Baden-Württemberg Stiftung

WIR STIFTEN ZUKUNFT

Forschungsergebnisse

Optische Technologien

der Baden-Württemberg Stiftung gGmbH

Nichtlineare Mikroskopie mit selbstrekonstruierenden Strahlen in Zellclustern und Geweben

Nichtlineare Mikroskopie mit selbstrekonstruierenden Strahlen in Zellclustern und Geweben

Die Kombination von 2-Photonen-Fluoreszenzanregung und selbstrekonstruierenden Bessel-Strahlen zur Weiterentwicklung der Lichtscheibenmikroskopie war Inhalt eines durch die Baden-Württemberg Stiftung finanzierten Projekts an der Universität Freiburg.

Mikroskopische Verfahren, mit denen dreidimensionale Bilddatensätze von ausgedehnten Objekten, wie Zellclustern oder Gewebeproben, angefertigt werden können, sind von immenser Bedeutung für verschiedene Wissenschaftsdisziplinen, wie Evolutionsbiologie, Krebsforschung [3] oder neurologische Forschung. Die zum Einsatz kommenden optischen Mikroskopieverfahren basieren meist auf der Markierung spezifischer Merkmale der Probe mittels Fluoreszenzfarbstoffen, der Beleuchtung der Probe mittels Laserlicht und der Detektion des Fluoreszenzlichts der gezielt angeregten Farbstoffe. Eine große Herausforderung ist hierbei die Verbesserung von Kontrast und Auflösung und die Minimierung von Bleichen und phototoxischen Effekten.

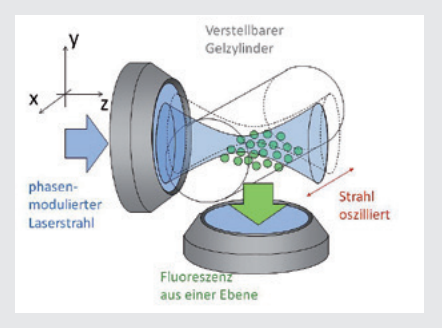

Abb. 1: Links: Funktionsprinzip eines Lichtscheibenmikroskops. Ein holographisch geformter (phasenmodulierter) Beleuchtungsstrahl wird in das Mikroobjekt projiziert und dann lateral gescannt um zeitgemittelt ein Lichtblatt zu formen. Fluoreszenz-Licht wird nur in der Fokalebene der Detektionslinse emittiert und detektiert

In den vergangenen Jahren hat eine neue Methode der Fluoreszenzmikroskopie die bildgebende biologische Forschung entscheidend beeinflusst. Bei der sogenannten Lichtscheibenmikroskopie („light-sheet microscopy") wird jeweils nur eine Ebene des Objekts beleuchtet, entweder mit einem stark elliptischen Strahl, der durch eine Zylinderlinse erzeugt wird, oder durch einen lateral in der Fokusebene gescannten radialsymmetrischen Gauß-Strahl. Die schwach fokussierten Strahlen beleuchten eine Ebene, die im Bereich der Rayleigh-Länge des Strahls eine nahezu konstante Dicke aufweist. Die Detektion erfolgt durch ein zweites optisches Linsensystem, dessen optische Achse senkrecht auf der beleuchteten Ebene steht und diese auf eine Kamera abbildet (Abbildung 1). Fluorophore außerhalb der Fokusebene der Detektionslinse, die die Bildschärfe beeinträchtigen würden, werden nicht angeregt.

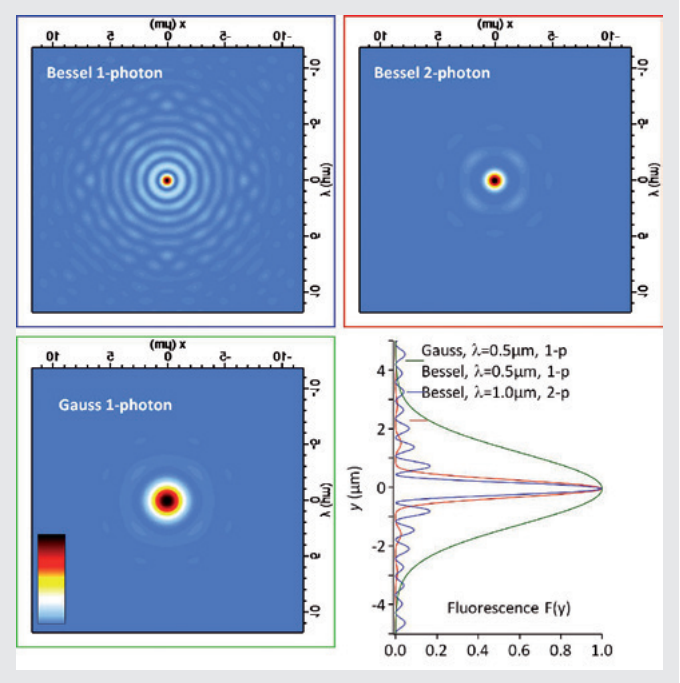

Abb. 2: Simulierte Fluoreszenz-Querschnitte und Linienprofile von 3 Strahlen mit gleicher axialer Ausdehnung: Bessel-Strahl mit 1- und 2-Photonen-Anregung und ein Gauß-Strahl mit 1-Photonen-Anregung. Rechts unten: Fluoreszenz-Profile durch das Zentrum

Neben dem sehr guten „axialen optischen Sectioning" sind weitere Vorteile eine höhere Bildaufnahmerate, und eine deutlich geringere phototoxische Probenbelastung im Vergleich zur konfokalen Mikroskopie.

Insbesondere für die Untersuchung von ausgedehnten stark streuenden Objekten hat sich die 2-Photonen-Mikroskopie in den vergangenen 20 Jahren etabliert. Wie bei der konfokalen Mikroskopie wird bei der 2-Photonen-Mikroskopie die Fluoreszenz in der Probe Punkt für Punkt mit einem fokussierten Laserstrahl angeregt. Im Gegensatz zur konfokalen Mikroskopie ist der Anregungsprozess im Falle der 2-Photonen-Mikroskopie jedoch nichtlinear. Dies bedeutet, dass nicht ein Photon der halben Wellenlänge, sondern zwei Photonen der doppelten Wellenlänge gleichzeitig auf das Fluorophor treffen und die notwendige Energie zur Anregung bereitstellen. Der Vorteil der nichtlinearen Anregung ist eine deutlich lokalere Signalentstehung und eine erhöhte Eindringtiefe aufgrund der doppelten Wellenlänge.

In diesem Projekt wurden nun zwei erfolgreiche Ansätze zusammengeführt: die hohe Bildaufnahme-Geschwindigkeit und die niedrige Probenbelastung der Lichtscheibenmikroskopie einerseits sowie die erhöhte Eindringtiefe und die Unterdrückung von Artefakten der 2-Photonen-Mikroskopie andererseits. Die Verwendung von selbstrekonstruierenden Bessel-Strahlen für die Lichtscheibenmikroskopie führt hierbei zu einer weiteren Reduktion der

Dicke des Lichtblatts und folglich zu einer Verbesserung der Auflösung (Abbildung 2). Das dünne Hauptmaximum der Bessel-Strahlen bei gleicher Strahlengänge zeigt deren Überlegenheit bei der Generierung möglichst dünner Lichtblätter relativ zu Gauß-Strahlen. Dieser Effekt wird durch die Nutzung der 2-Photonen-Fluoreszenzanregung entscheidend verbessert, da die Fluoreszenz im Ringsystem des Bessel-Strahls infolge der nichtlinearen Anregung der Fluorophore massiv unterdrückt wird.

Die in Abbildung 4 gezeigten Mikroskopieaufnahmen an aktingefärbten, spheroidalen Krebszellclustern mit 300µm Durchmesser bestätigen die erwarteten Vorteile unseres Konzepts auch in komplexen biologischen Medien. Insbesondere im hinteren Bereich des Objekts (siehe Ausschnittsvergrößerungen in Abbildung 4a, b, c) zeigt sich eine deutliche Verbesserung im Bildkontrast bei der Beleuchtung mittels Bessel-Strahlen mit 2-Photonen-Fluoreszenzanregung gegenüber der linearen Fluoreszenzanregung mittels Bessel- oder Gauß-Strahl. Dies wird scheibenmikroskopie setzt. Dieses Prinzip sollte viele neue diagnostische Möglichkeiten bei der lichtmikroskopischen Untersuchung von Zellclustern und Geweben ermöglichen.

Referenz:
[1] Fahrbach, F.O., Gurchenkov, V., Alessandri, K., Nassoy, P., Rohrbach A., Light-sheet microscopy in thick media using scanned Bessel beams and two-photon fluorescence excitation. Opt. Express, 2013a. 21(11): p. 13824 - 13839.

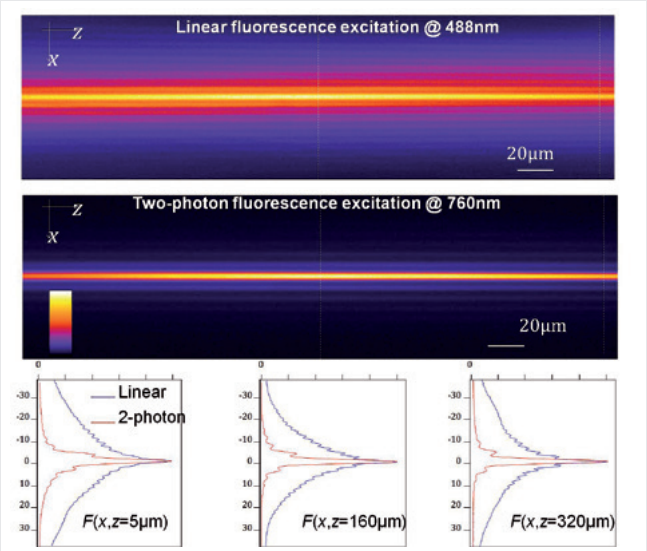

Abb. 3: Gemessene Fluoreszenz-Querschnitte von Bessel-Strahlen in einer Fluorescein-Lösung. Sowohl der Bessel-Strahl oben mit 488nm Wellenlänge zur 1-Photonen-Anregung, als auch darunter mit 760nm Wellenlänge zur 2-Photonen-Anregung haben eine axiale Strahlausdehnung von ca. 320µm. Die unterste Reihe zeigt jeweils drei Fluoreszenz-Profile entlang der gestrichelten Linien für 1-Photonen-Fluoreszenz (Lin.) und 2-Photonen-Fluoreszenz. (Quelle: [1])

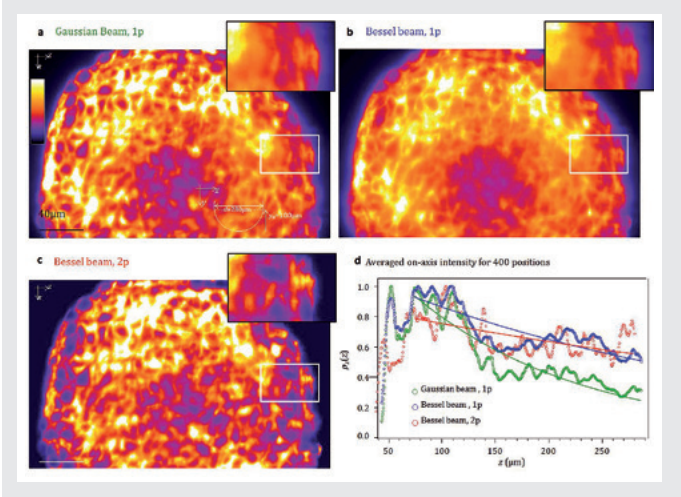

Abb. 4: Simultan aufgenommene Kontraste ungefärbter, lebender C. elegans Fadenwürmer bei THG (blau), SHG (grün), CARS (rot) und deren Überlapp (ganz rechts), Pulsdauer des Aufnahme-Laserstrahls im Objektivfokus etwa 7 fs

Die in Abbildung 3 dargestellten Messungen bestätigen auch experimentell die Überlegenheit der Kombination aus Lichtscheibenmikroskopie mittels selbstrekonstruierender Bessel-Strahlen und der 2-Photonen-Fluoreszenzanregung bei der Generierung möglichst dünner Lichtblätter [1]. Die drei lateralen Strahlprofile zeigen eine deutlich höhere Lokalisierung bei 2-Photonen-Fluoreszenzanregung im Vergleich zur linearen Fluoreszenzanregung über den gesamten axialen Bildbereich von 320µm. Hierfür wurde ein gepulster Ti-Saphir-Laser bei einer Wellenlänge von 760nm verwendet.

durch Quantifikation der Eindringtiefen der drei verschiedenen Beleuchtungsstrahlen in die Zellcluster in Abbildung 4d bestätigt. Die hier ermittelte Eindringtiefe für den Bessel-Strahl mit 2-Photonen-Fluoreszenzanregung von 560µm ist um einen Faktor 3 – 5 größer als die des etablierten Referenzverfahren (Gauß-Strahl mit 1-Photonen-Anregung).

Damit konnte erfolgreich gezeigt werden, dass die Kombination von 2-Photonen-Fluoreszenzanregung und selbstrekonstruierenden Bessel-Strahlen neue Maßstäbe in der Licht-

Kontakt:

Prof. Alexander Rohrbach
Universität Freiburg
Institut für Mikrosystemtechnik
Labor für Bio- and Nano-Photonik
Georges-Köhler-Allee 102
79110 Freiburg

Tel. 0761 2037536

rohrbach@imtek.de
www.imtek.de/bnp