Hochschule Aalen
Hochschule Reutlingen
Reutlingen University
Syddansk Universitet
Ruprecht-Karls-Universität Heidelberg
hochschule mannheim

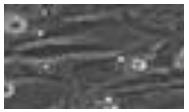
ZAFH – PHOTON ^{n}
PHOTONische Verfahren in neuen Dimensionen

Schwerpunkt 1: Multidimensionale Mikroskopie

Laser-induzierte Autofluoreszenzmessungen in isogenen Tumormodellen

H. Kuhn, A. Holloschi, C. Müller, M. Rauen, M. Worf, S. Mutyam, S. Blaich, T. Röder, A. von Deimling, J. Mollenhauer, P. Kioschis

Herstellung und Anwendung isogener Zellmodelle



Ausgangszelllinie
(Krankheitsphänotyp, z.B. Glioblastom)

↓ "single-site" Rekombination

Akzeptor-Zelllinie

Addition oder Inaktivierung eines Gens ↙

↘ Zugabe anderer Komponenten

Gleiche Integrationsstelle bei gleichem genetischen Hintergund

↔ = ISOGEN

Ziel-Zelllinie
mit neuem Zielgen
(z.B. Krankheitsgen)

↓

Funktionelle Genomik
Zielmolekül-Identifizierung

↓

Zelllinien mit hoher Standardisierung
- Autofluoreszenz-Analysen

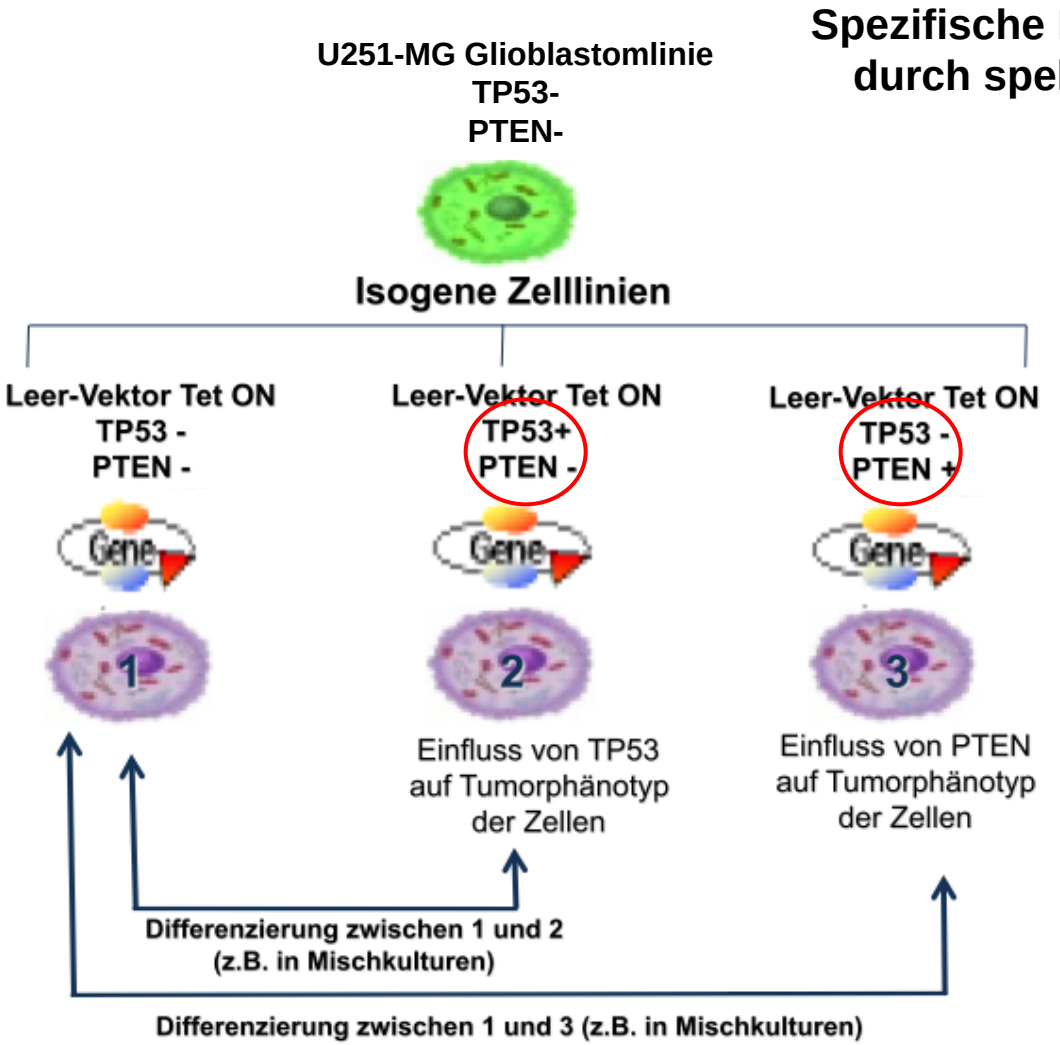
Kontroll-Zelllinie
(leere Integrationsstelle)

↓

"Synthetic lethal"
Wirkstoff-Screening

Entwicklung isogener Zelllinien

Glioblastom-Zelllinie U251-MG



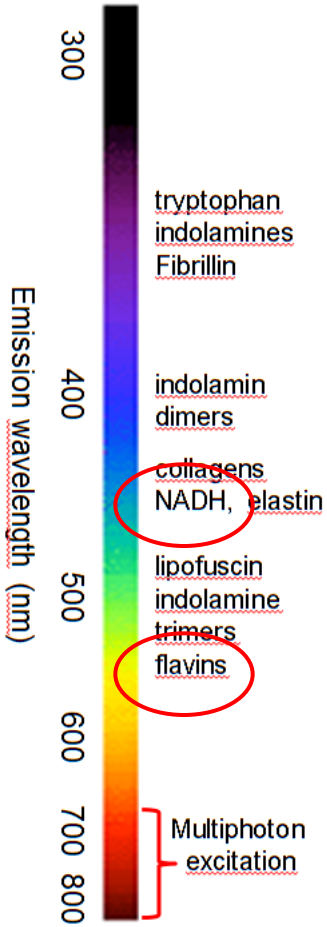
Spezifische Detektion unterschiedlicher Zelltypen durch spektrales Imaging der Autofluoreszenz

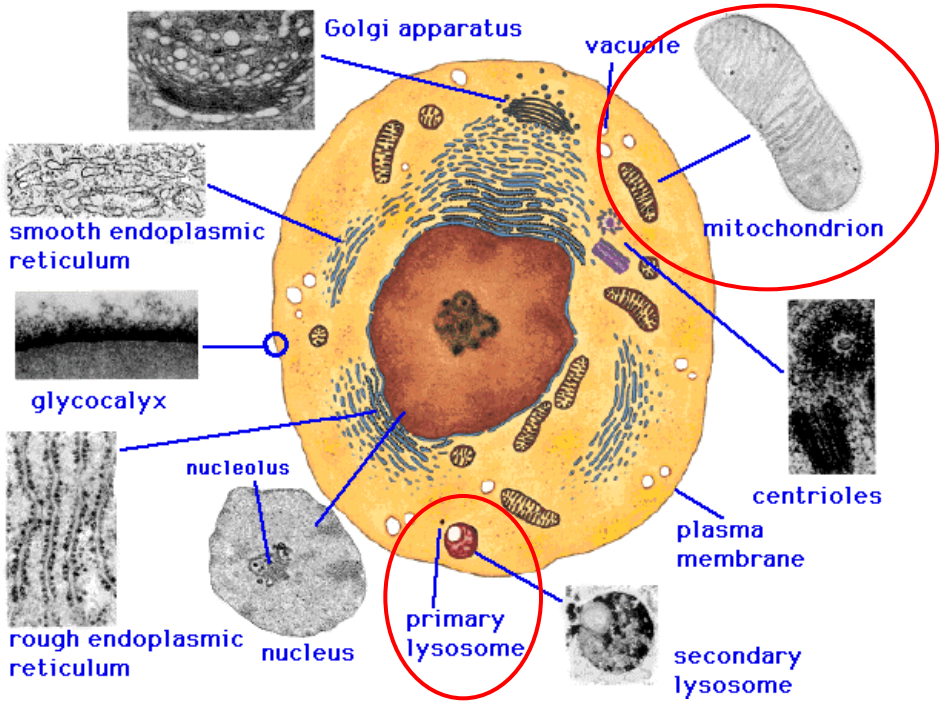
Isogene Tumorzelllinien mit induzierbarer Zielgen-Expression (TP53, PTEN: Tumorsuppressoren) und unterschiedlichen Tumor-spezifischen Charakteristika

Selektive Identifizierung von Zellen mit unterschiedlichen Tumor-spezifischen Eigenschaften durch tiefenauflösendes bzw. spektrales Imaging

Autofluoreszenz

Zelluläre Fluorophore





Animal cell
IHW, 2005

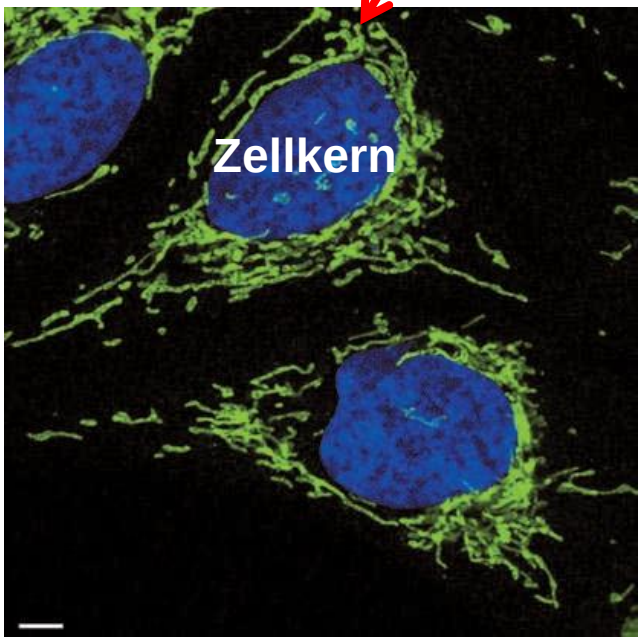
Mitochondrien

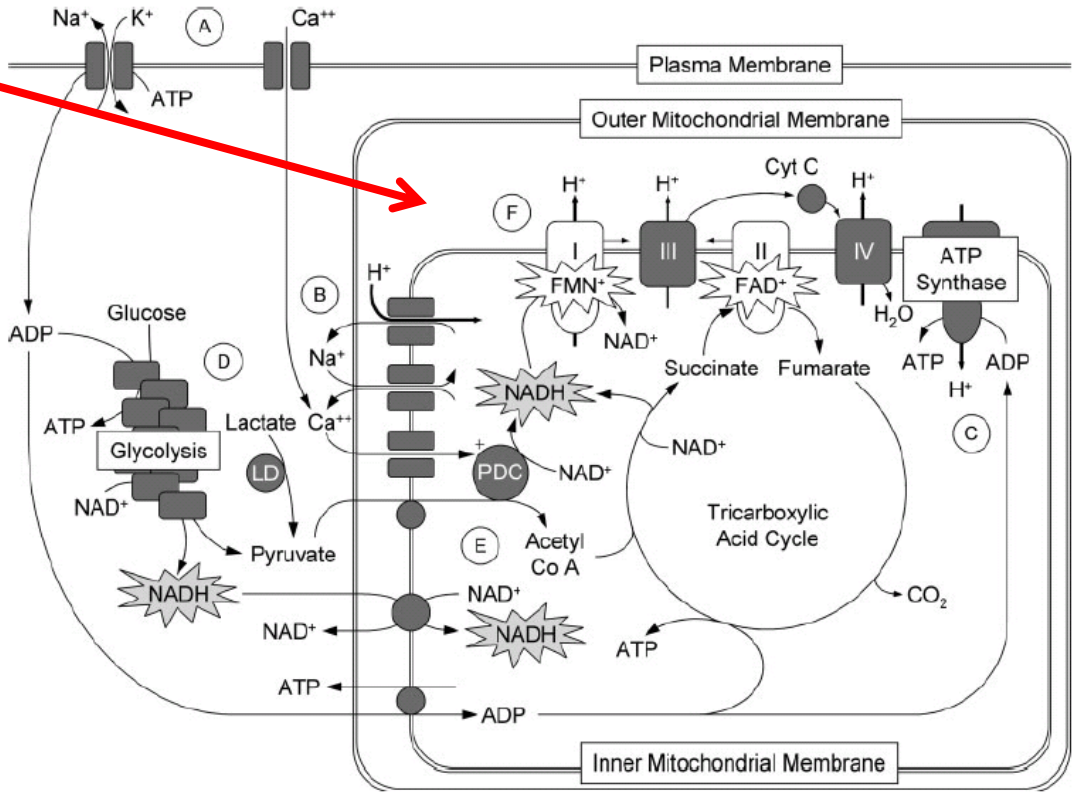
- Dynamische Struktur (**Fusion**, längliche netzartige Struktur = normale Zellfunktion **Fission**, punktförmig, vesikulär = veränderte Zellfunktion)
- Energiemetabolismus
- Signaling
- Apoptose
- Störungen - Krankheiten

Rodrigues et al. 2011
Westermann et al., 2010

- NADH und FAD Autofluoreszenz für Analysen der Morphologie von Mitochrondrien, Zellmetabolismus, des intrazellulären Redoxzustands, Sauerstoffmangels und von Störungen der Atmungskette

Mitochondrien

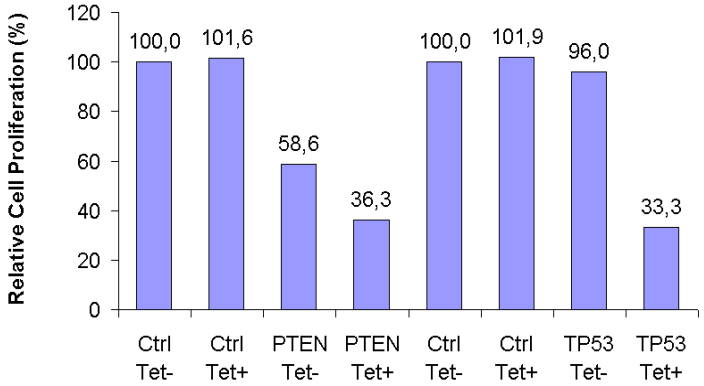




KC Reinert et al., 2007; Rodrigues et al. 2011; Westermann et al., 2010

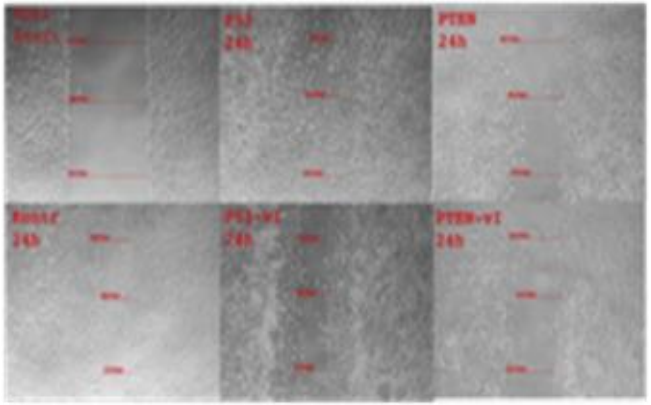
Zellmodell-Validierung: (Homogene) Expression der Zielgene im Modell

A



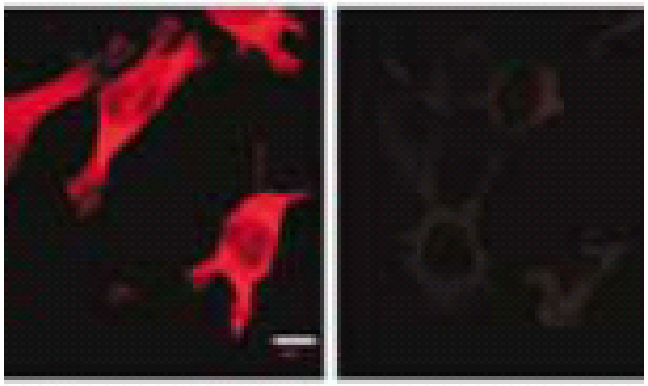
Proliferationsanalysen (Zellzahl; Zellvitalität)

B



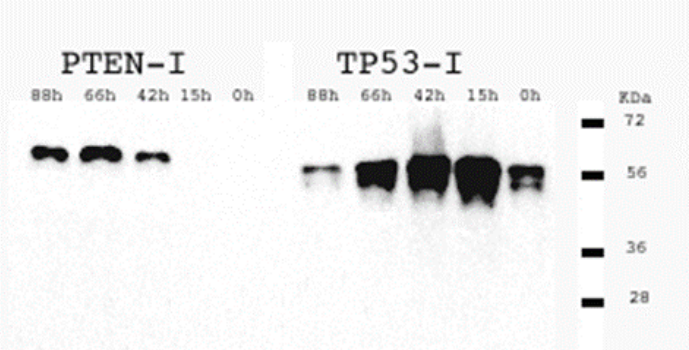
Scratch Assays (Proliferation)

C



Immuncytochemische Analysen

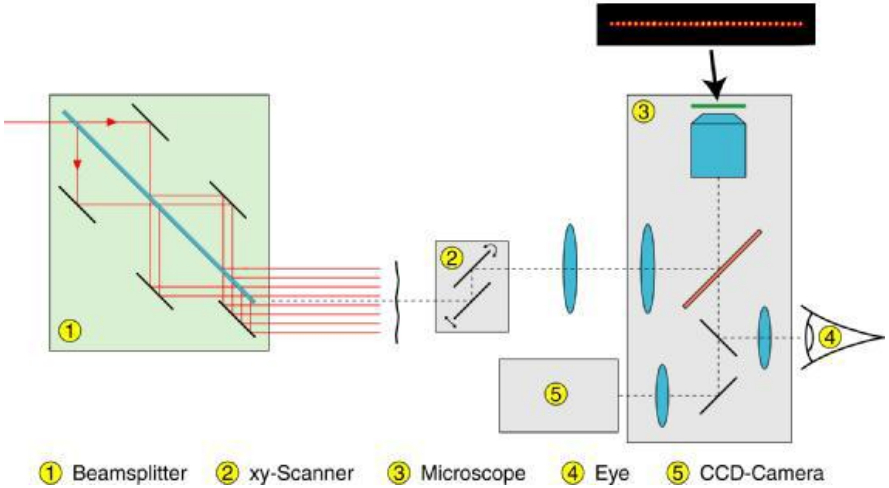
D



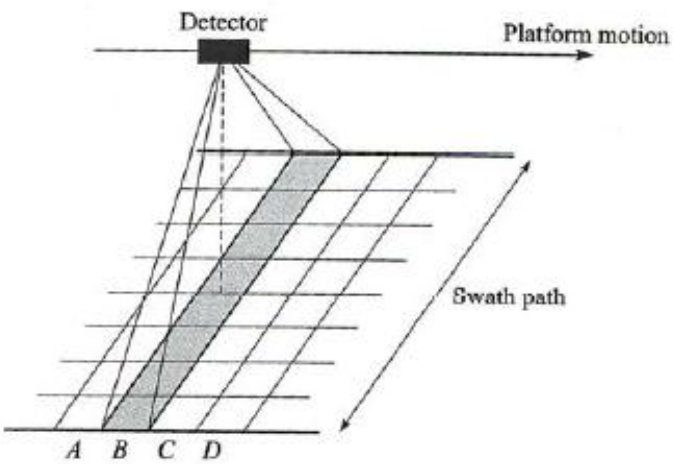
Western Blot Analysen

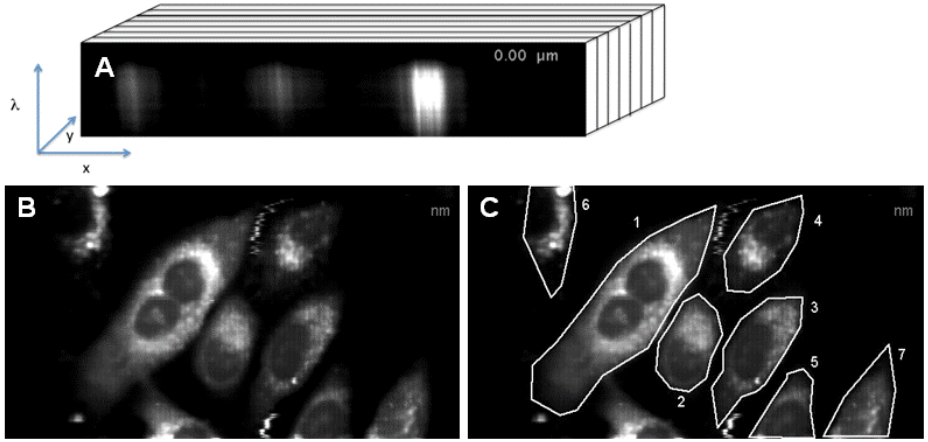
Tumor-Zellmodelle

Spektrales Imaging der Autofluoreszenz



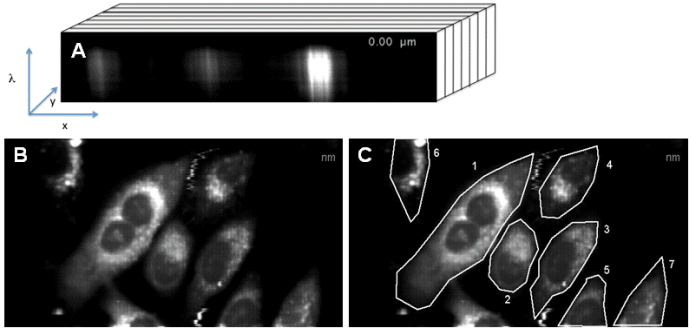
LaVision BioTec TriM Scope / Ti:Sa-Laser beam-multiplexer / xy-beamscanner

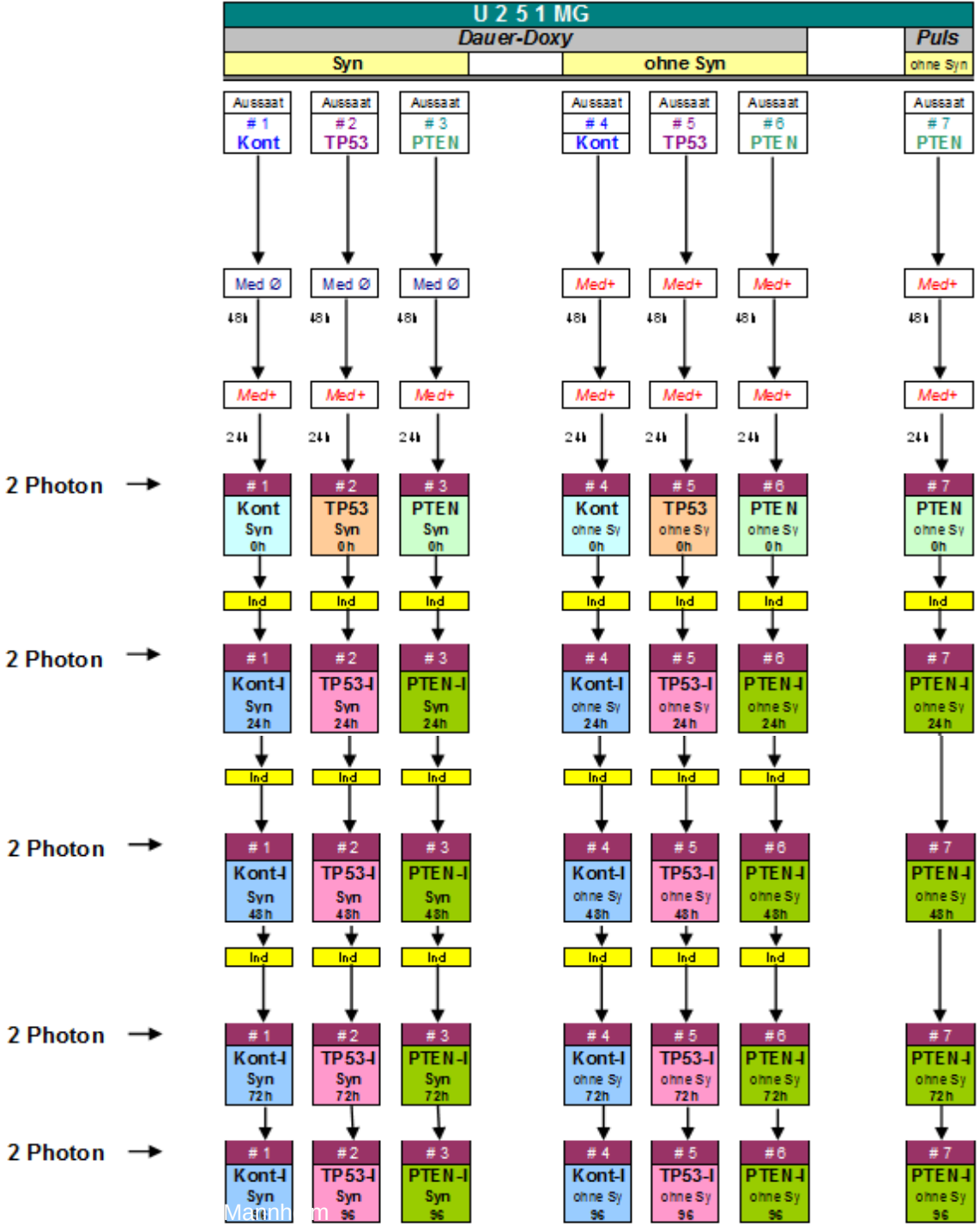




- Selektion von Einzelzellen (ca. 10 Zellen / Messung)
- Anregungswellenlängen: 750nm, 800 nm, 850nm und 880 nm
- Scanbereich von 75µm x 150µm
- subzelluläre Auflösung
- Autofluoreszenz-Emissionsspektren / Auflösung 2nm (zwischen 367nm bis 627 nm)

Tumor-Zellmodelle: Kultivierungs- und Meßablauf





Tumor-Zellmodelle

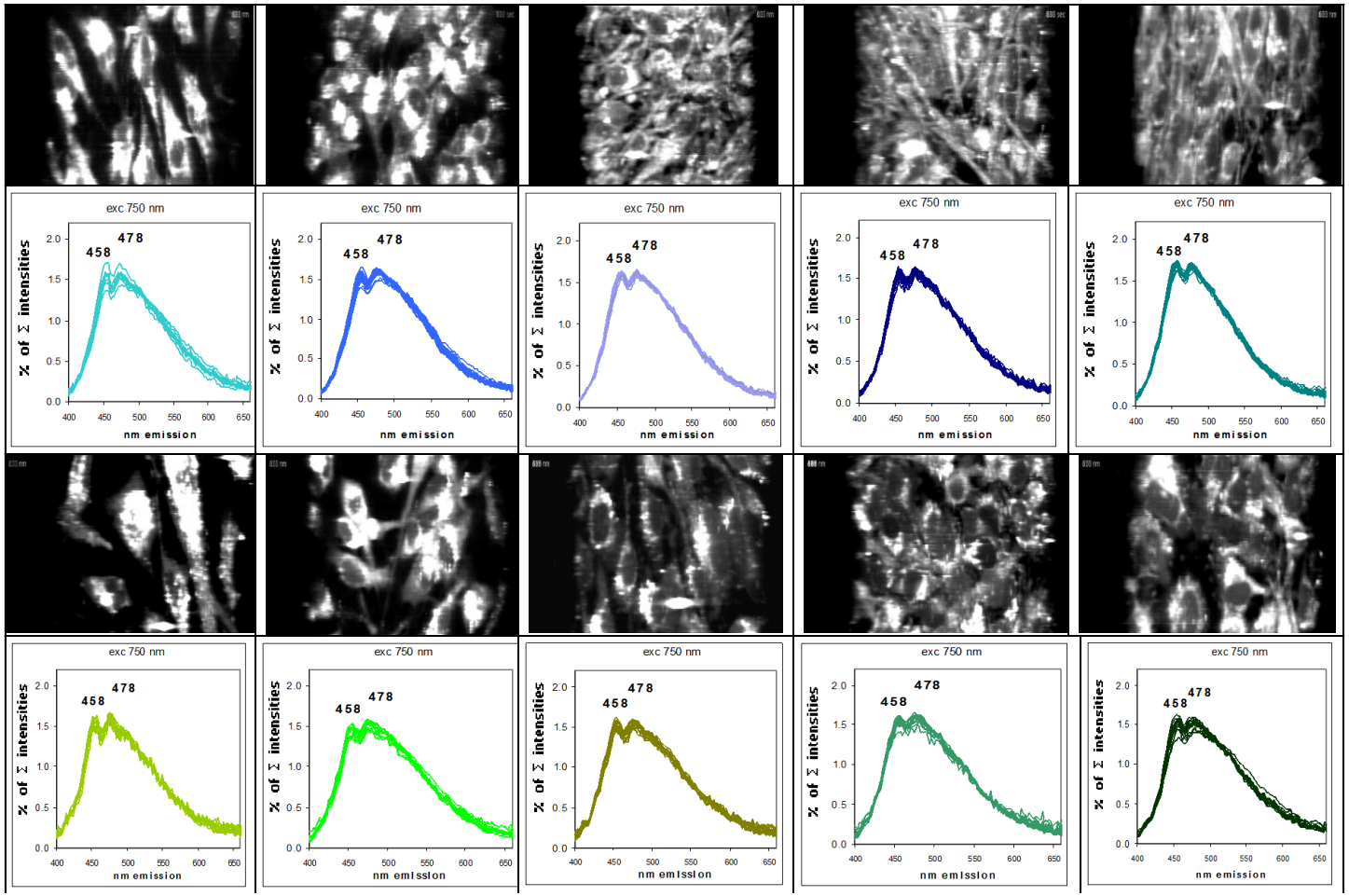
Spektrales Imaging der Autofluoreszenz

Stunden nach Induktion

U251MG 0h 16h 39h 64h 88h

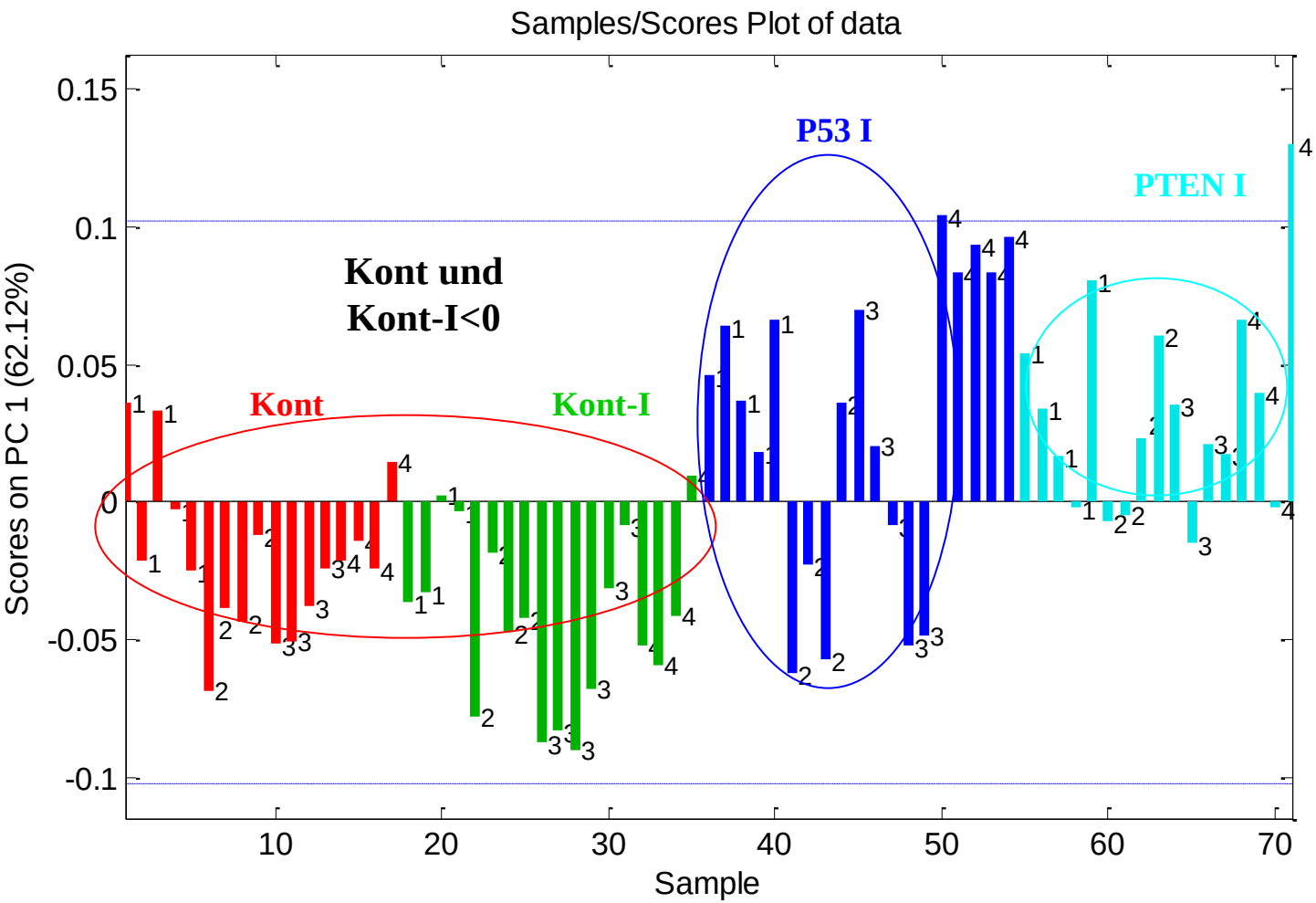
Kont

PTEN



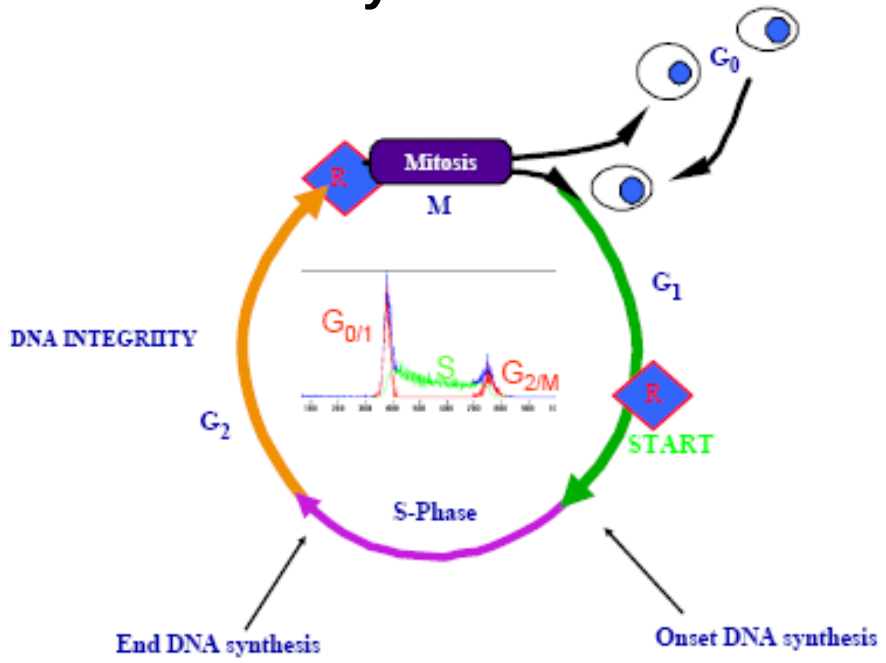
Isogenes Glioblastom-Modell

Multivariate Datenanalyse
Score Plot PC 1
Anregung 750nm



© Kessler et.al.: Prozessanalytik, Hochschule Reutlingen-Reutlingen University

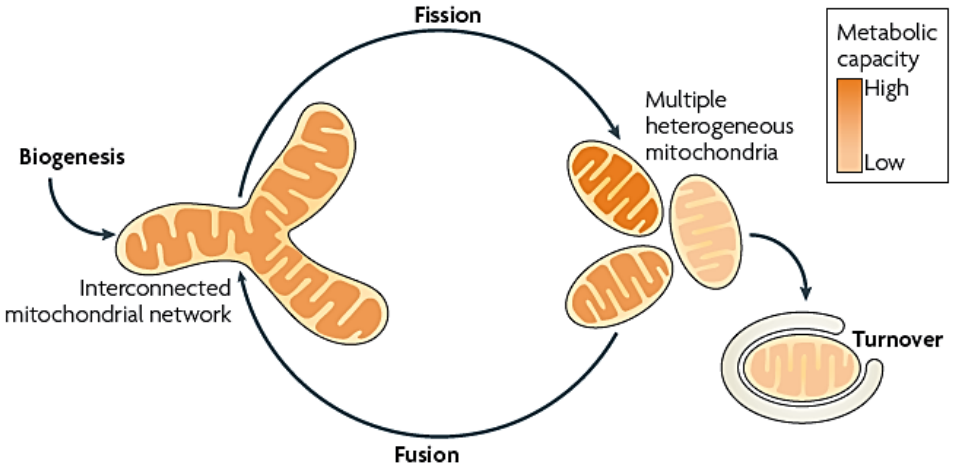
Zellzyklus



Phasen- Synchronisation (Vereinheitlichung der Zellpopulation)

1) Serumentzug: Arretierung G_0 – Phase
2) Serumzugabe: Synchronisierte Proliferation bis zu 60h

Mitochondriale Dynamik



Biogenese von Mitochondrien

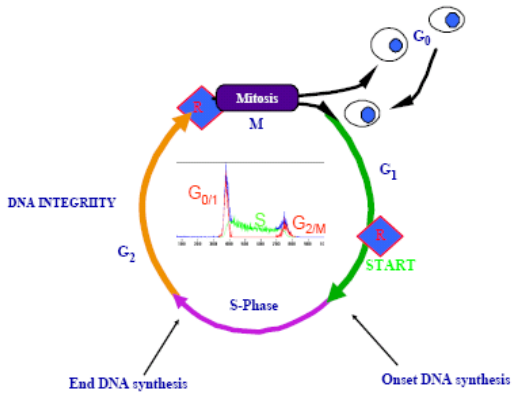
- Wachstum, Teilung und Mitophagie (turnover).
- fusion / fission: Generierung von heterogenen Mitochondrien oder von mitochondrialen Netzwerken in Abhängigkeit der pyhsiologischen Bedingungen.

Westermann et al., Nat. Rev. Mol. Cell Biol. 2010, Mitochondrial fusion and fission in cell life and death

Isogenes Glioblastom-Modell

Synchronisation NADH (geb. / frei)

- Synchronisierung



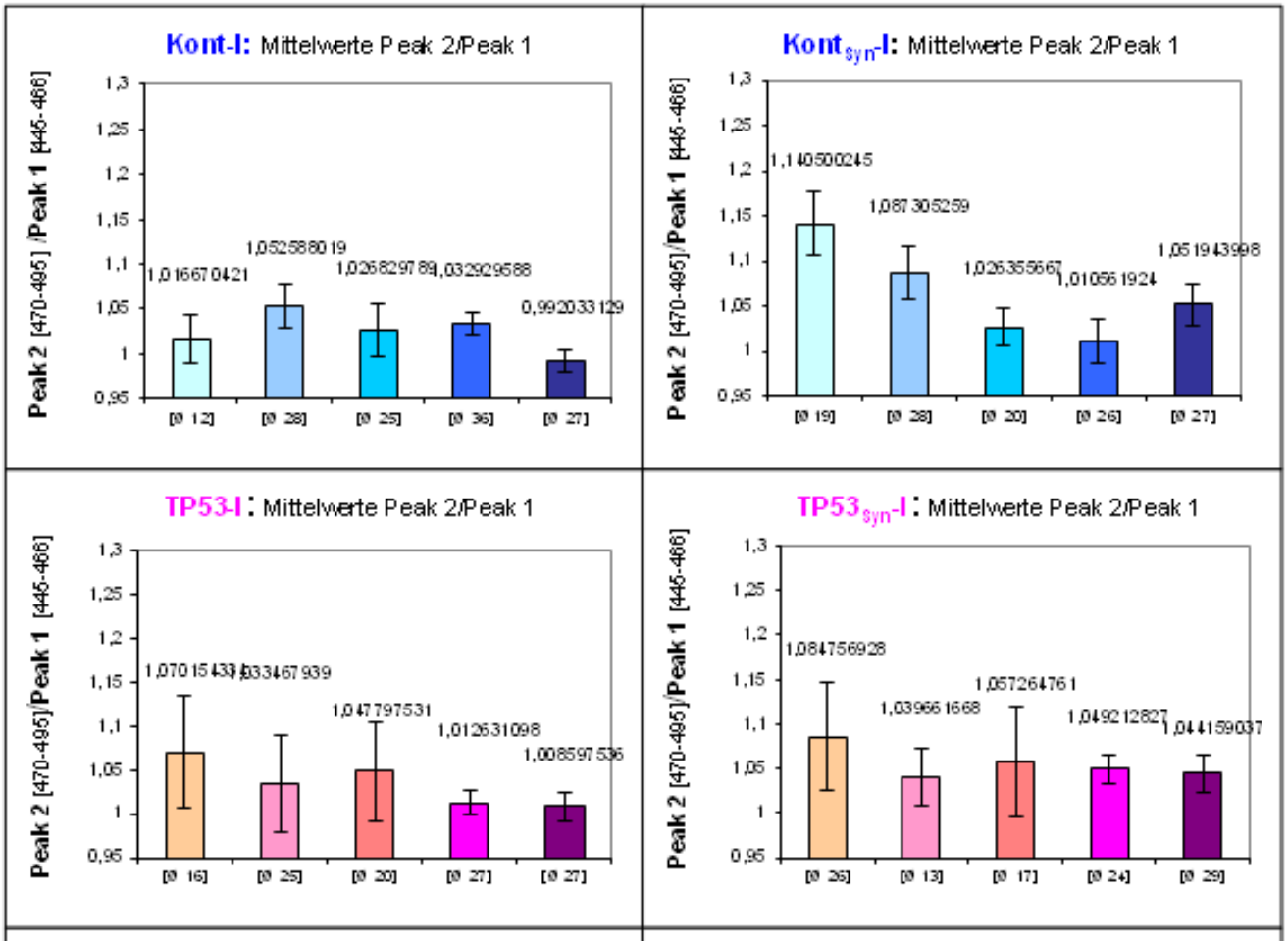
Verhältnis von freiem zu gebundenem NADH [exc 750 nm]

[Kin 4]

Mittelwerte, normiert

Peak 1 [445-466] = Protein-gebundenes NADH

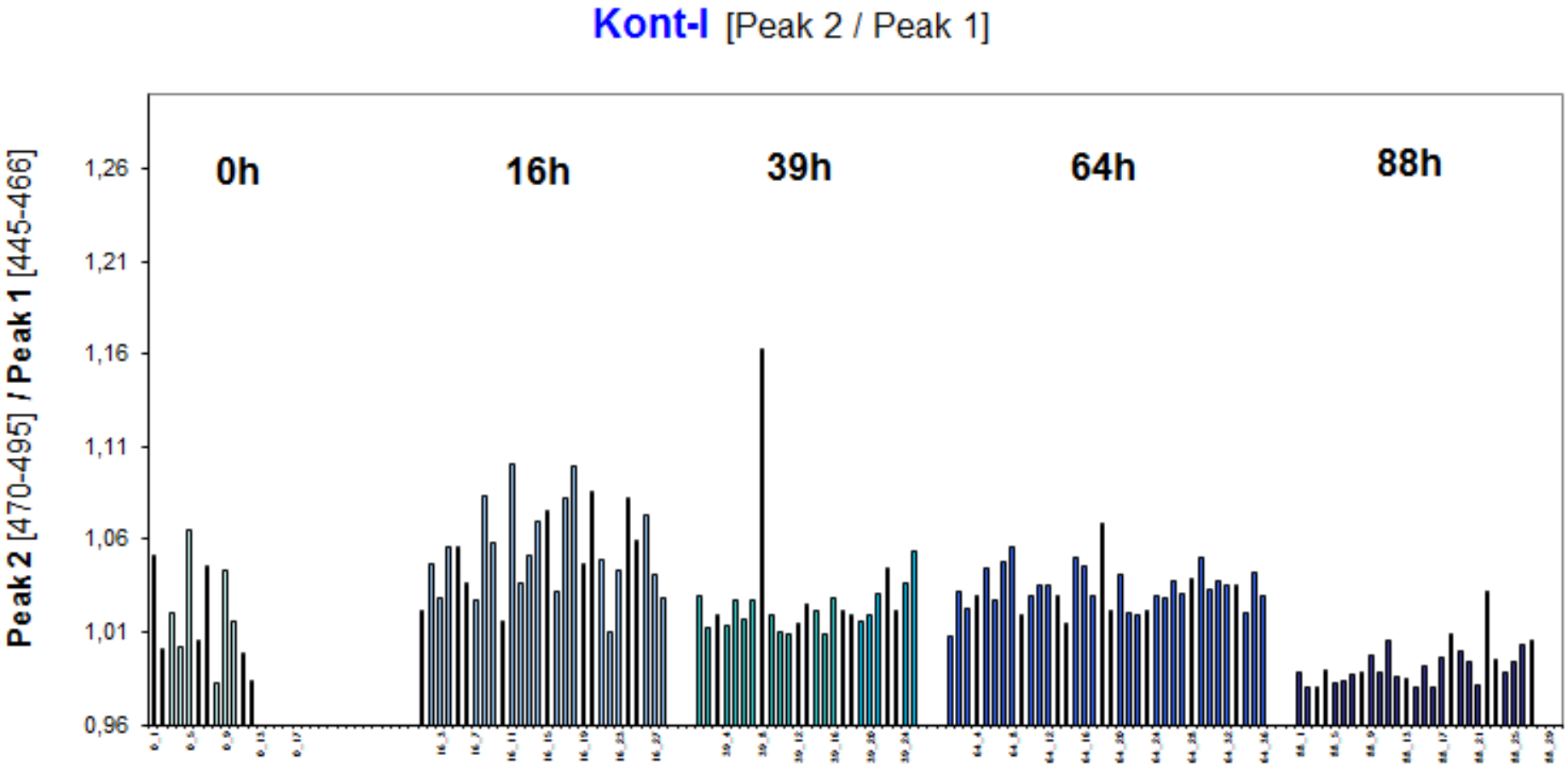
Peak 2 [470-495] = freies NADH



Isogenes Glioblastom-Modell

Analyse NADH (geb. / frei)

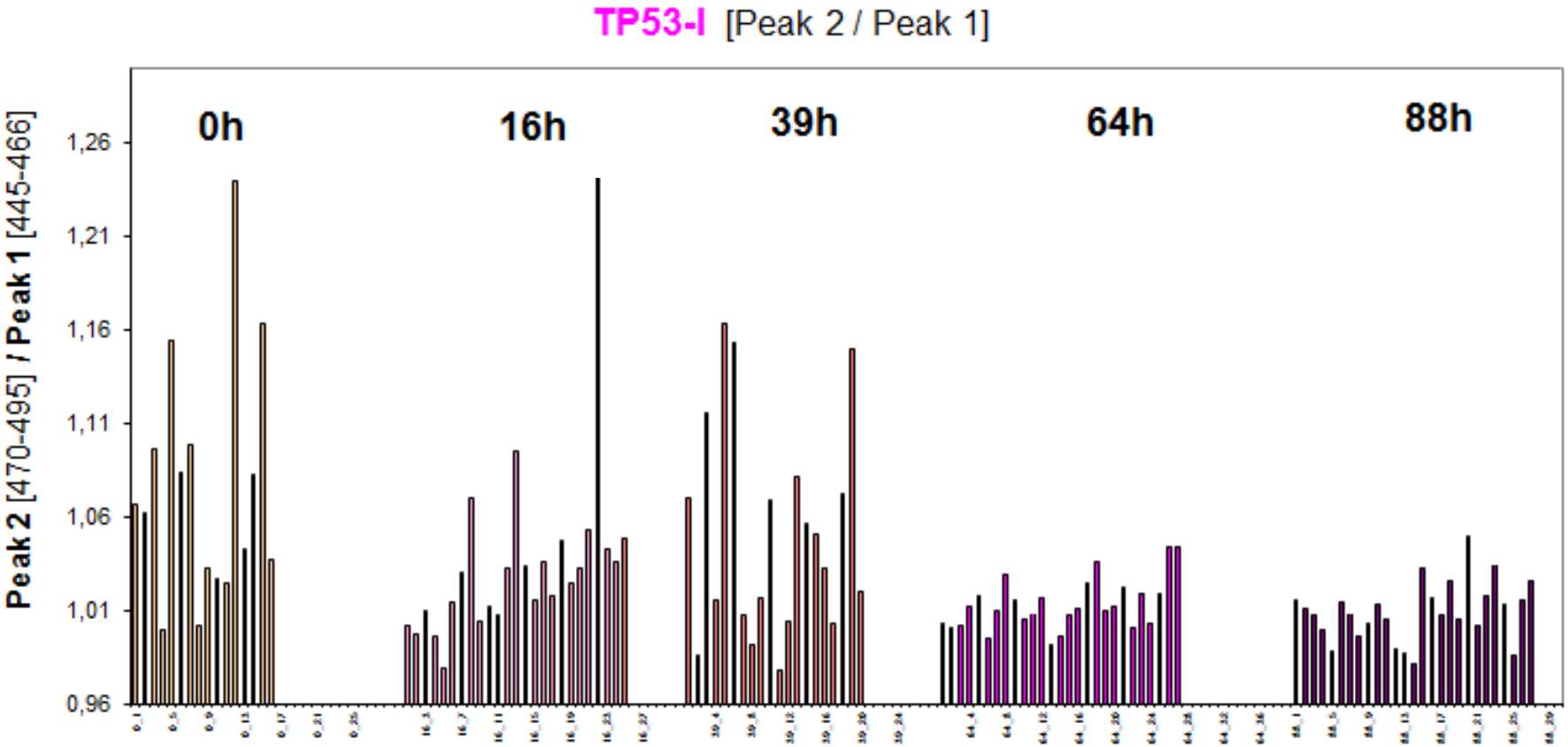
Einzelzellanalyse NADH (Verhältnis geb./frei): Veränderung über die Kultivierungsdauer > 100 Zellen



Isogenes Glioblastom-Modell

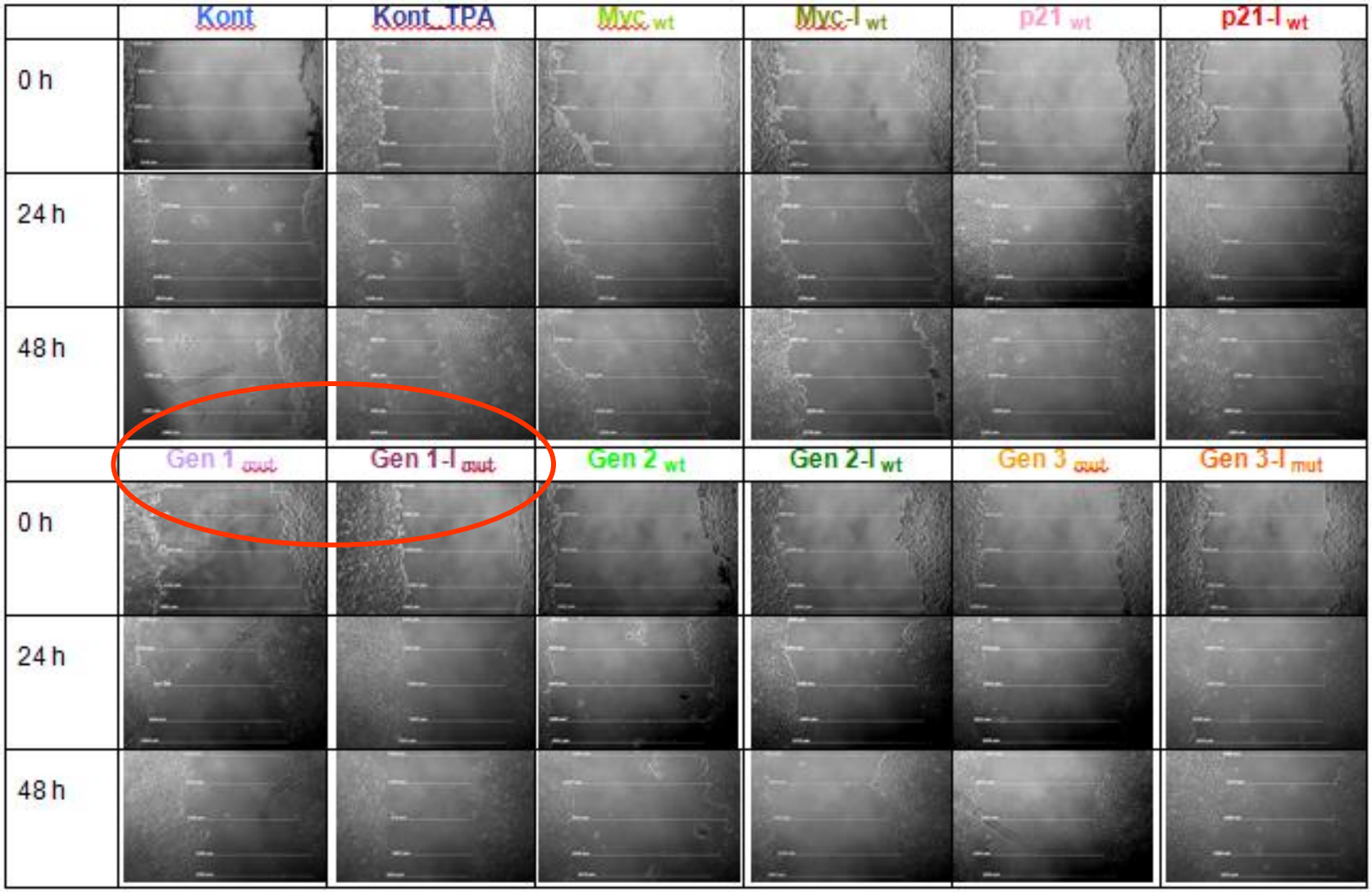
Analyse NADH (geb. / frei)

Einzelzellanalyse NADH (Verhältnis geb./frei): Veränderung über die Kultivierungsdauer > 100 Zellen



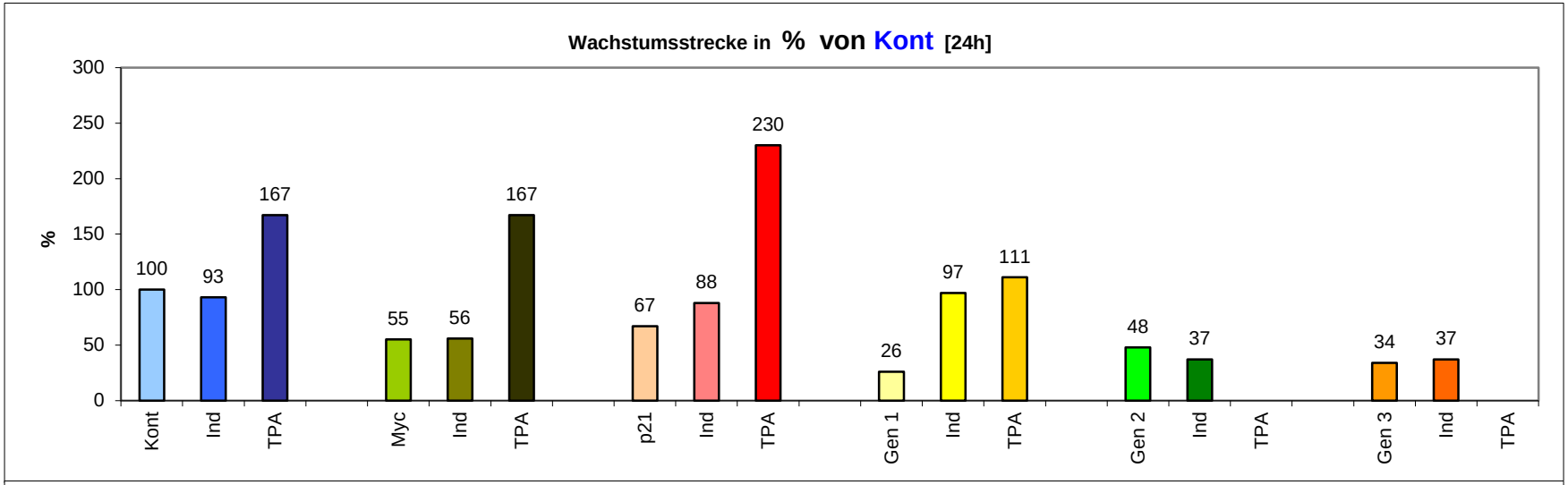
Übertragung auf andere Tumormodelle

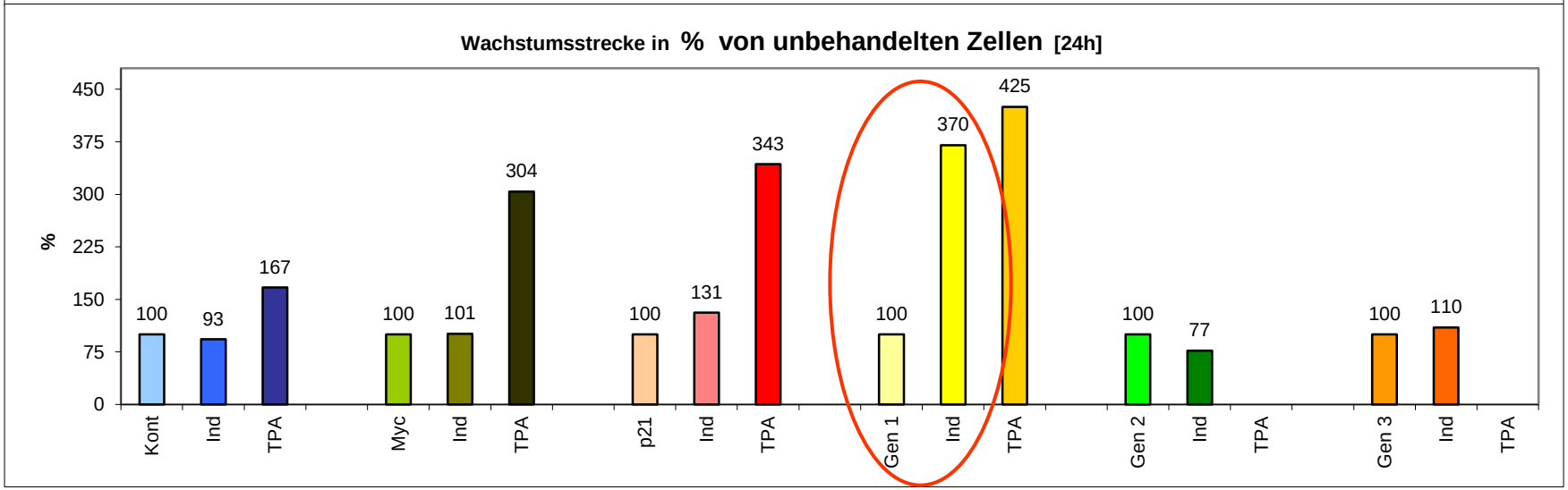
Isogenes Brustkrebs-Zellmodell: Wundheilungstest
(Proliferation / Migration)



Übertragung auf andere Tumormodelle

Isogenes Brustkrebs-Zellmodell: Wundheilungstest (Proliferation / Migration)

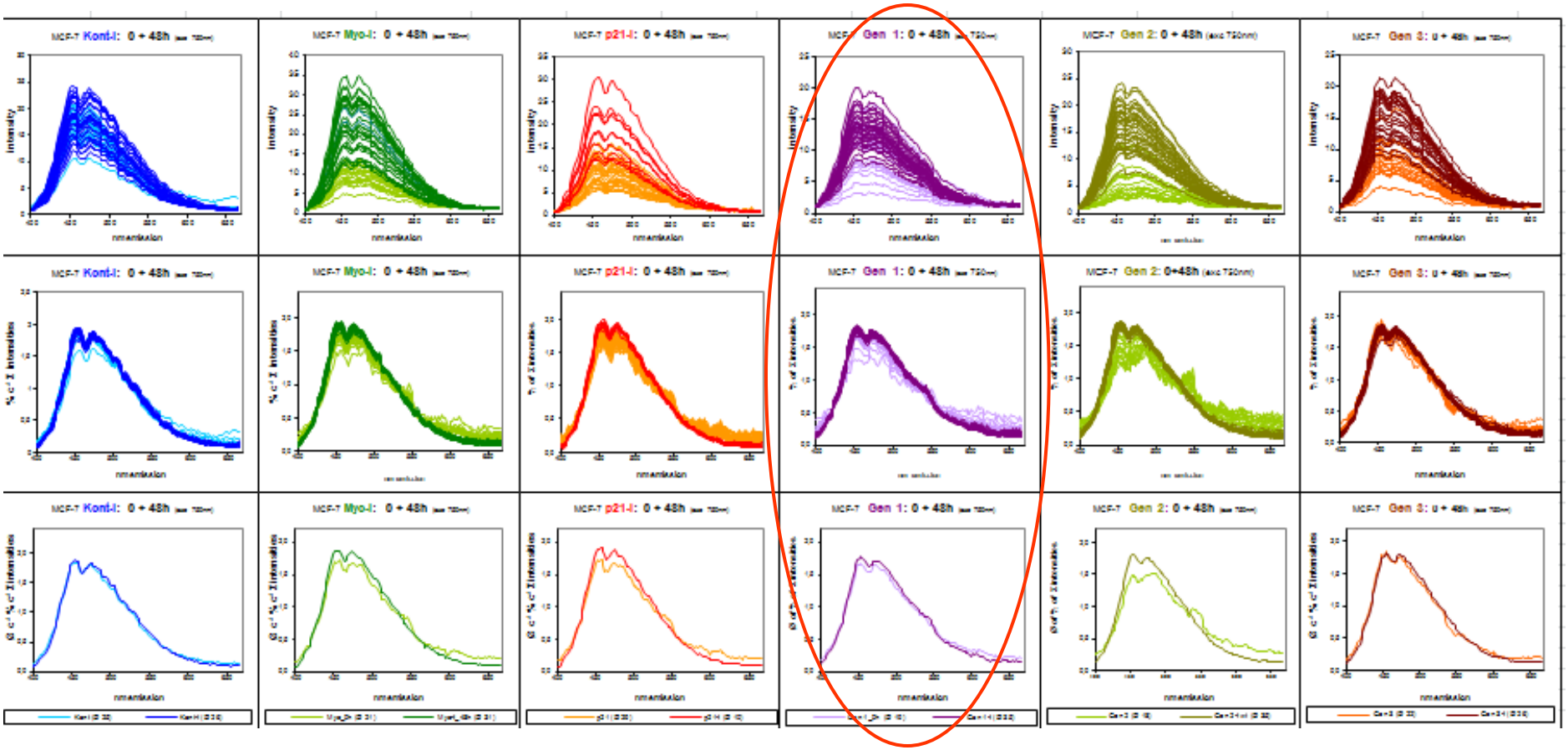




Übertragung auf andere Tumormodelle

Isogenes Brustkrebs-Zellmodell: Autofluoreszenzmessungen

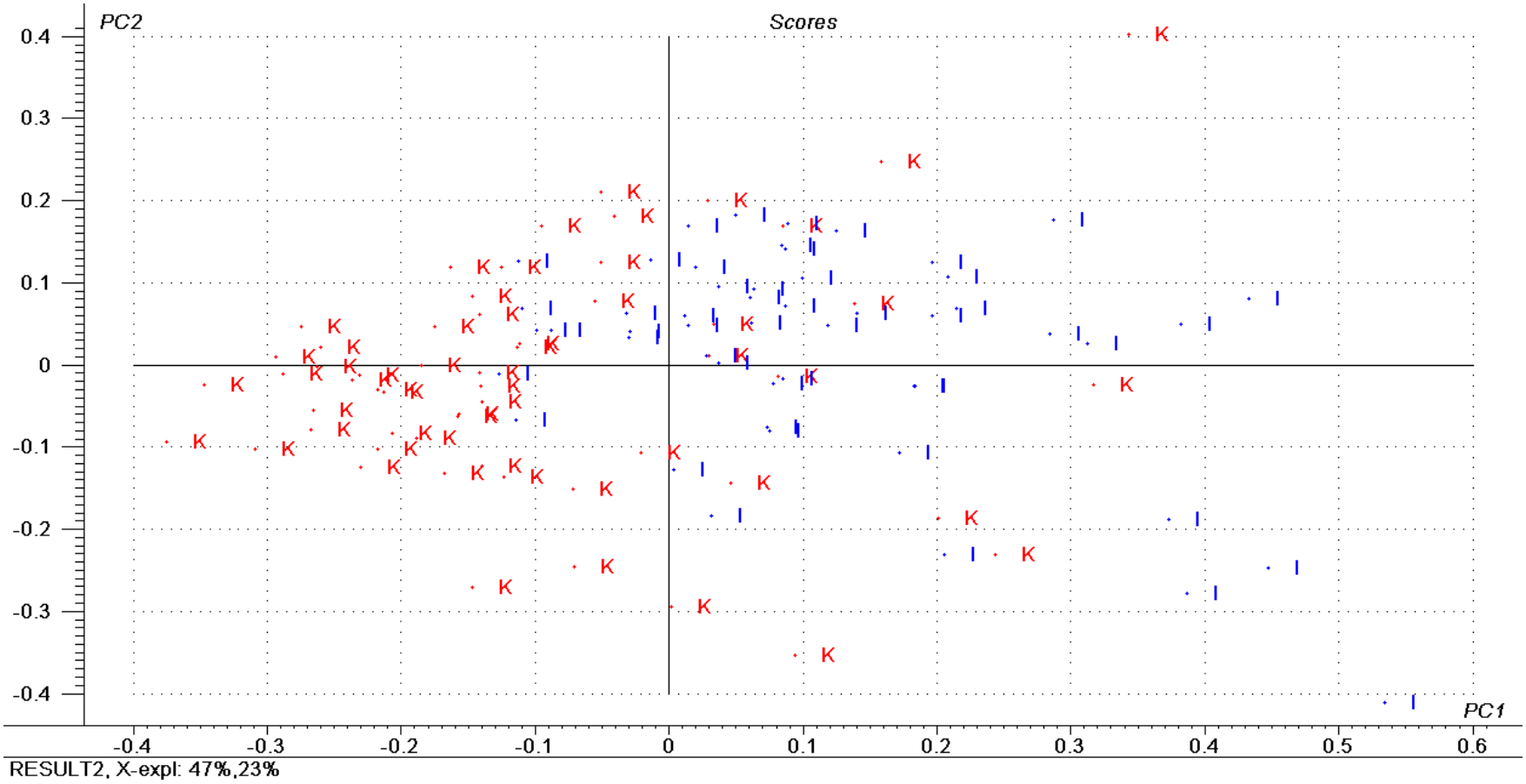
Emissionsspektren vor [0h] und nach [48h] Doxycyclin-Induktion



1. Reihe: Emissionsspektren der parallel gemessenen Zellen → Höhenunterschiede = Intensitätsunterschiede
2. Reihe: normierte Emissionsspektren der parallel gemessenen Zellen → jeder Emissionskurvenpunkt in % der Gesamtsumme der Intensitäten aller Kurvenpunkte einer Zelle
3. Reihe: Mittelwert der normierten Emissionsspektren aller parallel gemessenen Zellen (= Mittelwerte aus mittlerer Reihe)

Isogenes Brustkrebs-Zellmodell: MVDA der MCF-7 Spektren

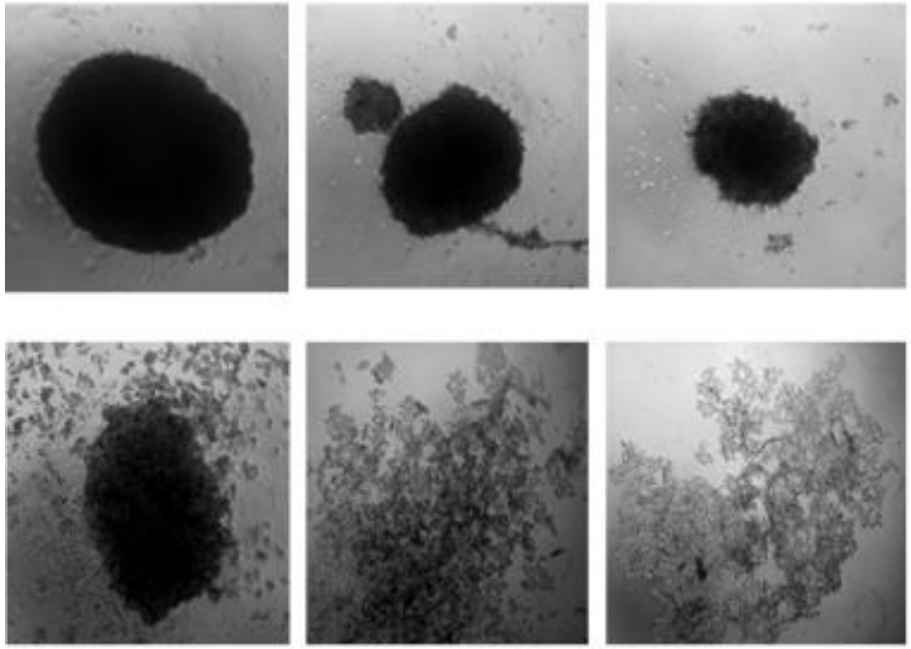
MCF-7 normiert Spektren



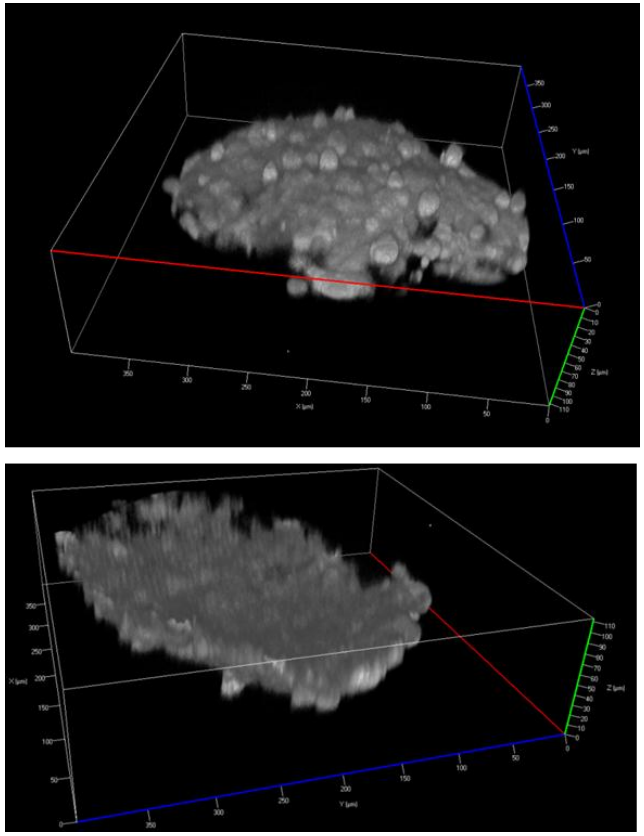
K = Kontroll-Zelllinie **I = Gen 1 (Kandidatengen)**

Sphäroid-Kultivierung (Agarose)
MCF-7 / MCF-10A / 72h

80000 40000 20000



Mikroskopische Analyse - ApoTome



Ausblick

- **Zellmodell-Entwicklung und genetische Screens:**
  - Expression von klinisch relevanten Mutationen, neue Krebskandidatengene
- **Hochauflösende subzelluläre spektral Analysen im Glioblastom-Zellmodell**
  - Analyse der Organisation von Proliferation und Metabolismus in Tumorzellen
  - Mitochondrien-Analyse: Korrelation Morphologie / metabolischer Zustand in Bezug zu rekombinant exprimierten Kandidatengenen
  - Mischkulturen
- **Spektrale Analysen im 3D-Tumormodell**
  - Kultivierung von Sphäroiden
  - Vitalitätsmessung über Proliferationsassays
  - 3D spektrale Analysen
- **Zielmolekülentwicklung**
  - Validierung identifizierter Krebskandidatengene