

2

Das Unsichtbare sichtbar machen

Um in immer kleinere Welten vordringen zu können, brauchen Biologie und Medizin Biologen und Mediziner feinere optische Werkzeuge. Die Biophotonik liefert neue Technologien »mit Ausstrahlung«.

Nachdem wir uns nun mit der Geschichte der Wissenschaften des Lichtes und des Lebens sowie mit der Wechselwirkung von Licht mit Materie im Allgemeinen und mit biologischen Systemen im Besonderen beschäftigt haben, wollen wir uns nun einige Techniken anschauen, die das Rüstzeug für die Biophotonik bilden. Spannend dabei ist, dass diese Techniken auf natürliche Phänomene zurückgehen. Wie wir später sehen werden, können wir mit diesem Rüstzeug, das wir uns von Fall zu Fall ein wenig »zurechtschneiden«, ganz unterschiedliche medizinische und biologische Fragestellungen angehen. Es lohnt sich also, sich den »Werkzeugkasten« der Biophotonik ein bisschen genauer anzuschauen.

Wahrhaft leuchtende Einfälle: Fluoreszenztechniken

Die Fluoreszenz ist ein sehr gutes Beispiel dafür, wie ein natürliches Phänomen zur Grundlage von einer ganzen Reihe von Techniken wurde. Fluoreszenzfarbstoffe und die auf ihnen basierenden Innovationen wie die Fluoreszenzmikroskopie oder optische Bio-Chips sind aus keinem Labor mehr wegzudenken.

Das Phänomen der Fluoreszenz wurde schon im 17. Jahrhundert von Anastasius Kircher, einem Jesuiten-Pater, Universalgelehrten und Alchimisten beschrieben. Er beobachtete, dass wässrige Extrakte des Blauen Sandelholzes eine blaue Farbe abstrahlten, wenn er sie mit weißem Licht beschien. Später hat Isaac Newton diese Beobachtung

gen in seine Beschreibungen der spektralen Eigenschaften des weißen Lichtes aufgenommen. Es war dann aber George Stokes, der in der Mitte des 19. Jahrhunderts die entscheidende Beobachtung machte, die das Phänomen der Fluoreszenz erst verständlich machte: Die Absorptionswellenlänge ist immer kürzer und damit das absorbierte Licht energiereicher als die Emissionswellenlänge. Demnach wird einfallendes Licht von der fluoreszierenden Substanz absorbiert, die dann mit kurzer zeitlicher Verzögerung energieärmeres, längerwelliges Licht emittiert. Gemäß der »Stokeschen Regel« muss die Wellenlänge des emittierten Photons mindestens gleich oder größer sein als die des absorbierten Photons. Bei exakt gleichen Wellenlängen spricht man von »Resonanzfluoreszenz«. Der Unterschied zwischen dem Absorptions- und dem Emissionsmaximum ist immer abhängig von dem eingesetzten Fluorophor. Darunter verstehen wir bestimmte Moleküle, die nach Absorption energiereichen Lichtes Photonen mit längerer Wellenlänge abgeben – das Molekül fluoresziert. Wie wir schon aus der Schule wissen, gibt es keine Regel ohne Ausnahme: Im Fall der Zwei-Photonen-angeregten Fluoreszenz ist bei zwei absorbierten Photonen nur ein Elektron betroffen, das aufgrund der doppelt erhöhten Energie ein Photon emittiert, welches eine kürzere Wellenlänge als das Anregungslicht besitzt – was der Stokeschen Regel scheinbar widerspricht.

Lumineszenz ist der Oberbegriff zu Fluoreszenz und Phosphoreszenz. Zur Lumineszenz gehört beispielsweise das so genannte kalte Leuchten, wie es zum Beispiel das Mineral Fluorit in Flussspat und Calciumfluorit abgibt, und mit deren Spezialform, der Biolumineszenz, wir uns im nächsten Abschnitt beschäftigen wollen – und die Phosphoreszenz, bei welcher die verzögerte Emission erst nach Millisekunden oder gar Tagen auftritt. Im Gegensatz dazu ist das Zeitintervall zwischen der Absorption und der Emission im Fall der Fluoreszenz extrem kurz und beträgt weniger als eine Millionstel Sekunde.

Viele pflanzliche und tierische Gewebe fluoreszieren ebenso wie manche Materialien von sich aus, wenn man sie mit einer kurzen Wellenlänge bestrahlt. In diesem Fall sprechen wir von primärer oder Autofluoreszenz. Diese Eigenschaft ist für die Untersuchung von Pflanzen, in der Analyse von Sedimentgesteinen und in der Halbleiterindustrie von großem Nutzen. Für das Studium von tierischem Gewebe oder Krankheitserregern ist die Autofluoreszenz allerdings oft

zu blass oder nicht spezifisch genug und deshalb nur von geringem Wert. Hier kommen Fluorophore ins Spiel, deren abgestrahltes Licht intensiver ist. Durch sie vermittelte Fluoreszenz bezeichnet man als sekundäre Fluoreszenz.

Fluorophore werden seit Ende des 19. Jahrhunderts hergestellt. Es sind Farbstoffe, die in gewissem Sinn mit den sichtbares Licht absorbierenden Farben vergleichbar sind. Sie binden an organische Materie, und, was sie für den Einsatz in der Biologie so nützlich macht, zeigen dabei oft eine gewisse Spezifität für bestimmte Zielstrukturen. So binden manche an Nukleinsäuren, wie der Farbstoff DAPI (4',6-Diamidino-2-phenylindol). Ursprünglich wurde er als ein Mittel zur Bekämpfung der Erreger der Schlafkrankheit synthetisiert, heute wird er zur schnellen Identifikation von Pathogenen benutzt. Besonders hervorzuheben sind außerdem das Kristallviolett, das zum Anfärben von Bakterien dient, sowie das FITC (*Fluoresceinisothiocyanat*). Das Fluorescein wurde von Adolf von Baeyer Ende des 19. Jahrhunderts synthetisiert. FITC ist noch heute in den meisten biologischen Labors zu finden und dient als Fluoreszenzmarker in unterschiedlichen Anwendungen. FITC absorbiert Licht besonders gut bei 494 nm und strahlt Licht mit einer Wellenlänge von 518 nm ab, was dem Experimentator am Fluoreszenzmikroskop als grün erscheint.

Genutzt wird das Phänomen Fluoreszenz in der Forschung in Form des Fluoreszenzmikroskops, das in den frühen Jahren des 20. Jahrhunderts von August Köhler, Carl Reichert und Heinrich Lehmann entwickelt wurde. Nachdem man die Bedeutung dieser Technik mehrere Jahrzehnte lang unterschätzt hatte, ist das Fluoreszenzmikroskop heute ein fast unersetzbares Werkzeug der Zellbiologie.

Das grundlegende Prinzip des Fluoreszenzmikroskops ist, dem Anregungslicht den Weg zur zu untersuchenden Probe zu gestatten und dann das viel schwächere Fluoreszenzsignal davon zu trennen. Denn nur das von der Probe emittierte Licht soll das Auge des Betrachters oder auch einen anderen Detektor (wie z. B. eine digitale oder konventionelle Filmkamera) erreichen. Je dunkler dabei der Hintergrund ist, desto effizienter ist das Mikroskop.

Eines der wichtigsten Anwendungsfelder der Fluoreszenzmikroskopie ist die Immunofluoreszenz. Dazu nutzt man das natürlich Prinzip der Antikörper-Antigen-Bindung aus. Mit diesem Prinzip werden im Körper eingedrungene Krankheitserreger erkannt und zur Zerstörung durch das Immunsystem markiert. Die Antikörper-Anti-

gen-Bindung ist hochspezifisch, ähnlich wie bei einem Schloß, in das nur ein ganz spezieller Schlüssel passt.

Die Immunofluoreszenz verbindet in äußerst nützlicher Weise diese hohe Spezifität der Bindung mit der Sensitivität der Fluoreszenzmikroskopie. Schauen wir uns kurz einen typischen Versuchsaufbau an: Wir haben zum Beispiel eine Gewebeprobe, in der wir bestimmte Proteine nachweisen wollen. Durch einen Immunisierungsschritt haben wir uns in Mäusen oder Kaninchen Antikörper gegen genau dieses Protein hergestellt. An diese koppeln wir nun ein Fluorophor und geben sie auf unsere Probe. War das entsprechende Protein darin enthalten, ist der Antikörper nun gebunden und wir können ihn im Fluoreszenzmikroskop leuchten sehen. Auf diese Weise kann man neben Proteinen auch Chromosomen und DNS-Abschnitte genauso sichtbar machen wie Hormone, Vitamine oder komplexere zelluläre Strukturen.

Bei der Untersuchung von lebenden Systemen trifft die Fluoreszenzmikroskopie allerdings an ihre Grenzen. Viele Fluorophore sind nämlich giftig, verändern die chemischen Verhältnisse oder sind schlicht zu groß für ihre Bindungsstellen. Der Trend geht deshalb zu markerfreien Methoden, von denen wir einige im weiteren Verlauf unserer Betrachtungen noch kennen lernen werden.

Glühende »Liebesbotschaften« im Labor: Luciferase-Techniken

Wahrscheinlich haben auch Sie schon mal einen frühlommerlichen Abendspaziergang gemacht, bei dem »Glühwürmchen« für eine gehörige Portion Romantik sorgten. Die kleinen leuchtenden Insekten sind in Wirklichkeit keine Würmer, sondern Käfer. Sie sind in der Lage, Licht zu erzeugen und damit ihr Liebeswerben zu bereichern. Vielleicht war es ja während eines romantischen Rendezvous, dass ein Biologe auf die Idee kam, dieses Leuchten auch in seinem Labor zu nutzen. Doch eins nach dem anderen. Als Biolumineszenz bezeichnet man zunächst ganz allgemein das Phänomen der Lichterzeugung durch Lebewesen. Sie ist, ganz unromantisch, das Ergebnis von biochemischen Reaktionen in Zellen, bei denen die chemische Energie in Form von Lichtquanten abgegeben wird. Dabei haben die Tiere eine Effizienz entwickelt, die der Mensch mit seinen Glühbirnen nicht erreichen kann: Die Lichtausbeute beträgt in der Natur

nämlich fast 100 Prozent, während wir in unseren künstlichen Lichtquellen 95 Prozent als Wärme verschwenden. Das können sich die Tiere nicht leisten, denn dann würden sie beim Leuchten glatt überhitzen. Neben den Glühwürmchen setzen in der Natur auch andere Insekten, Larven, Würmer, Spinnen und sogar Pilze auf das Licht. Besonders bekannt sind auch mikroskopisch kleine Algen, die für das Meeresleuchten verantwortlich sind. Sie sorgen zum Beispiel in der karibischen Mosquito Bay für nächtliche Badeerlebnisse der besonderen Art, bei denen jede Schwimmbewegung das Wasser blau-grün aufleuchten lässt. Die dafür verantwortlichen einzelligen Algen gehören zu den Dinoflagellaten und tragen so romantische Namen wie »Nachtlaternenchen«. Wenn das Nährstoffangebot stimmt, bilden die Einzeller Kolonien von bis zu 100.000 Individuen pro Liter Wasser. Und weil sie in diesen Massen natürlich im wahrsten Sinne des Wortes ein gefundenes Fressen für ihre Feinde sind, locken die Algen mit dem hellen Licht die Feinde der Feinde an – und lassen diese auffressen, bevor sie selbst zum Opfer werden.

Bei den Tieren hat die Natur zwei Strategien entwickelt: Entweder produzieren die Tiere das Licht in speziell dafür entwickelten Organen selbst oder sie beherbergen Bakterien, die das Leuchten für sie übernehmen. Auch hier sind die Motive zur Lichtaussendung oft recht heimtückisch: Der Anglerfisch lockt zum Beispiel mit einer leuchtenden »Angel« vor seinem Maul die Beutetiere direkt in seinen Mund, der Beilfisch dagegen hält sich seine Fressfeinde vom Leib, in dem er mit biolumineszierenden Schuppen an Bauch und Körperseiten die hell erscheinende Wasseroberfläche imitiert und sich so nahezu perfekt tarnt.

Doch betrachten wir jetzt noch etwas genauer die leuchtenden Käfer, deren Liebesglühen heute so manchem Wissenschaftler die Arbeit erleichtert. Weltweit gibt es rund 2000 Glühwürmchenarten. Bei uns in Europa funkelt das Glühwürmchen (*Lampyrus noctiluca*), in Nord- und Mittelamerika leuchtet die Feuerfliege (*Photinus pyralis*) abendlichen Spaziergängern heim. Jede Art verfügt über ganz spezifische Blinksignale, damit es bei zufälligen Begegnungen nicht zu Paarungen der falschen Art kommt. Die Tiere besitzen dazu in ihrem Hinterleib einen biolumineszierenden Stoff, das Luciferin, das eine Leuchtreaktion auslöst, sobald ein bestimmtes Enzym, die Luziferase ausgeschüttet wird. Spezialisierte Zellen dienen mit einer Vielzahl von Salzkristallen als eine Art Reflektor, die das Licht vom Körper weg

nach außen lenken. Durchsichtige Zellen auf der anderen Seite des Leuchtorgans lassen das Leuchten von außen erkennbar sein. Die nötige Energie liefern weitere Zellen, die ihrerseits besonders viele Mitochondrien enthalten. Der Vorgang der Lichterzeugung ist bei allen Tieren sehr ähnlich: Die Tiere brauchen Sauerstoff und chemische Energie in Form von ATP dazu. Es gibt Theorien, dass die Biolumineszenz einst von den Lebewesen entwickelt wurde, um das Stoffwechselfgift Sauerstoff zu entsorgen, denn in den Frühzeiten der Erde war die Atmosphäre noch ganz anders zusammengesetzt als heute, enthielt fast keinen freien Sauerstoff, aber jede Menge Stickstoff, Kohlenmono- und -dioxid und verschiedene Schwefel- und Stickoxide. Die damals lebenden Organismen waren daran gut angepasst und konnten mit dem Sauerstoff, den die ersten photosynthetisch lebenden Blaualgen freisetzen, nichts anfangen. Sie entwickelten also Möglichkeiten, dieses schädliche Gas wieder loszuwerden und eine dieser Möglichkeiten ist die Lumineszenz: Dabei wird eine Substanz, nämlich das Luziferin, mit Hilfe von Sauerstoff oxidiert und nimmt vorübergehend einen energetisch angeregten Zustand ein. Geht es in seinen energetischen Grundzustand zurück, wird Licht ausgesendet.

Die Lumineszenz hat in den letzten Jahren eine außerordentlich große Bedeutung für Biologie und Medizin erlangt. Luziferin/Luziferase-Systeme werden als Nachweissysteme in der Molekularbiologie eingesetzt. Die erste Luziferase wurde zwar aus Bakterien isoliert und charakterisiert, als erste intensiv biochemisch untersucht wurde allerdings die Luziferase der amerikanischen Firefly. Zur Zeit zeichnen sich nach Einschätzung des Lumineszenz-Experten Dr. Dieter Weiß vom Institut für Organische Chemie und Makromolekulare Chemie der Universität Jena folgende drei Einsatzgebiete ab:

Diagnostik: Da bei der Lichterzeugung mit Hilfe des Luciferin/Luziferase-Systems ATP verbraucht wird, ist die Stärke des ausgesendeten Lichtes ein Maß für die in der Ausgangslösung vorhandene Menge an ATP. Mit speziellen Methoden der Lichtmessung kann man also eine quantitative ATP-Bestimmung vornehmen. Der ATP-Gehalt lässt wiederum Rückschlüsse auf das Vorhandensein von Bakterien zu, was zum Beispiel bei Hygienekontrollen zum Einsatz kommt.

Gentechnik: Hier setzt man Luziferase-Gene als Reporter ein, die vom Ort eines Geschehens direkt berichten, was passiert. Denn Molekularbiologen haben häufig das Problem, dass sie nicht wissen, ob die Übertragung eines bestimmten Gens geklappt hat oder nicht,

denn das Produkt des Gens lässt sich unter Umständen nur schlecht oder zu einem späteren Zeitpunkt nachweisen. Bringt man aber das Reporter-gen, in diesem Fall das für Luziferase, mit in das Genom ein, kann man nach Zugabe von Luziferin direkt am Leuchten der entsprechenden Zellen ablesen, dass die fremden Gene ordnungsgemäß eingebaut und ablesen werden. Medizinische Grundlagenforschung: Zellen oder Bakterien, die das Luciferase-Gen in sich haben, können als Marker dienen. Injiziert man zum Beispiel einer Ratte Luziferase-markierte Salmonellen-Erreger so breiten sie sich im Rattenkörper aus. Mit Hilfe einer Luziferin-Lösung, die man anschließend der Ratte verabreicht, kann man diese Ausbreitung durch das entstehende Licht von außen verfolgen, ohne die Ratte zu töten. In gleicher Weise kann man auch Karzinome markieren und deren Metastasenbildung und Verbreitung optisch durch das emittierte Licht registrieren.

Große Dinge im Kleinen verstehen – Moderne Mikroskopie- und Bildgebungsverfahren

Die Welt in immer kleineren Dimensionen zu verstehen, hat die Wissenschaftler beflügelt, immer bessere optische Instrumente zu entwickeln. Die Entdeckung von mikroskopisch-kleinen Zellen wie beispielsweise Bakterien, Spermienzellen, Blutzellen, mikroskopische Nematoden, usw. war die Folge. Mit den grundlegenden Arbeiten von Ernst Abbe zum Auflösungsvermögen optischer Systeme war der Grundstein für die moderne Optik gelegt. Mikroskope konnten von da an mit hoher Genauigkeit und reproduzierbaren Eigenschaften gefertigt werden.

Heutzutage sind die Anforderungen an die Mikroskopie weiter gestiegen. Man möchte optische Bilder der betrachteten biologischen Proben mit hoher Ortsauflösung und maximalem Kontrast. Sie fragen nach dem Warum? Hierzu müssen wir uns noch einmal die Zielsetzungen der Biophotonik genauer anschauen. Die großen Visionen der Biophotonik sind einen Beitrag dazu zu leisten:

- Krankheiten in ihren Ursachen zu verstehen
- Krankheiten zu verhindern oder möglichst frühzeitig zu erkennen
- Krankheitsbekämpfung nebenwirkungsfrei mit maßgeschneiderten Therapien durchzuführen

Um diese visionären Ziele erfolgreich in der nahen Zukunft erreichen zu können, benötigen die Wissenschaftler ein detailliertes Verständnis über die in Zellen, Gewebe und Organen ablaufenden Lebensvorgänge. Hierbei ist es oft von Vorteil, wenn Informationen auf molekularem Niveau vorliegen, das heißt, man versteht, was die Moleküle in einem Prozess machen. Neben dem Verstehen der Prozesse und Funktionen ist eine weitere essentielle Voraussetzung, dass man in die Zellvorgänge gezielt eingreifen und sie manipulieren kann. Dieses Eingreifen muss hierbei auf sub- und suprazellulärer Ebene möglich sein. Mit diesen beiden Instrumentarien wird man dann in der Lage sein, besonders die Grenzbereiche zwischen Zelle, Gewebe und Organismus verstehen zu lernen. Gerade auf dem Weg von der Zelle auf einem Objektträger, die dort sogar noch zu einem zweidimensionalen Untersuchungsobjekt zusammengequetscht wird, über das Organ bis hin zum gesamten Organismus benötigen wir besondere bildgebende Technologien, die heutzutage nur in Ansätzen vorhanden sind. Sollen beispielsweise Organe oder Zellen in einem lebenden Organismus untersucht werden, so müssen die optischen Untersuchungsinstrumente an die entsprechende Stelle innerhalb des Körper gebracht werden. Das heißt, die neuen bildgebende Verfahren müssen in Endoskope eingebaut werden. Dies ist – neben der Entwicklung von immer besseren bildgebende Technologien – für sich eine große Herausforderung.

Zusammenfassend können wir sagen, dass der Kampf gegen Krankheiten nur dann wesentlich erfolgreicher angegangen werden kann, wenn es uns gelingt, die Vorgänge innerhalb unserer Körperzellen auf molekularer Ebene zu verstehen. Daher sind die optischen Technologien im Wechselspiel mit anderen Wissenschaftsbereichen wie beispielsweise der Nanotechnologie, der Biotechnologie, der Mikrosystemtechnik, der Medizintechnik und anderen gefordert, innovative optische bildgebende Techniken zur Verfügung zu stellen, die uns mit möglichst hohem Kontrast und sehr guter räumlicher Auflösung detaillierte Informationen über die betrachteten biologischen Vorgänge liefern. Dieses Handwerkszeug in den Händen von Lebenswissenschaftlern, Biologen, Mikrobiologen und Medizinern kann es schaffen, die Visionen der Biophotonik wahr werden zu lassen.

Bleiben wir erstmal bei der Mikroskopie. Bei der konventionellen Lichtmikroskopie werden zur Kontrasterzeugung vor allem Unter-

schiede in der Absorption, Transmission und Reflexion von Weißlicht in biologischem Gewebe genutzt.

Neben diesen »konventionellen« Verfahren gewinnen seit vielen Jahren auch eine Vielzahl weiterer Phänomene der Wechselwirkung von Licht und Materie für die Bildgebung an Bedeutung.

Detaillierte molekulare Informationen über das zu untersuchende System, beispielsweise eine biologische Zelle, lassen sich über die Fluoreszenz-, die Infrarot-Absorptions- bzw. die Raman-Spektroskopie gewinnen. Mit den physikalischen Grundlagen und deren Eigenschaften haben wir uns im Kapitel 1 vertraut gemacht. In Abb. 2.1 sind die drei Licht-Materie-Phänomene nochmals nebeneinander dargestellt.

Als Fluoreszenz bezeichnet man das Phänomen, bei dem die elektronische Absorption von Licht einer bestimmten Wellenlänge durch ein Molekül zur Emission von Licht bei längeren Wellenlängen führt. Die Detektion von Fluoreszenz anstatt der schwachen Absorptionsänderungen von Weißlicht bei der optischen Mikroskopie bietet zahlreiche Vorteile. So ist die Fluoreszenzdetektion nahezu untergrundfrei und sehr sensitiv, so dass man sogar einzelne Moleküle untersuchen kann. Da viele biologische Proben keine Eigenfluoreszenz bei Anregung im sichtbaren Spektralbereich zeigen und eine direkte UV-Anregung oftmals zur einer Probenzerstörung führt, wurde die Labeling-Technologie etabliert. Dabei färbt man die Probe mit speziell entwickelten Farbstoffen (Marker bzw. Label) ein und detektiert

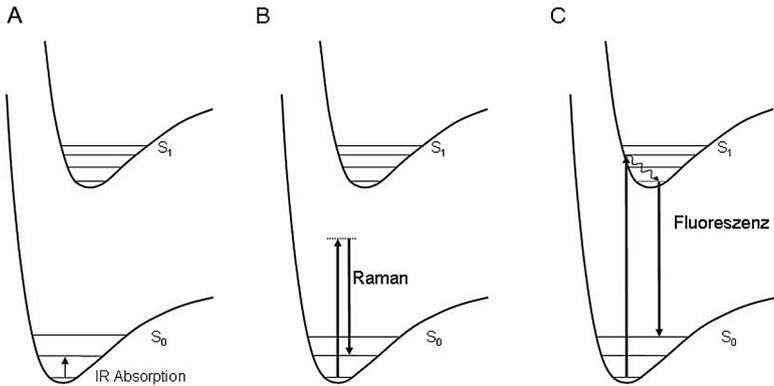


Abb. 2.1 Physikalische Prozesse zur Kontrasterzeugung in der optischen Mikroskopie. (A) IR-Absorption, (B) linearer Stokes-Raman-Prozess, (C) Fluoreszenz.

beispielsweise dann den Ort, wo man diese unter Bestrahlung fluoreszierenden Label in den Proben wiederfindet. Durch die Einführung des konfokalen Messprinzips in die Fluoreszenzmikroskopie können sehr einfach dreidimensionale Bilder der Probe erzeugt werden. Bei dieser Technik wird das Untersuchungsobjekt sukzessive abgerastert und durch den Einsatz einer Blende (konfokales Pinhole) im Fluoreszenz-Detektionsstrahlengang immer nur das Signal eines kleinen Volumensegments aufgenommen (siehe Abb. 2.2). Signale, die nicht aus dem entsprechenden Volumenelement stammen, werden durch das konfokale Pinhole im Detektionsstrahlengang gebündelt.

Durch die immer weitergehende Optimierung dieser optischen Systeme ist man heutzutage in der Lage, neben Ortsinformationen

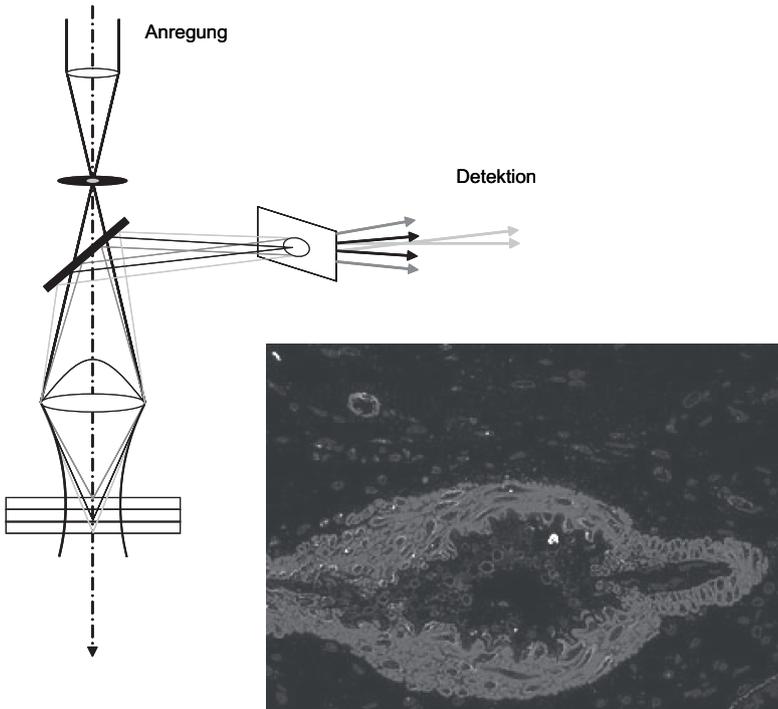


Abb. 2.2 Schematische Darstellung eines konfokalen Mikroskops sowie Fluoreszenzbild einer Arterie im Zungenquerschnitt einer Ratte. Zur Aufnahme des

Bildes wurde die Probe mit den Farbstoffen ALEXA 594 und DAPI gelabelt (mit freundlicher Genehmigung der Carl Zeiss AG).

vor allem auch die in biologischen Zellen ablaufenden Prozesse zu verfolgen. Neueste optische Konzepte im Bereich der konfokalen Fluoreszenzmikroskopie erlauben die Echtzeituntersuchung schneller Prozesse an Lebendpräparaten. Mit solchen hochgerüsteten Technologien sind die Wissenschaftler aus dem Life-Science-Bereich somit in der Lage, durch eine einzigartige Kombination von Scangeschwindigkeit, Bildqualität und Sensitivität exklusive Einblicke hinter die Kulissen zellulärer Prozesse zu gewinnen. Damit hat sich Fluoreszenzmikroskopie zu einer Methode entwickelt, die zur Beantwortung einer Vielzahl von Fragestellungen aus den Bereichen Lebenswissenschaften und Medizin geeignet ist. Konfokale Fluoreszenzmikroskope gehören somit mittlerweile zum Standardequipment eines jeden Biologielabors.

Ein großer Wurf in Richtung einer dreidimensionalen Fluoreszenz-Lebendzellanalyse ist dem Wissenschaftlerteam um Ernst Stelzer am Europäischen Laboratorium für Molekularbiologie (EMBL) gelungen. Die Wissenschaftler haben ein so genanntes Scheibenmikroskop (*Selective Plane Illumination Microscopy*, SPIM) realisiert, mit dem man erstmals in der Lage ist, lebende Systeme bis hinauf zu einer Größe von wenigen Millimetern mit hoher Ortsauflösung dreidimensional darzustellen. Hierbei wird die reale, lebende Probe in einem Fixierungsmaterial, zum Beispiel Agarose (ein Medium, was die Lebensfähigkeit der Zellen nicht beeinflusst), eingebettet und mit einer so genannten Lichtscheibe (siehe Abb. 2.3 A und B) beleuchtet. Das Fluoreszenzlicht wird somit auch nur innerhalb dieser schmalen Beleuchtungsscheibe angeregt. Über eine einfache Sammeloptik wird der beleuchtete Bereich auf einer Kamera abgebildet. Zur Unterdrückung von störendem Streulicht des Beleuchtungslasers wird ein Fluoreszenz-Emissionsfilter in den Detektionsstrahlengang eingebaut. Durch Rotation der Probe können die Informationen aus ganz unterschiedlichen Blickwinkeln aufgezeichnet und anschließend zu einem dreidimensionalen Bild verrechnet werden. Abb. 2.3 C und D zeigen SPIM-Bilder von Embryonen des Medaka-Fisches. Solche Aufnahmen wären ohne die innovative SPIM-Technologie unmöglich.

Die Fluoreszenztechnologie birgt jedoch auch einige Nachteile. Die Farbstoffe können durch die Laserbestrahlung ausbleichen, wodurch eine Quantifizierung extrem schwierig wird. Zudem ist die Probenvorbereitung durch den Einsatz externer Label durchaus umfangreich und bedarf speziell geschulten Personals. Methoden, die ganz ohne

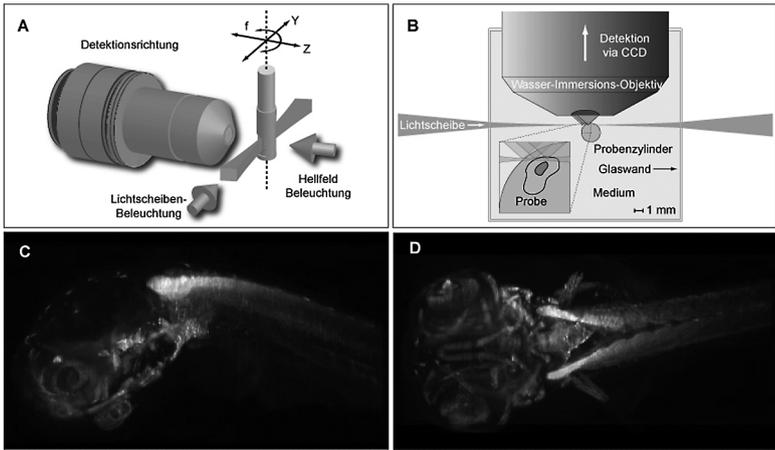


Abb. 2.3 »Single Plane Illumination Microscopy« (SPIM) für moderne drei-dimensionale Anwendungen im Life-sciences Bereich. Die dünne Lichtscheibe beleuchtet nur einen kleinen Ausschnitt der Probe, welche durch die Focusebene des Detektionsobjektiv und der Lichtscheibe bewegt wird (A, B). Ein Vorteil von SPIM ist eine deutlich reduzierte Belichtungs-

zeit, was Folgen wie lichtinduziertes Ausbleichen und phototoxische Effekte vermindert. SPIM ist besonders gut geeignet zur Darstellung von drei-dimensionalen, stark streuenden Proben wie beispielsweise Medaka-Embryonen (C, D). Mit freundlicher Genehmigung von Ernst Stelzer, EMBL, Heidelberg.

externe Marker auskommen, sind die IR-Absorptions- und die Raman-Spektroskopie. Bei beiden Methoden können Schwingungsübergänge der in einer Probe vorhandenen Moleküle angeregt werden. Man erhält somit einen molekularen Fingerabdruck der Probe.

Bei der Raman-Spektroskopie wird das Probenmaterial mit monochromatischem Laserlicht bestrahlt, wobei das eingestrahelte Licht gestreut wird. Ein geringer Prozentsatz des Streulichtes ist jedoch durch Molekülschwingungen im Vergleich zum einfallenden Licht frequenzverschoben (siehe Abb. 2.1 B). Diese Frequenzverschiebungen spiegeln das Schwingungsmuster des Probenmaterials wider und sind somit hochspezifisch. Bei der IR-Spektroskopie werden die Molekülschwingungen direkt durch die Absorption von IR-Photonen angeregt (siehe Abb. 2.1 A). Obwohl der Raman-Effekt im Vergleich zur direkten IR-Absorption bzw. zur Fluoreszenz ein extrem schwacher Effekt ist, hat sich die Raman-Spektroskopie durch eine konsequente Verbesserung der Raman-Apparaturen (optische Filter, Detektoren,

Spektrometer, usw.) in den letzten Jahren als eine extrem leistungsstarke Methode etabliert.

Eine typische Raman-Apparatur ist in Abb. 2.4 dargestellt. Da es sich bei der Raman-Streuung, wie es der Name impliziert, um eine Streumethode handelt, kann das Streulicht unter beliebigen Streuwinkeln gesammelt werden. Als besonders vorteilhaft hat sich die Kombination mit einem Lichtmikroskop erwiesen. Diese Kombination erlaubt die detaillierte Untersuchung biologischer Objekte mit hoher Ortsauflösung. Arbeitet man zusätzlich konfokal, so können sogar dreidimensionale Informationen der biologischen Objekte erhalten werden.

Durch die Ortsauflösung im Submikrometerbereich können beispielsweise einzelne Bakterien flächenmäßig untersucht und über subtile Auswertalgorithmen direkt identifiziert werden. Ein besonderer Vorteil bei der Raman-Spektroskopie ist die minimale Probenvorbereitung, da die Proben gewöhnlich so verwendet werden können, wie sie anfallen. Im Vergleich zur IR-Absorptionsspektroskopie müssen die Proben nicht getrocknet oder wie bei der Fluoreszenzspektroskopie nicht durch externe Label markiert werden. Nachteilig bei der Raman-Methode ist der niedrige Raman-Streuerquerschnitt. Daraus resultiert ein relativ großer Zeitbedarf, um ein komplettes Raman-Image aufzunehmen und im Fall der Anwesenheit von Fluorophoren überlagert die resultierende Fluoreszenz die Raman-Information bzw. erschwert ihre Detektion. Obwohl es hier vielfältige technologische Ansätze gibt, die Aufnahmezeiten zu verkürzen, ist man jedoch weit davon entfernt Raman-Bilder in Echtzeit mit Video-Wiederholungsrate aufzeichnen zu können.

Mit der Entwicklung von hochintensiven Ultrakurzzeitlasern wurde neben der Spektroskopie auch die Mikroskopie unter der Ausnutzung nichtlinearer optischer Phänomene in den letzten Jahren revolutioniert. Durch technische Tricks kann man erreichen, dass ein Laser seine Strahlung nicht kontinuierlich abgibt, sondern in Form von Lichtpulsen. Hierbei ist ein aktuelles Ziel der Laserentwickler, immer kürzere Laserpulse zu erzeugen, dies jedoch mit einer hohen Wiederholungsrate (man spricht auch von Repetitionsrate). Die kürzesten Laserpulse liegen aktuell im Bereich von Sub-Femtosekunden. Mittels dieser Ultrakurzzeitlaser lassen sich moderate Energiemengen in einer sehr kurzen Zeit (Piko- bis Femtosekunden) erzeugen, wodurch sich bei entsprechender Fokussierung extrem hohe Licht-

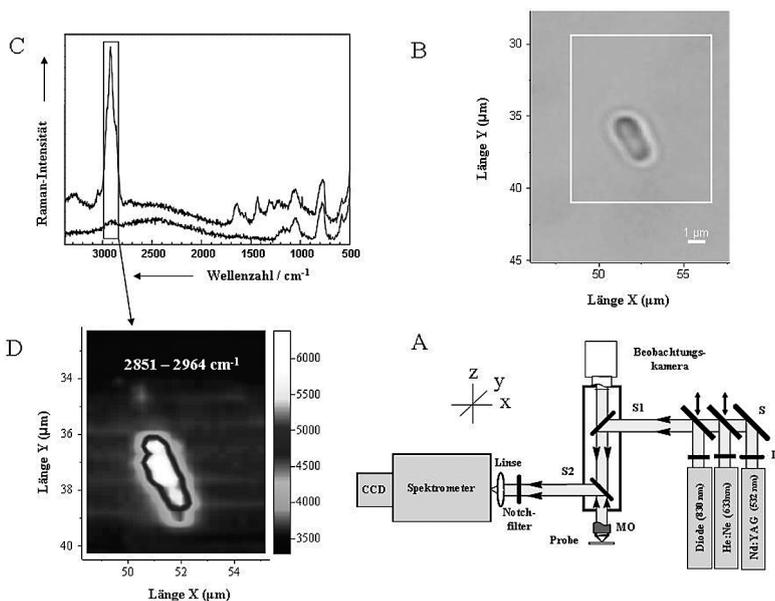


Abb. 2.4 (A) Schematischer Aufbau eines Raman-Mikroskops. Der ausgewählte Raman-Anregungslaser wird über einen Strahlteiler S1 in ein Lichtmikroskop eingekoppelt und auf die Probe fokussiert. Das Mikroskopobjektiv (MO), welches zum Fokussieren des Lasers verwendet wird, wird auch zum Sammeln des Raman-Streulichtes genutzt. Über den Strahlteiler S2 wird das gesammelte Streulicht aus dem Mikroskop ausgekoppelt und über einen Notch-Filter und eine Linse auf den Eingangsspalt eines Raman-Spektrometers (SP) fokussiert. Der Notch-Filter dient dazu, das elastische bzw. Rayleigh-gestreute Licht zu eliminieren. Das verbleibende Raman-Licht wird im Spektrometer entsprechend seiner spektralen Bestandteile zerlegt und mit einer CCD-Kamera aufgezeichnet. Zur Anregung der Raman-Streuung können verschiedene Laser mit verschiedenen Lichtwellenlängen eingesetzt werden. Die Auswahl einer entsprechenden Wellenlänge wird in Abhängigkeit der Fragestellung und der Probe getroffen. Die Laserwellenlänge hat hierbei einen sehr entscheidenden Einfluss auf die Ergebnisse, die man erhält. Für weitere Informationen muss auf die einschlägige Literatur verwiesen

werden. In Teilbild (B) ist die Mikroskopaufnahme eines einzelnen Bakteriums (*Bazillus Sphaericus*) dargestellt, das mit der Beobachtungskamera aufgezeichnet wurde. Diese Bakterienzelle wurde Punkt für Punkt mit einer räumlichen Auflösung von etwa $0,5 \mu\text{m}$ abgescannt. An jedem Messpunkt wurde ein Raman-Spektrum, d. h. der molekulare Fingerabdruck der Zelle, aufgezeichnet. Zwei typische Raman-Spektren sind in Teilbild (C) gegeben. Das obere Spektrum ist ein Raman-Spektrum der Zelle, während das untere Spektrum, das Raman-Spektrum des Quarzträgers zeigt, auf dem die Zelle liegt. An diesen beiden Spektren können Sie erkennen, dass auch immer die Umgebung, in der sich beispielsweise eine biologische Zelle befindet, signifikante Informationen liefert. Nimmt man nun beispielsweise die CH-Streckschwingung, die typisch für alle organischen Moleküle ist, und stellt das mikroskopische Bild (Teilbild B) als Funktion dieser Raman-Information dar, so erhält man Teilbild D. Man spricht, da in diesem Bild Raman-Informationen, also chemische Informationen dargestellt sind, auch von einer chemischen oder biochemischen »Landkarte«.

intensitäten generieren lassen. Derartige Intensitäten führen zu speziellen nichtlinearen Licht-Materie-Wechselwirkungen, bei denen im Gegensatz zu den bisher beschriebenen Fluoreszenz- bzw. Raman-Techniken das Signal nicht mehr linear mit der eingestrahnten Lichtintensität skaliert.

Die nichtlineare Antwort der Materie ermöglicht die Beobachtung spezieller Prozesse wie zum Beispiel der Multi-Photonen-Absorption. Bei der Multi-Photonen-Absorption werden von einem Atom oder Molekül gleichzeitig $m \geq 2$ Photonen absorbiert (siehe Abb. 2.1 C und 2.5 A). Da m Photonen gleichzeitig vorhanden sein müssen, hängt dieser Effekt von der m -ten Potenz des eingestrahnten Lichtes ab. Eine derartige nichtlineare Abhängigkeit lässt sich für Anwendungen nutzen, bei denen nur in einem winzigen Raumbereich eine Reaktion im System ausgelöst werden soll. Damit ist die Multi-Photonen-Absorption besonders prädestiniert für den Einsatz in der Mikroskopie. Durch die Verwendung eines Femtosekunden-Titan-Saphir-Lasers mit einer Anregungswellenlänge im Bereich von 800–960 nm können nun Fluorophore, die im Bereich von 400–490 nm (Absorption von zwei Laserphotonen) bzw. im Bereich von 270–320 nm (Absorption von drei Laserphotonen) absorbieren, angeregt und deren Fluoreszenz rot verschoben dazu detektiert werden. Da die simultane Absorption von zwei bzw. drei Photonen nur in einem sehr kleinen Volumensegment des fokussierten Laserstrahls erfolgen kann, resultiert hieraus eine sehr gute Lokalisierung der Fluoreszenz und damit ein inhärenter 3D-Effekt, der den Einsatz einer konfokalen Blende überflüssig macht (siehe Abb. 2.5 B). Durch dreidimensionales Abrastern der Probe kann über die detektierte Fluoreszenz die räumliche Verteilung des Fluorophors in der Probe ermittelt und mit entsprechender Bildgebungssoftware in dreidimensionale Bilder mit hohem Bildkontrast umgewandelt werden (siehe Abb. 2.5 C). Weitere bemerkenswerte Vorteile der Multi-Photonen-Absorptions-Fluoreszenzmikroskopie sind: (1) Da die Fluorophore nicht durch ein energiereiches, sondern durch die simultane Absorption mehrerer niederenergetischer Photonen angeregt werden, können lebende Proben schonender untersucht werden. Sowohl die Fluoreszenzemission als auch mögliche Bleichungseffekte, das heißt die photochemische bzw. thermische Zerstörung der Probe, sind auf ein sehr kleines Volumensegment beschränkt. (2) Die Wellenlänge des resultierenden Fluoreszenzlichtes und die Wellenlänge des Anregungslasers liegen spektral

sehr weit auseinander, so dass es bei der Detektion des Fluoreszenzlichtes zu keiner Störung mit dem breitbandigen Anregungslaser kommt und somit das Hintergrundrauschen minimal ist. Wie bei der Beschreibung der konfokalen Fluoreszenzmikroskopie bereits erwähnt, existiert eine große Palette von synthetischen Fluoreszenzmarkern bzw. natürlichen biologischen Fluorophoren wie zum Beispiel NADH, Flavone oder grün fluoreszierende Proteine, die für die Untersuchung von lebendem biologischem Material angewendet werden können. Zwei-Photonen- bzw. Multi-Photonen-Absorptions-Fluoreszenzspektroskopie hat sich seit ihrer Entwicklung 1990 zu einer unentbehrlichen biophysikalischen Methodik entwickelt, die wertvolle Informationen über subzelluläre biochemische Vorgänge in lebenden Zellen liefert. Die Multi-Photonen-Bildgebung mittels NIR-Femtosekundenlaser zeichnet sich durch eine hohe Eindringtiefe aus und ermöglicht damit die Darstellung von Geweben mit hoher räumlicher Auflösung sowie hohem Kontrast. Sie eignet sich daher besonders für die nichtinvasive Gewebediagnostik. Die Firma JenLab brachte vor Kurzem das Gerät DermalInspect® zur Multi-Photonen-Tomographie von Hautkrebs auf den Markt. Dieses Gerät verwendet eine durchstimmbare Femtosekundenquelle zur Anregung von Multi-Photonen-Autofluoreszenz von endogenen Biomolekülen in der Haut wie zum Beispiel NAD(P)H, Flavine, Elastin, Melanin, Porphyrin usw. (siehe Abb. 2.5 C).

Worüber wir nun berichten grenzt schon fast an Zauberei. Angefangen hat die Geschichte bereits vor mehr als 130 Jahren. Im Jahre 1873 formulierte der Physiker Ernst Abbe in Jena seine bis heute gültige Theorie zur mikroskopischen Auflösung. Abbe fand heraus, dass die Wellennatur des Lichts die räumliche Auflösung optischer Verfahren begrenzt, dass heißt alles was kleiner ist als etwa die halbe Lichtwellenlänge kann nicht mehr getrennt abgebildet werden. Wie lässt sich nun diese fundamentale Grenze im Auflösungsvermögen mit optischen Methoden überwinden? Eigentlich ist es unmöglich. Doch auch hier liegt das Geheimnis in der Kombination verschiedener Techniken, und zwar in der Kombination der Multi-Photonen-Absorption mit der stimulierten Emission (ein Prozess, den wir bereits kennen gelernt haben). Beide Techniken geschickt vereint erlauben es, räumliche Auflösungen im Bereich von wenigen Nanometern zu realisieren.

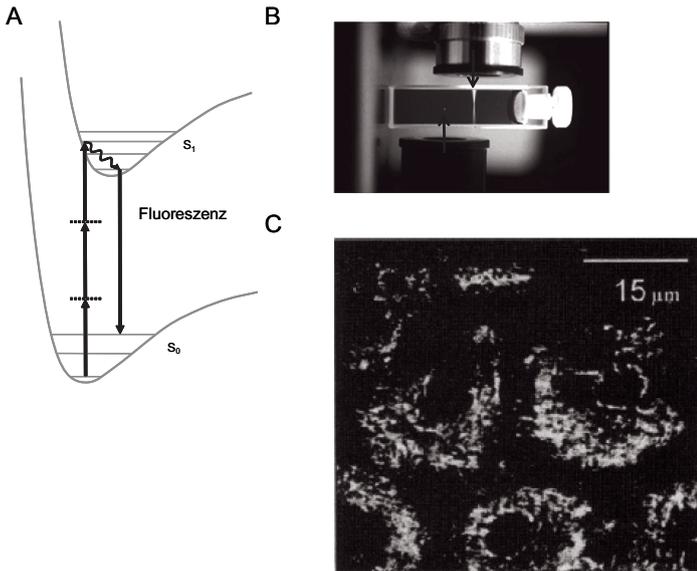


Abb. 2.5 (A) Anregungsschema der Multi-Photonen-Fluoreszenzspektroskopie. (B) Küvette gefüllt mit einem fluoreszierenden Farbstoff, angeregt mit einem einzelnen Photon (Anregung von oben, rechts) und zwei Photonen eines intensiven Femtosekundenlasers (Anregung von unten, links). Man erkennt sehr deutlich, dass die Zwei-Photonen-Fluoreszenz auf den Fokus des Anregungslasers reduziert ist (Bild aus <http://www.loci.wisc.edu/multiphoton/mp.html>). (C) *In-vivo*-Multi-

Photonen-Autofluoreszenzbild von sieben Zellen im *Stratum spinosum*. Die Aufnahme erfolgte in 45 μm Tiefe auf dem Vorderarm einer weiblichen Freiwilligen (Anregungswellenlänge 760 nm). Die dunklen Stellen entsprechen den nicht fluoreszierenden Zellkernen, während die hellen Stellen die NAD(P)H-Fluoreszenz, welche hauptsächlich in den Mitochondrien lokalisiert ist, zeigen (mit freundlicher Genehmigung von JenaLab).

Kommen wir noch einmal auf die stimulierte Emission zurück. Sie bezeichnet, wie wir bereits gelernt haben, den durch ein Photon induzierten Übergang eines Elektrons von einem höherenergetischen in einen niederenergetischen Zustand. Dieser Effekt lässt sich dazu nutzen, um das Fokussvolumen, aus dem man die nach einer Multi-Photonen-Absorption resultierende Fluoreszenz beobachtet, noch weiter zu verkleinern. Dabei wird der Prozess der stimulierten Emission zur Auslöschung der Fluoreszenz genutzt und zwar derart, dass nur die Fluoreszenz am Rande des Fluoreszenzspots ausgelöscht wird. Abbildung 2.6 A zeigt das Anregungsschema dieser stimulierten Fluoreszenzlöschung (engl. *Stimulated Emission Depletion*, STED).

Ein Anregungslaser hebt die Moleküle in einen angeregten elektronischen Zustand, aus dem Moleküle normalerweise durch spontane Emission von Fluoreszenzlicht wieder relaxieren würden. Durch Einstrahlung eines intensiven zum Anregungslaser rot verschobenen und leicht zeitlich verzögerten STED-Laserpulses werden die angeregten Moleküle, bevor sie spontan fluoreszieren können, wieder in höhere Schwingungsniveaus des elektronischen Grundzustands abgeregt. Diese »abgeregt« Moleküle können durch den Anregungslaser dann jedoch nicht mehr angeregt werden. Wählt man das Strahlprofil des STED-Pulses in Form einer »Donut«-Mode – das heißt, im Fokuspunkt des Anregungslasers ist das STED-Laserprofil nahezu dunkel und kreissymmetrisch dazu sehr intensiv –, so resultiert daraus eine extreme Reduktion der Größe des Fluoreszenzspots, da nur die Moleküle im Zentrum beider Laserfoki von der Abregung nicht betroffen sind. Das resultierende Fluoreszenzlicht stammt somit aus einem sehr viel schärferen nur noch wenige Nanometer großen Spot. Das Untersuchungsvolumen reduziert sich bei der STED-Mikroskopie auf bis zu 0,67 Attoliter, was 18-mal kleiner ist, als das, was man mit der konventionellen konfokalen Fluoreszenzmikroskopie erreicht.

Eine weitere Möglichkeit, die räumliche Ausdehnung des Fokales zu verkleinern, ist die 4Pi-Mikroskopie. Da man aufgrund eines maximal erreichbaren Öffnungswinkels nur ein Segment einer kugelförmigen Wellenfront generieren kann, erzeugt ein Mikroskopobjektiv einen entlang der optischen Achse gedehnten Fokus (siehe Abb. 2.6 B). Bei der 4Pi-Mikroskopie werden daher die Wellenfronten von zwei entgegengesetzt angeordneten Objektiven kohärent konstruktiv addiert, um eine Kugelwelle mit dem vollen Raumwinkel von 4Pi anzunähern (siehe Abb. 2.6 C). Durch diesen Trick der konstruktiven Überlagerung zweier entgegengesetzt laufender Wellenfronten erhält man einen 3- bis 4-mal engeren Fokalbereich.

Eine Symbiose aus der STED- und 4Pi-Mikroskopie zu einem »STED-4Pi-Mikroskop« ermöglicht Auflösungen jenseits der Beugungsgrenze des Lichtes und erlaubt so den Übergang von der »Mikroskopie in die Nanoskopie«. Es ist dabei aber wichtig festzuhalten, dass die Abbe'sche Beugungsgrenze des Lichtes selbstverständlich weiterhin ihre Gültigkeit beibehält, jedoch nicht mehr die Grenze ist. Bei der »4Pi-STED-Mikroskopie« wird die Probe mit einem Femtosekunden-Puls elektronisch angeregt und nachfolgend durch

zwei entgegengesetzt laufende Pikosekunden-STED-Pulse, in einer 4Pi-Anordnung durch stimulierte Emission wieder abgeregt (siehe Abb. 2.5 D). Mittels einer derartigen Anordnung lassen sich fokale Lichtflecken von angeregten fluoreszierenden Molekülen mit einer räumlichen Ausdehnung von nur 33 nm entlang der optischen Achse erzeugen. Der Einsatz dieser Spots in der Mikroskopie ermöglicht die Aufnahme von Fernfeld-Mikroskopiebildern mit einer Auflösung von einigen Zehn Nanometern (siehe Abb. 2.5 E). Eine derartige Auflö-

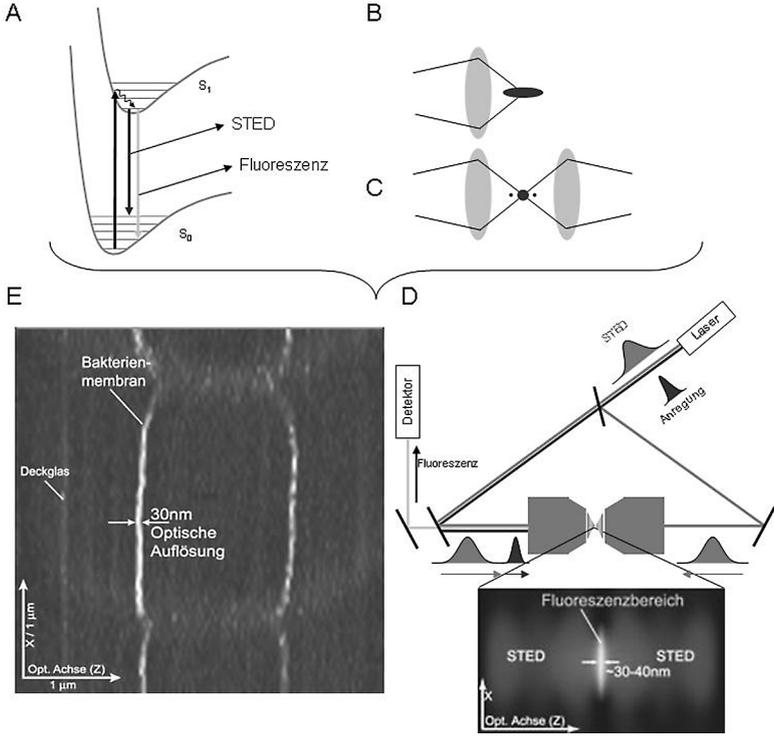


Abb. 2.6 (A) Anregungsschema der »STED«-Spektroskopie. (B) 4Pi-Mikroskopie: Abbe'sche Beugungsgrenze führt zu einem entlang der optischen Achse gedehnten Fokus. Reduktion der Fokusgröße durch konstruktive Überlagerung zweier Wellenfronten von zwei entgegengesetzt angeordneten Objektiven. Diese Addition führt zu einem kleinen zentralen Lichtfleck sowie zwei Nebenmaxima.

(C) Strahlengang des »STED-4Pi-Mikroskops« (Zeichnungen A bis C modifiziert gemäß Max-Planck-Institut für biophysikalische Chemie Göttingen). (D) »STED-4Pi«-Aufnahme eines Bakteriums (*Bacillus megaterium*) mit einer Auflösung von 30 nm (Mikroskopiebild aus dem Max-Planck-Institut für biophysikalische Chemie Göttingen).

sung gestattet es, völlig neuartige Einblicke in lebende Objekte zu bekommen.

Als Laserquellen der Multi-Photonen-Mikroskopie werden hauptsächlich modengekoppelte Titan-Saphir-Laser gepumpt mit Argon-Ionen- oder frequenzverdoppelten Festkörperlasern verwendet, welche Femtosekundenpulse zwischen 700 und 1000 nm emittieren können. Nachteile dieser Laser sind allerdings die relativ hohen Anschaffungs-, Betriebs- und Wartungskosten. Zudem bedürfen sie auch eines versierten Bedieners. Neueste Entwicklungen auf dem Sektor der Kurzpuls-Laser brachten leistungsstarke diodengepumpte modengekoppelte Festkörperlaser hervor, die bestens für den Einsatz in der Multi-Photonen-Mikroskopie geeignet sind. Der Vorteil dieser Kurzpuls-Laser gegenüber Titan-Saphir-Lasern besteht darin, dass diese mit einer Hochleistungslaserdiode gepumpt werden, was zu einer hohen Zuverlässigkeit, einfachen Bedienbarkeit und geringem Preis führt.

Lassen Sie uns zum Abschluss unserer Betrachtungen noch ein weiteres ganz modernes, wenn auch relativ kompliziertes Spektroskopieverfahren, vorstellen. Es handelt sich um eine nichtlineare Variante der Raman-Spektroskopie, die kohärente Anti-Stokesche Raman-Spektroskopie (CARS = *Coherent Anti Stokes Raman Scattering*). Wie bereits oben erwähnt, ist der besondere Vorteil dieser Methode im Vergleich zur linearen und nichtlinearen Fluoreszenzmikroskopie, dass kein Fluorophor in der zu untersuchenden Probe vorhanden sein bzw. die Probe vorher nicht mit einem speziellen Farbstoff angefärbt werden muss. Die CARS-Mikroskopie ist somit eine »labelfreie« Methode, mit der sich auch durchsichtige Objekte untersuchen lassen. CARS-Mikroskopiebilder liefern detaillierte chemische Strukturinformationen, da mit der CARS-Spektroskopie Molekülschwingungen wie bei der Raman-Spektroskopie angeregt werden. In einem CARS-Prozess werden drei Laserpulse in der zu untersuchenden Probe überlagert und erzeugen dort ein räumlich gerichtetes CARS-Signal. Die CARS-Methode beruht auf der Tatsache, dass zwei Laserstrahlen (Pump (ω_p)- und Stokes (ω_s)-Laser) gleichzeitig durch eine Probe geschickt werden und dort, für den Fall, dass die Energiedifferenz zwischen Pump- und Stokes-Laser einem Raman-Schwingungsübergang ω_R entspricht, die Moleküle zu kohärenten In-Phase-Schwingungen anregen. An diesem Ensemble kohärent angeregter Molekül-Schwingungsmoden wird nun ein weiteres Pump-Photon in-

elastisch, unter Aussendung eines zu den Anregungslasern blau verschobenen Anti-Stokes-Raman-Signal ω_{aS} , gestreut. Die Frequenz des Anti-Stokes-Raman-Signals ergibt sich aus der Energieerhaltung: $\omega_{aS} = 2\omega_p - \omega_s$ wobei $\omega_{aS} > \omega_p > \omega_s$ (siehe Abb. 2.7 A), während die Richtung des kohärenten CARS-Signals durch die Wellenvektorerhaltung bestimmt wird. Die Summe der Wellenvektoren der vier am Prozess beteiligten Photonen muss Null ergeben ($\Delta k = 0$ ($k_{aS} = k_p - k_s + k_p$)), damit das CARS-Signal maximal wird (siehe Abb. 2.7 B). In einer häufig gewählten Strahlgeometrie zur Einhaltung der Phasenanpassung werden die drei Laserstrahlen in drei Dimensionen angeordnet, was zu einer maximalen räumlichen Trennung von Laser- und Signallicht führt. Ein wesentlicher Vorteil der CARS-Spektroskopie ist, dass Fluoreszenz nicht stört, da das CARS-Signal blau verschoben zu den Anregungslasern ist. Die resultierenden Raman-Signale bei CARS sind zudem um mehrere Größenordnungen intensiver als beim klassischen Raman-Effekt. Da die Streustrahlung einen laserähnlichen Strahl bildet, ist es möglich ohne Monochromatoren zu arbeiten und eine hohe Auflösung zu erhalten. Diesen Vorteilen steht jedoch der Nachteil der kostenintensiven Ausrüstung und dem hohen experimentellen Aufwand gegenüber. Zur Erzeugung eines CARS-Signals benötigt man hohe Lichtintensitäten (Piko- bzw. Femtosekundenpulse) und mindestens zwei farblich durchstimmbare Kurzpulslaserquellen. Bei der Implementierung eines CARS-Mikroskops werden zwei kollineare Laserstrahlen (ω_p und ω_s) über ein Mikroskopobjektiv mit möglichst großem Öffnungswinkel auf einen Punkt in der Probe fokussiert. Bei Verwendung eines Mikroskopobjektivs, das heißt stark fokussierten Laserpulsen, ist die Phasenanpassung unkritisch, da das CARS-Signal nur über eine relativ kleine Fläche entsteht. Das CARS-Signal kann entweder in Vorwärtsrichtung (F-CARS) oder in Rückwärtsrichtung (EPI-CARS) detektiert werden (siehe Abb. 2.7 C). In der F-CARS-Anordnung wird also ein zweites Objektiv zum Sammeln des CARS-Signals, welches durch einen geeigneten Filter vom Anregungslicht abgetrennt werden kann, benötigt. Die Erzeugung eines EPI-CARS-Signals beobachtet man nur dann, wenn die Größe der zu untersuchenden Probe kleiner als die Wellenlänge der Anregungslaser ist. EPI-CARS bietet den Vorteil, dass man nur ein Mikroskopobjektiv benötigt und man daher auch ein konventionelles Fluoreszenzmikroskop einfach in ein CARS-Mikroskop umbauen kann. Durch gezieltes Abrastern der Probe lassen sich so

2D- und 3D-CARS-Bilder bestimmter Molekülschwingungen aufzeichnen, welche detaillierte chemische Strukturinformationen über die untersuchte Probe liefern (siehe CARS-Mikroskopiebild in Abb. 2.7 D).

Molekulare Bildgebungsverfahren erlangen in den letzten Jahrzehnten besonders in den Bereichen der Lebenswissenschaften als auch der Medizin immer mehr an Bedeutung. Hierbei gelingt es besonders den optisch basierten Methoden immer weiter in zelluläre und subzelluläre Regionen vorzudringen. Als besonders vorteilhaft hat sich dabei der Einsatz von spektroskopischen Verfahren erwiesen. Neben Bildinformationen bekommt man direkten molekularen

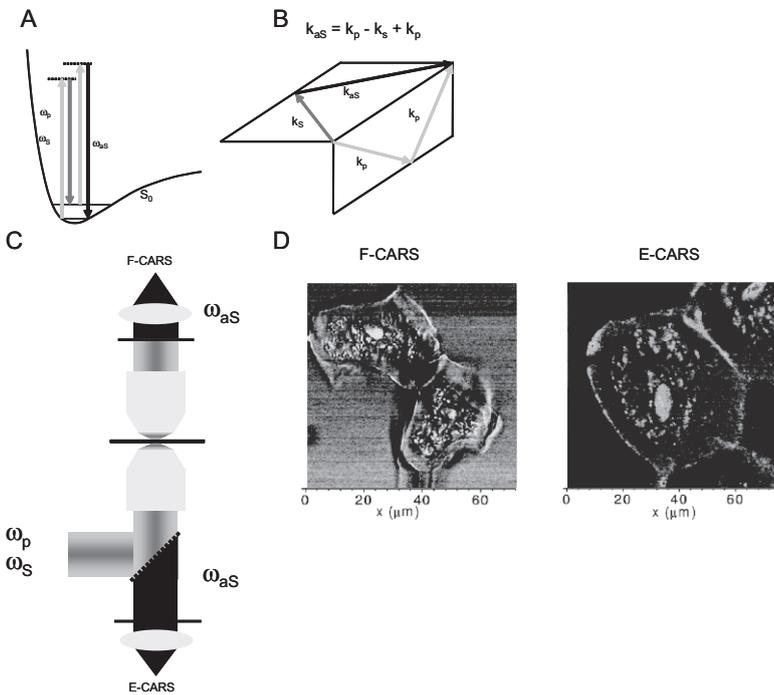


Abb. 2.7 Energieniveauschema (A) und Wellenvektordiagramm (B) zur Veranschaulichung der Energieerhaltung bzw. der Phasenanpassung innerhalb eines CARS-Prozesses. (C) Schematische Darstellung eines F- bzw. E-CARS-Mikroskops. (D) F- und E-CARS-Mikroskopiebilder von ungefärbten lebenden Epithel-

zellen aufgenommen für einen Raman-Shift von 1579 cm^{-1} im Fall des F-Cars-Bildes bzw. 1570 cm^{-1} für das E-Cars-Image. In diesem Wellenzahlenbereich findet man charakteristische Protein- bzw. Nukleinsäureschwingungen. (Bilder aus: A. Volkmer, J. Phys. D: Appl. Phys. 38, R59, 2005.)

Kontrast, was die Aufklärung von Zellfunktionen ermöglicht. Der Einsatz moderner Femtosekunden-Lasersysteme in der Mikroskopie ermöglicht zudem erstmals, nichtlineare Phänomene in der Diagnostik zu verwenden. Damit sind ganz neue faszinierende Einblicke in zelluläre Lebensvorgänge möglich. Die gewählten Beispiele innovativer Mikroskopietechniken zeigen das große Potenzial der Femtosekunden-Spektroskopie, welche ohne die großen Fortschritte auf dem Gebiet der Femtosekundenpuls-Lasertechnologien nicht möglich gewesen wären. Die hohen Intensitäten, welche sich mit Kurzpulslasern erreichen lassen, machen diese zu einem unverzichtbaren Werkzeug in der modernen optischen Fernfeldmikroskopie und sind heutzutage aus den modernen Lebens- bzw. Biowissenschaften nicht mehr wegzudenken.

Nicht nur die Mikroskopie hat sich in den letzten Jahren extrem gemauert, sondern es sind aufgrund der Fortschritte in Bereichen der Mikrosystemtechnik, der Nano- und Biotechnologie ganz neue Analysearchitekturen auf den Markt gekommen. Hierzu gehören beispielsweise miniaturisierte Chip-Systeme.

Nichts zu essen – Bio-Chips

Bestimmt haben Sie schon einmal von »Bio-Chips« gehört. Nein, wir meinen in diesem Zusammenhang nicht die gesunden Knabberereien aus dem Öko-Laden, sondern eine besondere Form von Reaktionsgefäßen, die so klein sind, dass Tausende von ihnen auf der Fläche einer Briefmarke oder eines Fingernagels Platz haben. Und weil die Versuche, die man mit solchen Reaktionsgefäßen machen kann, die Leistungsfähigkeit eines ganzen Analyselabors erreichen oder sogar übertreffen können, spricht man im Fachjargon gern vom »Lab-on-a-chip«. Seit ihrer ersten Beschreibung im Jahr 1995 haben die Bio-Chips die Genexpressionsanalyse revolutioniert.

Die Bezeichnung »Bio-Chip« rührt vermutlich daher, dass die Computertechnologie sich Mitte der 1990er Jahre in einer Hochphase befand und der Biotechnologie ein ähnliches Wachstumspotenzial vorausgesagt wurde. Da bot sich die Kombination aus »Bio« und »Chip« einfach an. Heute gibt es unter diesem Oberbegriff bereits einen ganzen Strauß verschiedener Chip-Technologien, die nach dem Untersuchungsgegenstand unterschieden werden, als da sind die

DNS-, Protein-, Peptid- und Proteom-Chips. Wenn die einzelnen Reaktionspunkte, auch Spots genannt, einen Durchmesser von weniger als 200 µm haben, spricht man auch von »Microarrays«. Dieser Begriff bezeichnet die Tatsache, dass eine »Große Aufstellung« (Array) auf kleinstem Raum Platz findet. Heutzutage gibt es Microarrays, die auf einem Quadratzentimeter mehr als 200.000 Reaktionspunkte beherbergen.

Wie wir schon in den einleitenden Kapiteln beschrieben haben, hat die Entschlüsselung des menschlichen Genoms der Medizin einen gewaltigen Auftrieb gegeben. Wie auch bereits kurz erwähnt, sind DNS-Chips, also Träger mit Tausenden winziger Reaktionsgefäße, ein essentielles Werkzeug der Genomforschung. Diese Chips finden ihre Anwendung vor allem in der biomedizinischen Forschung, um krankheitsverursachende Gene zu identifizieren und zu sequenzieren. Zukünftig sollen sie auch verstärkt in der Diagnostik genutzt werden, zum Beispiel für die Früherkennung von Krankheiten, oder um Medikamentenverträglichkeiten von Patienten zu testen. Das Fernziel ist es, zu einer »Medizin nach Maß« beizutragen.

Man geht davon aus, dass alle intrazellulären Prozesse durch Proteine vermittelt werden. Daraus kann man folgern, dass sich die Unterschiede zwischen kranken und gesunden Zellen auch in der Zusammensetzung, der Zahl und der Struktur zellulärer Proteine niederschlagen wird.

Der Nachweis der Bindung zwischen dem gekoppelten und dem freien Interaktionspartner geschieht bei der Microarray-Technologie meistens über eine Messung von Fluoreszenzintensitäten. Die Fluoreszenzmoleküle sind in der Regel an den freien Liganden gebunden, so dass nach der Bindung beider Partner ein spezifisches Fluoreszenzsignal detektiert wird. Mit der Fluoreszenz haben wir uns ja schon in den einleitenden Kapiteln beschäftigt, im Folgenden wollen wir uns näher ansehen, wie das Fluoreszenzsignal durch einen Scanner gemessen und in ein digitales Format übersetzt werden kann.

Einen Scanner haben Sie ja vielleicht selbst zu Hause. Die Bedienung ist einfach: Man legt ein Bild oder eine Textseite zwischen eine Leuchtquelle und eine Abdeckung, drückt den »Scan«-Knopf und nach wenigen Minuten hat man ein digitales Abbild dessen, was man als Vorlage verwendet hat. Bevor durch die Heim-PC-Revolution Flachbett-Scanner für fast jedermann erschwinglich wurden, wurde dieses Prinzip bereits vor Jahrzehnten in Kopier- und Faxgeräten ein-

gesetzt. Allerdings sind die Anforderungen an einen Microarray-Scanner, den Fachleute auch als »Reader«, also Lesegerät, bezeichnen, nun doch etwas größer. So muss ein Microarray-Scanner eine sehr hohe Auflösung besitzen. Er muss Spots mit einem Abstand von wenigen Mikrometern hinsichtlich ihrer Fluoreszenzintensität deutlich voneinander unterscheiden können. Nach der Messung werden die gelesenen Daten digitalisiert und in einem entsprechenden Bildformat bereitgestellt.

Herzstück eines Microarray-Scanners ist ein Laserstrahl. Er wird über verschiedene Filter, Linsen und Spiegel auf die Chip-Oberfläche gelenkt. Die Fluophore absorbieren das Laserlicht und emittieren längerwelliges Licht, das wiederum über Filter, Spiegel und Linsen in einen Photomultiplier geführt wird, der es verstärkt. Anschließend wird das Signal in eine digitale Information umgewandelt.

Das Prinzip der Laserumwandlung wird im Allgemeinen bei jedem Scanner eingesetzt, aber es gibt zwei grundlegende Unterschiede, auf welche Art der Laser den Bio-Chip abscannt. Zum einen kann sich bei einer stationären Laseroptik der Chip in X- und Y-Richtung bewegen. Die andere Möglichkeit ist, dass sich die Laseroptik in X- und Y-Richtung über einen stationären Chip bewegt. Die Aufgabe der Laseroptik ist dabei aber immer gleich: Sie besteht darin, dass die Fluorophore mit der erforderlichen Wellenlänge angeregt und die Emission mehr oder weniger gleichzeitig gemessen werden kann. Da in der Regel mindestens zwei verschiedene Fluorophore detektiert werden sollen, muss der Scanner in der Lage sein, die unterschiedlichen absorbierten und emittierten Wellenlängen zu messen. Moderne Scanner können durch Verwendung diverser Laser und Filter teilweise mehr als zehn verschiedene Fluorophore in einer Bandbreite von 488–652 nm messen. Sehr gute Scanner haben eine Auflösung von 3 μm . Ein weiteres Qualitätsmerkmal ist eine geringe Hintergrundstrahlung, die sich zum Beispiel durch die Verwendung von konfokalen optischen Systemen minimieren lässt.

