

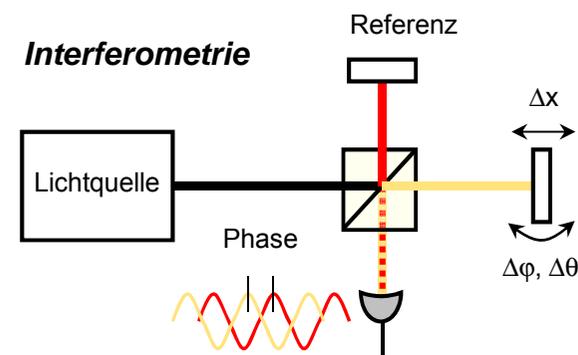
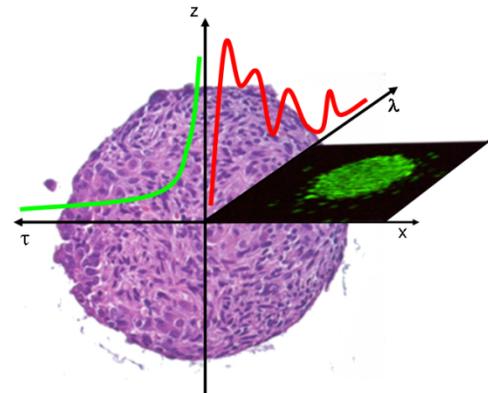
Zentrum für Angewandte Forschung ZAFH-PHOTONⁿ (2008 – 2013/14)

Multidimensionale Mikroskopie und Photonische Sensorik



Zentrum für Angewandte Forschung ZAFH-PHOTONⁿ HS Aalen, Reutlingen, Mannheim, Furtwangen, Konstanz, Offenburg

- Multidimensionale Mikroskopie
 - Tiefenauflösendes Imaging
 - 3D-Laserpinzette
 - Multispektrales Imaging
- Photonische Sensorik
 - Miniatur-Lasersensor
 - Faseroptischer Gassensor
 - Fabry-Perot-Biosensor
 - 4D-Fertigungsmesstechnik

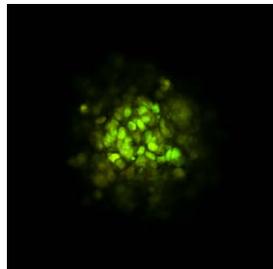


gefördert durch die Europäische Union, Europäischer Fonds
für regionale Entwicklung und das Land Baden-Württemberg

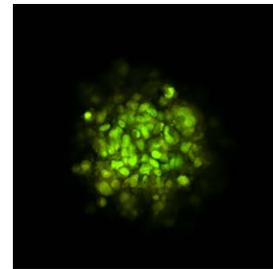
Tiefenauflösung in der Mikroskopie lebender Zellen

Methods:

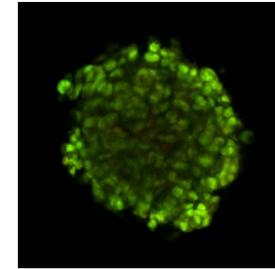
- Laser-Scanning-Mikroskopie (LSM)



$z = 10 \mu\text{m}$

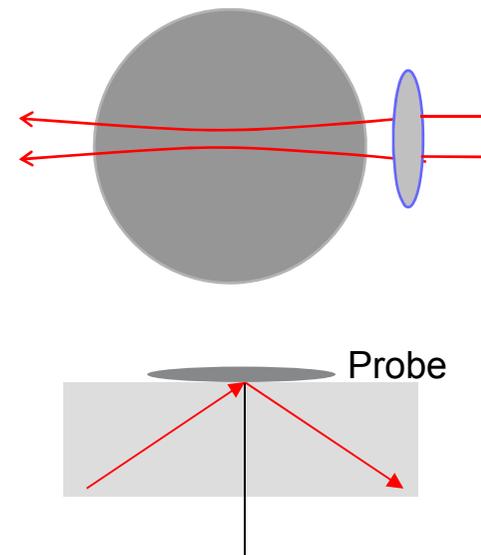


$z = 15 \mu\text{m}$

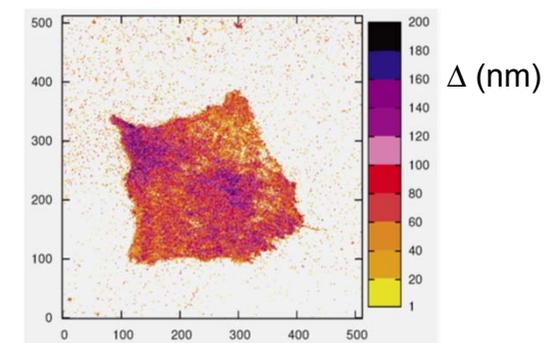
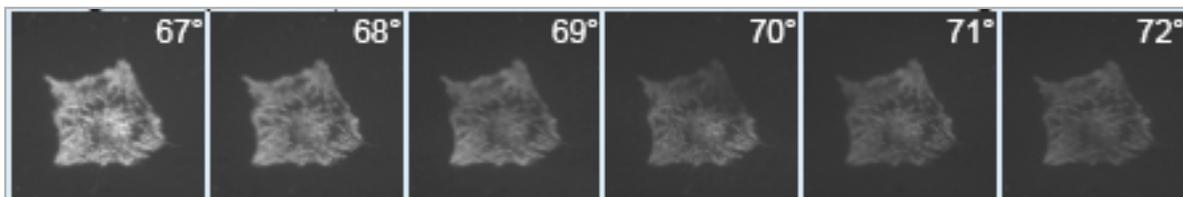
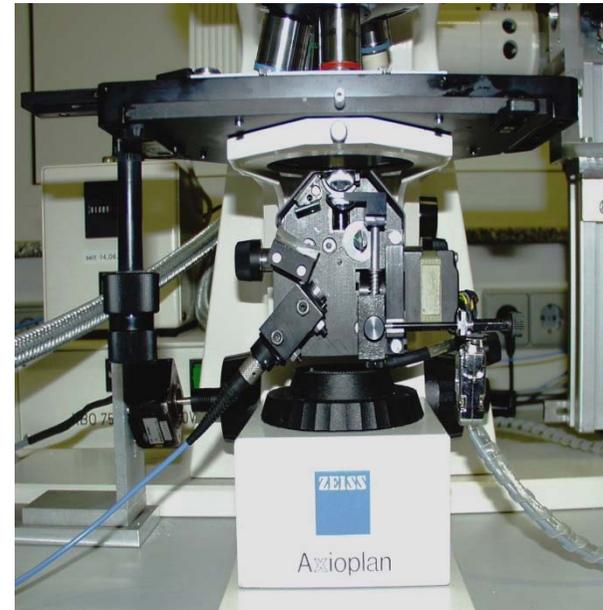
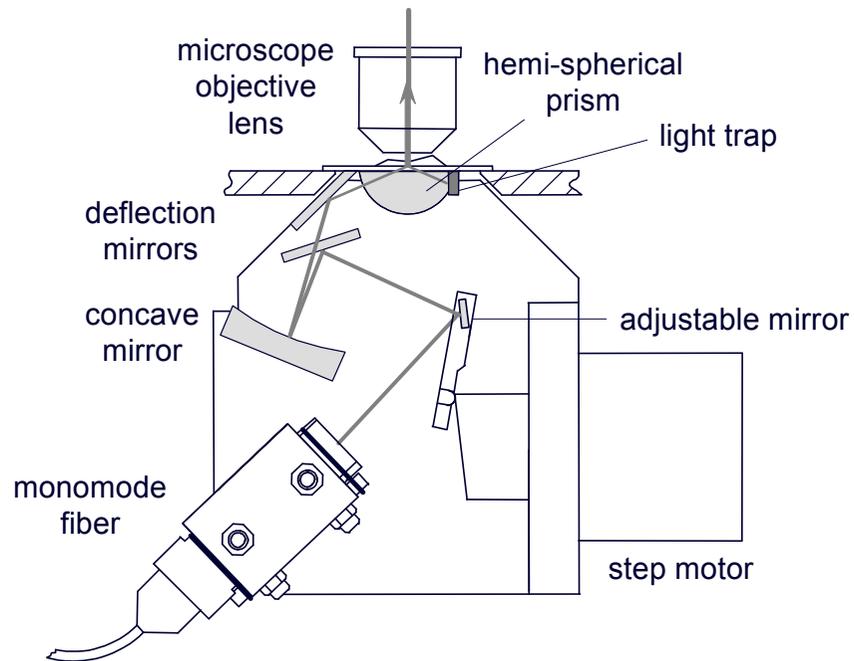


$z = 60 \mu\text{m}$

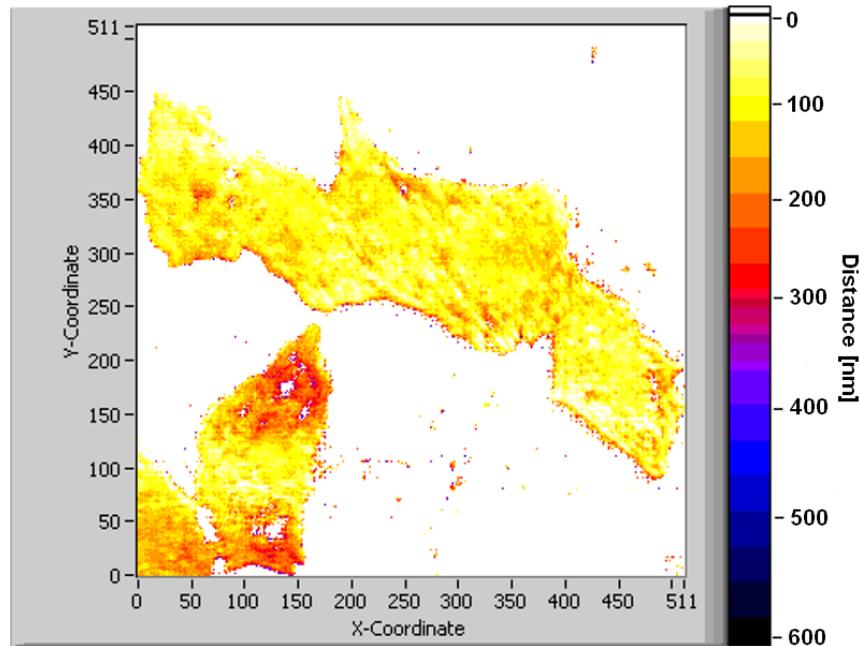
- Strukturierte Beleuchtung
- Lichtscheibenmikroskopie
- Totalreflexionsmikroskopie



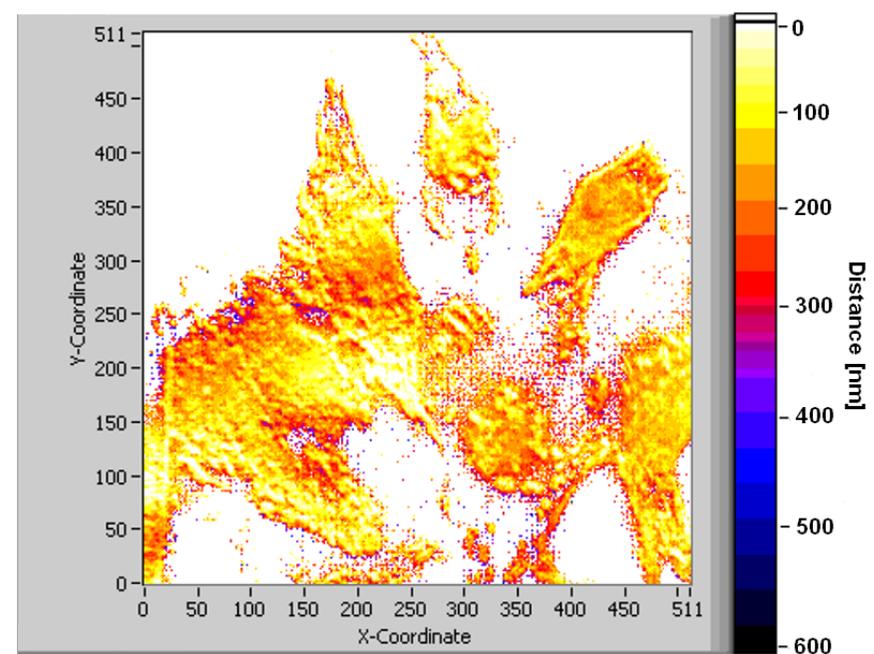
Tiefenauflösende Totalreflexionsmikroskopie



Nanotopologie von Zelloberflächen



Tumorzellen (Glioblastom)

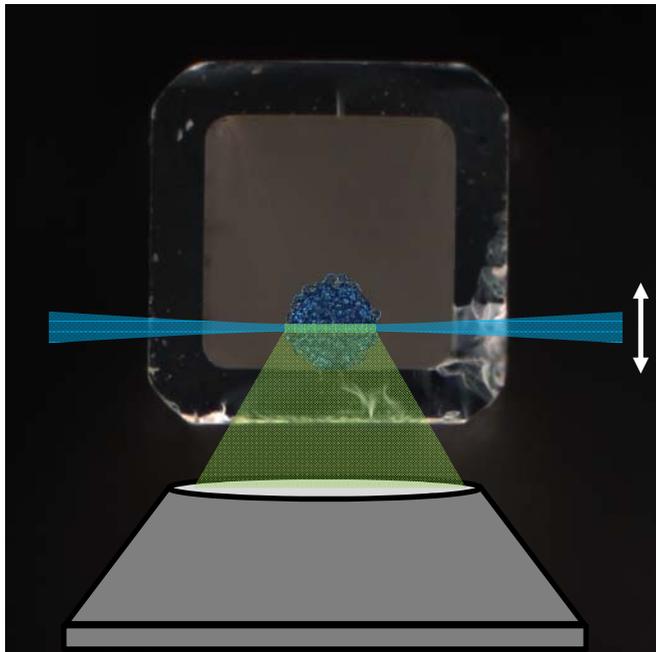


Glioblastomzellen mit Tumorsuppressorganen

<http://www.jove.com/video/4133/nanotopology-cell-adhesion>

Cells provided by J. Mollenhauer, Dept. of Molecular Oncology, University of South Denmark, Odense

Lichtscheibenmikroskopie an 3D Zellsystemen (CHO-GFP-Mem)

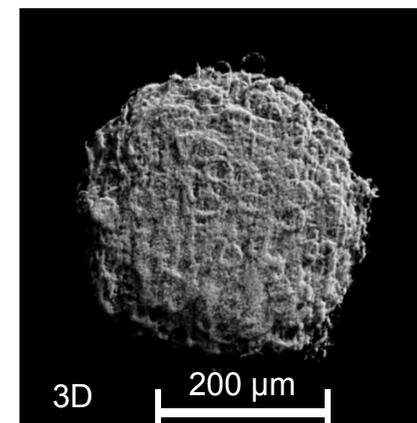
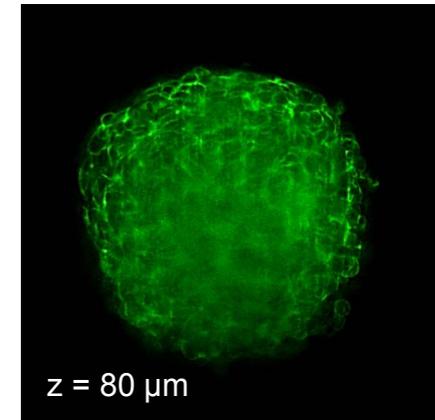
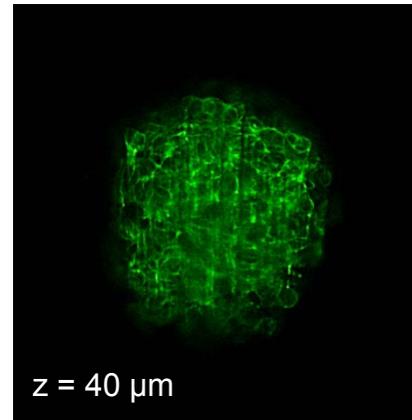


Messparameter:

Strahltaile: $\Delta z = 5\text{--}10\ \mu\text{m}$

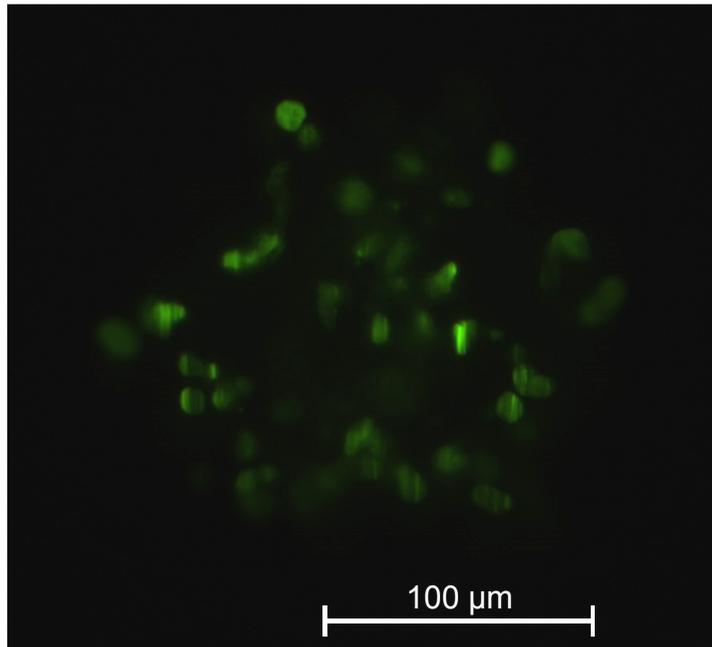
Strahlbreite: $\Delta x \approx 8\ \text{mm}$

Fokustiefe: $\Delta y \approx 200\text{--}400\ \mu\text{m}$

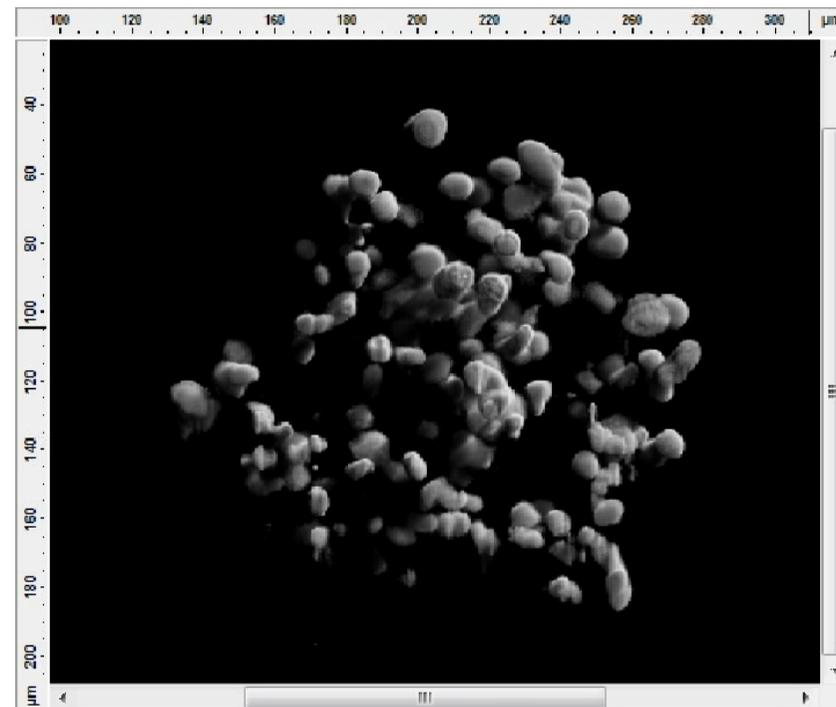


Nur Ebenen im Fokusbereich des Mikroskops werden bestrahlt → geringe Lichtdosis

Nekrose nach Inhibierung der Atmungskette (Rotenon: 1 μM , 3 h; CellTox: 2 h; $\lambda_{\text{ex}} = 470 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{d}} \geq 515 \text{ nm}$)



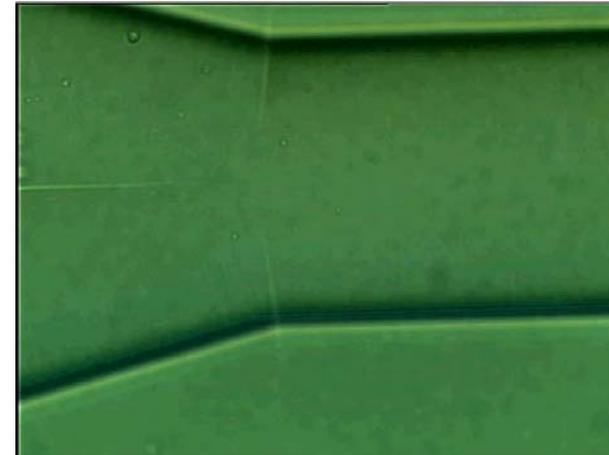
Einzelnschicht: $z = 50 \mu\text{m}$; $d \leq 10 \mu\text{m}$



3D Rekonstruktion

Einige Ergebnisse aus 6 Jahren ZAFH – Forschung - Schwerpunkt „Multidimensionale Mikroskopie“

- Etablierung Strukturierte Beleuchtung, 3D Laserpinzette (Laboraufbauten)
- Optimierung und vielfache Nutzung von TIRFM
- Etablierung der Lichtscheibenmikroskopie Laboraufbau und Ansatz für kommerzielles Gerät (ZIM-Projekt)
- Promotionen zu 3D Ratio Imaging (Land BW) und winkelaufgelöster Streulicht-Mikroskopie (BW-Stiftung)
- Neue Forschungsprojekte (u.a. Apoptose in 3D Zellsystemen)



Ratio Imaging von Redox-Zuständen in Tumorzellsphäroiden mittels Lichtscheiben-Fluoreszenz-Mikroskopie

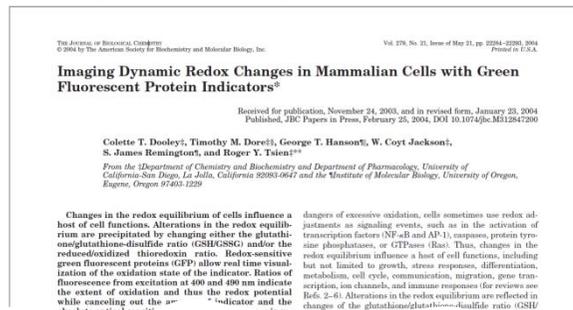
Ratio Imaging: Verhältnis zweier Fluoreszenzbilder

Anwendung: Messung von Änderungen des intrazellulären Redox-Gleichgewichts
 Änderungen des Redox-Gleichgewichts...

...wirken sich auf Zellfunktionen aus.

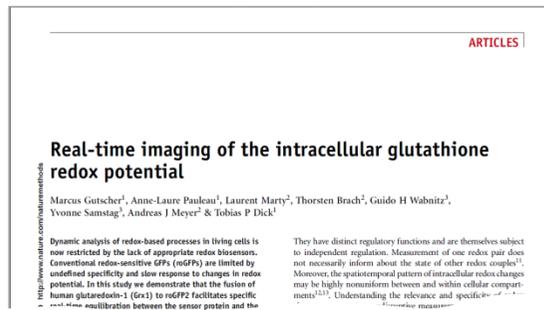
...zeigen sich unter anderem in einer Änderung des Verhältnisses von reduziertem zu oxidiertem Glutathion (GSH/GSSG).

Dooley *et al.* (2004):



Redox-sensitives GFP (roGFP2)

Gutscher *et al.* (2008):



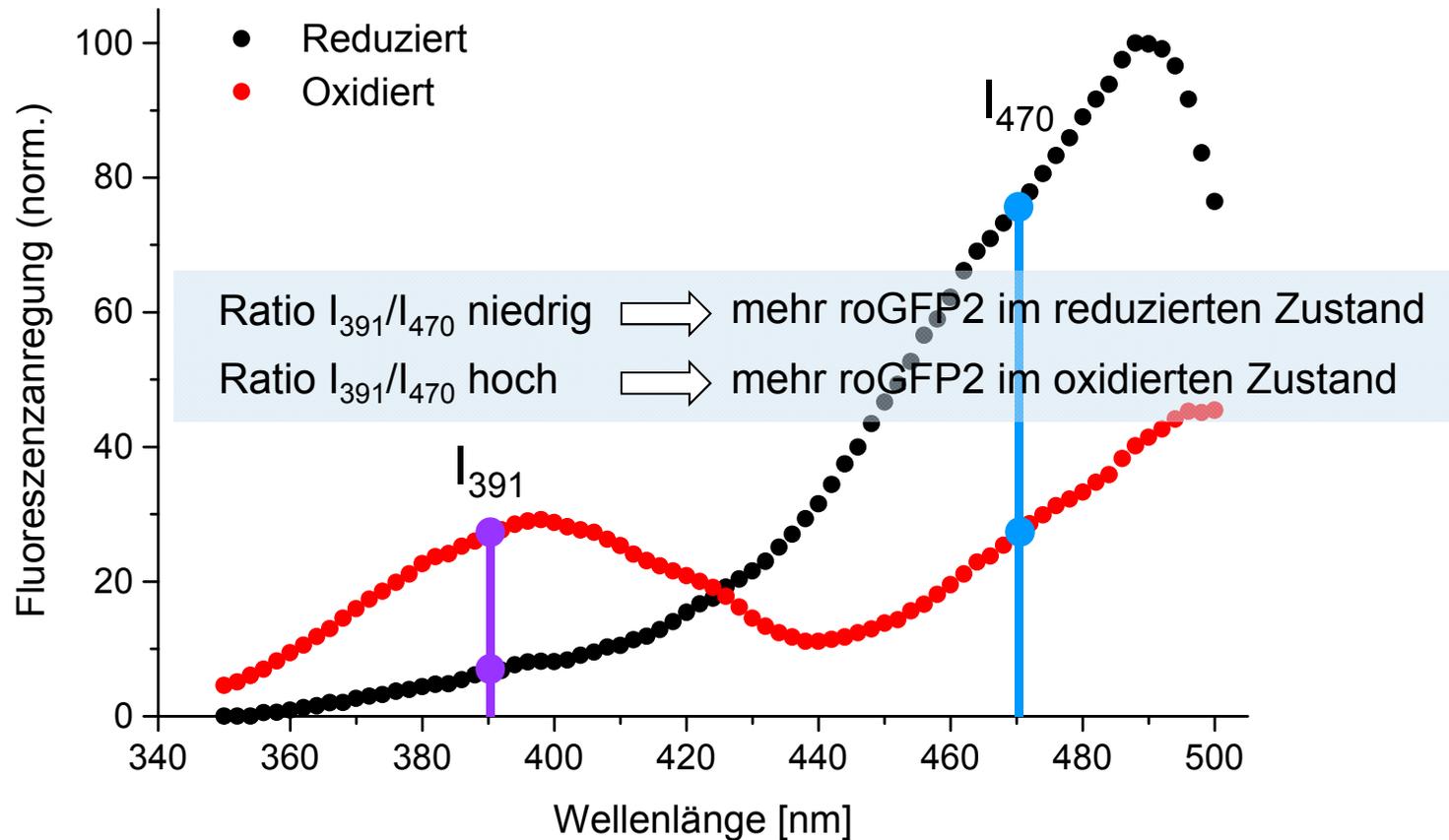
Fusionierung roGFP2 mit humanem
 Glutaredoxin 1 → Grx1-roGFP2

Wittig *et al.* (2013):

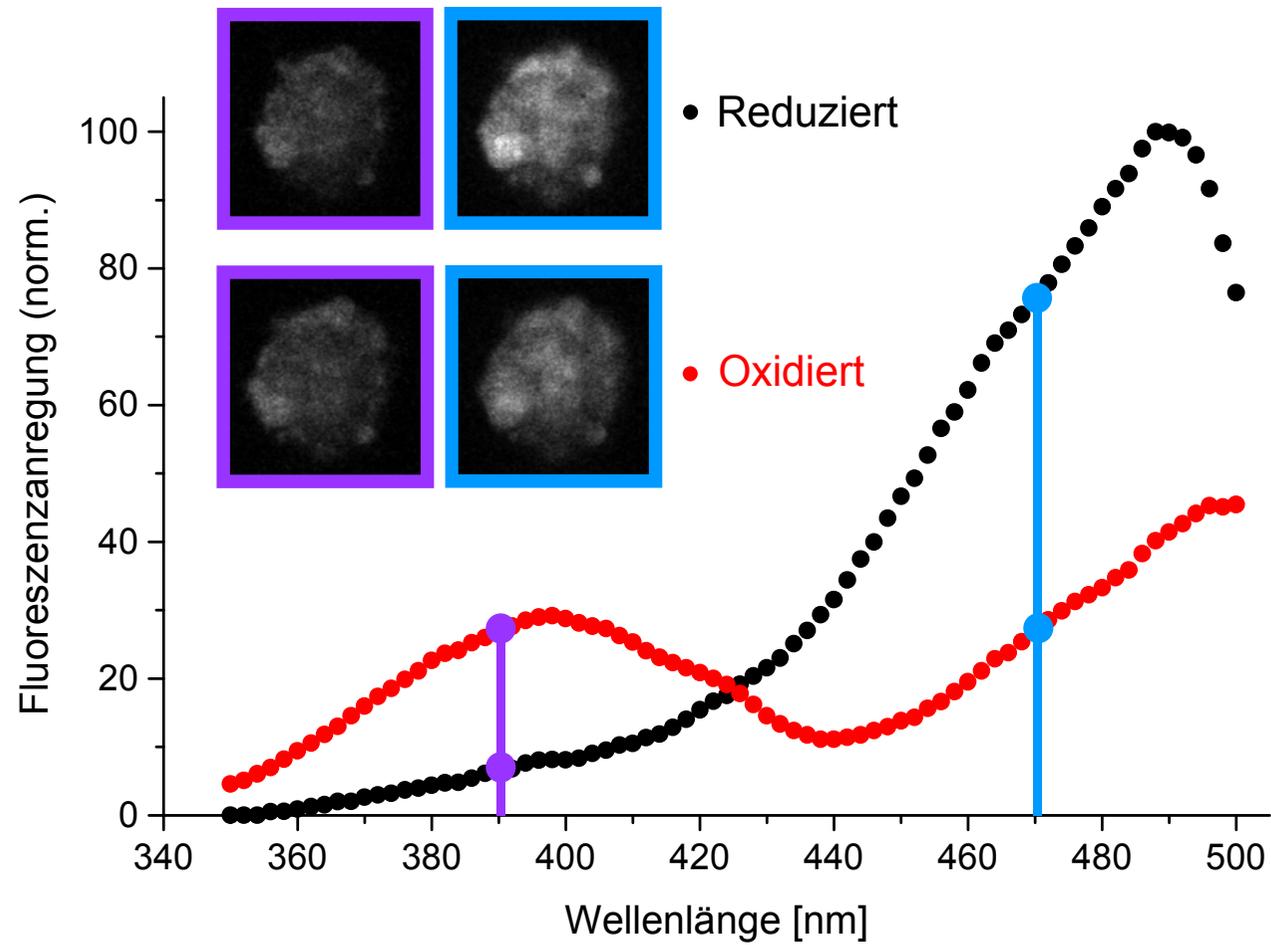


Transfektion von U251-MG Glioblastom-
 zellen mit Grx1-roGFP2

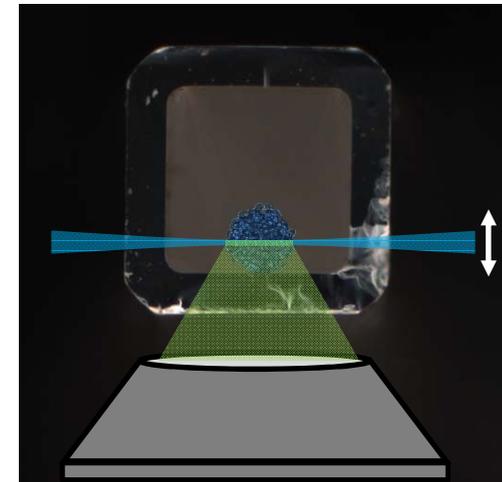
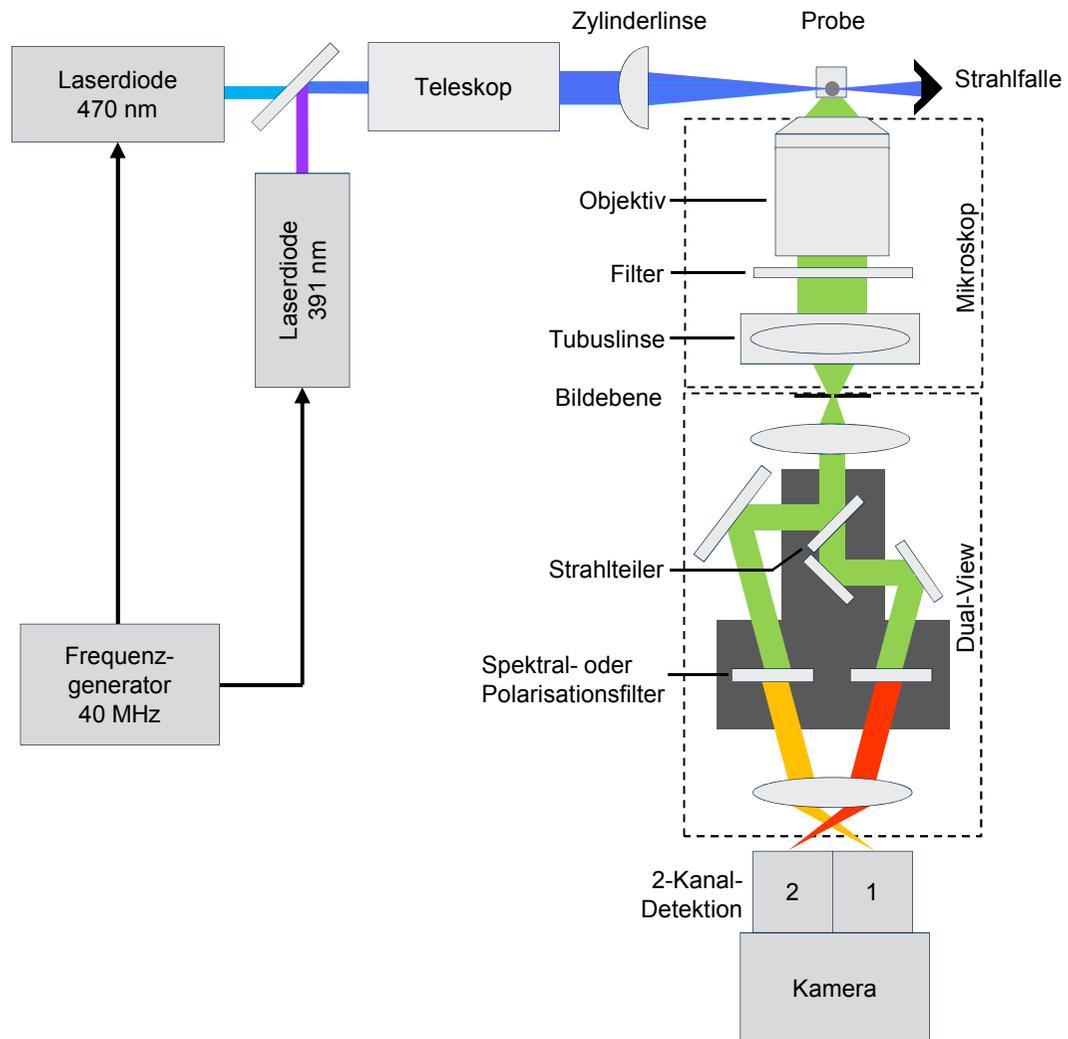
Anregungsspektren von roGFP2



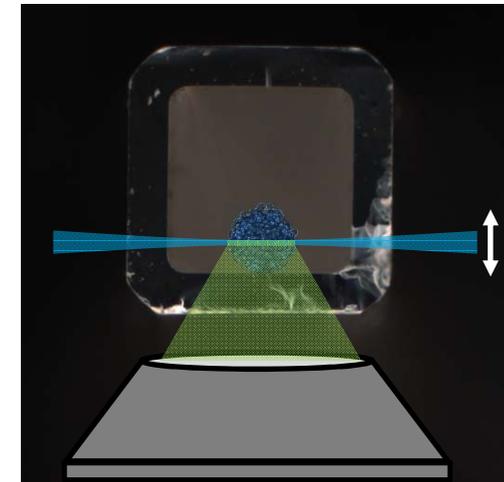
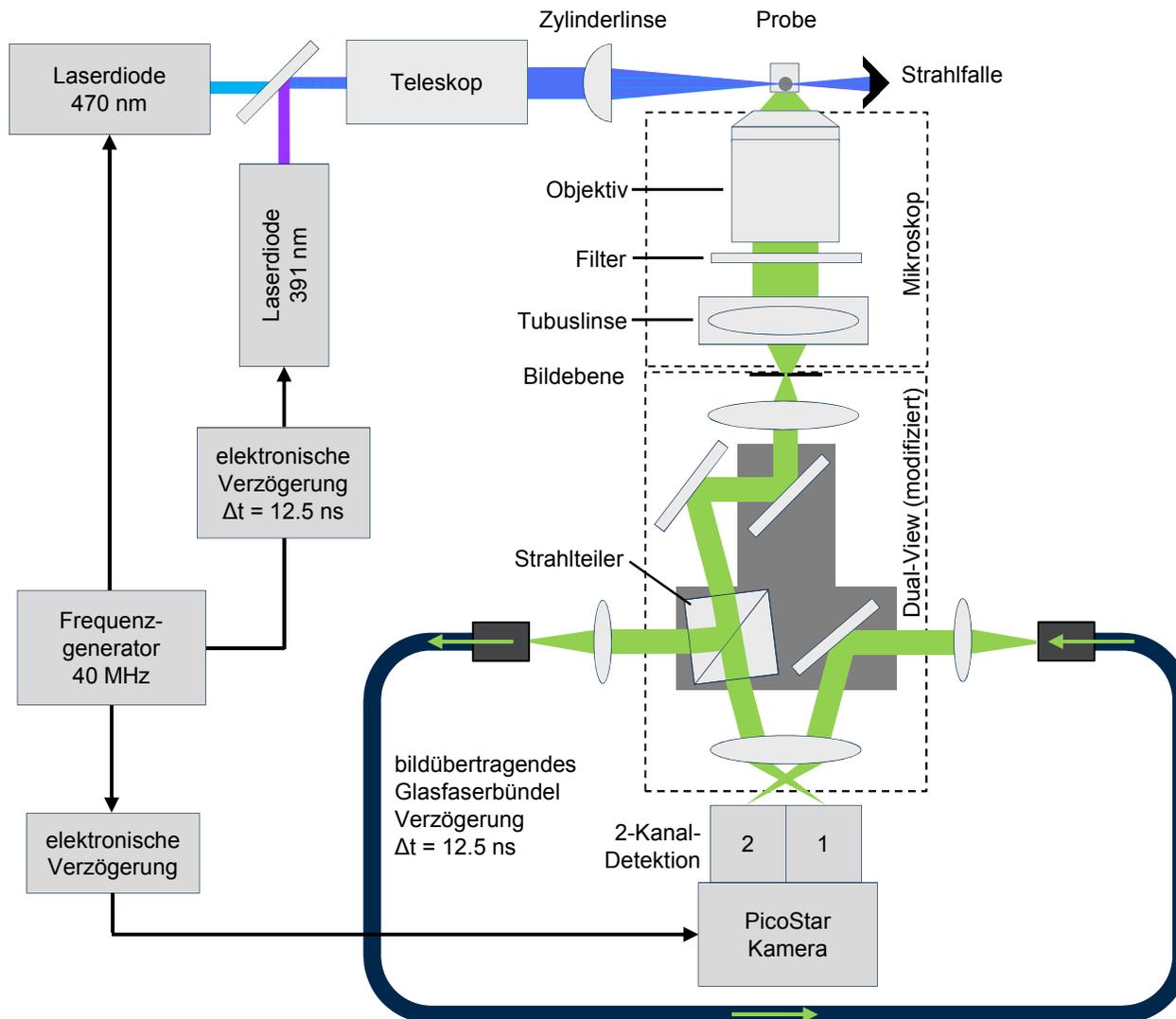
Anregungsspektren von roGFP2



Experimenteller Aufbau

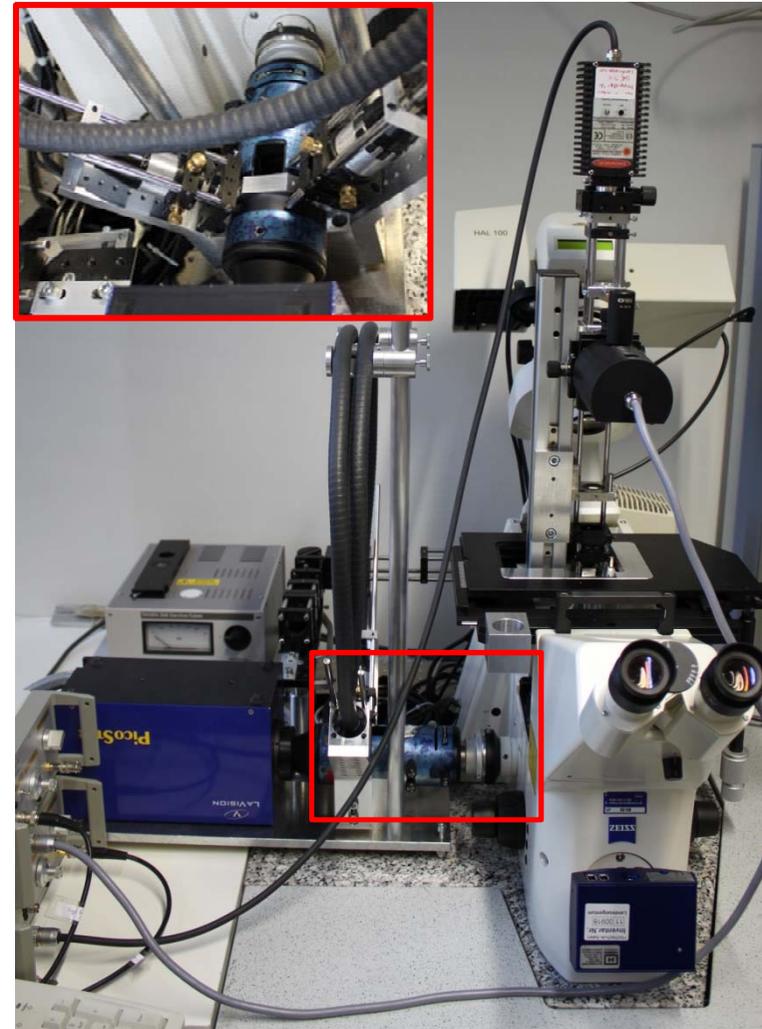


Experimenteller Aufbau

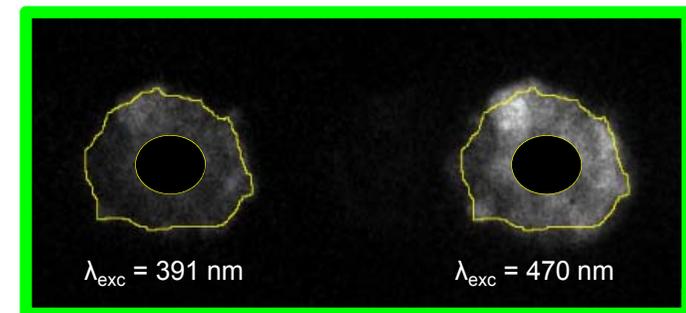
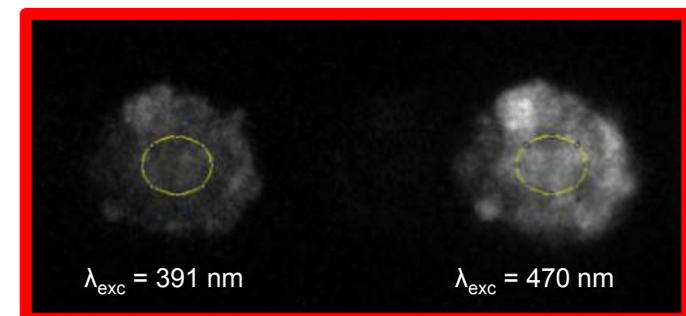
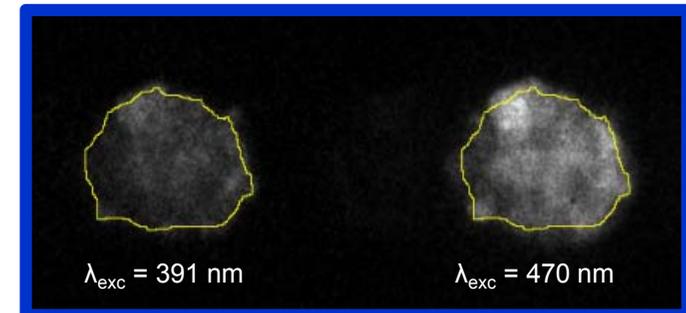
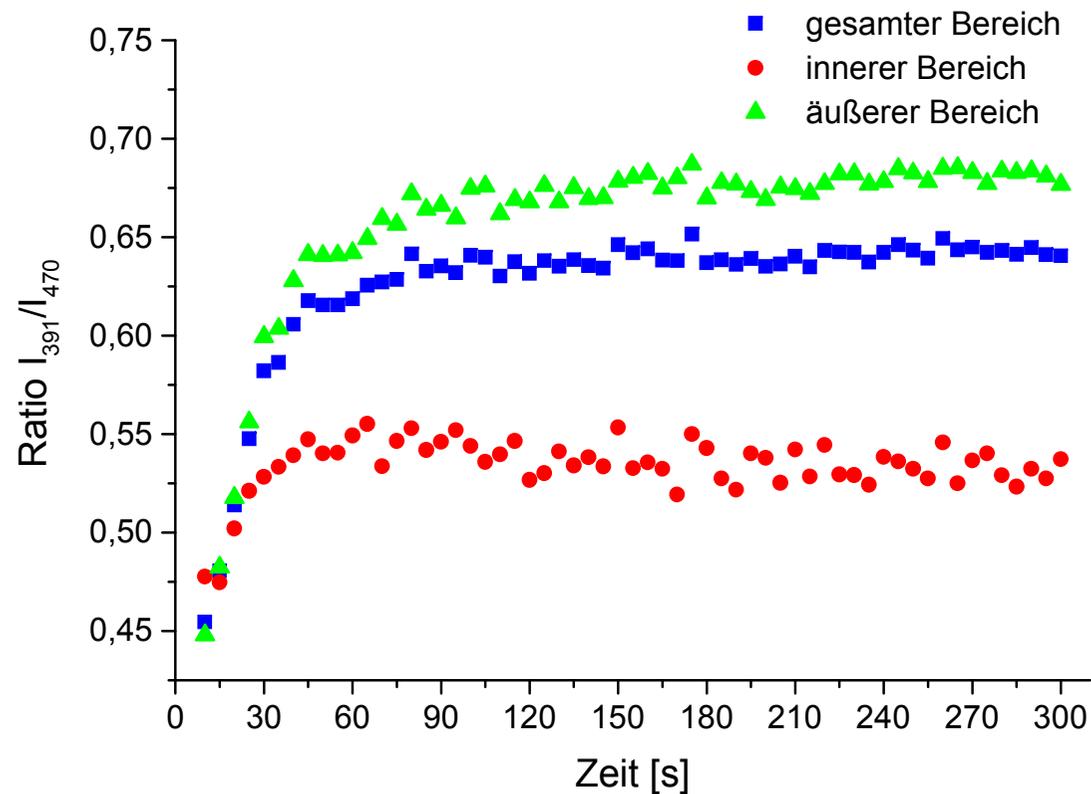


	Sensorhälfte 1 (direktes Bild)	Sensorhälfte 2 (verzögertes Bild)
t	470 nm	-
$t + \Delta t$	391 nm	470 nm
$t + 2 \Delta t$	470 nm	391 nm
$t + 3 \Delta t$	391 nm	470 nm
$t + 4 \Delta t$	470 nm	391 nm
$t + 5 \Delta t$	391 nm	470 nm

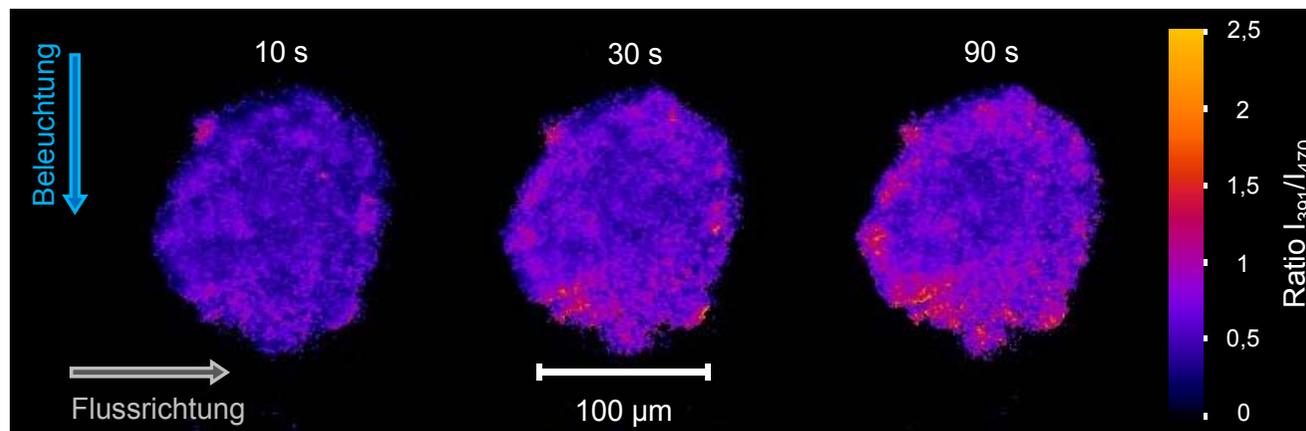
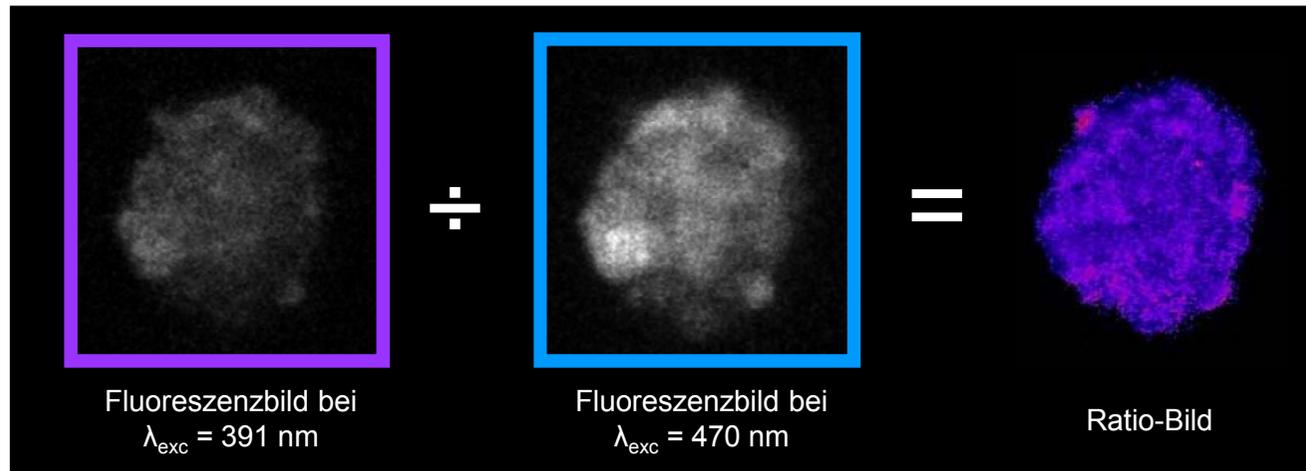
Experimenteller Aufbau



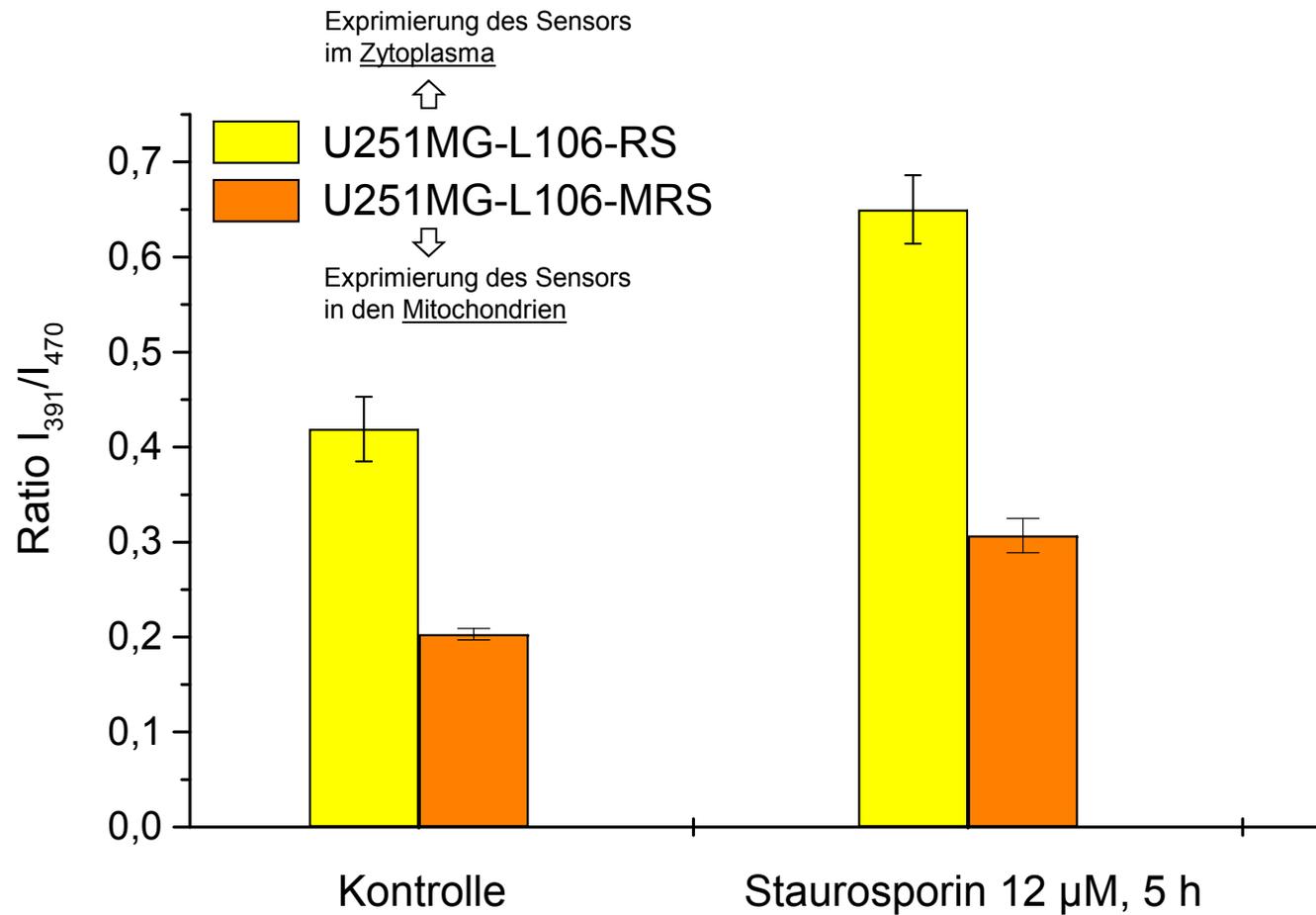
Experiment 1: Änderung des Redox-Gleichgewichts in Zellsphäroiden unter H₂O₂-Zugabe



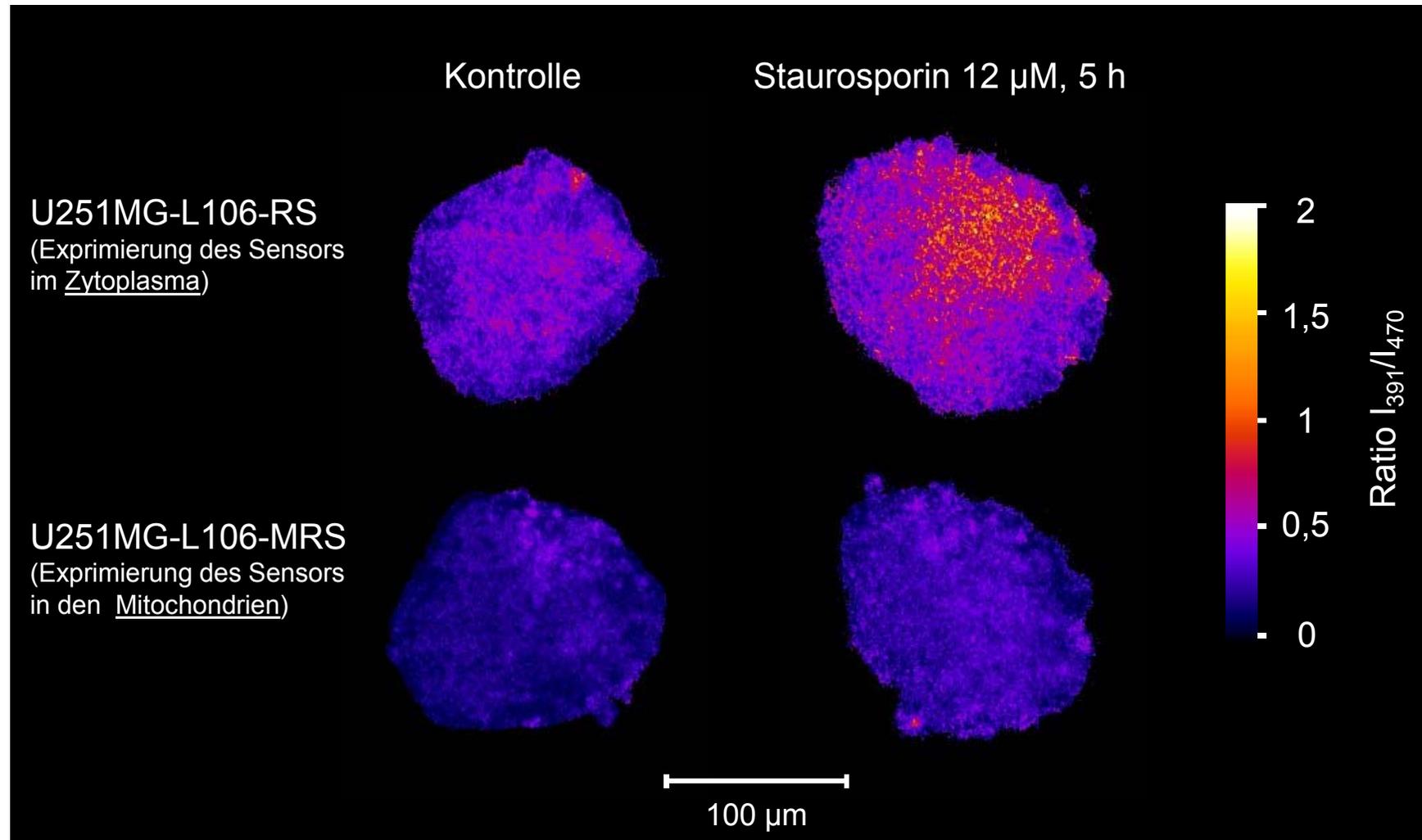
Experiment 1: Änderung des Redox-Gleichgewichts in Zellsphäroiden unter H_2O_2 -Zugabe



Experiment 2: Änderung des Redox-Gleichgewichts in Zellsphäroiden durch Staurosporin-induzierte Apoptose



Experiment 2: Änderung des Redox-Gleichgewichts in Zellsphäroiden durch Staurosporin-induzierte Apoptose



Zusammenfassung

- Simultane Fluoreszenzdetektion von Proben mit unterschiedlichen Anregungs- jedoch gleichen Emissionsspektren
- Messung während der Zugabe eines Wirkstoffs dank Mikrofluidik
- Demonstration der System-Funktionalität anhand zweier Experimente

Ausblick

- Calcium Imaging
 - Messung der Fluoreszenzlebensdauer (bei entsprechender Modifikation)
- 

Mikrostrukturanalyse im Gewebeverband

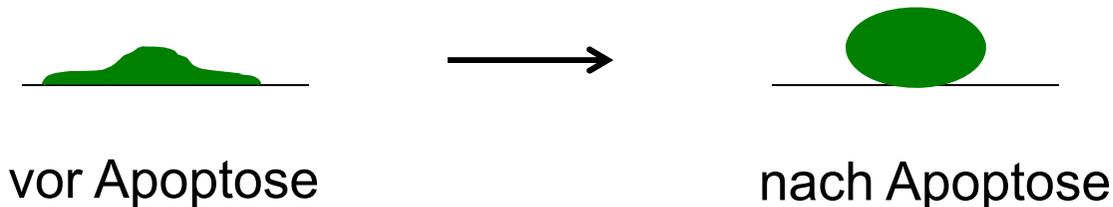
- in Kooperation mit ILM, Ulm -

- finanziert durch Baden – Württemberg Stiftung gGmbH -

Ziel des Projekts:

- ➔ aus Streulichtmessungen an makroskopischen Gewebeproben Informationen über deren Mikrostruktur erhalten
z.B. Zellkerngröße

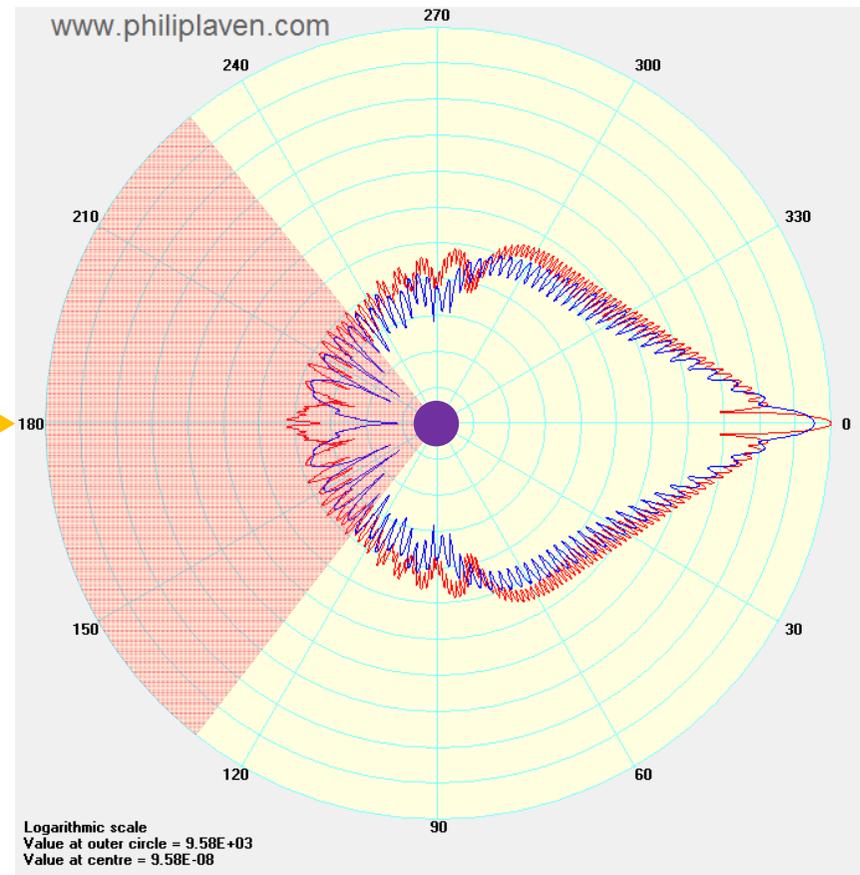
Beispiel: Veränderungen von Zellen bei Apoptose



Winkelabhängige Streulichtmessungen

→ Änderungen der Zellstruktur bewirkt Änderung im Streumuster

→ Rückstreuung im Bereich $130^\circ - 230^\circ$



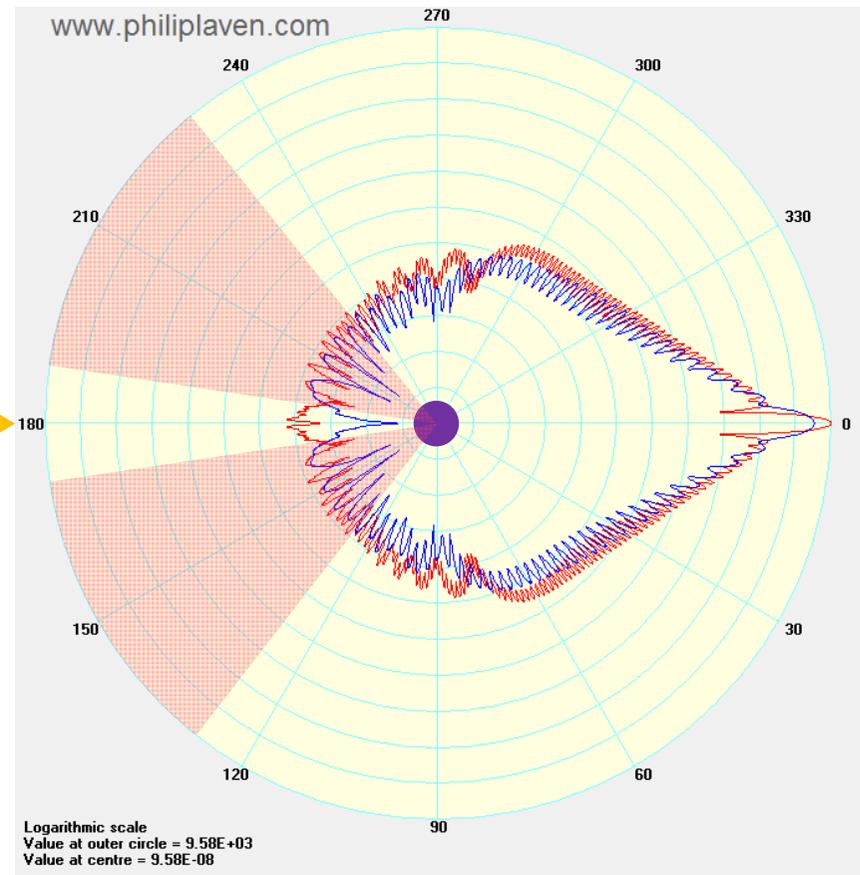
Simulation: Kugeln mit $d_{\text{blau}} = 10 \mu\text{m}$
 $d_{\text{rot}} = 20 \mu\text{m}$
 $n_{\text{Kugel}} = 1,37$
 $n_{\text{Medium}} = 1,33$

Winkelabhängige Streulichtmessungen

→ Änderungen der Zellstruktur bewirkt Änderung im Streumuster

→ Rückstreuung im Bereich $130^\circ - 230^\circ$

→ direkter Reflex an der Glasoberfläche $180^\circ \pm 10^\circ$



Simulation: Kugeln mit $d_{\text{blau}} = 10\mu\text{m}$
 $d_{\text{rot}} = 20\mu\text{m}$
 $n_{\text{Kugel}} = 1,37$
 $n_{\text{Medium}} = 1,33$

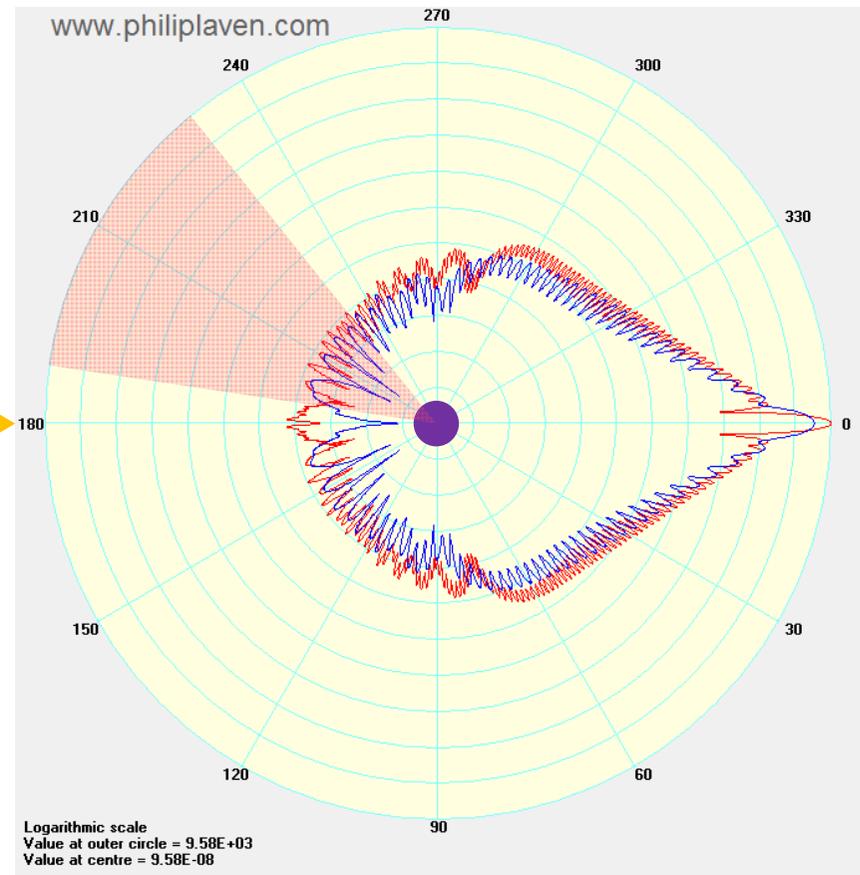
Winkelabhängige Streulichtmessungen

→ Änderungen der Zellstruktur bewirkt Änderung im Streumuster

→ Rückstreuung im Bereich $130^\circ - 230^\circ$

→ direkter Reflex an der Glasoberfläche $180^\circ \pm 10^\circ$

→ Streuung symmetrisch



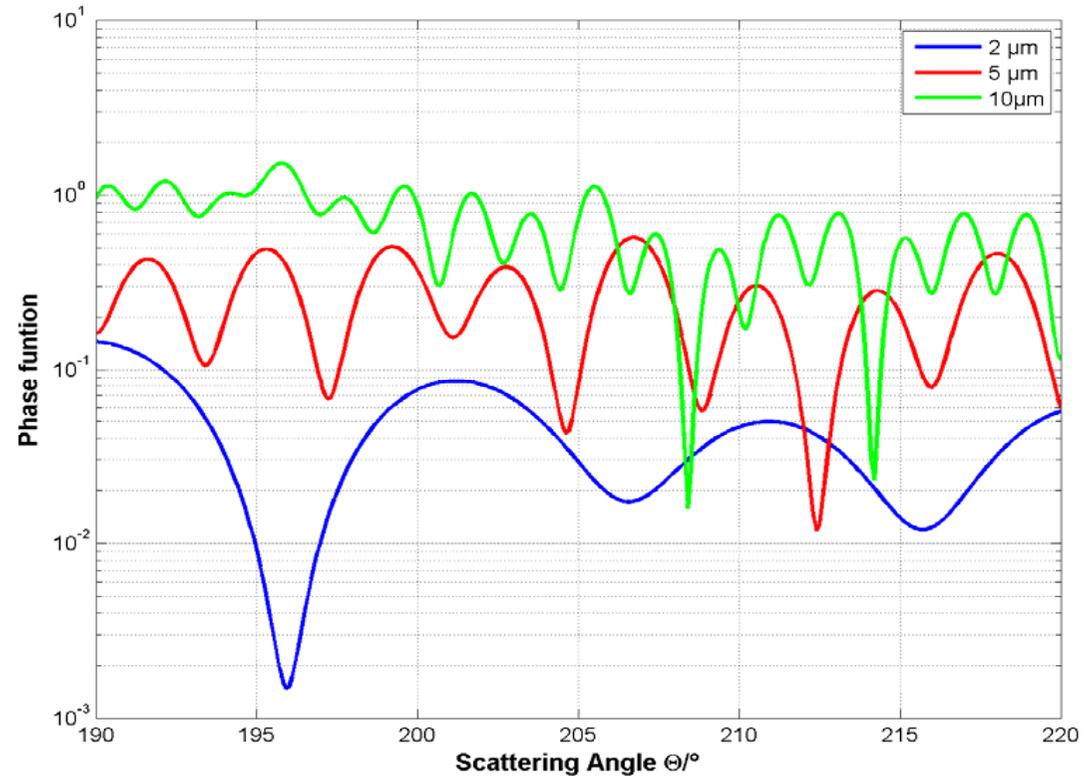
Simulation: Kugeln mit $d_{\text{blau}} = 10\mu\text{m}$
 $d_{\text{rot}} = 20\mu\text{m}$
 $n_{\text{Kugel}} = 1,37$
 $n_{\text{Medium}} = 1,33$

Elastische Lichtstreuung (Mie Theorie):

- Winkelabhängigkeit der Rückstreuung (Latex Beads) -

→ Streuung ist abhängig von Größe des Streuers

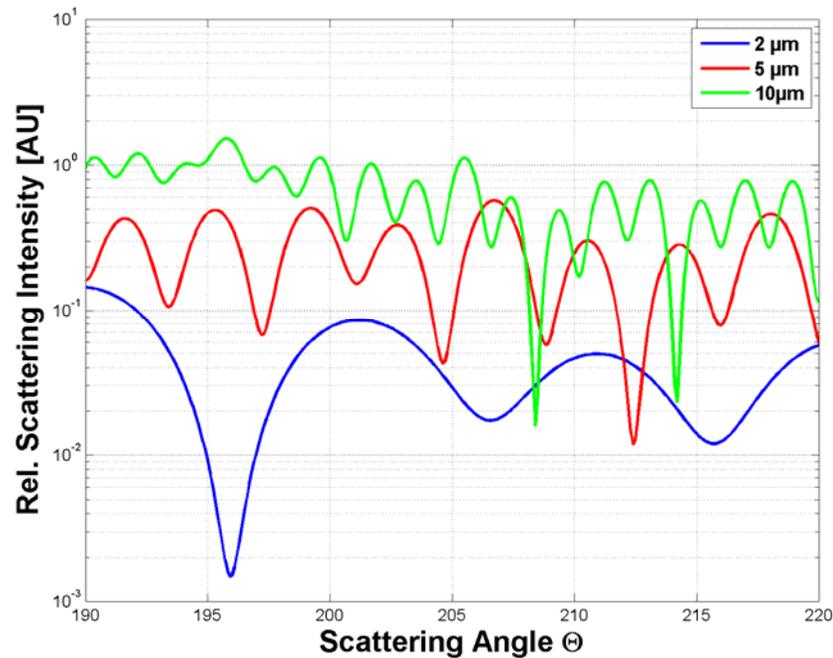
→ je größer der Streuer, desto schmaler die Oszillationen



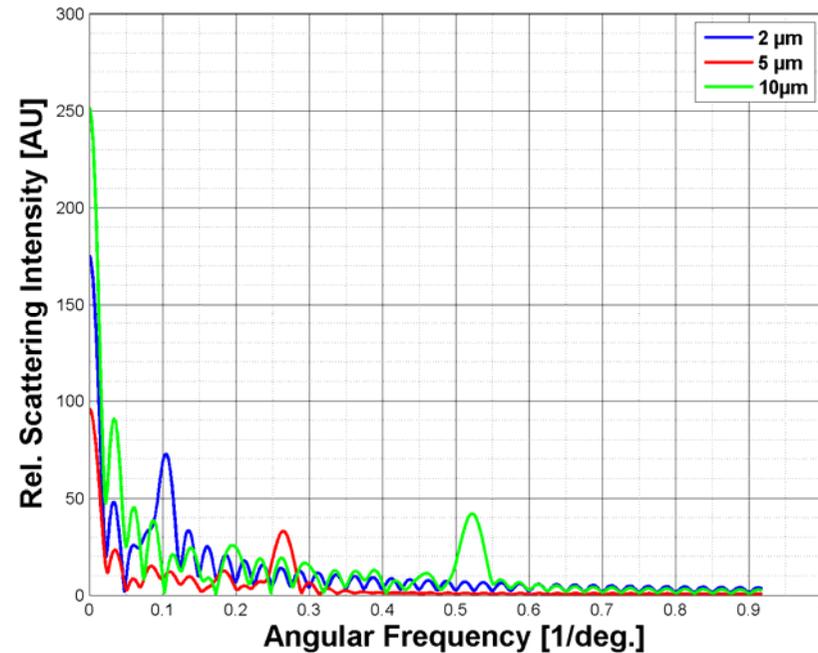
Simulation: Kugeln mit $d_{\text{blau}} = 2\mu\text{m}$
 $d_{\text{rot}} = 5\mu\text{m}$
 $d_{\text{grün}} = 10\mu\text{m}$
 $n_{\text{Kugel}} = 1,59$
 $n_{\text{Medium}} = 1,33$

Winkelabhängige Rückstreuung (Latex Beads) und Fast Fourier Transformation

Simulation



FFT

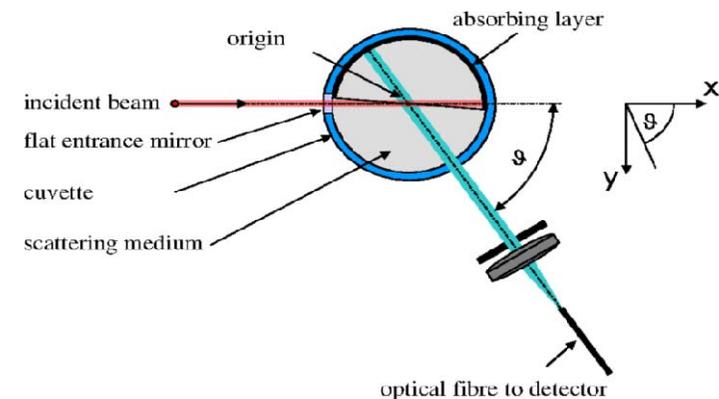


Simulation: Kugeln mit $d_{\text{blau}} = 2\mu\text{m}$
 $d_{\text{rot}} = 5\mu\text{m}$
 $d_{\text{grün}} = 10\mu\text{m}$
 $n_{\text{Kugel}} = 1,59$
 $n_{\text{Medium}} = 1,33$

Winkelabhängige Rückstreuung

üblicherweise: Messungen an Zellsuspensionen

- Detektor wird um Probe herum verfahren
- Probe wird gedreht



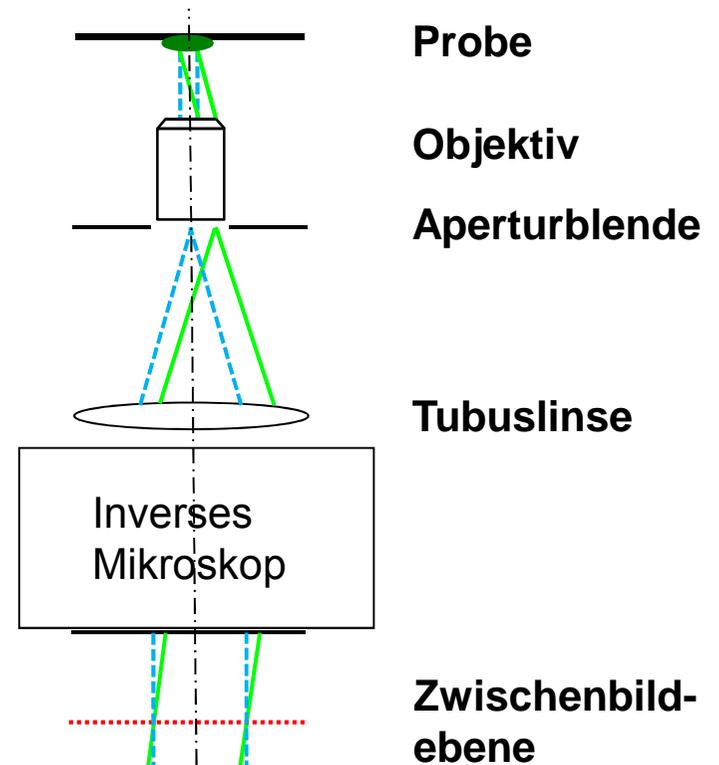
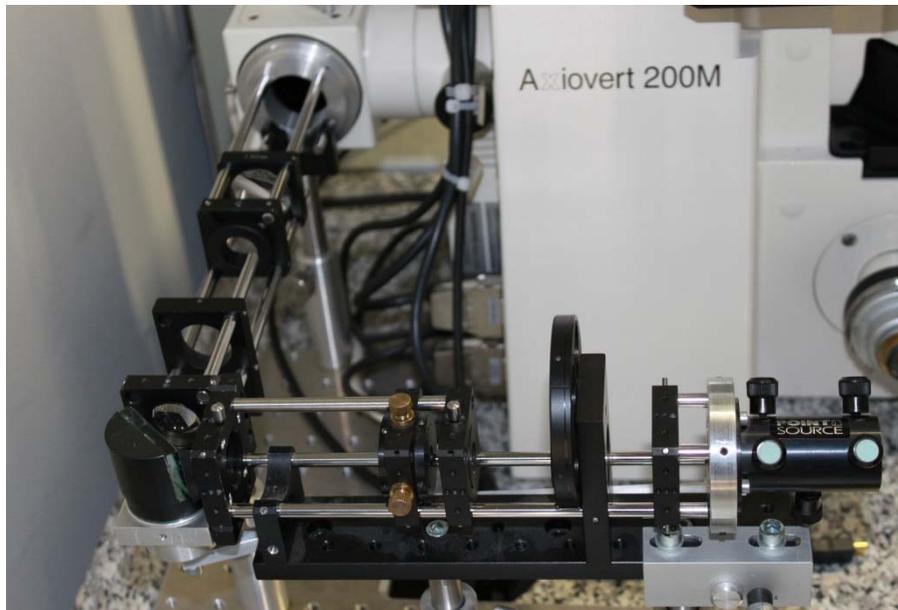
[Florian Foschum und Alwin Kienle, 2013]

hier: Messung an vitalen Zellen auf Deckgläsern

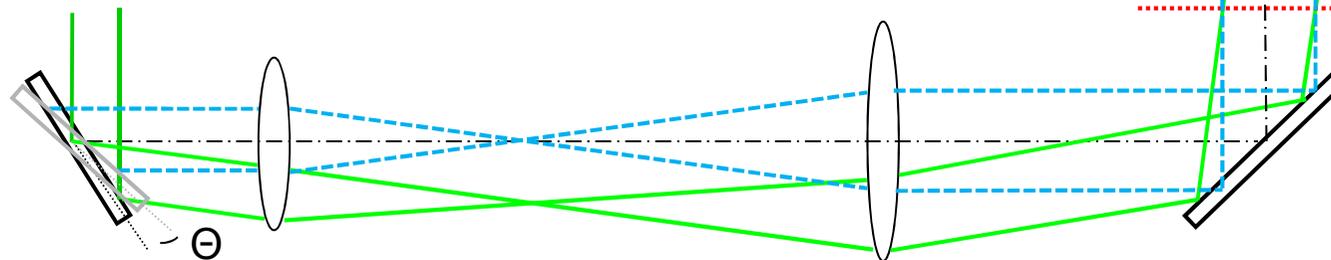
- Adaption an konventionelles inverses Mikroskop
- Beobachtung der Probe möglich

Winkelabhängige Rückstreuung

- Experimenteller Aufbau -

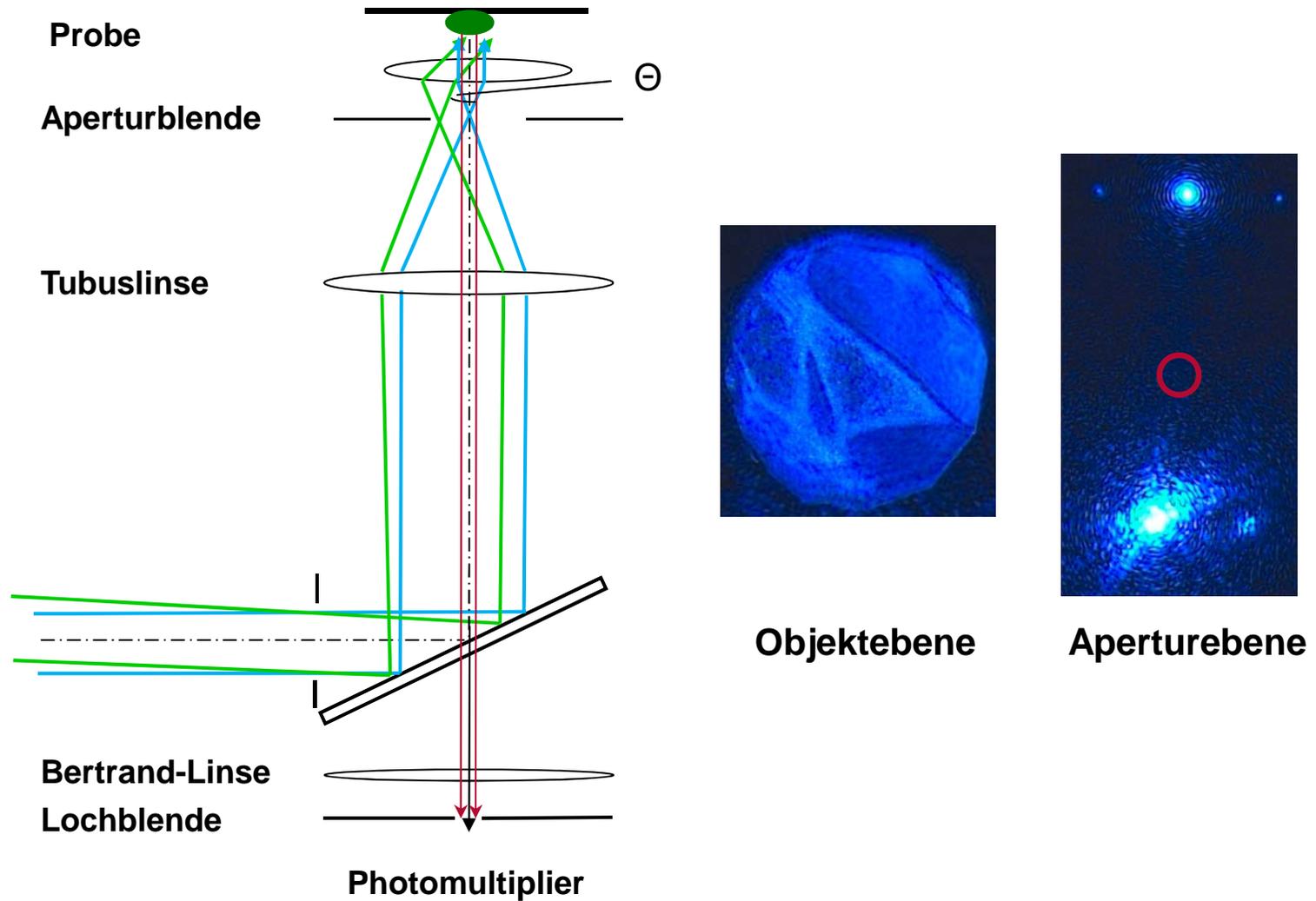


Laserdiode



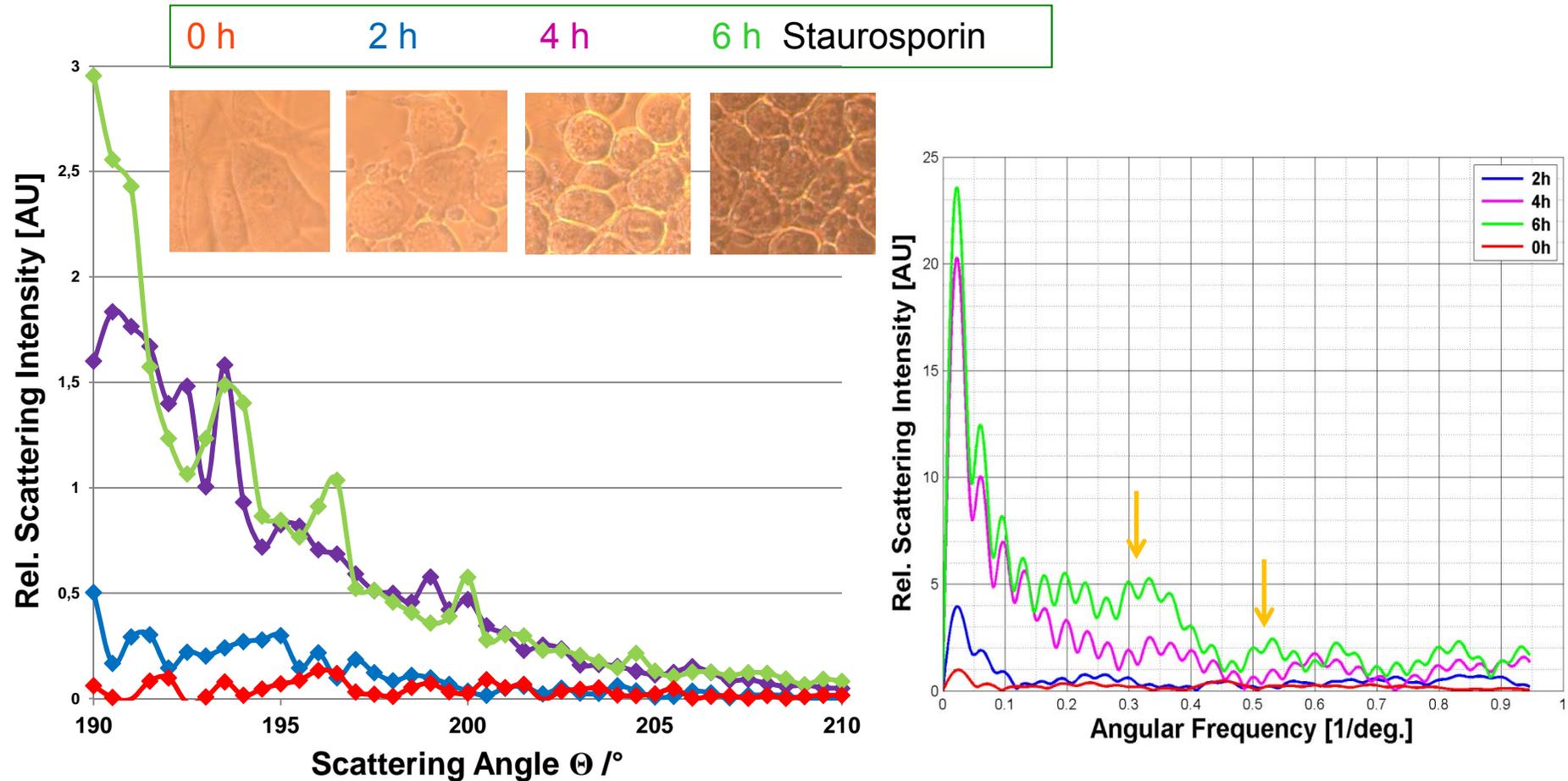
Drehspiegel Θ

Winkelabhängige Rückstreuung - Experimenteller Aufbau -



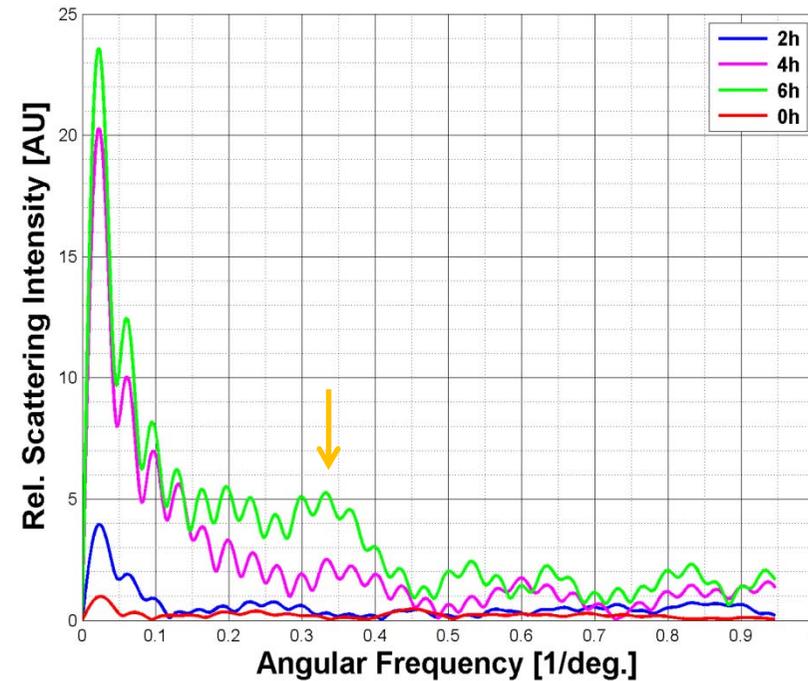
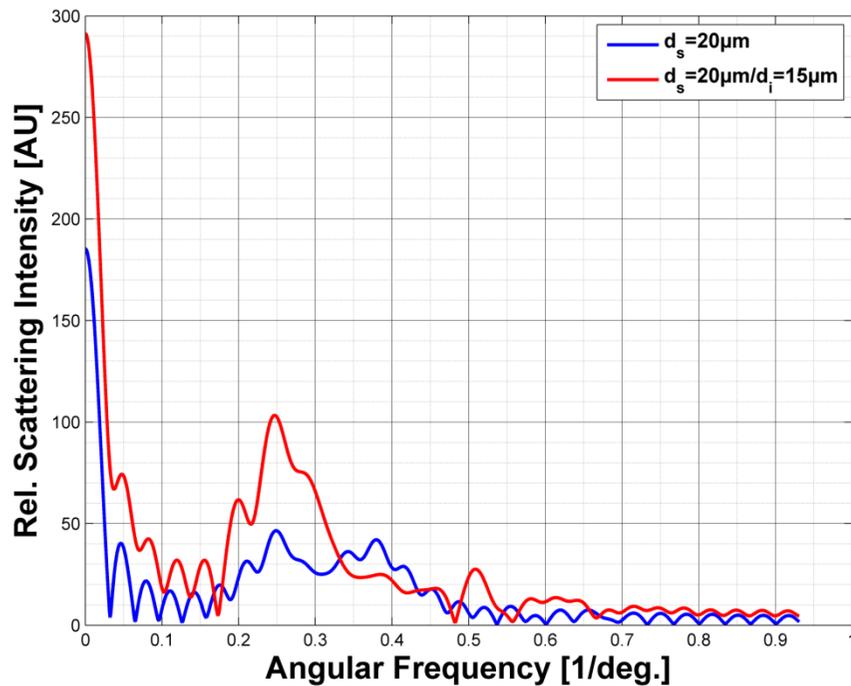
Winkelabhängige Streuung: 3T3 Fibroblasten nach Apoptose

- Staurosporin 1 μ M/2h-4h-6h-



Vergleich mit Simulation

- Florian Voit, ILM Ulm -

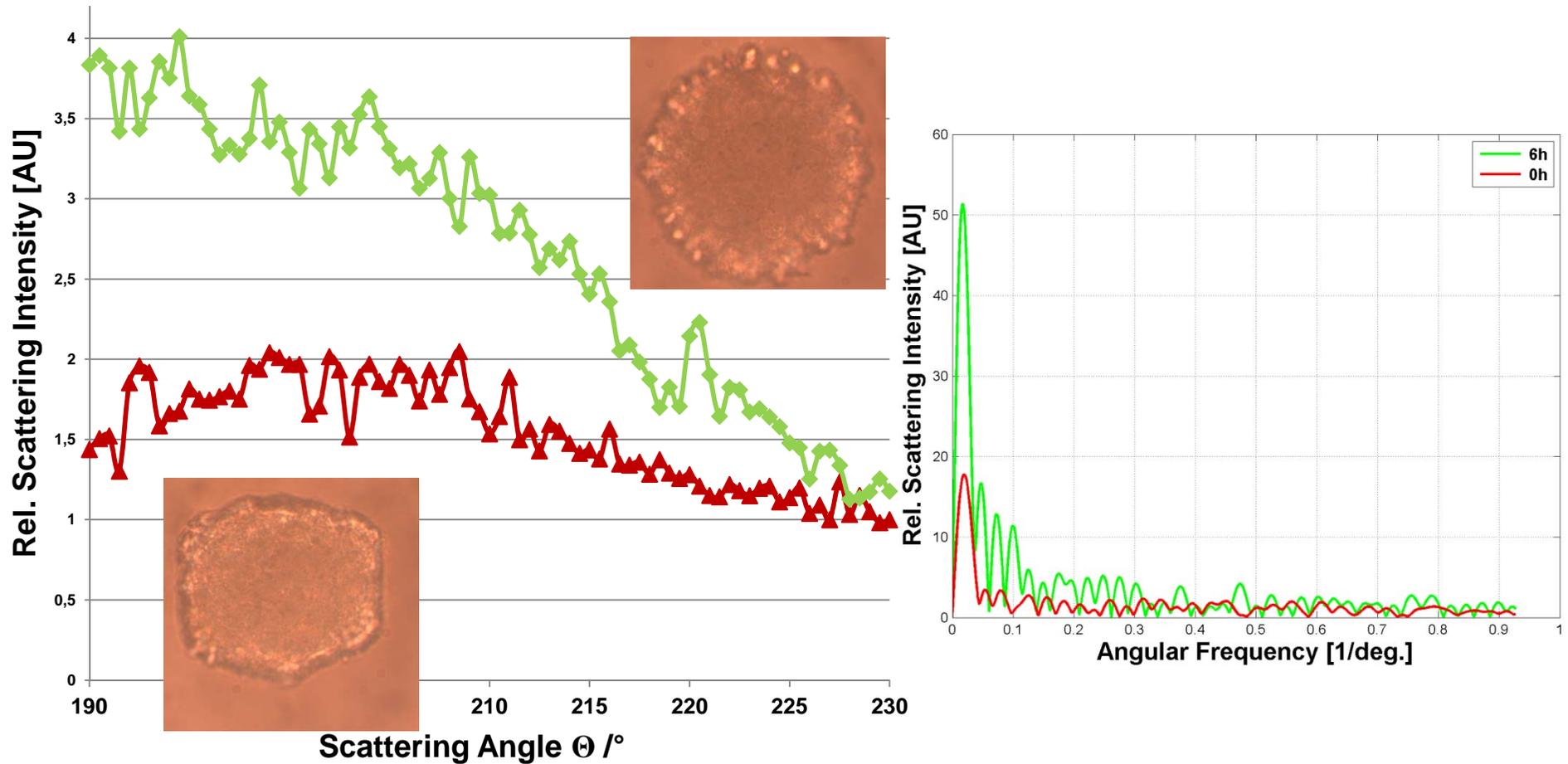


Simulation: Kugeln mit $d_{\text{blau}} = 20\mu\text{m}$
 $d_{\text{rot,H\u00fc}} = 20\mu\text{m} / d_{\text{rot,Kern}} = 15\mu\text{m}$
 $n_{\text{Kugel}} = 1,37$
 $n_{\text{Medium}} = 1,33$

Messung 3T3 Fibroblasten
 vor und nach Apoptose (0h,2h,4h,6h,)

Ausblick: Apoptose bei Sphäroiden

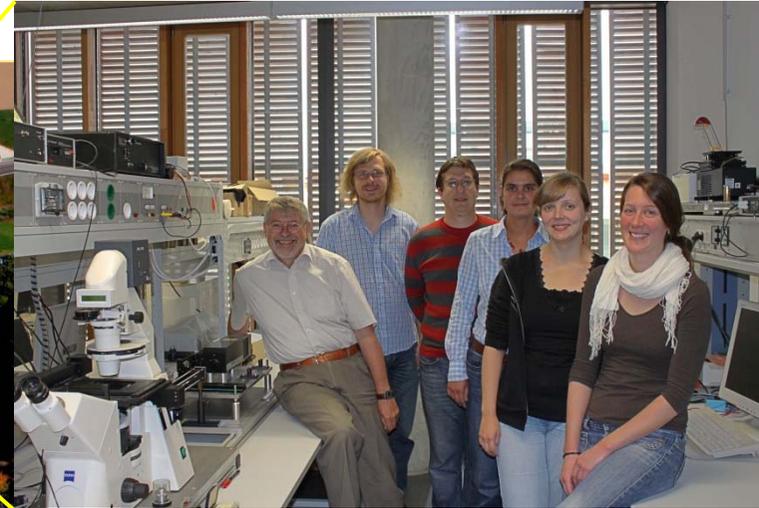
- Staurosporin 2 μ M/6h -



Winkelabhängige Streulicht-Messungen: Perspektiven und Probleme

- Größe der Streupartikel kann abgeschätzt werden;
- Kalibrierung schwierig, da genaue Brechungsindizes unbekannt
- Vergleich mit Simulation schwierig
 - sehr viele verschiedene Parameter
- Apoptose kann untersucht werden, tritt aber vermutlich in Zusammenhang mit anderen Prozessen auf (z.B. Nekrose)
- 3-dimensionale Proben sollten weiter untersucht werden

Biophotonik - Gruppe (Hochschule Aalen)



(gefördert durch BMBF, Land Baden-Württemberg, Europ. Fonds für regionale Entwicklung,
finanziert durch Baden-Württemberg-Stiftung gGmbH)

First Announcement



Topics:

- Biomedical Imaging
- Laser Spectroscopy
- Laser-Tissue Interaction
- Light Microscopy
- Nano-Biophotonics
- Novel Devices and Methods
- Clinical Laser Applications

Plenary and Keynote Speakers Include:

B. Tromberg (USA), V. Ntziachristos (D),
P. French (UK), P. Anderson (DK), M. Frenz (CH),
A.V. Priezzhev (RUS), P. Taroni (I), Q. Luo (China)
V.V. Tuchin (RUS), J. Lademann (D), J. Popp (D)
M.R. Hamblin (USA), A. Chiou (Taiwan), V. Vaks (RUS)
A. Vogel (D), C. Cremer (D), E. Stelzer (D),
R. Rotomskis (LT), V.B. Loshchenov (RUS),
S. Andersson-Engels (S), N.M. Shakhova (RUS),
P. Berlien (D), H. Stepp (D)

Conference Chairs: R. Steiner, R. Hibst, H. Schneckenburger (D)

<http://lals2014.ilm-ulm.de>