Institut für Lasertechnologien in der Medizin und Messtechnik
an der Universität Ulm

Direktor: Prof. Dr. Raimund Hibst

in Kooperation mit der Hochschule Aalen,
Institut für Angewandte Forschung

Leiter: Prof. Dr. Herbert Schneckenburger

Lichtscheibenmikroskopie und Ratio Imaging
–
Entwicklung von Modulen und deren Anwendung zur Untersuchung von Tumorzellsphäroiden

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades der Humanbiologie
der Medizinischen Fakultät der Universität Ulm

Sarah Schickinger

Baden-Baden

2014

Amtierender Dekan: Prof. Dr. Thomas Wirth

1. Berichterstatter: Prof. Dr. Herbert Schneckenburger

2. Berichterstatter: Prof. Dr. Paul Walther

Tag der Promotion: 23. Januar 2015

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis V

Formelzeichen VII

1 Einleitung 1

2 Material und Methoden 8

2.1 Physikalische Grundlagen 8

2.1.1 Abbildende Optik 8

2.1.2 Fluoreszenz 14

2.1.3 Förster-Resonanzenergietransfer (FRET) 16

2.2 Fluoreszierende Proteine und Sensoren 18

2.3 Sphäroide – Dreidimensionale Zellkultur 21

2.4 Wirk- und Farbstoffe 24

2.5 Konfokale Laser Scanning Mikroskopie 28

3 Technischer Aufbau 30

3.1 Modul zur Probenhalterung 31

3.1.1 Kapillaren 31

3.1.2 Probenapplikation 32

3.1.3 Kapillarhalterung 33

3.1.4 Fluidik 35

3.2 Modul zur Lichtscheibenerzeugung 36

3.2.1 Aufbau 37

3.2.2 Zwei-Wellenlängen-Anregung 41

3.2.3 Synchronisierter Hub von Lichtscheibe und Objektiv 43

3.3 Modul zum Ratio Imaging im Nanosekundenbereich 46

3.3.1 Zwei-Kanal-Detektion 47

3.3.2 Bildverzögerung mittels bildübertragendem Glasfaserbündel 50

3.3.3 Justage der Abbildungen auf dem Kamerasensor 51

3.3.4 Gesamtaufbau und Funktionsweise 54

3.3.5 Darstellung von Änderungen des Redoxgleichgewichts 58

3.4 Weitere Detektionsmöglichkeiten 60

4 Ergebnisse 62

4.1 Charakterisierung des SPIM-Moduls 63

4.1.1 Charakterisierung der Lichtscheibe 63

4.1.2 Bildqualität 65

4.1.3 3D-Rekonstruktion 67

4.2 Anwendungsbeispiele unter Verwendung des SPIM-Moduls 69

4.2.1 Fluoreszenzaufnahmen eines Zellsphäroids nach Inkubation mit dem Zytostatikum Doxorubicin 69

4.2.2 Messungen der Fluoreszenzlebensdauer 71

4.3 Charakterisierung des Moduls zum Ratio Imaging 74

4.3.1 Transmission 74

4.3.2 Bildqualität 74

4.4 Ratio Imaging an Tumorzellsphäroiden 76

4.4.1 Oxidation des Redoxsensors durch Wasserstoffperoxid 76

4.4.2 Oxidation des Redoxsensors durch Staurosporin-induzierte Apoptose 79

5 Diskussion 84

5.1 Technischer Aufbau 84

5.1.1 Modul zur Probenhalterung 84

5.1.2 SPIM-Modul 89

5.1.3 Ratio Imaging Modul 93

5.2 Ergebnisse 97

5.2.1 Lichtscheibenfluoreszenzmikroskopie mit SPIM-Modul 97

5.2.2 Ratio Imaging 102

5.3 Fazit und zukünftige Perspektiven 105

6 Zusammenfassung 108

7 Literaturverzeichnis 110

Anhang 120

Danksagung 122

Lebenslauf 123

Publikationsliste 125

Abkürzungsverzeichnis

A	Absorption
Ac	Aequorea coerulescens (Quallenspezies aus der das grün fluoreszierende Protein AcGFP1 gewonnen wird)
a.u.	Arbitrary units (willkürliche Einheiten)
CCD	Charge-Coupled Device
CHO	Chinese Hamster Ovary (Zelllinie aus Ovarien des chinesischen Hamsters)
CLSM	Confocal Laser Scanning Microscopy (Konfokale Laser Scanning Mikroskopie)
DEVD	Linker-Peptid (Aminosäuresequenz aus Asparaginsäure-Glutaminsäure-Valin-Asparaginsäure)
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium (Zellkulturmedium)
DNA	Deoxyribonucleic acid (Desoxyribonucleinsäure, DNS)
EBSS	Earle's Balanced Salt Solution (Kochsalzlösung)
(E)CFP	(Enhanced) Cyan Fluorescent Protein (cyan fluoreszierendes Protein)
(E)GFP	(Enhanced) Green Fluorescent Protein (grün fluoreszierendes Protein)
(E)YFP	(Enhanced) Yellow Fluorescent Protein (gelb fluoreszierendes Protein)
ET	Energietransfer
F	Fluoreszenz
FBS	Fetal Bovine Serum (Fötales Rinderserum)
FLIM	Fluorescence Lifetime Imaging Microscopy
FRET	Förster-Resonanzenergietransfer
FWHM	Full Width Half Maximum (Halbwertsbreite)
G 418-BC	Antibiotikum (Zusatz bei der Zellkultivierung)
GAP-43	Growth Associated Protein 43
Grx	Glutaredoxin
Grx1-roGFP2	Glutathion-spezifisches redoxsensitives grün fluoreszierendes Protein, abgekürzt mit RS für Redoxsensor
GSH	Glutathion (reduzierter Zustand)
GSSH	Glutathiondisulfid (oxidierter Zustand)
HeLa	Epithelzelllinie eines Zervixkarzinoms
HRI	High Rate Imager (Hochgeschwindigkeitsaufnahmegerät)
IC	Internal Conversion (Strahlungslose Konversion)

ISC	Intersystem Crossing (Interkombination)
LED	Light Emitting Diode (Leuchtdiode)
LUT	Lookup Table (Wertetabelle)
MCTS	Multi Cellular Tumor Spheroids (Multizelluläre Tumorsphäroide)
MAD	Median Absolute Deviation (Median der absoluten Abweichungen)
MCF-7	Mammakarzinomzelllinie
Mem	Membranständigkeit (Plasmamembran-assoziierte Proteinexpression)
MEM	Minimal Essential Medium (Zellkulturmedium)
NAD(P)	Nicotinamidadenindinucleotid(phosphat) (oxidierte Form)
NAD(P)H	Nicotinamidadenindinucleotid(phosphat) (reduzierte Form)
NEAA	Non-Essential Amino Acids (Zusatz bei der Zellkultivierung)
P	Phosphoreszenz
p	Plasmid
PSF	Point Spread Function (Punktverwaschungsfunktion)
roGFP	Redoxsensitives Grün Fluoreszierendes Protein
ROS	Reactive Oxygen Species (reaktive Sauerstoffspezies)
RPMI 1640	Zellkulturmedium (entwickelt am Roswell Park Memorial Institute)
RS	Redoxsensor (Grx1-roGFP2)
S	Singulettzustand
SPIM	Single Plane Illumination Microscopy (Lichtscheibenmikroskopie)
T	Triplettzustand
TRAIL	Tumor necrosis factor Related Apoptosis Inducing Ligand
U251MG	Glioblastomzelllinie
U251MG-L106	Transfizierter Subklon der U251MG Glioblastomzelllinie
U251MG-L106-RS	Rekombinanter Subklon, der den Redoxsensor (RS) Grx1-roGFP2 im Zytoplasma exprimiert
U251MG-L106-MRS	Rekombinanter Subklon, der den Redoxsensor (RS) Grx1-roGFP2 in den Mitochondrien (M) exprimiert
VSNR	Variational Stationary Noise Remover (ImageJ *Plugin*)

Formelzeichen

A_i	Amplitude der Komponente *i* mit der Fluoreszenzlebensdauer τ_i [a.u.]
A_N	Numerische Apertur
$A_{N,Bel}$	Numerische Apertur der Beleuchtungsoptik
$A_{N,Det}$	Numerische Apertur der Detektionsoptik
a_{rB}	Radius einer runden Blende [m]
a_S	Halbe Spaltbreite einer rechteckigen Blende [m]
a'_C, a'_F	Bildweiten für die Wellenlängen C und F [m]
$a'_{d,1}$	Bildweite der Linse 1 für die Wellenlänge d [m]
β	Funktion in Abhängigkeit der Blende und des Winkels θ zur Berechnung der beugungsbegrenzten Auflösung optischer Systeme
β'	Abbildungsmaßstab
c	Lichtgeschwindigkeit [m/s]
C	Wellenlänge 656,3 nm (Fraunhoferlinie des Elements Wasserstoff, H-alpha)
d	Wellenlänge 587,6 nm (Fraunhoferlinie des Elements Helium)
D	Abstand zwischen Donor- und Akzeptormolekül (in Bezug auf FRET) [m]
D_0	FRET-kritischer Abstand zwischen Donor- und Akzeptormolekül [m]
e	Abstand zwischen dem bildseitigen Hauptpunkt einer Linse 1 und dem objektseitigen Hauptpunkt einer Linse 2 [m]
E	Energie eines Photons [J]
η_F	Fluoreszenzquantenausbeute
F	Wellenlänge 486,1 nm (Fraunhoferlinie des Elements Wasserstoff, H-beta)
f'	Bildseitige Brennweite [m]
f'_1, f'_2, f'_{zyl}	Bildseitige Brennweite der Linse 1, der Linse 2 und der Zylinderlinse [m]
f'_C, f'_F, f'_d	Bildseitige Brennweiten für die Wellenlängen C, F und d [m]
$f'_{d,1}$, $f'_{d,2}$, $f'_{d,ges}$	Bildseitige Brennweite der Linse 1, der Linse 2 und des Linsensystems für die Wellenlänge d [m]

h	Planck'sches Wirkungsquantum [Js]
θ	Winkel, der zwischen der optischen Achse und der Strecke R aufgespannt wird [°]
I_0	Fluoreszenzintensität unmittelbar nach der Anregung [a.u.]
$I_F(t)$	Fluoreszenzintensität in Abhängigkeit der Zeit nach der Anregung [a.u.]
$I(\theta)$	Intensitätsverteilung bei Beugung an einer Blende [a.u.]
I_{391}, I_{470}	Fluoreszenzintensitäten bei den Anregungswellenlängen 391 nm und 470 nm [a.u.]
k, k_F, k_{IC}, k_{ISC}, k_{ET}	Gesamte Übergangsrate, Übergangsrate bei Fluoreszenz, strahlungsloser Konversion, Interkombination, Energietransfer [s^{-1}]
λ	Wellenlänge [m]
v	Frequenz [s^{-1}]
v_d, $v_{d,1}$, $v_{d,2}$	Abbe'sche Zahl, Abbe'sche Zahl des Materials der Linse 1 und des Materials der Linse 2
n, n_1, n_2, n_3	Brechungsindex, Brechungsindizes der Medien 1, 2, und 3
n_C, n_F, n_d	Brechungsindizes für die Wellenlängen C, F und d (Fraunhoferlinien)
q_{rB}	Durchmesser des Airy-Scheibchens [m]
q_S	Kleinstmögliche Linienbreite bei Beugung an einer rechteckigen Blende bzw. bei Strahlfokussierung mit einer Zylinderlinse [m]
R	Strecke von der Blendenmitte zum Rand des ersten hellen Ringes/Linie [m]
σ, σ_1, σ_3	Halber Öffnungswinkel, halber Öffnungswinkel des Objektivs in Medium mit Brechungsindex n_1, Brechungswinkel (Ausfallwinkel) in Medium mit dem Brechungsindex n_3 [°]
τ, τ_i	Fluoreszenzlebensdauer, Fluoreszenzlebensdauer der Komponente i [s]
τ_D	Fluoreszenzlebensdauer des Donors [s]
t, Δt	Zeit, Zeitversatz [s]
x, y, z	Raumachsen, x und y: lateral, z: axial (bezogen auf die Detektionsachse des Mikroskopobjektivs)
Δx	Fokustiefe bezogen auf die Lichtscheibe in deren Ausbreitungsrichtung [m]
Δy	Laterale Auflösung in der Weitfeldfluoreszenzmikroskopie [m]

Δz	Axiale Auflösung, Fokustiefe (Schärfentiefe) bezogen auf die Detektion [m]
Δz_{Fokus}	Fokusverschiebung [m]
$\Delta z_{Objektiv}$	Objektivverschiebung [m]

1 Einleitung

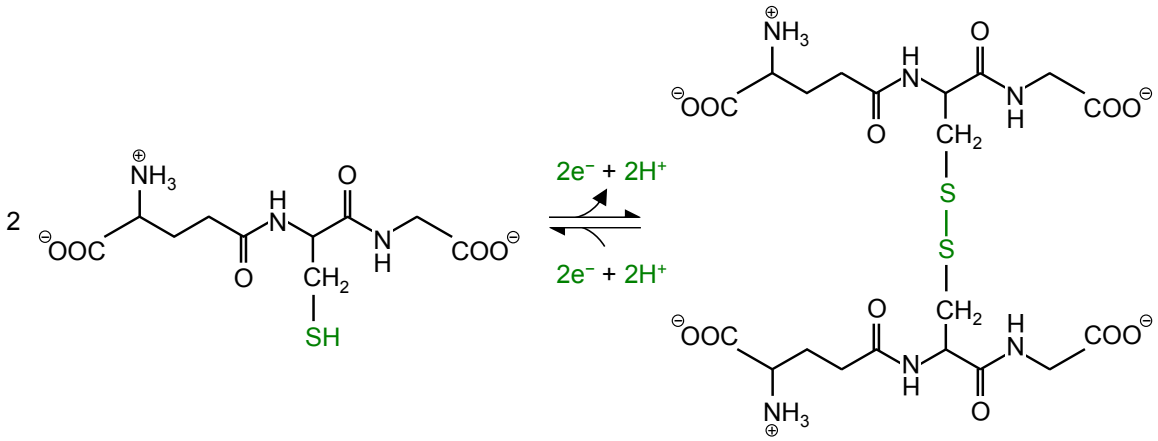
Zielsetzung und Motivation

Ziel der vorliegenden Arbeit ist die Entwicklung einer innovativen Methode zur verhältnisbasierten Bildgebung (Ratio Imaging) an dreidimensionalen Tumorzellsphäroiden und deren Kombination mit Lichtscheibenfluoreszenzmikroskopie. Dies soll unter anderem der Darstellung von Änderungen des intrazellulären Redoxgleichgewichts im Bereich der Wirkstoffforschung dienen.

Zellen besitzen eine Vielzahl von Redoxsystemen. Ihre Aufgabe besteht darin, Oxidantien, die bei intrazellulären Prozessen, wie der Zellatmung, entstehen oder von außen aufgenommen werden, abzubauen. Ein Redoxsystem besteht aus Molekülen, die sich in einem bestimmten Verhältnis zueinander im reduzierten und oxidierten Zustand befinden. Dabei ist die Anzahl der reduzierten Moleküle innerhalb eines Redoxsystems in der Regel deutlich höher als die Anzahl der Moleküle im oxidierten Zustand. Beim Abbau von Oxidantien gehen die reduzierten Moleküle in den oxidierten Zustand über. Um das Redoxgleichgewicht wieder herzustellen, werden die sich somit im oxidierten Zustand befindenden Moleküle durch entsprechende Enzyme in den reduzierten Zustand zurückversetzt.

Der Erhalt des intrazellulären Redoxgleichgewichts spielt eine wichtige Rolle, da sich dessen Änderungen auf eine Reihe von Zellfunktionen auswirken. Zu diesen zählen unter anderem Wachstum, Reaktion bei Stress, Stoffwechsel, Zellzyklus, Kommunikation, Migration, Gentranskription und Immunantworten. [22]

Eines der intrazellulären Redoxsysteme ist Glutathion. Diesem wird aufgrund seiner hohen Konzentration von 5 bis 10 mM in Zellen eine große Bedeutung beim Erhalt des Redoxgleichgewichts zugewiesen [22]. Das Verhältnis von reduziertem Glutathion (GSH) zu oxidiertem Glutathion (GSSG, Glutathiondisulfid) beträgt innerhalb von Zellen etwa 100 : 1 [64]. GSH (Abbildung 1, links) schützt die Zelle vor Peroxiden durch die Fähigkeit, Elektronen in Form von Wasserstoffatomen an diese abgeben zu können. Nach Abgabe jeweils eines Wasserstoffatoms verbinden sich zwei GS-Reste zu GSSG (Abbildung 1, rechts). Das Enzym Glutathion-Reduktase sorgt mit der reduzierten Form von Nicotinamidadenindinucleotidphosphat (NADPH) als Reduktionsmittel für die Rückführung von GSSG zu GSH [64].



Reduziertes Glutathion (GSH) Oxidiertes Glutathion (GSSH)

Abbildung 1. Glutathion. Bei der Oxidation von zwei reduzierten Glutathion (GSH) entsteht oxidiertes Glutathion in Form von Glutathiondisulfid (GSSG). [64]

Durch die Gabe eines Oxidationsmittels (z. B. Wasserstoffperoxid) kann das Redoxgleichgewicht in Zellen direkt beeinflusst werden [36]. Jedoch werden auch bei Apoptose (programmierter Zelltod) oxidative Änderungen des Redoxgleichgewichts hervorgerufen. Diese werden durch reaktive Sauerstoffspezies – produziert in den Mitochondrien – verursacht, die vermutlich zu einer Abnahme der Konzentration von reduziertem Glutathion führen [21, 28, 30].

In dieser Arbeit wird ein auf grün fluoreszierenden Proteinen basierendes Sensorsystem (Grx1-roGFP2) in Kombination mit Ratio Imaging genutzt, um Änderungen des intrazellulären Redoxgleichgewichts von Glutathion nachzuweisen.

Die Funktionsweise des Redoxsensors Grx1-roGFP2 beruht auf dessen unterschiedlichen Anregungsspektren im reduzierten und oxidierten Zustand: Im oxidierten Zustand weist der Sensor ein etwa zehnmal größeres Verhältnis der Fluoreszenzintensitäten bei Anregungswellenlängen von 400 nm und 490 nm auf als im reduzierten Zustand (siehe Abbildung 8). Die Fluoreszenzemission liegt bei beiden Anregungswellenlängen im gleichen Spektralbereich.

Wird der Redoxsensor in Zellen eingebracht, so befindet er sich, entsprechend dem herrschenden Redoxgleichgewicht von Glutathion, teils im reduzierten, teils im oxidierten Zustand. Änderungen des Intensitätsverhältnisses, hervorgerufen z. B. durch die Zugabe eines Oxidationsmittels, lassen direkt auf eine Verschiebung des Redoxgleichgewichts von Glutathion schließen. Je größer das Intensitätsverhältnis, desto mehr Sensorproteine Grx1-roGFP2 (und damit Glutathion) liegen im oxidierten Zustand vor.

Zur Darstellung des Redoxgleichgewichts wird das sogenannte Ratio Imaging genutzt. Dabei werden zunächst zwei Fluoreszenzbilder, erzeugt bei zwei unterschiedlichen

Anregungswellenlängen, aufgenommen. Anschließend werden die Fluoreszenzintensitäten entweder Pixel für Pixel oder als Mittelwerte über einen definierten Bildausschnitt durcheinander dividiert. Diese Verhältnisbildung bietet im Vergleich zur Betrachtung der Fluoreszenzintensität bei nur einer Anregungswellenlänge den Vorteil, dass Schwankungen der Anregungsleistung oder ein mögliches Ausbleichen der Fluorophore das Ergebnis nicht beeinträchtigen.

Die Untersuchungen bezüglich Änderungen des intrazellulären Redoxgleichgewichts erfolgen an Tumorzellsphäroiden (MCTS, Multi Cellular Tumor Spheroids). Zellsphäroide gewinnen in der *in vitro* Forschung zunehmend an Bedeutung [1], da sie die Mikroumgebung von Zellen im Gewebe deutlich besser widerspiegeln als zweidimensionale Zellschichten (sogenannte Monolayerkulturen) auf Trägersubstraten [50]. Während in dreidimensionalen Zellkulturen wie MCTS viele biochemische und morphologische Eigenschaften erhalten bleiben, verlieren Monolayerkulturen, die auf Kunststoff- oder Glasträgern in einer Schicht wachsen, aufgrund ihrer unnatürlichen Umgebung und stark eingeschränkten Zell-Zell-Kontakten einige ihrer phänotypischen Eigenschaften [50].

Die Fluoreszenzanregung der Probe erfolgt ortsspezifisch mit einer im Verhältnis zur Probengröße dünnen Lichtscheibe. Die Besonderheit dieser sogenannten Lichtscheiben-(fluoreszenz)mikroskopie (auch SPIM für *Single Plane Illumination Microscopy* genannt) liegt darin, dass im Gegensatz zu anderen Mikroskopiemethoden Beleuchtungs- und Detektionsachse senkrecht zueinander stehen. Diese Anordnung ermöglicht die selektive Beleuchtung der aufzunehmenden Probenebene im Fokus des Detektionsobjektivs. Die Lichtscheibenmikroskopie ist somit eine 3D-Weitfeldmikroskopiemethode, die die Aufnahme von Bilderstapeln erlaubt. Diese Bilderstapel können bei Bedarf zur dreidimensionalen Rekonstruktion der Probe verwendet werden.

Die Hauptvorteile der Lichtscheibenmikroskopie lassen sich wie folgt zusammenfassen:

- Bessere Abbildungsqualität gegenüber der konventionellen Weitfeldmikroskopie, da in außerfokalen Bereichen keine Fluoreszenz angeregt wird.
- Geringere Lichtbelastung der Probe gegenüber anderen 3D-Mikroskopiemethoden (z. B. strukturierte Beleuchtung [35, 65] oder konfokale Methoden wie Spinning Disk [101] und Laser Scanning Mikroskopie [15]), da im Gegensatz zu diesen Methoden ausschließlich die aufzunehmende Probenebene beleuchtet wird. Dies verringert die Gefahr von Zellschädigungen durch phototoxische Effekte (vgl. [80]).

Besonders gut eignet sich die Lichtscheibenmikroskopie zur Beobachtung größerer Proben wie Zellsphäroiden [57, 93] oder Embryos [43, 94].

Stand der Forschung und Entwicklung

Die Entwicklung der Lichtscheibenmikroskopie geht auf die Arbeit von Siedentopf und Zsigmondy [83] Anfang des 20. Jahrhunderts zurück und wird seit der Veröffentlichung „Optical Sectioning Deep Inside Live Embryos by Selective Plane Illumination Microscopy“ von Huisken *et al.*, die 2004 in der Fachzeitschrift *Science* erschien, stark vorangetrieben [77]. Zur Beleuchtung einer einzelnen Probenebene wird eine Lichtscheibe senkrecht zur Detektionsachse genutzt, die entweder durch eine Zylinderlinse [17, 26, 34, 43, 57, 76, 77, 106] oder durch das Scannen eines Laserstrahls [5, 25, 47, 49, 61, 90, 96] erzeugt wird. Die Dicke der Lichtscheibe beträgt typischerweise 1 - 10 µm [42].

Die einfachste Variante, eine Lichtscheibe zu erzeugen, ist die Aufweitung eines Laserstrahls mit anschließender Fokussierung des Strahlenbündels in einer Achse durch eine Zylinderlinse [34]. Diese Methode wird auch in der hier vorgestellten Arbeit genutzt. Zur Verbesserung der Tiefenauflösung kann ein zusätzliches Mikroskopobjektiv in den Beleuchtungsstrahlengang eingesetzt werden [34], dessen Aperturblende sich im Fokus der Zylinderlinse befindet [17, 26, 34, 57, 76, 77].

Bei der sogenannten *(Simultaneous) Multiview Light Sheet Microscopy* [49, 96] sind jeweils zwei Beleuchtungs- und Detektionseinheiten einander gegenüber angeordnet. Diese Methode ermöglicht durch die simultane Aufnahme vier komplementärer Ansichten, ohne dass die Probe dabei rotiert wird, eine *in toto* Bildgebung mit subzellulärer Auflösung [49, 96].

Die Lichtscheibenmikroskopie eignet sich ferner für Einzelmolekülmessungen [74] sowie zur Kombination mit Zweiphotonenanregung, durch welche die Eindringtiefe gegenüber der Einzelphotonenanregung erhöht wird [96, 104]. Des Weiteren kann die Lichtscheibenmikroskopie mit strukturierter Beleuchtung [32, 46] oder mit konfokaler Spaltblendendetektion [5, 90] kombiniert werden, um eine Verbesserung der Bildqualität zu erreichen.

Bei den scannenden Verfahren werden die Vorteile eines sich selbst rekonstruierenden Besselstrahls gegenüber einem Gaußstrahl beschrieben [25]. Zum einen wird eine homogenere Beleuchtung der Probe erreicht, zum anderen wird durch die geringere Streuung, die ein solcher Besselstrahl erfährt, die Eindringtiefe in die Probe deutlich erhöht [25].

Bei einer Vielzahl der in der Literatur beschriebenen Systeme zur Lichtscheiben-mikroskopie handelt es sich um eigenständige Aufbauten [u.a. 26, 43, 47, 49, 57, 96, 104]. Wu *et al.* (2011) stellt hingegen einen Aufbau zur Lichtscheibenmikroskopie vor, der an den Korpus eines konventionellen inversen Mikroskops angebaut ist. Dieser Anbau

enthält jedoch nicht nur eine separate Beleuchtungs-, sondern auch eine zusätzliche Detektionsoptik [103]. Erweiterungen inverser Mikroskope zu Lichtscheibenmikroskopen unter Nutzung der Mikroskop-eigenen Detektionsoptiken werden von Fahrbach und Rohrbach (2010) sowie von Baumgart und Kubitschek (2012) vorgestellt. Beide Systeme nutzen einen scannenden Laserstrahl zur Lichtscheibenerzeugung, letzteres in Kombination mit konfokaler Liniendetektion [5]. Chardès *et al.* (2014) stellen einen Aufbau zur Lichtscheibenmikroskopie an einem aufrechten Mikroskop vor. Santi *et al.* (2009) beschreiben einen Aufbau zur Lichtscheibenbeleuchtung, der in Kombination mit einem horizontal angebrachten Mikroskop genutzt wird.

Derzeit sind zwei kommerzielle Lichtscheibenmikroskope auf dem Markt erhältlich: das Lightsheet Z.1 der Carl Zeiss Microscopy GmbH [106] und das Ultramicroscope der LaVision BioTec GmbH [52].

Ein ähnlich einfacher modularer Aufbau zur Probenbeleuchtung mittels Lichtscheibe an einem konventionellen Weitfeldmikroskop, wie er im Rahmen dieser Arbeit erstellt und validiert wurde, ist nicht bekannt. Auch die Recherche bezüglich einer vergleichbaren Methode des hier entwickelten Ratio Imagings im Nanosekundenbereich blieb ergebnislos. Arbeitsgruppen, die ebenfalls den in dieser Arbeit eingesetzten Redoxsensor verwenden, nutzen eine im Sekundenbereich sequentielle Anregung und Detektion der für das Ratio Imaging relevanten Fluoreszenzsignale (siehe unter anderem [33, 92, 102]).

Umsetzung

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit werden drei modulare Erweiterungen für das inverse Mikroskop Axiovert 200M (Carl Zeiss Jena) erstellt: ein Modul zur Probenhalterung, ein Modul zur Lichtscheibenerzeugung (SPIM-Modul) und ein Detektionsmodul zum Ratio Imaging.

Das Modul zur Probenhalterung besteht aus einer rechteckigen Glaskapillare als Probenträger und einer Kapillarhalterung, die an der beweglichen Einheit des Positioniertisches des Mikroskops befestigt wird. Aufgrund vier planer Glasflächen eignen sich die rechteckigen Kapillaren sehr gut als Probenträger in der Lichtscheiben-mikroskopie, da hier Anregungs- und Detektionsstrahlengang senkrecht zueinander angeordnet sind. Außerdem können die Glaskapillaren an ein Fluidik-System angeschlossen werden. Dies erlaubt Untersuchungen der Probe während der Zugabe eines Wirkstoffes.

Das SPIM-Modul wird an der nicht beweglichen Grundplatte des Positioniertisches des Mikroskops befestigt. Es erlaubt die gleichzeitige Nutzung zweier Lichtquellen (hier

gepulste Laserdioden), die Licht unterschiedlicher Wellenlängen emittieren. Mit einer Dicke von ca. 10 µm eignet sich die vom Modul erzeugte Lichtscheibe optimal für die selektive Beleuchtung einzelner Zellschichten in Sphäroiden. Die Lichtscheibe wird vor der Messung so justiert, dass sie sich im Fokus des Mikroskopobjektivs befindet, und kann über eine mechanische Kopplung synchron mit diesem axial verschoben werden. Die Fluoreszenzdetektion erfolgt durch das Mikroskop selbst bzw. durch die daran angeschlossene Kamera.

Zur Realisierung des Ratio Imagings im Nanosekundenbereich wird ein komplexes Detektionsmodul konstruiert, das an einen Seitenanschluss des Mikroskops angebracht werden kann. Es besteht im Wesentlichen aus einer Feldblende, einem Strahlteiler, einer zeitlichen Bildverzögerung und einer im Picosekundenbereich schaltbaren CCD-Kamera mit Bildverstärker. Dieser Aufbau bietet die Möglichkeit ein Fluoreszenzbild aufzunehmen, welches auf einer Bildhälfte die Probe bei Anregung mit Wellenlänge 1 und auf der anderen Bildhälfte die Probe bei Anregung mit Wellenlänge 2 zeigt, obwohl die Fluoreszenzemission jeweils im gleichen Spektralbereich liegt. Die Bildhälften werden anschließend miteinander verrechnet, indem entweder die mittleren Fluoreszenzintensitäten der Probe oder die Intensitäten Pixel für Pixel ins Verhältnis gesetzt werden. Für letztere Methode wurde mithilfe einer Mathematiksoftware ein entsprechendes Programm erstellt. Sie erlaubt die ortsaufgelöste Darstellung der Verhältniswerte als Falschfarbenbild.

Die Charakterisierung des SPIM-Moduls umfasst die Definition der Lichtscheibe sowie die Beurteilung der Bildqualität. Es werden Fluoreszenzstapelaufnahmen von Zellsphäroiden und deren dreidimensionale Rekonstruktion gezeigt. Als Beispiel für weitere Detektionsmöglichkeiten werden Messungen der Fluoreszenzlebensdauer vorgestellt. Diese erfolgen nach Inkubation eines Tumorzellsphäroids mit einem Zytostatikum sowie nach Einleitung von Apoptose und damit einhergehender Unterbrechung des Energietransfers zwischen zwei fluoreszierenden Proteinen in Sphäroiden aus Tumorzellen, die einen Apoptose-Sensor exprimieren.

Die Charakterisierung des Ratio Imaging Moduls erfolgt anhand der Transmissionseigenschaften und der Bildqualität. Es werden Messungen von Änderungen des Redoxgleichgewichts in Sphäroiden aus U251MG Glioblastomzellen nach Transfektion mit dem redoxsensitiven grün fluoreszierenden Protein Grx1-roGFP2 vorgestellt. Die Änderungen des Redoxgleichgewichts werden durch die Zuführung von Wasserstoffperoxid via Fluidik-System hervorgerufen. Weiterführende Messungen zeigen Änderungen des Redoxgleichgewichts aufgrund Staurosporin-induzierter Apoptose.

Abbildung 2 verschafft dem Leser einen Überblick über die im Rahmen dieser Arbeit entwickelten Module, deren wesentliche Komponenten sowie die vorgestellten Anwendungen.

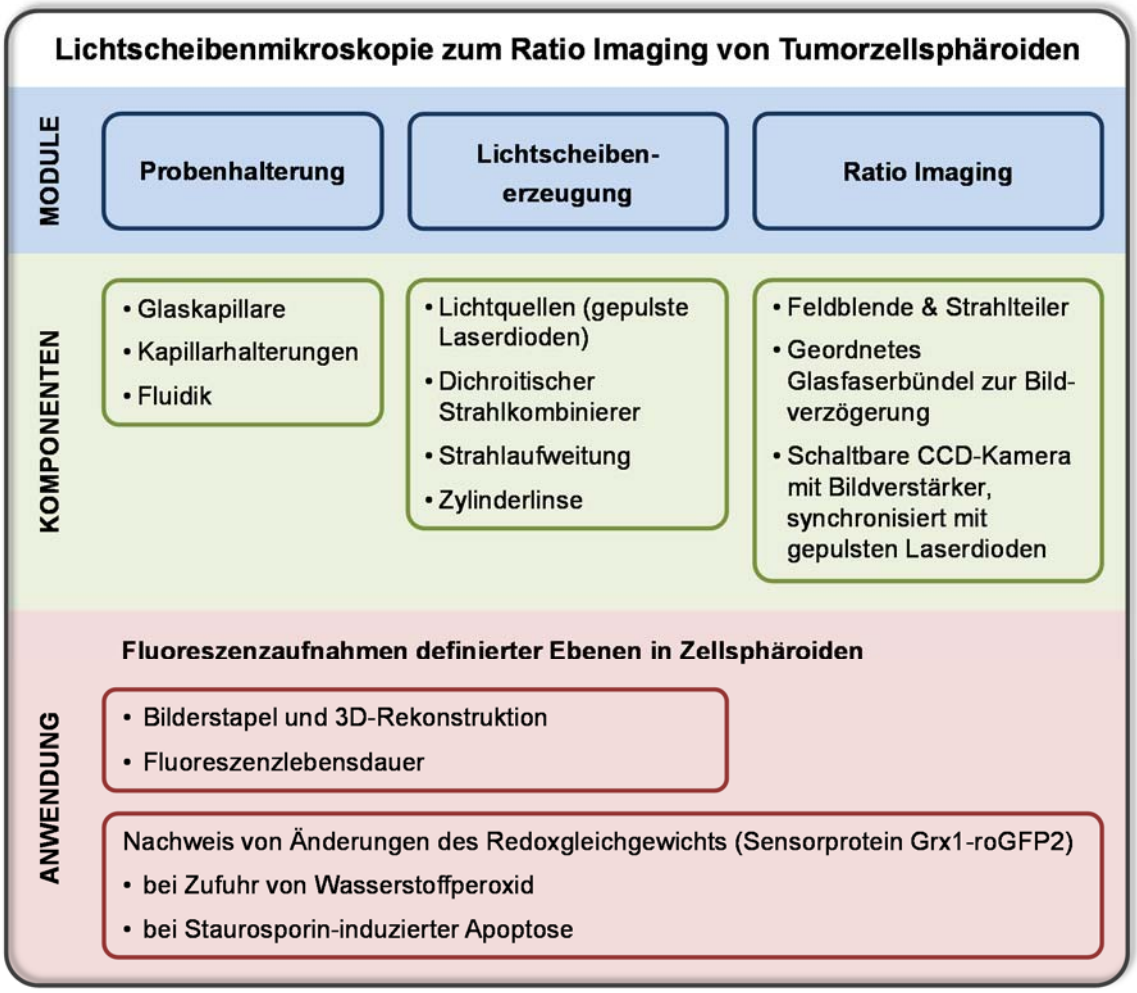


Abbildung 2. Schematische Übersicht der entwickelten Module und deren Anwendungen

2 Material und Methoden

2.1 Physikalische Grundlagen

2.1.1 Abbildende Optik

Die Lichtausbreitung in optischen Systemen wird durch Reflexion, Brechung und Beugung bestimmt. Letztere definiert dabei die maximal mögliche Auflösung eines Systems.

Numerische Apertur

Die numerische Apertur A_N ist ein Maß für den Öffnungswinkel eines optischen Systems und wird wie folgt definiert:

$$A_N = n \sin \sigma \qquad (1)$$

Hierbei ist n der Brechungsindex des umgebenden Mediums und σ der halbe Öffnungswinkel (vgl. Abbildung 3). Für kleine Winkel σ, d. h. für ein kleines Verhältnis von halber Blendenöffnung a zu Brennweite f', ist $\sin\sigma \approx \tan\sigma = a/f'$. Somit ergibt sich für Luft mit $n = 1$ als umgebendes Medium folgende Näherung:

$$A_N \approx \frac{a}{f'} \qquad (2)$$

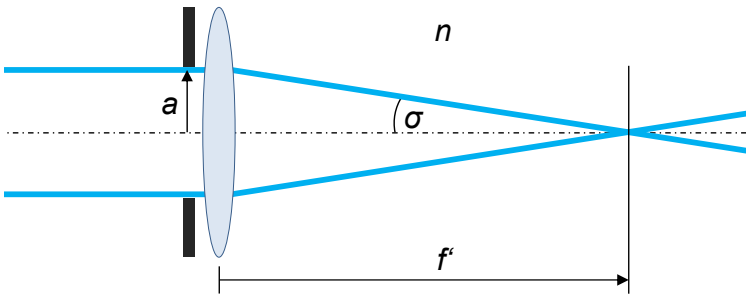


Abbildung 3. Schematische Darstellung zur Berechnung der numerischen Apertur (vgl. Gleichung (1) und Gleichung (2))

Beugung und Auflösung abbildender Systeme

Die Auflösung eines abbildenden Systems ist beugungsbegrenzt. Dies bedeutet zum einen, dass zwei Punkte nur dann getrennt voneinander wahrgenommen werden können, wenn deren Abstand zueinander einen definierten Wert, bestimmt durch die Beugungsfunktion, die Wellenlänge und die numerische Apertur nicht unterschreitet. Zum anderen folgt daraus, dass ein Strahlenbündel nicht auf einen unendlich kleinen Punkt fokussiert werden kann, sondern der Durchmesser bzw. die Breite des Strahlenbündels im Fokus

ebenfalls eine Funktion der Wellenlänge, der Beugungsfunktion und der numerischen Apertur ist. Die Beugungsfunktion ist abhängig von der Geometrie der für die Beugung verantwortlichen Blende:

- Bei Fokussierung mittels einer sphärischen Linse gilt die Beugungsfunktion an einer runden Öffnung als Grundlage für die Berechnung des Durchmessers des fokussierten Strahlenbündels.
- Erfolgt die Fokussierung mittels einer Zylinderlinse, wird zur Berechnung die Beugungsfunktion an einer Spaltblende verwendet, da eine Zylinderlinse ein Strahlenbündel nur in einer Achse fokussiert.

In Abbildung 4 sind die Beugungsfunktionen für Beugung am Spalt und Beugung an einer runden Öffnung dargestellt.

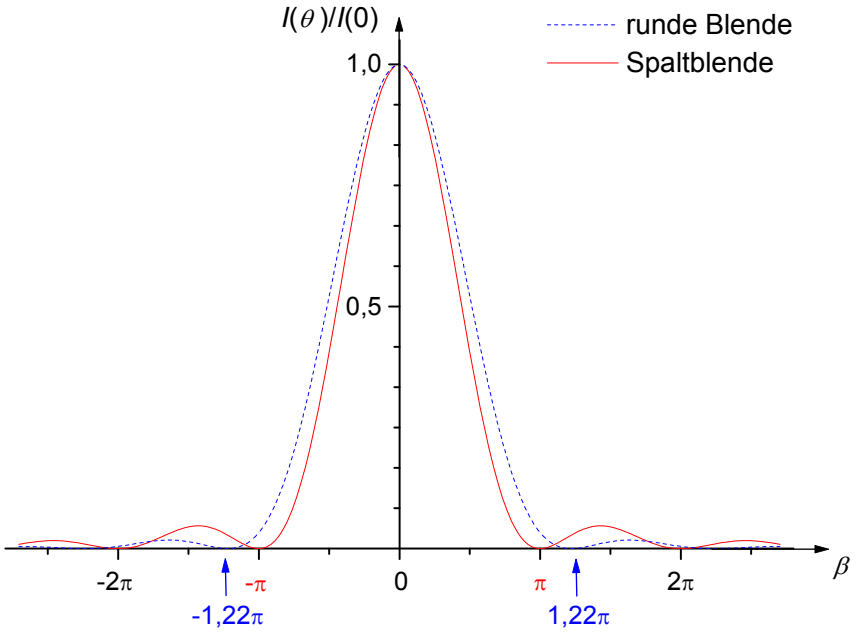


Abbildung 4. Intensitätsverteilung bei Beugung an einer runden Blende und am Spalt

Bei Beugung an einer runden Öffnung erhält man ein Ringmuster (mit einer hellen Scheibe im Zentrum), dessen Intensitätsverteilung auf der ersten Besselfunktion J_1 basiert und auch als Punktverwaschungsfunktion (PSF, abgeleitet vom englischen Begriff *Point Spread Function*) bezeichnet wird:

$$I(\theta) = I(0)\left(\frac{2J_1(\beta)}{\beta}\right)^2 \qquad (3)$$

Dabei gilt $\beta = (2\pi/\lambda)\, a_{rB} \sin\theta$. a_{rB} ist der Radius der Blendenöffnung, λ die Wellenlänge des Lichts und θ der Winkel, der zwischen der optischen Achse und der Strecke R (von

Blendenmitte bis zum Rand der zentralen hellen Scheibe) aufgespannt wird. sin θ kann durch den Term $q_{rB}/2R$ ersetzt werden, wobei q_{rB} dem minimal erreichbaren Fokusdurchmesser, dem Durchmesser des sogenannten Airy-Scheibchens, entspricht.

Bei Beugung am Spalt wird ein Linienmuster mit einer Intensitätsverteilung beruhend auf einer Sinusfunktion erzeugt:

$$I(\theta) = I(0)\left(\frac{\sin\beta}{\beta}\right)^2 \qquad (4)$$

Es gilt $\beta = (2\pi/\lambda)\, a_S \sin\theta$. Dabei entspricht a_S der halben Spaltbreite, λ der Wellenlänge des Lichts und θ dem Winkel, der zwischen der optischen Achse und der Strecke R (von Blendenmitte bis zum Rand der zentralen hellen Linie) aufgespannt wird. Es gilt $\sin\theta = q_S/2R$, wobei q_S die minimal erreichbare Linienbreite definiert.

Entscheidend für die Größe von q_{rB} und q_S ist die Stelle des ersten Intensitätsminimums (Nullstelle) der jeweiligen Beugungsfunktion. Bei Beugung an einer runden Öffnung liegt diese bei $(2\pi/\lambda)\, a_{rB}\, q_{rB}/2R = 3{,}832 = 1{,}22\,\pi$, da die Besselfunktion J_1 für diesen Wert Null wird. Daraus ergibt sich für den Durchmesser des Airy-Scheibchens und damit den Durchmesser des kleinstmöglichen Fokuspunkts, der mit einer idealen Linse erreicht werden kann:

$$q_{rB} = \frac{1{,}22\,\lambda\, R}{a_{rB}} \qquad (5)$$

Liegen die Blende und die Linse nah beieinander, z. B. wenn die Linsenfassung die Aperturblende darstellt, so kann bei parallel einfallendem Licht die Strecke R durch die Brennweite f' der Linse ersetzt werden. Mit der Näherung aus Gleichung (2) ergibt sich dann:

$$q_{rB} = \frac{1{,}22\,\lambda}{A_N} \qquad (6)$$

Bei Beugung am Spalt liegt die erste Nullstelle der Beugungsfunktion bei $\beta = (2\pi/\lambda)\, a_S\, q_S/2R = \pi$. Setzt man auch hier für R die Linsenbrennweite f' ein, so ergibt sich mit der Näherung aus Gleichung (2) für die kleinstmögliche Linienbreite:

$$q_S = \frac{\lambda}{A_N} \qquad (7)$$

Je größer also die numerische Apertur, desto kleiner ist die erreichbare Linienbreite bzw. der erreichbare Durchmesser des Airy-Scheibchens. Das bedeutet, je größer die

numerische Apertur (und je kleiner die Wellenlänge) ist, desto besser ist die Fokussierbarkeit eines Strahlenbündels.

Die Fokustiefe (Schärfentiefe) bezeichnet den Bereich entlang der optischen Achse, um den man defokussieren kann, ohne dass sich das Punktbild (Punktverwaschungsfunktion) um mehr als 20 % verschlechtert. Je größer die numerische Apertur, desto kleiner die Schärfentiefe.

Für die wellenoptische Betrachtung der Schärfentiefe Δx, in Bezug auf den Beleuchtungsstrahlengang in x-Richtung (vgl. Abbildung 18) gilt mit der Beleuchtungsapertur $A_{N,Bel}$ und dem Brechungsindex n:

$$\Delta x = \frac{n \lambda}{A_{N,Bel}^2} \qquad (8)$$

Die Größen q_S und Δx charakterisieren die Dimensionen der zur Probenbeleuchtung mittels Zylinderlinse erzeugten Lichtscheibe. q_S bezeichnet die Lichtscheibendicke, d. h. die Ausdehnung der Lichtscheibe in z-Richtung (in Bezug auf Abbildung 18). Die dünnste Stelle der Lichtscheibe mit der Dicke q_S wird im Folgenden auch als Strahltaille bezeichnet.

Zur Berechnung der detektionsbezogenen Fokustiefe Δz wird in Gleichung (8), anstatt der Beleuchtungsapertur $A_{N,Bel}$, die numerische Apertur des Detektionsobjektivs $A_{N,Det}$ eingesetzt:

$$\Delta z = \frac{n \lambda}{A_{N,Det}^2} \qquad (9)$$

Um die detektionsbezogene laterale Auflösung Δy in x- und y-Richtung (vgl. Abbildung 18) zu bestimmen, wird in der Weitfeldfluoreszenzmikroskopie folgende Gleichung angewandt:

$$\Delta y = \frac{0{,}61 \lambda}{A_{N,Det}} \qquad (10)$$

Chromatische Aberration

Der Brechungsindex eines Mediums ist wellenlängenabhängig. Je kürzer die Wellenlänge, desto größer ist der Brechungsindex, das heißt, desto stärker wird das Licht gebrochen. Diese Farbzerstreuung wird als Dispersion bezeichnet und führt zu chromatischer Aberration (Farbfehlern) in optischen Systemen.

Farbfehler werden in den Farblängsfehler und den Farbvergrößerungsfehler unterschieden. Der Farblängsfehler bezeichnet unterschiedliche Farbränder einer Abbildung vor und hinter der Fokusebene, d. h. Bilder unterschiedlicher Farben (Wellenlängen) liegen an unterschiedlichen Stellen auf der optischen Achse (vgl. Abbildung 5). Der Farbvergrößerungsfehler (auch als Brennweitenfehler bekannt) äußert sich in Farbsäumen am Rand einer Abbildung, da Bilder unterschiedlicher Farben aufgrund der Brennweitendifferenz für unterschiedliche Wellenlängen unterschiedlich groß abgebildet werden.

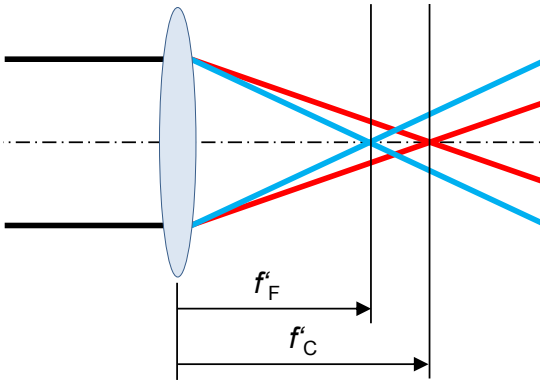


Abbildung 5. Chromatische Aberration. Farblängsfehler bei der Fokussierung paralleler Strahlen durch eine Linse: Da blaues Licht stärker gebrochen wird als rotes ergeben sich unterschiedliche Brennweiten f'_F und f'_C.

Der Farbvergrößerungsfehler einer Linse ist mit der Abbe'schen Zahl v_d

$$v_d = \frac{n_d - 1}{n_F - n_C} \qquad (11)$$

wie folgt definiert:

$$f'_F - f'_C = -\frac{f'_d}{v_d} \qquad (12)$$

Nach den Fraunhoferlinien bezeichnen F die Wellenlänge 486,1 nm, C die Wellenlänge 656,3 nm und d die mittlere Wellenlänge 587,6 nm. n_F, n_C und n_d sind die zugehörigen Brechungsindizes; f'_F, f'_C und f'_d kennzeichnen die entsprechenden Brennweiten.

Der Farblängsfehler ist abhängig vom Abbildungsmaßstab β'. Je größer dieser ist, desto größer ist der Farblängsfehler:

$$a'_F - a'_C = -\frac{f'_d}{v_d}(1 - \beta')^2 \qquad (13)$$

Da in der Mikroskopie häufig mit hohen Vergrößerungen gearbeitet wird, ist der Farblängsfehler dort in der Regel stärker ausgeprägt als der Farbvergrößerungsfehler. a'_F und a'_C sind die Bildweiten einer Linse bei den Wellenlängen F und C.

Bei optischen Systemen bestehend aus einer Sammel- und einer Zerstreuungslinse können der Farbvergrößerungsfehler und der Farblängsfehler durch eine entsprechende Wahl der Linsen-Materialien anhand ihrer jeweiligen Abbe'schen Zahl korrigiert werden. Der Farbvergrößerungsfehler wird korrigiert wenn die Bedingung

$$\frac{f'_{d,2} - e}{f'_{d,1} - e} = -\frac{v_{d,1}}{v_{d,2}} \qquad (14)$$

erfüllt ist.

Der Farblängsfehler wird für folgende Bedingung (Achromasie-Bedingung) korrigiert:

$$\frac{f'_{d,2}}{f'_{d,1}} = -\frac{v_{d,1}}{v_{d,2}}\left(1 - \frac{e}{a'_{d,1}}\right)^2 \qquad (15)$$

Die Indizes 1 und 2 kennzeichnen die verwendeten Linsen, e ist der Abstand der beiden Linsen zueinander, definiert durch den Abstand des bildseitigen Hauptpunktes der Linse 1 zum objektseitigen Hauptpunkt der Linse 2. Für $e \approx 0$ (verkitteter Achromat) werden beide Farbfehler korrigiert, wenn die Bedingung

$$\frac{f'_{d,2}}{f'_{d,1}} = -\frac{v_{d,1}}{v_{d,2}} \qquad (16)$$

erfüllt ist.

Für die Gesamtbrennweite eines Achromaten gilt:

$$f'_{d,ges} = f'_{d,1}\frac{v_{d,1}}{v_{d,1} - v_{d,2}} \quad \text{bzw.} \quad f'_{d,ges} = f'_{d,2}\frac{v_{d,2}}{v_{d,2} - v_{d,1}} \qquad (17)$$

Ein Achromat korrigiert die Farbfehler für zwei Wellenlängen, in dem hier vorgestellten Fall C und F.

In der vorliegenden Arbeit kommt der Farblängsfehler beim Ratio Imaging zum Tragen. Die Fluoreszenzanregung der Probe erfolgt in diesem Fall mit zwei gepulsten Laserdioden, die Licht der Wellenlängen 391 nm und 470 nm emittieren. Die resultierende Wellenlängendifferenz von 79 nm führt dazu, dass bei Fokussierung durch eine Zylinderlinse die Strahltaillen der erzeugten Lichtscheiben nicht übereinander liegen, sondern in axialer Richtung zueinander versetzt sind. Zur Korrektur dieses Versatzes können für die entsprechenden Wellenlängen korrigierte Achromate im Teleskop zur

Strahlaufweitung (siehe Aufbau zur Lichtscheibenerzeugung in Abbildung 18) und eine achromatische Zylinderlinse eingesetzt werden. Alternativ können die Teleskoplinsen entsprechend Gleichung (15) gewählt und ebenfalls mit einer achromatischen Zylinderlinse kombiniert werden. Beide Methoden bringen jedoch den Nachteil mit sich, dass das System dann lediglich für zwei ausgewählte Wellenlängen korrigiert ist. Letztere Methode erfordert nach Gleichung (15) außerdem für die Teleskoplinsen Materialien mit sehr unterschiedlichen Abbe'schen Zahlen und ist daher schwer realisierbar.

Aufgrund dessen wird der Farblängsfehler im realisierten Aufbau mit einem zusätzlichen Linsensystem korrigiert, welches der 470 nm-Diode nachgeschaltet ist (siehe Abschnitt 3.2.2).

2.1.2 Fluoreszenz

Bei der Absorption von Photonen durch Atome oder Moleküle werden deren Elektronen in einen höheren Energiezustand versetzt. Die Rückkehr in den Grundzustand erfolgt innerhalb weniger Nanosekunden. Dabei kann es zur Emission von Photonen kommen. Dieses Phänomen wird als Fluoreszenz bezeichnet.

Das vereinfachte Jablonski-Diagramm in Abbildung 6 veranschaulicht die Energieniveaus und Elektronenübergänge. Durch die Absorption (A) von Photonen werden Elektronen aus dem Grundzustand S_0 in einen höheren Energiezustand angehoben. Von dort erfolgt eine strahlungslose Konversion (IC) in den niedrigsten Singulettzustand S_1. Aus diesem geht das Elektron entweder strahlungslos (IC) oder unter der Abgabe von Fluoreszenzstrahlung (F) in den Grundzustand über.

Der Vollständigkeit halber sei an dieser Stelle auch die Phosphoreszenz (P) erwähnt. Sie tritt auf, wenn ein Elektron strahlungslos von einem Singulett- in einen Triplettzustand übergeht (Interkombination oder *Intersystem Crossing* ISC) und von dort unter Abgabe von Licht in den Grundzustand zurückfällt.

Während die Fluoreszenzlebensdauer (Verweilzeit des Elektrons im Zustand S_1) im Bereich weniger Nanosekunden liegt, ist die Lebensdauer im Triplettzustand deutlich höher, und die Übergangswahrscheinlichkeit entsprechend gering. Daher kann die Phosphoreszenz in den folgenden Betrachtungen vernachlässigt werden.

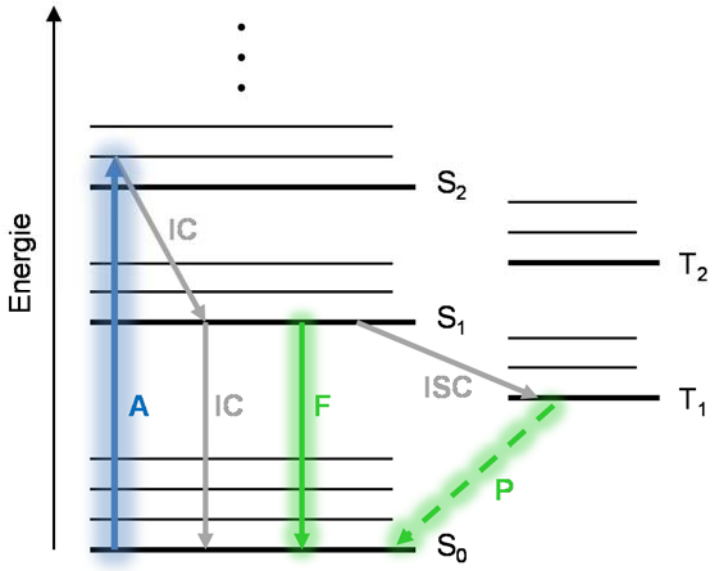


Abbildung 6. Vereinfachtes Jablonski-Diagramm. Es bezeichnen S_0 den Grundzustand, S_1 und S_2 die Singulettzustände, T_1 und T_2 die Triplettzustände, A die Absorption, IC die strahlungslose Konversion, F die Fluoreszenz, ISC die Interkombination und P die Phosphoreszenz.

Wie aus Abbildung 6 deutlich wird, ist die absorbierte Energie (A) eines Photons oft größer als die in Form von Fluoreszenz emittierte Energie (F).

Die Energie E eines Photons steht in umgekehrt proportionalem Zusammenhang zu dessen Wellenlänge:

$$E = \frac{hc}{\lambda} = h\nu \qquad (18)$$

Dabei ist $h = 6{,}626 \times 10^{-34}$ Js das Planck'sche Wirkungsquantum, c die Lichtgeschwindigkeit und ν die Frequenz des Lichts bzw. der Strahlung. Aus Gleichung (18) geht hervor: Je größer die Energie der Photonen, desto kleiner ist ihre Wellenlänge. Damit ergibt sich, dass die Wellenlänge des absorbierten Lichts meist kleiner ist als die Wellenlänge des emittierten Lichts. Diese Wellenlängenverschiebung wird als Stokes-Shift bezeichnet.

Die Übergangsrate k vom ersten angeregten Zustand S_1 zum Grundzustand S_0 setzt sich wie folgt zusammen:

$$k = k_F + k_{IC} + k_{ISC} + k_{ET} = \frac{1}{\tau} \qquad (19)$$

Dabei ist k_F die Fluoreszenzübergangsrate, k_{IC} die Übergangsrate bei interner Konversion, k_{ISC} die Übergangsrate bei Interkombination und k_{ET} die Übergangsrate bei Energietransfer (in Abbildung 6 nicht eingezeichnet). Energietransfer bedeutet, dass die durch Photonenabsorption aufgenommene Energie von einem Molekül strahlungslos an

ein benachbartes Molekül abgegeben wird, welches dann seinerseits in einen höheren Schwingungszustand versetzt wird und beim Übergang in seinen Grundzustand Fluoreszenz emittieren kann. τ ist die Lebensdauer der angeregten Zustände und wird im Allgemeinen als Fluoreszenzlebensdauer bezeichnet.

Die Fluoreszenzquantenausbeute η_F gibt an, wie hoch die Übergangsrate unter Abgabe von Fluoreszenz in Bezug auf die gesamte Übergangsrate ist:

$$\eta_F = \frac{k_F}{k} = k_F \tau \qquad (20)$$

Nach der Anregung klingt die Fluoreszenzintensität I_F über die Zeit t exponentiell ab. Im einfachsten Fall handelt es sich um einen monoexponentiellen Kurvenverlauf, bei welchem gilt:

$$I_F(t) = I_0 \, e^{-t/\tau} \qquad (21)$$

Dabei ist I_0 die Fluoreszenzintensität unmittelbar nach der Fluoreszenzanregung. Für den multiexponentiellen Zerfall gilt

$$I_F(t) = \sum_i A_i \, e^{-t/\tau_i} \qquad (22)$$

mit den Fluoreszenzlebensdauern τ_i und den zugehörigen Amplituden A_i.

Jeder Fluorophor besitzt eine spezifische Fluoreszenzlebensdauer. Sie ist unabhängig von der Fluorophorkonzentration und hochgradig sensitiv für die unmittelbare Umgebung. Daher dient die Fluoreszenzlebensdauer als wichtiges Werkzeug für die Untersuchung zellulärer Prozesse und Reaktionen. Die Messung der Fluoreszenzlebensdauer kann im Frequenz- oder im Zeitbereich erfolgen. Letztere Methode wird in dieser Arbeit bei der sogenannten *Fluorescence Lifetime Imaging Microscopy* (FLIM) verwendet. Hierbei werden die Fluorophore mit einem kurzen Lichtpuls (< 100 ps) angeregt, und über eine definierte Zeitspanne, z. B. 10 ns, wird in periodischen Abständen ein Fluoreszenzbild aufgenommen. So kann für jeden Bildpunkt eine Abklingkurve erstellt werden, aus welcher schließlich mittels monoexponentieller Kurvenanpassung die effektive Fluoreszenzlebensdauer bestimmt wird.

2.1.3 Förster-Resonanzenergietransfer (FRET)

Der Förster-Resonanzenergietransfer (FRET), erstmals vor über 60 Jahren von Theodor Förster beschrieben, ist eine Dipol-Dipol Wechselwirkung, die zwischen zwei Fluorophoren auftritt, wenn sich das Emissionsspektrum eines Moleküls (Donor) mit dem Absorptionsspektrum eines benachbarten Moleküls (Akzeptor) überlappt. Der

Energietransfer erfolgt dabei strahlungslos und tritt nur bei geringer räumlicher Distanz (maximal 10 nm) [29] zwischen Donor und Akzeptor auf (vgl. Abbildung 7). Die Rate des durch FRET auftretenden Energietransfers kann mit folgender Gleichung beschrieben werden:

$$k_{ET} = \frac{1}{\tau_D}\left(\frac{D_0}{D}\right)^6 \qquad (23)$$

Dabei ist τ_D die Lebensdauer des Donors im angeregten Zustand und D der Abstand zwischen den Fluorophoren (Donor und Akzeptor). Die Anzahl der FRET-basierten Übergänge in Bezug auf die Gesamtübergänge nimmt mit zunehmendem Abstand zwischen den Fluorophoren ab. Der Abstand, bei dem die FRET-Rate auf 50 % abgefallen ist ($k_{ET} = k/2$), wird als FRET-kritischer Abstand D_0 bezeichnet. In die Berechnung von D_0 gehen unter anderem der Orientierungsfaktor der Fluorophore, die Quantenausbeute des Donors sowie der Überlapp des Emissionsspektrums des Donors mit dem Absorptionsspektrum des Akzeptors ein [23].

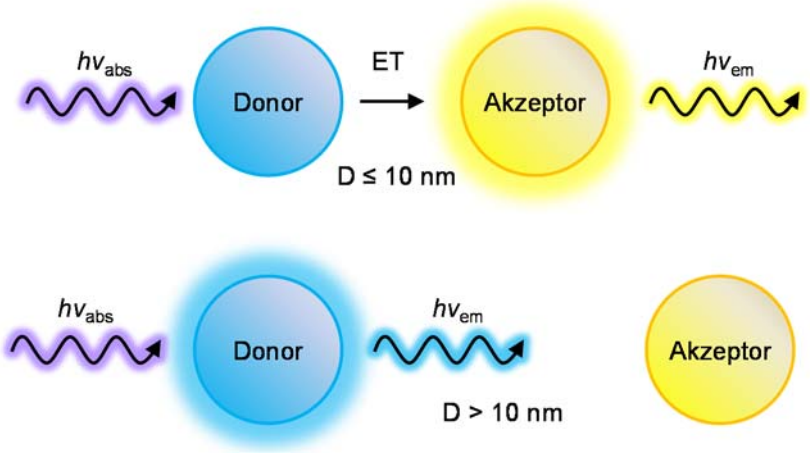


Abbildung 7. Schematische Darstellung des Förster-Resonanzenergietransfers. $h\nu_{abs}$ ist die Photonenenergie des absorbierten Lichts, $h\nu_{em}$ ist die Photonenenergie der emittierten Fluoreszenz. FRET findet statt, wenn der Abstand zwischen den Fluorophoren (Donor und Akzeptor) maximal 10 nm beträgt [29] (oben). Ist der Abstand größer, gibt der Donor selbst die aufgenommene Energie in Form von Fluoreszenz ab (unten).

FRET zwischen Donor und Akzeptor dämpft die Donor-Fluoreszenz proportional zur FRET-Effizienz. Somit verringert sich die Fluoreszenzquantenausbeute des Donors einhergehend mit einer Verkürzung von dessen Fluoreszenzlebensdauer [23] (vgl. Gleichung (20)). Daraus folgt, dass mittels Messung der Fluoreszenzlebensdauer des Donors Rückschlüsse auf die FRET-Effizienz und damit auf den Abstand zwischen Donor und Akzeptor gezogen werden können. In der vorliegenden Arbeit kommt ein FRET-basierter Apoptose-Sensor aus fluoreszierenden Proteinen zum Einsatz (vgl. Abschnitt 2.2).

2.2 Fluoreszierende Proteine und Sensoren

Fluoreszierende Proteine

Das grün fluoreszierende Protein (GFP) wurde 1962 von Shimomura *et al.* in der Quallenspezies *Aequorea victoria* entdeckt. Dank der Extraktion, Klonierung und Mutagenese von GFP, hat dieses über die Jahre große Bedeutung in der Biochemie und der Zellbiologie erlangt [38]. Mittels Transfektion kann die GFP-DNA in Zellen eingeschleust werden. Dies ermöglicht bei geeigneter Fluoreszenzanregung die Visualisierung einzelner Zellkompartimente, in welchen die grün fluoreszierenden Proteine lokalisiert sind. Alle in dieser Arbeit verwendeten Zelllinien, die fluoreszierende Proteine exprimieren, sind stabil transfiziert. Dies bedeutet, dass – im Gegensatz zur transienten Transfektion, bei der die Exprimierung der Fremd-Gene nur über einige Tage hinweg stattfindet – die Fremd-DNA in die chromosomale DNA der Zellen integriert ist, und die Proteine somit dauerhaft exprimiert werden [98].

Das Anregungsspektrum des natürlich vorkommenden GFP besitzt Maxima bei 396 nm und 475 nm. Bei der Anregungswellenlänge 475 nm ist die Fluoreszenzintensität deutlich geringer, es wird jedoch eine höhere Photostabilität beobachtet als bei der Anregungswellenlänge 396 nm [38]. Durch gezielte Mutationen ist es gelungen ein verbessertes (*enhanced*) grün fluoreszierendes Protein (EGFP) herzustellen, mit einer, bezogen auf natürliches GFP, deutlich stärkeren Fluoreszenzemission bei Anregungswellenlängen zwischen 470 nm und 490 nm [38, 107]. Außerdem wurden GFP-Varianten mit veränderten Fluoreszenzspektren erzeugt, darunter cyan fluoreszierende Proteine (CFP) und gelb fluoreszierende Proteine (YFP) [97].

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit kommen unter anderem die beiden grün fluoreszierenden Fusionsproteine pAcGFP1-Mem zur Markierung der Plasmamembran und Grx1-roGFP2 zur Visualisierung von Änderungen des Glutathion-Redoxgleichgewichts zum Einsatz. Das Fusionsprotein Mem-ECFP-DEVD-EYFP dient als Apoptose-Sensor.

Die Bezeichnung pAcGFP1-Mem beschreibt ein Fusionsprotein, das aus den 20 Aminosäuren des N-terminus von Neuromodulin (*Growth Associated Protein* 43, GAP-43) und dem grün fluoreszierenden Protein der Qualle *Aequorea coerulescens* (AcGFP1) besteht. Mit einem Anregungsmaximum bei 475 nm und einem Emissionsmaximum bei 505 nm [19] ähneln die spektralen Eigenschaften von AcGFP1 jenen des EGFP. Das Neuromodulinfragment sorgt dabei dafür, dass AcGFP1 in den zellulären Membranen und im speziellen in der Plasmamembran lokalisiert ist [19].

Redoxsensor Grx1-roGFP2

Dooley *et al.* (2004) beschreiben das redoxsensitive grün fluoreszierende Protein roGFP2 als Mutante eines grün fluoreszierenden Proteins (GFP), welches in einer reduzierten und in einer oxidierten Form vorliegen kann. Im oxidierten Zustand weist das roGFP eine größere Fluoreszenzanregung bei 400 nm und gleichzeitig eine geringere Fluoreszenzanregung bei 490 nm auf als im reduzierten Zustand [22]. Die Anregungsspektren für vollständig reduziertes und vollständig oxidiertes roGFP2 sind in Abbildung 8 dargestellt. Die vertikalen Linien markieren die in dieser Arbeit verwendeten Anregungswellenlängen 391 nm und 470 nm. Aus der Grafik ist ersichtlich, dass das Intensitätsverhältnis I_{391}/I_{470} im oxidierten Zustand deutlich größer ist als im reduzierten Zustand.

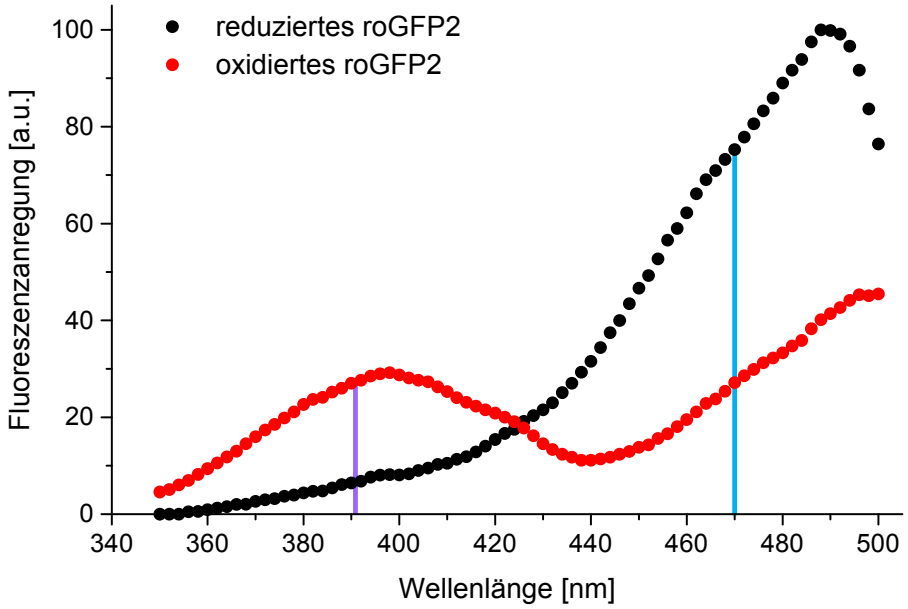


Abbildung 8. Anregungsspektren von roGFP2 im vollständig reduzierten sowie im vollständig oxidierten Zustand (Daten aus [22], normiert). Die vertikalen Linien markieren die in dieser Arbeit verwendeten Anregungswellenlängen 391 nm und 470 nm.

Gutscher *et al.* (2008) fusionieren roGFP2 mit humanem Glutaredoxin 1 (Grx1) zu Grx1-roGFP2 und erreichen damit, dass das Intensitätsverhältnis der Fluoreszenz bei Anregung mit den Wellenlängen 408 nm und 488 nm mit hoher Spezifität das Verhältnis von oxidiertem zu reduziertem Glutathion (siehe Einleitung) widerspiegelt. Die Anregungsspektren im reduzierten und oxidierten Zustand bleiben nach der Fusion unverändert [36].

FRET-basierter Apoptose-Sensor Mem-ECFP-DEVD-EYFP

Bei dem hier ferner verwendeten Fusionsprotein Mem-ECFP-DEVD-EYFP handelt es sich um einen auf FRET (vgl. Abschnitt 2.1.3) basierenden, Caspase-3 sensitiven Apoptose-Sensor. Der Baustein Mem-ECFP sorgt für die Verankerung des Fusionsproteins in der Plasmamembran. Die beiden fluoreszierenden Proteine ECFP und EYFP sind über das Linker-Peptid DEVD (Aminosäuresequenz aus Asparaginsäure-Glutaminsäure-Valin-Asparaginsäure) verbunden. Durch die somit gewährleistete räumliche Nähe zwischen ECFP (Donor) und EYFP (Akzeptor) kann FRET stattfinden. Wird bei der Einleitung von Apoptose das Enzym Caspase-3 freigesetzt, spaltet dieses EYFP vom Linker-Peptid DEVD. Durch den somit hervorgerufenen Verlust der räumlichen Nähe der beiden fluoreszierenden Proteine wird FRET unterbrochen. [3]

Abbildung 9 soll die Funktionsweise des Sensors verdeutlichen: Bei einer Anregungswellenlänge im Absorptionsspektrum des Donors ECFP findet Energietransfer statt, solange ECFP und EYFP durch DEVD verbunden sind. EYFP fluoresziert (a). Wird durch die Freisetzung von Caspase-3 der Energietransfer aufgrund der Abspaltung des Akzeptors EYFP unterbrochen, fluoresziert ECFP.

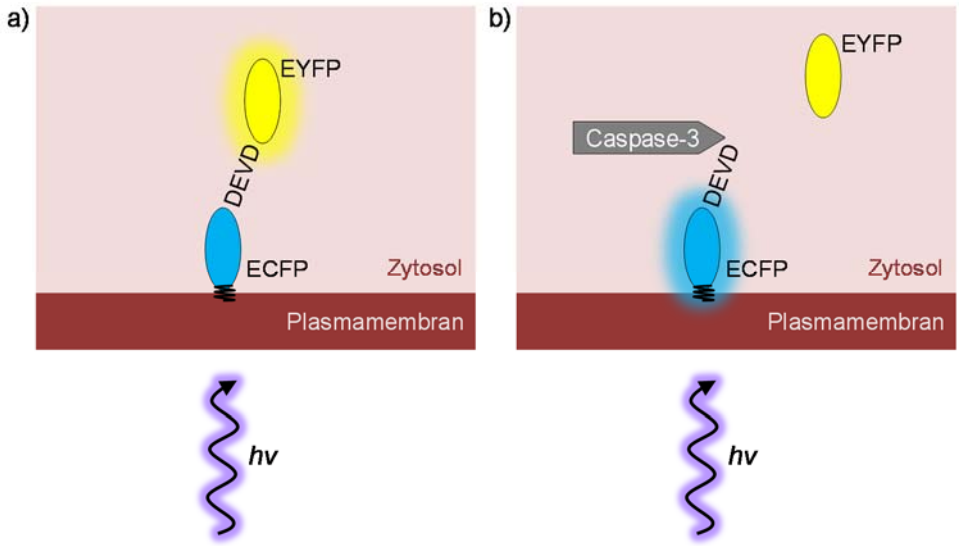


Abbildung 9. FRET-Apoptose-Sensor. a) ECFP (Donor) und EYFP (Akzeptor) sind über das Linker-Peptid DEVD verbunden: Energietransfer findet statt. b) Caspase-3 trennt den Akzeptor vom Linker-Peptid: Energietransfer wird unterbrochen.

Die Anregungsmaxima der verbesserten cyan und gelb fluoreszierenden Proteine liegen bei 433 nm (ECFP) und 514 nm (EYFP), die Emissionsmaxima bei 475 nm (ECFP) und 527 nm (EYFP) [60].

2.3 Sphäroide – Dreidimensionale Zellkultur

Bereits 1984 untersuchen Carlsson und Yuhas [14] die Sphäroidbildung verschiedener Tumorzelllinien anhand von Zellsuspensionen auf Oberflächen, die aufgrund ihrer Beschaffenheit die Anhaftung der Zellen verhindern. Agarose gelöst in Kulturmedium bildet eine gelartige, konkave, für Zellen nicht-adhärente Oberfläche, die sich somit als besonders geeignet für die Sphäroidkultivierung erweist. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit erfolgt die Sphäroidkultivierung im Wesentlichen nach der Beschreibung von Friedrich *et al.* (2009) in 96-well Mikrotiterplatten mit Agarose-beschichteten Kavitäten (1,5 % Agarose in Kulturmedium, 50 µl/Kavität).

Je nach Zelllinie werden die Zellen mit einer Dichte von 25 bis 400 Zellen pro Kavität ausgesät (siehe Tabelle 1) und für 5 - 7 Tage in 200 µl Kulturmedium mit den jeweiligen Zusätzen (abhängig von der Zelllinie, siehe unten) bei 37 °C und 5 % CO_2 belassen, bis die sich ausbildenden Sphäroide einen Durchmesser von 150 - 300 µm erreichen.

Tabelle 1. Verwendete Zelllinien und deren Aussaatdichten zur Sphäroidkultivierung

Zelllinie	Aussaatdichte [Zellen/Kavität]
CHO-pAcGFP1-Mem	25 / 50
MCF-7	150
HeLa-Mem-ECFP-DEVD-EYFP	150
U251MG-L106-RS	400
U251MG-L106-MRS	400

Die in Tabelle 1 aufgeführten Zelllinien sowie deren Kultivierung werden nachfolgend gesondert beschrieben.

CHO-pAcGFP1-Mem

Bei der Zelllinie CHO-pAcGFP1-Mem handelt es sich um Ovarialzellen des chinesischen Hamsters, die stabil mit dem grün fluoreszierenden Fusionsprotein pAcGFP1-Mem (vgl. Abschnitt 2.2) transfiziert wurden, welches in der Zellmembran exprimiert wird. Die Kultivierung erfolgt in RPMI 1640 Kulturmedium versetzt mit 10 % FBS, 1 % Penicillin/Streptomycin und 500 µg/ml G 418-BC. Die CHO-pAcGFP1-Mem Zelllinie wurde vom Institut für Lasertechnologien in der Medizin und Messtechnik (ILM) an der Universität Ulm zur Verfügung gestellt. Sphäroide dieser Zelllinie kommen aufgrund der definierten Membranfluoreszenz als Probe für die Validierung des SPIM-Moduls zum Einsatz.

MCF-7

Die Kultivierung der humanen Mammakarzinomzelllinie MCF-7 (Cell Lines Service, Eppelheim, Deutschland) erfolgt in DMEM/Ham‘s F-12 Kulturmedium versetzt mit 10 % FBS und 1 % Penicillin/Streptomycin. Mit dem Zytostatikum Doxorubicin-Hydrochlorid (siehe Abschnitt 2.4) inkubierte MCF-7 Sphäroide werden als Anwendungsbeispiel für die Lichtscheibenmikroskopie unter Verwendung des SPIM-Moduls herangezogen.

HeLa-Mem-ECFP-DEVD-EYFP

Die HeLa Zelllinie entstammt den Epithelzellen eines Zervixkarzinoms (Gebärmutterhalskrebs). Die Kultivierung der mit dem FRET-basierten Apoptose-Sensor Mem-ECFP-DEVD-EYFP (beschrieben in Abschnitt 2.2) transfizierten HeLa Zellen erfolgt in MEM Kulturmedium mit Earle’s Salzen unter Zugabe von 10 % FBS, 1 % Penicillin/Streptomycin, 1 % MEM NEAA, 2 mM L-Glutamin sowie 200 µg/ml G 418-BC [9]. Die transfizierte HeLa Zelllinie, zur Verfügung gestellt vom Naturwissenschaftlichen und Medizinischen Institut (NMI) an der Universität Tübingen, wird in dieser Arbeit für exemplarische Messungen der Fluoreszenzlebensdauer in Sphäroiden unter Lichtscheibenanregung verwendet.

U251MG-L106-Grx1-roGFP2 und U251MG-L106-Mito-Grx1-roGFP2

Zur Validierung des Ratio Imagings werden zwei Subklone der humanen Glioblastomzelllinie U251MG verwendet, die das Glutathion-spezifische redoxsensitive grün fluoreszierende Protein Grx1-roGFP2 [36] im Zytoplasma (U251MG-L106-Grx1-roGFP2 alias U251MG-L106-RS) beziehungsweise in den Mitochondrien (U251MG-L106-Mito-Grx1-roGFP2 alias U251MG-L106-MRS) exprimieren [102]. Die Subklone wurden vom Institut für Lasertechnologien in der Medizin und Messtechnik (ILM) an der Universität Ulm zur Verfügung gestellt. Die Kultivierung erfolgt in DMEM Kulturmedium versetzt mit 10 % FBS, 1 % Penicillin/Streptomycin und Hygromycin B (150 µg/ml).

Tabelle 2 enthält eine Auflistung der verwendeten Kulturmedien und Zusätze sowie die entsprechenden Bezugsquellen.

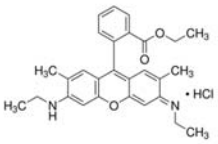
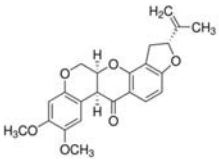
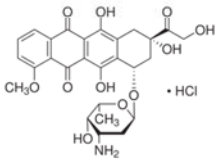
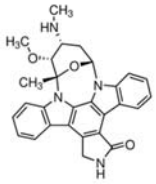
Tabelle 2. Verwendete Medien und Zusätze sowie deren Bezugsquellen

Medien	Bezugsfirma
RPMI 1640	Biochrom GmbH, Berlin (jetzt Merck Millipore)
DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium)	Biochrom GmbH, Berlin (jetzt Merck Millipore)
DMEM/Ham's F12	Biochrom GmbH, Berlin (jetzt Merck Millipore)
MEM (Minimal Essential Medium) + Earle's Salze	Life Technologies GmbH, Darmstadt
Zusätze	
FBS (Fetal Bovine Serum)	Biochrom GmbH, Berlin (jetzt Merck Millipore)
Penicillin/Streptomycin	Biochrom GmbH, Berlin (jetzt Merck Millipore)
G 418-BC (Antibiotikum)	Biochrom GmbH, Berlin (jetzt Merck Millipore)
MEM NEAA (Non-Essential Amino Acids)	Life Technologies GmbH, Darmstadt
L-Glutamin	Life Technologies GmbH, Darmstadt
Hygromycin B	PAA Laboratories, Pasching, Österreich (jetzt GE Healthcare Europe GmbH, Freiburg)

2.4 Wirk- und Farbstoffe

Die im Folgenden beschriebenen Wirk- und Farbstoffe sowie deren Bezugsquellen sind in Tabelle 3 aufgeführt.

Tabelle 3. Verwendete Wirk- und Farbstoffe. Struktur- und Summenformeln sowie Molekulargewichte, entsprechend der Reihenfolge der Nennung, aus [87, 88, 84, 85, 89]

Wirk-/Farbstoffe	Strukturformel	Summenformel Molekulargewicht	Bezugsfirma
Rhodamin 6G		$C_{28}H_{31}N_2O_3Cl$ 479,01 g/mol	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
Rotenon		$C_{23}H_{22}O_6$ 394,42 g/mol	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
CellTox Green Dye	nicht verfügbar*		Promega GmbH, Mannheim
Doxorubicin-Hydrochlorid		$C_{27}H_{29}NO_{11} \cdot HCl$ 579,98 g/mol	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
Wasserstoffperoxid 30 %		H_2O_2 34,01 g/mol	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
Staurosporin		$C_{28}H_{26}N_4O_3$ 466,53 g/mol	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München

* Eine Anfrage bei der Promaga GmbH ergab, dass diese Informationen dem Anwender nicht zur Verfügung gestellt werden dürfen.

Rhodamin 6G

Rhodamin-Farbstoffe zeichnen sich durch große Absorptionskoeffizienten, hohe Quantenausbeuten sowie eine vergleichsweise hohe Photostabilität aus. Sie finden daher breiten Einsatz – unter anderem in der Biophotonik zur Einzelmoleküldetektion und als Fluoreszenzmarker zur Untersuchung lebender Zellen. [75]

Rhodamin 6G liegt als Stammlösung 250 µM in Ethanol vor. Für die Messungen zur Charakterisierung der Lichtscheibe wird die Farbstofflösung im Verhältnis 1 : 10 mit bidestilliertem Wasser verdünnt. Die Fluoreszenzanregung erfolgt, entsprechend der im Rahmen dieser Arbeit zur Lichtscheibenmikroskopie verwendeten Laserdioden, mit den Wellenlängen 391 nm und 470 nm. Zur Fluoreszenzdetektion wird ein Langpassfilter für Wellenlängen ≥ 515 nm verwendet. Aufgrund der hohen Fluoreszenzquantenausbeute des Farbstoffes (0,95 bei Lösung in Ethanol [59]) wird selbst bei einer Anregungswellenlänge von 391 nm noch eine ausreichende Fluoreszenzintensität erreicht. Da diese jedoch deutlich geringer ist als bei einer Anregungswellenlänge von 470 nm, wird das Emissionslicht der 470 nm-Diode mittels Graufilter entsprechend abgeschwächt. Abbildung 10 zeigt das Anregungs- und Emissionsspektrum von Rhodamin 6G.

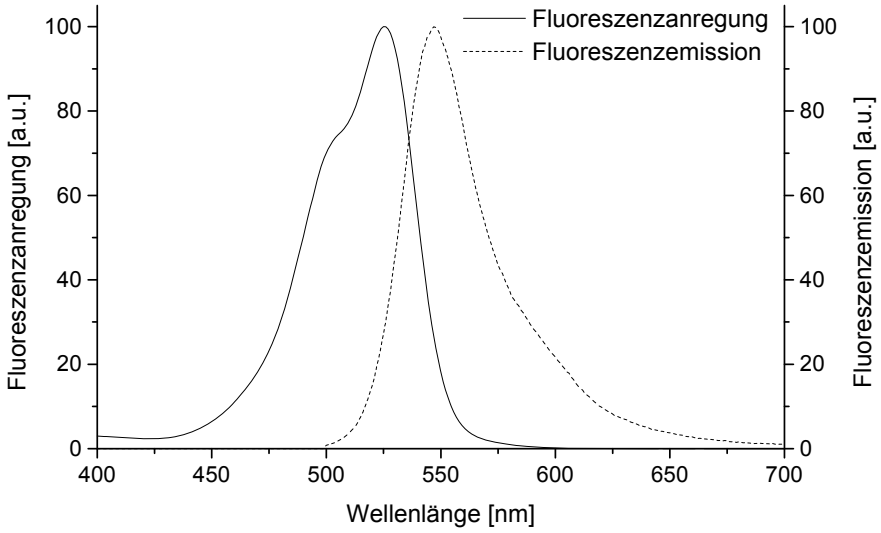


Abbildung 10. Anregungs- und Emissionsspektrum von Rhodamin 6G (Daten aus [56])

Rotenon

Rotenon wird aus den Wurzeln von Pflanzen der Gattung *Derris* gewonnen [86]. Der Wirkstoff blockiert die Atmungskette in Zellen und findet unter anderem Verwendung als Insektizid [53]. Ob die Zytotoxizität von Rotenon Zelltod durch Apoptose oder durch Nekrose auslöst, wird in der Literatur vielfach diskutiert [2, 39, 44, 51, 54, 66]. Es ist davon auszugehen, dass die Rotenon-Konzentration, die Beobachtungsdauer sowie die verwendete Zelllinie dabei eine wesentliche Rolle spielen [53]. Schädigungen der Plasmamembran im Zusammenhang mit Nekrose aufgrund der Inhibierung der Atmungskette durch Rotenon werden von Shimizu *et al.* (1996) beschrieben.

In der vorliegenden Arbeit wird Rotenon zusammen mit dem im Folgenden beschriebenen Fluoreszenzfarbstoff CellTox Green Dye zur Markierung von Zellen mit geschädigter Plasmamembran eingesetzt. Rotenon liegt als Stammlösung 1 mM in Ethanol vor. Für die

mikroskopischen Untersuchungen werden die Zellsphäroide mit Rotenon 1 µM in Kulturmedium für 1 bis 3 Stunden inkubiert.

CellTox Green Dye

CellTox Green Dye ist ein asymmetrischer Cyaninfarbstoff aus dem *CellTox Green Cytotoxicity Assay*, welcher für Vitalitätsuntersuchungen an Zellkulturen in Fluoreszenz-Readern entwickelt wurde. CellTox Green Dye dringt in Zellen mit beschädigter Plasmamembran ein und fluoresziert gebunden an DNA bei entsprechender Anregung im grünen Spektralbereich. Da der Farbstoff nicht in lebende Zellen mit intakter Membran eindringen kann und bei ungebundenem Farbstoff keine Fluoreszenz angeregt wird, ist das gemessene Fluoreszenzsignal direkt proportional zur Zytotoxizität. CellTox Green Dye selbst ist nicht zytotoxisch und liefert auch bei langen Einwirkungszeiten (bis zu 72 Stunden) ein stabiles Signal. [72]

Obwohl das Anregungsmaximum bei etwa 510 nm liegt (siehe Abbildung 11), wird mit der in der vorliegenden Arbeit verwendeten Laserdiode mit einer Emissionswellenlänge von 470 nm eine sehr hohe Fluoreszenzintensität erreicht. Zur Detektion der Fluoreszenzemission wird ein Langpassfilter für Wellenlängen ≥ 515 nm eingesetzt.

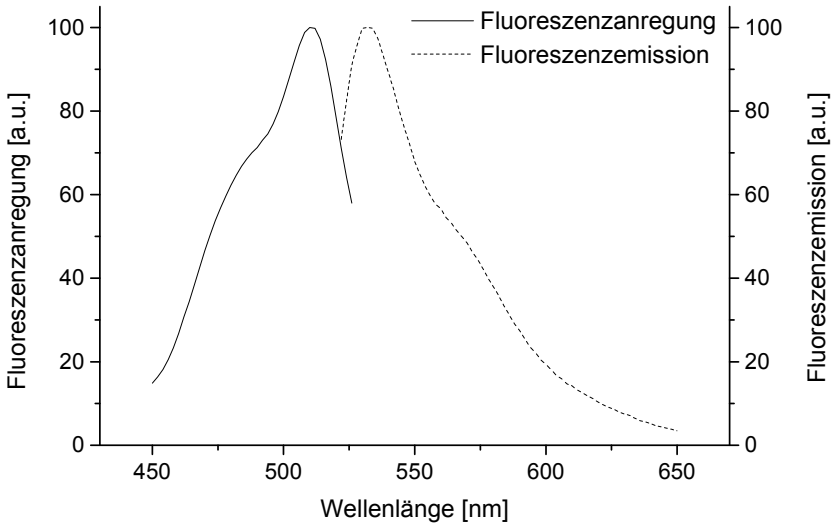


Abbildung 11. Anregungs- und Emissionsspektrum von CellTox Green Dye (Daten aus [73], normiert)

CellTox Green Dye (Konzentration 1 : 500 in Kulturmedium, Inkubationszeit 1 - 2 Stunden) wird zur Markierung nekrotischer Zellen im Sphäroid nach bzw. während der Inkubation mit Rotenon genutzt. Das Experiment eignet sich im Rahmen der Validierung des SPIM-Moduls insbesondere zur Demonstration der 3D-Rekonstruktion von Einzelschichtaufnahmen eines Zellsphäroids.

Doxorubicin-Hydrochlorid

Doxorubicin-Hydrochlorid, im Folgenden als Doxorubicin bezeichnet, ist ein Antibiotikum, das als Zytostatikum in der Chemotherapie bei Krebserkrankungen, wie Brustkrebs, Bronchialkarzinom und Lymphdrüsenkrebs (Malignes Lymphom) eingesetzt wird [7, 16]. Der Wirkstoff wird mittels passiver Diffusion durch die Plasmamembran der Zelle aufgenommen und lagert sich in DNA-Stränge ein [55]. Dort bewirkt Doxorubicin eine Verdichtung der DNA im Chromatin und die Einleitung von Apoptose [55]. Aufgrund seiner Fluoreszenzeigenschaften [45] kann Doxorubicin mittels verschiedener Mikroskopie-methoden in Zellen visualisiert werden. Messungen der Fluoreszenzlebensdauer [4, 18, 20, 37] können hierbei detaillierten Aufschluss über molekulare Interaktionen mit der Mikroumgebung geben.

Doxorubicin liegt als Stammlösung 2 mM in Ethanol vor. Fluoreszenzaufnahmen und Messungen der Fluoreszenzlebensdauer erfolgen nach Inkubation mit Doxorubicin bei Konzentrationen zwischen 2 µM und 8 µM in Kulturmedium für 4 bis 24 Stunden. In Anlehnung an die Literatur [45] erfolgt die Fluoreszenzanregung mit einer Wellenlänge von 470 nm, zur Detektion der Fluoreszenzemission wird ein Langpassfilter für Wellenlängen ≥ 515 nm eingesetzt.

Wasserstoffperoxid (H_2O_2)

Wasserstoffperoxid (H_2O_2) gehört zu der nicht-radikalen Gruppe der reaktiven Sauerstoffspezies (ROS, *Reactive Oxygen Species*), die als Oxidantien mit verschiedenen zellulären Zielmolekülen, sogenannten *Targets*, reagieren können und dabei Zellschädigungen oder Zelltod verursachen. Ferner fungiert Wasserstoffperoxid sowohl in Pflanzen als auch in Säugetieren als Signalmolekül bei der Kontrolle wichtiger Prozesse, wie Proliferation, Zellentwicklung, Signaltransduktion und Zelltod. Aufgrund dieser konträren Eigenschaften muss in den Zellen eine strenge Regulierung bei Produktion, Verteilung und Abbau von Wasserstoffperoxid stattfinden. Wasserstoff-peroxid, hat einen direkten Einfluss auf andere Redoxsysteme, wie NAD(P)H/NAD(P), Thioredoxin/oxidiertes Thioredoxin und Glutathion/oxidiertes Glutathion (zu letzterem siehe auch Kapitel 1). Der Redoxzustand einer Zelle hat, wie der pH-Wert und die Ionenzusammensetzung im Zytosol, einen Einfluss auf die physiologische Umgebung und damit auf die Funktionalität einer Vielzahl von Proteinen. [6]

Zur Validierung des Ratio Imagings wird Wasserstoffperoxid als Oxidationsmittel verwendet, um gezielt das Redoxgleichgewicht in Zellsphäroiden der Glioblastomzelllinie U251MG-L106-RS zu beeinflussen, die mit einem genetisch codierten, redoxsensitiven, grün fluoreszierenden Protein transfiziert ist.

Für die Messungen wird aus einer Wasserstoffperoxid-Lösung (30 % in Wasser) eine Stammlösung mit einer Konzentration von 100 mM in bidestilliertem Wasser angesetzt. Die weitere Verdünnung zu 50 µM in EBSS (Earle's Balanced Salt Solution) findet jeweils direkt vor der Messung statt. Da die Redoxreaktion bei Gabe von Wasserstoffperoxid innerhalb weniger Minuten abläuft [102], erfolgt die Zuführung des Wirkstoffes via Fluidik-System (vgl. Abschnitt 3.1.4). Fluoreszenzbilder werden alle fünf Sekunden ab dem Zeitpunkt, zu welchem die Wasserstoffperoxid-Lösung die Probe erreicht, aufgenommen.

Staurosporin

Staurosporin wurde 1977 von Omura *et al.* aus einer zur Gruppe der Actinobacteria gehörenden *Streptomyces* Art isoliert. Bei dem Naturstoff handelt es sich um ein Antibiotikum (Antibiotikum AM-2282), das Proteinkinase C [95] und Thrombozyten-Aggregation [68] inhibiert. Staurosporin findet verbreitet Einsatz zur Einleitung von Apoptose in verschiedenen eukaryotischen Zelltypen [48, 70, 71]. Eine Folge Staurosporin-induzierter Apoptose ist die Produktion reaktiver Sauerstoffspezies [70].

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wird Staurosporin zur Einleitung von Apoptose in Sphäroiden der Zelllinien HeLa-Mem-ECFP-DEVD-EYFP, U251MG-L106-RS und U251MG-L106-MRS genutzt. Hierfür werden diese mit Staurosporin-Konzentrationen zwischen 2 µM und 12 µM in Kulturmedium bis zu 6 Stunden inkubiert. Da Staurosporin selbst nicht fluoresziert, kann auf eine Spülung der Sphäroide in EBSS verzichtet werden. Der Apoptose-Nachweis erfolgt über die Messung der Fluoreszenzlebensdauer des Donors ECFP (HeLa Zelllinie) bzw. über die Messung von Änderungen des Redoxgleichgewichts des Sensorproteins Grx1-roGFP2 (U251MG Zelllinien).

2.5 Konfokale Laser Scanning Mikroskopie

Die konfokale Laser Scanning Mikroskopie (CLSM) ist eine verbreitete Methode zur fluoreszenzmikroskopischen Untersuchung dreidimensionaler Proben, da sie die Aufnahme definierter Schnittbilder bei hoher Auflösung erlaubt. Die Probe wird mit einem in die Probenebene des Mikroskopobjektivs fokussierten Laserstrahl abgerastert. Fluoreszenz, die außerhalb der Fokusebene des Objektivs angeregt wird, wird durch eine nachgeschaltete konfokale Blende blockiert. Die Detektion erfolgt über Photomultiplier.

In der vorliegenden Arbeit wird die konfokale Laser Scanning Mikroskopie als Vergleichsmethode zur Beurteilung der Möglichkeiten und Grenzen des in Abschnitt 3.2 vorgestellten SPIM-Moduls genutzt. Das hierfür verwendete Mikroskop Axiovert 200M (Carl Zeiss Jena GmbH, Jena), für welches auch das SPIM-Modul konstruiert wurde, verfügt über die Laser Scanning Einheit Pascal 5 (Carl Zeiss Jena GmbH, Jena). Zur

Fluoreszenzanregung wird ein Argon-Ionen-Laser (LGK 7812 ML3, Lasos Lasertechnik GmbH, Jena) mit der Emissionswellenlänge 488 nm genutzt. Die Detektion erfolgt über einen Langpassfilter für Wellenlängen ≥ 505 nm. Der Durchmesser der konfokalen Blende wird auf 80 % des Durchmessers des Airy-Scheibchens eingestellt, um analog zur Lichtscheibenmikroskopie eine Schichtdicke von 10 µm zu erhalten (vgl. Abschnitt 4.1.1). Außerdem sind Bestrahlungsstärke und Belichtungszeit pro Aufnahme mit 17,3 mW/cm² und 3 s so gewählt, dass die verwendete Bestrahlung (Lichtdosis) mit 52 mJ/cm² jener der zum direkten Vergleich herangezogenen SPIM-Aufnahmen (siehe Abschnitt 4.1.2) entspricht.

3 Technischer Aufbau

Zur Kombination von Lichtscheibenfluoreszenzmikroskopie und Ratio Imaging wurde jeweils ein Aufbau erstellt, der modular an das bestehende Mikroskop Axiovert 200M (Carl Zeiss Jena GmbH, Jena) angebracht werden kann. Des Weiteren wurde ein Modul zur Probenhalterung entwickelt. [11, 12, 78]

Das Axiovert 200M ist ein inverses Weitfeldmikroskop, welches zusätzlich über eine Laser Scanning Einheit verfügt (vgl. Abschnitt 2.5). Der Objektivrevolver sowie das Filterrad sind motorisiert und können per Software angesteuert werden. Der Positioniertisch ist manuell in x- und y-Richtung beweglich. In seiner aktuellen Konfiguration besitzt das Mikroskop zwei zugängliche Anschlüsse (Seiten- und Frontanschluss) für Kameras oder sonstige Detektionseinheiten sowie ein Okular zur direkten visuellen Beobachtung der Probe. Der Mikroskopkopf für die Durchlichtbeleuchtung der Probe mittels Halogenlampe lässt sich nach hinten wegklappen.

Das Modul zur Probenhalterung wird am Positioniertisch des Mikroskops befestigt. Als Probenträger dienen rechteckige Glaskapillaren [12]. Ein Fluidik-System, an welches die Kapillaren angeschlossen werden können, erlaubt die kontinuierliche Zufuhr von Nährmedien, Farb- und Wirkstoffen während der Messung [11, 12, 78].

Das Modul zur Lichtscheibenerzeugung [12] ermöglicht die Beleuchtung einzelner Probenebenen durch eine Lichtscheibe, die sich senkrecht zur Detektionsrichtung ausbreitet. In Anlehnung an den englischen Begriff *Single Plane Illumination Microscopy*, kurz SPIM, für Lichtscheibenmikroskopie, wird das Modul hier als SPIM-Modul bezeichnet. Das System aus SPIM-Modul und Probenhalterung in Glaskapillaren ist für die Betrachtung einzelner Ebenen in Zellsphäroiden entwickelt und optimiert. Es eignet sich in der aktuellen Konfiguration insbesondere für dreidimensionale Proben mit Dicken zwischen 50 und 500 µm.

Mit dem Detektionsmodul zum Ratio Imaging (Abschnitt 3.3) können von einer Probe gleichzeitig zwei Fluoreszenzbilder, erzeugt bei unterschiedlichen Anregungswellenlängen, aufgenommen werden, obgleich die Emission jeweils im gleichen Spektralbereich liegt. Hierfür wurde ein komplexer optischer Aufbau erstellt, der den Öffnungszyklus einer Kamera mit den Lichtpulsen der für die Anregung im SPIM-Modul genutzten Laserdioden synchronisiert.

3.1 Modul zur Probenhalterung

3.1.1 Kapillaren

Als Probenträger werden rechteckige Kapillaren aus Borosilikatglas (CM Scientific, Silsden, UK) verwendet. Rechteckige Glaskapillaren eignen sich besonders gut für die Lichtscheibenmikroskopie – bei der Beleuchtungs- und Detektionsrichtung senkrecht zueinander stehen – da sie plane Außenflächen sowohl in Beleuchtungsrichtung als auch in Detektionsrichtung aufweisen.

Für die in dieser Arbeit vorgestellten Messungen werden 50 mm lange Kapillaren mit einer inneren Kantenlänge von 600 µm (± 10 % Toleranz lt. Hersteller) und einer Wanddicke von 120 µm verwendet. Das Fassungsvermögen der Kapillaren beträgt somit ca. 18 µl.

Fertigungsbedingt besitzen die Kapillaren innen und außen leicht abgerundete Kanten. Entscheidend bei der Auswahl der Kapillaren ist, dass der Radius der äußeren Abrundung kleiner ist als die Dicke der Wandung, bzw. dass die Abrundung an der Fortführung der Innenwand (siehe gestrichelte Linie in Abbildung 12) abgeschlossen ist. Ist dies nicht der Fall, bewirkt die Lichtbrechung, dass die Lichtscheibe bei Stapelaufnahmen aus dem Fokus des Detektionsobjektivs wandert. Die Folge sind unscharfe Abbildungen. Gleiches gilt, wenn die Abrundungen der inneren Kapillarkanten große Radien aufweisen.

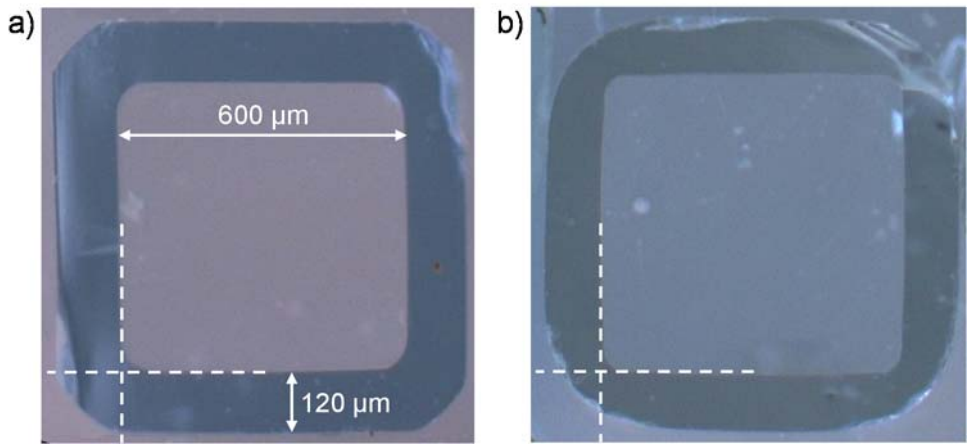


Abbildung 12. Qualität der Kapillaren mit 600 µm innerer Kantenlänge und 120 µm Wanddicke. a) Plane Außenflächen über den kompletten Bereich der Innenflächen sorgen für gute Abbildungsqualität. b) Radien der äußeren Kanten sind größer als die Wanddicke. Hierdurch entstehende Lichtbrechung führt zu unscharfen Abbildungen und zur Verschiebung der Lichtscheibe aus dem Fokus des Objektivs bei Stapelaufnahmen.

3.1.2 Probenapplikation

Für die Aufnahme der Probe in die Kapillare können entweder Kapillarkräfte genutzt werden oder die Probe kann mithilfe einer Pipette in die Kapillare eingebracht werden. Bei ersterer Methode wird ein Ende der Kapillare mit einem Finger abgedichtet, während das offene Kapillarende zur Probe geführt wird. Beim Lösen des Fingers wird die Probe mit der umgebenden Flüssigkeit in die Kapillare eingesogen. Wird eine Pipette zum Einbringen der Probe in die Kapillare genutzt, so ist einerseits darauf zu achten, dass die Pipettenspitze groß genug ist, um die Probe aufzunehmen ohne diese zu verletzen. Andererseits sollte der Durchmesser der Spitze den Innendurchmesser der Kapillare nicht überschreiten, damit ein optimales Befüllen der Kapillare gewährleistet ist.

Durch entsprechendes Bewegen der Kapillare wird die Probe dann mittels Gravitation in die gewünschte Position gebracht. Aufgrund von Streuung und Reflexionen an den Wänden sollte sich die Probe für mikroskopische Untersuchungen in der Mitte der Kapillare, bzw. im Abstand > 50 µm zu den beiden Außenwänden senkrecht zur Beleuchtungsrichtung befinden.

Eine dritte Variante der Probenaufnahme ist das Einsaugen der Probe unter Nutzung der in Abschnitt 3.1.4 vorgestellten Peristaltikpumpe. Hierbei wird der Pumpenschlauch direkt auf die Kapillare gesteckt, diese wird zur Probe geführt, und der Pumpvorgang wird gestartet. Diese Methode erweist sich insbesondere bei der Aufnahme großer Proben, deren Durchmesser ähnlich der inneren Kantenlänge der verwendeten Kapillare ist, als vorteilhaft.

Sämtliche in dieser Arbeit vorgestellten Ergebnisse wurden mit Zellsphäroiden in flüssigen Medien, statisch oder unter Fluss, erzielt. Für statische Messungen ist es nicht notwendig, die Zellsphäroide in der Kapillare zu fixieren. Sollen die Messungen unter Flussbedingungen (siehe hierzu Abschnitt 3.1.4) stattfinden, ist dies jedoch unerlässlich. Für Experimente mit Monokulturen hat sich gezeigt, dass die Adhäsion von Zellen auf Objektträgern durch deren Beschichtung mit fötalem Rinderserum (FBS) begünstigt wird. Daher werden die Kapillaren vor der Sphäroidapplikation für die Dauer von einer Stunde mit 18 µl FBS gefüllt. Als optimal hat sich eine Trocknungsdauer von zwölf Stunden bis maximal fünf Tagen erwiesen. Die Zellsphäroide sollten mindestens zwei bis drei Stunden vor dem Experiment in die Kapillaren eingesetzt und bis zu deren Verwendung im Inkubator bei 37 °C und 5 % CO_2 gelagert werden.

Entscheidend dabei ist, die Sphäroide vor deren Anhaftung in die gewünschte Position innerhalb der Kapillare zu bringen, um später optimale Ergebnisse hinsichtlich der Bildqualität zu erzielen. Des Weiteren gilt es zu beachten, dass eine zu lange Anhaftungs-

dauer im Inkubator zu einer Deformierung des Sphäroids führt. Dabei plattet das Sphäroid an der Auflagestelle immer mehr ab, wodurch sich die adhärierende Fläche des Sphäroids vergrößert. Außerdem kann die Entstehung einer Einzelzellschicht auf dem Glassubstrat um die Auflagestelle des Sphäroids beobachtet werden. Auch wenn dieser Effekt bei kurzen Anhaftungszeiten von etwa drei Stunden sehr gering ist, kann es dennoch lohnenswert sein, die Kapillare um 180° zu drehen und so einzusetzen, dass das Sphäroid hängend beobachtet wird. Insbesondere wenn Stapelaufnahmen gewünscht sind erweist sich diese Konfiguration als vorteilhaft, da so selbst von der untersten (dem Objektiv zugewandten) Sphäroidebene die Aufnahme störungsfreier Bilder möglich ist.

In Abbildung 13 sind die Möglichkeiten der Probenpositionierung dargestellt. Nicht adhärente Proben liegen auf dem Glassubstrat auf (a), wohingegen adhärente Proben sowohl liegend (a) als auch hängend (b) betrachtet werden können. Alternativ lässt sich, für statische Messungen, die Probe in einer Gel-Matrix, z. B. Agarose, einbetten (c).

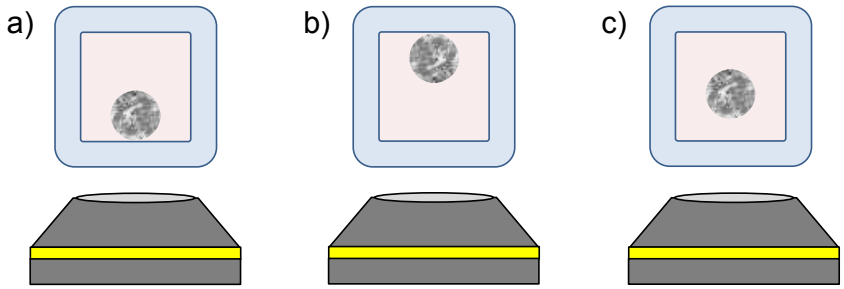


Abbildung 13. Möglichkeiten der Probenpositionierung in der Kapillare: a) aufliegendes Sphäroid, b) hängendes Sphäroid, c) in einer Gel-Matrix eingebettetes Sphäroid

3.1.3 Kapillarhalterung

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden zwei Kapillarhalterungen entwickelt, die an den Positioniertisch des Mikroskops angebracht werden können. Die einfachere Variante ist ein Einschub, der in die für die Probenträgerhalterung vorgesehene Ausfräsung des Positioniertisches eingesetzt wird (siehe Abbildung 14).

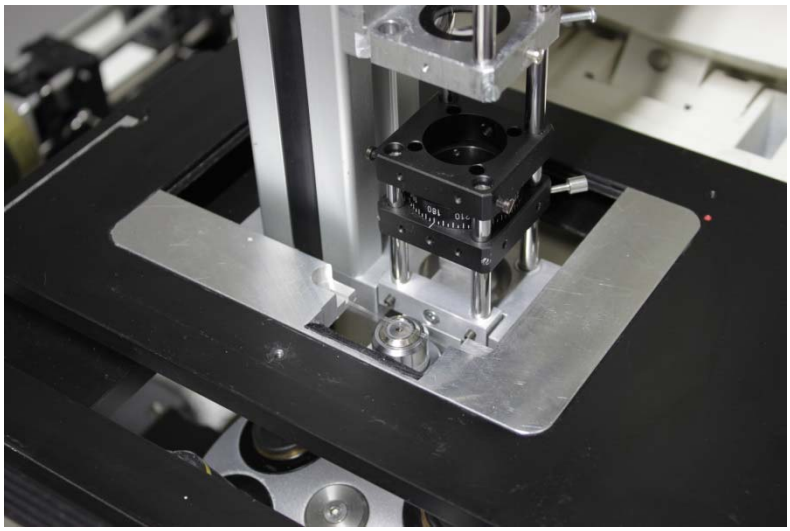


Abbildung 14. Kapillarhalterung für Messungen unter statischen Bedingungen

Der Einschub verfügt über eine Nut, in welche die Kapillare lediglich eingelegt wird. Dies bringt den Vorteil mit sich, dass Kapillaren sehr schnell und einfach ausgetauscht werden können.

Soll die Kapillare an das in Abschnitt 3.1.4 beschriebene Fluidik-System angeschlossen werden, bedingt dies jedoch, dass die Enden der Kapillare frei zugänglich sind. Aufgrund dessen wurde die in Abbildung 15 dargestellte Kapillarhalterung entwickelt. In dieser wird die Kapillare über zwei Klemmen gehaltert, die jeweils mittels einer Schraube festgezogen werden. Die Halterung ihrerseits wird ebenfalls mit einer Schraube am Positioniertisch befestigt. Hierfür wird ein bereits bestehendes Gewinde am Positioniertisch genutzt.

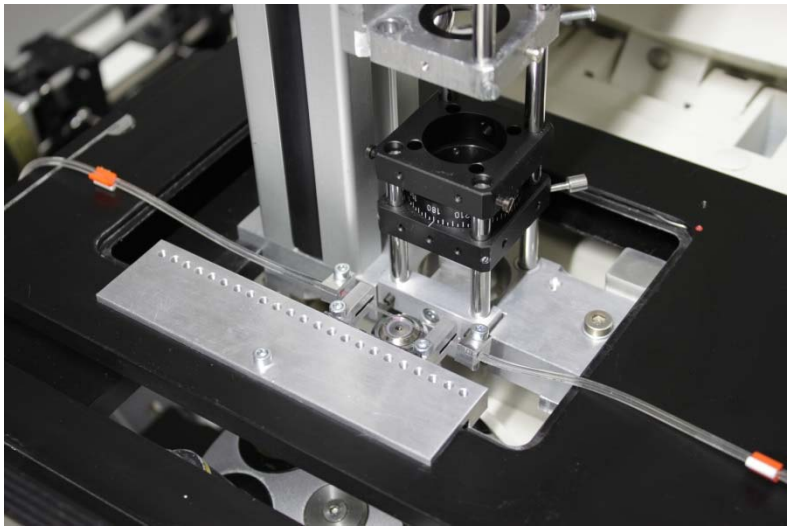


Abbildung 15. Kapillarhalterung mit Klemmmechanismus für frei zugängliche Kapillarenden, z. B. zum Aufstecken von Schläuchen zur Verbindung mit dem Fluidik-System

3.1.4 Fluidik

Die vorgestellte Probenhalterung in Form einer rechteckigen Kapillare eignet sich optimal für den Anschluss an ein Fluidik-System (Abbildung 16). Dies ermöglicht die konstante Versorgung der Probe mit – bei Bedarf temperierten – Medien und Wirkstoffen auch während der Messung, was insbesondere bei Reaktionen, die in sehr kurzen Zeitspannen ablaufen, einen Vorteil darstellt.

Auf beide Enden der Kapillare werden Schläuche mit einem Innendurchmesser von 0,89 mm aufgesteckt (Tygon R3607, IDEX Health & Science GmbH, Wertheim, Deutschland) und mit jeweils einer Klemme fixiert. Mittels einer Peristaltikpumpe (Ismatek, Glattbrugg-Zürich, Schweiz) wird die Flüssigkeit zugeführt. Zwischen dem Pumpschlauch (2a) und dem Schlauch (2b), der zur Kapillare führt, befindet sich eine Blasenfalle. Diese verhindert, dass Luftblasen in die Kapillare gelangen und das adhärente Sphäroid vom Glassubstrat lösen. Zunächst werden die Schläuche 2a und 2b mit der Blasenfalle verbunden. Die Blasenfalle wird befüllt, indem bei gelöstem Verschluss der Pumpvorgang gestartet wird. Es wird so lange gepumpt bis sich die gewünschte Flüssigkeitsmenge im Reservoir der Blasenfalle befindet. Im Idealfall sollte diese etwa zur Hälfte gefüllt sein (150 - 200 µl). Dann wird das Reservoir mit dem Verschluss abgedichtet und der Pumpvorgang so lange fortgesetzt bis die Flüssigkeit am offenen Ende von Schlauch 2b angekommen ist.

Zum Verbinden von Schlauchende und Kapillare wird diese schräg gehalten, sodass die Flüssigkeit an der Kapillaröffnung ansteht. Dann wird dieses Ende der Kapillare in den befüllten Schlauch gesteckt. Diese Vorgehensweise stellt sicher, dass beim Anschluss der Fluidik keine Luftblasen in die Kapillare gelangen. Eine Klemme an der Verbindungsstelle verhindert, dass Flüssigkeit austreten kann. Nun wird das andere Ende der Kapillare ebenfalls mit einem Schlauch (2c) verbunden und die Verbindung wiederum mit einer Klemme fixiert.

Der Schlauch 2c kann entweder in einen Abfallbehälter (I) münden, direkt mit dem Schlauch 2a verbunden werden (II) oder die Flüssigkeit in das ursprüngliche Reservoir zurück leiten (III). Die Kreislaufsysteme (II und III) bieten den Vorteil, dass gegenüber dem offenen System (I) geringere Flüssigkeitsvolumina und somit je nach Fragestellung geringere Wirkstoffmengen benötigt werden. Die Pumpgeschwindigkeit kann stufenweise zwischen 9 µl/min und 8 ml/min eingestellt werden. Im Rahmen dieser Arbeit kommt die Fluidik für die Zuführung von Wasserstoffperoxid zum Einsatz (siehe Abschnitt 4.4.1). Es wird das offene System mit einer Pumpgeschwindigkeit von ca. 20 µl/min verwendet. Dies entspricht einer Fließgeschwindigkeit von etwa 55 mm/min in der Kapillare.

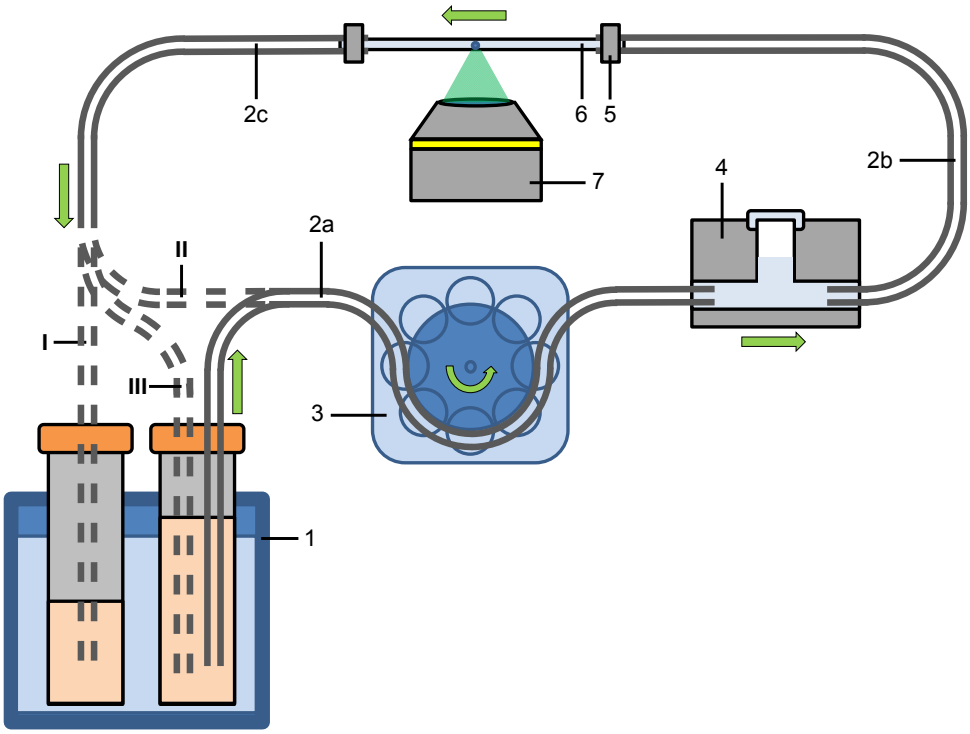


Abbildung 16. Fluidik-System bestehen aus Wasserbad mit Reservoirs (1), Schläuchen (2), Peristaltikpumpe (3), Blasenfalle (4), Klemmen (5), Kapillare (6) und Mikroskopobjektiv (7). (I) Nutzung als offenes System, (II) Nutzung als geschlossenes System, (III) Nutzung als geschlossenes System mit Rückführung ins Reservoir

3.2 Modul zur Lichtscheibenerzeugung

Das SPIM-Modul ermöglicht die Erweiterung des Weitfeld- und Laser Scanning Mikroskops Axiovert 200M zu einem Lichtscheibenmikroskop. Hierfür wird das Modul über einen Klemmmechanismus am statischen Teil des Positioniertisches des Mikroskops befestigt. Es ersetzt dabei lediglich die Beleuchtungsoptik während die Detektionsoptiken (Okular und Seitenausgänge) sowie die Kameraanschlüsse des Mikroskops weiterhin uneingeschränkt genutzt werden können. Die Basisausführung des SPIM-Moduls – montiert an das Mikroskop – ist in Abbildung 17 dargestellt.

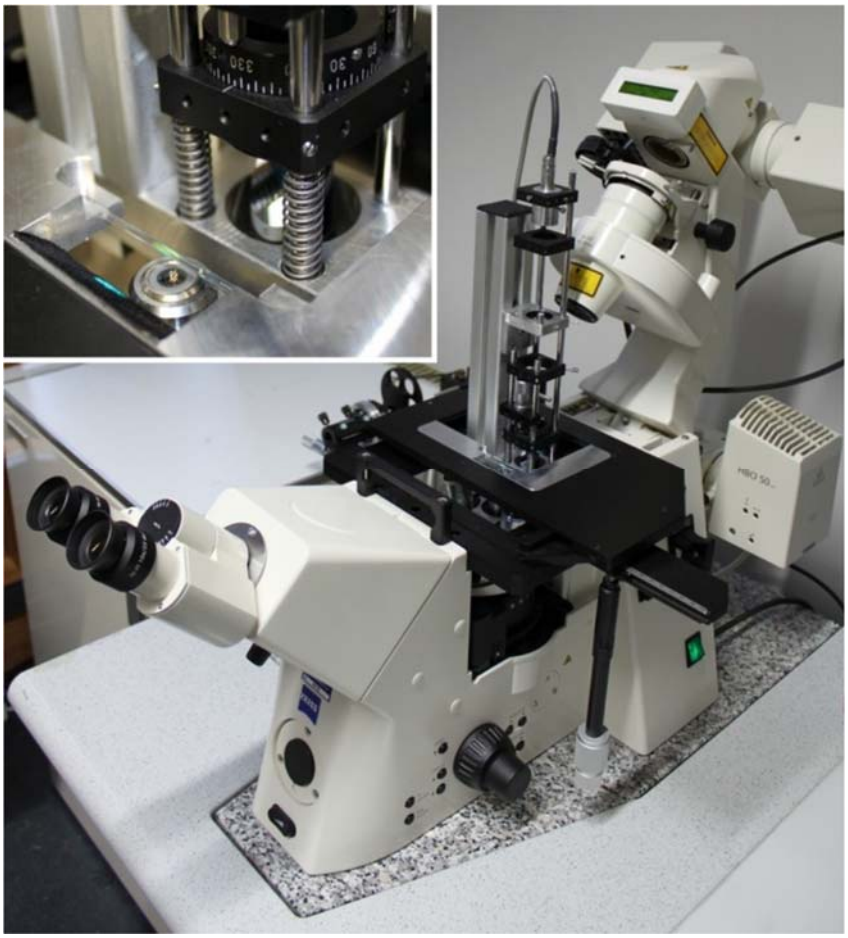


Abbildung 17. Basisversion des SPIM-Moduls – montiert an das inverse Mikroskop Axiovert 200M

Das SPIM-Modul kann in Kombination mit einer Vielzahl verschiedener Detektionsverfahren genutzt werden. Hierzu gehören die Aufnahme von Fluoreszenzbildern und -spektren sowie die Messung der Fluoreszenzlebensdauer.

3.2.1 Aufbau

Die Basisausführung des SPIM-Moduls, schematisch dargestellt in Abbildung 18, besteht aus einer Anschlussmöglichkeit für einen fasergekoppelten Laser oder eine Laserdiode, aus einem Teleskop zur Aufweitung des Laserstrahls und einer in einer Drehfassung gehalterten Zylinderlinse, die den aufgeweiteten Laserstrahl über einen Umlenkspiegel als Lichtscheibe in die Probenebene fokussiert. Der Aufbau ist so konstruiert, dass das Teleskopsystem fest, die Zylinderlinse und der Umlenkspiegel (siehe auch Bildausschnitt in Abbildung 17 oben) jedoch in z-Richtung beweglich gehaltert sind. Durch eine Justierschraube (Mikrometerschraube) als Bindeglied ist dieser bewegliche Teil des Moduls auf dem Objektivrevolver des Mikroskops gelagert. Die Justierschraube ermöglicht einerseits die Feineinstellung der Lichtscheibe auf die Fokusebene des Objektivs, andererseits kann durch diese Kopplung die Lichtscheibe synchron mit dem

Mikroskopobjektiv verschoben werden (für eine nähere Betrachtung siehe Abschnitt 3.2.3). Dies stellt sicher, dass die Lichtscheibe stets die Probenebene im Fokus des Objektivs beleuchtet, ohne dass eine eigene Ansteuerung für die Verschiebung der Lichtscheibe notwendig ist.

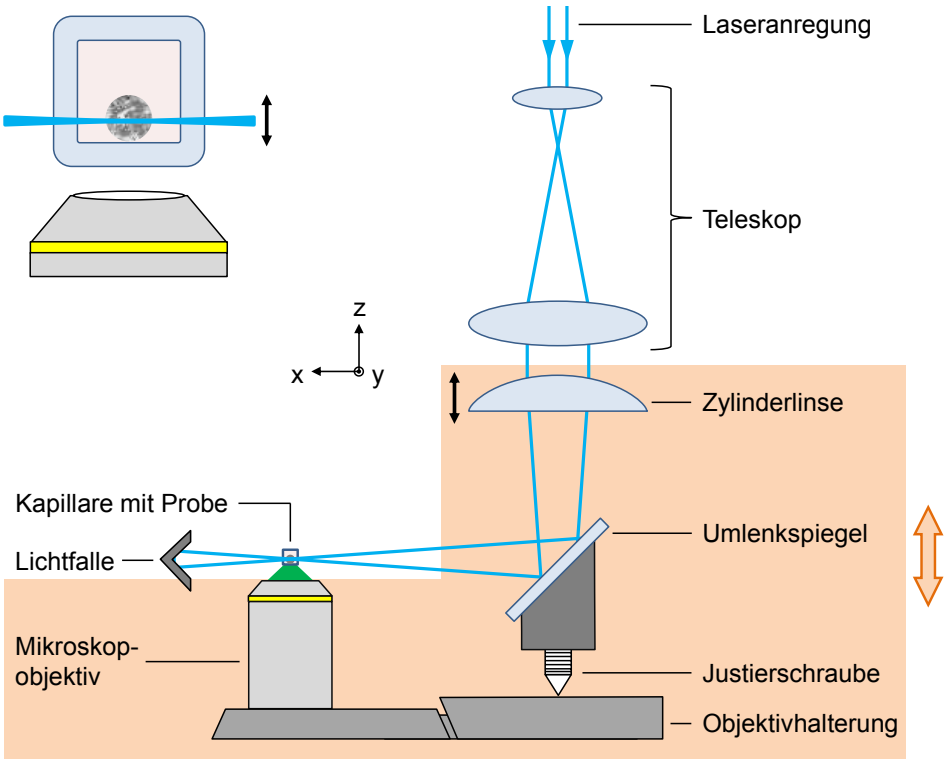


Abbildung 18. Schema der Beleuchtungseinheit. Teleskop sowie Lichteinkopplung sind statisch gehaltert. Zylinderlinse und Umlenkspiegel werden gemeinsam mit dem Objektiv in z-Richtung verschoben. Die Zylinderlinse ist separat in z-Richtung justierbar. Die vergrößerte Darstellung zeigt den Querschnitt einer Kapillare (vgl. Abschnitt 3.1.1) mit Probe und Lichtscheibenbeleuchtung.

Lichtscheibe

Die Dicke der Lichtscheibe ist, wie in Abschnitt 2.1.1 beschrieben, von der Blendenöffnung und der Brennweite der Zylinderlinse abhängig. Die Aufweitung des parallelen Laserstrahls erfolgt mit zwei Sammellinsen der Brennweiten f'_1 = 15 mm und f'_2 = 80 mm. Aus dem Verhältnis der beiden Brennweiten f'_2/f'_1 ergibt sich eine Aufweitung des einfallenden Strahls um den Faktor 5,33. Für einen Strahldurchmesser des einfallenden Lichts von 1,5 mm, erhält man somit nach der Strahlaufweitung ein paralleles Bündel mit einem Durchmesser von 8 mm. Die eingesetzte Zylinderlinse mit einer Brennweite von f'_{zyl} = 50 mm fokussiert das Licht in einer Ebene zu einer Lichtscheibe. Eine spezielle Fassung der Zylinderlinse mit einem Durchmesser von ebenfalls 8 mm fungiert als Aperturblende. Mit Gleichung (2) ergibt sich folglich für die Beleuchtung eine numerische Apertur von 0,08. Unter Verwendung der Gleichungen (7) und (8) lässt sich die minimal

erreichbare Dicke der Lichtscheibe (Strahltaille) im Fokus der Zylinderlinse sowie die entsprechende Fokustiefe (für wässrige Medien mit n = 1,33) für die jeweils verwendete Wellenlänge berechnen (siehe Tabelle 4).

Tabelle 4. Dicke der Lichtscheibe im Fokus der Zylinderlinse (Strahltaille) sowie die entsprechende Fokustiefe in Abhängigkeit der in dieser Arbeit verwendeten Anregungswellenlängen

Wellenlänge [nm]	Dicke der Strahltaille [µm]	Fokustiefe [µm]
488	6,1	101,4
470	5,9	97,7
391	4,9	81,3

Als Lichtquellen werden ein Argon-Ionen-Laser (Innova 90, Coherent, Palo Alto, Kalifornien, USA), betrieben bei einer Wellenlänge von 488 nm, sowie zwei Laserdioden (LDH-C-400 und LDH-P-C-470, Treiber PDL 800-B, PicoQuant, Berlin), die Licht der Wellenlängen 391 nm und 470 nm emittieren, verwendet. Das kollimierte Licht der Laserdioden wird direkt im Freistrahl eingekoppelt. Die Einkopplung des Lichts des Argon-Ionen-Lasers erfolgt über eine Singlemode-Faser mit Kollimationsoptik (kineFLEX, Point Source, Southampton, Großbritannien). Da die Brennweite optischer Systeme wellenlängenabhängig ist (vgl. Abschnitt 2.1.1), muss die Position der Strahltaille in Bezug auf die Probe, für jede Wellenlänge individuell, über die Positionierung der Zylinderlinse in z-Richtung eingestellt werden.

Positionierung der Strahltaille bei Anregung mit einer Wellenlänge

Um die Position der Strahltaille zu bewerten und zu justieren, ist es hilfreich diese durch das Mikroskopobjektiv betrachten zu können. Hierfür wird eine mit Rhodamin 6G (25 µM in bidestilliertem Wasser) gefüllte Kapillare (vgl. Abschnitt 3.1.1) in die Probenhalterung gelegt und die Zylinderlinse um 90° gedreht, sodass die Lichtscheibe senkrecht (Abbildung 19b) statt waagrecht (Abbildung 19a) auf die Kapillare trifft.

Nun wird die Zylinderlinse entlang der optischen Achse verschoben, bis sich die Strahltaille in der Mitte der Kapillare befindet. An dieser Position wird die Zylinderlinse fixiert.

Anschließend wird die Zylinderlinse für eine waagerecht einfallende Lichtscheibe zur Probenbeleuchtung um 90° zurück gedreht. Die exakt horizontale Orientierung der Lichtscheibe kann unter Beobachtung des Lichteinfalls an der unteren inneren Kapillarkante leicht justiert werden.

Diese Vorgehensweise zur Strahltaillen-Positionierung kann auch anhand des im *Journal of Visualized Experiments* 2014 veröffentlichten Videos [11] nachvollzogen werden.

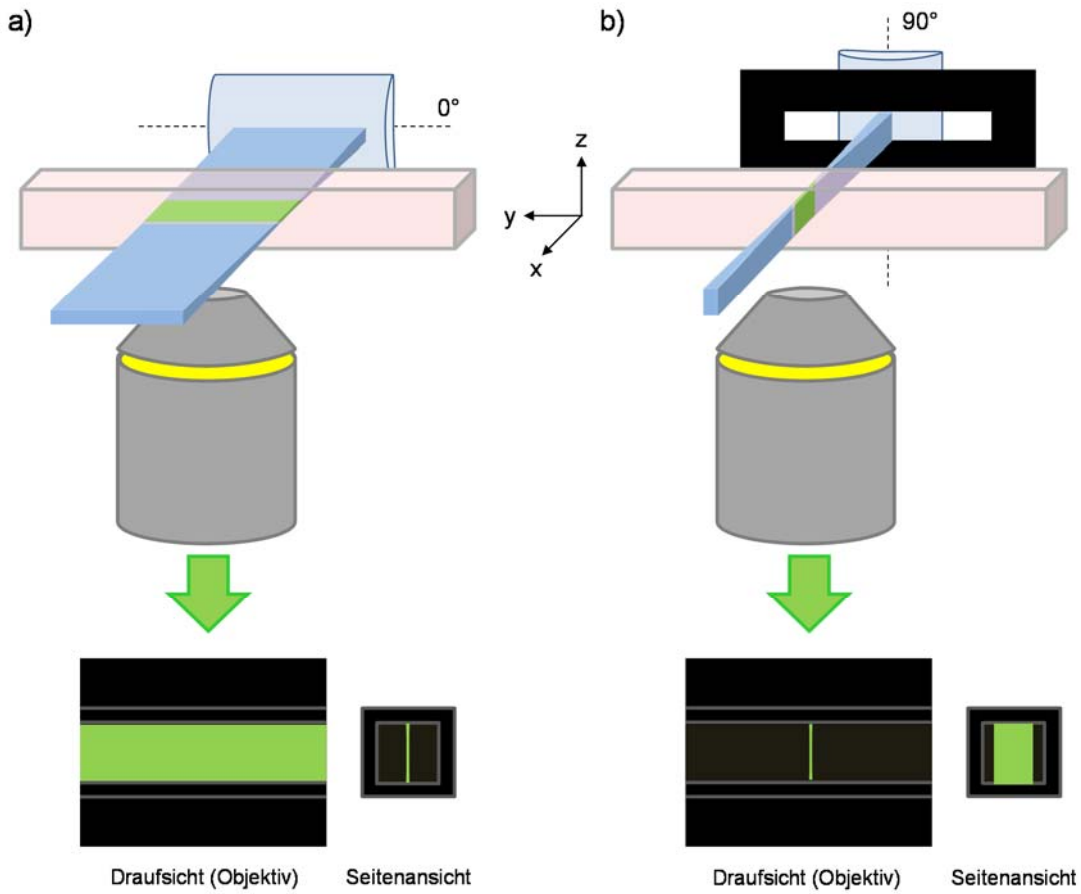


Abbildung 19. Schematische Darstellung der Lichtscheibe in Abhängigkeit der Rotation der Zylinderlinse: a) 0°-Position der Zylinderlinse: waagerechter Lichteinfall zur Probenbeleuchtung, b) 90°-Position der Zylinderlinse: senkrechter Lichteinfall zur Charakterisierung der Lichtscheibe. Der Umlenkspiegel, der sich zwischen Zylinderlinse und Kapillare befindet, ist hier nicht eingezeichnet.

Vorgehensweise zur Charakterisierung der Lichtscheibe

Um eine quantitative Aussage bezüglich der Dicke der Lichtscheibe (Ausdehnung der Lichtscheibe in z-Richtung bei waagerechtem Lichteinfall) zu treffen, wird zunächst, wie im vorhergehenden Abschnitt beschrieben, die Zylinderlinse für einen senkrechten Lichteinfall um 90° gedreht und die Strahltaille in der Mitte der mit Rhodamin 6G Lösung gefüllten Kapillare positioniert.

Zur Aufnahme der Lichtscheibe wird das Objektiv EC Plan-Neofluar 10x/0,3 Pol in Kombination mit der Farbkamera AxioCam MRc (vgl. Abschnitt 3.4) verwendet.

Die Bestimmung der Lichtscheibendicke erfolgt mittels der Software ImageJ (U. S. National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA). Im Fluoreszenzbild werden an gewünschten Positionen entlang der optischen Achse des Beleuchtungsstrahlengangs (x-Achse) sogenannte Profilkurven erstellt. Profilkurven geben den Grauwerteverlauf senkrecht zur Lichtausbreitung wieder. Die Grauwerte stellen die Intensitätswerte der

Pixel dar und werden von der Software als Mittelwert der RGB-Werte der jeweiligen Pixel berechnet. Somit erlaubt die Rotation der Lichtscheibe um 90° den Intensitätsverlauf der Lichtscheibe in Bezug auf deren Ausdehnung entlang der optischen Achse des Detektionsobjektivs (z-Achse) zu bestimmen (vgl. Abbildung 35 und Abbildung 36).

Die Halbwertsbreite (FWHM) der Profilkurve definiert die Dicke der Lichtscheibe an einem Punkt entlang der Ausbreitungsrichtung (x-Achse). Anhand der Erstellung mehrerer Profilkurven in definierten Abständen entlang der x-Achse und der Bestimmung der jeweiligen Halbwertsbreiten kann die Dicke der Lichtscheibe in Abhängigkeit der Position *x* im Abstand zur Strahltaille aufgetragen werden (vgl. Abbildung 37).

Um anhand dieser Vorgehensweise verlässliche Werte bezüglich der Lichtscheibendicke zu erhalten, wird vor der Kapillare ein Spalt eingebracht, der das gebündelte Licht auf eine Breite von 220 µm begrenzt (siehe Abbildung 19b). Hierdurch werden störende Reflexionen an der oberen und unteren Kapillarwandung verhindert.

Durchlichtbeleuchtung

Bei Verwendung des SPIM-Moduls, kann die klassische Durchlichtbeleuchtung des Mikroskops aus Platzgründen nicht mehr genutzt werden, da sie zusammen mit dem Mikroskopkopf zurückgeklappt wird (siehe Abbildung 17). Um dennoch Durchlicht-aufnahmen einer Probe zu ermöglichen, wird an das SPIM-Modul eine Weißlicht-LED angebracht. Diese ist, auf Höhe der zweiten Teleskoplinse, so gehaltert, dass sie sich zentral über dem Detektionsobjektiv und somit auf der optischen Achse der Detektion befindet. Die Durchlichtbeleuchtung dient der Lokalisierung der Probe, der Grob-einstellung der Fokusebene sowie für Referenzaufnahmen zu Fluoreszenzbildern.

3.2.2 Zwei-Wellenlängen-Anregung

Zur parallelen Anregung der Probe mit zwei unterschiedlichen Wellenlängen wird der in Abbildung 18 dargestellte Aufbau um einen dichroitischen Strahlkombinierer und ein Teleskop, bestehend aus zwei Sammellinsen mit jeweils einer Brennweite von 40 mm, erweitert (siehe Abbildung 20). Der dichroitische Strahlkombinierer reflektiert Wellen-längen zwischen 372 nm und 415 nm, sein Transmissionsbereich umfasst 439 nm bis 647 nm. Damit ist es möglich das Licht zweier Laserdioden mit den Wellenlängen 391 nm und 470 nm, die senkrecht zueinander angeordnet sind, in das System einzukoppeln. Das Teleskop als afokales System mit Vergrößerungsfaktor 1 ist leicht dejustiert, sodass der Linsenabstand etwas größer ist als die doppelte Brennweite der Einzellinsen. Dieser spezielle Aufbau dient der Korrektur der chromatischen Aberration (vgl. Abschnitt 2.1.1), die notwendig ist, um zu gewährleisten, dass die Strahltaillen der Lichtscheiben beider

Wellenlängen exakt übereinander liegen. Während das Licht der Wellenlänge 391 nm als paralleles Bündel auf den Strahlkombinierer und das Teleskop zur Strahlaufweitung trifft, erzeugt das leicht dejustierte afokale System im Strahlengang des Lichts der Wellenlänge 470 nm vor dem Strahlkombinierer ein leicht konvergentes Strahlenbündel. Dies hat zur Folge, dass das langwelligere Licht aus dem Teleskop zur Strahlaufweitung ebenfalls als konvergentes Bündel austritt. Daher liegt die Strahltaille des langwelligeren Lichts nicht mehr im Fokus der Zylinderlinse, sondern vor diesem. Durch die entsprechende Einstellung des Teleskops ist es somit möglich die Strahltaille der Lichtscheibe der Wellenlänge 470 nm exakt auf die Strahltaille der Lichtscheibe der Wellenlänge 391 nm zu legen. Ohne diese Korrektur beträgt die gemessene Brennweitendifferenz für die Wellenlängen 391 nm und 470 nm ca. 500 µm.

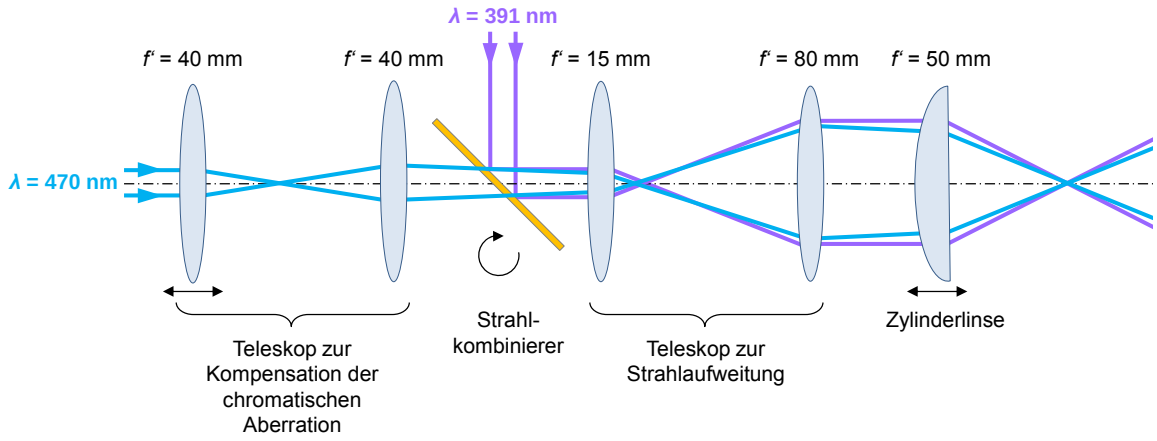


Abbildung 20. Einkopplung zweier Wellenlängen und Kompensation der chromatischen Aberration

Positionierung der Strahltaillen bei Anregung mit zwei Wellenlängen

Zunächst wird nur die Lichtscheibe der Anregungswellenlänge 391 nm betrachtet. Die Positionierung der Strahltaille erfolgt wie in Abschnitt 3.2.1 beschrieben. Dieses Vorgehen definiert die Position der Zylinderlinse für die Zwei-Wellenlängen-Anregung.

Anschließend wird die Lichtscheibe der Anregungswellenlänge 470 nm betrachtet. Aufgrund der chromatischen Aberration – und der eben erfolgten Positionierung der Zylinderlinse für die Anregungswellenlänge 391 nm – befindet sich die Strahltaille der Lichtscheibe der Wellenlänge 470 nm nicht mittig über dem Detektionsobjektiv. Um diese ebenfalls mittig zu positionieren, wird nun die erste Teleskoplinse (Betrachtung in Lichtrichtung) entlang der optischen Achse entsprechend verschoben und dann fixiert.

Als nächstes muss gewährleistet werden, dass beide Lichtscheiben horizontal auf die Kapillare treffen, damit eine Probenebene senkrecht zur Detektionsrichtung beleuchtet werden kann. Dabei gilt es besonderes Augenmerk darauf zu legen, dass sich die

Lichtscheiben an derselben Stelle auf der Detektionsachse (z-Achse) befinden und somit dieselbe Probenebene beleuchten. Für die Grobeinstellung kann das in Abschnitt 3.2.1 beschriebene Verfahren angewandt werden, bei dem der Lichteinfall (bzw. die Fluoreszenz) an der unteren Kapillarkante für beide Wellenlängen beobachtet wird. Durch Rotation des Strahlkombinierers (vgl. Abbildung 20) kann die z-Position der mit der Wellenlänge 391 nm erzeugten Lichtscheibe angepasst werden. Die Feinjustage sollte unter Zuhilfenahme einer fluoreszierenden dreidimensionalen Probe mit kleinen Strukturen erfolgen.

3.2.3 Synchronisierter Hub von Lichtscheibe und Objektiv

Aufgrund der Lichtbrechung beim Übergang verschiedener Medien und den daraus resultierenden unterschiedlichen optischen Weglängen, tritt der sogenannte *Fishtank* Effekt auf: Objekte, die sich in einem anderen Medium befinden als der Betrachter (hier das Mikroskopobjektiv), erscheinen diesem gestaucht oder gestreckt, je nach Verhältnis der Brechungsindizes. Im Falle der Betrachtung eines Objekts durch ein Mikroskop, bedeutet dies, dass der Verfahrweg des Objektivs nicht dem Versatz der Fokusebene in der Probe entspricht. Daraus ergibt sich zum einen, dass die Lichtscheibe bei einer direkten Kopplung dieser mit dem Objektivrevolver bei einer Verschiebung in z-Richtung aus dem Fokus wandert. Zum anderen darf die Verschiebung (der Hub) des Objektivs nicht mit der Fokusverschiebung in der Probe gleichgesetzt werden (vgl. Abbildung 21). Dieser Zusammenhang ist essentiell bei der Aufnahme mehrerer Schichten in dreidimensionalen Proben und deren späterer Verrechnung zu 3D-Bildern.

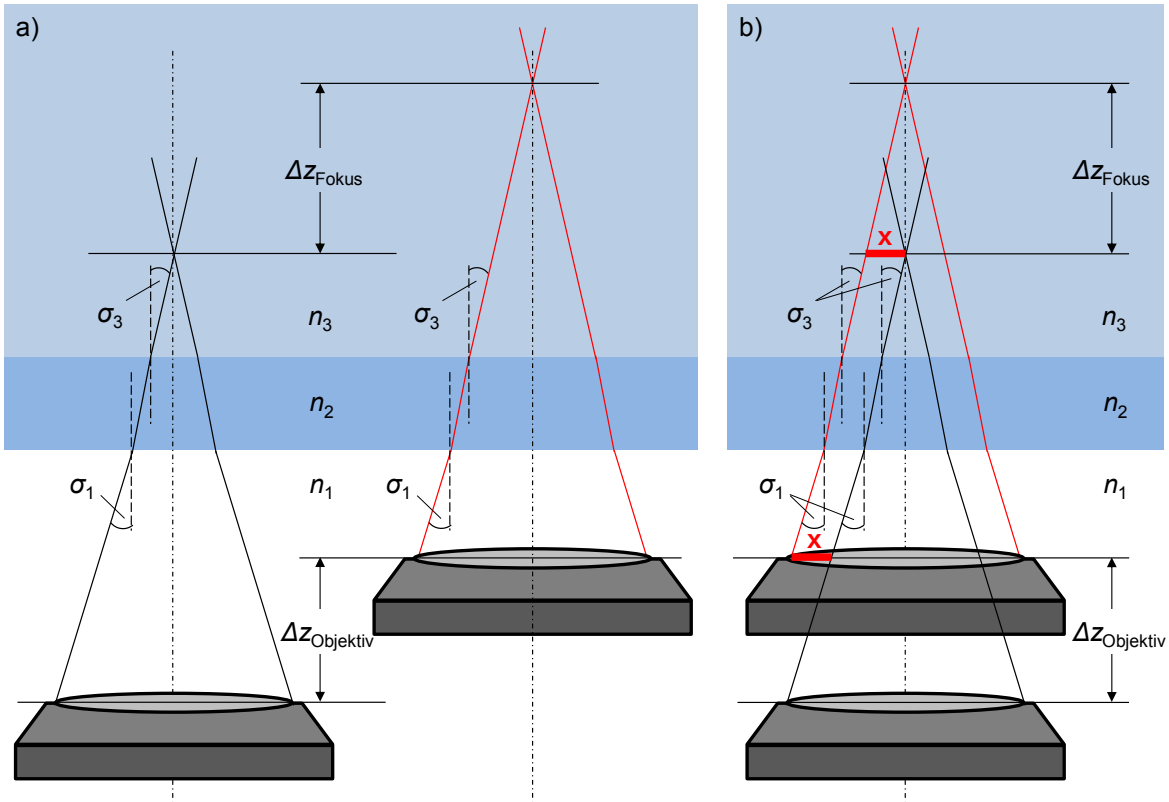


Abbildung 21. Optische Weglängendifferenz aufgrund unterschiedlicher Brechungsindizes. σ_1 ist der Öffnungswinkel des Objektivs, gegeben durch den Brechungsindex n_1 des umgebenden Mediums und der numerischen Apertur des Objektivs. σ_3 ist der Eintrittswinkel in die Probe mit dem Brechungsindex n_3. n_2 ist der Brechungsindex des Probenträgers (z. B. Glaskapillare). a) Übersichtsdarstellung, b) Überlagerte Darstellung zum Verständnis der geometrischen Herleitung der Berechnung des Verhältnisses $\Delta z_{Fokus}/\Delta z_{Objektiv}$

Aus Abbildung 21b lässt sich anhand der numerischen Apertur A_N des Objektivs

$$A_N = n_1 \sin \sigma_1, \qquad (24)$$

des Brechungsgesetzes

$$n_1 \sin \sigma_1 = n_3 \sin \sigma_3 \qquad (25)$$

sowie trigonometrischer Funktionen

$$\tan \sigma_1 = \frac{x}{\Delta z_{Objektiv}} \quad \text{und} \quad \tan \sigma_3 = \frac{x}{\Delta z_{Fokus}} \qquad (26)$$

für das Verhältnis der Fokusverschiebung in der Probe zur Objektivverschiebung folgender Zusammenhang ableiten:

$$\frac{\Delta z_{Fokus}}{\Delta z_{Objektiv}} = \frac{\tan \sigma_1}{\tan \sigma_3} \qquad (27)$$

Für kleine Aperturen mit $\sin\sigma \approx \tan\sigma$ gilt:

$$\frac{\Delta z_{\text{Fokus}}}{\Delta z_{\text{Objektiv}}} \approx \frac{\sin\sigma_1}{\sin\sigma_3} = \frac{n_3}{n_1} \qquad (28)$$

Das Verhältnis ist also abhängig von dem Öffnungswinkel bzw. der numerischen Apertur des verwendeten Objektivs, vom Brechungsindex des Objektiv-umgebenden Mediums (n_1) sowie von dem Brechungsindex der Probe (n_3). In Abbildung 22 ist die Abhängigkeit des Verhältnisses der z-Verschiebung von Fokus zu Objektiv in Abhängigkeit vom Brechungsindex n_3 der Probe für Objektive mit einer numerischen Apertur von 0,15, 0,3 sowie 0,5 in Luft (n_1 = 1) grafisch dargestellt.

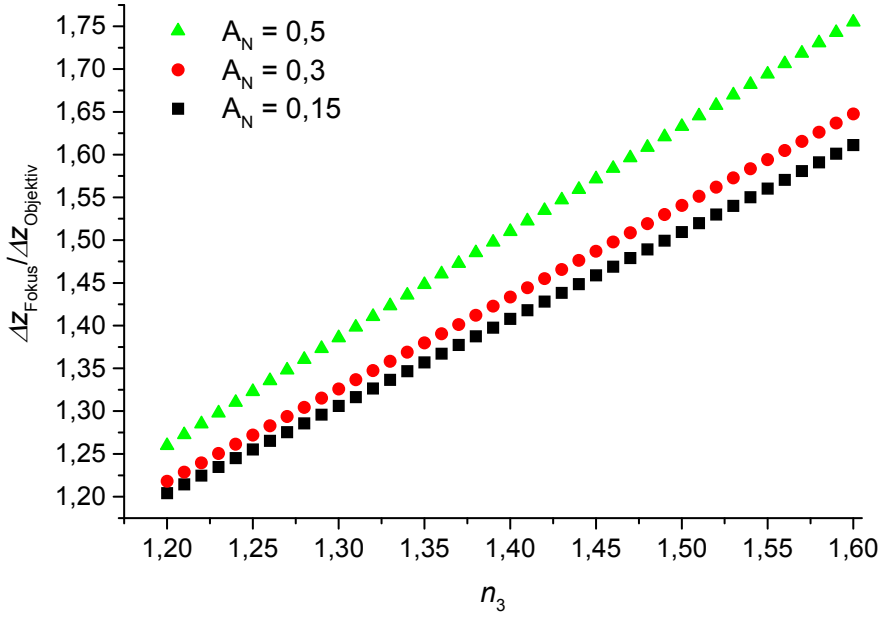


Abbildung 22. Korrekturfaktor $\Delta z_{\text{Fokus}}/\Delta z_{\text{Objektiv}}$ in Abhängigkeit des Brechungsindex n_3 für Objektive mit einer numerischen Apertur von 0,15, 0,3 und 0,5 in Luft (n_1 = 1)

Um diesem Zusammenhang Rechnung zu tragen, ist zwischen Mikrometerschraube und Objektivrevolver eine Umsetzung in Form eines Hebelarmes eingebaut, welche in einer ersten Ausführung für ein Objektiv mit einer numerischen Apertur von 0,3 in Luft und der Fokusebene in Wasser, mit Brechungsindex 1,33, angepasst ist.

Der in Abbildung 23 dargestellte Aufbau enthält eine variable Umsetzung, realisiert indem der am Mikroskop befestigte Stift durch eine Mikrometerschraube verfahren werden kann. Dies ermöglicht die exakte Einstellung der Hebelwirkung anhand der Änderung des Abstandes zwischen Justierschraube und Stift. Somit kann die Verschiebung der Lichtscheibe der Fokusverschiebung für beliebige Objektive und Brechungsindizes angepasst werden.

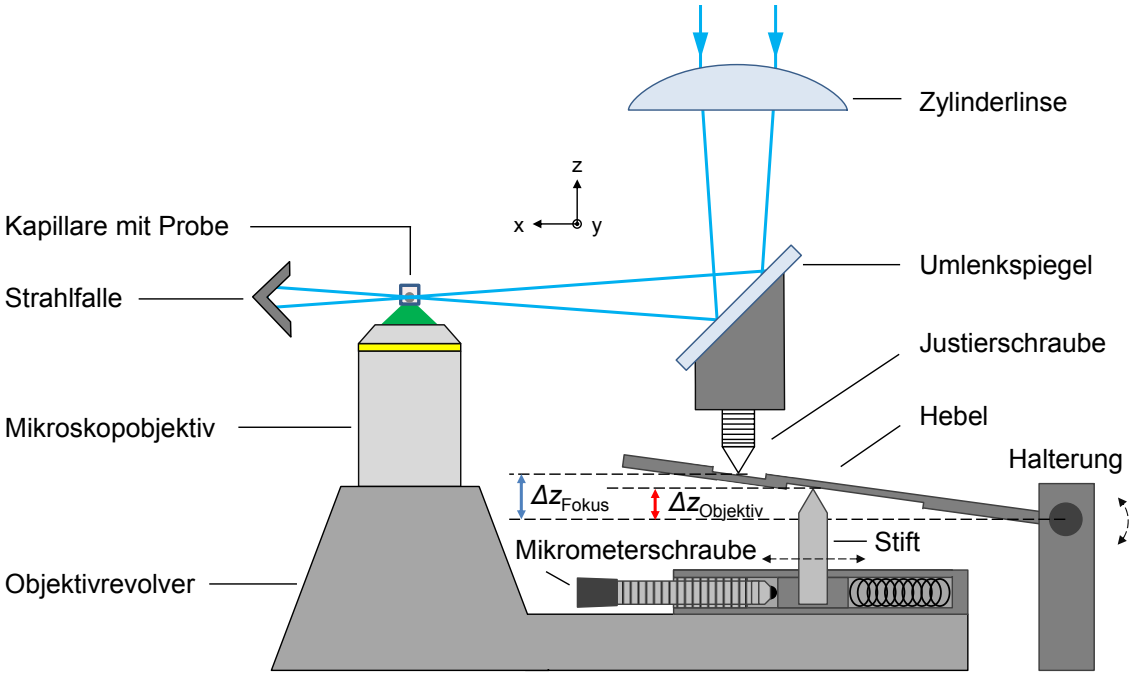


Abbildung 23. Mechanische Lösung zum Ausgleich der unterschiedlichen optischen Weglängen in Medien unterschiedlicher Brechungsindizes

3.3 Modul zum Ratio Imaging im Nanosekundenbereich

Die Grundlage des hier vorgestellten Ratio Imagings ist die räumlich getrennte, simultane Detektion von Fluoreszenz, die durch unterschiedliche Wellenlängen angeregt, jedoch im gleichen Spektralbereich emittiert wird. Die Anregung mit zwei Wellenlängen erfolgt wie in Abschnitt 3.2.2 beschrieben mit zwei gepulsten Laserdioden. Die Pulsfrequenz der beiden Laserdioden beträgt jeweils 40 MHz, wobei die Pulse zeitlich um 12,5 ns gegeneinander verschoben sind.

Das Detektionsmodul besteht im Wesentlichen aus einem System zur Strahlteilung (Dual-View), einem bildübertragenden Glasfaserbündel und einer im Picosekundenbereich schaltbaren CCD-Kamera mit Bildverstärker. Abbildung 24 zeigt den Gesamtaufbau des Systems am Mikroskop inklusive des SPIM-Moduls mit Zwei-Wellenlängen-Anregung. Die einzelnen Komponenten der Detektionseinheit werden in den nachfolgenden Abschnitten im Detail beschrieben.

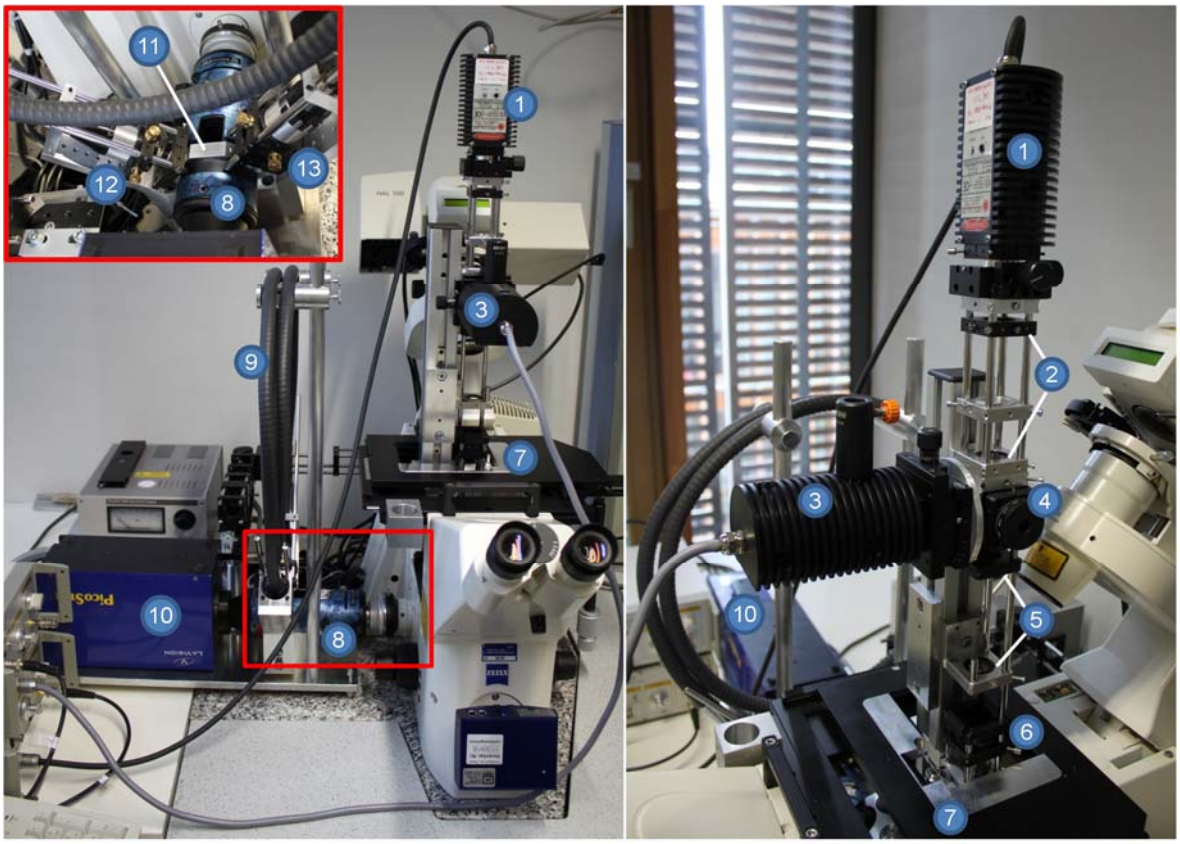


Abbildung 24. Aufbau zum Ratio Imaging im Nanosekundenbereich mit Fluoreszenzanregung mittels Lichtscheibe. 1) Laserdiode mit Emissionswellenlänge 470 nm, 2) Teleskop zum Ausgleich der chromatischen Aberration, 3) Laserdiode mit Emissionswellenlänge 391 nm, 4) dichroitischer Strahlkombinierer, 5) Teleskop zur Aufweitung des Laserstrahls, 6) Zylinderlinse und nachfolgender Umlenkspiegel, 7) Probenhalterung, 8) Dual-View, 9) bildübertragendes Glasfaserbündel, 10) Bildverstärker und Kamera, 11) Einschub zur Halterung von Spiegeln und Strahlteilerwürfel, 12) Einkopplung eines Teilbündels in das Glasfaserbündel, 13) Wiedereinkopplung des verzögerten Bildes in das System

3.3.1 Zwei-Kanal-Detektion

Für die Zwei-Kanal-Detektion wird zwischen dem Seitenanschluss des Mikroskops und der Kamera ein Dual-View Modul (Optical Insights, Tucson, Arizona, USA) eingesetzt. Das kommerziell erhältliche Modul (schematisch dargestellt in Abbildung 25) ermöglicht die zeitgleiche Aufnahme einer vom Mikroskop erzeugten Abbildung (z. B. Fluoreszenzbild) unter unterschiedlichen Bedingungen – z. B. durch den Einsatz verschiedener Spektral- oder Polarisationsfilter – auf jeweils einer Sensorhälfte einer Kamera.

Eine einstellbare Feldblende (Spalt) am Ort der vom Mikroskop erzeugten Abbildung der Probe definiert die Bildbreite. Diese wird in der Regel so gewählt, dass sie der halben Breite des Kamerasensors entspricht. Es folgt ein telezentrisches Linsensystem, welches die vom Mikroskop erzeugte Abbildung im Maßstab 1 : 1 auf den Kamerasensor abbildet. In dem Linsensystem befindet sich ein herausnehmbarer Einschub, der einen Strahlteiler, einen Spiegel sowie zwei Halterungen für Filter enthält. Im Korpus des Moduls sind

außerdem zwei Justierspiegel montiert, die der lateralen Justage der Abbildungen auf dem Kamerasensor dienen.

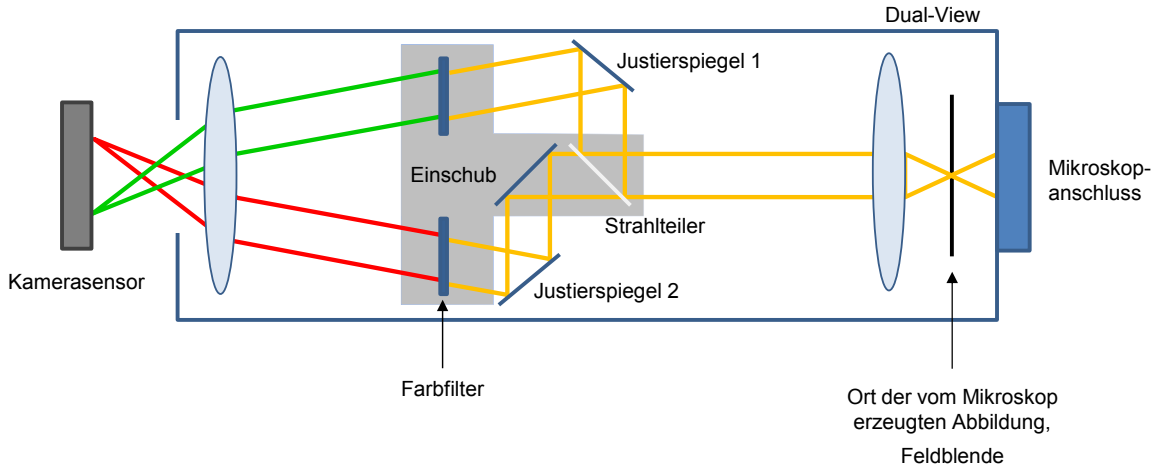


Abbildung 25. Schematische Darstellung eines kommerziell erhältlichen Dual-View Moduls am Beispiel eines spektral getrennten Fluoreszenzsignals

Während sich die Art der Fluoreszenzdetektion eines handelsüblichen Dual-View Moduls auf die Unterscheidung nach den Emissionseigenschaften einer Probe bezieht, soll die Fluoreszenz des im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Redoxsensors nach der Anregungswellenlänge unterschieden werden. Um dies zu realisieren wurde ein spezieller Einschub konstruiert (siehe Abbildung 26).

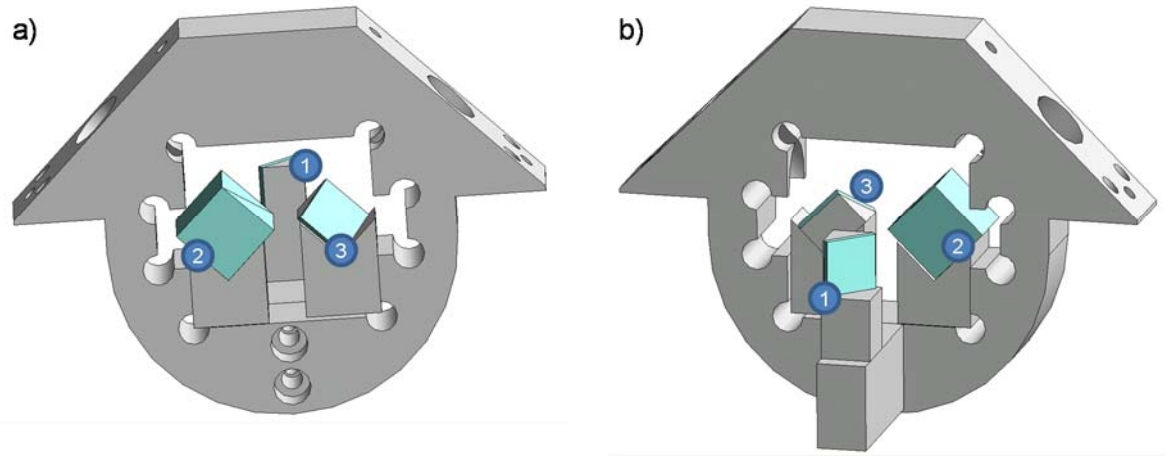


Abbildung 26. Einschub für das Dual-View Modul mit 1) Umlenkspiegel, 2) Strahlteilerwürfel, 3) Einkoppelspiegel. a) Frontansicht (der Kamera zugewandte Seite), b) Rückansicht (dem Mikroskop zugewandte Seite)

Der Lichtweg im Dual-View Modul mit speziell gefertigtem Einschub ist in Abbildung 27 dargestellt. Die Feldblende, der Justierspiegel 1 sowie das telezentrische Linsensystem im Dual-View Modul werden weiterhin genutzt.

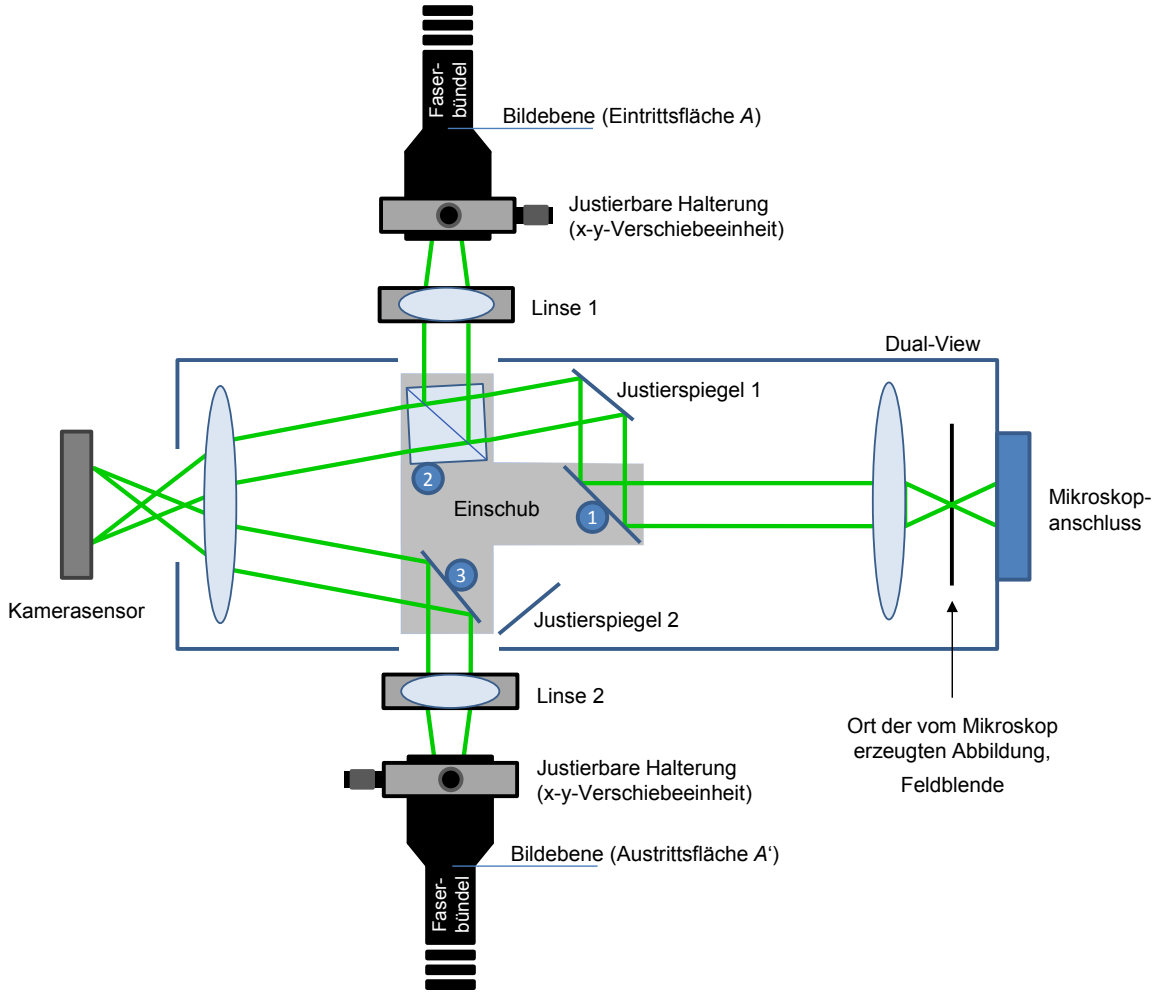


Abbildung 27. Abbildungsstrahlengang im Dual-View Modul mit Einschub zur Strahlaus- und Wiedereinkopplung mit Umlenkspiegel (1), Strahlteilerwürfel (2) und Einkoppelspiegel (3)

Das von der Feldblende auf die halbe Breite des Kamerasensors beschnittene Strahlenbündel wird über zwei Spiegel auf einen Strahlteilerwürfel (2) gelenkt. Ein Teilbündel (50 %) wird transmittiert und auf die linke Sensorhälfte der Kamera abgebildet. Das andere Teilbündel hingegen wird reflektiert und durch die nachfolgende Linse 1 (f' = 40 mm) auf die Eintrittsfläche *A* des bildübertragenden Glasfaserbündels abgebildet. Nach dem Durchlaufen des Glasfaserbündels wird das Teilbündel mittels Linse 2 (f' = 40 mm) wieder in das Dual-View eingekoppelt, von Spiegel (3) umgelenkt und auf die rechte Sensorhälfte der Kamera abgebildet. Aufgrund der Bauform des Dual-View Moduls wird das Licht unter einem Winkel von 45° zur Einfallsebene aus diesem heraus- und wieder zurückgeführt (vgl. Bildausschnitt in Abbildung 24 und Abbildung 26).

3.3.2 Bildverzögerung mittels bildübertragendem Glasfaserbündel

Zur Bildverzögerung dient ein speziell konfektioniertes bildübertragendes Glasfaserbündel (Schott North America, Inc., Southbridge, Massachusetts, USA) mit einer numerischen Apertur von 0,6. Es besteht aus geordneten Multifasern, welche wiederum aus 6 × 6 geordneten Einzelfasern aufgebaut sind. Eine solche Einzelfaser mit einem Durchmesser von 10 µm stellt bei der Bildübertragung ein Pixel dar. Die optisch nutzbare Fläche des Faserbündels beträgt laut Konfektionierung 5,5 × 5,5 mm². Tatsächlich ist diese Fläche mit 5,3 × 5,5 mm² jedoch nicht exakt quadratisch. Abbildung 28 zeigt die Endfläche des verwendeten Faserbündels. Sie besteht aus 83 × 88 Multifasern; dies entspricht insgesamt 262.944 Einzelfasern (Pixeln). In der vergrößerten Darstellung ist eine der Fehlstellen markiert, an welcher eine Multifaser komplett ausfällt. Bezogen auf die Anzahl der im Faserbündel verarbeiteten Multifasern belaufen sich die Fehlstellen durch ganz oder teilweise ausfallende Multifasern auf ca. 0,5 %.

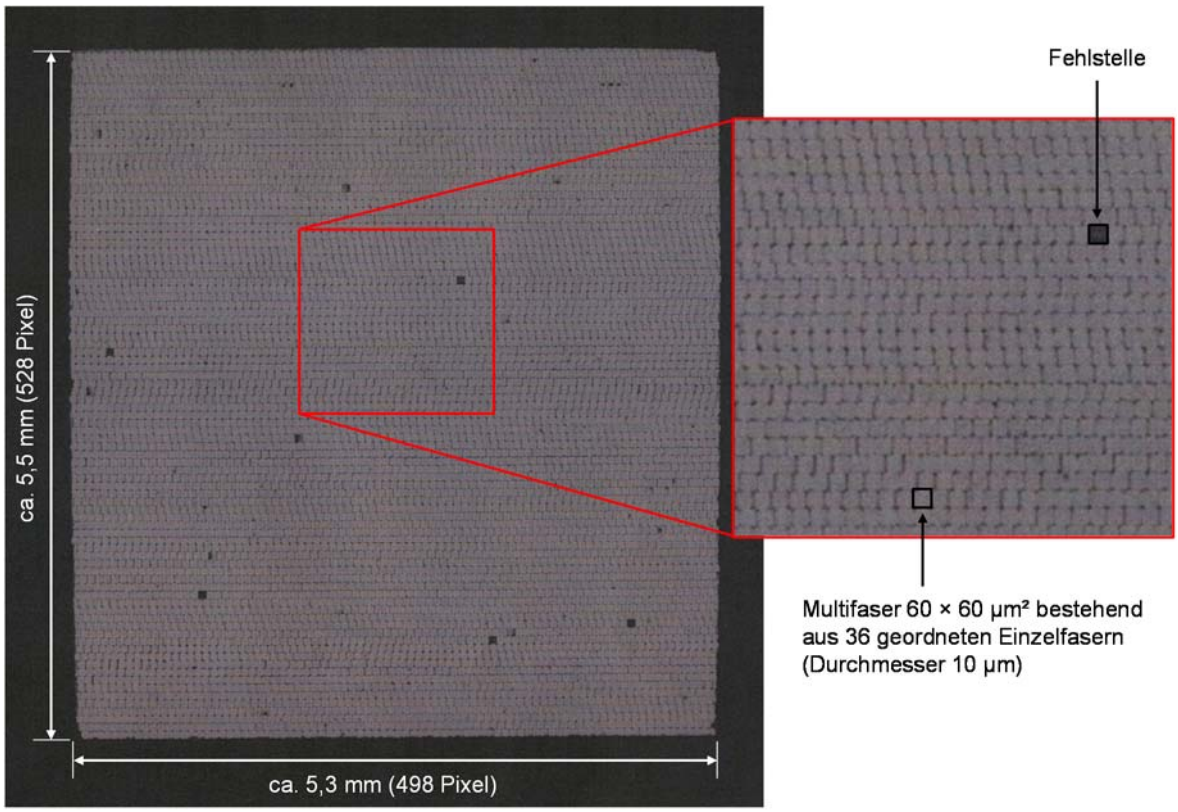


Abbildung 28. Vom Hersteller zur Verfügung gestelltes Bild einer Endfläche des für das Ratio Imaging genutzten, bildübertragenden Glasfaserbündels. In der vergrößerten Ansicht sind exemplarisch eine Multifaser und eine Fehlstelle (Multifaser, die kein Licht transmittiert) markiert.

Um zu erreichen, dass beide Fluoreszenzbilder (erzeugt bei zwei unterschiedlichen Anregungswellenlängen) zur gleichen Zeit auf je einer Kamerahälfte detektiert werden können, muss die Bildverzögerung durch das Faserbündel genau so groß sein wie der

Pulsversatz der anregenden Laserdioden. Dieser beträgt – aufgrund der Pulsfrequenz von 40 MHz und dem daraus resultierenden Pulsabstand von 25 ns – 12,5 ns.

Anhand dieser Vorgabe wird die Länge des Glasfaserbündels konfektioniert: Mit einem Brechungsindex des Kernmaterials der Glasfasern von 1,62 ergibt sich die Geschwindigkeit $1{,}85 \times 10^8$ m/s, mit der das Licht das Faserbündel durchläuft. Durch Multiplikation dieser Geschwindigkeit mit der gewünschten Verzögerung von 12,5 ns, wird die notwendige Länge des Faserbündels von 2,3 m errechnet.

Die Transmission des geordneten Glasfaserbündels ist sowohl abhängig von dessen Länge als auch von der Wellenlänge. Für das in dieser Arbeit verwendete Faserbündel liegt die Transmission laut Herstellerangaben im Wellenlängenbereich von 500 bis 600 nm zwischen 30 und 40 %. Die begrenzte Transmission des Faserbündels hat letztlich eine Verringerung der vom Kamerasensor aufgenommenen Fluoreszenzintensität des verzögerten Bildes gegenüber dem direkt transmittierten zur Folge. Dies wiederum wirkt sich auf die Größe des Intensitätsverhältnisses der beiden Bilder zueinander aus. Um den Einfluss der begrenzten Transmission auf das Intensitätsverhältnis zu kompensieren, wird die Transmission des Faserbündels quantifiziert. Die Leistungen der Laserdioden werden dann so angepasst, dass das später verzögerte – und dadurch abgeschwächte – Fluoreszenzbild bei einer entsprechend höheren Anregungsleistung erzeugt wird.

Zur Bestimmung der Transmission wird eine mit Rhodamin 6G (25 µM in bidestilliertem Wasser) gefüllte Kapillare mit einer Lichtscheibe (Wellenlänge 470 nm) beleuchtet und sowohl das direkt transmittierte als auch das durch das Glasfaserbündel verzögerte Fluoreszenzbild aufgenommen. Die Fluoreszenzdetektion erfolgt für Wellenlängen ≥ 515 nm. Anschließend werden für jeweils die gleichen Bildausschnitte mithilfe der Software ImageJ die mittleren Grauwerte (Fluoreszenzintensitäten) der Pixel bestimmt und ins Verhältnis gesetzt. Unter Zuhilfenahme dieses Faktors, lassen sich – über die Anpassung der Diodenleistungen – die Transmissionsunterschiede der Lichtwege des direkt transmittierten und des verzögerten Bildes ausgleichen.

3.3.3 Justage der Abbildungen auf dem Kamerasensor

Entscheidend für das Ratio Imaging, bei dem das direkt transmittierte Bild und das verzögerte Bild Pixel für Pixel ins Verhältnis gesetzt werden, sind scharfe, gleich große und gleich ausgerichtete Abbildungen auf beiden Kamerahälften. Um dies zu erreichen, hat es sich als hilfreich erwiesen, die Abbildungen zunächst unter Einsatz des kommerziellen Einschubs des Dual-View Moduls auszurichten (vgl. Abbildung 25). Als

Probe dient ein Objektträger mit Rastermarkierung (Zubehör zur Justage des Dual-View Moduls) unter Durchlichtbeleuchtung.

Abbildung 29a zeigt eine mögliche Ausgangssituation. Die beiden Bilder werden höhenversetzt und schräg auf dem Kamerasensor abgebildet. Um eine optimale Abbildung beider Bilder zu erreichen (siehe Abbildung 29b) werden zunächst das Dual-View Modul und die Kamera zueinander ausgerichtet (Rotation um die optische Achse). Dann wird die gewünschte Bildposition in vertikaler und horizontaler Richtung mithilfe der im Dual-View Modul montierten Justierspiegel eingestellt.

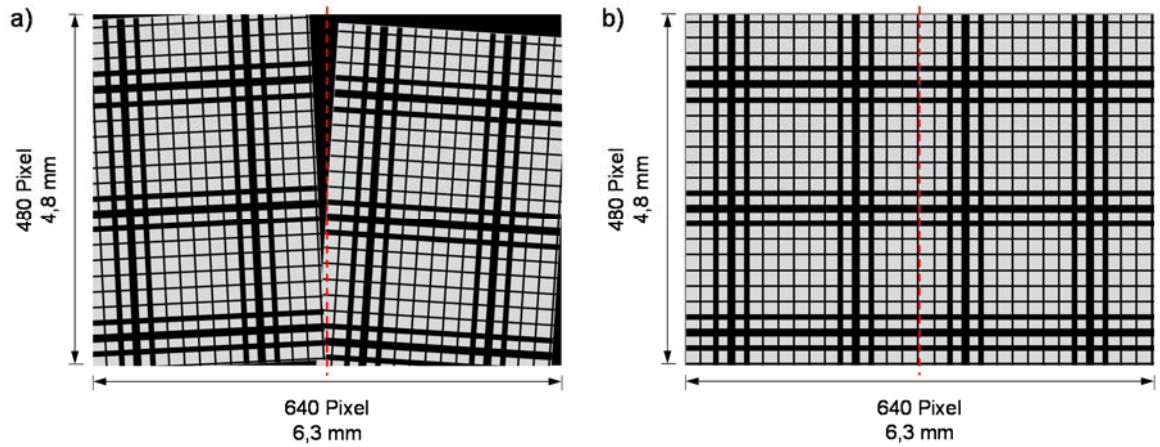


Abbildung 29. Justage der beiden Bilder auf dem Kamerasensor mit dem Dual-View Modul mit kommerziellem Einschub. a) Mögliche Ausgangssituation: Die Bilder sind dejustiert. b) Optimale Justage

Diese Vorgehensweise ist in erster Linie zur Ausrichtung der linken Abbildung auf dem Kamerasensor wichtig. Wird der kommerzielle Einschub nun durch den Eigenbau ersetzt, so muss für die linke (direkt transmittierte) Abbildung auf den Kamerasensor gegebenenfalls nur noch eine Feinjustage mittels Justierspiegel 1 vorgenommen werden. Außerdem erleichtert diese Vorgehensweise beim Aufbau des Einschubs die Einstellung des Rotationswinkels der Halterung des Strahlteilerwürfels.

Abbildungsschärfe und Größe des verzögerten Bildes werden von den Linsen 1 und 2 bestimmt (vgl. Abbildung 27). Voraussetzung ist zunächst die scharfe Abbildung der Austrittsfläche *A*‘ des Faserbündels auf die rechte Sensorhälfte durch entsprechendes Positionieren der Linse 2 und des Faserkopfes mit der Austrittsfläche *A*‘. Der Abbildungsmaßstab, bei dem die Abbildungsbreite der halben Sensorbreite entspricht, beträgt etwa 1 : 1,65. Dies bedeutet, die Austrittsfläche des Faserbündels wird verkleinert auf den Kamerasensor abgebildet (vgl. Abbildung 30).

Um dennoch gleichgroße Abbildungen der Probe auf dem Kamerasensor zu erhalten, wird diese von Linse 1 – in Bezug auf das direkt transmittierte Bild – vergrößert auf die

Eintrittsfläche *A* des Faserbündels abgebildet. Hieraus ergibt sich der Vorteil, dass kleinere Strukturen in der Probe zunächst besser aufgelöst werden.

Die Schärfe und die Größe des zu verzögernden Bildes der Probe werden eingestellt, indem zum einen der Abstand zwischen Linse 1 und der Eintrittsfläche *A* optimiert wird und zum anderen die beiden Elemente als Ganzes entlang der optischen Achse positioniert werden.

Um die rechteckige Eintrittsfläche *A* des Faserbündels optimal auszunutzen und die Bildgröße und -ausrichtung auf dem Kamerasensor leichter einzustellen, sollte die Eintrittsfläche *A* die gleiche Orientierung aufweisen wie das Bild. Dieses ist aufgrund der Positionierung des Strahlteilerwürfels zur Lichtauskopplung unter einem Winkel von 45° (vgl. Abbildung 26), ebenfalls um 45° um die optische Achse gedreht.

Die beiden Köpfe des Faserbündels sind jeweils in einer x-y-Verschiebeeinheit justierbar gehaltert, um einen möglichen Höhenversatz der beiden Abbildungen auf dem Kamerasensor ausgleichen zu können. Die Neigung der verzögerten Abbildung (rechte Sensorhälfte, vgl. Abbildung 30a) wird durch entsprechende Rotation der frei drehbaren Austrittsfläche *A*‘ des Faserbündels reguliert.

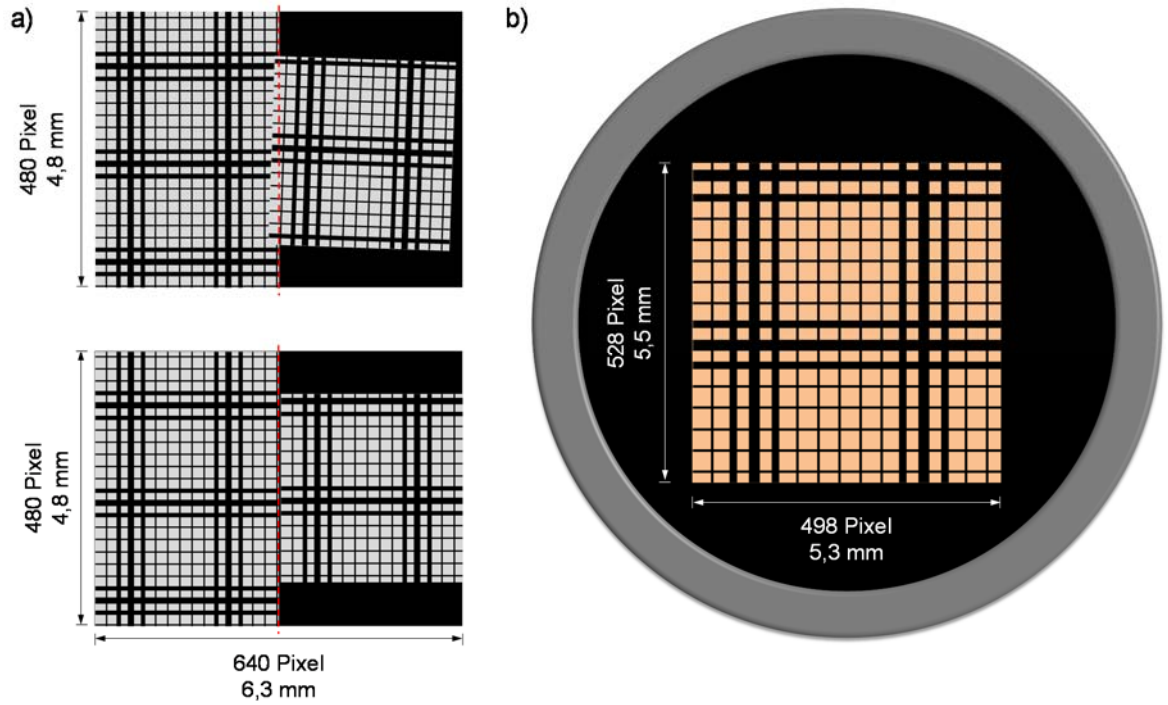


Abbildung 30. a) Justage des direkt auf den Kamerasensor transmittierten und des mittels Glasfaserbündel verzögerten Bildes bei Verwendung des Dual-View Moduls mit Einschub zur Strahlaus- und Wiedereinkopplung, b) Draufsicht: Kopf des bildübertragenden Glasfaserbündels mit optisch nutzbarer Endfläche (5,3 mm × 5,5 mm)

3.3.4 Gesamtaufbau und Funktionsweise

Das komplette System zum Ratio Imaging im Nanosekundenbereich mit Lichtscheibenanregung durch zwei unterschiedliche Wellenlängen ist in Abbildung 31 dargestellt.

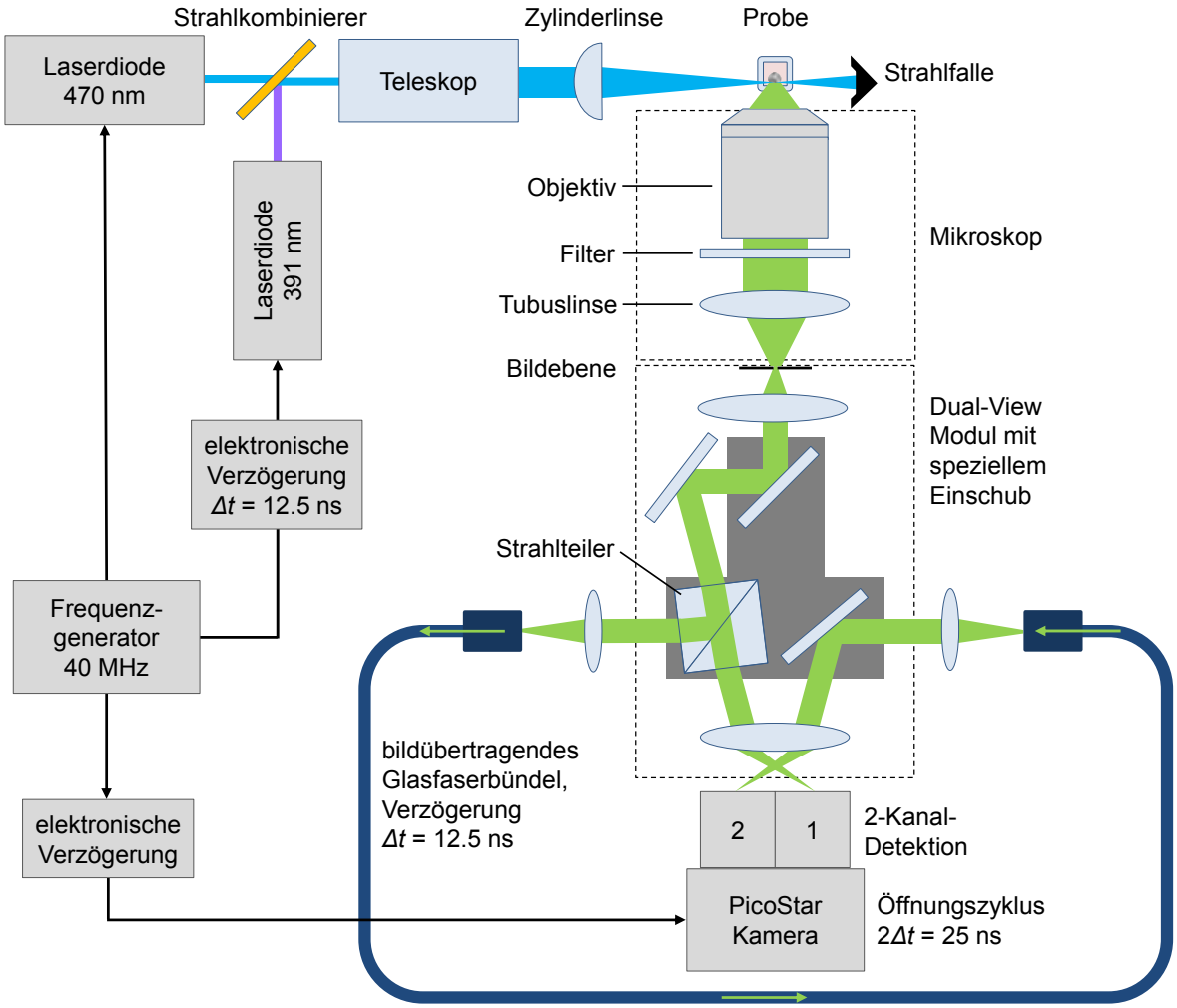


Abbildung 31. Schema des Aufbaus zum Ratio Imaging im Nanosekundenbereich

Die Fluoreszenzanregung erfolgt mit zwei gepulsten Laserdioden, die Licht der Wellenlängen 391 nm und 470 nm mit Pulsbreiten < 70 ps bzw. < 90 ps FWHM emittieren. Die Pulsfrequenzen liegen bei 40 MHz, d. h. beide Laserdioden senden alle 25 ns einen Lichtpuls aus. Der Treiber der 470 nm-Diode fungiert als Master-Pulsgenerator, der sowohl den Treiber der zweiten Laserdiode als auch die Verschlusszeit der Kamera steuert. Eine elektronische Verzögerung sorgt für einen gegenseitigen Versatz der Pulse der beiden Laserdioden um Δt = 12,5 ns. Die Kamera öffnet in zeitlichen Abständen von $2\Delta t$ = 25 ns für jeweils 1 ns. Die Einstellungen sind so gewählt, dass die Kamera zum Zeitpunkt $t + \Delta t$, wenn das durch die 391 nm-Diode angeregte Signal auf der Sensorhälfte 1 und das durch die 470 nm-Diode angeregte

Signal auf der Sensorhälfte 2 der Kamera ankommt, öffnet. Zum Zeitpunkt $t + 2\Delta t$ hingegen, wenn das durch die 470 nm-Diode angeregte Signal auf der Sensorhälfte 1 und das durch die 391 nm-Diode angeregte Signal auf der Sensorhälfte 2 ankommt, ist die Kamera geschlossen. Auf diese Art und Weise werden die Signale zur Erzeugung eines Fluoreszenzbildes für eine beliebige Dauer, in der Regel 1 s, integriert. Zur Verdeutlichung der Funktionsweise ist die Signaldetektion in Abbildung 32 schematisch dargestellt, wobei die grüne Markierung anzeigt, zu welchen Zeitpunkten die Kamera öffnet. 470 nm und 391 nm bezeichnen die Anregungswellenlängen, bei denen die Fluoreszenz auf der jeweiligen Sensorhälfte detektiert wird.

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

Abbildung 32. Signaldetektion beim Ratio Imaging. 470 nm und 391 nm bezeichnen die Anregungswellenlängen, bei denen die Fluoreszenz auf der jeweiligen Sensorhälfte detektiert wird. Die grün markierten Flächen kennzeichnen die Öffnungszeiten der Kamera.

Zur Aufnahme der Fluoreszenzbilder wird das Kamerasystem PicoStar HR mit der Software DaVis 6.2.2 (LaVision, Göttingen) verwendet. Die im Picosekundenbereich schaltbare CCD-Kamera mit Bildverstärker besitzt einen Sensor der Größe 640 × 480 Pixel mit einer Pixelgröße von 9,9 µm × 9,9 µm (Dynamikbereich 12 Bit monochrom). Die Kamera liefert Grauwertbilder, die zur Weiterverarbeitung (Berechnung der mittleren Verhältniswerte oder Erstellung von Ratio-Bildern) als ASCII-Dateien gespeichert werden.

Abbildung 33 zeigt schematisch die beim Ratio Imaging eingesetzten elektronischen Komponenten sowie die Signalwege durch Koaxialkabel bzw. in Luft und Glas.

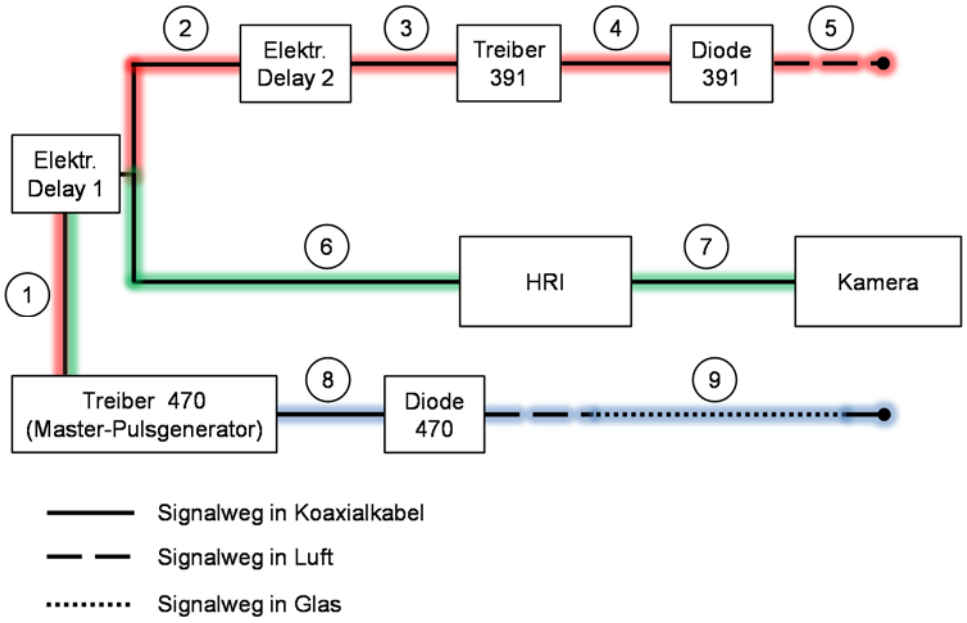


Abbildung 33. Schematische Darstellung der für das Ratio Imaging eingesetzten elektronischen Komponenten und Kabel bzw. optischen Wege. Weglängen: 1) 1,5 m, 2) 2 m, 3) 1 m, 4) 1 m, 5) ca. 1 m, 6) 4 m, 7) 1,5 m, 8) 1 m, 9) ca. 1,35 m in Luft; 2,3 m Glasfaserbündel. Die Gerätetypen und Hersteller sind in Tabelle 5 aufgelistet.

Zur zeitgleichen Detektion des direkten und des durch das Glasfaserbündel verzögerten Fluoreszenzbildes ist es notwendig, die einzelnen Signalwege zu betrachten und deren Längen aufeinander abzustimmen sowie die elektronischen Signalverzögerer entsprechend einzustellen. Der Treiber der 470 nm-Diode, im Folgenden als Treiber 470 bezeichnet, fungiert wie bereits erwähnt als Master-Pulsgenerator mit einer Frequenz von 40 MHz. Diese Impulse werden mittels eines Koaxialkabels der Länge 1,5 m (1) an das elektronische Delay 1 übertragen, welches das Signal um 13,7 ns verzögert (Einstellung erfolgt mittels der Software DaVis 6.2.2 (LaVision, Göttingen). Über einen T-Verzweiger wird das Signal durch ein Koaxialkabel der Länge 2 m (2) an das elektronische Delay 2 und durch ein Koaxialkabel der Länge 4 m an den HRI (High Rate Imager) übergeben. Die durch das Delay 2 verursachte Verzögerung wird manuell auf 6 ns eingestellt. Ein weiteres Koaxialkabel der Länge 1 m (3) überträgt das Signal an den Treiber der 391 nm-Diode, welcher über ein Kabel der Länge 1 m (4) mit der Diode verbunden ist. Der folgende Signalweg (5) bezeichnet den Lichtweg des Anregungslichts der 391 nm-Diode sowie den Lichtweg der Fluoreszenz von der Probe durch das Mikroskop, das Dual-View und den Bildverstärker bis zur Sensorfläche der Kamera. Diese Strecke beträgt ca. 1 m. Das Kabel, welches die Kamera mit dem HRI (*High Rate Imager*) verbindet ist 1,5 m lang. Die 470 nm-Diode wird über ein 1 m langes Kabel (8) von dem Treiber 470 angesteuert. Der mit (9) gekennzeichnete Lichtweg schließt den Weg des Anregungslichts zur Probe und den Weg des zu detektierenden Fluoreszenzlichts durch das Mikroskop, das Dual-

View, das 2,3 m lange Glasfaserbündel und den Bildverstärker bis zur Sensorfläche der Kamera ein. Die Strecke (9) exklusive dem Weg durch das Glasfaserbündel beträgt ca. 1,35 m. Bei einer angenommenen Signalgeschwindigkeit im Koaxialkabel von 2×10^8 m/s, einer Lichtgeschwindigkeit in Luft von $2{,}99 \times 10^8$ m/s und einer Lichtgeschwindigkeit im Glasfaserbündel von $1{,}85 \times 10^8$ m/s ergibt sich für den roten sowie den grün markierten Signalweg eine Dauer von ca. 50 ns für die Signalübertragung. Dies bedeutet, dass das durch die 391 nm-Diode angeregte Fluoreszenzsignal nach 50 ns auf dem Kamerasensor ankommt, und dass die Kamera zu diesem Zeitpunkt, also 50 ns nach der Puls-Erzeugung des Treibers 470, das erste Mal öffnet. Für den blau markierten Signalweg ergibt sich eine Signalübertragungsdauer von ca. 25 ns. Das erste Bild wird also zum Zeitpunkt $t = 50$ ns aufgenommen. Im weiteren Verlauf öffnet die Kamera, gesteuert durch den Masterpulsgenerator, der eine Pulsfrequenz von 40 MHz erzeugt, alle 25 ns, d. h. es werden innerhalb der Messzeit von einer Sekunde 4×10^7 Bilder integriert. Aufgrund der gerätetechnisch begrenzten maximalen Öffnungszeit der Kamera von 1 ns, wird das Fluoreszenzsignal jeweils nur innerhalb der ersten Nanosekunde nach seiner Anregung aufgenommen, d. h. bei einer angenommenen Fluoreszenzlebensdauer von ca. 3 ns werden nur 28 % des Signals detektiert.

Sämtliche im Ratio Imaging Modul eingesetzten elektronischen Komponenten sind mit Geräte- und Firmenbezeichnung in Tabelle 5 aufgelistet.

Tabelle 5. Auflistung der für das Ratio Imaging eingesetzten Geräte mit Firmenbezeichnungen

Gerät	Gerätebezeichnung	Firma
Treiber 470	PDL800-B	PicoQuant GmbH, Berlin
Treiber 391	PDL800-B	PicoQuant GmbH, Berlin
Diode 391	LDH-C-400	PicoQuant GmbH, Berlin
Diode 470	LDH-P-C-470	PicoQuant GmbH, Berlin
Elektr. Delay 1	Precision programmable 50 Ω delay line, PS ps-DGU	LaVision, Göttingen
Elektr. Delay 2	50 Ω delay	ORTEC Advanced Measurement Technology, Inc, Oak Ridge, Tennessee, USA
HRI	High Rate Imager PS HRI	LaVision, Göttingen
Kamera	PicoStar HR	LaVision, Göttingen

3.3.5 Darstellung von Änderungen des Redoxgleichgewichts

Die Kamera liefert ein Bild, das auf einer Hälfte (rechts) das Fluoreszenzbild der Probe bei der Anregungswellenlänge 470 nm und auf der anderen Hälfte (links) das Fluoreszenzbild der Probe bei der Anregungswellenlänge 391 nm zeigt.

In dieser Arbeit werden zwei Arten der Darstellung von Änderungen des Redoxgleichgewichts verwendet. Zum einen erfolgt die Darstellung in Form von Ratio-Bildern, indem die durch die beiden Wellenlängen erzeugten Fluoreszenzbilder Pixel für Pixel durcheinander dividiert werden. Hierfür wird ein eigenes, in der Software Mathcad 2001 Professional (PTC, Needham, Massachusetts, USA) geschriebenes Programm genutzt.

Zum anderen kommt ein weniger aufwendiges Verfahren zum Einsatz, bei dem das Intensitätsverhältnis nicht Pixel für Pixel, sondern lediglich aus den Mittelwerten eines ausgewählten Bereichs bestimmt wird. Hierfür wird mithilfe der Software ImageJ der gewünschte Bereich im Fluoreszenzbild ausgewählt. Über den Befehl *Measure* kann der Mittelwert der in diesem Bereich enthaltenen Grauwerte angezeigt werden. Dieser Vorgang wird jeweils für beide Fluoreszenzbilder (erzeugt bei den zwei unterschiedlichen Anregungswellenlängen) durchgeführt. Dann werden die Mittelwerte ins Verhältnis gesetzt. Wichtig ist bei dieser Vorgehensweise in beiden Bildern jeweils den gleichen Bereich zur Mittelwertbestimmung heranzuziehen.

Erstellung von Ratio-Bildern

Abbildung 34 zeigt das Flussdiagramm zur Beschreibung der Berechnung eines Ratio-Bildes; das zugehörige Mathcad-Programm ist im Anhang zu finden.

Zunächst wird das von der Kamera aufgenommene Bild als .txt-Datei eingelesen. Um die beiden Fluoreszenzbilder, die diese Aufnahme enthält, ins Verhältnis zu setzen, ist die Erstellung zweier gleich großer Submatrizen notwendig, von welchen eine das bei der Wellenlänge 470 nm erzeugte Fluoreszenzbild und die andere das bei der Wellenlänge 391 nm erzeugte Fluoreszenzbild enthält. Dabei ist darauf zu achten, dass sich die Bildinformationen in beiden Submatrizen exakt an der gleichen Stelle befinden. Anschließend wird die das bei 391 nm erzeugte Fluoreszenzbild enthaltende Submatrix durch die das bei 470 nm erzeugte Fluoreszenzbild enthaltende geteilt. Die Verhältnisbildung betrifft somit nicht nur diejenigen Pixel, die Bildinformation enthalten, sondern auch Hintergrundpixel. Zwar sind deren Intensitätswerte im Vergleich zu den informationstragenden Pixeln um ein Vielfaches geringer, jedoch entstehen bei der Verhältnisbildung Werte, die im gleichen Bereich wie die Verhältniswerte der Fluoreszenz liegen können. Dies führt dazu, dass im Ratio-Bild nicht mehr zwischen Bild- und

Hintergrundinformation unterschieden werden kann. Daher ist es notwendig, die Hintergrundpixel vor der Erstellung des Ratio-Bildes zu identifizieren.

Eine Möglichkeit hierfür ist die Schwellwerterfassung mit der Software ImageJ. Dabei wird ein bestimmter Pixelwert als Grenzwert festgelegt. Alle Werte, die kleiner als dieser Grenzwert sind, werden im Folgenden als Hintergrundpixel betrachtet und gleich Null gesetzt. Mittels des Mathcad-Programms wird dann ein Binärbild erzeugt, indem alle Pixelwerte, die größer sind als der Grenzwert – d. h. alle Pixel die laut Schwellwerterfassung Bildinformation enthalten – gleich Eins gesetzt werden. Alle Pixelwerte, die kleiner sind als der Grenzwert, werden gleich Null gesetzt.

Üblicherweise wird für die Erstellung des Binärbildes die Submatrix, die das bei 470 nm erzeugte Fluoreszenzbild enthält, genutzt, da bei diesem Bild das Signal-Rausch-Verhältnis größer ist. Durch Multiplikation des auf diese Weise erstellten Binärbildes mit dem zuvor errechneten Ratio-Bild, erhält man eine Ergebnismatrix, welche ausschließlich die Verhältniswerte der bildinformationstragenden Pixel enthält.

Die Ergebnismatrix wird als ASCII-Datei abgespeichert. Mithilfe der Software ImageJ kann diese Datei dann als Falschfarbenbild dargestellt werden. Hierfür wird die Wertetabelle (LUT) *Fire* verwendet.

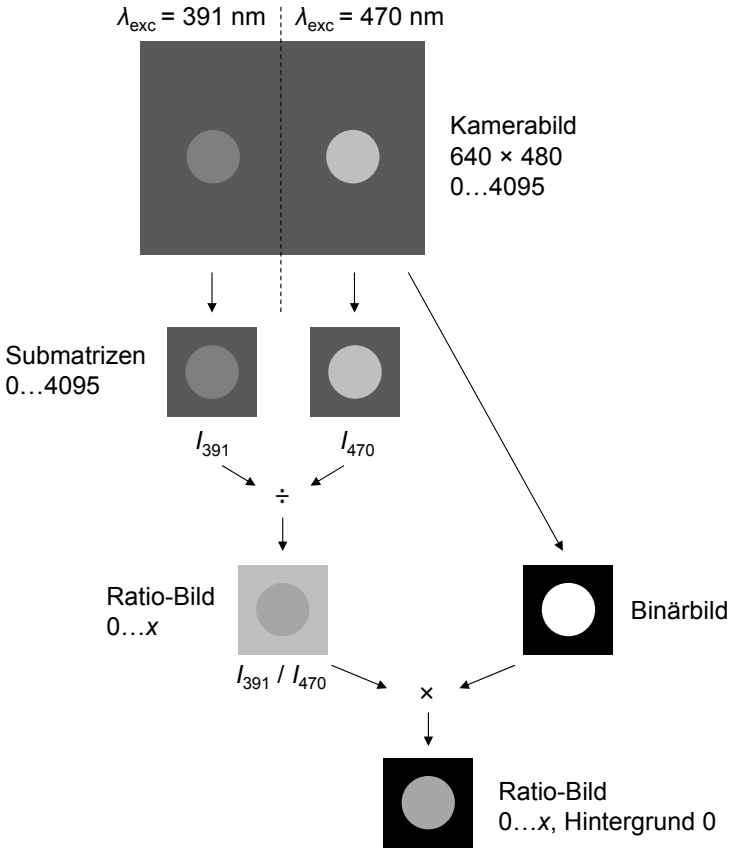


Abbildung 34. Flussdiagramm zur Erzeugung eines Ratio-Bildes

3.4 Weitere Detektionsmöglichkeiten

Prinzipiell können beliebige Detektoren, wie diverse Kamerasysteme, Photomultiplier oder Spektrometer an den Seiten- und/oder Frontanschluss des Mikroskops angebracht sowie eine Vielzahl von Objektiven genutzt werden. Die Auswahl erfolgt unter Berücksichtigung der zu messenden Parameter sowie der Proben- bzw. der Kapillargeometrie.

In der vorliegenden Arbeit werden die Objektive EC Plan-Neofluar 10x/0,3 Pol und Plan-Neofluar 20x/0,5 (Carl Zeiss Microscopy GmbH, Göttingen) verwendet.

Zur Aufnahme von Fluoreszenzbildern dient die Farbkamera AxioCam MRc (Carl Zeiss Microscopy GmbH, Jena) mit einem 1,4 Megapixel CCD-Sensor (Sensorgröße 8,9 mm × 6,7 mm, Pixelgröße 6,45 µm × 6,45 µm, Dynamikbereich 3 × 12 Bit RGB), angebracht an den Seiten- oder Frontanschluss des Mikroskops. Die Ansteuerung erfolgt über die Software AxioVision 4.8.2 (Carl Zeiss Microscopy GmbH, Jena). Es werden Belichtungszeiten von 0,1 s bis 5 s genutzt. Die Software ermöglicht neben der Steuerung der Kamera auch die Ansteuerung des Mikroskops. Unter anderem können die Filterradposition, die Position des Objektivrevolvers sowie dessen Positionierung in axialer Richtung per Software eingestellt werden. Letzteres ist von besonderer Bedeutung, da dies die automatisierte Aufnahme von Bilderstapeln ermöglicht. Hierfür werden die Start- und die Endposition sowie der gewünschte Hub Δz oder wahlweise die Anzahl der aufzunehmenden Ebenen eingegeben. Anhand dieser Parameter und der gewählten Einstellungen für die Belichtungszeit, den Verstärkungsfaktor etc. erfolgt dann die Aufnahme. Bei der Festlegung der Start- und Endposition bzw. des Hubs Δz gilt es zu beachten, dass die Software den Unterschied zwischen dem Hub des Objektivs und dem Hub der Fokusebene nicht berücksichtigt (vgl. Abschnitt 3.2.3). Dies ist in zweierlei Hinsicht von Bedeutung: Zum einen muss für die Stapelaufnahme das Inkrement, um das sich das Objektiv verschieben soll, um den entsprechenden Korrekturfaktor (vgl. Abbildung 22 und Gleichung (27)) verringert eingegeben werden. Und zum anderen muss im Falle einer 3D-Rekonstruktion dieser Wert durch den Wert der Fokusverschiebung ersetzt werden, da die Berechnung ansonsten mit dem Wert des Objektivhubs erfolgt und man als Ergebnis ein in der z-Achse gestauchtes Bild erhält.

Die Software stellt verschiedene Modi zur 3D-Ansicht einer Stapelaufnahme zur Verfügung. Für die in dieser Arbeit vorgestellten 3D-Bilder wurde der Modus Schatten mit Beleuchtung des Objekts von rechts oben ausgewählt.

Zur Aufnahme der Fluoreszenzlebensdauer dient das in Abschnitt 3.3.4 bereits für das Ratio Imaging vorgestellte Kamerasystem PicoStar HR (LaVision, Göttingen). Die im Picosekundenbereich schaltbare CCD-Kamera (Sensorgröße 640 × 480 Pixel, Pixelgröße

9,9 µm × 9,9 µm, Dynamikbereich 12 Bit monochrom) mit Bildverstärker wird am linken Seitenanschluss des Mikroskops angebracht. Die Bildaufnahme erfolgt mithilfe der Software DaVis 6.2.2 (LaVision, Göttingen).

In einem Zeitfenster von 10 ns wird in periodischen Abständen von 200 ps die Fluoreszenzintensität gemessen, indem Bilder mit einer Integrationszeit zwischen 1 und 4 Sekunden aufgenommen werden.

Zur ortsaufgelösten Darstellung der Fluoreszenzlebensdauer wird aus den Intensitätswerten jedes einzelnen Pixels eine Abklingkurve erstellt und eine monoexponentielle Kurvenanpassung durchgeführt. Aus dieser angepassten Kurve wird die effektive Fluoreszenzlebensdauer bestimmt. Mittels Falschfarbendarstellung wird die Fluoreszenzlebensdauer räumlich aufgelöst in der einzelnen Probenebene als Bild wiedergegeben.

Des Weiteren ermöglicht die Software die Berechnung der mittleren Fluoreszenzlebensdauer über einen ausgewählten Bildbereich. Diese Funktion wird für die in Abbildung 44 dargestellten Ergebnisse verwendet. Die zeitgleiche Nutzung der Farbkamera AxioCam MRc am Frontanschluss des Mikroskops ermöglicht zusätzlich die Aufnahme eines Fluoreszenzbildes in Echtfarbendarstellung (siehe Abbildung 43 und Abbildung 45).

4 Ergebnisse

Die hier vorgestellten Ergebnisse beziehen sich zum einen auf die Charakterisierung des SPIM- und des Ratio Imaging Moduls. Zum anderen werden Anwendungsbeispiele unter Verwendung des SPIM-Moduls aufgezeigt und die Ergebnisse der Redox-Messungen mittels Kombination von Lichtscheibenfluoreszenzmikroskopie und Ratio Imaging vorgestellt. Die nachfolgende Tabelle enthält eine Übersicht der Methoden und durchgeführten Untersuchungen.

Tabelle 6. Übersicht der verwendeten Methoden und durchgeführten Untersuchungen

Methode	Messung	Probe / Zelllinie (Sphäroide)	Wirk-/Farbstoff
SPIM	Lichtscheibe	Farbstofflösung	Rhodamin 6G
	Bildqualität	CHO-pAcGFP1-Mem	-
	z-Stapel, 3D-Rekonstruktion	U251MG-L106-RS	Rotenon + CellTox Green Dye
		MCF-7	Doxorubicin
	FLIM	MCF-7	Doxorubicin
		Hela-Mem-ECFP-DEVD-EYFP	Staurosporin
Ratio Imaging	Transmission des Faserbündels	Farbstofflösung	Rhodamin 6G
	Bildqualität	Rasterplatte	-
SPIM + Ratio Imaging	Redoxgleich-gewicht	U251MG-L106-RS	H_2O_2 (Fluidik)
			Staurosporin
		U251MG-L106-MRS	Staurosporin

4.1 Charakterisierung des SPIM-Moduls

4.1.1 Charakterisierung der Lichtscheibe

Durch Rotation der Zylinderlinse um 90° ist es möglich, die Ausdehnung der Lichtscheibe in z-Richtung (Dicke der Lichtscheibe) zu messen und die Position der Strahltaille zu bestimmen (vgl. Abschnitt 3.2.1). Abbildung 35 zeigt die Dimensionen der Lichtscheiben bei Fluoreszenzanregung von Rhodamin 6G (25 µM in bidestilliertem Wasser) mit den Wellenlängen 391 nm (a) und 470 nm (b).

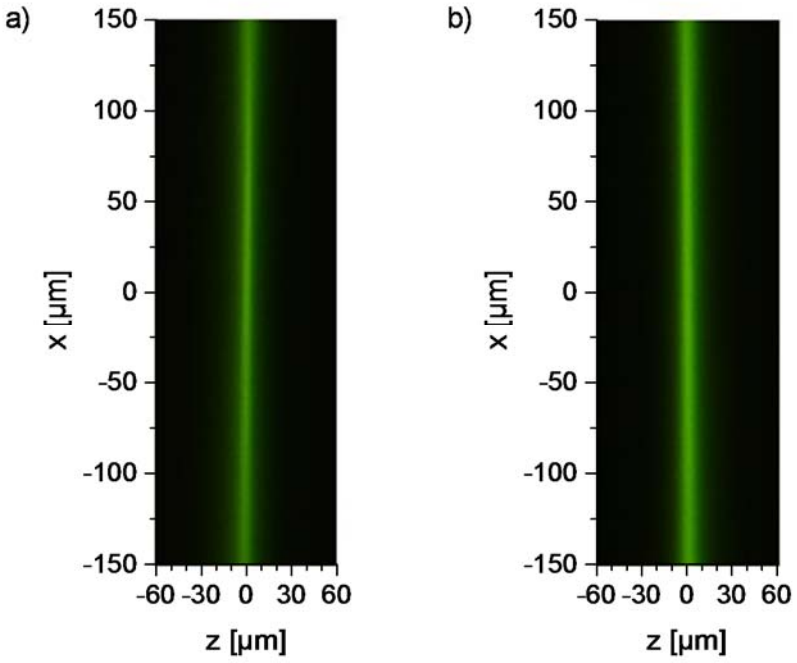


Abbildung 35. Dimensionen der Lichtscheibe. Fluoreszenzaufnahmen von Rhodamin 6G (25 µM in bidestilliertem Wasser) bei vertikaler Ausrichtung der Lichtscheibe in Bezug auf die Längsachse der Kapillare (vgl. Abbildung 19b). a) Anregungswellenlänge 391 nm, b) Anregungswellenlänge 470 nm. Detektion: $\lambda \geq 515$ nm, Objektiv: EC Plan-Neofluar 10x/0,3 Pol

Um eine quantitative Aussage bezüglich der Dicken der Lichtscheiben treffen zu können, wird mittels der Software ImageJ die Fluoreszenzintensität entlang der z-Achse ermittelt und die Halbwertsbreite (FWHM) bestimmt. Exemplarisch sind in Abbildung 36 diese Profile für die Lichtscheiben beider Anregungswellenlängen am Ort $x = 0$ µm (vgl. Abbildung 35) dargestellt. Für die Erstellung der Profile wird die Fluoreszenzintensität (Grauwerte) über eine Strecke von $\Delta x = 10$ µm integriert. Die Fluoreszenzintensitäten werden für die grafische Darstellung auf 1 normiert.

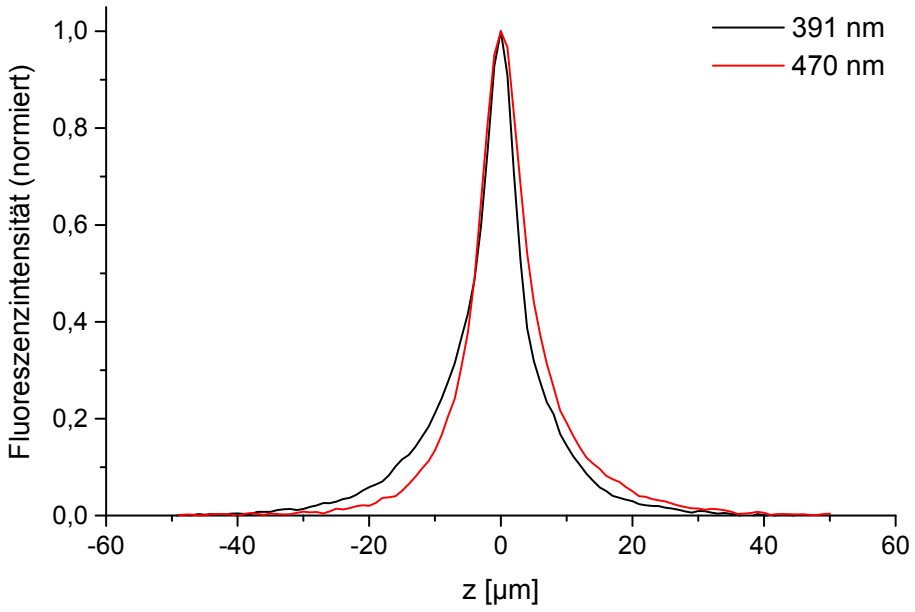


Abbildung 36. Profile der Lichtscheiben (normierte Intensität in Abhängigkeit von *z*) bei Fluoreszenzanregung von Rhodamin 6G (25 µM in bidestilliertem Wasser) bei $x = 0$ µm (vgl. Abbildung 35) gemittelt über $\Delta x = 10$ µm zur Ermittlung der Halbwertsbreite (FWHM)

Die Halbwertsbreiten entlang der x-Achse, ermittelt anhand der Profile (jeweils über $\Delta x = 10$ µm integriert), sind in Abbildung 37 dargestellt. Bei der Anregungswellenlänge 470 nm wird der Strahltaillendurchmesser an der Stelle $x = 0$ somit zu 8 µm bestimmt, bei 391 nm zu 7 µm.

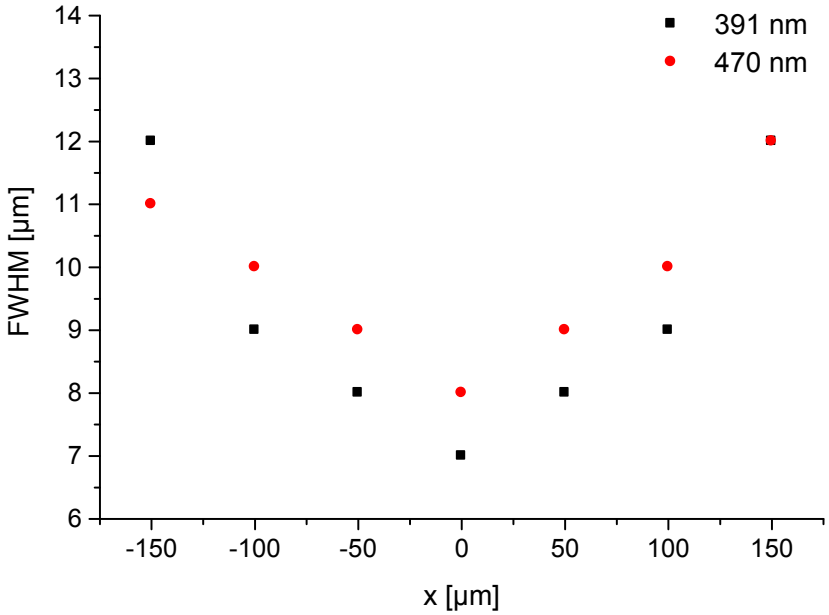


Abbildung 37. Verlauf der Halbwertsbreiten (FWHM) über eine Strecke von 300 µm, ermittelt anhand der in Abbildung 35 dargestellten Fluoreszenzaufnahmen

4.1.2 Bildqualität

Zur Beurteilung der Eindringtiefe des Anregungslichts und der Bildqualität werden Fluoreszenzaufnahmen einzelner Ebenen im Zellsphäroid bei Lichtscheibenmikroskopie mit SPIM-Modul und konfokaler Laser Scanning Mikroskopie miteinander verglichen.

Abbildung 38 (SPIM) und Abbildung 39 (CLSM) zeigen jeweils vier Aufnahmen von Einzelschichten eines CHO-pAcGFP1-Mem Sphäroids, aufgenommen im Abstand von 20 µm, 40 µm, 60 µm und 80 µm zur dem Mikroskopobjektiv zugewandten Sphäroidunterseite. In den SPIM-Aufnahmen in Abbildung 38 sind die Zellmembranen, in welchen das grün fluoreszierende Protein exprimiert wird, scharf abgebildet. Mit zunehmendem Abstand zur Sphäroidunterseite wird der innere Bereich des Sphäroids unschärfer. Parallel zur Beleuchtungsrichtung sind Artefakte in Form von Streifen erkennbar. Ferner erscheint die der Beleuchtungsrichtung abgewandte Sphäroidseite diffuser als die dem Licht zugewandte.

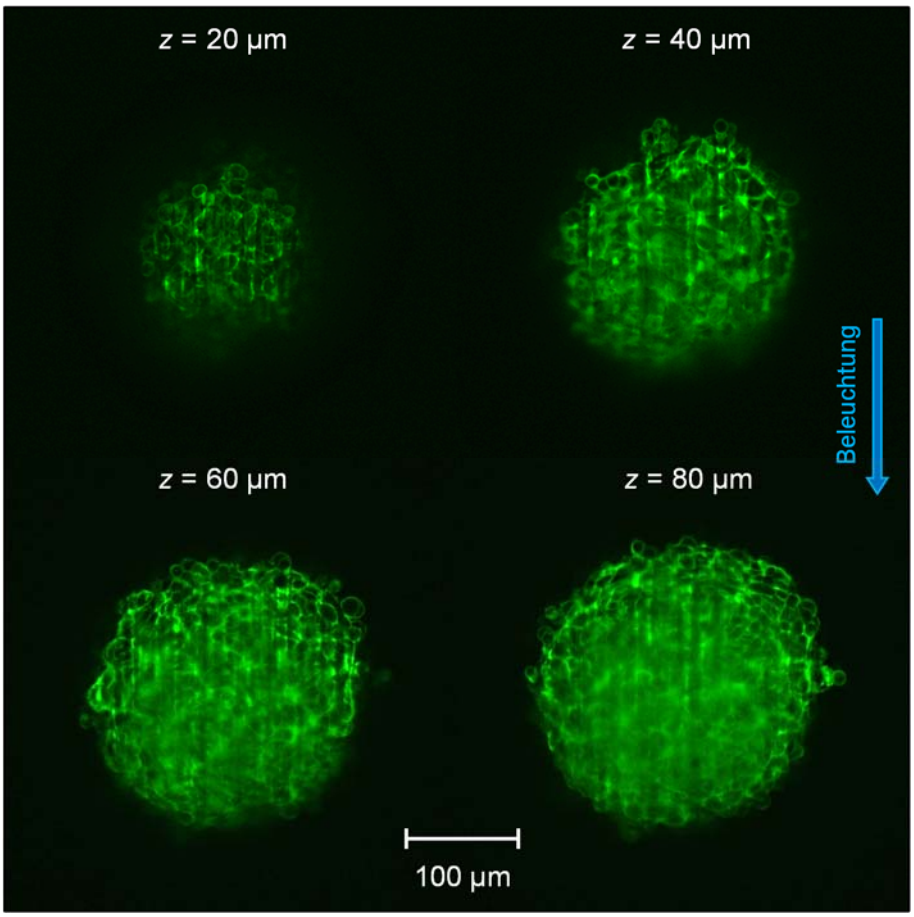


Abbildung 38. SPIM-Schichtaufnahmen eines Sphäroids in den Abständen 20 µm, 40 µm, 60 µm und 80 µm zur Sphäroidunterseite. Zelllinie: CHO-pAcGFP1-Mem, Anregungswellenlänge: 488 nm, Detektion: $\lambda \geq 515$ nm, Objektiv: EC Plan-Neofluar 10x/0,3 Pol

Die CLSM-Aufnahmen (bei Beleuchtung und Beobachtung senkrecht zur Bildebene) in Abbildung 39 zeigen ebenfalls scharfe Membranstrukturen. Im Unterschied zu den in Abbildung 38 dargestellten SPIM-Aufnahmen ist hier jedoch mit zunehmendem Abstand zur Sphäroidunterseite eine deutliche Abnahme der Helligkeit im inneren Bereich der jeweiligen Sphäroidebenen zu erkennen.

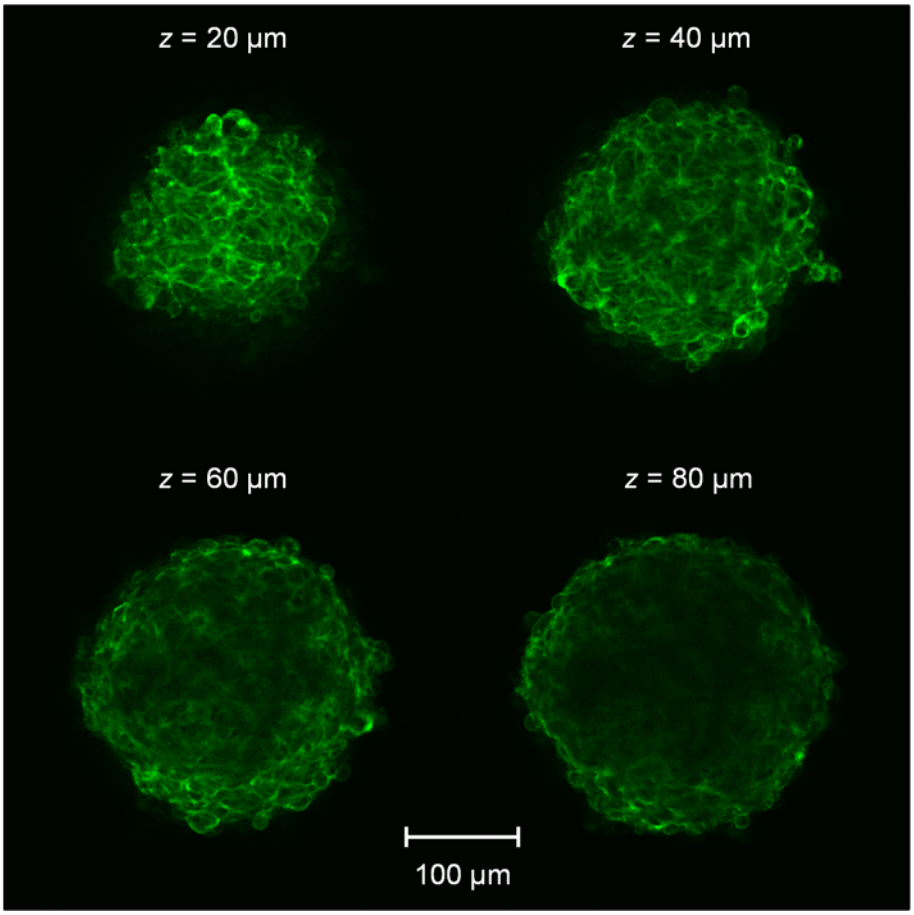


Abbildung 39. CLSM-Schichtaufnahmen eines Sphäroids in den Abständen 20 µm, 40 µm, 60 µm und 80 µm zur Sphäroidunterseite. Zelllinie: CHO-pAcGFP1-Mem, Anregungswellenlänge: 488 nm, Detektion: $\lambda \geq 505$ nm, Objektiv: EC Plan-Neofluar 10x/0,3 Pol

Für die Aufnahmen mit beiden Mikroskopietechniken wird eine Bestrahlung von 52 mJ/cm² pro Bild genutzt, die weit unterhalb einer phototoxischen Lichtdosis liegt [80]. Die Belichtungszeit beträgt 1 s für die SPIM-Aufnahmen und 3 s für die CLSM-Aufnahmen. Aufgrund der höheren Empfindlichkeit des Photomultipliers als Detektor in der konfokalen Laser Scanning Mikroskopie gegenüber der Farbkamera, die als Detektor für die SPIM-Aufnahmen eingesetzt wird, wird die Helligkeit dieser mittels Bildbearbeitung erhöht.

Streifenreduktion

Eine Software-basierte Streifenreduktion kann mit dem ImageJ *Plugin* VSNR (*Variational Stationary Noise Remover*) [27] erreicht werden. Die Algorithmen beruhen insbesondere auf der Fourier-Analyse. Zur Entfernung des stationären Rauschens werden Dirac-Filter und entsprechend zu konfigurierende Gabor-Filter eingesetzt [100]. Abbildung 40 zeigt exemplarisch das SPIM-Originalbild, das Grünkanalbild sowie das mittels Software neu errechnete, streifenfreie Grünkanalbild der im Abstand von 60 µm von der Sphäroidunterseite aufgenommenen Sphäroidebene.

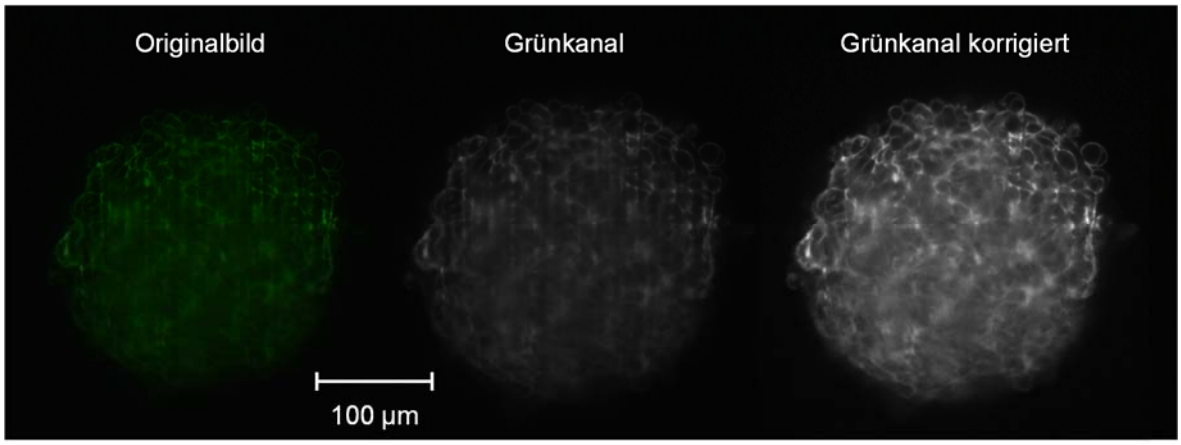


Abbildung 40. Originalbild, Grünkanalbild und mit dem ImageJ *Plugin* VSNR [27] korrigiertes, streifenfreies Grünkanalbild einer Sphäroidebene im Abstand z = 60 µm von der Sphäroidunterseite

4.1.3 3D-Rekonstruktion

Zur Validierung des SPIM-Moduls bezüglich der 3D-Rekonstruktion aus Schichtaufnahmen dient ein mit Rotenon (1 µM in Kulturmedium, 3 h) und CellTox Green Dye (Verdünnung 1 : 500 in Kulturmedium, 2 h) inkubiertes Zellsphäroid. Zellen mit, aufgrund der Rotenon-Inkubation, geschädigter Plasmamembran werden durch die Co-Inkubation mit dem Fluoreszenzmarker CellTox Green Dye sichtbar. Abbildung 41 zeigt die Fluoreszenzaufnahmen der einzelnen Sphäroidebenen, aufgenommen jeweils im Abstand von Δz = 5 µm (a), das Durchlichtbild (b) und die 3D-Rekonstruktion (c).

Die Bestrahlungsstärke für die Aufnahme eines Fluoreszenzbildes beträgt 110 mW/cm². Dies resultiert bei einer Belichtungszeit von 100 ms in einer Bestrahlung von 22 mJ/cm²; unter Berücksichtigung, dass bei einem Abstand der aufgenommenen Ebenen von Δz = 5 µm, aufgrund der Lichtscheibendicke von 10 µm, jede aufgenommene Ebene zweimal beleuchtet wird.

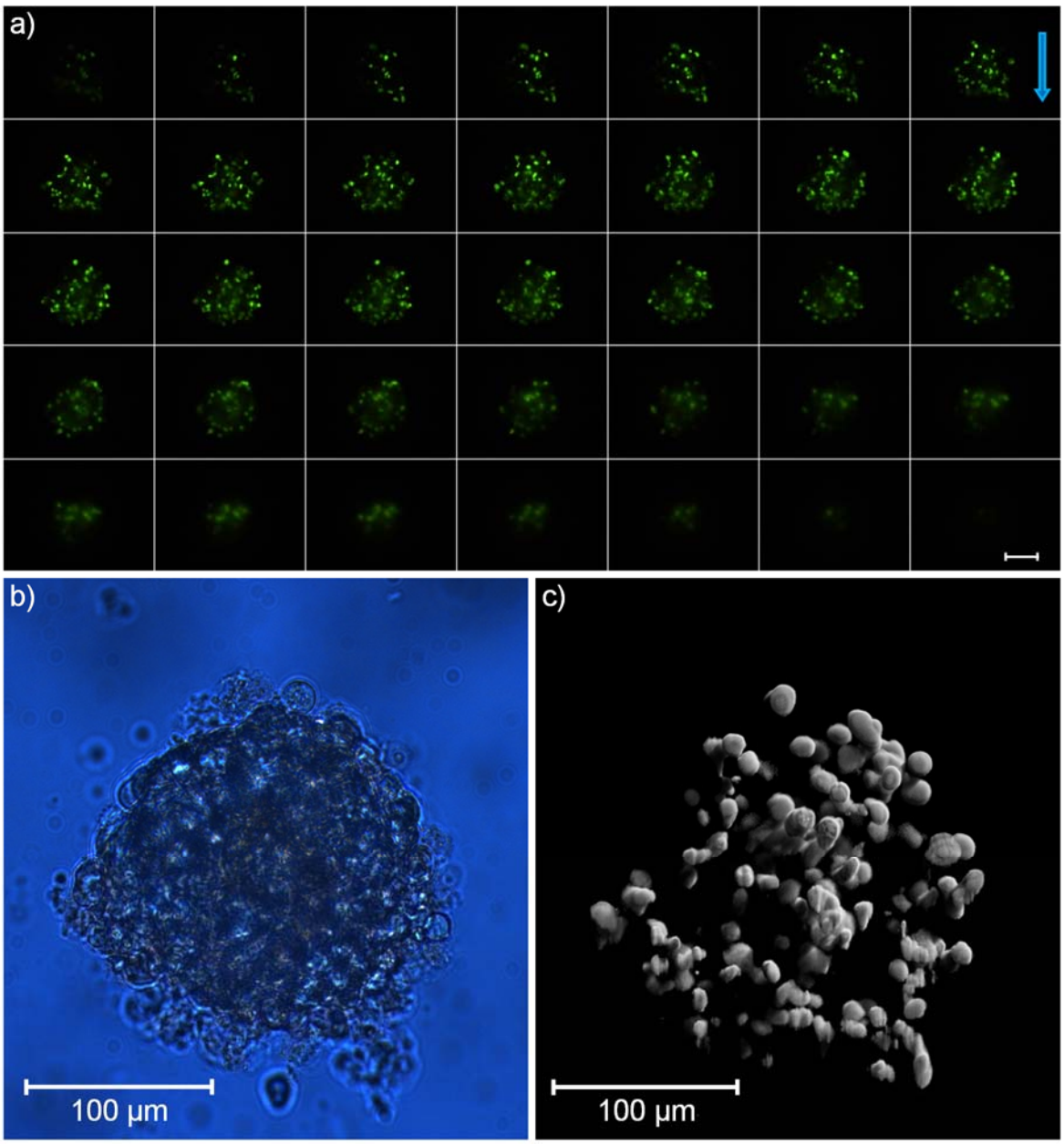


Abbildung 41. U251MG-L106-RS Sphäroid, inkubiert mit Rotenon (1 µM in Kulturmedium, 3 h) und CellTox Green Dye (Verdünnung 1 : 500 in Kulturmedium, 2 h). a) Fluoreszenzaufnahmen der Einzelschichten (Δz = 5 µm, Maßstabsbalken: 100 µm), b) Durchlichtaufnahme und c) 3D-Rekonstruktion des Zellsphäroids aus 35 Schichtaufnahmen mit Δz = 5 µm. Der blaue Pfeil indiziert die Beleuchtungsrichtung. Anregungswellenlänge: 470 nm, Detektion: $\lambda \geq$ 515 nm, Objektiv: Plan-Neofluar 20x/0,5

4.2 Anwendungsbeispiele unter Verwendung des SPIM-Moduls

4.2.1 Fluoreszenzaufnahmen eines Zellsphäroids nach Inkubation mit dem Zytostatikum Doxorubicin

Abbildung 42 zeigt Fluoreszenzbilder einzelner Schichten eines MCF-7 Zellsphäroids im Abstand von Δz = 10 µm nach Inkubation mit Doxorubicin (8 µM in Kulturmedium, 5 h). Der Durchmesser des Sphäroids beträgt etwa 200 µm. Im äußeren Bereich des Sphäroids ist die im roten Spektralbereich lokalisierte Doxorubicin-Fluoreszenz in den Zellkernen erkennbar, während im inneren Bereich des Sphäroids vermutlich ein Abbauprodukt von Doxorubicin zur Fluoreszenz angeregt wird, welches im Wesentlichen in bzw. an der Zellmembran lokalisiert ist [40]. Ab dem Abstand z = 90 µm zur Sphäroidunterseite treten sowohl in der Mitte als auch im Randbereich des Sphäroids Unschärfen auf, welche sich mit zunehmendem Abstand zur Sphäroidunterseite verstärken. Für die Bildaufnahme wird eine Bestrahlungsstärke von 0,66 W/cm² genutzt. Bei einer Belichtungszeit von einer Sekunde resultiert dies in einer Bestrahlung von 0,66 J/cm².

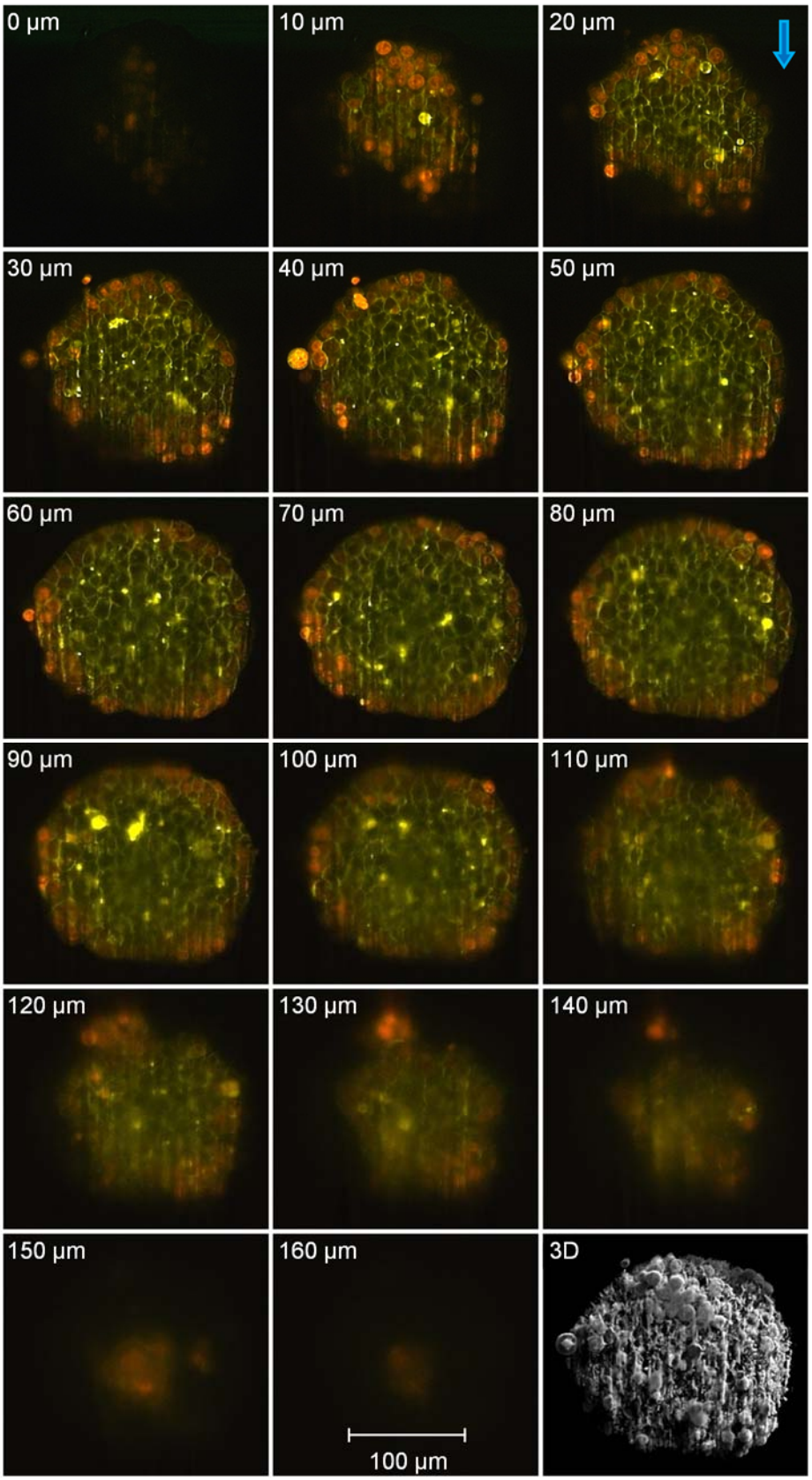


Abbildung 42. Schichtaufnahmen (Δz = 10 µm) und 3D-Rekonstruktion eines MCF-7 Zellsphäroids nach Doxorubicin-Inkubation (8 µM in Kulturmedium, 6 h). Der blaue Pfeil indiziert die Beleuchtungsrichtung. Anregungswellenlänge: 470 nm, Detektion: $\lambda \geq 515$ nm, Objektiv: EC Plan-Neofluar 10x/0,3 Pol

4.2.2 Messungen der Fluoreszenzlebensdauer

Abbildung 43 zeigt die Einzelschichtaufnahme eines mit Doxorubicin (8 µM, 24 h) inkubierten MCF-7 Sphäroids bei z = 25 µm bezogen auf die Sphäroidunterseite. Es ist sowohl das Fluoreszenzbild (a) als auch das FLIM-Bild (b) dargestellt. Wie bereits in Abbildung 42 gezeigt, ist auch hier die Doxorubicin-Fluoreszenz im roten Spektralbereich in den Zellkernen vornehmlich im äußeren Bereich der Sphäroidebene zu erkennen. Im inneren Bereich hingegen dominiert die Fluoreszenz des Abbauprodukts. Beim Vergleich des FLIM-Bildes mit dem Fluoreszenzbild zeigt sich, dass das rot fluoreszierende Doxorubicin mit < 2,5 ns eine deutlich geringere Fluoreszenzlebensdauer aufweist als dessen im kurzwelligeren Spektralbereich fluoreszierendes Abbauprodukt (3,5 ns). Für die Fluoreszenzaufnahme einer Sphäroidebene ist diese einer Bestrahlung von 0,6 J/cm² ausgesetzt. Die Aufnahme des FLIM-Bildes erfordert eine Bestrahlung der Sphäroidebene von 30 J/cm², da 50 Bilder zur Bestimmung der Fluoreszenzabklingkurve aufgenommen werden. Hierbei kann eine Phototoxizität von Doxorubicin nicht ausgeschlossen werden.

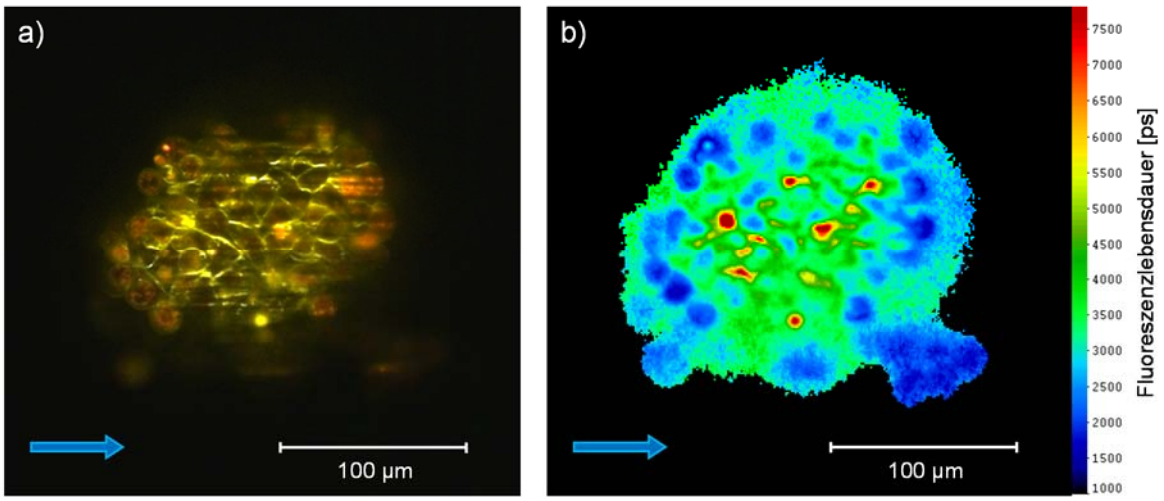


Abbildung 43. MCF-7 Sphäroid nach Inkubation mit Doxorubicin 8 µM in Kulturmedium, 24 h. Die blauen Pfeile indizieren die Beleuchtungsrichtung. a) Fluoreszenzbild, b) FLIM-Bild. Anregungswellenlänge: 488 nm, Detektion: $\lambda \geq 515$ nm, Objektiv: Plan-Neofluar 20x/0,5, Abstand der aufgenommenen Ebene zur Sphäroidunterseite: z = 25 µm

Weitere Ergebnisse aus Messungen der Fluoreszenzlebensdauer in Sphäroid-Einzelschichten sind in Abbildung 44 und in Abbildung 45 dargestellt. Abbildung 44 zeigt die Mediane und MADs der mittleren Fluoreszenzlebensdauer des ECFP in unbehandelten HeLa-Mem-ECFP-DEVD-EYFP Sphäroiden (Kontrolle) und in HeLa-Mem-ECFP-DEVD-EYFP Sphäroiden nach Inkubation mit Staurosporin (2 µM in Kulturmedium, 4 h).

Bei Sphäroiden, die einer Staurosporin-Inkubation ausgesetzt waren, kann mit 3,31 ± 0,04 ns eine deutlich längere Fluoreszenzlebensdauer des Donors ECFP gemessen werden als bei Kontrollsphäroiden (2,44 ± 0,185 ns), was sich mit einer

Unterbrechung des Energietransfers von ECFP auf EYFP bei Apoptose erklären lässt. Zur Bestimmung der Mediane und MADs wird in beiden Gruppen die mittlere Fluoreszenzlebensdauer einer Ebene aus jeweils vier Sphäroiden herangezogen.

Die Bilder werden mit einer Bestrahlungsstärke von 0,2 W/cm² und Belichtungszeiten zwischen 2 und 4 s aufgenommen, um optimale Ergebnisse zu erreichen. Die maximale Bestrahlung einer Sphäroidebene bei 50 aufgenommenen Bildern zur Bestimmung der Fluoreszenzabklingzeit beläuft sich somit auf 40 J/cm². Die notwendige Belichtungszeit von 5 s, für die in Abbildung 45 gezeigten Fluoreszenzaufnahmen, resultiert in einer Bestrahlung von 1 J/cm².

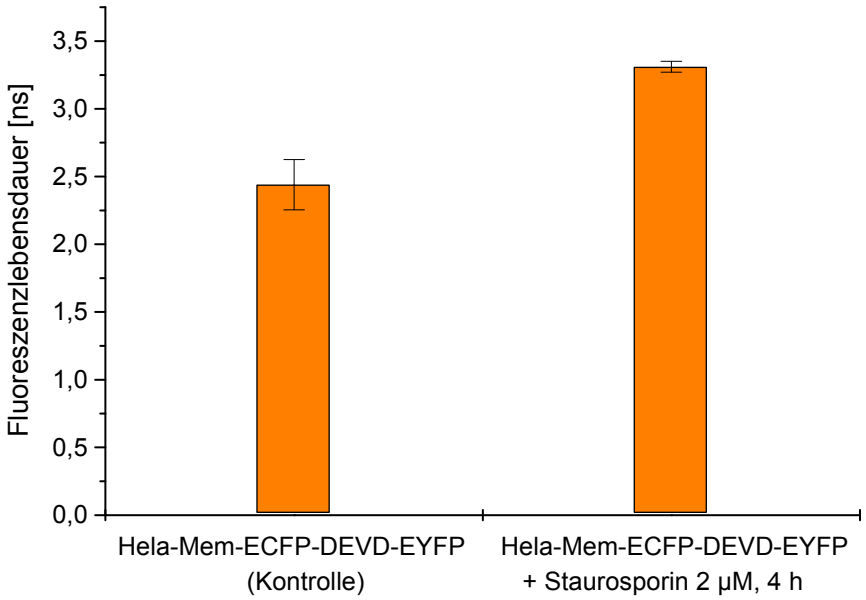


Abbildung 44. Mediane und MADs der mittleren Fluoreszenzlebensdauer gemessen in jeweils einer Zellschicht in vier unbehandelten HeLa-Mem-ECFP-DEVD-EYFP Sphäroiden (Kontrolle) und vier HeLa-Mem-ECFP-DEVD-EYFP Sphäroiden nach Staurosporin-Inkubation (2 µM in Kulturmedium, 4 h). Anregungswellenlänge: 391 nm, Detektion: Langpassfilter für $\lambda \geq 420$ nm und Bandpassfilter für 450 nm $\leq \lambda \leq$ 490 nm, Objektiv: Plan-Neofluar 20x/0,5

Abbildung 45 zeigt exemplarisch jeweils ein FLIM-Bild einer Ebene eines unbehandelten HeLa-Mem-ECFP-DEVD-EYFP Sphäroids (Kontrolle) und eines HeLa-Mem-ECFP-DEVD-EYFP Sphäroids nach Staurosporin-Inkubation (2 µM in Kulturmedium, 4 h), aufgenommen bei einer Anregungswellenlänge von 391 nm. Die Detektion erfolgte unter Einsatz eines Langpassfilters für $\lambda \geq 420$ nm und eines Bandpassfilters für 450 nm $\leq \lambda \leq$ 490 nm (Fluoreszenzbereich des Donors). Außerdem sind die entsprechenden Durchlichtbilder der Sphäroide sowie die Fluoreszenzbilder (aufgenommen unter Einsatz eines Langpassfilters für $\lambda \geq 515$ nm, d. h. im Fluoreszenzbereich des Akzeptors EYFP) dargestellt. Die Bilder zeigen, dass sich mit Staurosporin-Gabe nicht nur die Fluoreszenzlebensdauer des cyan fluoreszierenden Proteins verlängert, sondern auch

morphologische Veränderungen innerhalb des Sphäroids stattfinden. Membranstrukturen sind nur in dem HeLa-Mem-ECFP-DEVD-EYFP Sphäroid zu erkennen, welches nicht mit Staurosporin inkubiert wurde.

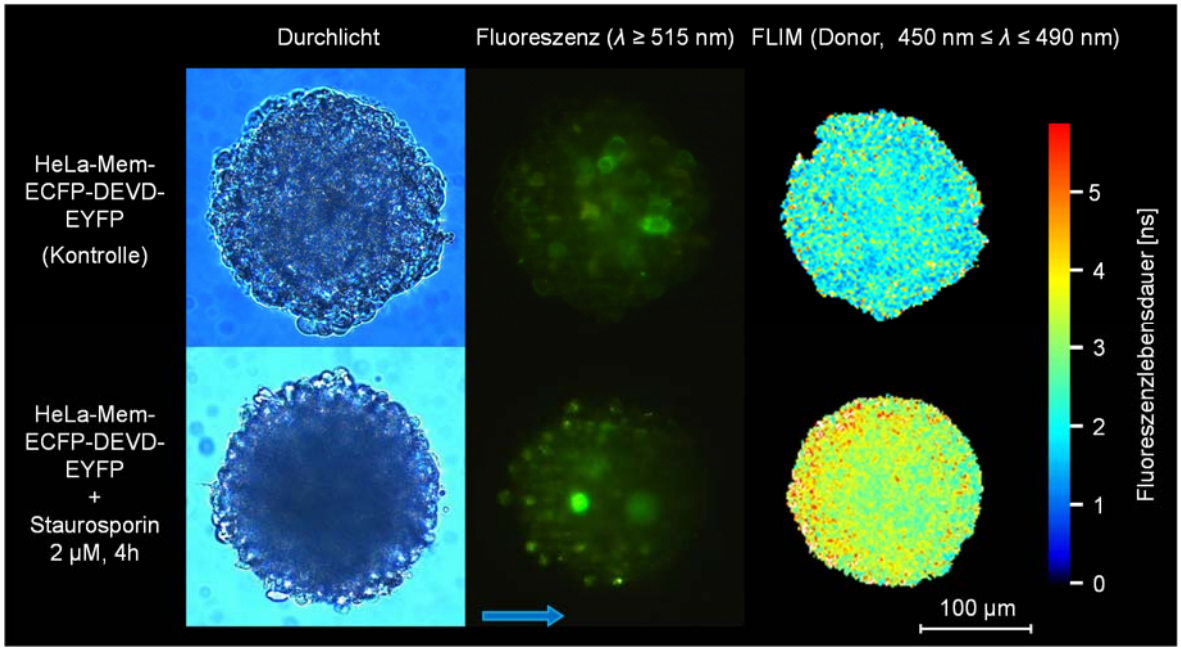


Abbildung 45. Durchlichtbilder jeweils eines unbehandelten HeLa-Mem-ECFP-DEVD-EYFP Sphäroids und eines HeLa-Mem-ECFP-DEVD-EYFP Sphäroids nach Staurosporin-Inkubation (2 µM in Kulturmedium, 4 h) sowie die zugehörigen Fluoreszenz- und FLIM-Aufnahmen jeweils einer einzelnen Zellschicht. Der blaue Pfeil indiziert die Beleuchtungsrichtung. Anregungswellenlänge: 391 nm, Detektion: Langpassfilter für $\lambda \geq 515$ nm (Fluoreszenzbilder), Langpassfilter für $\lambda \geq 420$ nm sowie Bandpassfilter $450 \text{ nm} \leq \lambda \leq 490$ nm (FLIM-Bilder), Objektiv: Plan-Neofluar 20x/0,5

4.3 Charakterisierung des Moduls zum Ratio Imaging

4.3.1 Transmission

Mit der in Abschnitt 3.3.2 vorgestellten Messmethode lässt sich für den Lichtweg, den das verzögerte Teilbündel passiert, eine Transmission von ca. 33 % ermitteln. Das bedeutet, dass die Fluoreszenzintensität des verzögerten Bildes gegenüber der des direkt transmittierten Bildes um den Faktor 3 abgeschwächt wird. Da für das Ratio Imaging das bei der Anregungswellenlänge 470 nm erzeugte Fluoreszenzbild nach dessen Verzögerung aufgenommen wird, wird zum Ausgleich die Leistung der 470 nm-Diode um den Faktor 3 höher gewählt als die der 391 nm-Diode.

4.3.2 Bildqualität

Abbildung 46 zeigt die Durchlichtaufnahme eines Objektträgers mit Rastermarkierung als Testprobe zur Anpassung der Bildgröße und -schärfe. Links ist das direkt auf die Kamera abgebildete Bild zu sehen, rechts das durch das Faserbündel verzögerte Bild. Der aus der begrenzten Transmission des Faserbündels resultierende Helligkeitsunterschied der beiden Bilder ist deutlich erkennbar. Dessen ungeachtet wird die Rasterstruktur auf beiden Sensorhälften scharf und in gleicher Größe abgebildet.

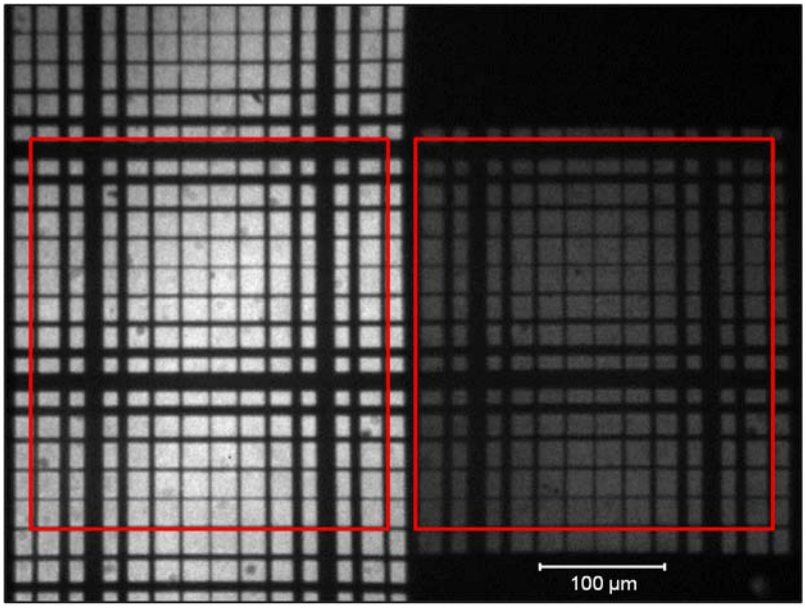


Abbildung 46. Aufnahme einer Testplatte zur Justage des Ratio Imaging Moduls. Links: direkt transmittiertes Bild, rechts: durch Faserbündel verzögertes Bild. Die rote Markierung kennzeichnet die Bereiche, aus welchen die Ratio-Bilder (dargestellt in Abbildung 47) berechnet werden. Sensorgröße: 640 × 480 Pixel, Pixelgröße: 9,9 µm × 9,9 µm, Objektiv: Plan-Neofluar 20x/0,5

Das durch das Faserbündel verzögerte Bild wird durch die Geometrie der Endflächen des Faserbündels beschnitten. Wie in Abschnitt 3.3.3 beschrieben ist die Austrittsfläche des

Faserbündels mit den Abmessungen 5,3 mm × 5,5 mm verkleinert auf die 3,15 mm × 4,8 mm große Sensorhälfte der Kamera abgebildet.

Die rote Markierung kennzeichnet die Bildbereiche, aus welchen die in Abbildung 47 dargestellten Ratio-Bilder berechnet werden. Hierfür werden die beiden Bildbereiche Pixel für Pixel durcheinander dividiert und das Ergebnis in Falschfarben dargestellt.

In Abbildung 47a sind Artefakte in Form heller Linien erkennbar, die entstehen, wenn nicht in jedem der beiden Bilder (siehe Abbildung 46: links das direkt transmittierte und rechts das durch das Faserbündel verzögerte Bild) die exakt gleichen Bildbereiche zur Verrechnung ausgewählt werden. Durch die Verschiebung der Bereichsauswahl (roter Kasten) im rechten (verzögerten) Bild können diese Artefakte minimiert werden (vgl. Abbildung 47b). Das Gittermuster im Ratio-Bild entspricht dem der Durchlichtaufnahme in Abbildung 46.

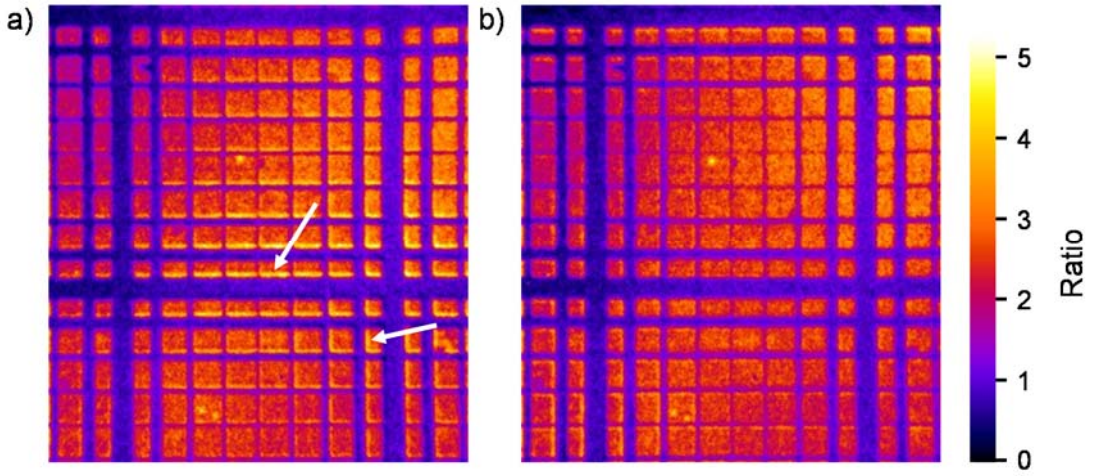


Abbildung 47. Ratio-Bilder in Falschfarben aus den in Abbildung 46 markierten Bildbereichen (links/rechts). a) Die durcheinander dividierten Bildbereiche stimmen nicht exakt überein. Das Gittermuster enthält helle Linien (siehe Pfeile), die auf einen Versatz hinweisen. b) Die Bildbereiche stimmen überein. Im Vergleich zu (a) wurde die Bereichsauswahl (roter Kasten in Abbildung 46) in der rechten Abbildung leicht verschoben.

4.4 Ratio Imaging an Tumorzellsphäroiden

Die im Folgenden vorgestellten Ergebnisse sind Einzelschichtaufnahmen von Sphäroiden aus der Glioblastomzelllinie U251MG, die das Glutathion-spezifische redoxsensitive grün fluoreszierende Protein Grx1-roGFP2 im Zytoplasma (U251MG-L106-RS) oder in den Mitochondrien (U251MG-L106-MRS) exprimieren. Messungen von Änderungen des Redoxgleichgewichts erfolgen zum einen während der Zufuhr von Wasserstoffperoxid und zum anderen nach Staurosporin-induzierter Apoptose. Die angegebenen Abstände der Ebenen beziehen sich auf die dem Objektiv zugewandte Sphäroidunterseite. Die Bezeichnung Ratio I_{391}/I_{470} steht für das Verhältnis der Fluoreszenzintensitäten bei Anregung mit den Wellenlängen 391 nm und 470 nm und spiegelt das Redoxverhältnis von Glutathion wider (vgl. Abschnitt 2.2). Die Anregungsleistung der 391 nm-Laserdiode beträgt für alle im Folgenden vorgestellten Messungen (ausschließlich der Voruntersuchung) 65 mW/cm², die der 470 nm-Laserdiode 185 W/cm². Damit ergibt sich mit der verwendeten Belichtungszeit von 1 s eine gesamte Bestrahlung (Lichtdosis) von 250 mJ/cm² pro Aufnahme bzw. für ein Ratio-Bild.

4.4.1 Oxidation des Redoxsensors durch Wasserstoffperoxid

Voruntersuchung

Im Rahmen der Experimente unter Wasserstoffperoxid-Zufuhr durch das Fluidik-System wird untersucht, ob sich die Strömung oder die Lichtbelastung auf das Redoxverhältnis im Sphäroid auswirken. Als Probe dient ein adhärentes U251MG-L106-RS Sphäroid unter kontinuierlicher Zuführung von EBSS. Die Diodenleistungen werden für diese Aufnahmen auf 95 mW/cm² für die 391 nm-Diode und 300 mW/cm² für die 470 nm-Diode erhöht. Über die Dauer von drei Minuten wird alle zehn Sekunden ein Bild aufgenommen.

Abbildung 48 zeigt die Fluoreszenzaufnahmen einer Sphäroidebene bei beiden Anregungswellenlängen 10 s, 60 s, 120 s und 180 s nach Beginn der EBSS-Zufuhr sowie die hieraus berechneten Ratio-Bilder. Aus diesen ist erkennbar, dass das Redoxverhältnis über die gesamte Dauer der Messung konstant bleibt. Bestimmt man den Median ± MAD aus den mittleren Intensitätsverhältnissen I_{391}/I_{470} der insgesamt 18 Aufnahmen über die Zeit, so ergibt sich ein Wert von 0,436 ± 0,002.

Bei Betrachtung der Fluoreszenzbilder ist ein leichter Rückgang der Fluoreszenzintensität über die Zeit erkennbar. Aus den jeweiligen Intensitätsmittelwerten lässt sich dieser auf ca. 8 % quantifizieren.

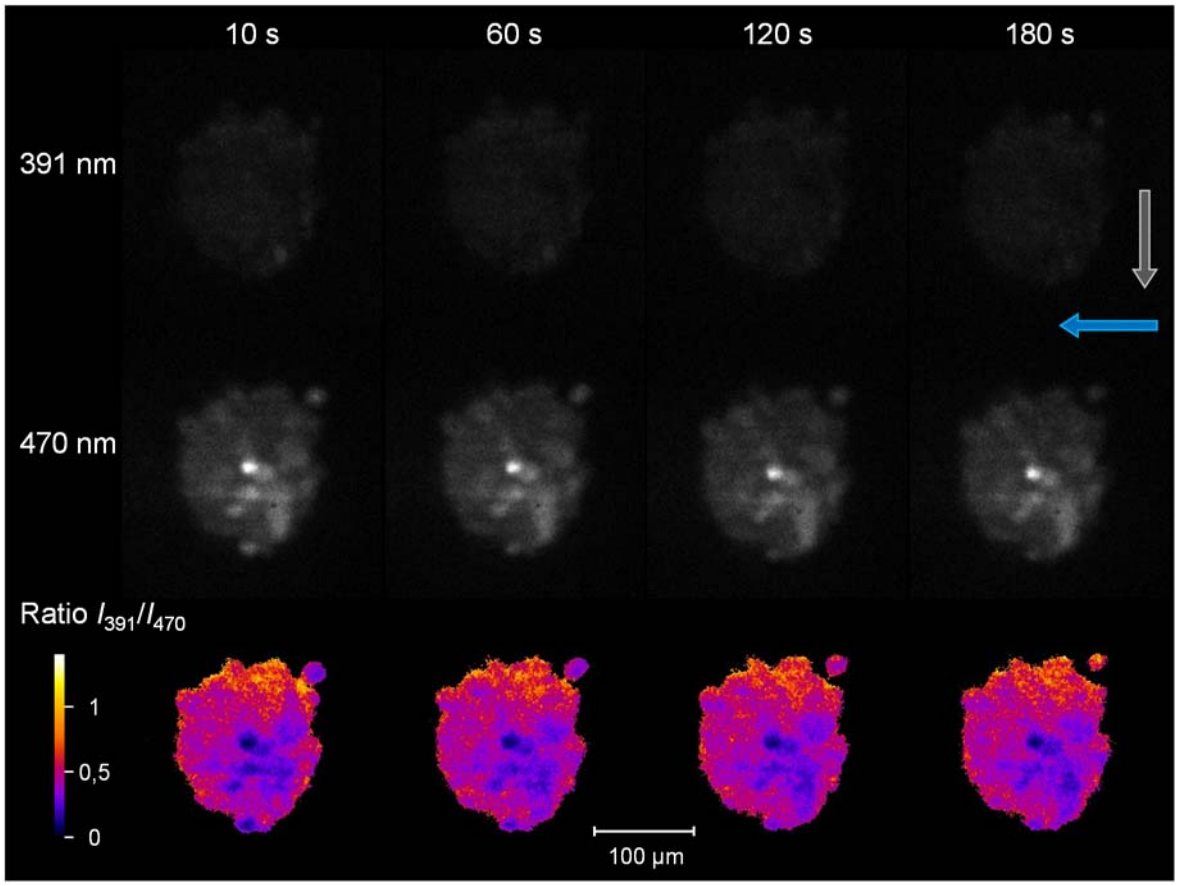


Abbildung 48. Fluoreszenz- und Ratio-Bilder aus der Ebene z = 65 µm eines U251MG-L106-RS Sphäroids im Fluss von EBSS. Der graue Pfeil indiziert die Flussrichtung, der blaue die Beleuchtungsrichtung. Anregungswellenlängen: 391 nm und 470 nm, Detektion: $\lambda \geq 515$ nm, Objektiv: Plan-Neofluar 20x/0,5

Oxidation des Redoxsensors durch Wasserstoffperoxid

Zum Nachweis der prinzipiellen Funktionalität des Moduls zum Ratio Imaging von Redoxzuständen in Tumorzellsphäroiden dienen adhärente U251MG-L106-RS Sphäroide, welchen, durch das Fluidik-System, das Oxidationsmittel Wasserstoffperoxid (H_2O_2, 50 µM in EBSS) zugeführt wird. Hierfür erfolgt über einen Zeitraum von fünf Minuten die Aufnahme von Fluoreszenzbildern in einem Intervall von fünf Sekunden.

Das Intensitätsverhältnis der Fluoreszenzbilder (Ratio I_{391}/I_{470}) bei Anregung mit den Wellenlängen 391 nm und 470 nm, welches das Verhältnis von oxidiertem zu reduziertem Glutathion widerspiegelt, ist in Abbildung 49 in Abhängigkeit der Dauer der H_2O_2-Zufuhr dargestellt. Neben den, aus den Intensitätsmittelwerten des gesamten Bereichs der Sphäroidebene errechneten Ratio-Werten (blaue Kurve), sind außerdem die aus den Intensitätsmittelwerten des inneren sowie des äußeren Bereichs errechneten Ratio-Werte separat dargestellt (rote bzw. grüne Kurve). Anhand der Kurvenverläufe ist ersichtlich, dass in allen Bereichen des Sphäroids eine Oxidation stattfindet, der Effekt jedoch radial betrachtet in den äußeren Schichten stärker auftritt als in den inneren. Ein Anstieg der

Ratio-Werte, also eine zunehmende Oxidation, findet nur etwa bis zu einer Dauer von 90 s statt und ist im äußeren Bereich um den Faktor 2 - 3 höher als im inneren Bereich.

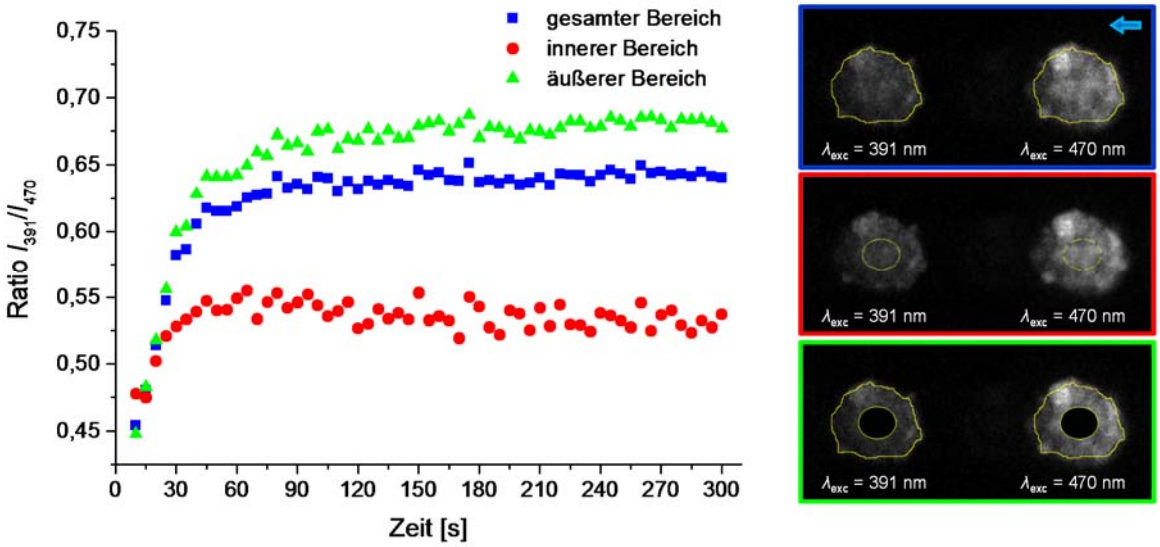


Abbildung 49. Entwicklung der Ratio-Werte in Abhängigkeit der Inkubationsdauer mit H_2O_2 (50 µM in EBSS, Zufuhr durch das Fluidik-System), aufgenommen in einer einzelnen Ebene im Abstand von 60 µm zur Sphäroidunterseite (Zelllinie: U251MG-L106-RS). Jeder Datenpunkt stellt den Mittelwert aller Ratio-Werte der aufgenommenen Ebene dar. Die blaue Kurve spiegelt den gesamten Bereich der aufgenommenen Schicht wider. Die rote Kurve bezieht sich auf den inneren, die grüne auf den äußeren Bereich dieser Ebene. Rechts sind die zur Auswertung herangezogenen Bereiche markiert. Der blaue Pfeil indiziert die Beleuchtungsrichtung. Anregungswellenlängen: 391 nm und 470 nm, Detektion: $\lambda \geq 515$ nm, Objektiv: Plan-Neofluar 20x/0,5

Abbildung 50 zeigt exemplarisch die Ratio-Bilder der aufgenommenen Sphäroidebene zu den Zeitpunkten 10 s, 30 s und 90 s nach dem Start der Wasserstoffperoxid-Zufuhr. Auch anhand dieser Bilder in Falschfarbendarstellung ist deutlich ersichtlich, dass die Ratio-Werte im äußeren Bereich des Sphäroids stärker ansteigen als im inneren.

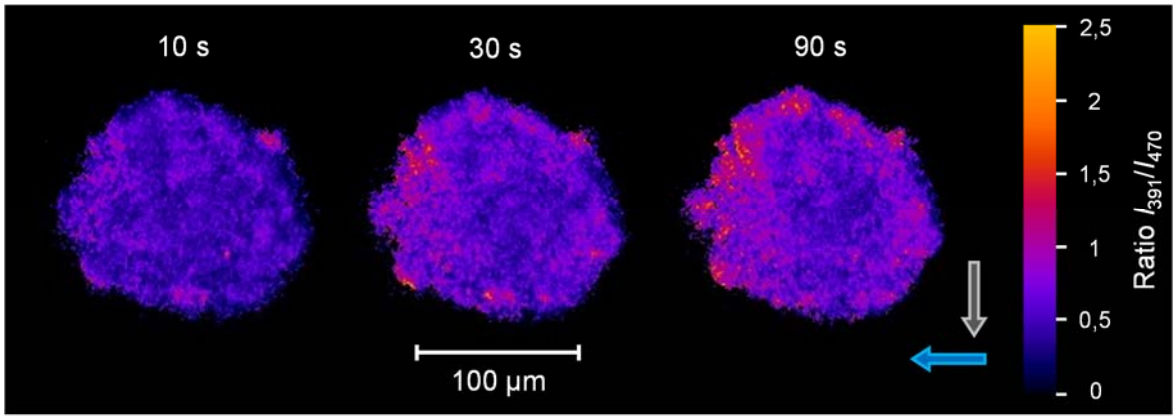


Abbildung 50. Ratio-Bilder einer Sphäroidebene (z = 60 µm bezogen auf die Sphäroidunterseite) 10 s, 30 s und 90 s nach Beginn der konstanten Zuführung von H_2O_2 (50 µM in EBSS) über das Fluidik-System. Der graue Pfeil indiziert die Flussrichtung, der blaue die Beleuchtungsrichtung. Zelllinie: U251MG-L106-RS, Anregungswellenlängen: 391 nm und 470 nm, Detektion: $\lambda \geq 515$ nm; Objektiv: Plan-Neofluar 20x/0,5

4.4.2 Oxidation des Redoxsensors durch Staurosporin-induzierte Apoptose

Redoxverhältnis in Abhängigkeit der Konzentration und der Sphäroidebene

In einem ersten Experiment zur Untersuchung, inwiefern sich die Inkubation von Tumorzellsphäroiden mit Staurosporin auf das Redoxverhältnis von Glutathion auswirkt, werden U251MG-L106-MRS Sphäroide für sechs Stunden mit dem Wirkstoff inkubiert und anschließend Bilderstapel mit einem Inkrement von Δz = 10 µm aufgenommen. Abbildung 51 zeigt das Redoxverhältnis in Abhängigkeit der Sphäroidebene z in Sphäroiden, die mit den Staurosporin-Konzentrationen 4 µM, 8 µM und 12 µM in Kulturmedium inkubiert wurden sowie die Redoxverhältnisse der einzelnen Ebenen eines unbehandelten Sphäroids (Kontrolle).

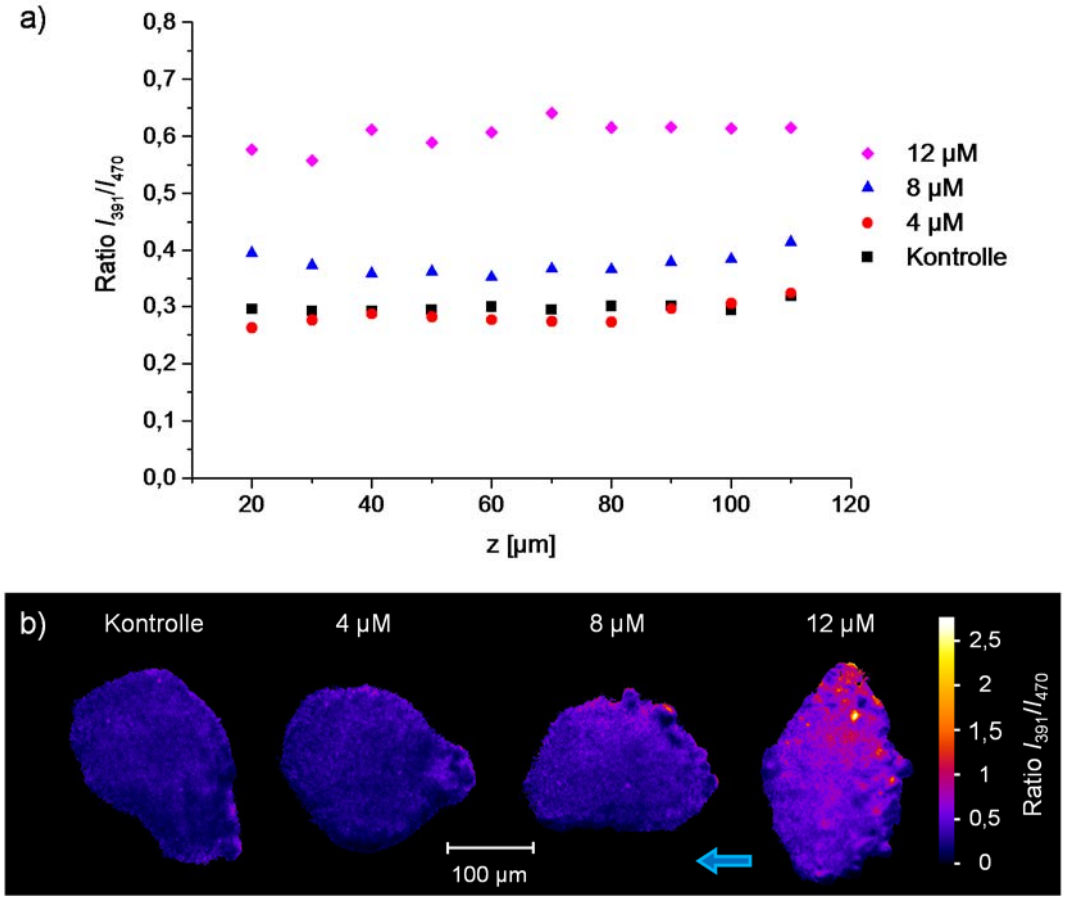


Abbildung 51. Ratio-Werte in Abhängigkeit der Staurosporin-Konzentration. a) Mittlere Ratio-Werte in Abhängigkeit des Abstandes z der aufgenommenen Sphäroidebene zur Sphäroidunterseite für die Staurosporin-Konzentrationen 4 µM, 8 µM und 12 µM in Kulturmedium (Inkubationszeit 6 h) sowie für ein nicht inkubiertes Kontrollsphäroid. b) Ratio-Bilder der Sphäroidebenen im Abstand z = 60 µm von der Sphäroidunterseite. Der blaue Pfeil indiziert die Beleuchtungsrichtung. Zelllinie: U251MG-L106-MRS, Anregungswellenlängen: 391 nm und 470 nm, Detektion: $\lambda \geq$ 515 nm, Objektiv: Plan-Neofluar 20x/0,5

Aus Abbildung 51a geht hervor, dass das Verhältnis zwischen oxidiertem und reduziertem Glutathion weitestgehend unabhängig von der Sphäroidebene ist. Die Redoxverhältnisse im Kontrollsphäroid unterscheiden sich kaum von den Redoxverhältnissen im Sphäroid, das einer Staurosporin-Konzentration von 4 µM ausgesetzt war. Bei einer Staurosporin-Konzentration von 8 µM ist ein leichter Anstieg der Redoxverhältnisse erkennbar. Die Inkubation mit einer Staurosporin-Konzentration von 12 µM hat einen deutlichen Anstieg des Redoxverhältnisses um einen Faktor 2, bezogen auf die Kontrolle, zur Folge. Abbildung 51b zeigt exemplarisch jeweils ein Ratio-Bild der Sphäroidebene im Abstand z = 60 µm von der Sphäroidunterseite.

In Abbildung 52 sind die Mediane mit MADs der in Abbildung 51 vorgestellten Ratio-Werte der einzelnen Sphäroidebenen in Abhängigkeit der Staurosporin-Konzentration dargestellt.

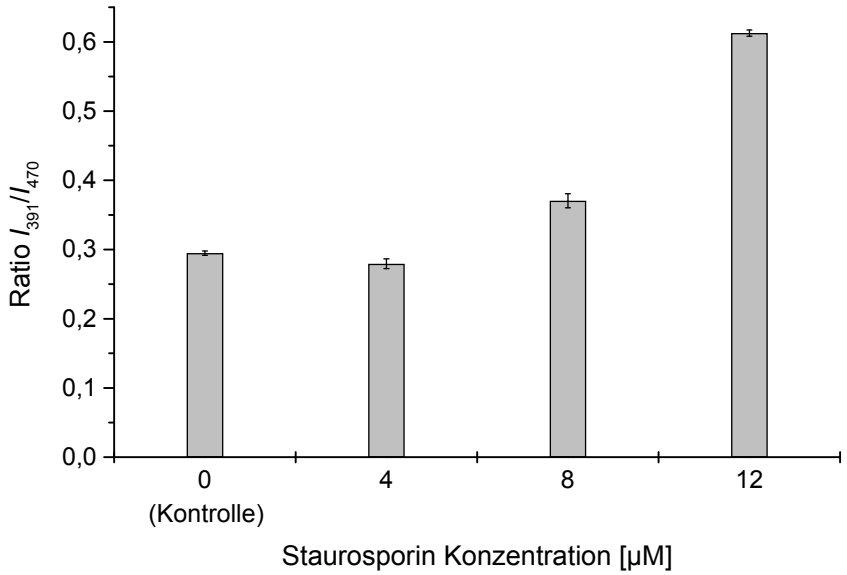


Abbildung 52. Ratio-Werte in Abhängigkeit der Staurosporin-Konzentration. Dargestellt ist jeweils der Median ± MAD aus zehn Sphäroidebenen zwischen 20 µm und 110 µm (Δz = 10 µm). Zelllinie: U251MG-L106-MRS, Anregungswellenlängen: 391 nm und 470 nm, Detektion: $\lambda \geq 515$ nm, Objektiv: Plan-Neofluar 20x/0,5

Das Kontrollsphäroid weist ein Intensitätsverhältnis I_{391}/I_{470} von 0,295 ± 0,0031 auf. Nach Staurosporin-Inkubation mit einer Konzentration von 4 µM ergibt sich ein Verhältnis I_{391}/I_{470} von 0,279 ± 0,0072, bei einer Konzentration von 8 µM steigt das Verhältnis I_{391}/I_{470} auf 0,371 ± 0,0101 an. Bei einer Konzentration von 12 µM liegt das Verhältnis I_{391}/I_{470} bei 0,613 ± 0,0045.

Änderung des Redoxverhältnisses in Abhängigkeit der Inkubationsdauer

In einem weiteren Experiment mit Sphäroiden der Zelllinie U251MG-L106-MRS wird die Abhängigkeit des Redoxverhältnisses von der Inkubationsdauer untersucht. Hierfür werden die Sphäroide stationär mit 12 µM Staurosporin in Kulturmedium inkubiert. Über 330 Minuten hinweg wird alle 30 Minuten ein Sphäroid entnommen und die Fluoreszenz in der Ebene z = 60 µm, bezogen auf die Sphäroidunterseite, aufgenommen. Das Ergebnis ist in Abbildung 53a grafisch dargestellt. Trotz einer relativ starken Streuung ist anhand der angepassten Geraden eine Erhöhung der Ratio-Werte mit steigender Inkubationsdauer ersichtlich. Die Kreise markieren die Inkubationsdauern, zu welchen die Ratio-Bilder in Abbildung 53b dargestellt sind.

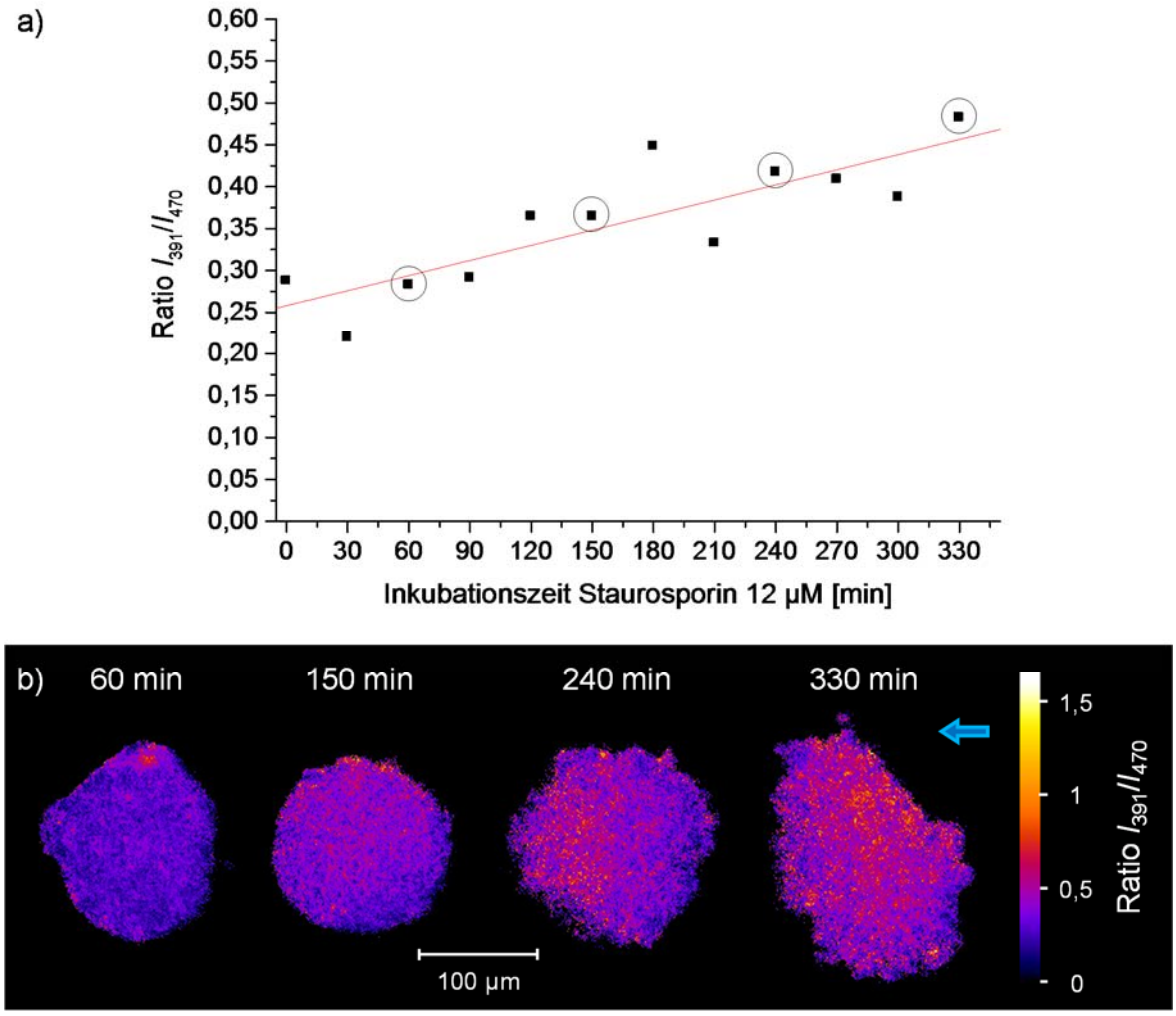


Abbildung 53. a) Mittlere Ratio-Werte einer Sphäroidebene bei z = 60 µm, bezogen auf die Sphäroidunterseite, in Abhängigkeit der Dauer der Staurosporin-Inkubation (12 µM in Kulturmedium). Die Kreise markieren die Werte, zu welchen in (b) die Ratio-Bilder dargestellt sind. b) Ratio-Bilder nach 60 min, 150 min, 240 min und 330 min Staurosporin-Inkubation. Der blaue Pfeil indiziert die Beleuchtungsrichtung. Zelllinie: U251MG-L106-MRS, Anregungswellenlängen: 391 nm und 470 nm, Detektion: $\lambda \geq 515$ nm, Objektiv: Plan-Neofluar 20x/0,5

Änderung des Redoxverhältnisses in Abhängigkeit der Lokalisierung des Sensors

Eine weitere Untersuchung zeigt, inwiefern die Änderung des Redoxverhältnisses in Sphäroiden der beiden Zelllinien U251MG-L106-RS und U251MG-L106-MRS von der unterschiedlichen Lokalisierung des Redoxsensors Grx1-roGFP2 abhängig ist (siehe Abbildung 54). Hierfür werden Fluoreszenzbilder aus der Ebene z = 60 µm, bezogen auf die Sphäroidunterseite, aufgenommen. Als Kontrolle dienen fünf unbehandelte Sphäroide je Zelllinie. Nach Staurosporin-Inkubation (12 µM, 5 h) werden drei Sphäroide der Zelllinie U251MG-L106-RS sowie vier Sphäroide der Zelllinie U251MG-L106-MRS untersucht. Zur Auswertung der Ergebnisse wird jeweils der Median ± MAD aus den mittleren Intensitätsverhältnissen bestimmt.

Die Kontrollmessungen an Sphäroiden der Zelllinie U251MG-L106-RS, die den Sensor im Zytoplasma exprimiert, ergeben ein Redoxverhältnis von 0,419 ± 0,034. Das Verhältnis der Kontrollmessungen in Sphäroiden der Zelllinie U251MG-L106-MRS, die den Sensor in den Mitochondrien exprimiert, ist mit 0,203 ± 0,0064 etwa halb so groß. Nach Staurosporin-Inkubation steigt das Verhältnis bei Sphäroiden der Zelllinie U251MG-L106-RS auf 0,650 ± 0,036 bzw. auf 0,307 ± 0,018 bei Sphäroiden der Zelllinie U251MG-L106-MRS. Die Ratio-Werte in Sphäroiden der Zelllinie U251MG-L106-RS liegen somit zwar um den Faktor 2 höher als die in Sphäroiden der Zelllinie U251MG-L106-MRS, jedoch zeigt sich, dass sich das Redoxverhältnis aufgrund der Staurosporin-Inkubation in Sphäroiden beider Zelllinien in gleichem Maße um den Faktor 1,5 erhöht.

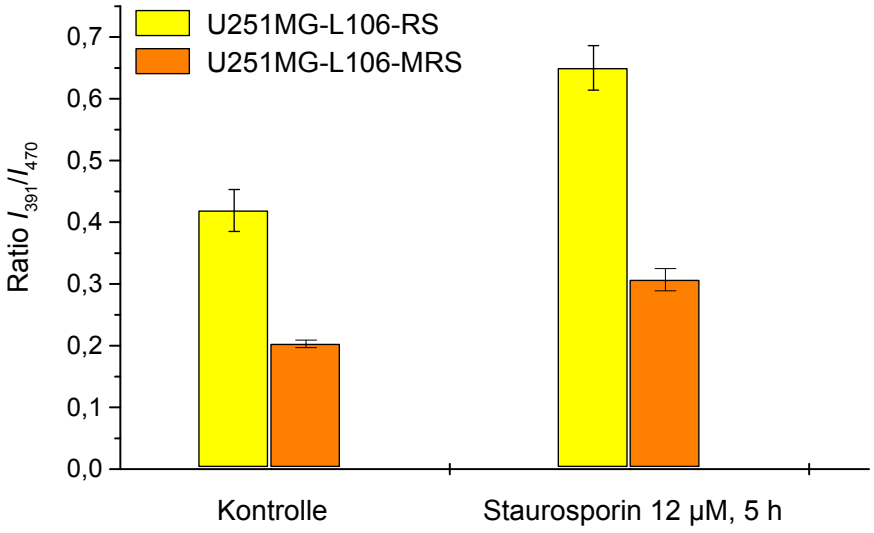


Abbildung 54. Intensitätsverhältnisse I_{391}/I_{470} bei Sphäroiden der Zelllinien U251MG-L106-RS und U251MG-L106-MRS ohne (Kontrolle) und nach Staurosporin-Inkubation (12 µM, 5 h). Median und MAD berechnet anhand der mittleren Verhältniswerte jeweils einer Ebene im Abstand von z = 60 µm von der Sphäroidunterseite (Kontrolle: fünf Sphäroide je Zelllinie; nach Staurosporin-Inkubation: drei Sphäroide der Zelllinie U251MG-L106-RS, vier Sphäroide der Zelllinie U251MG-L106-MRS). Anregungswellenlängen: 391 nm und 470 nm, Detektion: $\lambda \geq 515$ nm, Objektiv: Plan-Neofluar 20x/0,5

Abbildung 55 zeigt exemplarisch für Sphäroide beider Zelllinien je ein Ratio-Bild ohne Staurosporin-Inkubation (Kontrolle) und nach Staurosporin-Inkubation. Die Bilder spiegeln ortsaufgelöst die in Abbildung 54 dargestellten Ergebnisse wider. Aus den Ratio-Bildern geht hervor, dass die Ratio-Werte – sowohl bei den Sphäroiden nach Staurosporin-Inkubation als auch bei den Kontrollsphäroiden – tendenziell im inneren Bereich der Sphäroide etwas höher liegen als im äußeren. Dies lässt darauf schließen, dass sich im inneren Bereich des Sphäroids mehr Sensorproteine im oxidierten Zustand befinden als im äußeren.

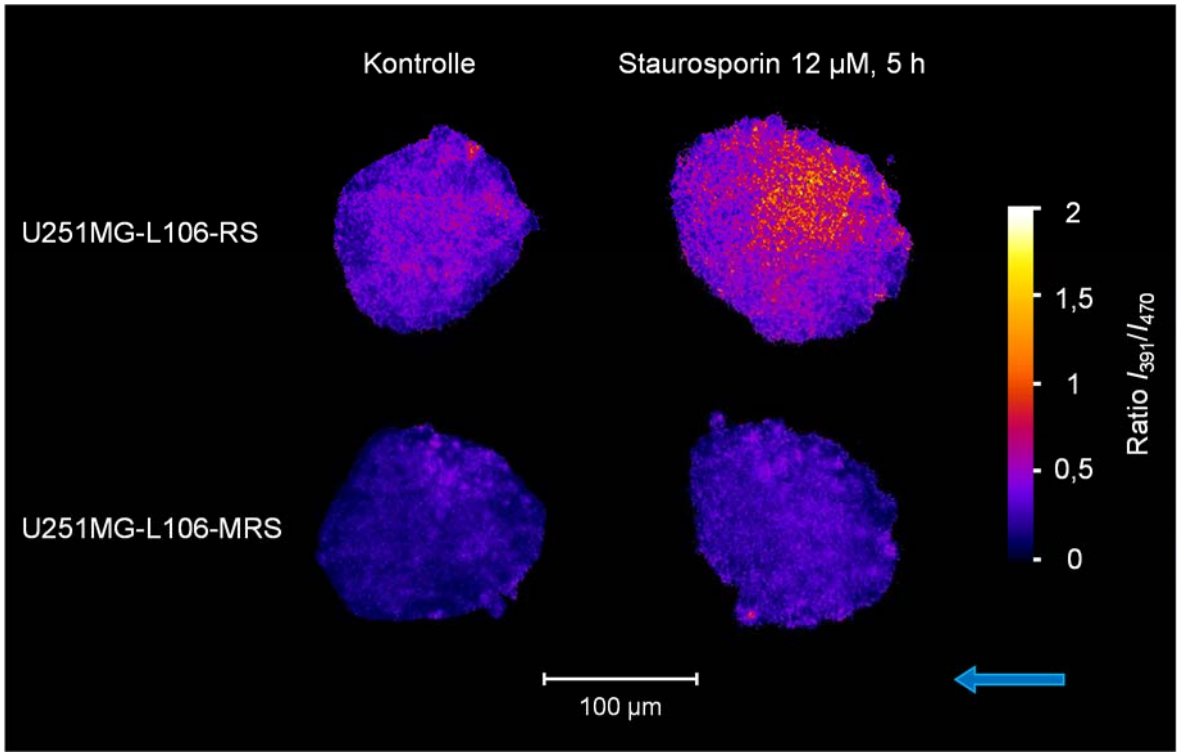


Abbildung 55. Änderung des Redoxzustands in Sphäroiden (U251MG-L106-RS und U251MG-L106-MRS) aufgrund deren Inkubation mit Staurosporin. Die Ratio-Bilder stammen aus jeweils einer Sphäroidebene im Abstand von 60 µm zur Sphäroidunterseite. Links: Kontrolle (keine Staurosporin-Inkubation), rechts: nach Staurosporin-Inkubation (12 µM, 5 h). Der blaue Pfeil indiziert die Beleuchtungsrichtung. Anregungswellenlängen: 391 nm und 470 nm, Detektion: $\lambda \geq 515$ nm, Objektiv: Plan-Neofluar 20x/0,5

5 Diskussion

5.1 Technischer Aufbau

5.1.1 Modul zur Probenhalterung

Das im Rahmen dieser Arbeit entwickelte Modul zur Probenhalterung besteht aus einer rechteckigen Glaskapillare als Probenträger sowie einer Kapillarhalterung, die an den Positioniertisch eines vorhandenen Mikroskops angebracht wird. Der Anschluss der Kapillare an ein Fluidik-System erlaubt die Versorgung der Probe mit Nährmedien, Farb- oder Wirkstoffen während der Messung.

Glaskapillaren

Die klassische Probenhalterung in der Mikroskopie besteht aus einem Objektträger und einem Deckglas. Zwischen diesen ist die Probe, umgeben von einem Flüssigkeitsfilm, platziert. Diese Art der Probenhalterung eignet sich jedoch lediglich für zweidimensionale Proben, wie z. B. Einzelzellen in einem konfluenten Zellrasen.

Die in dieser Arbeit vorgestellten rechteckigen Glaskapillaren stellen eine gute Alternative zu dem konventionellen System dar. Aufgrund vier planer, hochtransparenter Wandungen können sie für eine Vielzahl von Mikroskopiemethoden bei Auf- und Durchlichtbeleuchtung eingesetzt werden. Hierzu zählen unter anderem Methoden der Weitfeldmikroskopie sowie konfokale Methoden wie die Laser Scanning Mikroskopie, bei welchen Beleuchtungs- und Detektionsachse in der Regel identisch sind. Für die Lichtscheibenmikroskopie, bei der Beleuchtungs- und Detektionsachse senkrecht zueinander angeordnet sind, ist die Verwendung von rechteckigen Glaskapillaren als Probenträger innovativ und wegweisend.

Ein Vorteil der Glaskapillaren gegenüber Objektträgern ist, dass die Probe (z. B. Zellen) sich während der Messung nicht in einer dünnen, schnell verdunstenden Flüssigkeitsschicht zwischen Objektträger und Deckglas befindet, sondern während der kompletten Untersuchung einer optimalen Flüssigkeitsversorgung ausgesetzt ist. Ferner kann, wenn erwünscht, die Messung unter Flussbedingungen durchgeführt werden.

Besonderen Vorzug bieten rechteckige Kapillaren bei 3D-Mikrosokopiemethoden für die Untersuchung von Proben jenseits herkömmlicher zweidimensionaler Zellkulturen, die nicht zwischen Objektträger und Deckglas gehaltert werden können. Doch selbst zur Untersuchung zweidimensionaler Zellkulturen bieten sich die Glaskapillaren als Träger an.

Wie auf Objektträgern adhärieren die Zellen am Glassubstrat und bilden einen Zellrasen aus.

Bei den in dieser Arbeit verwendeten Glaskapillaren handelt es sich um kostengünstige Massenware. Bei Bedarf kann für jede Messung eine neue Kapillare genutzt werden. Werden Messungen mit nicht adhärenten Proben durchgeführt, kann die Kapillare nach einer Messung gespült und wiederverwendet werden.

Entscheidend bei der Wahl der Glaskapillare ist, neben der Abstimmung der Kapillar- auf die Probengröße, die innere und äußere Rechteckgeometrie sowie die Dicke der Wandung.

Um herkömmliche Mikroskopobjektive verwenden zu können, sollte die Dicke der Wandung in der Größenordnung der Dicke eines Deckglases (170 µm) liegen, für welche Mikroskopobjektive in der Regel korrigiert sind. Weicht die Dicke der Wandung stark von diesem Wert ab, sollte auf sogenannte *Long Distance* Objektive zurückgegriffen werden, die für unterschiedliche Glasdicken anpassbar sind.

Bezüglich der inneren und äußeren Rechteckgeometrie der Kapillaren ist darauf zu achten, dass die Radien der inneren Ecken möglichst klein sind und zudem die Radien der äußeren Ecken kleiner sind als die Dicke der Wandung (vgl. hierzu Abbildung 12). Dies gewährleistet eine gute optische Abbildung auch derjenigen Probenebenen, die sich nahe der Kapillarkante befinden, was insbesondere bei Verwendung der Kapillaren als Probenträger in der Lichtscheibenmikroskopie wichtig ist. Fluoreszenzaufnahmen aus Experimenten, die mit Kapillaren mangelhafter Rechteckgeometrie durchgeführt werden, zeigen eine deutlich schlechtere Bildqualität. Beim Verfahren der Fokusebene ist es aufgrund der Krümmungsradien nicht möglich, die Lichtscheibe entsprechend mitzuführen, sodass bereits bei geringen Verfahrwegen von 30 bis 40 µm Lichtscheibe und Fokusebene nicht mehr übereinander liegen.

Probenapplikation

Bei Verwendung einer Glaskapillare als Probenträger ist das Umgebungsmedium der Probe frei wählbar. Die Probenaufnahme ist sehr einfach und schnell durchzuführen.

Soll die Probe in einer Flüssigkeit vermessen werden, so kann diese mit der entsprechenden Flüssigkeit über Kapillarkräfte in die Kapillare eingesogen, mit einer Pipette aufgenommen und in die Kapillare pipettiert oder unter Verwendung des Fluidik-Systems in die Kapillare eingebracht werden. Alle drei Varianten haben sich als praktikabel erwiesen. Erstere ist insbesondere dann gut zu verwenden, wenn der Flüssigkeitsdruck hoch ist, letztere eignet sich besonders gut für Proben, deren

Durchmesser ähnlich der Größe des Innenrechtecks der Kapillare ist. Alle in dieser Arbeit vorgestellten Untersuchungen erfolgten in einer Flüssigkeit als Probenumgebung.

Zur Vermessung einer Probe in Gel (z. B. Agarose) gibt es zwei Möglichkeiten der Probenaufnahme: Befindet sich die Probe bereits in verfestigtem Gel, so kann diese mit der Kapillare aus dem Gel ausgestochen werden. Diese Technik wurde für eine in [63] veröffentlichte Messung genutzt. Muss die Probe zunächst in das noch flüssige Gel eingebracht werden, so kann die Probenaufnahme – direkt nach dem Einbringen der Probe in das Gel – nach der gleichen Vorgehensweise wie bei Flüssigkeiten erfolgen.

Ein Vorteil der Probeneinbettung in Agarose ist, dass die somit fixierte Probe in der rechteckigen Kapillare aus vier Ansichten betrachtet werden kann (siehe auch [63]). Wichtig ist dabei allerdings, dass sich die Probe im Zentrum der Kapillare (in Bezug auf deren Querschnitt) bzw. im Mindestabstand von 50 µm zu den Wandungen befindet, die während der Aufnahme senkrecht zur Ausbreitungsrichtung der Lichtscheibe stehen. Andernfalls können – je nach Ansicht – Streuung und Reflexionen an der Wandung die Bildqualität beeinträchtigen.

Bei Messungen in flüssigen Medien spielt dieser Umstand eine untergeordnete Rolle, da die Probe jederzeit, durch entsprechendes Neigen der Kapillare, an den gewünschten Ort gebracht werden kann. Bei Einbettung in Agarose ist ein nachträgliches Positionieren der Probe in der Kapillare bezüglich ihres Abstandes zu den Wandungen nicht mehr möglich.

Bezüglich der Einfachheit der Probenapplikation und der Flexibilität das Umgebungsmedium der Probe betreffend, stellen rechteckige Glaskapillaren somit einen bedeutenden Vorteil gegenüber anderen Systemen zur Lichtscheibenmikroskopie dar. In diesen werden häufig Gel-Zylinder (Agarose u.a. [24, 43, 49, 93, 106], Phytagel u.a. [57]) als Probenträger verwendet, die wiederum in eine mit wässrigem Medium gefüllte Probenkammer eingetaucht werden. In den meisten Fällen handelt es sich somit beim direkt die Probe umgebenden Medium um Gel [24, 43, 49, 93, 106]. Lorenzo *et al.* (2011) beschreiben hingegen ein relativ komplexes Probenträger-System für Zellsphäroide in einem, mit einer Flüssigkeit gefüllten, Hohlraum in einem Gel-Zylinder. Ferner gibt es Ansätze, bei welchen größere Proben an einem Haken [106] oder Stab [76] befestigt werden und direkt in eine, mit Flüssigkeit gefüllte, Probenkammer eintauchen.

Glaskapillaren als Einwegartikel mit geringem Fassungsvermögen

Bei den im vorhergehenden Abschnitt aus der Fachliteratur referenzierten Ansätzen zur Probenhalterung in der Lichtscheibenmikroskopie, erfolgt die Nähr-, Farb- oder Wirkstoffversorgung der Probe während der Messung über das Fluten der Probenkammer. Das Fassungsvermögen solcher Probenkammern liegt üblicherweise im Bereich

einiger Milliliter. Als Beispiel sei die Probenkammer des kommerziell erhältlichen Lichtscheibenmikroskops Lightsheet Z.1 (Carl Zeiss Microscopy GmbH, Jena) [106] genannt, die ein Volumen von 15 ml fasst [8].

Neben diesen großen notwendigen Volumina liegt ein weiterer Nachteil in der Kontaminierung der wiederzuverwendenden Komponenten. Hierzu zählen die Probenkammer selbst sowie die eintauchenden, wassergekoppelten Objektive (nur Detektionsobjektiv wassergekoppelt u.a. in [24, 43, 57, 93, 96, 106], Beleuchtungs- sowie Detektionsobjektive wassergekoppelt in [49]).

Die im Rahmen der vorliegenden Arbeit genutzten Glaskapillaren sind Einwegartikel und isolieren die Probe von Optiken, sodass keine Gefahr der Kontamination besteht. Die verwendeten Glaskapillaren weisen ein Fassungsvermögen von 18 µl auf. Dieses deutlich geringere Fassungsvermögen der Glaskapillaren gegenüber den Probenkammern stellt in mehrerlei Hinsicht einen Vorteil dar: Zum einen bedeuten kleinere Volumina geringere Kosten, da der Verbrauch von Medien sowie Farb- und Wirkstoffen niedriger ist. Zum anderen kann die Flüssigkeit in der Kapillare während der Messung wesentlich schneller ausgetauscht werden, was insbesondere bei schnell ablaufenden Reaktionen von Bedeutung sein kann.

Fluidik

Für Messungen die unter Flussbedingungen stattfinden, wird die Kapillare an ein Fluidik-System [11, 78] angeschlossen. Das notwendige Flüssigkeitsvolumen variiert je nach Pumpgeschwindigkeit und Konfiguration des Systems (vgl. Abbildung 16) zwischen 300 µl (geschlossenes System) und bis zu 10 ml (offenes System). Für die hier vorgestellten Messungen unter Flussbedingungen im offenen System liegt die verwendete Flüssigkeitsmenge bei ca. 2 ml.

Kapillarhalterung

Die Positionierung der Kapillare in x- und y-Richtung erfolgt mit dem Positioniertisch des Mikroskops, an welchen die Kapillarhalterung angebracht wird (vgl. Abbildung 14 und Abbildung 15). Eine Vorrichtung zur Bewegung der Probe entlang der Detektionsachse (z-Richtung) ist nicht notwendig, da zur Aufnahme von Bilderstapeln die Fokusebene des Detektionsobjektivs synchron mit der Lichtscheibe durch die Probe hindurch verfahren wird.

In anderen Lichtscheibenmikroskopen (u.a. [24, 43, 49, 57, 76, 93, 106]) ist der Probenträger an einer Positioniereinheit befestigt, welche die Bewegung der Probe in x-, y- und z-Richtung sowie die Rotation der Probe um die Längsachse (z-Achse) erlaubt. Die

Längsachse des Probenträgers befindet sich dabei jeweils in Richtung der Gravitation, die Beleuchtungs- und Detektionsachse stehen senkrecht zu dieser. In diesen Lichtscheiben-mikroskopen ist die Probenverschiebung in z-Richtung essentiell, da zur Aufnahme von Bilderstapeln die Probe durch die Fokus- bzw. Lichtscheibenebene hindurch bewegt wird, während die Objektive zur Anregung und Detektion ihre Position beibehalten.

Probenrotation

Am Rande dieser Promotionsarbeit wurde ein Rotationsmodul [10, 13] entwickelt, welches es erlaubt die Probe in der rechteckigen Kapillare axial zu drehen. Es besteht aus einem Motor, der eine probenführende runde Kapillare in einer mit Immersionsflüssigkeit gefüllten, rechteckigen Kapillare rotiert. Somit kann weiterhin von den vorteilhaften optischen Eigenschaften der rechteckigen Kapillare profitiert werden. Zur Halterung der rechteckigen Kapillare und des Motors wird dieselbe Kapillarhalterung verwendet wie bei der Kopplung der Kapillare an das Fluidik-System (vgl. Abbildung 15).

In Kombination mit der Lichtscheibenmikroskopie oder anderen 3D-Mikroskopiemethoden, wie z. B. der konfokalen Laser Scanning Mikroskopie, ermöglicht die Probenrotation die Aufnahme von Bilderstapeln unter verschiedenen Rotationswinkeln (vgl. [10]). Hierdurch werden ein deutlich größerer Informationsgehalt und eine verbesserte 3D-Darstellung erreicht, als wenn die Probe nur aus einer Richtung betrachtet wird. Dieser Vorteil kommt insbesondere bei komplexeren Proben wie Kleinstlebewesen [10] oder Embryos [u.a. 42, 43] zum Tragen.

Die meisten Lichtscheibenmikroskope verfügen über eine Möglichkeit der Probenrotation [u.a. 24, 42, 57, 93, 106]. Im Unterschied hierzu eignet sich das von Bruns *et al.* (2013) entwickelte Rotationsmodul jedoch nicht nur zur Kombination mit dem hier vorgestellten SPIM-Modul, sondern darüber hinaus auch zur Nutzung an einer Vielzahl kommerzieller inverser und aufrechter Mikroskope. Somit eröffnen sich mit dem Rotationsmodul neue Möglichkeiten für zukünftige Fragestellungen.

Bei den in dieser Arbeit vorgestellten Untersuchungen an nahezu kugelförmigen Zellsphäroiden war eine Probenrotation nicht notwendigerweise erforderlich. Swoger *et al.* (2014a) stellen beispielsweise z-Projektionen aus Bilderstapeln eines Zellsphäroids vor, die in zwölf verschiedenen Ansichten aufgenommen wurden, sich jedoch aufgrund der Beschaffenheit des Sphäroids kaum voneinander unterscheiden. In solchen Fällen gilt es abzuwägen, inwiefern die Aufnahme von Bilderstapeln aus verschiedenen Ansichten tatsächlich einen zusätzlichen Informationsgewinn mit sich bringt. Denn Aufnahmen von verschiedenen Ansichten, setzen die Probe auch einer höheren Lichtbelastung aus, erfordern mehr Messzeit und erzeugen ein enormes Datenvolumen.

5.1.2 SPIM-Modul

Dank des erstellten SPIM-Moduls kann ein bestehendes inverses Mikroskop innerhalb weniger Minuten zu einem Lichtscheibenmikroskop erweitert werden. Somit ergibt sich eine kostengünstige und platzsparende Alternative zu anderen Lichtscheiben-mikroskopen.

Der Hauptvorteil der Lichtscheibenmikroskopie generell gegenüber anderen 3D-Mikroskopiemethoden (z. B. strukturierte Beleuchtung, konfokale Laser Scanning Mikroskopie) besteht darin, dass für jede Einzelschichtaufnahme nur die Probenebene im Fokus beleuchtet und somit die Lichtbelastung der Probe minimiert wird.

Die modulare Erweiterung eines bestehenden Mikroskops bietet daneben die Möglichkeit, sämtliche Funktionen zu nutzen, über welche dieses verfügt. Hierzu zählen unter anderem die Anschlussmöglichkeiten für verschiedene Detektionssysteme wie Kameras oder Spektrometer. Aufgrund der Möglichkeit der Probenbeobachtung durch das Okular, kann die Probe zudem sehr schnell und einfach lokalisiert werden. Dies stellt einen bedeutenden Vorteil gegenüber den meisten okularlosen Lichtscheibenmikroskopen [u.a. 43, 49, 57, 76, 93], wie auch dem kommerziell erhältlichen Lightsheet Z.1 [106], dar.

Das SPIM-Modul ist zum Anschluss frei wählbarer Laserdioden oder fasergekoppelter Laser – jeweils mit Kollimationsoptik – ausgelegt. Die optischen Komponenten sind für Wellenlängen im sichtbaren Bereich optimiert.

Strahlaufweitung

Zur Strahlaufweitung wird im hier vorgestellten Aufbau des SPIM-Moduls ein Kepler-Teleskop, bestehend aus zwei Sammellinsen, verwendet (vgl. Abbildung 18). Alternativ kann zur Strahlaufweitung ein Galilei-Teleskop aus einer Zerstreuungslinse kurzer Brennweite und einer Sammellinse langer Brennweite genutzt werden [12]. In diesem Fall verkürzt sich die Baulänge des Teleskops und somit des Gesamtaufbaus um die doppelte Brennweite der Linse mit der höheren Brechkraft. Da diese Brennweite mit 15 mm jedoch relativ gering ist und weder die Dicke der Lichtscheibe noch die Qualität der Fluoreszenzaufnahmen durch die Art des Teleskops beeinflusst werden, spielt die Wahl – Kepler- oder Galilei-Teleskop – in diesem Fall eine untergeordnete Rolle.

Eine weitere Möglichkeit, das System zur Strahlaufweitung in seiner Baulänge zu verkürzen, ist die Nutzung einer fasergekoppelten Lichtquelle mit nachfolgender Kolli-mationslinse. Die Baulänge wird dann durch die Brennweite der Linse und die numerische Apertur des Lichtleiters bestimmt. Je größer die numerische Apertur, desto kleiner ist die notwendige Brennweite, um den gewünschten Strahldurchmesser zu erreichen.

Strahlfokussierung

Der aufgeweitete Laserstrahl trifft auf eine Zylinderlinse, welche die Lichtscheibe erzeugt. Die Zylinderlinse muss aufgrund der Dispersion wellenlängenabhängig positioniert werden, sodass sich die Strahltaille jeweils zentral über dem Detektionsobjektiv befindet. Diese Positionierung ist sehr einfach durchzuführen. Es wird lediglich die Zylinderlinse, die an einem Stangensystem gehaltert ist, entlang der optischen Achse verschoben, bis die Strahltaille, die in einer fluoreszierenden Lösung beobachtet wird, an der gewünschten Stelle liegt.

Im Gegensatz zu anderen Lichtscheibenmikroskopen [17, 26, 34, 57] wird bei dem in dieser Arbeit vorgestellten SPIM-Modul kein Objektiv im Beleuchtungsstrahlengang genutzt.

Zur Untersuchung möglicher Verbesserungen durch den Einsatz eines Objektivs wurde dem Lichtweg folgend hinter dem Umlenkspiegel ein 2,5-fach vergrößerndes Objektiv mit einer numerischen Apertur von 0,075 so eingebracht, dass die Strahltaille, der durch die Zylinderlinse erzeugten Lichtscheibe, in dessen Aperturblende lag.

Aufnahmen von Sphäroiden der Zelllinie CHO-pAcGFP1-Mem zeigten jedoch – im Vergleich mit Aufnahmen der gleichen Sphäroide ohne Objektiv im Beleuchtungs-strahlengang – keine Verbesserung der Bildqualität [12].

Die Verwendung eines Objektivs höherer Apertur im Beleuchtungsstrahlengang ermöglicht die Erzeugung einer dünneren Lichtscheibe (vgl. Gleichung (7)). Dies hat jedoch ebenfalls zur Folge, dass die Fokustiefe verringert wird (vgl. Gleichung (8)). Eine kleinere Fokustiefe resultiert in einer inhomogeneren Ausleuchtung der betrachteten Probenebene. Um dem entgegenzuwirken, kann die Probe beidseitig beleuchtet und die Aufnahmen anschließend zu einem Bild verrechnet werden [u.a. 41, 106]. Dies erfordert neben einem komplexeren Aufbau zur Probenbeleuchtung die entsprechenden Software-Funktionen.

Für das kommerziell erhältliche Lichtscheibenmikroskop Lightsheet Z.1 (Carl Zeiss Microscopy GmbH, Jena), in welches eine bidirektionale Probenbeleuchtung implementiert ist, wurden für die Beleuchtung spezielle 5-fach und 10-fach vergrößernde Objektive mit einer numerischen Apertur von 0,1 bzw. 0,2 entwickelt [105]. Damit kann bei einer Anregungswellenlänge von 488 nm die Dicke der Lichtscheibe zwischen 2 und 14 µm eingestellt werden [79]. In anderen Lichtscheibenmikroskopen werden 10-fach vergrößernde Objektive mit einer numerischen Apertur von 0,2 [34], 0,25 [57], 0,28 [74], und 0,3 [17, 26, 41] im Beleuchtungsstrahlengang verwendet.

Von besonderem Vorteil ist die Verwendung eines Objektivs im Beleuchtungsstrahlengang, wenn die geringere Fokustiefe eines Detektionsobjektivs höherer numerischer Apertur optimal genutzt werden soll. Dennoch kann – selbst wenn die Lichtscheibendicke größer ist als die Fokustiefe des Detektionsobjektivs – mit Lichtscheibenmikroskopie eine deutlich bessere Auflösung erreicht werden als mit Weitfeldmikroskopie. Dies gilt insbesondere bei dicken fluoreszierenden Proben wie Zellsphäroiden. Der Grund hierfür ist, dass in der Praxis die Auflösung vom Bildkontrast beeinflusst wird [91]. Huisken *et al.* (2004) beschreiben eine Verbesserung des Bildkontrasts um bis zu 50 % gegenüber Weitfeldbeleuchtung bei Schichtaufnahmen einer 500 µm dicken Probe, bei Beleuchtung mit einer 10 µm dicken Lichtscheibe.

Alternativ zur Lichtscheibenerzeugung mittels Zylinderlinse [17, 26, 34, 43, 57, 76, 77, 106] kann ein scannender Laserstrahl zur selektiven Beleuchtung einer Probenebene genutzt werden [5, 24, 47, 49, 61, 90, 96]. Es wird beschrieben, dass eine Lichtscheibe, erzeugt durch einen scannenden Laserstrahl, weniger Artefakte im Fluoreszenzbild hervorruft als eine statische Lichtscheibe, erzeugt durch eine Zylinderlinse [24]. Während in [5] ein relativ einfacher Aufbau mit einem scannenden Gaußstrahl als Erweiterung für ein inverses Mikroskop dargestellt wird, zeigen Fahrbach und Rohrbach (2010) einen deutlich komplexeren und raumgreifenderen Aufbau. Dieser dient, wie das hier vorgestellte SPIM-Modul, ebenfalls als Erweiterung für das inverse Mikroskop Axiovert 200M. Die Lichtscheibe wird durch einen scannenden, sich selbst rekonstruierenden Besselstrahl generiert. Diese Art der Lichtscheibenerzeugung liefert sehr gute Ergebnisse in Bezug auf eine Reduktion der Lichtstreuung in der Probe [24].

Zwei-Wellenlängen-Anregung

Das SPIM-Modul bietet die Möglichkeit zwei Lichtquellen anzuschließen und somit die Probe gleichzeitig oder im schnellen Wechsel mit zwei unterschiedlichen Wellenlängen zu beleuchten und Fluoreszenz anzuregen.

Zum Ausgleich der chromatischen Aberration ist der Lichtquelle, die das langwelligere Licht emittiert, ein einstellbares Linsensystem nachgeschaltet (siehe Abbildung 20). Soll die hiermit einhergehende Vergrößerung des Gesamtmoduls (im aktuellen Aufbau ca. 10 cm) vermieden werden, können alternative Methoden zur Minimierung der chromatischen Aberration genutzt werden. Eine Möglichkeit wäre, sämtliche Linsen der Basisausführung des SPIM-Moduls durch Achromate zu ersetzen. Alternativ könnten die Glassorten der Linsen im Teleskop zur Strahlaufweitung so gewählt werden, dass ein achromatisches Linsensystem aus einer Zerstreuungs- und einer Sammellinse entsteht, welches in Kombination mit einer achromatischen Zylinderlinse genutzt wird.

Letztere Vorgehensweise ist jedoch schwierig zu realisieren, da – aufgrund der großen, für die Strahlaufweitung notwendigen, Brennweitendifferenz – ein sehr kleines Verhältnis der Abbe‘schen Zahlen der Glassorten erforderlich ist, um die chromatische Aberration auszugleichen (vgl. Abschnitt 2.1.1). Des Weiteren ist bei den Alternativen zum zusätzlichen Linsensystem zu beachten, dass die Dispersion im UV-nahen und niedrigen sichtbaren Wellenlängenbereich stärker ausgeprägt ist als bei höheren Wellenlängen. Dies erschwert die Korrektur der chromatischen Aberration durch Achromate in diesem Bereich. Beide Varianten würden Farbfehler außerdem nur für zwei ausgewählte Wellenlängen eliminieren. Beim Einsatz des zusätzlichen Linsensystems hingegen, kann die Brennweitendifferenz für zwei beliebige Wellenlängen im sichtbaren Bereich ausgeglichen werden.

Die Positionierung der Strahltaillen ist auch bei Verwendung des SPIM-Moduls mit zwei Wellenlängen sehr schnell zu erlernen und einfach handhabbar. Gleiches gilt für die Positionierung der Lichtscheiben entlang der Detektionsachse (z-Achse) in Bezug auf die Fokusebene des Objektivs.

Synchrone Verschiebung von Fokusebene und Lichtscheibe

In der Lichtscheibenmikroskopie ist es entscheidend, dass die Lichtscheibe in der Fokusebene des Detektionsobjektivs liegt.

Um Bilderstapel einer Probe aufzunehmen, gibt es in der Lichtscheibenmikroskopie drei Möglichkeiten. Im häufigsten Fall wird die Probe entlang der Detektionsachse verfahren, während die Lichtscheibe und das Detektionsobjektiv ihre Position beibehalten (u.a. [5, 24, 49, 57, 77]). Ebenso können die Lichtscheibe und das Detektionsobjektiv verfahren werden [11], während die Probe ihre Position beibehält. Bei der dritten Variante wird die Lichtscheibe verfahren und die Objektweite des Detektionsobjektivs mit einer elektrisch einstellbaren Linse entsprechend angepasst [26]. Letztere Methode stellt gegenüber den erstgenannten einen Vorteil bei der Nutzung flüssigkeitsgefüllter Probenkammern, in die eine, meist in Agarose gelagerte, Probe und ein Wasserimmersionsobjektiv eintauchen, dar. Denn insbesondere bei Hochgeschwindigkeitsaufnahmen sollte aufgrund der hohen Viskosität des Agarosezylinders eine schnelle Bewegung desselbigen ebenso vermieden werden, wie Flüssigkeitsbewegungen beim Verfahren des Wasserimmersionsobjektivs [26].

Bei der in dieser Arbeit vorgestellten Art der Probenhalterung stellt das Verfahren von Lichtscheibe und Detektionsobjektiv zur Aufnahme von Bilderstapeln hingegen keinen Nachteil dar, da die Probe von deren Bewegung entkoppelt ist.

Zum synchronen Verfahren von Lichtscheibe und Detektionsobjektiv wird die beweglich gehalterte Einheit des SPIM-Moduls (Zylinderlinse und Umlenkspiegel), und damit die Lichtscheibe, mit der im Mikroskop bereits vorhandenen Mechanik für den Objektivhub gekoppelt. Eine separate Verschiebeeinheit – zur Bewegung der Probe entlang der Detektionsachse – ist somit nicht notwendig.

Da sich das Detektionsobjektiv in Luft und die Fokusebene in einer wässrigen Flüssigkeit bzw. der Probe befindet, entspricht die Verschiebung des Detektionsobjektivs nicht der Verschiebung der Fokusebene (vgl. Abbildung 21). Ein Hebelmechanismus an der Koppelstelle von Objektivrevolver und beweglicher Einheit des SPIM-Moduls bewirkt, dass die Lichtscheibe entsprechend der Fokusverschiebung um einen größeren Weg verschoben wird als das Objektiv selbst. In einer ersten Version ist dieser Hebel für Detektionsobjektive mit einer numerischen Apertur von 0,3 und das Brechungsindex-verhältnis von Luft und Wasser optimiert. Die erweiterte Version (vgl. Abbildung 23) bietet die Möglichkeit, die Hebelwirkung nach Bedarf – entsprechend der Brechungsindizes und der numerischen Apertur des Detektionsobjektivs – einzustellen.

Alternativ könnte die Lichtscheibe mit einem Piezoaktor geführt werden, welcher über eine Software-Schnittstelle mit der Objektivverschiebung des Mikroskops synchronisiert ist. Dies würde allerdings, neben einem höheren finanziellen Aufwand, die Möglichkeit erfordern, die Steuersoftware des Piezoaktors in die Software des Mikroskop-Herstellers zu integrieren.

5.1.3 Ratio Imaging Modul

Das Detektionsmodul wurde für das Echtzeit Ratio Imaging (genetisch codierter) fluoreszierender Sensorproteine entwickelt, deren Anregungsspektrum in Abhängigkeit ihres Redoxzustands variiert, während der Spektralbereich der Emission unverändert bleibt. Es eignet sich jedoch ebenso zum Calcium Imaging oder – bei entsprechender Modifikation des Aufbaus – zur bildgebenden Messung der Fluoreszenzlebensdauer.

Im Gegensatz zu herkömmlichen Systemen für das Ratio Imaging zur Messung von Calcium-Ionen [67] oder Änderungen des Redoxgleichgewichts [33], ermöglicht die hier vorgestellte Methode die gleichzeitige Aufnahme der Bilder, die ins Verhältnis gesetzt werden sollen – mit einer Kamera und ohne den Einsatz schnell rotierender mechanischer Filterräder.

Bei herkömmlichen Systemen zum Ratio Imaging werden die Fluoreszenzbilder üblicherweise sequentiell aufgenommen [33, 36, 92]. Die zeitliche Verzögerung, der die Aufnahme von Bildern mit unterschiedlichen Anregungswellenlängen unterliegt, bewegt

sich zwischen drei Sekunden [92] und einer Minute [33]. Bei sehr langsam ablaufenden Prozessen stellt dieser zeitliche Versatz kein Problem dar. Soll jedoch der zeitliche Verlauf schnell ablaufender Prozesse möglichst präzise dokumentiert werden, stoßen diese Systeme an ihre Grenzen. Dies zeigt sich eindrucksvoll bei Betrachtung der Änderung des Redoxgleichgewichts aufgrund der Oxidation mit Wasserstoffperoxid (vgl. Abbildung 49). Mit dem in [33] beschriebenen System könnten lediglich zwei Bilder aufgenommen werden, bevor Sättigung erreicht ist. Das hier vorgestellte Ratio Imaging Modul erlaubt hingegen die Aufnahme von Fluoreszenzbildern alle fünf Sekunden. Dies resultiert in 18 möglichen Messpunkten, bevor bei etwa 90 Sekunden Sättigung erreicht ist. Insbesondere bei schnell ablaufenden Prozessen ist deshalb davon auszugehen, dass mit der hier vorgestellten Aufnahmetechnik präzisere Ergebnisse zum Reaktionsverlauf erzielt werden können. Die Limitierung von mindestens 5 s zwischen den Bildaufnahmen, ist durch die Steuersoftware des Kamerasystems gegeben. Mit einer komfortableren Softwarelösung könnte diese Zeit weiter reduziert werden.

Das Ratio Imaging Modul wurde zur Verwendung in Kombination mit dem SPIM-Modul an einem inversen Mikroskop erstellt. Aufgrund der vom SPIM-Modul vorgegebenen Beleuchtungsart eignet sich das Ratio Imaging Modul in dieser Kombination in erster Linie zur Untersuchung größerer dreidimensionaler Proben wie Zellsphäroiden. Prinzipiell ist die Aufnahmetechnik jedoch ohne weiteres mit anderen Methoden der Weitfeldmikroskopie, beispielsweise auch mit der strukturierten Beleuchtung [35, 65], kombinierbar und eignet sich somit ebenso für Messungen an Einzelzellen. Entscheidend ist letztlich nur, dass die Probenbeleuchtung quasi simultan mit zwei gepulsten Lichtquellen erfolgt, die entsprechend mit einer, im Nanosekundenbereich schaltbaren, Kamera synchronisiert sind. Das Ratio Imaging Modul selbst wird lediglich an einen Detektionsausgang des gewünschten Mikroskops angebracht.

Dual-View Modul mit speziellem Einschub

Die Verwendung des Dual-View Moduls mit speziell gefertigtem Einschub bietet den Vorteil, dass Mikroskop- und Kameraanschluss gegeben sind, sowie das optische System in diesem genutzt werden kann. Allerdings wird das Licht aufgrund der geometrischen Verhältnisse unter einem Winkel von 45° nach oben, bezogen auf die optische Achse im Dual-View, in das Faserbündel ein- und ausgekoppelt (vgl. Abbildung 24 und Abbildung 26). Diese Anordnung geht mit erschwerter Justage der optischen Komponenten zur Lichteinkopplung in das bildübertragende Faserbündel und zur Rückführung des verzögerten Bildes in das Dual-View Modul einher.

Die Schwierigkeit der Positionierung des Strahlteilerwürfels und des Einkoppelspiegels (vgl. Abbildung 27) besteht darin, diese und die jeweiligen Halterungen der abbildenden Linse sowie des Faserkopfes so zueinander auszurichten, dass sie sich jeweils auf derselben optischen Achse befinden. Ist dies nicht der Fall, kann Verzeichnung auftreten. Die optimale Einstellung erfolgt bei Durchlichtbeleuchtung unter Zuhilfenahme des Objektträgers mit Rastermarkierung als Testprobe.

Ein zweiter kritischer Punkt liegt in der Justage der beiden Fluoreszenzbilder auf dem Kamerasensor. Um die Fluoreszenzbilder einer einzelnen Ebene miteinander verrechnen zu können, müssen – insbesondere für die Division einzelner Pixel zur ortsaufgelösten Darstellung des Redoxgleichgewichts – die Bilder auf dem Kamerasensor möglichst gleich groß sein (zur Vorgehensweise siehe Abschnitt 3.3.3). Ist dies nicht der Fall, entstehen bei der Verrechnung Fehlinformationen. Gleiches gilt, wenn die Bilder unterschiedliche Neigungswinkel aufweisen. Der Neigungswinkel des verzögerten Bildes lässt sich – durch Rotation der frei drehbaren Faserbündelaustrittsfläche, welche auf den Kamerasensor abgebildet wird – relativ leicht justieren (vgl. Abbildung 30).

In einer zweiten Version des Ratio Imaging Moduls könnte dessen Robustheit verbessert werden, indem statt der Verwendung des Dual-View Moduls ein eigener optischer Aufbau erstellt wird, der die Aus- und Einkopplung zur Bildverzögerung unter 90° in der horizontalen Ebene der optischen Achse des Seitenanschlusses des Mikroskops erlaubt.

Bildverzögerung

Zur Bildverzögerung wird ein bildübertragendes Glasfaserbündel eingesetzt. Dies bringt in erster Linie den Vorteil mit sich, ein geschlossenes System zu sein, welches trotz seiner Länge von 2,3 m platzsparend im Aufbau integriert werden kann (siehe Abbildung 24).

Alternativ zur Bildverzögerung mittels eines geordneten Glasfaserbündels, könnte die Bildverzögerung im Freistrahl über ein System aus Linsen und Spiegeln realisiert werden. In diesem Fall ist die Wegstrecke, die das Licht durchlaufen muss, um 12,5 ns verzögert zu werden, mit 3,75 m jedoch deutlich länger als bei Verwendung des Faserbündels. Dieser Unterschied ergibt sich aus dem Verhältnis der Brechungsindizes von Luft und dem lichtführenden Kern der Einzelfasern im Bündel (siehe auch Abschnitt 3.3.2).

Um diese Wegstrecke zu überbrücken, wäre ein relativ komplexes System aus einer Vielzahl optischer Komponenten notwendig. Dadurch würde sich zum einen der Justageaufwand erhöhen und zum anderen erforderte dieses System einen deutlich raumgreifenderen Aufbau aus einer Aneinanderreihung telezentrischer Linsensysteme sowie Spiegeln zur Faltung des Strahlengangs.

Auch hinsichtlich der Transmission im Lichtweg des verzögerten Bildes brächte die Freistrahlvariante aufgrund der vielen notwendigen optischen Komponenten keinen Vorteil. Bei einer durchaus realistischen Zahl von zehn bis zwölf benötigten Linsen mit einer angenommenen Transmission von 90 %, läge die Transmission des verzögernden Systems zwischen 28 und 35 %; die begrenzte Reflektivität notwendiger Spiegel noch nicht mit eingerechnet. Im Vergleich hierzu konnte bei Verwendung des Glasfaserbündels die Transmission im verzögernden Lichtweg zu ca. 33 % bestimmt werden (siehe hierzu Abschnitt 3.3.2 und Abschnitt 4.3.1).

Fluoreszenzdetektion

Bei der hier vorgestellten Methode zum Ratio Imaging mit simultaner Bildaufnahme wird – im Gegensatz zu Ratio Imaging Systemen, die auf sequentieller Bildaufnahme beruhen – nur ein relativ geringer Anteil der angeregten Fluoreszenz detektiert. Dies ist zum einen dem geschuldet, dass aufgrund der Strahlteilung jeweils nur 50 % des Fluoreszenzlichts in Richtung der Kamera transmittiert bzw. durch das Glasfaserbündel verzögert werden. Zum anderen ist die maximal mögliche Öffnungszeit der Kamera mit einer Nanosekunde so kurz, dass – ausgehend von einer für grün fluoreszierende Proteine üblichen Fluoreszenzabklingzeit von etwa 3 ns – nur etwa 28 % der von einem Laserpuls angeregten Fluoreszenz in dieser Nanosekunde detektiert werden. Letztere Limitierung wäre mit neuen Kamera-Systemen mit längeren Öffnungszeiten zu umgehen. Die verbleibende Fluoreszenzintensität zum Zeitpunkt der Anregung durch den folgenden Laserpuls, also nach 12,5 ns, beläuft sich – wiederum ausgehend von einer Fluoreszenzlebensdauer von etwa 3 ns – auf weniger als 2 %. Bei Aufnahmen der Fluoreszenzintensität mit dem Ratio Imaging Modul entstehen bezüglich des Übersprechens somit Fehler in dieser Größenordnung.

Bildqualität und Auflösung

Die Auflösung des Ratio Imaging Moduls wird bei den im aktuellen Aufbau verwendeten Komponenten durch den CCD-Sensor der Kamera begrenzt. Bei Verwendung eines 20-fach vergrößernden Objektivs mit einer numerischen Apertur von 0,5 entspricht ein Kamerapixel im Bild 1 µm. Damit ist die Kameraauflösung schlechter als die des Objektivs, für welches sich mit einer Detektionswellenlänge von 520 nm eine laterale Auflösung von 0,63 µm ergibt.

Um eine Beeinträchtigung der Bildqualität durch das bildübertragende Faserbündel zu minimieren, wird das Fluoreszenzbild vergrößert auf die Eintrittsfläche des Bündels abgebildet, während die Austrittsfläche wiederum verkleinert auf den Kamerasensor abgebildet wird. Durch dieses Vorgehen wird die Pixelstruktur des Bündels besser

ausgenutzt, als wenn die Abbildung auf die Eintrittsfläche des Faserbündels im gleichen Maßstab erfolgen würde wie die direkte Abbildung auf den Kamerasensor. Bei dieser Art der Abbildung entspricht ein Pixel (Einzelfaser) der Endfläche des Faserbündels ca. 0,6 µm im Bild und damit in etwa der lateralen Auflösung des Objektivs. Da ein Kamerapixel 1 µm entspricht, wird die Pixelstruktur des Faserbündels nicht aufgelöst und beeinträchtigt daher die Bildqualität nicht. Die Bildqualität des direkt transmittierten und des durch das Glasfaserbündel verzögerten Bildes ist bezüglich der Auflösung und Artefakten nahezu identisch.

Würde das Fluoreszenzbild im gleichen Maßstab auf die Eintrittsfläche des Faserbündels abgebildet wie auf die Sensorfläche der Kamera, so müsste die Abbildung der Austrittsfläche des Bündels im Maßstab 1 : 1 auf den Kamerasensor erfolgen. Da die Pixel des Kamerasensors mit 9,9 µm × 9,9 µm und die des Faserbündels mit 10 µm nahezu gleich groß sind, ist die Entstehung unerwünschter Interferenzen der beiden Strukturen und damit störender Artefakte im Bild wahrscheinlich.

5.2 Ergebnisse

5.2.1 Lichtscheibenfluoreszenzmikroskopie mit SPIM-Modul

Charakterisierung der Lichtscheibe

Die errechneten Dicken der Lichtscheiben bei beugungsbegrenzter Abbildung betragen 5,9 µm und 4,9 µm für die Wellenlängen 470 nm und 391 nm (vgl. Tabelle 4). Diese Werte entsprechen 74 % bzw. 70 % der im Experiment ermittelten Lichtscheibendicken von 8 µm bzw. 7 µm (vgl. Abbildung 37). Dieser Unterschied zwischen Theorie und Praxis ist vermutlich darauf zurückzuführen, dass die Abbildung nicht beugungsbegrenzt, sondern durch sphärische Aberration begrenzt ist. Dieser Fall tritt auf, da der Schnittpunkt von Strahlen im paraxialen Raum des parallel einfallenden Bündels weiter von der Linse entfernt liegt als jener der achsfernen Strahlen. Dadurch entsteht – statt eines beugungsbegrenzten Brennpunkts – ein verbreiterter in die Länge gezogener Brennfleck.

Hiermit lässt sich auch die Differenz zwischen gemessener und berechneter Fokustiefe erklären. Die errechneten Werte liegen bei 97,7 µm für die Wellenlänge 470 nm und bei 81,3 µm für die Wellenlänge 391 nm (vgl. Tabelle 4). Anhand von Abbildung 37 lässt sich – bezogen auf die jeweilige Strahltaille – bei der Wellenlänge 470 nm über einen Bereich von 100 µm eine Verbreiterung von 12,5 % ermitteln, bei der Wellenlänge 391 nm beträgt die Verbreiterung 14,3 %. Dies bedeutet, dass eine Verbreiterung um 20 % erst im Bereich zwischen 150 und 200 µm um die Strahltaille erreicht wird. Damit ist dieser

Bereich etwa doppelt so groß wie der theoretische Wert. Die sphärische Aberration hat somit im Hinblick auf die Fokustiefe einen durchaus positiven Einfluss: Sie ermöglicht eine homogenere Ausleuchtung der betrachteten Probenebene.

Ferner beeinflussen höchst wahrscheinlich auch Streueffekte in der fluoreszierenden Lösung, die zur Sichtbarmachung der Lichtscheibe dient, deren messbare Dicke. Die etwas größere Abweichung vom theoretischen Wert bei der Wellenlänge 391 nm ließe sich dann damit erklären, dass kurzwelliges Licht stärker gestreut wird als langwelliges.

Reflexionen an der Kapillarkante beeinflussen ebenfalls die messbare Dicke der Lichtscheibe, da die Lichtscheibe, um 90° gedreht, hier vertikal statt horizontal auf die Kapillare trifft. Um diesen Störeffekt zu minimieren, wird die Breite der Lichtscheibe durch einen Spalt, eingebracht zwischen Umlenkspiegel und Kapillare, auf 220 µm begrenzt (vgl. Abbildung 19).

Bildqualität

Zur Beurteilung der Bildqualität werden Fluoreszenzbilder einzelner Sphäroidebenen, aufgenommen mit Lichtscheibenmikroskopie, unter Einsatz des SPIM-Moduls, und konfokaler Laser Scanning Mikroskopie, miteinander verglichen. Als Probe dienen Sphäroide aus CHO Zellen, die ein membranständiges grün fluoreszierendes Protein exprimieren. Bei den Aufnahmen mit beiden Verfahren sind die Membranstrukturen der Einzelzellen im Sphäroid gut zu erkennen.

Es fällt auf, dass bei Verwendung der konfokalen Laser Scanning Mikroskopie der innere Bereich der aufgenommenen Probenebene deutlich dunkler ist als bei Einsatz der Lichtscheibenmikroskopie. Dies ist auf die geringere Eindringtiefe des Lichts – vermutlich aufgrund der höheren Beleuchtungsapertur – bei der konfokalen Laser Scanning Mikroskopie zurückzuführen. Während die Beleuchtungsapertur bei den hier vorgestellten Aufnahmen, bestimmt durch das verwendete Objektiv, bei 0,3 liegt, beträgt die Beleuchtungsapertur des SPIM-Moduls nur 0,08.

Ferner ist beim Vergleich der beiden Methoden hervorzuheben, dass zwar für eine Einzelschichtaufnahme die gleiche Lichtexposition erfolgt, diese sich bei den CLSM-Aufnahmen jedoch mit der Anzahl der aufgenommenen Ebenen aufsummiert, da für jede Aufnahme das gesamte Sphäroid der Bestrahlung ausgesetzt ist und nicht, wie bei der Lichtscheibenmikroskopie, nur die jeweils aufgenommene Ebene.

Im Vergleich zu den CLSM-Aufnahmen (Abbildung 39) weisen die SPIM-Aufnahmen (Abbildung 38) Artefakte in Form von Streifen auf, die in Beleuchtungsrichtung – in erster Linie aufgrund von Abschattung – entstehen. Absorption und Streuung beeinträchtigen die

Bildqualität ebenfalls in Abhängigkeit der Transparenz der Probe und der Position der aufgenommenen Schicht in Bezug auf die dem Objektiv zugewandte Probenseite. Je größer der Abstand dieser Probenseite zur Fokusebene ist, desto deutlicher wird die Beeinträchtigung der Bildqualität durch Unschärfebereiche im Inneren und an der der Beleuchtungsrichtung abgewandten Probenseite.

Die Streifenbildung kann durch sogenanntes *Pivoting* der Lichtscheibe reduziert werden [41]. Beim *Pivoting* wird die Lichtscheibe in der Ebene der Lichtausbreitung mithilfe eines Resonanzspiegels mit einer Frequenz von 1 kHz über einen Winkel von 10° gescannt, sodass das Licht unter verschiedenen Winkeln auf die Probe trifft [41]. Bei der Bildintegration mitteln sich die Streifen weitgehend heraus [41]. Dieses Verfahren wird als sogenannter *Pivot Scan* im Lichtscheibenmikroskop Lightsheet Z.1 eingesetzt [79]. Bei wenig transparenten Proben wie Zellsphäroiden kann die Streifenbildung jedoch auch hiermit nicht vollständig unterbunden werden.

Eine Alternative zum *Pivot Scan* stellt die nachträgliche Bearbeitung der Aufnahmen mittels mathematischer Algorithmen dar [27, 57]. Abbildung 40 zeigt anschaulich, dass die Streifen in diesem Beispiel völlig entfernt werden konnten. Es hat sich jedoch herausgestellt, dass sich die Algorithmen nicht bei allen SPIM-Aufnahmen entsprechend leicht anwenden lassen bzw. es sehr zeitaufwendig sein kann, die individuellen Parameter für die Algorithmen zu finden. Demnach gilt es abzuschätzen, inwiefern streifenfreie Bilder einen Mehrwert darstellen bzw. mehr relevante Bildinformation liefern.

Der abnehmenden Fluoreszenzintensität sowie der zunehmenden Unschärfe der Strukturen mit fortschreitender Lichtausbreitung in der Probe, kann mit bidirektionaler Beleuchtung entgegengewirkt werden [41, 49, 96]. Ein weiterer Vorteil, den diese Methode mit sich bringt, ist, dass eine geringere Fokustiefe der Lichtscheibe [41] bzw. des gescannten Laserstrahls [49, 96] ausreicht, da die betrachtete Probenebene nur zur Hälfte optimal ausgeleuchtet werden muss. Somit kann die Probe mit einer dünneren Lichtscheibe bzw. kleineren Strahltaille beleuchtet werden, um die axiale Auflösung zu verbessern [41]. Zwei Bilder, aufgenommen aus entgegengesetzten Beleuchtungs-richtungen, werden dann zu einem Bild verrechnet.

Bilderstapel und 3D-Rekonstruktion

Anhand von zwei Beispielen (Abbildung 41 und Abbildung 42) konnte gezeigt werden, dass das SPIM-Modul die automatische Aufnahme von Bilderstapeln (z-Stapeln) mithilfe der Mikroskop-Software ermöglicht. Für diese Aufnahmen werden das Mikroskopobjektiv und die Lichtscheibe synchron verfahren. Bei der Einstellung des Inkrements ist auf die optische Wegdifferenz beim Passieren von Medien unterschiedlicher Brechungsindizes zu

achten und der Wert, um den sich aus dem Öffnungswinkel des Objektivs und den Brechungsindizes ergebenden Faktor, zu korrigieren. Somit ist gewährleistet, dass die Fokusebene um das Inkrement verfahren wird, in dem Bilder aufgenommen werden sollen.

Die in Abbildung 41 vorgestellten Aufnahmen zeigen ein U251MG-L106-RS Sphäroid nach Co-Inkubation mit Rotenon und CellTox Green Dye. Die Aufnahmen erfolgten mit dem 20-fach vergrößernden Objektiv mit einer numerischen Apertur von 0,5. Wie bereits in Abschnitt 5.1.2 erläutert, ist die Hebelumsetzung für die synchrone Verschiebung von Lichtscheibe und Fokusebene für Objektive mit einer numerischen Apertur von 0,3 optimiert. Dessen ungeachtet ist auch mit dem 20-fach vergrößernden Objektiv die Aufnahme von Bilderstapeln möglich, insbesondere, wenn es sich wie in diesem Fall um eine relativ kleine Probe handelt (Durchmesser ca. 170 µm). Da die Schärfentiefe des 20-fach vergrößernden Objektivs nur knapp ein Drittel der Dicke der Lichtscheibe beträgt und der benötigte Ausgleichsfaktor lediglich 1,05 mal größer ist als der durch den Hebel für die numerische Apertur von 0,3 realisierte Faktor (vgl. Abbildung 22), ist für die Aufnahme des gesamten Bilderstapels eine ausreichende Beleuchtung der jeweiligen Probenebene im Fokus gegeben.

Aufgrund der definierten Markierung einzelner Zellen im Sphäroid lässt sich diese Messung als gutes Beispiel für den Mehrwert einer 3D-Rekonstruktion heranziehen. Per Software kann diese rotiert werden und bietet dem Betrachter so sehr anschaulich einen besseren Einblick in die Verteilung der geschädigten Zellen im Sphäroid.

Abbildung 42, die die zelluläre Aufnahme und Verteilung von Doxorubicin [58] und seines Abbauprodukts [40, 99] zeigt, verdeutlicht sehr eindrucksvoll die Güte der Bildqualität. Der Bilderstapel wurde mit dem 10-fach vergrößernden Objektiv (A_N = 0,3) aufgenommen, für welches die Hebelumsetzung optimiert ist. Ein weiterer Grund für die Güte dieser Aufnahmen ist die definierte Fluoreszenz, die Doxorubicin in MCF-7 Zellsphäroiden hervorruft. Man erkennt deutlich die rote Fluoreszenz im Zellkern und die grüne Fluoreszenz des Abbauprodukts in der Zellmembran. Aus der Stapelaufnahme geht hervor, dass die rote Fluoreszenz des Zellkerns auf die Zellen in den äußeren Schichten des Sphäroids beschränkt ist, während im inneren Bereich des Sphäroids nur die Fluoreszenz des Abbauprodukts zu sehen ist.

Die unter Nutzung des SPIM-Moduls aufgenommenen Bilderstapel eignen sich für beliebige Arten der 3D-Rekonstruktion oder z-Projektion mithilfe einer geeigneten Software. Je nach Untersuchung können so zusätzliche Informationen bezüglich der Form und Struktur der Probe erlangt werden.

Messung der Fluoreszenzlebensdauer

Des Weiteren konnte anhand von zwei Beispielen gezeigt werden, dass sich die Nutzung des SPIM-Moduls auch zur Fluoreszenzanregung bei der Messung der Fluoreszenzlebensdauer in Zellsphäroiden eignet. Hier kommen wiederum die Vorteile des modularen Aufbaus zum Ausdruck. Da die Detektion über das Mikroskop stattfindet, liefert dieses die Infrastruktur zum Anschluss von Kameras oder anderen Detektoren. Das hier verwendete Mikroskop verfügt derzeit über zwei nutzbare Anschlüsse, die mit Kameras versehen werden können. Hierdurch ist es möglich mit einer Kamera die Fluoreszenzlebensdauer zu messen und mit einer zweiten von derselben ausgewählten Ebene ein Fluoreszenzbild in Echtfarben aufzunehmen. Dies erleichtert die Analyse der Ergebnisse, indem die Bilder direkt miteinander verglichen und einzelne Bildbereiche einander zugeordnet werden können. Besonders deutlich ist dies an den Aufnahmen des MCF-7 Zellsphäroids nach Doxorubicin-Inkubation in Abbildung 43 zu erkennen. Die rote Fluoreszenz in den Zellkernen im äußeren Sphäroidbereich weist eine geringere Lebensdauer auf als das Doxorubicin-Abbauprodukt, welches hauptsächlich im inneren Bereich des Sphäroids gebildet wird.

Weitere Aufnahmen der Fluoreszenzlebensdauer in Sphäroiden aus HeLa Zellen, die einen membranständigen FRET-Sensor exprimieren, zeigen hingegen nur eine begrenzte Ortsauflösung (siehe Abbildung 45), was sich einerseits durch das schwache Fluoreszenzsignal und andererseits durch eine Verschmierung der Fluoreszenzbilder aufgrund der Lichtstreuung erklären lässt.

In Fluoreszenzbildern, die nach Staurosporin-Inkubation aufgenommen wurden, sind im Gegensatz zu Fluoreszenzbildern von Sphäroiden, die keiner Staurosporin-Inkubation ausgesetzt waren, keine Membranstrukturen mehr zu erkennen. Die Fluoreszenzdetektion erfolgte im Wesentlichen im Emissionsbereich des Akzeptors EYFP über einen Langpassfilter für Wellenlängen ≥ 515 nm.

Messungen der Fluoreszenzlebensdauer des Donors ECFP (Fluoreszenzdetektion im Spektralbereich 450 - 490 nm) zeigen eine gegenüber unbehandelten Sphäroiden verlängerte Fluoreszenzlebensdauer des cyan fluoreszierenden Proteins nach Staurosporin-Inkubation. Damit korrelieren die vorgestellten Ergebnisse mit jenen aus entsprechender Literatur [3]. Sie stellen ein Indiz für die Unterbrechung des Energietransfers, bedingt durch die Freisetzung von Caspase-3, welche den Akzeptor EYFP vom Linker-Peptid DEVD trennt, dar [3].

Die Durchlichtaufnahme des Sphäroids nach Staurosporin-Inkubation zeigt im Vergleich zur Durchlichtaufnahme des unbehandelten Sphäroids deutliche morphologische

Veränderungen im inneren Bereich. Dieser erscheint in der Durchlichtaufnahme des Sphäroids nach Staurosporin-Inkubation wesentlich dunkler – ist also weniger transparent als bei dem unbehandelten Sphäroid. Die Auswirkung dieses Umstandes zeigt sich in den Fluoreszenzaufnahmen. Die geringere Transparenz resultiert in einer deutlich reduzierten Fluoreszenzintensität mit zunehmender Eindringtiefe des Anregungslichts. In diesem Fall würde eine beidseitige Beleuchtung (diskutiert in Abschnitt 5.1.2) Abhilfe schaffen.

5.2.2 Ratio Imaging

Charakterisierung des Detektionsmoduls

Zur Charakterisierung des Ratio Imaging Moduls sind die Eigenschaften des bildübertragenden Glasfaserbündels sowie die Bildqualität des verzögerten in Bezug auf das direkt transmittierte Bild hinsichtlich Transmission, Schärfe und Verzeichnung entscheidend.

Es konnte gezeigt werden, dass die Transmission der optischen Elemente im Lichtweg des verzögerten Bildes etwa 33 % beträgt. Diese eingeschränkte Transmission wird durch eine entsprechende Erhöhung der Leistung der Laserdiode (Wellenlänge 470 nm), unter deren Anregung das verzögerte Fluoreszenzbild aufgenommen wird, kompensiert (vgl. Abschnitt 4.3.1). Ungeachtet der eingeschränkten Transmission zeigt Abbildung 46, dass die Bildqualität durch die faseroptische Übertragung nicht wesentlich beeinträchtigt wird. Es ist also möglich beide Bilder gleich groß und gleich scharf sowie verzeichnungsfrei auf die beiden Sensorhälften der Kamera abzubilden.

Erstellung der Ratio-Bilder

Anhand von Ratio-Bildern, die aus einer Durchlichtaufnahme der Testplatte mit Gitterstruktur erstellt wurden (Abbildung 47), kann gezeigt werden, wie wichtig die genaue Auswahl der jeweiligen Bildbereiche ist, die miteinander verrechnet werden sollen. Bereits der Versatz um ein bis zwei Pixel kann Artefakte und somit Fehlinformationen im Ratio-Bild verursachen. Um diesem Zusammenhang so gut wie möglich Rechnung zu tragen, wird für die Erstellung der Submatrizen zur Berechnung der Ratio-Bilder zunächst in der Software ImageJ ein rechteckiger Kasten so ausgewählt, dass dieser in beiden Abbildungen exakt den fluoreszierenden Bereich einschließt. Anschließend wird die Auswahl in vertikaler und horizontaler Richtung erweitert bis die gewünschte Größe der Submatrix erreicht ist, in deren Mitte sich die Fluoreszenzinformation befindet.

Ratio Imaging des Redoxsensors Grx1-roGFP2 in Tumorzellsphäroiden

Die Entwicklung der Ratio-Werte in Sphäroiden der Glioblastomzelllinie U251MG bei Oxidation des im Zytoplasma exprimierten Redoxsensors Grx1-roGFP2 mit Wasserstoffperoxid zeigt, dass es aufgrund der sehr kurzen Reaktionszeit im Bereich von 90 s notwendig ist, die Messung mit Beginn der Wirkstoffzugabe zu starten (vgl. Abbildung 49). Hierfür wurde ein Fluidik-System entwickelt, das sich leicht mit der hier vorgestellten Art der Probenhalterung kombinieren lässt. Um den Einfluss der Strömungsgeschwindigkeit zu minimieren, wurde mit 20 µl/min (entspricht einer Fließgeschwindigkeit von 55 mm/min in der Kapillare) eine sehr geringe Pumpgeschwindigkeit für die Messungen ausgewählt. Es konnte jedoch gezeigt werden, dass adhärente Sphäroide selbst einer Fließgeschwindigkeit von 4.000 mm/min in der Kapillare standhalten [12].

Ebenso wurde gezeigt, dass die Messung unter Flussbedingungen in der Pufferlösung EBSS ohne die Zugabe eines Wirkstoffes keinen Einfluss auf die ermittelten Ratio-Werte hat (Abbildung 48). Die leicht abfallende Fluoreszenzintensität bei beiden Anregungswellenlängen um ca. 8 % über eine Zeitspanne von drei Minuten könnte mit einem geringen Ausbleichen der grün fluoreszierenden Proteine erklärt werden.

Abbildung 49 und Abbildung 50 zeigen, dass zu Beginn der Aufnahmen die mittleren Ratio-Werte im inneren und äußeren Bereich der Sphäroidebene etwa gleich groß sind. Im Verlauf der Messung steigen die Ratio-Werte im äußeren Bereich jedoch deutlich stärker an als im inneren, wie auch von Wittig *et al.* (2013) beschrieben. Eine Ursache hierfür könnte sein, dass Katalase- und Peroxidase-Aktivität im äußeren Sphäroidbereich das Eindringen von Wasserstoffperoxid in den inneren Sphäroidbereich begrenzt [102], indem ein Teil des Wasserstoffperoxids bereits in den äußeren Sphäroidschichten zu Wasser und Sauerstoff umgesetzt bzw. reduziert wird.

Die Bestrahlung (Lichtdosis) zur Aufnahme eines Messpunktes für den in Abbildung 49 dargestellten Verlauf der Ratio-Werte liegt bei 250 mJ/cm². Damit ist die notwendige Lichtdosis zur Erstellung eines Ratio-Bildes 2,5 mal höher als die von Wittig *et al.* (2013) verwendete Lichtdosis für Aufnahmen mit strukturierter Beleuchtung. Dies ist der in Abschnitt 5.1.3 bereits diskutierten Detektionsmethode geschuldet.

Unter der Annahme, dass Lichtdosen bis zu etwa 10 J/cm² für GFP-Mutanten nicht phototoxisch sind [80], ist zu erwarten, dass bis 200 s nach Beginn der Messung, über welche alle 5 s ein Bild mit einer Belichtungszeit von 1 s aufgenommen wird (insgesamt 40 Bilder), Zellschädigungen durch Licht nahezu auszuschließen sind.

Ferner zeigt sich beim Betrachten der in Abbildung 49 dargestellten Fluoreszenzbilder und der in Abbildung 50 vorgestellten Ratio-Bilder ein Vorteil des Ratio Imagings: Während in den Fluoreszenzbildern deutlich die in Beleuchtungsrichtung abnehmende Fluoreszenzintensität erkennbar ist, zeigen sich die Ratio-Bilder von diesem potenziellen Nachteil der Lichtscheibenanregung unbeeinflusst.

Untersuchungen des Redoxgleichgewichts bei Zugabe des Apoptose-auslösenden Wirkstoffes Staurosporin in Sphäroiden der Glioblastomzelllinie U251MG, die das redoxsensitive Protein Grx1-roGFP2 entweder im Zytoplasma oder in den Mitochondrien exprimieren, führen zu ähnlichen Ergebnissen wie die von Gutscher *et al.* (2008) vorgestellten Resultate. In [36] werden Änderungen des Redoxgleichgewichts von Grx1-roGFP2 in Einzelzellen bei Apoptose, hervorgerufen durch das Protein TRAIL (Tumornekrosefaktor-verwandter Apoptose-induzierender Ligand), beschrieben.

Es konnte gezeigt werden, dass die Staurosporin-Konzentration die Ratio-Werte, also den Anteil von oxidiertem Glutathion zu reduziertem Glutathion, beeinflusst (Abbildung 51 und Abbildung 52). Je höher die Staurosporin-Konzentration, der das Zellsphäroid ausgesetzt ist, desto höher liegen die Ratio-Werte, d. h. desto mehr oxidiertes Glutathion liegt vor. Z-Stapelaufnahmen bei unterschiedlichen Staurosporin-Konzentrationen weisen auf eine relativ gleichmäßige Verteilung des oxidierten Glutathion im Sphäroid hin. Dies zeigen auch die Ratio-Bilder einzelner Ebenen in Abbildung 51b. Die Ratio-Werte sind im kompletten Bereich der Sphäroidebene konstant. Lediglich nach der Inkubation mit 12 µM Staurosporin weisen die Ratio-Werte innerhalb der Ebene höhere Schwankungen auf. Tendenziell liegen die Werte, im Gegensatz zur Oxidation mit Wasserstoffperoxid, im inneren Bereich der Sphäroidebene etwas höher als im äußeren. Ebenfalls kann gezeigt werden, dass sich die Dauer der Staurosporin-Inkubation auf das Redoxgleichgewicht auswirkt (Abbildung 53).

Der Vergleich von Änderungen des Redoxgleichgewichts in Sphäroiden, die den Redoxsensor im Zytoplasma und in den Mitochondrien exprimieren (Abbildung 54 und Abbildung 55), zeigt, dass die Ratio-Werte nach Staurosporin-Inkubation in beiden Subklonen um den gleichen Faktor ansteigen. Die Werte des Subklons, der den Sensor im Zytoplasma exprimiert, sind jedoch jeweils etwa doppelt so hoch wie die des Subklons, der den Redoxsensor in den Mitochondrien exprimiert. Dies lässt darauf schließen, dass das Zytoplasma und die Mitochondrien ein unterschiedliches Verhältnis von reduziertem zu oxidiertem Glutathion aufweisen, wie auch von Meyer und Dick (2010) beschrieben.

Bei der Betrachtung der Ratio-Bilder (Abbildung 55) zeigt sich, dass die Ratio-Werte innerhalb der Sphäroidebene des Subklons, der den Sensor in den Mitochondrien

exprimiert, weniger Schwankungen aufweisen als die des Subklons, der den Sensor im Zytoplasma exprimiert. Interessant ist in diesem Zusammenhang, dass bei dem Subklon, der den Sensor im Zytoplasma exprimiert, sowohl im Kontrollsphäroid als auch nach Staurosporin-Inkubation die Ratio-Werte im inneren Bereich der Sphäroidebene höher liegen als im äußeren. Bei dem Subklon, der den Sensor in den Mitochondrien exprimiert, ist dies nur in deutlich abgeschwächter Form zu beobachten (siehe hierzu auch Abbildung 53b).

Vergleicht man die Ratio-Bilder nach Wasserstoffperoxid- und Staurosporin-Inkubation (Abbildung 50 und Abbildung 55), so zeigt sich, dass die Ratio-Werte nach Wasserstoffperoxid-Inkubation im äußeren Bereich der Sphäroidebene deutlich stärker angestiegen sind als im inneren. Nach Staurosporin-Inkubation hingegen ist der Anstieg der Ratio-Werte im inneren Bereich der Sphäroidebene etwas höher als im äußeren. Dies könnte auf die unterschiedlichen Wirkmechanismen der Stoffe zurückzuführen sein. Während Wasserstoffperoxid zu einer direkten Oxidation von Glutathion führt, löst Staurosporin Apoptose und damit die Entstehung reaktiver Sauerstoffspezies aus, die dann von Glutathion abgebaut werden.

5.3 Fazit und zukünftige Perspektiven

Die Umsetzung der Zielvorgabe dieser Arbeit – die Kombination von Lichtscheiben-mikroskopie und Echtzeit Ratio Imaging an einem konventionellen, vorhandenen Mikroskop – erfolgte auf Modul-Basis. Die in den folgenden Abschnitten resümierten modularen Erweiterungen bieten dem Anwender hohe Flexibilität bezüglich Probenum-gebung, Fluoreszenzanregung und Fluoreszenzdetektion. Insbesondere die Kombination dieser Module als Erweiterung des Weitfeld- und Laser Scanning Mikroskops Axiovert 200M zeigen großes Potenzial für die Untersuchung mikroskopischer Frage-stellungen aus den Bereichen Wirkstoffforschung und *in vitro* Diagnostik.

Modul zur Probenhalterung

Rechteckige Glaskapillaren eigenen sich aufgrund ihrer vier planen Außenflächen optimal als Probenträger in der Mikroskopie – insbesondere für Untersuchungen an Zellsphäroiden oder Mikroorganismen. Die Probenapplikation ist simpel. Bei Bedarf können die Kapillaren mit wenigen Handgriffen an ein Fluidik-System angeschlossen werden. Das geringe Fassungsvermögen der Kapillaren im Bereich weniger Mikroliter minimiert die notwendige Flüssigkeitsmenge in der Probenumgebung, sodass selbst bei Kopplung an das Fluidik-System der Verbrauch von Medien sehr gering ist. Zudem

handelt es sich bei den Glaskapillaren um kostengünstige Einwegkomponenten, die jedoch – je nach Messanforderung – auch mehrfach verwendet werden können.

Beide Kapillarhalterungen lassen sich sehr einfach an eine Vielzahl von Mikroskopen anbringen oder können für diese adaptiert werden. Die Positionierung der Kapillaren in den Halterungen ist ebenfalls sehr leicht zu handhaben, sodass die Kapillaren zwischen den Messungen schnell ausgetauscht werden können.

Ein innovatives Modul zur axialen Probenrotation, das am Rande der vorliegenden Arbeit entwickelt wurde, ermöglicht Aufnahmen der Probe in der rechteckigen Glaskapillare aus beliebigen Ansichten.

Die Anschlussmöglichkeit an ein Fluidik-System, die Möglichkeit der Probenrotation sowie das kleine Volumen der Kapillaren zeigen großes Potenzial für zukünftige Anwendungen im Bereich der 3D-Mikroskopie.

SPIM-Modul

Das SPIM-Modul erweitert ein konventionelles inverses Mikroskop zu einem Lichtscheibenmikroskop. Sämtliche Detektionsoptiken des bestehenden Mikroskops, inklusive des Okulars, lassen sich weiterhin zur Probenbeobachtung verwenden. An die Ausgänge des Mikroskops können beliebige Kameras oder sonstige Detektoren wie Spektrometer angebracht werden.

Das SPIM-Modul ist in wenigen Minuten am Mikroskop montiert und einsatzfähig. Es ermöglicht bei Bedarf die gleichzeitige Fluoreszenzanregung der Probe mit zwei Wellenlängen. Mit einer Lichtscheibendicke von ca. 10 µm ist das Modul zur Beleuchtung einzelner Probenebenen in Zellsphäroiden und Mikroorganismen geeignet. Durch die selektive Beleuchtung ist die Probe bei der Aufnahme von Bilderstapeln einer deutlich geringeren Lichtbelastung ausgesetzt als bei anderen 3D-Mikroskopiemethoden wie der strukturierten Beleuchtung oder der konfokalen Laser Scanning Mikroskopie.

Die vorgestellten Fluoreszenzaufnahmen von Zellsphäroiden sind hinsichtlich der Bildqualität und des Informationsgehalts mit jenen anderer, aus der Literatur bekannten Lichtscheibenmikroskopen, vergleichbar [57, 93]. Es können sowohl einfache Durchlichtbilder aufgenommen als auch mehrere Kamerasysteme gleichzeitig an das Mikroskop angeschlossen werden, sodass z. B. von einer Probenebene sowohl ein Fluoreszenzbild in Echtfarben aufgenommen werden als auch die bildgebende Messung der Fluoreszenzlebensdauer erfolgen kann.

Wie das Modul zur Probenhalterung ist auch das SPIM-Modul für andere Mikroskope adaptierbar. Derzeit wird es im Rahmen eines Förderprojekts des Bundesministeriums für

Wirtschaft und Energie (BMWi) gemeinsam mit der J&M Analytik AG weiterentwickelt. Ziel ist die Erstellung eines Prototyps für ein marktfähiges Produkt. Das SPIM-Modul soll im Rahmen des Projekts miniaturisiert und optimiert sowie für inverse Mikroskope verschiedener Mikroskop-Hersteller adaptierbar gemacht werden. Im Vordergrund stehen dabei die Optimierung der optischen Komponenten, die Implementierung eines *Pivoting*-Modus sowie die Probenrotation. Ein weiterer Schwerpunkt ist die Erstellung einer piezogeführten Halterung mit entsprechender Ansteuerung, sodass die Verschiebung der Lichtscheibe von der Objektivhalterung mechanisch unabhängig erfolgen kann. Das Anregungslicht soll über eine Singlemode-Faser in das SPIM-Modul eingekoppelt werden können. Ein alternativer Aufbau zur Lichtscheibenerzeugung, der weitestgehend wellenlängenunabhängig ist, steht ebenfalls zur Debatte und wird aktuell getestet.

Ratio Imaging Modul

Das Modul zum Ratio Imaging ist das bislang einzig bekannte System, das die simultane, räumlich getrennte Fluoreszenzaufnahme einer Probe ermöglicht, deren Emission sich – bei zwei unterschiedlichen Anregungswellenlängen – nicht nach dem Spektralbereich unterscheiden lässt. Der rein optisch-elektronische Aufbau enthält keine fehleranfälligen mechanischen Schalter oder Aktoren und ist dementsprechend robust. Synchronisiert mit entsprechend gepulsten Anregungslichtquellen kann das Detektionsmodul an eine Vielzahl von Weitfeldmikroskopen angebracht bzw. für diese adaptiert werden.

In Kombination mit den in dieser Arbeit vorgestellten Modulen zur Lichtscheiben-beleuchtung und Probenhalterung, können deren Vorzüge für Messungen zum Ratio Imaging genutzt werden. Hierzu zählen unter anderem die selektive Beleuchtung einer Probenebene und die somit geringe Lichtbelastung sowie die Möglichkeit Wirkstoffe während der Messung zuzuführen. Eine Reihe von Messungen von Änderungen des Redoxgleichgewichts in einzelnen Probenebenen von Zellsphäroiden zeigt die Funktionsfähigkeit des Ratio Imaging Moduls.

Bezüglich des Ratio Imaging Moduls sind aufgrund der aktuellen Projektlage derzeit keine Weiterentwicklungen geplant. Dennoch bietet der innovative Aufbau ein hohes Potenzial, in zukünftigen Projekten für verschiedene Ratio Imaging Anwendungen genutzt zu werden. Anwendungsgebiete in der Wirkstoffforschung liegen neben Untersuchungen bezüglich des Redoxgleichgewichts auch im Calcium Imaging. Großes Potenzial in der Zellbiologie und Tumorforschung hätte auch die Weiterentwicklung der Methode für Echtzeitmessungen der Fluoreszenzlebensdauer (FLIM, *Fluorescence Lifetime Imaging Microscopy*) oder Messungen des Förster-Resonanzenergietransfers (FRET).

6 Zusammenfassung

Die grundlegende Anwendung hinter dieser Arbeit ist die verhältnisbasierte Messung von Änderungen des Redoxgleichgewichts in Zellsphäroiden. Das Glutathion-spezifische redoxsensitive grün fluoreszierende Protein Grx1-roGFP2 dient dabei als Sensor, der in den Zellen exprimiert wird. Die Besonderheit dieses Sensors liegt in den unterschiedlichen Fluoreszenzintensitäten im reduzierten und im oxidierten Zustand bei Anregungswellenlängen um 400 nm und 480 nm, während die Emission jeweils im gleichen Spektralbereich liegt. Die Messung von Änderungen des Redoxgleichgewichts erfolgt mittels Ratio Imaging, d. h. indem die Fluoreszenzintensitäten ins Verhältnis gesetzt werden. Ziel dieser Arbeit ist es, eine Methode zum Ratio Imaging von Tumorzellsphäroiden, welche diesen Sensor exprimieren, zu entwickeln und die Methode mit Lichtscheibenfluoreszenzmikroskopie zu kombinieren.

Umgesetzt wird dieses Ziel zunächst mit der Entwicklung eines SPIM-Moduls (*Single Plane Illumination Microscopy*), welches ein bestehendes inverses Mikroskop zu einem Lichtscheibenmikroskop, optimiert für die Untersuchung von Zellsphäroiden, erweitert. Es erlaubt die gleichzeitige Einkopplung zweier Lichtquellen mit unterschiedlichen Wellenlängen. Die Lichtscheibe mit einer mittleren Dicke von ca. 10 µm wird durch eine Zylinderlinse erzeugt und ermöglicht eine selektive und schonende Beleuchtung der Probe.

Als Probenhalterung dienen rechteckige Glaskapillaren mit einer inneren Kantenlänge von 600 µm. Die Wanddicke mit 120 µm erlaubt zur Fluoreszenzdetektion die Verwendung konventioneller Mikroskopobjektive.

Vergleichende Fluoreszenzaufnahmen einzelner Sphäroidebenen mittels Lichtscheiben- und konfokaler Laser Scanning Mikroskopie verdeutlichen die gute Bildqualität und Eindringtiefe des Anregungslichts, die unter Nutzung des SPIM-Moduls erreicht werden können. Des Weiteren werden Bilderstapel (z-Stapelaufnahmen) von Sphäroiden, deren 3D-Rekonstruktion sowie die Verwendung des SPIM-Moduls in Kombination mit Messungen der Fluoreszenzlebensdauer in Zellsphäroiden gezeigt.

Das im Rahmen dieser Arbeit erstellte Detektionsmodul zum Ratio Imaging ermöglicht die zeitgleiche Aufnahme zweier Fluoreszenzbilder einer Probe (die bei unterschiedlichen Anregungswellenlängen Fluoreszenz im gleichen Spektralbereich emittiert) mit einer Kamera. Hierfür werden zwei gepulste Laserdioden, die an das SPIM-Modul montiert werden, mit dem Öffnungszyklus einer im Nanosekundenbereich schaltbaren Kamera

synchronisiert. Die Lichtpulse sind zeitlich gegeneinander verschoben, sodass die Probe im Abstand von einigen Nanosekunden abwechselnd mit beiden Wellenlängen beleuchtet und zur Fluoreszenz angeregt wird. Ein Strahlteiler sowie die zeitliche Verzögerung eines der resultierenden Strahlenbündel über ein bildübertragendes Glasfaserbündel im Detektionsstrahlengang ermöglichen schließlich die gleichzeitige Aufnahme der bei unterschiedlichen Wellenlängen erzeugten Fluoreszenzbilder auf je einer Sensorhälfte der Kamera. Die Funktionalität verdeutlichen Experimente, bei welchen entweder durch die Zugabe von Wasserstoffperoxid oder durch den Apoptose-induzierenden Wirkstoff Staurosporin das intrazelluläre Redoxgleichgewicht in Zellsphäroiden verändert wird.

7 Literaturverzeichnis

[1] A. Abbott: Cell Culture: biology's new dimension. *Nature* 424, 870-872 (2003)

[2] F.A. Ahmadi, D.A. Linseman, T.N. Grammatopoulos, S.M. Jones, R.J. Bouchard, C.R. Freed, K.A. Heidenreich, and W.M. Zawada: The pesticide rotenone induces caspase-3-mediated apoptosis in ventral mesencephalic dopaminergic neurons. *J. Neurochem.* 87, 914-921 (2003)

[3] B. Angres, H. Steuer, P. Weber, M. Wagner, and H. Schneckenburger: A Membrane-Bound FRET-Based Caspase Sensor for Detection of Apoptosis Using Fluorescence Lifetime and Total Internal Reflection Microscopy. *Cytometry A* 75, 420-227 (2009)

[4] G.J. Bakker, V. Andresen, R.M. Hoffman, and P. Friedl: Fluorescence lifetime microscopy of tumor cell invasion, drug delivery, and cytotoxicity. *Methods Enzymol.* 504, 109-125 (2012)

[5] E. Baumgart and U. Kubitscheck: Scanned light sheet microscopy with confocal slit detection. *Opt. Express* 20, 21805-21814 (2012)

[6] G.P. Bienert, J.K. Schjoerring, and T.P. Jahn: Membrane transport of hydrogen peroxide. *Biochim. Biophys. Acta* 1758, 994-1003 (2006)

[7] R.H. Blum and S.K. Carter: Adriamycin. A new anticancer drug with significant clinical activity. *Ann. Intern. Med.* 80, 249-259 (1974)

[8] A. Bolzer: Workshop zum Thema Light Sheet Microscopy mit dem Lightsheet Z.1 an der Core Facility für konfokale und Multiphotonen Mikroskopie an der Universität Ulm (13.05.2014)

[9] T. Bruns, B. Angres, H. Steuer, P. Weber, M. Wagner, and H. Schneckenburger: Förster resonance energy transfer-based total internal reflection fluorescence reader for apoptosis. *J. Biomed. Opt.* 14, 021003 (2009)

[10] T. Bruns, S. Schickinger und H. Schneckenburger: Mikroskopadapter zur Rotation 3-dimensionaler Proben. *BioPhotonik* 7, 40-41 (2014)

[11] T. Bruns, S. Schickinger, and H. Schneckenburger: Single plane illumination module and micro-capillary approach for a wide-field microscope, *J. Vis. Exp.* 90, e51993 (2014)

[12] T. Bruns, S. Schickinger, R. Wittig, and H. Schneckenburger: Preparation strategy and illumination of three-dimensional cell cultures in light sheet-based fluorescence microscopy. *J. Biomed. Opt.* 17, 101518 (2012)

[13] T. Bruns, H. Schneckenburger, and S. Schickinger: Sample holder for rotation of three-dimensional specimens in microscopy. European Patent Application EP 13 184 931.7 (2013)

[14] J. Carlsson and J.M. Yuhas: Liquid-overlay culture of cellular spheroids. *Recent Results Cancer Res.* 95, 1-23 (1984)

[15] K. Carlsson, P.E. Danielsson, R. Lenz, A. Liljeborg, L. Majlöf, and N. Åslund: Three-dimensional microscopy using a confocal laser scanning microscope. *Opt. Lett.* 10, 53-55 (1985)

[16] S.K. Carter and R.H. Blum: New chemotherapeutic agents – Bleomycin and adriamycin. *CA Cancer J. Clin.* 24, 322-331 (1974)

[17] C. Chardès, P. Mélénec, V. Bertrand, and P.F. Lenne: Setting Up a Simple Light Sheet Microscope for In Toto Imaging of C. elegans Development. *J. Vis. Exp.* 87, e51342 (2014)

[18] N.T. Chen, C.Y. Wu, C.Y. Chung, Y. Hwu, S.H. Cheng, C.Y. Mou, and L.W. Lo: Probing the dynamics of doxorubicin-DNA intercalation during the initial activation of apoptosis by fluorescence lifetime imaging microscopy (FLIM). *PLoS One* 7, e44947 (2012)

[19] Clontech Laboratories, Inc.: pAcGFP-Mem Vector Information. Protocol No. PT3841-5, Version No. PR56802 (2005)

[20] X. Dai, Z. Yue, M.E. Eccleston, J. Swartling, N.K. Slater, and C.F. Kaminski: Fluorescence intensity and lifetime imaging of free and micellar-encapsulated doxorubicin in living cells. *Nanomedicine* 4, 49-56 (2008)

[21] N.N. Danial and S.J. Korsmeyer: Cell death: critical control points. *Cell* 116, 205-219 (2004)

[22] C.T. Dooley, T.M. Dore, G.T. Hanson, W.C. Jackson, S.J. Remington, and R.J. Tsien: Imaging Dynamic Redox Changes in Mammalian Cells with Green Fluorescent Protein Indicators. *J. Biol. Chem.* 279, 22284-22293 (2004)

[23] R. Ebrecht, C. Don Paul, and F.S. Wouters: Fluorescence lifetime imaging microscopy in the medical sciences. *Protoplasma* 251, 293-305 (2014)

[24] F.O. Fahrbach and A. Rohrbach: A line scanned light-sheet microscope with phase shaped self-reconstructing beams. *Opt. Express* 18, 24229-24244 (2010)

[25] F.O. Fahrbach, P. Simon, and A. Rohrbach: Microscopy with self-reconstructing beams. *Nature Photon.* 4, 780-785 (2010)

[26] F. Fahrbach, F.F. Voigt, B. Schmid, F. Helmchen, and J. Huisken: Rapid 3D light-sheet microscopy with a tunable lens. *Opt. Express* 21, 21010-21026 (2013)

[27] J. Fehrenbach, P. Weiss, and C. Lorenzo: Variational algorithms to remove stationary noise. Application to microscopy imaging. IEEE Image Processing 21, 4420-4430 (2012)

[28] G. Filomeni and M.R. Ciriolo: Redox control of apoptosis: an update. *Antioxid. Redox Signal*. 8, 2187-2192 (2006)

[29] T. Förster: Zwischenmolekulare Energiewanderung und Fluoreszenz. *Ann. Phys.* 2, 57-75 (1948)

[30] R. Franco and J.A. Cidlowski: SLCO/OATP-like transport of glutathione in FasL-induced apoptosis: glutathione efflux is coupled to an organic anion exchange and is necessary for the progression of the execution phase of apoptosis. *J. Biol. Chem.* 281, 29542-29557 (2006)

[31] J. Friedrich, C. Seidel, R. Ebner, and L.A. Kunz-Schughart: Spheroid-based drug screen: considerations and practical approach. *Nat. Protoc.* 4, 309-324 (2009)

[32] L. Gao, L. Shao, C.D. Higgins, J.S. Poulton, M. Peifer, M.W. Davidson, X. Wu, B. Goldstein, and E. Betzig: Noninvasive imaging beyond the diffraction limit of 3D dynamics in thickly fluorescent specimens. *Cell* 151, 1370-1385 (2012)

[33] E.A. Gibbs-Flournoy, S.O. Simmons, P.A. Bromberg, T.P. Dick, and J.M. Samet: Monitoring intracellular redox changes in ozone-exposed airway epithelial cells. *Environ. Health Perspect.* 121, 312-317 (2013)

[34] K. Greger, J. Swoger, and E.H. Stelzer: Basic building units and properties of a fluorescence single plane illumination microscope. *Rev. Sci. Instrum.* 78, 023705 (2007)

[35] M.G. Gustafsson, L. Shao, P.M. Carlton, C.J. Wang, I.N. Golubovskaya, W.Z. Cande, D.A. Agard, and J.W. Sedat: Three-dimensional resolution doubling in wide-field fluorescence microscopy by structured illumination. *Biophys. J.* 94, 4957-4970 (2008)

[36] M. Gutscher, A.-L. Pauleau, L. Marty, T. Brach, G.H. Wabnitz, Y. Samstag, A.J. Meyer, and T.P. Dick: Real-Time Imaging of the Intracellular Glutathione Redox Potential. *Nat. Methods* 5, 553-559 (2008)

[37] D.M. Haaland, H.D. Jones, M.H. van Benthem, M.B. Sinclair, D.K. Melgaard, C.L. Stork, M.C. Pedroso, P. Liu, A.R. Brasier, N.L. Andrews, and D.S. Lidke: Hyperspectral confocal fluorescence imaging: Exploring alternative multivariate curve resolution approaches. *Appl. Spectrosc.* 63, 271-279 (2009)

[38] R. Heim, A.B. Cubitt, and R.Y. Tsien: Improved green fluorescence. *Nature* 373, 663-664 (1995)

[39] M. Higuchi, T. Honda, R.J. Proske, and E.T. Yeh: Regulation of reactive oxygen species-induced apoptosis and necrosis by caspase 3-like proteases. *Oncogene* 17, 2753-60 (1998)

[40] O. Hovorka, V. Šubr, D. Větvička, L. Kovář, J. Strohalm, M. Strohalm, A. Benda, M. Hof, K. Ulbrich, and B. Ríhová: Spectral analysis of doxorubicin accumulation and the indirect quantification of its DNA intercalation. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 76, 514-524 (2010)

[41] J. Huisken and D.Y.R. Stainier: Even fluorescence excitation by multidirectional selective plane illumination microscopy (mSPIM). *Opt. Lett.* 32, 2608-2610 (2007)

[42] J. Huisken and D.Y.R. Stainier: Selective plane illumination microscopy techniques in developmental biology. *Development* 136, 1963-1975 (2009)

[43] J. Huisken, J. Swoger, F. Del Bene, J. Wittbrodt, and E.H.K. Stelzer: Optical Sectioning Deep Inside Live Embryos by Selective Plane Illumination Microscopy. *Science* 305, 1007-1009 (2004)

[44] J.S. Isenberg and J.E. Klaunig: Role of the mitochondrial membrane permeability transition (MPT) in rotenone-induced apoptosis in liver cells. *Toxicol. Sci.* 53, 340-351 (2000)

[45] K.K. Karukstis, E.H. Thompson, J.A. Whiles, and R.J. Rosenfeld: Deciphering the fluorescence signature of daunomycin and doxorubicin. *Biophhys. Chem.* 73, 249-263 (1998)

[46] P.J. Keller, A.D. Schmidt, A. Santella, K. Khairy, Z. Bao, J. Wittbrodt, and E.H.K. Stelzer: Fast, high-contrast imaging of animal development with scanned light sheet–based structured-illumination microscopy. *Nat. Methods* 7, 637-642 (2010)

[47] P.J. Keller, A.D. Schmidt, J. Wittbrodt, and E.H.K. Stelzer: Reconstruction of zebrafish early embryonic development by scanned light sheet microscopy. *Science* 322, 1065-1069 (2008)

[48] I. Kruman, Q. Guo, and M.P. Mattson: Calcium and reactive oxygen species mediate staurosporine-induced mitochondrial dysfunction and apoptosis in PC12 cells. *J. Neurosci. Res.* 51, 293-308 (1998)

[49] U. Krzic, S. Gunther, T.E. Saunders, S.J. Streichan, and L. Hufnagel: Multiview light-sheet microscope for rapid *in toto* imaging. *Nat. Methods* 9, 730-733 (2012)

[50] L.A. Kunz-Schughart, J.P. Freyer, F. Hofstaedter, and R. Ebner: The use of 3-D cultures for high-throughput screening: the multicellular spheroid model. *J. Biomol. Screen.* 9, 273-285 (2004)

[51] N. Lapointe, M. St-Hilaire, M.G. Martinoli, J. Blanchet, P. Gould, C. Rouillard, and F. Cicchetti: Rotenone induces non-specific central nervous system and systemic toxicity. *FASEB J.* 18, 717-719 (2004)

[52] LaVision BioTec GmbH
http://www.lavisionbiotec.com/ultramicroscope-overview.html (07.11.2014)

[53] J. Li, M.L. Spletter, D.A. Johnson, L.S. Wright, C.N. Svendsen, and J.A. Johnson: Rotenone-induced caspase 9/3-independent and -dependent cell death in undifferentiated und differentiated human neural stem cells. *J. Neurochem.* 92, 462-476 (2005)

[54] N. Li, K. Ragheb, G. Lawler, J. Sturgis, B. Rajwa, J.A. Melendez, and J.P. Robinson: Mitochondrial complex I inhibitor rotenone induces apoptosis through enhancing mitochondrial reactive oxygen species production. *J. Biol. Chem.* 278, 8516-8525 (2003)

[55] Z.X. Li, T.T. Wang, Y.T. Wu, C.M. Xu. M.Y. Dong, J.Z. Sheng, and H.F. Huang: Adriamycin induces H2AX phosphorylation in human spermatozoa. *Asian J. Adrol.* 10, 749-757 (2008)

[56] Life Technologies GmbH
http://www.lifetechnologies.com/greater-china/en/home/life-science/cell-analysis/labeling-chemistry/fluorescence-spectraviewer.html.html, Fluorophore: Rhodamine 6G (06.11.2014)

[57] C. Lorenzo, C. Frongia, R. Jorand, J. Fehrenbach, P. Weiss, A. Maandhui, G. Gay, B. Ducommun, and V. Lobjois: Live cell division dynamics monitoring in 3D large spheroid tumor models using light sheet microscopy. *Cell Division* 6, doi: 10.1186/1747-1028-6-22 (2011)

[58] H.L. Ma, Q. Jiang, S. Han, Y. Wu, J.C. Tomshine, D. Wang, Y. Gan, G. Zou, and X.J. Liang: Multicellular tumor spheroids as an in vivo-like tumor model for three-dimensional imaging of chemotherapeutic and nano material cellular penetration. *Mol. Imaging* 11, 487-498 (2012)

[59] D. Magde, R. Wong, and P.G. Seybold: Fluorescence quantum yields and their relation to lifetimes of rhodamine 6G and fluorescein in nine solvents: improved absolute standards for quantum yields. *Photochem. Photobiol.* 75, 327-334 (2002)

[60] S.R. McRae, C.L. Brown, and G.R. Bushell: Rapid purification of EGFP, EYFP, and ECFP with high yield and purity. *Protein Expr. Purif.* 41, 121-127 (2005)

[61] J. Mertz and J. Kim: Scanning light-sheet microscopy in the whole mouse brain with HiLo background rejection. *J. Biomed. Opt.* 15, 016027 (2010)

[62] A.J. Meyer and T.P. Dick: Fluorescent protein-based redox probes. *Antioxid. Redox Signal.* 13, 621-650 (2010)

[63] K.L. Mills, R. Kemkemer, S. Rudraraju, and K. Garikipati: Elastic Free Energy Drives the Shape of Prevascular Solid Tumors. *PLoS ONE* 9, e103245 (2014)

[64] T. Langer: Coenzyme. In: K. Munk (Hrsg.) Taschenlehrbuch Biologie – Biochemie Zellbiologie, Georg Thieme Verlag KG, Stuttgart, S. 230-231 (2008)

[65] M.A.A. Neil, R. Juškaitis, and T. Wilson: Method of obtaining optical sectioning by using structured light in a conventional microscope. *Opt. Let.* 22, 1905-1907 (1997)

[66] K. Newhouse, S.L. Hsuan, S.H. Chang, B. Cai, Y. Wang, and Z. Xia: Rotenone-induced apoptosis is mediated by p38 and JNK MAP kinases in human dopaminergic SH-SY5Y cells. *Toxicol. Sci.* 79, 137-146 (2004)

[67] N. O'Connor and R.B. Silver: Ratio imaging: practical considerations for measuring intracellular Ca^{2+} and pH in living cells. *Methods Cell Biol.* 114, 387-406 (2013)

[68] S. Oka, M. Kodama, H. Takeda, N. Tomizuka, and H. Suzuki: Staurosporine, a potent platelet aggregation inhibitor from Streptomyces sp. *Agric. Biol. Chem.* 50, 2723-2727 (1986)

[69] S. Omura, Y. Iwai, A. Hirano, A. Nakagawa, J. Awaya, H. Tsuchiya, Y. Takahashi, and R. Masuma: A new alkaloid AM-2282 of Streptomyces origin: Taxonomy, isolation, fermentation and preliminary characterization. *J. Antibiot.* 30, 275-282 (1977)

[70] K. Pong, S.R. Doctrow, K. Huffman, C.A. Adinolfi, and M. Baudry: Attenuation of staurosporine-induced apoptosis, oxidative stress, and mitochondrial dysfunction by synthetic superoxide dismutase and catalase mimetics, in cultured cortical neurons. *Exp. Neurol.* 171, 84-97 (2001)

[71] R. Posmantur, K. McGinnis, R. Nadimpalli, R.B. Gilbertsen, and K.K. Wang: Characterization of CPP32-like protease activity following apoptotic challenge in SH-SY5Y neuroblastoma cells. *J. Neurochem*. 68, 2328-2337 (1997)

[72] Promega GmbH
http://www.promega.de/products/cell-health-and-metabolism/cytotoxicity-assays/celltox-green-cytotoxicity-assay (16.11.2014)

[73] Promega GmbH: Technical Manual – CellTox™ Green Cytotoxicity Assay
http://www.promega.com/~/media/files/resources/protocols/technical%20manuals/101/celltox%20green%20cytotoxicity%20assay%20protocol.pdf (14.11.2014)

[74] J.G. Ritter, R. Veith, A. Veenendaal, J.P. Siebrasse, and U. Kubitscheck: Light Sheet Microscopy for Single Molecule Tracking in Living Tissue. *PLoS ONE* 5, e11639 (2010)

[75] M. Sameiro and T. Goncalves: Optimized UV/Fluorescent Markers. In: A.P. Demchenko (Hrsg.), Advanced Fluorescence Reporters in Chemistry and Biology I: Fundamentals and Molecular Design, Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, S. 27-64 (2010)

[76] P.A. Santi, S.B. Johnson, M. Hillenbrand, P.Z. Grandpre, T.J. Glass, and J.R. Leger: Thin-sheet laser imaging microscopy for optical sectioning of thick tissues. *BioTechniques* 46, 287-294 (2009)

[77] P.A. Santi: Light Sheet Fluorescence Microscopy: A Review. *J. Histochem. Cytochem.* 59, 129-138 (2011)

[78] S. Schickinger, T. Bruns, R. Wittig, P. Weber, M. Wagner, and H. Schneckenburger: Nanosecond ratio imaging of redox states in tumor cell spheroids using light sheet-based fluorescence microscopy. *J. Biomed. Opt.* 18, 126007 (2013)

[79] F. Schmitt: Lightsheet Z.1. Light Sheet Fluorescence Microscopy by Carl Zeiss http://imagerie-vivant.sciencesconf.org/conference/imagerie-vivant/pages/Zeiss.pdf (16.11.2014)

[80] H. Schneckenburger, P. Weber, M. Wagner, S. Schickinger, V. Richter, T. Bruns, W.S.L. Strauss, and R. Wittig: Light exposure and cell viability in fluorescence microscopy. *J. Microsc.* 245, 311-318 (2012)

[81] S. Shimizu, Y. Eguchi, W. Kamiike, S. Waguri, Y. Uchiyama, H. Matsuda, and Y. Tsujimoto: Retardation of chemical hypoxia-induced necrotic cell death by Bcl-2 and ICE inhibitors: possible involvement of common mediators in apoptotic and necrotic signal transductions. *Oncogene* 12, 2045-2050 (1996)

[82] O. Shimomura, F.H. Johnson, and Y Saiga: Extraction, purification and properties of aequorin, a bioluminescent protein from the luminous hydromedusan, Aequorea. *J. Cell. Comp. Physiol.* 59, 223-39 (1962)

[83] H. Siedentopf und R. Zsigmondy: Über Sichtbarmachung und Größenbestimmung ultramikroskopischer Teilchen, mit besonderer Anwendung auf Goldrubingläser. *Ann. Phys.* 315, 1-39 (1902)

[84] Sigma-Aldrich Chemie GmbH: Doxorubicin hydrochloride http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/d1515?lang=de&region=DE (13.11.2014)

[85] Sigma-Aldrich Chemie GmbH: Hydrogen peroxide solution http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/h1009?lang=de&region=DE (13.11.2014)

[86] Sigma-Aldrich Chemie GmbH: Product Information Rotenone http://www.sigmaaldrich.com/content/dam/sigma-aldrich/docs/Sigma/Product_Information_Sheet/1/r8875pis.pdf (13.11.2014)

[87] Sigma-Aldrich Chemie GmbH: Rhodamine 6G http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/r4127?lang=de&region=DE (13.11.2014)

[88] Sigma-Aldrich Chemie GmbH: Rotenone http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/r8875?lang=de&region=DE (13.11.2014)

[89] Sigma-Aldrich Chemie GmbH: Staurosporine from *streptomyces* sp. http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/s5921?lang=de&region=DE (13.11.2014)

[90] L. Silvestri, A. Bria, L. Sacconi, G. Ianello, and F.S. Pavone: Confocal light sheet microscopy: micron-scale neuroanatomy of the entire mouse brain. *Opt. Express* 20, 20582-20598 (2012)

[91] E.H.K. Stelzer: Contrast, resolution, pixelation, dynamic range and signal-to-noise ratio: fundamental limits to resolution in fluorescence light microscopy. *J. Microsc.* 189, 15-24 (1998)

[92] T. Su, Z. Zhang Z, and Q. Luo: Ratiometric fluorescence imaging of dual biomolecular events in single living cells using a new FRET pair mVenus/mKOκ-based biosensor and a single fluorescent protein biosensor. *Biosens. Bioelectron.* 31, 292-298 (2012)

[93] J. Swoger, F. Pampaloni, and E.H. Stelzer: Imaging cellular spheroids with a single (selective) plane illumination microscope. *Cold Spring Harb. Protoc.* 2014, 106-113 (2014a)

[94] J. Swoger, F. Pampaloni, and E.H. Stelzer: Light-sheet-based fluorescence microscopy for three-dimensional imaging of biological samples. *Cold Spring Harb. Protoc.* 2014, 1-8 (2014b)

[95] T. Tamaoki, H. Nomoto, I. Takahashi, Y. Kato, M. Morimoto, and F. Tomita: Staurosporine, a potent inhibitor of phospholipid/Ca++dependent protein kinase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 135, 397-402 (1986)

[96] R. Tomer, K. Khairy, F. Amat, and P.J. Keller: Quantitative high-speed imaging of entire developing embryos with simultaneous multiview light-sheet microscopy. *Nat. Methods* 9, 755-763 (2012)

[97] R.Y. Tsien: The green fluorescent protein. *Annu. Rev. Biochem.* 67, 509-544 (1998)

[98] R. Voit: Analyse von Promotorstärke und aktiver RNA-Synthese. In: F. Lottspeich und J.W. Engels (Hrsg.), Bioanalytik, 3. Auflage. Springer Verlag Berlin Heidelberg, S. 1000-1001 (2012)

[99] P. Weber, M. Wagner, and H. Schneckenburger: Cholesterol dependent uptake and interaction of doxorubicin in MCF-7 breast cancer cells. *Int. J. Mol. Sci.* 14, 8358-8366 (2013)

[100] P. Weiss: Reference manual Fiji plugin VSNR Version 2 (2013)

[101] T. Wilson: Spinning-disk microscopy systems. *Cold Spring Harb. Protoc.* 2010, pdb.top88, doi: 10.1101/pdb.top88 (2010)

[102] R. Wittig, V. Richter, S. Wittig-Blaich, P. Weber, W.S.L. Strauss, T. Bruns, T.P. Dick, and H. Schneckenburger: Biosensor-Expressing Spheroid Cultures for Imaging of Drug-induced Effects in Three Dimensions. *J. Biomol. Screen.* 18, 736-743 (2013)

[103] Y. Wu, A. Ghitani, R. Christensen, A. Santella, Z. Du, G. Rondeau, Z. Bao, D. Colón-Ramos, and H. Shroff: Inverted selective plane illumination microscopy (*i*SPIM) enables coupled cell identity lineaging and neurodevelopmental imaging in *Caenorhabditis elegans*. *PNAS* 108, 17708-17713 (2011)

[104] F.C. Zanacchi, Z. Lavagnino, M. Pesce, F. Difato, E. Ronzitti, and A. Diaspro: Two-photon fluorescence excitation within a light sheet based microscopy architecture. In: A. Periasamy, K. König, and P.T.C. So (eds.), Multiphoton Microscopy in the Biomedical Sciences XI, *Proc. SPIE* 7903, 79032W (2011)

[105] Carl Zeiss Microscopy GmbH
Product Information: Lightsheet Z.1 – Light Sheet Microscopy for Multiview Imaging of large Specimens. Release 1.0 (2012)

[106] Carl Zeiss Microscopy GmbH
White Paper: Sample Preparation for Light Sheet Microscopy, Protocols and Guidelines for ZEISS Lightsheet Z.1, Revision 08.10.2013

[107] G. Zhang, V. Gurtu, and S.R. Kain: An Enhanced Green Fluorescent Protein Allows Sensitive Detection of Gene Transfer in Mammalian Cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 227, 707-711 (1996)

Anhang

Mathcad-Programm zur Berechnung der Ratio-Bilder

Das im Folgenden beschriebene Mathcad Programm zur Erstellung eines Ratio-Bildes ist in Abbildung 56 dargestellt.

Zunächst werden die Daten der Fluoreszenzaufnahme als Textdatei eingelesen (1). Diese stellen räumlich getrennt sowohl die Intensitätsinformation bei der Anregungswellenlänge 391 nm als auch die Intensitätsinformation bei der Anregungswellenlänge 470 nm dar. Da das Verhältnis aus beiden Intensitätsinformationen gebildet werden soll, ist die Erstellung zweier Submatrizen notwendig deren Breite und Höhe eingegeben wird (2). Außerdem werden jeweils die Startpixel in Form von Zeile *r* und Spalte *c* der oberen linken Ecke der jeweiligen Submatrix eingegeben, woraus die Endpixel (untere rechte Ecke) berechnet werden (3). Anhand dieser Informationen werden die beiden Submatrizen erstellt, wobei I391 die Intensitätsinformation bei der Anregungswellenlänge 391 nm enthält und I470 die Intensitätsinformation bei der Anregungswellenlänge 470 nm (4). Es folgt die Division der beiden Submatrizen (5) sowie die Erstellung des Binärbildes anhand eines einzugebenden Schwellwertes (6). Durch Multiplikation der Ergebnismatrix aus (5) mit dem in (6) erstellten Binärbild werden die Verhältniswerte der Intensitäten der Hintergrundpixel, welche in einem ähnlichen Wertebereich liegen können wie die Verhältniswerte der Fluoreszenzintensitäten, auf null gesetzt. Das Ergebnisbild wird als Textdatei abgespeichert (8).

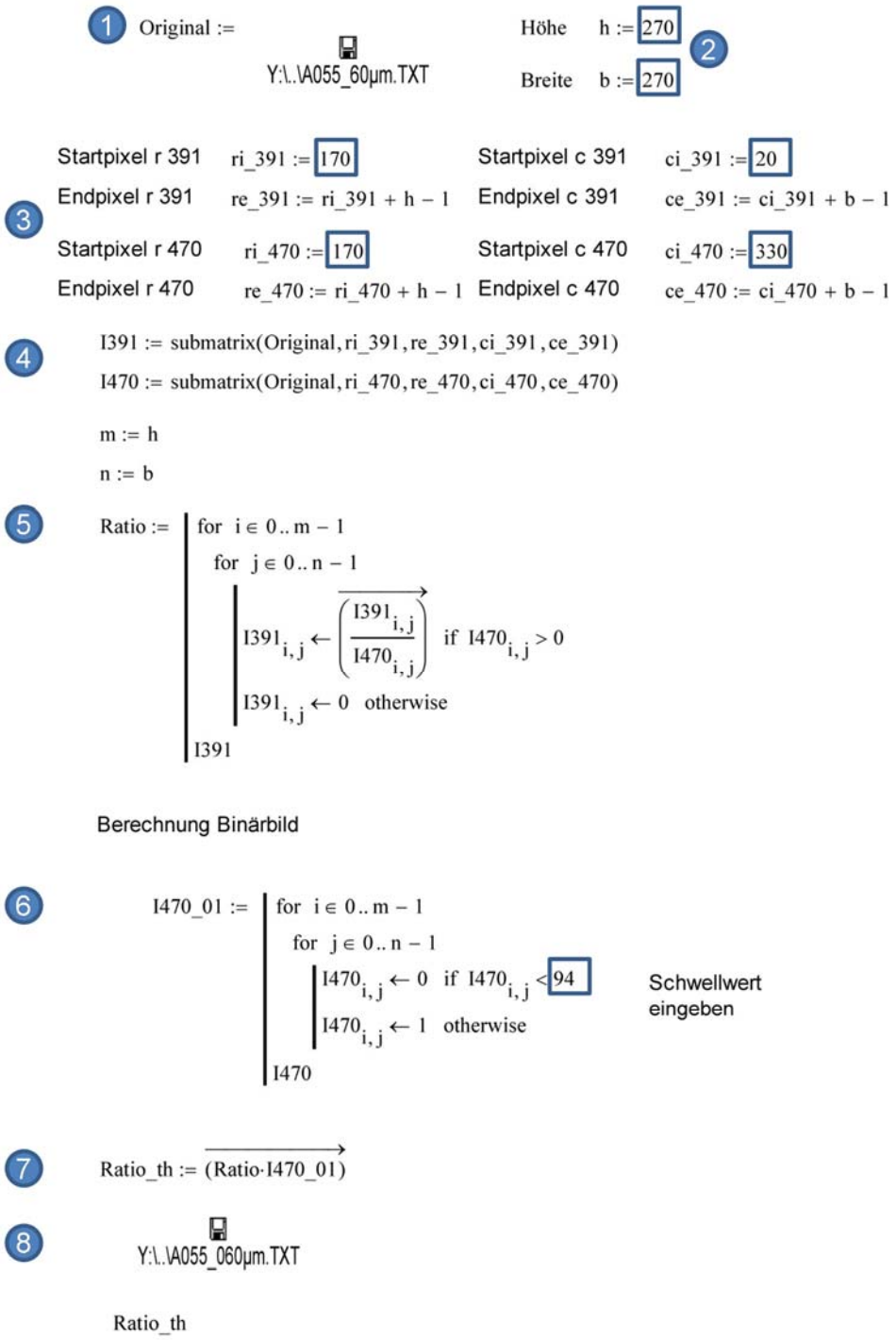


Abbildung 56. Mathcad Programm zur Erstellung eines Ratio-Bildes

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen, die zum Entstehen dieser Arbeit beigetragen haben, ganz herzlich bedanken.

Allen voran gilt mein großer Dank meinem Doktorvater Herbert Schneckenburger, der mir die Promotion zu diesem spannenden Thema angeboten und ermöglicht hat. Danke für die hervorragende Betreuung und Unterstützung meiner Arbeit, für die konstruktiven Diskussionen, die Hilfsbereitschaft, die Ermöglichung der Teilnahme an der Summer School und Konferenzen, die ungemein angenehme Zusammenarbeit.

Außerdem möchte ich Paul Walther danken, für seine Bereitschaft, das Zweitgutachten für diese Arbeit zu übernehmen, sowie Raimund Hibst und Albrecht Brandenburg für ihre Prüfertätigkeit.

Rainer Wittig vom ILM an der Universität Ulm danke ich für hilfreiche Diskussionen und die Bereitstellung der transfizierten Redoxzelllinien. Ebenso geht mein Dank an Brigitte Angres von der Cellendes GmbH in Reutlingen für die Bereitstellung der transfizierten HeLa Zelllinie. Bernd Faltermeier danke ich für seine Besuche an der Hochschule Aalen und die damit verbundenen fruchtbaren Gespräche zum Thema Optik.

Für die Umsetzung meiner Bauteilzeichnungen und die Hilfe bei Fragen der Konstruktion bedanke ich mich bei Horst Müller. Markus Gruber danke ich für seine umfangreiche Unterstützung in sämtlichen Elektronikfragen.

Großer Dank gilt meinen Kollegen der Biophotonik-Arbeitsgruppe der Hochschule Aalen:

Ein ganz besonderes Dankeschön geht hierbei an Thomas Bruns für seine unermüdliche Unterstützung in allen Bereichen dieser Arbeit, für die unzähligen tollen Ideen, die diese Arbeit voran gebracht haben und für die vielen fruchtbaren Diskussionen.

Claudia Hintze danke ich sehr für die vielen Sphäroide, die sie für mich angesetzt hat und für Ihre Hilfsbereitschaft in allen Zellkulturfragen, Michael Wagner für die Hilfestellung bei der Zusammenstellung und Konfiguration der elektronischen Komponenten für das Ratio Imaging, Petra Weber für ihre Hilfestellung bei der Staurosporin-Inkubation und für die Beantwortung meiner zellbiologischen Fragen. Verena Richter danke ich sehr dafür, dass sie immer ein offenes Ohr für mich hatte, egal welches Anliegen oder welche Frage mir gerade in den Sinn kam. Danke an alle für die tolle und angenehme Zusammenarbeit.

Ein letzter Dank, der nicht in Worte zu fassen ist, geht an meine Familie und nochmal an Thomas. Ihr seid die Besten.

Lebenslauf

Der Lebenslauf wurde aus Gründen des Datenschutzes entfernt.

Der Lebenslauf wurde aus Gründen des Datenschutzes entfernt.

Publikationsliste

T. Bruns, **S. Schickinger**, and H. Schneckenburger: Single plane illumination module and micro-capillary approach for a wide-field microscope, *J. Vis. Exp.* 90 e51993 (2014)

T. Bruns, **S. Schickinger** und H. Schneckenburger: Mikroskopadapter zur Rotation 3-dimensionaler Proben. *BioPhotonik* 7, 40-41 (2014)

L. Mamone, G. Di Venosa, L. Gándara, D. Sáenz, P. Vallecorsa, **S. Schickinger**, M.V. Rossetti, A. Batlle, F. Buzzola, and A. Casas: Photodynamic inactivation of Gram-positive bacteria employing natural resources. *J. Photochem. Photobiol. B* 133, 80-89 (2014)

S. Schickinger, T. Bruns, R. Wittig, P. Weber, M. Wagner, and H. Schneckenburger: Nanosecond ratio imaging of redox states in tumor cell spheroids using light sheet-based fluorescence microscopy. *J. Biomed. Opt.* 18, 126007 (2013)

T. Bruns, H. Schneckenburger, and **S. Schickinger**: Sample holder for rotation of three-dimensional specimens in microscopy. European Patent Application EP 13 184 931.7 (2013)

V. Richter, P. Weber, M. Wagner, **S. Schickinger**, T. Bruns, and H. Schneckenburger: Visualizing a Cytostatic Drug and Probing Apoptosis of Cancer Cells. In: V. Deckert and N. Ramanujam (eds.), Clinical and Biomedical Spectroscopy and Imaging III, *Proc. SPIE* 8798, 879804 (2013)

H. Schneckenburger, P. Weber, M. Wagner, T. Bruns, V. Richter, **S. Schickinger**, and R. Wittig: Multidimensional fluorescence microscopy in live cell imaging – a mini-review. *Photon. Lasers Med.* 1, 35-40 (2012)

H. Schneckenburger, P. Weber, M. Wagner, **S. Schickinger**, V. Richter, T. Bruns, W.S.L. Strauss, and R. Wittig: Light exposure and cell viability in fluorescence microscopy. *J. Microsc.* 245, 311-318 (2012)

T. Bruns, **S. Schickinger**, R. Wittig, and H. Schneckenburger: Preparation strategy and illumination of 3D cell cultures in light–sheet based fluorescence microscopy. *J. Biomed. Opt.* 17, 101518 (2012)

H. Schneckenburger, P. Weber, M. Wagner, **S. Schickinger**, T. Bruns, and W.S.L. Strauss: Dose Limited Fluorescence Microscopy of 5-Aminolevulinic Acid Induced Protoporphyrin IX. In: D. Kessel (ed.), Living Cells in Optical Methods for Tumour Treatment and Detection: Mechanisms and Techniques in Photodynamic Therapy, *Proc. SPIE* 7164, 716414 (2009)

H. Schneckenburger, M. Wagner, P. Weber. **S. Schickinger**, T. Bruns, and W.S.L. Strauss: Dose-limited fluorescence microscopy of living cells. In: P.J. Campagnola, E. Stelzer, and G .v. Bally (eds.), Advanced Microscopy Techniques, *Proc. SPIE* 7367, 73670E (2009)

Poster und Vorträge

International Conference on Laser Applications in Life Sciences (LALS), Ulm, Deutschland
29. Juni - 2. Juli 2014

S. Schickinger, T. Bruns, R. Wittig, and H. Schneckenburger: Nanosecond Ratio Imaging of Redox States in Tumor Cell Spheroids Using Light Sheet Based Illumination (Vortrag)

Focus on Microscopy (FOM), Sydney, Australien
13. - 16. April 2014

S. Schickinger, T. Bruns, R. Wittig, P. Weber, M. Wagner, and H. Schneckenburger: Nanosecond Ratio Imaging of Redox States in Tumor Cell Spheroids Using Light-Sheet Based Fluorescence Microscopy (Vortrag)

T. Bruns, **S. Schickinger**, and H. Schneckenburger: Single Plane Illumination Module and Micro-Capillary Approach for a Wide-Field Microscope (Vortrag)

T. Bruns, **S. Schickinger**, and H. Schneckenburger: Sample holder for Rotation of 3-dimensional Specimens in Microscopy (Poster)

V. Richter, **S. Schickinger**, Petra Weber, and H. Schneckenburger: Light Scattering Microscopy – An Appropriate Tool for Probing Apoptosis? (Poster)

Forschungstag 2013, Baden-Württemberg Stiftung, Stuttgart, Deutschland
11. Juli 2013

S. Schickinger, T. Bruns, M. Wagner, R. Wittig, and H. Schneckenburger: A light sheet module for 3D fluorescence microscopy and nanosecond ratio imaging of tumour cell spheroids (Poster)

Focus on Microscopy (FOM), Maastricht, Niederlande
24. - 27. März 2013

S. Schickinger, T. Bruns, M. Wagner, R. Wittig, and H. Schneckenburger: Ratio Imaging – Simultaneous detection of fluorescence images excited by two wavelengths (Poster)

H. Schneckenburger, **S. Schickinger**, M. Wagner, P. Weber, R. Wittig, and Thomas Bruns: A Light Sheet Module for 3D Fluorescence Microscopy of Tumour Cell Spheroids (Poster)

T. Bruns, **S. Schickinger**, and H. Schneckenburger: McSPIM – A Microfluidic Capillary Approach for Selective Plane Illumination Microscopy (Poster)

Focus on Microscopy (FOM), Singapur
01. - 04. April 2012

H. Schneckenburger, M. Wagner, P. Weber, **S. Schickinger**, V. Richter, R. Wittig, and T. Bruns: 3D Fluorescence Microscopy of Living Cells at Low Light Exposure (Vortrag)

T. Bruns, **S. Schickinger**, R. Wittig and H. Schneckenburger: Illumination Device for Light Sheet Based Fluorescence Microscopy of Living Cells (Poster)

5th International Graduate Summer School: Biophotonics '11, Ven, Schweden
14. - 21. Mai 2011

S. Schickinger, T. Bruns, and H. Schneckenburger: Light sheet based microscopy for 3D-imaging of tumor cell spheroids (Poster)

Teile dieser Dissertation wurden bereits in folgenden Fachartikeln veröffentlicht:

T. Bruns, S. Schickinger, and H. Schneckenburger: Single plane illumination module and micro-capillary approach for a wide-field microscope, *J. Vis. Exp.* 90 e51993 (2014)

S. Schickinger, T. Bruns, R. Wittig, P. Weber, M. Wagner, and H. Schneckenburger: Nanosecond ratio imaging of redox states in tumor cell spheroids using light sheet-based fluorescence microscopy. *J. Biomed. Opt.* 18, 126007 (2013)

V. Richter, P. Weber, M. Wagner, S. Schickinger, T. Bruns, and H. Schneckenburger: Visualizing a Cytostatic Drug and Probing Apoptosis of Cancer Cells. In: V. Deckert and N. Ramanujam (eds.), Clinical and Biomedical Spectroscopy and Imaging III, *Proc. SPIE* 8798, 879804 (2013)

T. Bruns, S. Schickinger, R. Wittig, and H. Schneckenburger: Preparation strategy and illumination of 3D cell cultures in light–sheet based fluorescence microscopy. *J. Biomed. Opt.* 17, 101518 (2012)