ZAFH – PHOTON^{n}

PHOTONische Verfahren in neuen Dimensionen

Hochschule **Aalen**

(Sprecher: Prof. Dr. Herbert Schneckenburger)

im Verbund mit den Hochschulen

Furtwangen, Konstanz, Mannheim,

Offenburg und **Reutlingen**

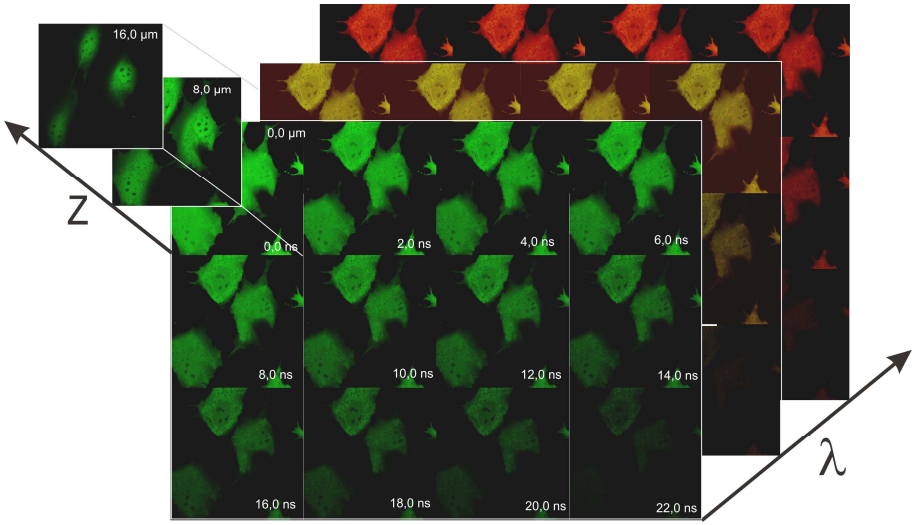
Struktur und Teilprojekte

ZAFH – PHOTON^n: PHOTONische Verfahren in neuen Dimensionen	
Multidimensionale Mikroskopie	***Photonische Sensorik***
TP 1.1. Tiefenauflösendes Imaging	TP 2.1. Miniatur-Lasersensor
TP 1.2. 3D-Laserpinzette	TP 2.2. Faseroptischer Gassensor
TP 1.3. Multispektrales Imaging	TP 2.3. Fabry-Pérot-Biosensor
	TP 2.4. 4D-Fertigungsmesstechnik

Multidimensionale Mikroskopie

Ziele:

- Tiefenauflösung
- Spectral Imaging
- Fluorescence Lifetime Imaging
- Diffus-optische Abbildung
- Laser-Mikromanipulation



Teilprojekte	Kurztitel	Kooperationen	Leitung
1.1.	Tiefenauflösendes Imaging	AA, KN, FU und MA (ILM UL u. Uni HD)	HS AA
1.2.	3D-Laserpinzette	OG, FU und AA (ILM UL)	HS OG
1.3.	Multispektrales Imaging	RT und MA (ILM UL)	HS RT

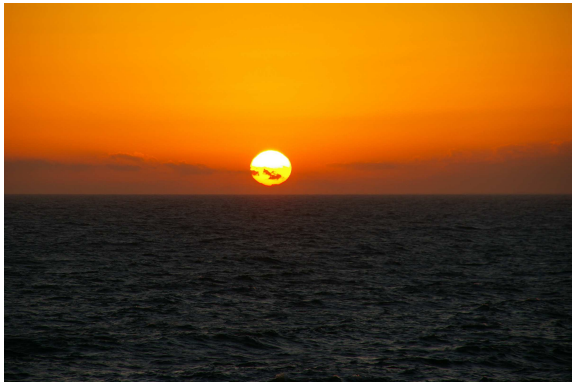
Tiefenauflösende Mikroskopie an lebenden Zellen

Leitbild:

- Limitierte Lichtdosis zur Erhaltung der Zellvitalität

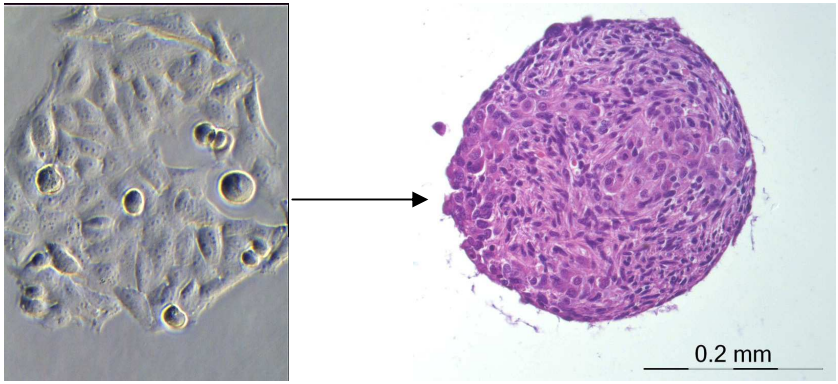
Solarkonstante: 1 kW/m² = 100 mW/cm²
= 1 mW/mm² = 1 nW/µm²

Messzeit: 2,5 s – 30 min.



- 3D Zellsysteme

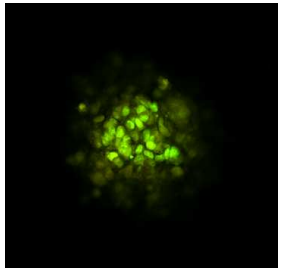
beschreiben (Tumor-) Zellen
im Gewebeverband besser als
herkömmliche 2D Modelle



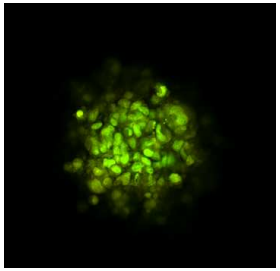
Tiefenauflösende Mikroskopie an lebenden Zellen

Methoden:

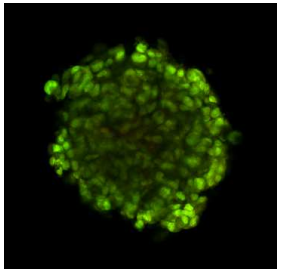
- Laser-Scanning-Mikroskopie (LSM)



z = 22 µm



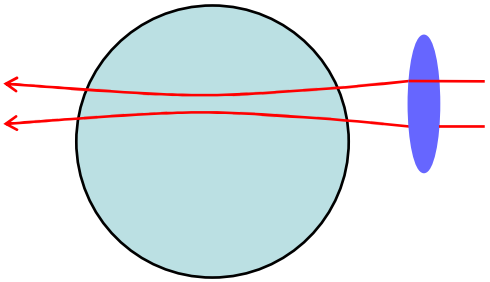
z = 28 µm



z = 74 µm

- Strukturierte Beleuchtung

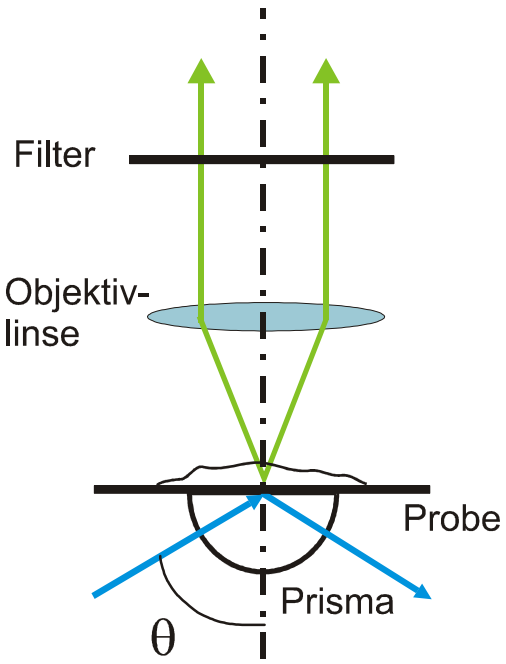
- Lichtscheiben-Mikroskopie (LSFM, SPIM)



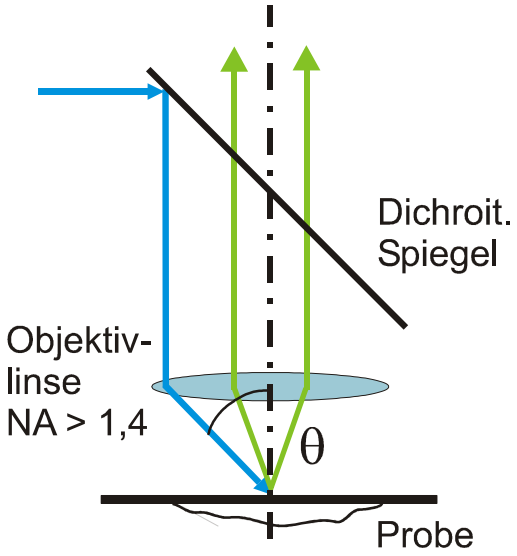
- Totalreflexions-Fluoreszenzmikroskopie (TIRFM)
  Zelloberflächen, Plasmamembranen

Totalreflexionsmikroskopie (TIRFM)

Prismen-gekoppelte TIRFM



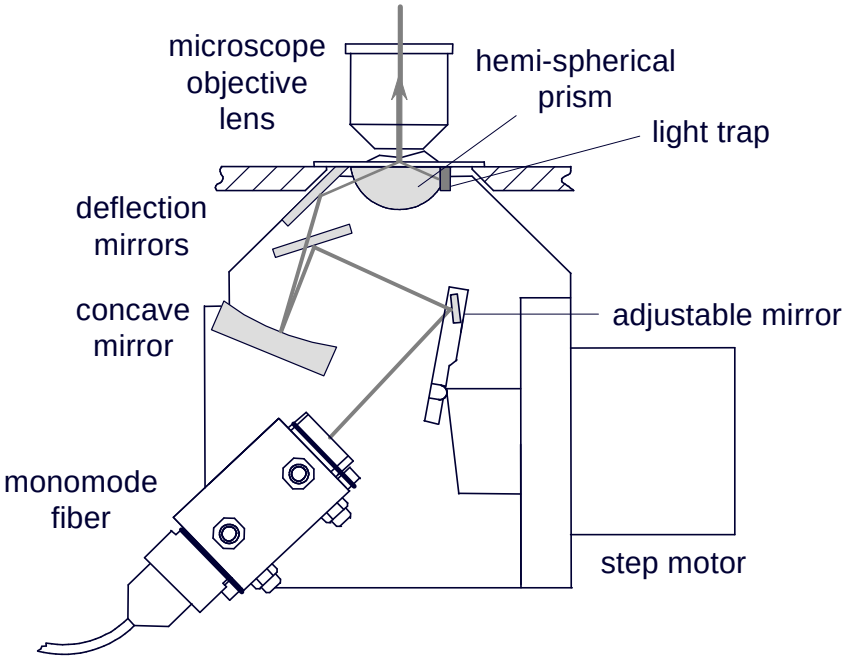
Objektiv-gekoppelte TIRFM

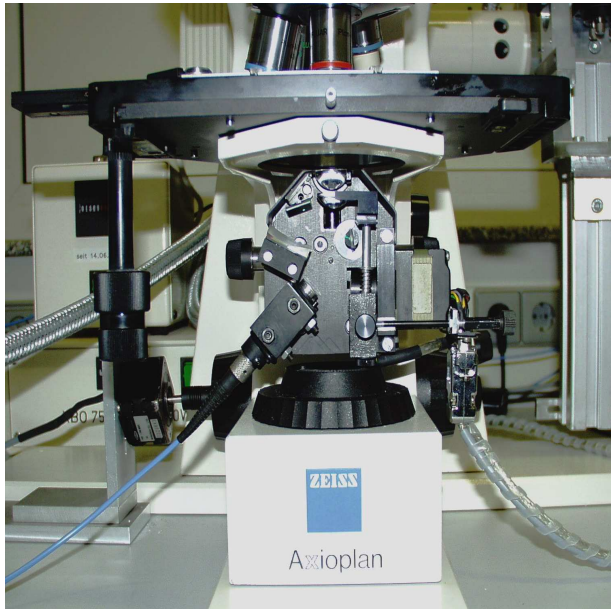


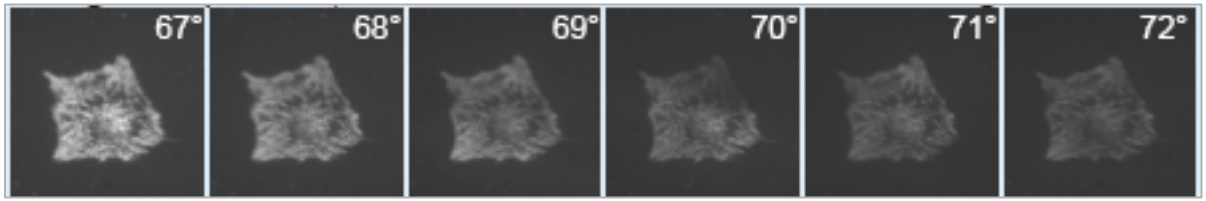
Θ Variabel → d = 50….300 nm
Objektiv + Messfeld variabel
Eigenbau

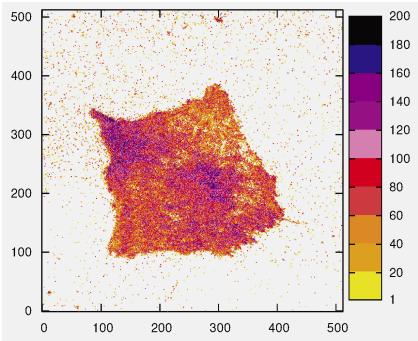
Θ wenig variabel → d ≈ 100 nm
Objektiv + Messfeld vorgegeben
kommerziell

Tiefenauflösende Totalreflexionsmikroskopie (TIRFM)



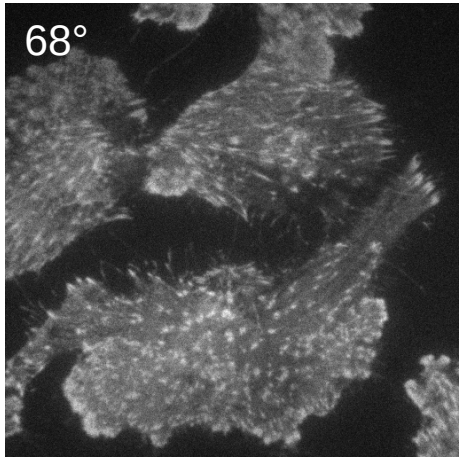


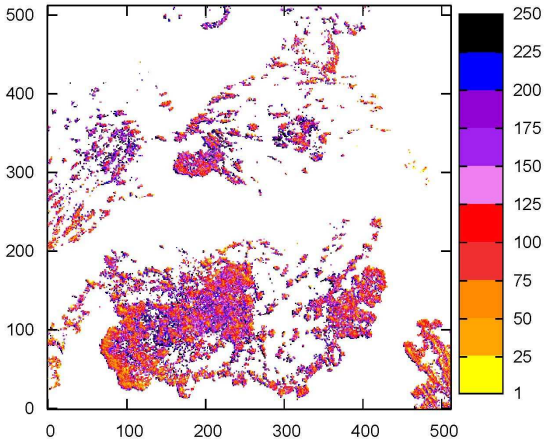




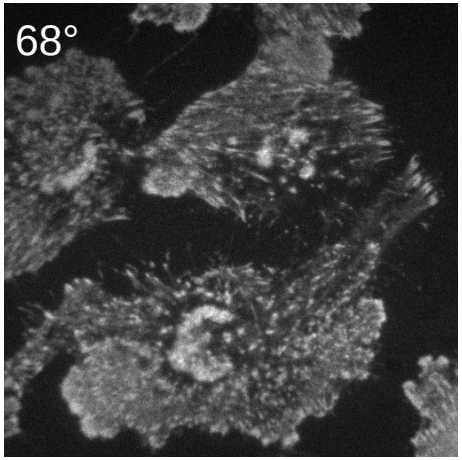
Zell-Substrat-Topologie (Protoporphyrin IX)

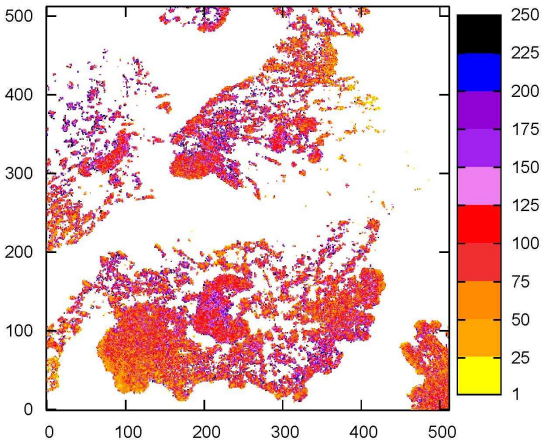
vor Laserbestrahlung





nach Laserbest. (633 nm, 4 J/cm²)



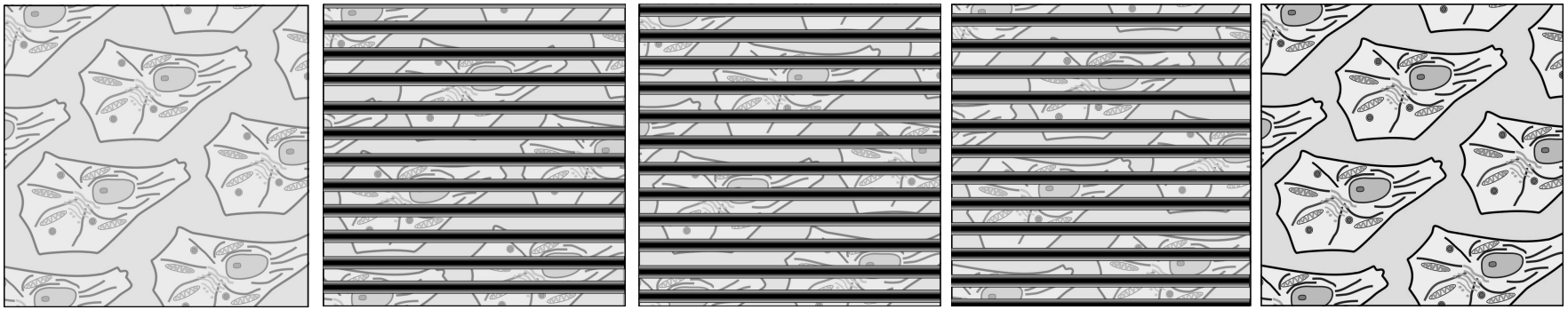


Tiefenauflösung durch Strukturierte Beleuchtung

Optisches Gitter: $I = I_0 + I_C \cos\Phi + I_S \sin\Phi$ wird in die Probenebene abgebildet

Schnittbild: $I = [(I_1 - I_2)^2 + (I_1 - I_3)^2 + (I_2 - I_3)^2]^{1/2}$

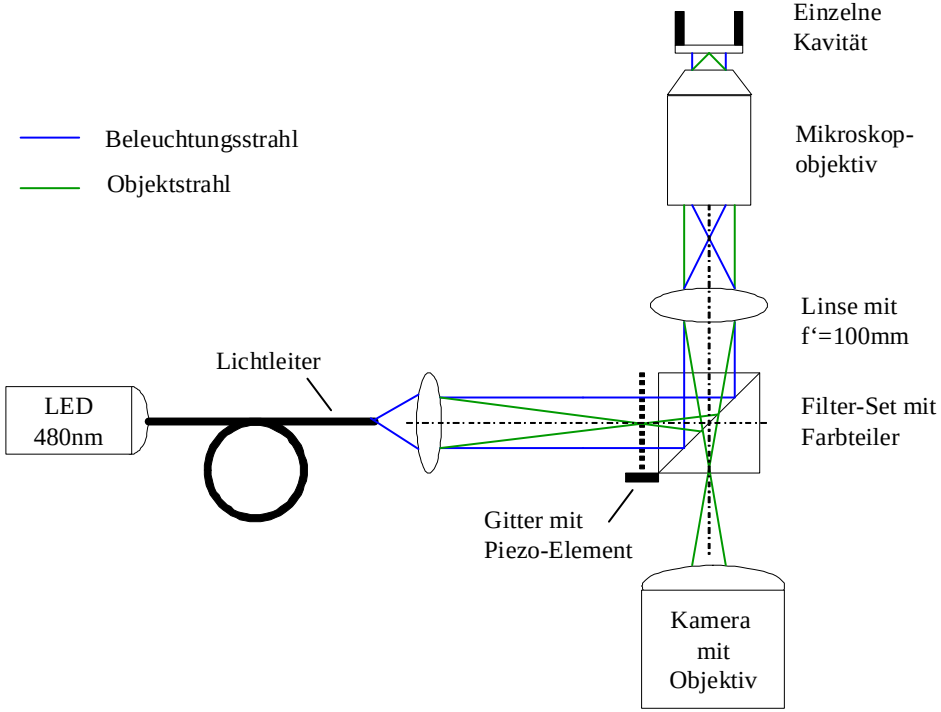
Konventionelles Bild: $I = (I_1 + I_2 + I_3) / 3$

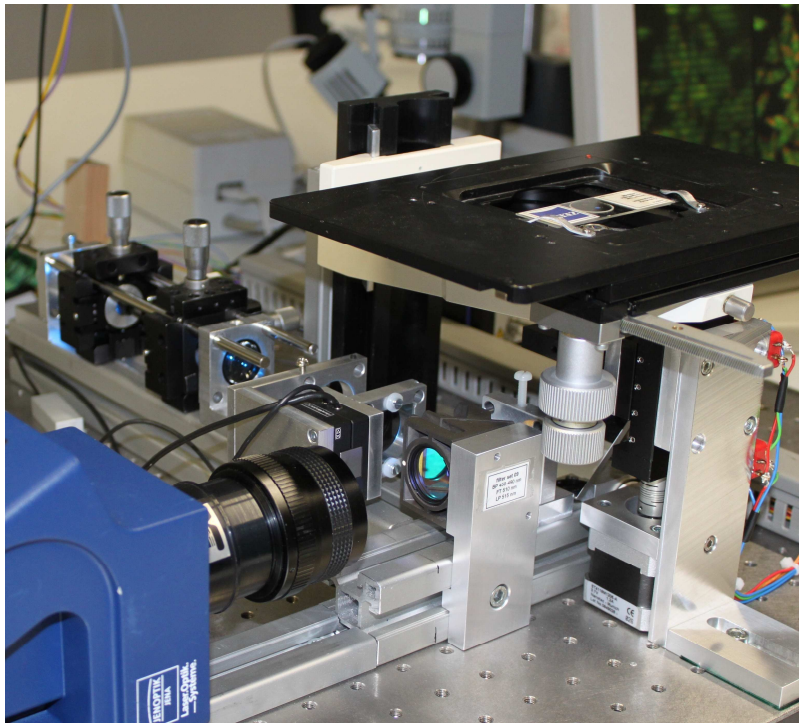


Ursprüngl. Bild $\Phi_1 = 0 \rightarrow I_1$ $\Phi_2 = 2\pi/3 \rightarrow I_2$ $\Phi_3 = 4\pi/3 \rightarrow I_3$ Schnittbild

A.A. Neil, R. Juskaitis, T. Wilson: Opt. Lett. 22 (1997) 1905–1907

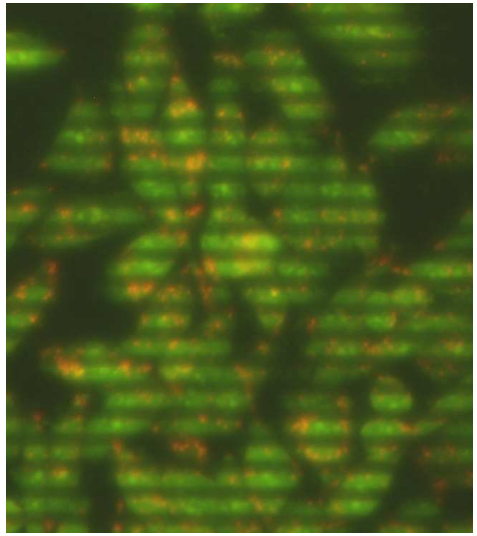
Aufbau zum tiefenauflösenden Imaging



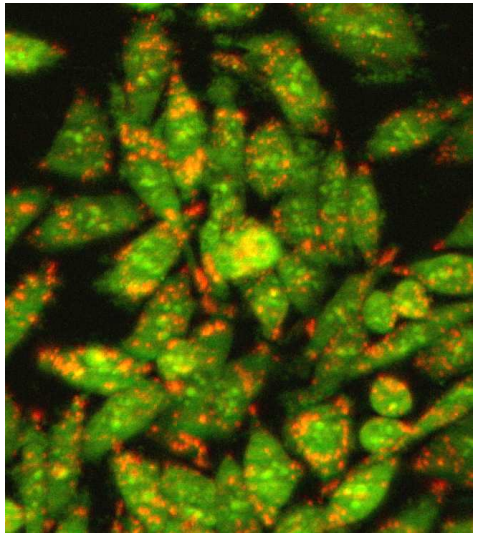


Tiefenauflösendes Imaging/ Strukturierte Beleuchtung

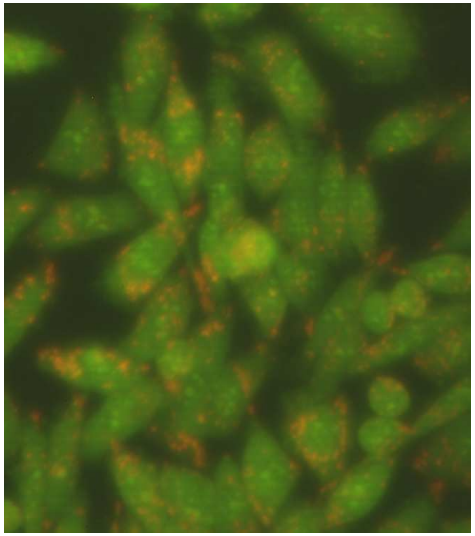
CHO Ovarialkarzinomzellen + Acridin Orange (5 µM; 30 min.)



Strukturierte Beleuchtung



Schnittbild

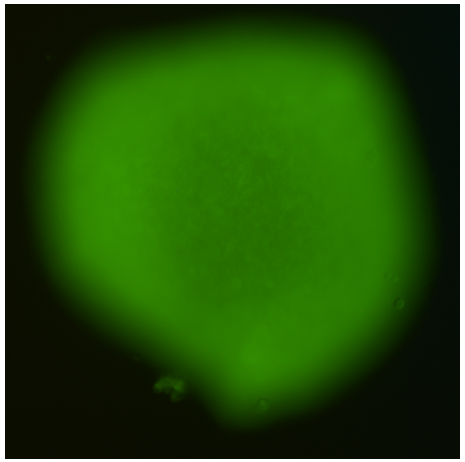


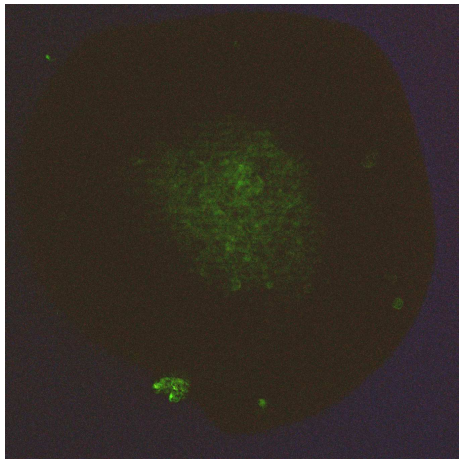
konventionelles Bild

Tiefenauflös. Imaging von Tumorzellsphäroiden

CHO-EGFP-Mem – Strukturierte Beleuchtung

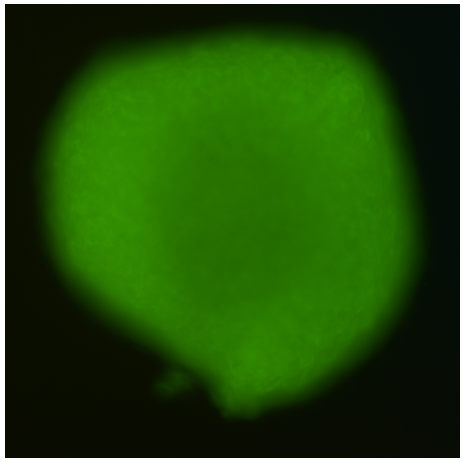
konventionell
z = 0 µm

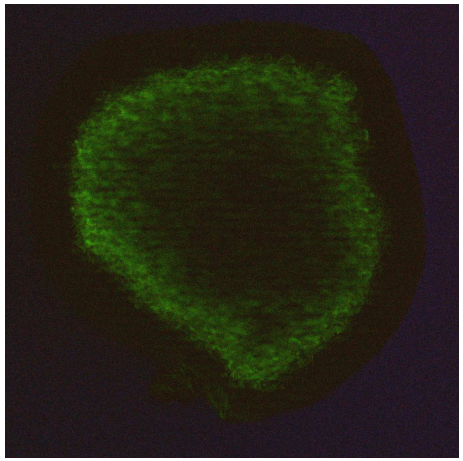




strukturiert
z = 0 µm

konventionell
z = 70 µm

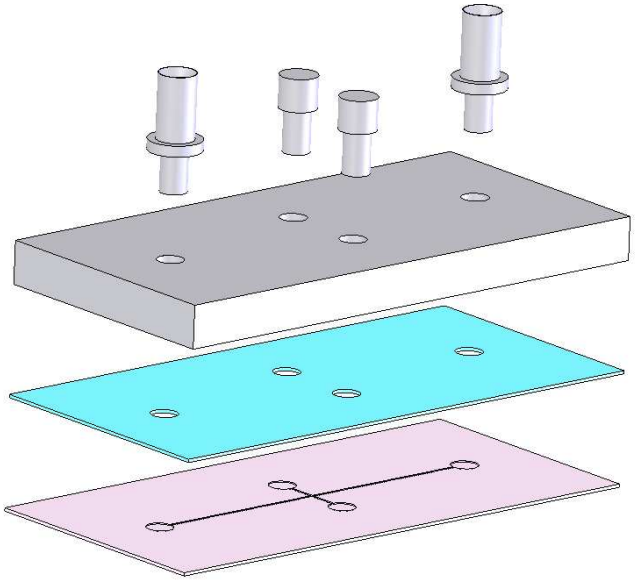


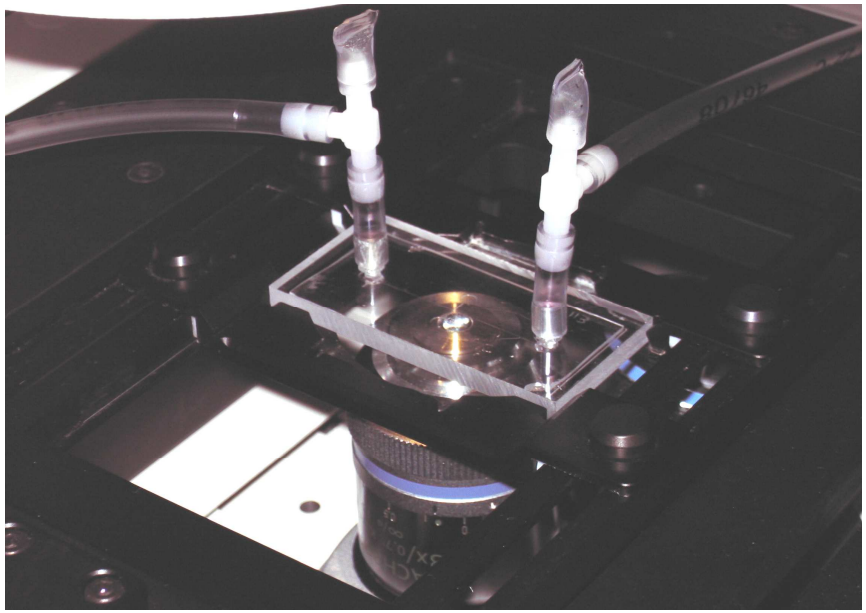


strukturiert
z = 70 µm

Lasermikromanipulation / Single cell Sorting

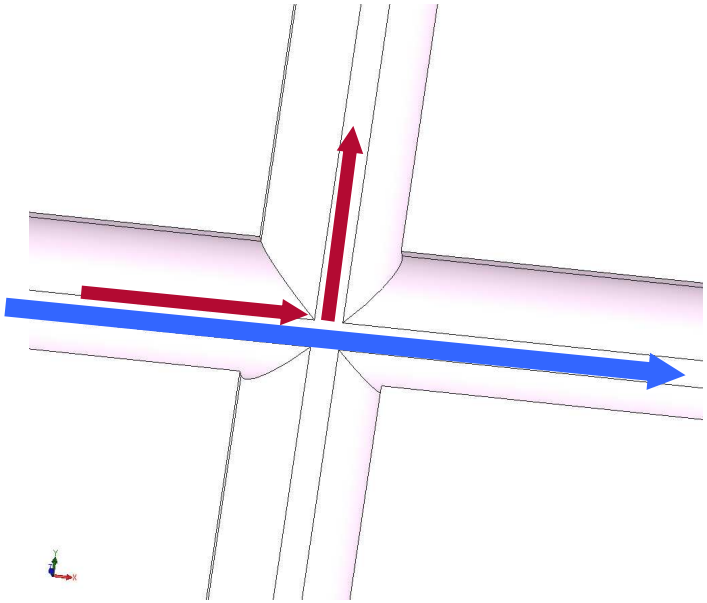
Ziele:
- Isolierung einzelner genetisch veränderter Zellen
- Kombination von Mikrofluidsystem und Laserpinzette
- aktives Cell Sorting





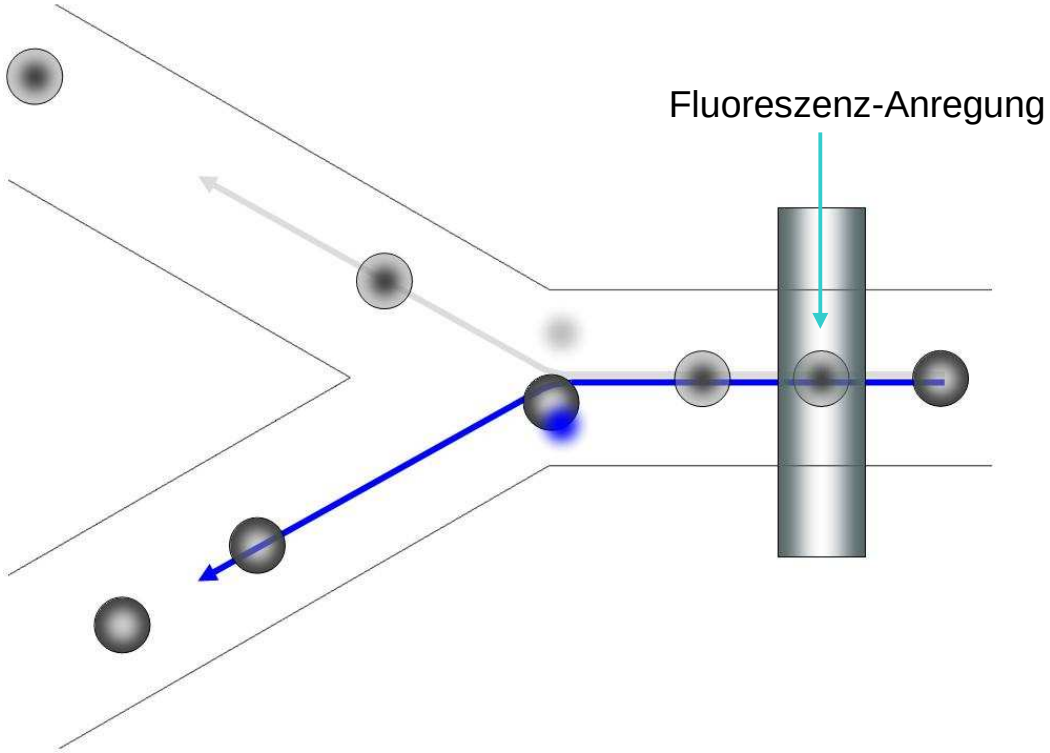
Lasermikromanipulation / Single cell Sorting

Einzelzellsortierung im Mikrofluidsystem mit der Laserpinzette



Zukunftsvision: Active Cell Sorting

Einzelzellsortierung im Mikrofluidsystem mit der Laserpinzette
bei minimaler Lichtexposition



Tiefenauflösende Mikroskopie: Weitere Ziele

- Markerfreie Mikroskopie (Autofluoreszenz, Raman)

  → laufende Projekte (BMBF, Landesstiftung BW)

- Fluorescence Lifetime Imaging Microscopy (FLIM)

  → Erweiterungen geplant

- Lichtscheiben-Mikroskopie (SPIM) → in Vorbereitung

- Dosis-limitierte Mikroskopie

  → laufendes Projekt des Landes BW

Alle Methoden zielen auf eine Erkennung zellulärer Mechanismen, Erkennung von Krankheiten (z.B. Krebs, Alzheimer) oder Wirkstoffforschung

Beiträge der Partner

- TIRFM, Strukturierte Beleuchtung, (SPIM): Hochschule Aalen
- Mikrofluidik + Laserpinzette: Hochschule Aalen
- Holographische Mikroskopie: Hochschule Offenburg
- Zellsysteme: Hochschule Mannheim, ILM Ulm
- Mikrospektralanalyse: Hochschule Reutlingen, ILM Ulm
- Mikrostrukturierung: Hochschule Furtwangen