

# Multimodale Bildgebung – Mikroskopie auf neuen Wegen

Thomas Hellerer, Toptica Photonics AG, Gräfelfing/München

**Bei der Untersuchung von Lebensprozessen wie dem Stoffwechsel kommen neue Mikroskopiemethoden zum Einsatz. Da zur Analyse dieser Prozesse die untersuchten Organismen voll lebensfähig und intakt bleiben müssen, muss die durch die Bildgebung verursachte Störung möglichst gering sein. Nicht-invasive Methoden sind daher das Mittel der Wahl. Bei der Multimodalen Bildgebung werden verschiedene Signale wie z.B. THG, SHG oder Autofluoreszenz aufgenommen und liefern komplementäre Informationen.**

Adipositas (Fettleibigkeit) ist heutzutage eine der großen Zivilisationskrankheiten. Viele Forscher beschäftigen sich daher mit dem Stoffwechsel und wie man ihn positiv beeinflussen kann. Im Gegensatz zu Standardverfahren in der Zellbiologie reicht es hier nicht aus, einzelne Zellen oder einen Verbund an Zellen zu untersuchen. Das komplexe Wechselspiel von Regelungsmechanismen wie die Ausschüttung von Insulin setzen voraus, dass man einen voll lebensfähigen und intakten Organismus untersucht. Um die Komplexität zu reduzieren, verwendet man möglichst einfache und gut verstandene Organismen, die dennoch Rückschlüsse auf den Menschen zulassen.

### Lebende Organismen als Untersuchungsobjekte

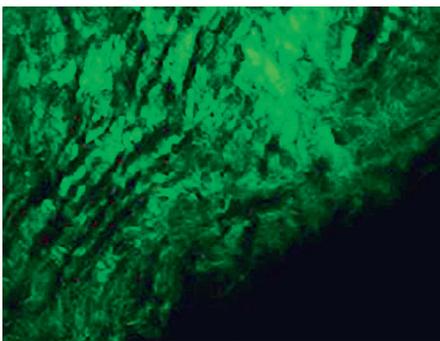
Für den Fettstoffwechsel hat sich unter vielen anderen der Wurm *Caenorhabditis elegans* etabliert. Dieser 1 mm kleine Wurm lebt auf Pflanzen und ist genetisch vollstän-

dig analysiert [1]. Wertvolle Erkenntnisse konnten bisher auf Basis verschiedener Mutanten gewonnen werden. Noch vor sieben Jahren wurden die Würmer getötet, um mit einer Zentrifuge den Fettgehalt festzustellen. Dann fand man einen Weg, die Nahrung der Würmer mit Farbstoffen zu versehen und die Nahrungsaufnahme am lebenden Wurm zu beobachten [2]. Dies war ein entscheidender Schritt für die Beobachtung am unversehrten Organismus, der auch eine Lokalisation der Fettanteile im Wurm ermöglichte. Leider wurde später nachgewiesen, dass die Farbstoffe nicht die ganze Wahrheit enthüllen: Sie färben nicht das gesamte Fett im Wurm an sondern nur einen bestimmten Teil [3]. Dies gehört zu den großen Problemen der etablierten Fluoreszenzmikroskopie, die auf Farbstoffen als Marker basiert. Ein weiteres Problem besteht darin, dass die Anfärbung der Zellbestandteile deren Funktionalität verändert. Das hat weitreichende Folgen in der Analyse von Lebensprozessen. Trotz des begründeten, sehr großen Erfolgs der Fluoreszenzmethode werden deshalb Stimmen laut, die nach neuen Wegen verlangen, mit denen die störende Einflussnahme auf das Zellgeschehen eliminiert werden kann. Das Schlagwort heißt nicht-invasive Techniken: Man behandelt die Proben nicht speziell für die Beobachtung, sondern bedient sich Mittel und Wege, um auf „natürliche“ Weise eine informative Bildgebung der Untersuchungsobjekte zu erreichen.

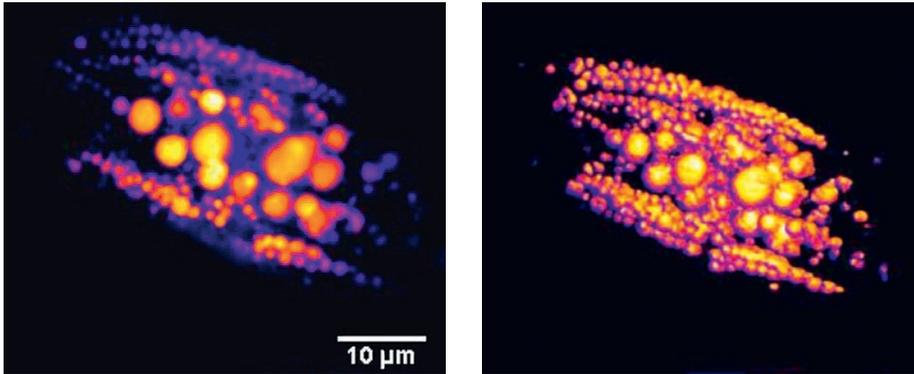
### Nicht-invasive Methoden und Nichtlineare Effekte

Verschiedene Methoden wurden in den letzten 10 Jahren dafür entwickelt und auch erfolgreich in biologischen Anwendungen eingesetzt [4]. Zu ihnen zählen

die second(SHG) (**Bild 1**) bzw. third harmonic generation(THG)-Mikroskopie und die Coherent Raman Scattering (CRS)-Mikroskopie. Alle diese Verfahren beruhen auf optisch nicht-linearen Prozessen. Um eine spürbare Nichtlinearität in der untersuchten Probe zu erzeugen, müssen Laser mit sehr hohen Leistungen eingesetzt werden, die im Dauerbetrieb die Lebensfähigkeit der Zellen zerstören würden. Deshalb kommen Ultrakurzpuls-Laser zum Einsatz, die für einen winzigen Bruchteil einer Sekunde ( $10^{-13}$  s) einen Laserpuls mit Spitzenleistung bis zu mehreren zehn Kilowatt emittieren. Durch lange Pausen zwischen den Pulsen kommt es nur zu einer moderaten, gut verträglichen Belastung der Zellen. Die nichtlineare Optik bietet viele interessante Effekte, die sich am besten mit dem Photonenbild des Lichts veranschaulichen lassen. Dazu stellt man sich einen Laserstrahl bildlich als Fluß von Photonen vor, deren Dichte mit der Intensität des Lasers zunimmt. Bei genügend hoher Intensität ist die Wahrscheinlichkeit sehr hoch, dass zwei dieser Photonen „sich zufällig treffen“ und über die optische Nichtlinearität miteinander wechselwirken. Dabei kann unter Vernichtung der beiden Photonen ein neues mit der doppelten Energie entstehen, was letztendlich zu einer Strahlung mit der halben Wellenlänge führt: die Second Harmonic Generation (SHG). Nur Proben, welche diese optische Nichtlinearität (2.Ordnung) aufweisen, ergeben ein Signal bei dieser Wellenlänge. Dieses kann deshalb als Kontrastmittel in der Bildgebung fungieren und die Aufgabe des Farbstoffes übernehmen. In lebenden Zellen dienen insbesondere relativ steife Strukturen wie Proteinfilamente (Mikrotubuli) und Kollagenfasern



**Bild 1: SHG-Bild von Kollagenfasern in einer Probe aus einer menschlichen Arterie** (Bild: Group of Molecular Microscopy, Chalmers University)



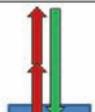
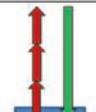
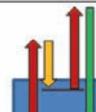
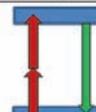
**Bild 2: CARS (Coherent Antistokes Raman Scattering)-Bild von Lipidtröpfchen aus dem zentralen Teil eines lebenden Wurms der Gattung *C. elegans*. Links: ein einzelner optischer Schnitt durch den Wurm. Rechts: ein 3D-gerendertes Bild, berechnet aus vielen optischen Schnitten**

(Bild: Group of Molecular Microscopy, Chalmers University)

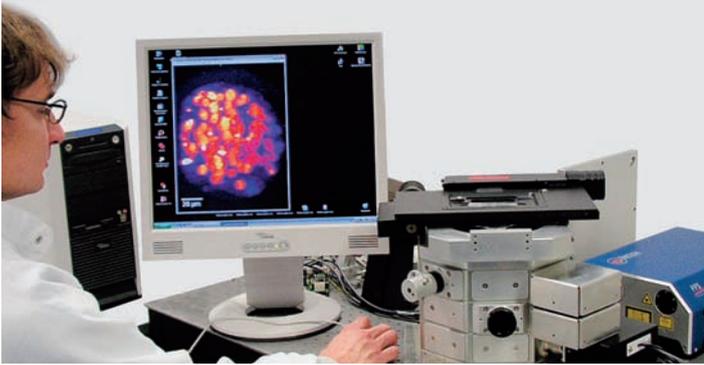
als Quelle für das SHG-Signal. Die Third Harmonic Generation (THG) erfolgt analog zur SHG mit drei Photonen, die ein Signal bei der gedrittelten Wellenlänge erzeugen. Hier sind vor allem Lipidtröpfchen (=Fett) die Hauptquelle für das THG-Signal in lebenden Organismen. Beide optische Prozesse finden zeitgleich in der Probe statt. Trifft also ein Laserpuls bestimmter Wellenlänge auf die Probe im Mikroskop, leuchten die verschiedenen Bestandteile der Zelle bei der halben oder aber bei der Drittel-Wellenlänge. Die simultane Nutzung beider Signale, die verschiedene Informationen tragen, führte zu dem Begriff „Multimodale Bildgebung“: Das bildgebende Mikroskop läuft mit derselben Lichtquelle in zwei Betriebsmodi, dem SHG-Imaging und dem THG-Imaging. Durch Hinzufügen weiterer Signale kann das Potenzial dieser Methode beliebig gesteigert werden. Eine Erweiterung der Lichtquelle ermöglicht z.B. auch CRS-Imaging (**Bild 2**) als Untersuchungsmodus: Zwei synchron arbeitende, gepulste Laser mit unterschiedlichen Wellenlängen können auch drei Photonen miteinander wechselwirken lassen, so dass dabei ein vier-

tes entsteht. Das Besondere hierbei ist, dass mit der Wahl der Wellenlängen die Zellbestandteile gezielt ausgewählt werden können, die das Signal und damit den Kontrast erzeugen sollen. Der physikalische Mechanismus beruht auf den Molekülen in den Zellen, deren Atome mit verschiedenen Frequenzen gegeneinander schwingen können. Die Wechselwirkung dieser Schwingungen mit Licht wird durch den Raman-Effekt beschrieben. Die (Eigen-)Schwingungen sind spezifisch für jede Art von Molekül und kann mit der Differenzfrequenz der beiden Laser kohärent angeregt werden. Durch die Abstimmung der Laser auf die Molekülart, erzeugen diese verstärkt das kohärente Raman Signal (engl. Coherent Raman Scattering, CRS). Bevorzugt werden mit der CRS-Mikroskopie die Lipidtröpfchen, Mitochondrien, Membranen und Proteine wegen ihres hohen Raman-Kontrastes abgebildet.

Zu diesen drei Techniken gesellt sich noch die Autofluoreszenz von bestimmten Zellbestandteilen wie beispielsweise Hämoglobin, Melanin, Elastin oder das Coenzym NADH, das eine wichtige Rolle beim Energiehaushalt der Zelle spielt. Es

Methode	SHG	THG	CRS	2-Photonen Autofluoreszenz
Photonenzahl	2+1	3+1	3+1	2+1
Zellbestandteile	Mikrotubuli, Kollagenfasern	Lipidtröpfchen	Lipidtröpfchen, Membrane, Proteine, Wasser	Elastin, NADH, Melanin, Hämoglobin
Energieschemata				

**Tabelle 1: Übersicht über nicht-invasive, optisch nichtlineare Mikroskopie-Methoden**



**Bild 3: Faserlaser an einem Multimodal Mikroskop**

(Bild: TILL Photonics GmbH)

handelt sich hierbei zwar um Farbstoffe, die aber von Natur aus in Zellen vorhanden sind und daher keine störenden Faktoren darstellen. Werden diese Farbstoffe nicht wie üblich mit sichtbarem Licht angeregt, sondern mit gepulsten Infrarotlasern, dann können analog zur SHG anstatt eines auch zwei Photonen die Anregungsenergie aufbringen. Der Vorteil besteht darin, dass die dafür notwendige Intensität des gepulsten Lasers nur im Fokus des Mikroskop-Objektivs ausreicht. Das Signal – die Fluoreszenz – des Farbstoffs wird also nur von einem punktförmigen Ausschnitt der Zelle ausgesandt. Mit geeigneten Spiegel-Scannern wird dieser Fokuspunkt durch die Probe in allen Raumrichtungen bewegt und dabei das Signal aufgenommen. Mit einer 3D-Auswertung lässt sich so

alle optisch-nichtlinearen Mikroskopiemethoden gemeinsam. In **Tabelle 1** wird eine Übersicht über die vier vorgestellten nicht-invasiven Methoden – SHG, THG, CRS und Autofluoreszenz – gegeben. Sie stellen die verschiedenen Facetten der Multimodalen Bildgebung dar und beruhen alle auf der nichtlinearen Optik.

### Ausblick

Der vielversprechende Ansatz der Multimodalen Bildgebung steht kurz vor dem Durchbruch in den Lebenswissenschaften. Zum einen sind moderne Mikroskop-Objektive verfügbar, die für Anregungswellenlängen im Infrarotbereich optimiert wurden. Auch sind seit einigen Jahren Ultrakurzpuls-Faserlaser erhältlich, die nicht mehr nur von technisch

die dreidimensionale Struktur der Organismen rekonstruieren und sogenannte optische Schnitte hindurch legen. Diese 3D-Leistungsfähigkeit, die üblicherweise nur mit erhöhtem technischen Aufwand in der konfokalen Mikroskopie verbunden ist, haben

versierten Wissenschaftlern in Physiklaboren, sondern von nichttechnischem Personal direkt in Kliniken oder Laboren bedient werden können. In diesen Lasern sorgen eine mit seltenen Erden dotierte Faser als Verstärkungsmedium und sättigbare Absorber für einen stabilen Pulsbetrieb. Die kompakten Systeme benötigen zudem weder Wasserkühlung noch Starkstromanschlüsse und lassen sich somit einfach in Life Science Laboren integrieren (**Bild 3**).

### Literaturhinweise:

- [1] Science 1998; 282(5396):2012-8
- [2] Nature 2003; 421:268–272
- [3] PNAS 2007; 104:14658-63
- [4] Opt.Exp.2009; 17:12282-90

### Kontakt:

Dr. Thomas Hellerer  
Toptica Photonics AG  
Vertriebsmanager  
Ultrafast Fiber Lasers  
Toptica Photonics AG  
Lochamer Schlag 19  
D-82166 Gräfelfing/München  
Tel.: 089 / 85837-123  
Fax: 089 / 85837-200  
eMail: thomas.hellerer@toptica.com  
www.toptica.com



[www.bio-photonik.de](http://www.bio-photonik.de) ▶ Webcode **B2003**