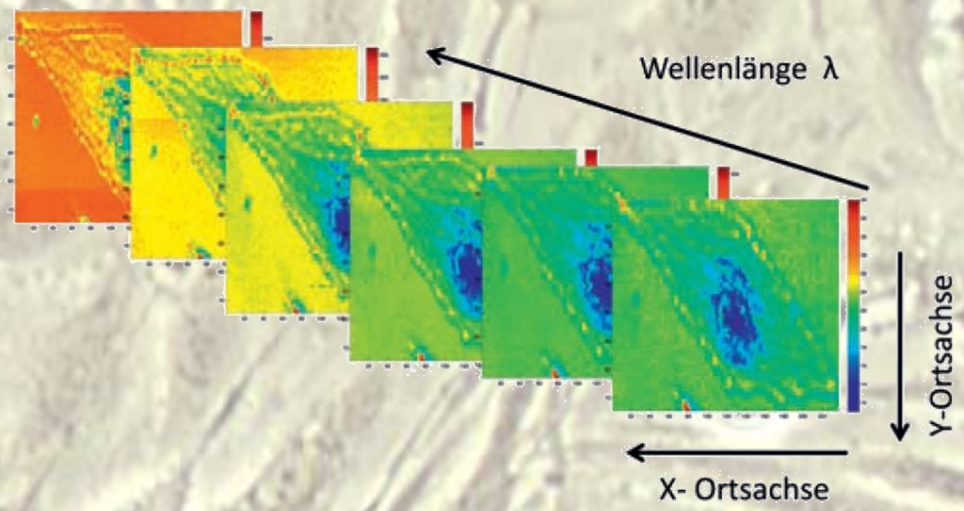
Markerfreie mikrospektralphotometrische Charakterisierung von Gehirntumorzellen

E. Ostertag, S. Luckow, B. Boldrini und R. W. Kessler



Hochschule Reutlingen
Reutlingen University

Edwin Ostertag, RRi Process Analysis, Reutlingen University, Alteburgstraße 150, 72762 Reutlingen, www.reutlingen-university.de,
T. +49 (0)7121 271-1428, F. +49 (0)7121 271-2013, edwin.ostertag@reutlingen-university.de

Agenda

Einführung

Tumor Modell

Konzept multimodale Spektroskopie und multivariate Datenanalyse

Messungen

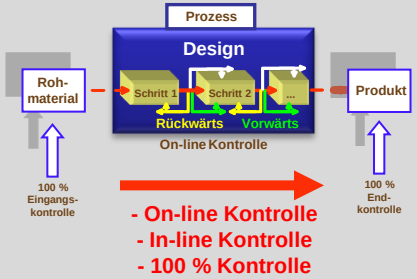
Auswertungen

Fazit

Prozessanalytik und Technologie am RRi der Hochschule Reutlingen

Mission

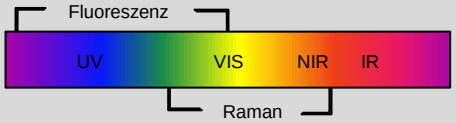
Funktions-Design der Produkte



- On-line Kontrolle
- In-line Kontrolle
- 100 % Kontrolle

maßgeschneiderte Produkte

Philosophie



Optische Spektroskopie als „All in One“ Sensor

Strategie

Statistische Versuchsplanung

+

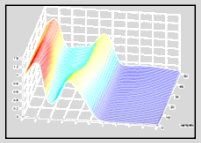
Prozessdaten Soft Sensor

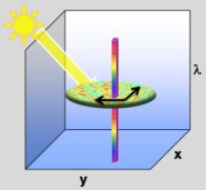
+

Spektroskopie Molekulare Marker

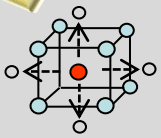
Toolbox

On-line- und In-line Spektroskopie

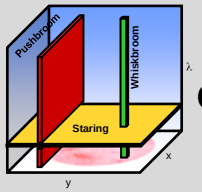




Multimodal-ortsaufgelöste-Spektroskopie



Chemometrie und Statistische Versuchsplanung

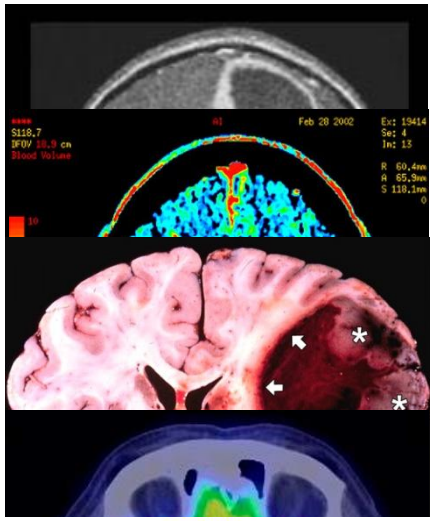


Chemical Imaging

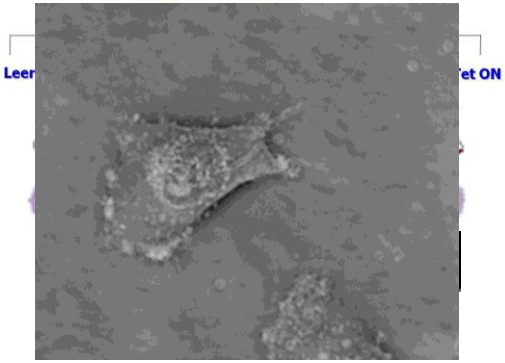
Hochschule Reutlingen
Reutlingen University

Glioblastoma multiforme

- Häufigster bösartiger Hirntumor bei Erwachsenen
- Mittlere Überlebenszeit nur wenige Monate
- Extreme Malignität durch inaktive Tumor-Suppressorgene PTEN und TP53
- Zellen mit mindestens einem aktiven Tumor-Suppressorgen sind weniger bösartig und repräsentieren möglichen Beginn einer Tumorentwicklung
- Tumor Modell simuliert unterschiedliche Malignitäten (Entwicklung an Hochschule Mannheim)



U373-MG
TP53 -
PTEN -



Ziel:
Spektroskopische Charakterisierung und Unterscheidung von Tumorzellen mit unterschiedlichen Malignitätsstufen.

Agenda

Einführung

Tumor Modell

Konzept multimodale Spektroskopie und multivariate Datenanalyse

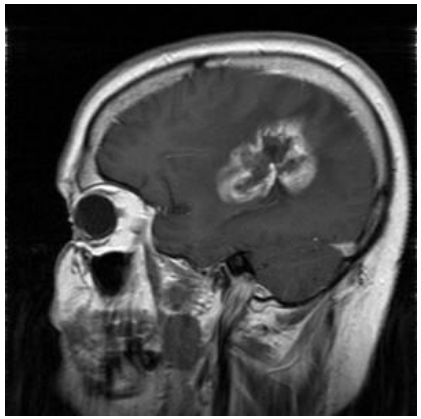
Messungen

Auswertungen

Fazit

Tumor Modell

Wildtyp: U-251 MG, Nr. 09063001 ECACC (European Collection of Cell Cultures)



© http://hirntumor.biz

Explantat

Zelllinie „PTEN“

Zelllinie „Kontrolle“

Zelllinie „TP53“

Glioblastoma multiforme:
Tumor-Suppressorgene
PTEN und TP53 inaktiv

↓

Extreme Malignität

Glioblastom Tumor Modell:

- Zelllinie Kontrolle entspricht Wildtyp
- Zelllinie PTEN erlaubt gesteuerte Expression des Tumor-Suppressorproteins PTEN
- Zelllinie TP53 erlaubt gesteuerte Expression des Tumor-Suppressorproteins TP53

↓

Modell für unterschiedliche Malignitäten / Tumorstadien
(PTEN-, PTEN+, TP53-, TP53+)

Agenda

Einführung

Tumor Modell

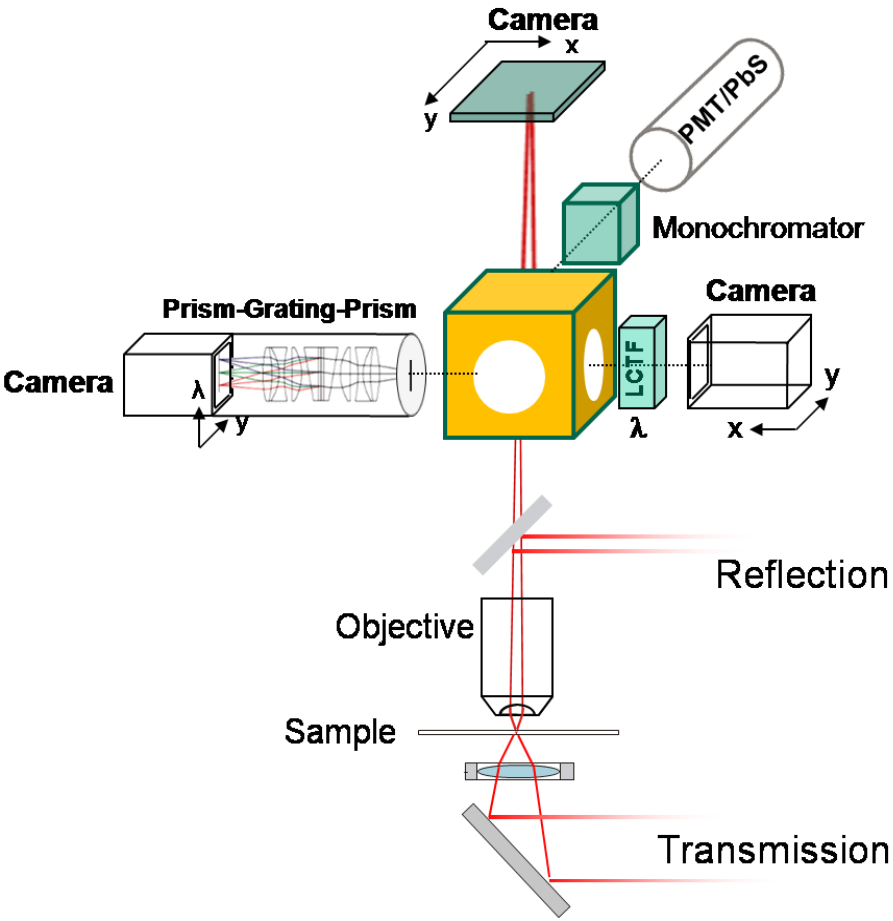
Konzept multimodale Spektroskopie und multivariate Datenanalyse

Messungen

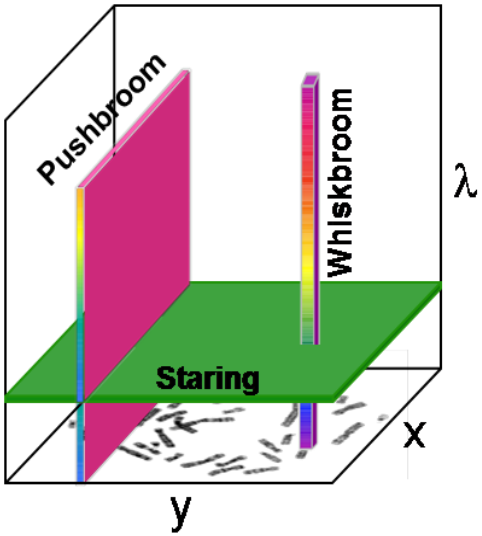
Auswertungen

Fazit

Multimodale Spektroskopie



Multimodales Spektrales Imaging-System auf Basis eines Zeiss MPM / UMSP



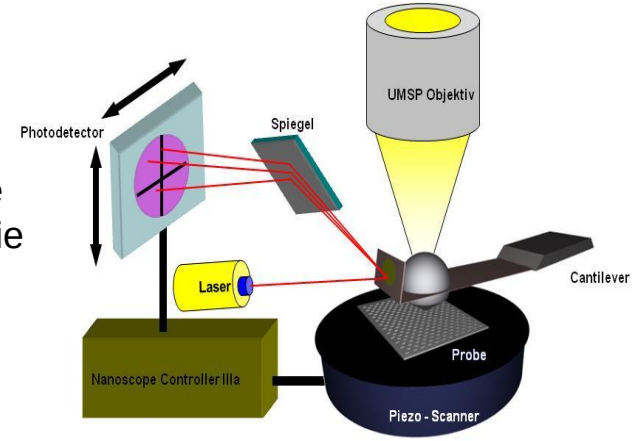
Unterschiede zwischen den einzelnen Zelllinien auflösen.

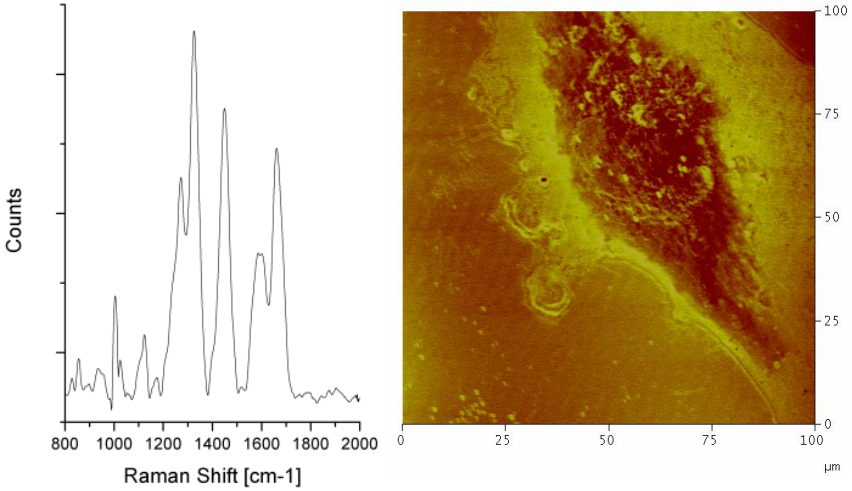
Ansatz:

- Multimodale Ortsaufgelöste Mikro-Spektralphotometrie
- Transmission, spekulare und diffuse Reflexion
- x, y, z, Nahfeld
- UV/VIS, NIR, (IR), Raman, Fluoreszenz, λ_{ex}, λ_{em}, t

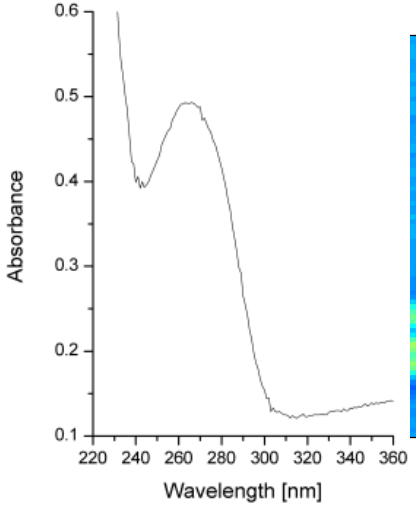
Multimodale Spektroskopie an Glioblastomzellen

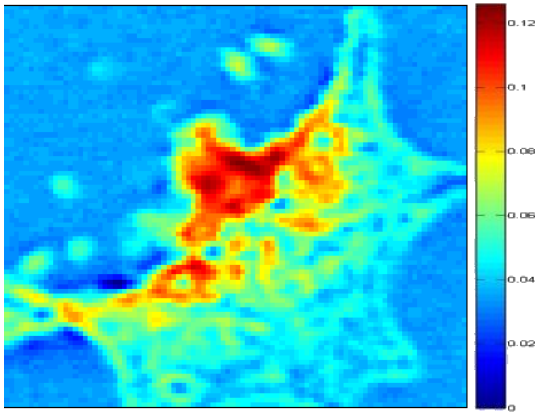
Nahfeldeinheit mit Festkörper-Immersionslinse für Spektroskopie unterhalb des Beugungslimits von Licht.



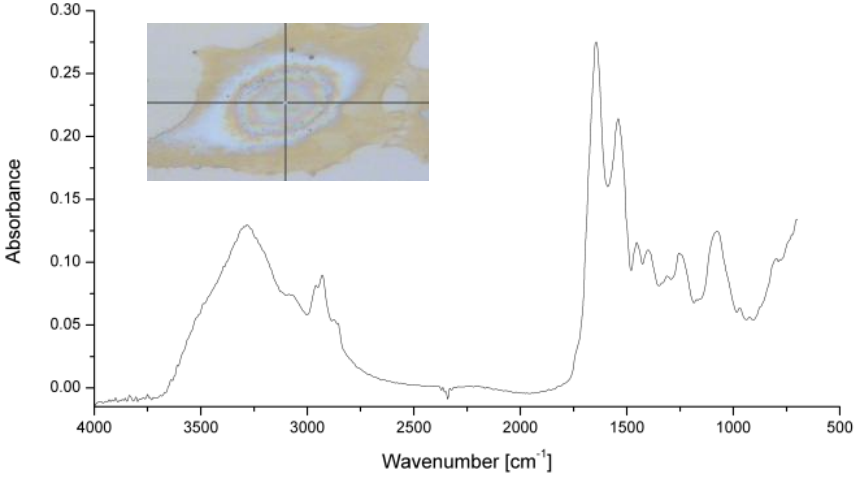


Micro-Raman-Spektrum u. nahfeldoptische Aufnahme



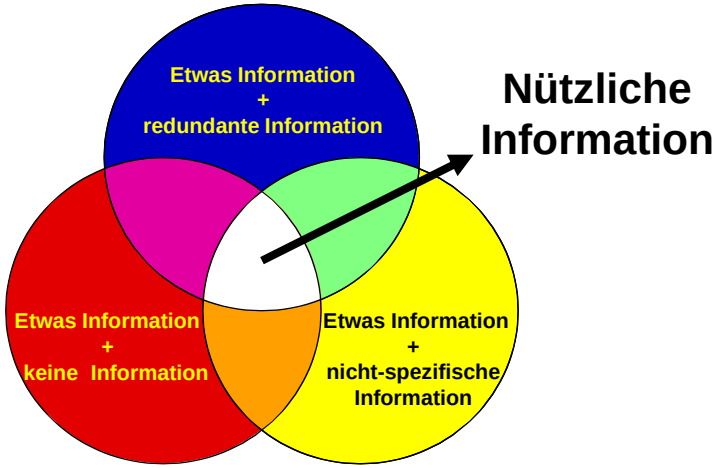


UV-Absorptionsspektrum und UV-Image bei 260 nm



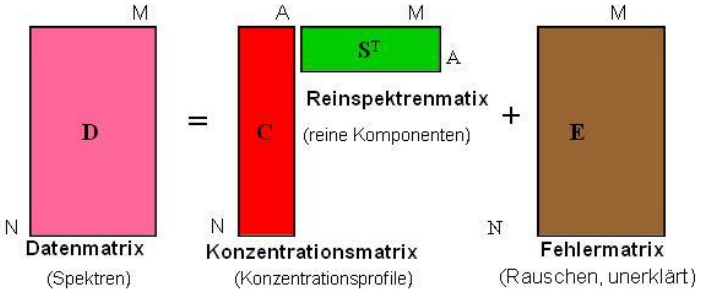
Micro-IR-Spektrum

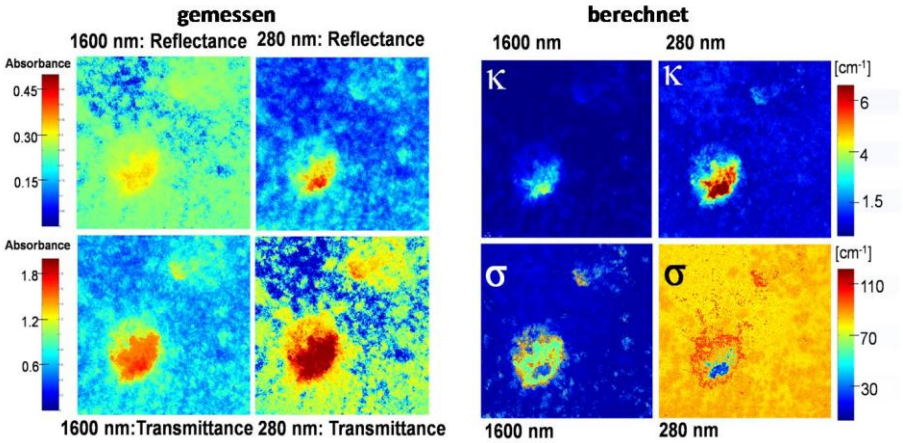
Multivariate Datenanalyse: Extrahiere die wesentlichen Informationen



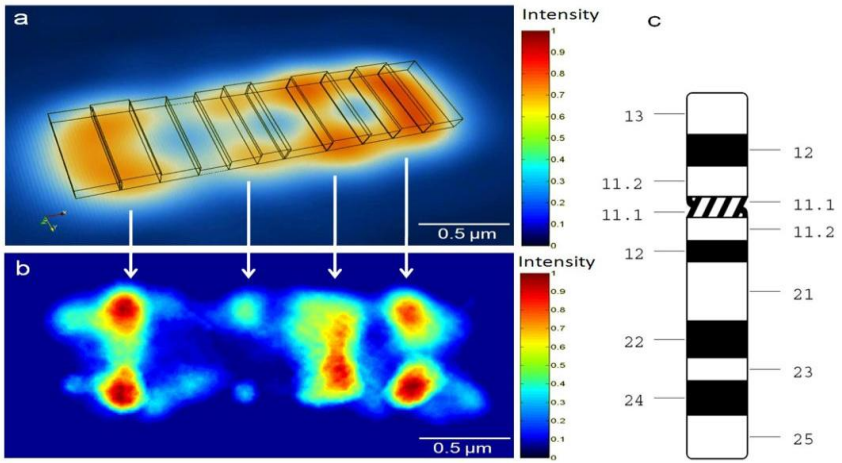
MCR
ALS

Herausheben einer Lösung durch entsprechende Nebenbedingungen





Separierung Streuung und Absorption (ASS Tablette)



Simulation und Diffuse Opt. Abbildung Chromosom 17

Agenda

Einführung

Tumor Modell

Konzept multimodale Spektroskopie und multivariate Datenanalyse

Messungen

Auswertungen

Fazit

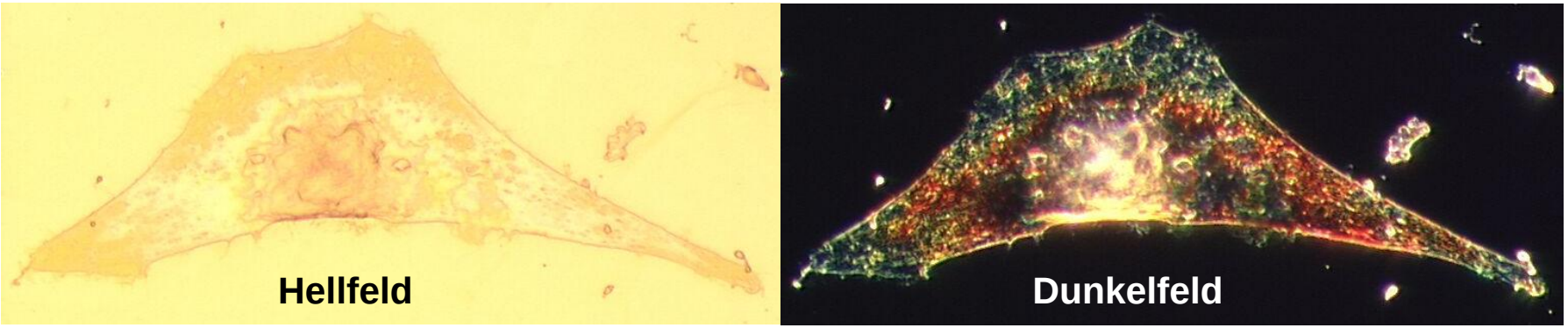
Probenpräparation

Zellkultur

- Soll: 100 Zellen/mm^2 auf Quarz Objektträger
- Kulturmedium: Dulbecco‘s Modified Eagle Medium (DMEM) + 10% fetales Kälberserum (FCS)
- Hygromycin B (zur Selektion)
- 37 C, 5% CO_2
- Doxycyclin zur Induktion („Tetracyclin-on System“)

Präparation

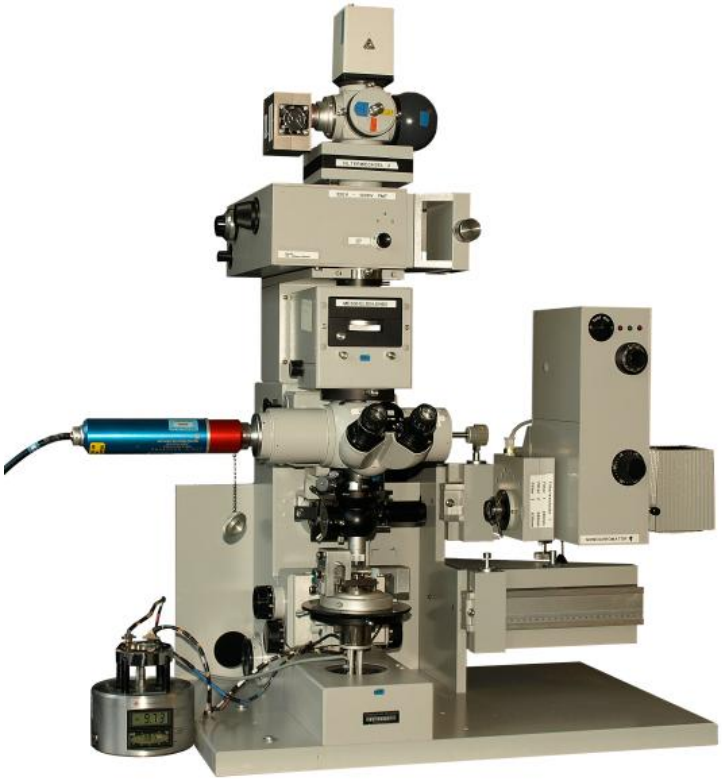
- 4% Paraformaldehyde in PBS-Puffer (Phosphate Buffered Saline), 15 Min.
- Spülen mit dest. Wasser
- Trocknen



Glioblastoma multiforme fixiert mit Paraformaldehyd

Mikrospektralphotometrie UV / VIS

Systeme Zeiss Universalmikroskopspektralphotometer (UMSP)
und Mikroskopspektralphotometer (MPM)

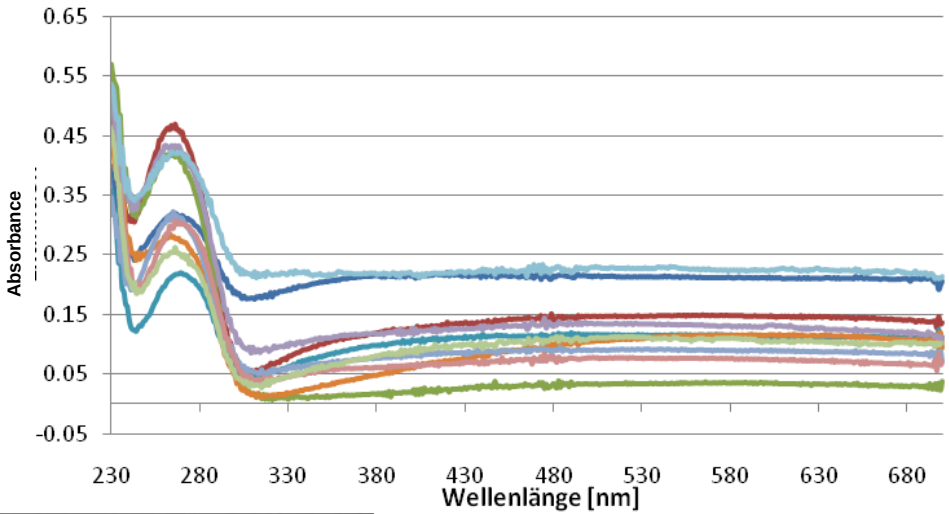


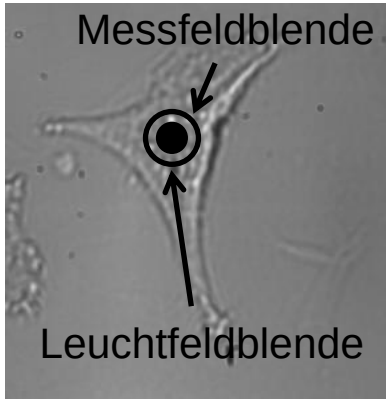
Zeiss UMSP

Zeiss MPM

Aufnahme UV / VIS - Spektren

- Probenset: 10 Zellen je Zelllinie im Zellkern
- Wellenlängenbereich: 230-700nm (in Transmission)
- Objektiv Ultrafluar 32x, Messfeldblende 0,25mm, Xenonbogenlampe

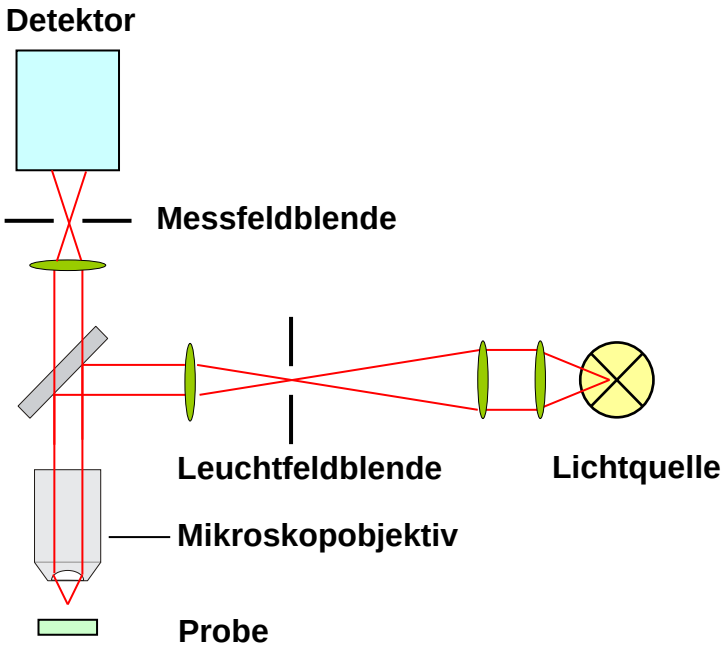




Oben:
Beispielspektren der Zelllinie TP53 ohne Spektrenvorverarbeitung.

Links: Messung im Zellkern.

Rechts: Schema Messaufbau



Agenda

Einführung

Tumor Modell

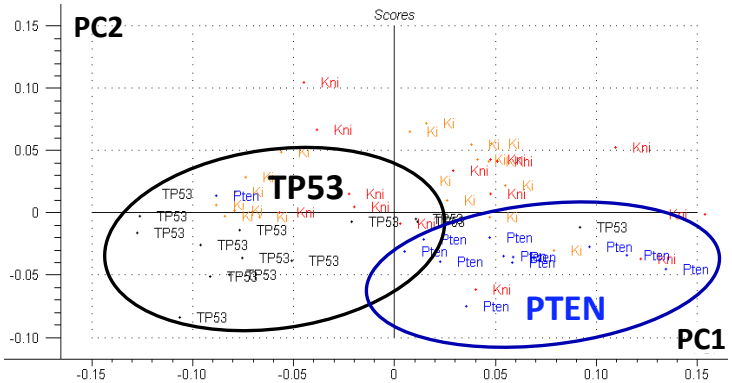
Konzept multimodale Spektroskopie und multivariate Datenanalyse

Messungen

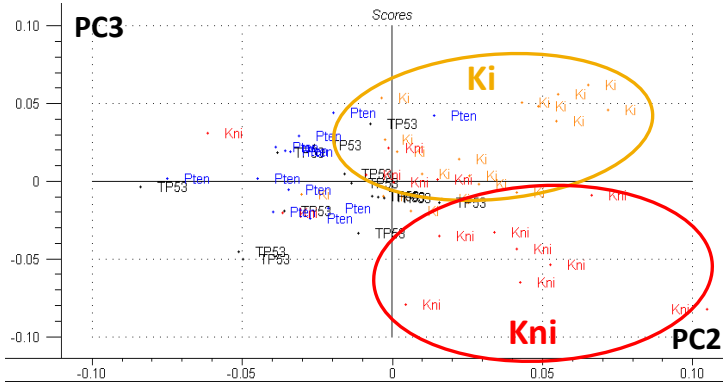
Auswertungen

Fazit

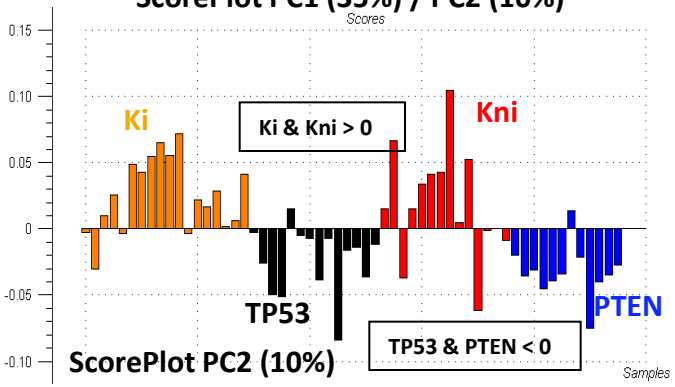
Multivariate Datenanalyse, alle Proben, λ = 230 - 700 nm



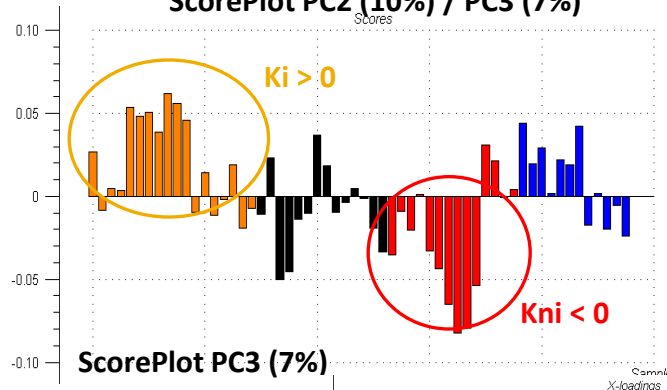
ScorePlot PC1 (35%) / PC2 (10%)



ScorePlot PC2 (10%) / PC3 (7%)



ScorePlot PC2 (10%)



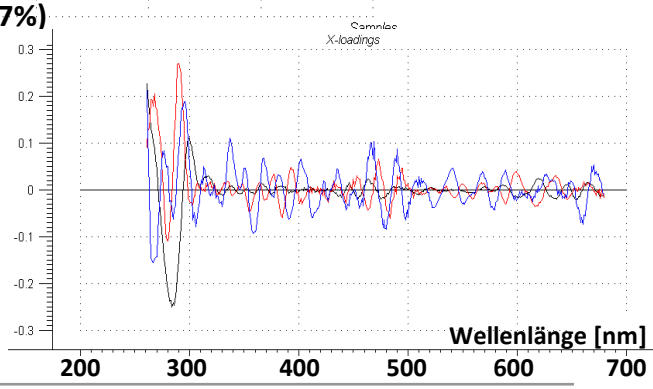
ScorePlot PC3 (7%)

PC1: Unterscheidung zwischen PTEN und TP53 (35%)

PC2: Unterscheidung TP53/PTEN und Kontrollen Ki/Kni (10%)

PC3: Unterscheidung zwischen Kni und Ki (7%)

LoadingPlots →
PC1: 35% (schwarz)
PC2: 10% (rot)
PC3: 7% (blau)



Agenda

Einführung

Tumor Modell

Konzept multimodale Spektroskopie und multivariate Datenanalyse

Messungen

Auswertungen

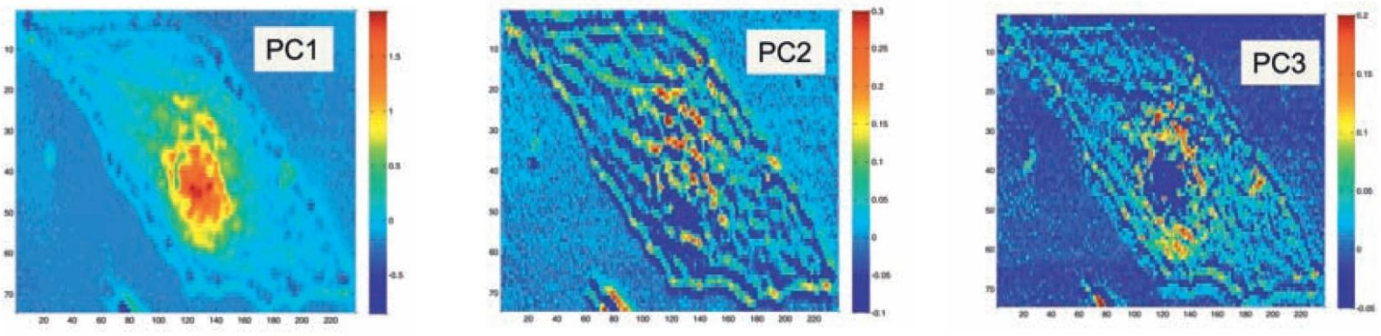
Fazit

Fazit

- Die markerfreie Charakterisierung von fixierten Glioblastomzellen auf der Basis von lateral hochaufgelöster UV/VIS-Spektroskopie mit Hilfe multivariater Auswerte-verfahren stellt einen Ansatz dar zur Unterscheidung unterschiedlich maligner Zelllinien.

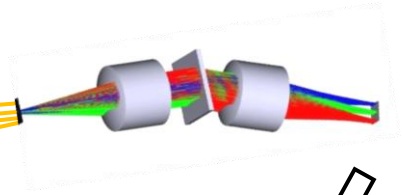
- Spektrale Informationen über Absorption <u>und</u> Streuung verbessern die Unter-scheidung der Zell-Linien.

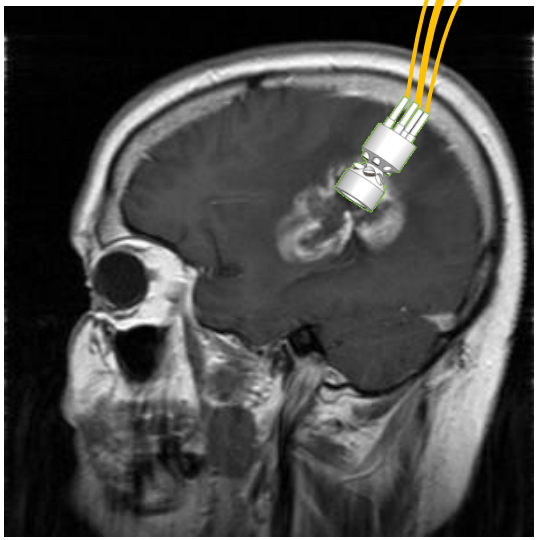
- Die spezifische Detektion unterschiedlich maligner Zellen könnte zu einer erheblich verbesserten Diagnostik und einer präziseren Therapie am Patienten führen.



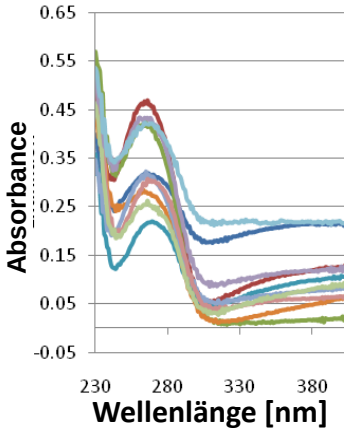
Vision: Point-of-Care Testing von Glioblastomzellen

Mikrosonde mit Pushbroom-Imager für Operation





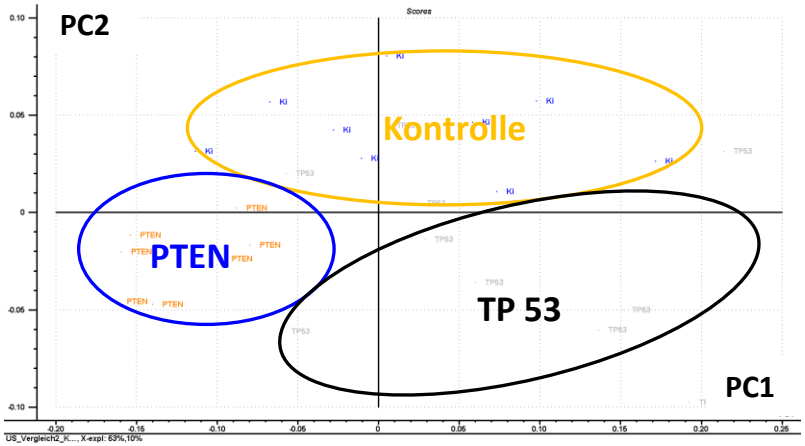
© http://hirntumor.biz



Multivariate Analyse

Hoch **Mittel** **Niedrig**

Charakterisierung nach Malignität



ScorePlot PC1 (63%) / PC2 (10%)

Tumormodell auf der Basis der Zell-Linien
Kontrolle (Wildtyp)
PTEN
TP 53

Danksagung

BMBF

Prof. Dr. Rudolf Kessler
Prof. Dr. Schneckenburger
Prof. Dr. Kioschis

Dr. Tobias Merz
Dr. Karsten Rebner

Vielen Dank für
Ihre Aufmerksamkeit!