

Laser für FLIM

Marion Lang, Armin Zach, Toptica Photonics AG, Gräfelfing

Viele mikroskopische Anwendungen benötigen mehrere Anregungswellenlängen im sichtbaren Spektralbereich. Neben Weißlichtquellen stehen hierfür inzwischen auch schmalbandige, abstimmbare Ultrakurzpuls-Faserlaser zur Verfügung. Wir erläutern im folgenden Beitrag, warum diese für Fluoreszenzlebensdauer-Experimente in einem breiten Wellenlängenbereich besonders gut geeignet sind.

1 Licht für die Fluoreszenz-Mikroskopie

Eine Vielzahl biologischer Fragestellungen wird mit fluoreszenzmikroskopischen Methoden untersucht. Die Proben werden dazu mit unterschiedlichen Farbstoffen markiert, die jeweils ein spezifisches Absorptions- und Emissionsspektrum besitzen. Eine geeignete Lichtquelle muss daher in der Lage sein, verschiedenste Farbstoffe optimal anzuregen. In Weitfeldtechniken werden dazu häufig konventionelle Lichtquellen wie Xenon-, Quecksilber- oder Halogenlampen eingesetzt. Diese emittieren über einen breiten Wellenlängenbereich und insbesondere über das komplette sichtbare Spektrum. Mit geeigneten Anregungsfiltern wird dieses Licht spektral gefiltert, so dass nur die „richtige“ Wellenlänge auf die Probe trifft.

Lichtquellen für die Konfokalmikroskopie müssen zudem eine hohe Leuchtdichte besitzen; eine Anforderung, die nur durch Laser erfüllt wird. Laserquellen, die mehrere Linien gleichzeitig emittieren, sind insbesondere die Gas-Laser, wie z.B. der Argon-Ionen Laser. Deren Nachteil liegt jedoch in der geringen Leistung pro Emissionslinie, ihrer Baugröße und den hohen Betriebskosten. Gas-Laser werden inzwischen immer öfter durch kompakte Multi-

Laser-Systeme ersetzt, in denen die Strahlen mehrerer diodengepumpter Festkörper-Laser (DPSS-Laser) und/oder Dioden-Laser durch geeignete Optiken und dichroitische Spiegel überlagert werden. Der resultierende Strahl wird dann meist über eine Faser in das Mikroskop eingekoppelt.

Keine dieser Lichtquellen ist jedoch über einen breiten Wellenlängenbereich durchstimmbaar. Dies ist beispielsweise erforderlich, um die Anregungswellenlängen für bestimmte Farbstoffe zu optimieren. Mehr Flexibilität bei der Wahl der geeigneten Wellenlängen bieten Farbstofflaser, die (ohne Wechsel des Farbstoffs) über etwa 30 nm durchstimmbaar sind, oder optische parametrische Oszillatoren (OPOs). Idealerweise sollte ein Laser über den kompletten sichtbaren Bereich kontinuierlich durchstimmbaar sein. Diese Anforderung erfüllen sogenannte ‚ultrachrome‘ Laser, die entweder ein Weißlicht-Superkontinuum oder eine im sichtbaren Bereich durchstimmbare Laserlinie erzeugen.

2 FLIM-Mikroskopie

Mit Fluoreszenzfarbstoffen können Strukturen der Zelle spezifisch gefärbt werden. Dies, und der dadurch generierte hohe Kontrast, erklären den großen Erfolg der Fluoreszenzmikroskopie. In einigen Fällen

ist diese Technik jedoch durch den spektralen Überlapp der verwendeten Farbstoffe limitiert. Häufig können in einer Probe daher nicht mehr als drei bis vier verschiedene Farbstoffe eingesetzt werden. Abhilfe schafft in diesen Fällen die Fluoreszenzlebensdauer-Mikroskopie (Fluorescence Lifetime Imaging, FLIM) [1]. Hierbei wird die mittlere Lebensdauer eines Fluoreszenz-Moleküls ermittelt und liefert neben der räumlichen Auflösung eine zusätzliche Dimension, die es ermöglicht, Farbstoffe mit stark überlappenden Emissionsspektren zu unterscheiden. Darüber hinaus liefert diese Technik auch Informationen über die chemische Umgebung der Farbstoffe.

Absorbiert ein Farbstoffmolekül ein Photon geeigneter Wellenlänge, so geht es in einen angeregten Zustand über (Bild 1a). Nach einer gewissen Zeit kann das Molekül durch Emission eines Fluoreszenzphotons wieder in den Grundzustand zurückkehren. Die Fluoreszenzlebensdauer ist die gemittelte Zeitspanne, die ein Molekül im angeregten Zustand verbringt. Sie ist charakteristisch für eine bestimmte Molekülsorte und – im Gegensatz zur Intensität des Fluoreszenzsignals – unabhängig von der Farbstoffkonzentration. Sie erlaubt es, Fluoreszenzmoleküle mit stark überlappenden Emissionsspektren zu unterscheiden [2].

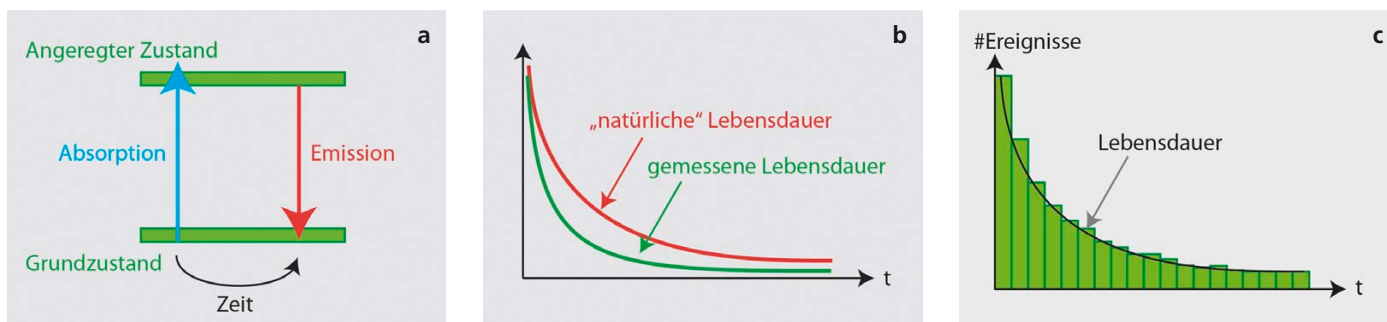


Bild 1: Time-Domain FLIM: a) Nach dem Anregungspuls geht das Fluoreszenzmolekül in einen angeregten Zustand über. Die Fluoreszenzlebensdauer ist die Zeit, die es im Mittel in diesem Zustand verbringt. b) Die Zeit zwischen Anregungspuls und Eintreffen eines emittierten Fluoreszenz-Photons am Detektor wird gemessen. c) Aus der Abklingkurve, einem Histogramm vieler Einzel-Ereignisse, kann die Fluoreszenzlebensdauer bestimmt werden

Das Molekül kann die Energie auch an seine Umgebung abgeben ("quenching") und dadurch in den Grundzustand zurückkehren. Die Fluoreszenzlebensdauer ist dann im Vergleich zur „natürlichen“ Lebensdauer verkürzt (**Bild 1b**). Die Fluoreszenzlebensdauer gibt somit auch Aufschluss über die chemische Umgebung des Moleküls. Dadurch können die Ionen-, oder Sauerstoffkonzentration, der lokale pH-Wert und viele weitere Faktoren untersucht werden [3]. Besonders häufig wird FLIM auch bei FRET-Experimenten (Förster Resonanz Energy Transfer) eingesetzt [4]; eine Technik, mit der sich Proteinwechselwirkungen untersuchen lassen.

FLIM-Experimente werden meistens mit einem konfokalen [5] oder einem 2-Photonen-Mikroskop [6,7] durchgeführt, um die Messung nicht durch Signale aus anderen Ebenen der Probe zu verfälschen. Dabei wird zwischen Phasenmodulations-Experimenten [8] und Time-Domain-Experimenten unterschieden. Bei Phasenmodulations-Experimenten wird die Phasenverschiebung zwischen Anregung und Emission verwendet, um die Fluoreszenzlebensdauer zu bestimmen. Zur Anregung der Farbstoffe kommen in diesem Fall Dauerstrichlaser zum Einsatz, die mit hoher Frequenz moduliert werden.

Bei Time-Domain-Experimenten wird die Probe mit einem gepulsten Laserstrahl abgerastert. Nach jedem Anregungspuls werden die emittierten Photonen mit einem schnellen Einzelphotonen-Detektor gemessen und die Zeit bis zum Eintreffen eines Photons am Detektor wird bestimmt. Diese Messung wird häufig wiederholt, und die Ergebnisse werden in ein Histogramm eingetragen. Für jede x,y-Position ergibt sich daraus eine Fluoreszenz-Abklingkurve (**Bild 1c**). Anhand dieser Kurven wird schließlich für jede Position die durchschnittliche Fluoreszenzlebensdauer bestimmt und in einem Falschfarbenbild dargestellt.

Die Photonenzählrate sollte deutlich kleiner als 5% (besser 1%) der Laserrepetitionsrate sein [9]. Andernfalls kann es sein, dass zwischen zwei aufeinanderfolgenden Anregungs-Pulsen zwei oder mehr Fluoreszenz-Photonen ankommen, von denen jedoch nur das erste Photon detektiert wird ("pile up" Effekt). Die Folge ist, dass längere Lebensdauer-Ereignisse systematisch diskriminiert und dadurch insgesamt zu kurze Lebensdauern gemessen werden.

Aus demselben Grund sollte auch die Zeit zwischen zwei Pulsen in etwa das Vierfache der Fluoreszenzlebensdauer betragen, da sonst ein Photon erst im darauf folgenden Zyklus detektiert wird. Typische Lebensdauern betragen etwa 1 bis 20 ns [10].

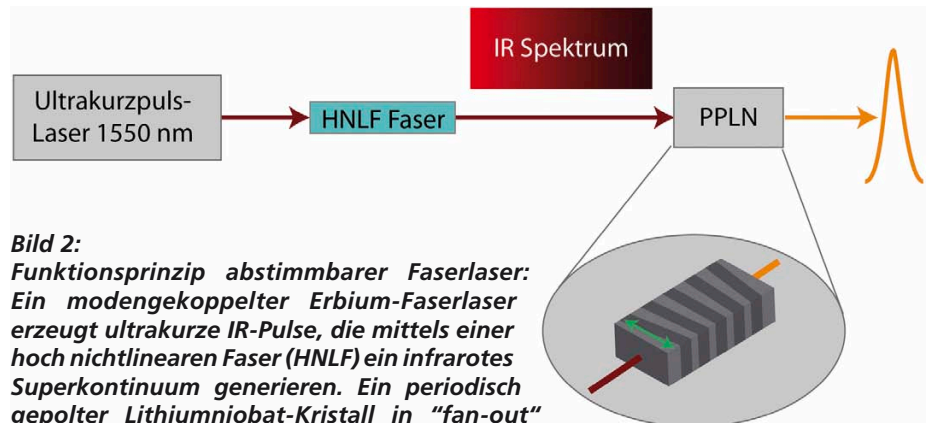


Bild 2: Funktionsprinzip abstimbarer Faserlaser: Ein modengekoppelter Erbium-Faserlaser erzeugt ultrakurze IR-Pulse, die mittels einer hoch nichtlinearen Faser (HNLF) ein infrarotes Superkontinuum generieren. Ein periodisch gepolter Lithiumniobat-Kristall in "fan-out" Struktur transformiert einen Teil des Lichts ins sichtbare Spektrum. Wird der Kristall in Richtung des grünen Pfeils verschoben, ändert sich die Wellenlänge, für die die Phasenanpassungsbedingung erfüllt ist

Ein frequenzverdoppelter Titan:Saphir-Laser besitzt z.B. eine Repetitionsrate von 80 MHz; das entspricht 12,5 ns zwischen zwei Pulsen. Um dennoch komplette Zerfallskurven von Farbstoffen mit langer Fluoreszenzlebensdauer messen zu können, muss in diesen Fällen ein Pulse Picker eingesetzt werden, der die Repetitionsrate herabsetzt.

Für die 1-Photonen-Anregung sind Laserleistungen in der Fokusebene zwischen 5 und 100 µW ausreichend. Die Pulsdauer sollte dabei geringer als 100 ps sein, denn sie bestimmt die Zeitauflösung des Systems. Entscheidend sind vor allem „saubere“ Pulse, die weder Nachpulse noch ein langes Abklingen ("Tail") aufweisen, da sonst die Meßgenauigkeit abnimmt. Dies ist häufig ein Problem bei gepulsten Diodenlasern.

3 Neue Laser für FLIM

Für Anregungswellenlängen im sichtbaren Bereich stehen neben frequenzverdoppelten Titan:Saphir-Lasern und Pikosekunden-Diodenlasern seit einiger Zeit auch Weißlichtquellen oder durchstimmbare Faserlaser zur Verfügung. Weißlichtquellen (z.B. von Fianium oder NKT Photonics) basieren auf Faserlasern, die ein breites Superkontinuum erzeugen. Hierzu wird ein gepulster, mehrere Watt starker Laser in eine photonische Kristallfaser (Photonic Crystal Fibre, PCF) eingekoppelt. Durch nichtlineare Prozesse in dieser Faser wird ein Superkontinuum von etwa 400 bis 2000 nm erzeugt. Da sich die Leistung über ein breites Spektrum ver-

teilt, bleiben im sichtbaren Bereich nur wenige mW/nm übrig.

Die gewünschte Wellenlänge wird aus diesem Superkontinuum durch eine Anordnung akusto-optisch durchstimmbarer Filter (Acousto-Optical Tunable Filter, AOTF) ausgewählt, die eine ausreichende Unterdrückung des restlichen Superkontinuums gewährleisten. Mit geeigneter Ansteuerung der AOTFs ist es möglich, die Probe mit mehreren Farben simultan anzuregen, da alle Wellenlängen gleichzeitig zur Verfügung stehen. Von Vorteil ist außerdem, dass auch Farbstoffe mit einem Absorptionsmaximum bei kurzen Wellenlängen angeregt werden können, wie z.B. CFP (Cyan Fluorescent Protein) mit einem Anregungsmaximum bei 440 nm.

Ein weiteres Konzept wird mit abstimmbaren Faserlasern verfolgt. Diese erzeugen eine schmale, über einen großen Wellenlängenbereich abstimmbare Spektrallinie. Im Gegensatz zu Superkontinuum-Lasern besitzen sie keinen spektralen Hintergrund, der sorgfältig herausgefiltert werden muss. Ein Beispiel auf Basis polarisationserhaltender Ultrakurz-puls-Fasertechnologie ist in **Bild 2** illustriert. Ein modengekoppelter Erbium-Faserlaser erzeugt fs-Pulse

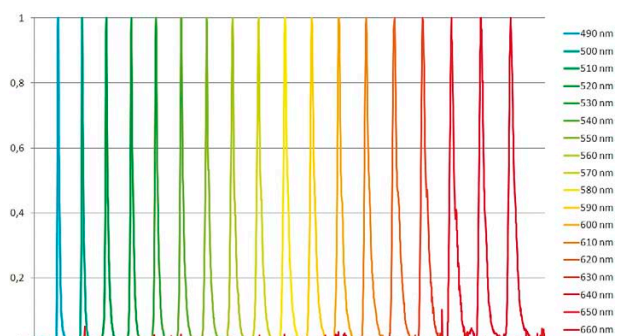


Bild 3: Spektren des abstimmbaren Faserlasers iChrome TVIS für ausgewählte Wellenlängen von 488 bis 640 nm

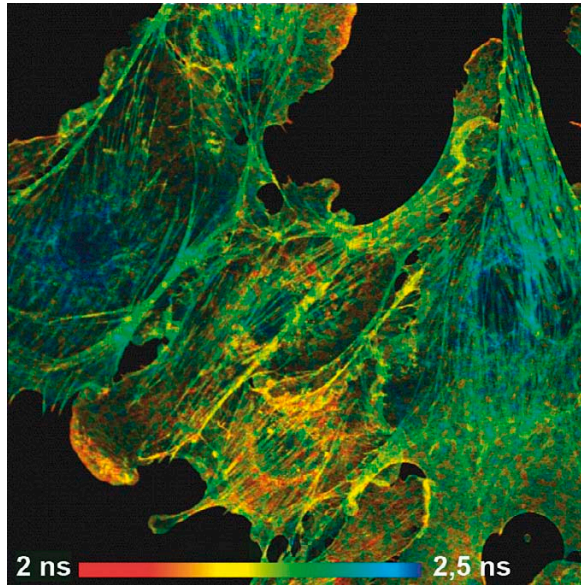


Bild 4: FLIM-Messung an BPAE-Zellen [11]. Die Aktin-Fasern sind mit Alexa 488 Phalloidin gefärbt und wurden bei 490 nm angeregt

bei 1,55 μm . Diese werden verstärkt und erzeugen nach einer hoch nichtlinearen Faser (HNL) ein Superkontinuum von 0,96 bis 2,2 μm . Anschließende Frequenzverdopplung (Second Harmonic Generation, SHG) durch einen periodisch gepolten Lithiumniobat-Kristall (PPLN) transformiert nur einen schmalbandigen Teil des infraroten Superkontinuums in den sichtbaren Wellenlängenbereich.

Der PPLN-Kristall mit spezieller Fächerstruktur ("fan out") befindet sich auf einem seitlich verschiebbaren Schlitten im Strahlengang. Wird der Kristall verschoben (senkrecht zur Strahlrichtung), so ändert sich die Wellenlänge, für die die Phasenanpassungsbedingung erfüllt ist. Durch diese Art der Frequenzkonversion kann die gewünschte Wellenlänge in einem Bereich von 488 nm bis 640 nm hoch reproduzierbar und mit einer Bandbreite von weniger als 3 nm erzeugt werden (Bild 3). Dadurch wird Laserlicht mit hoher spektraler Reinheit erzeugt, d.h. die benachbarten Wellenlängen werden sehr gut unterdrückt.

Bild 4 zeigt in Falschfarbendarstellung das Ergebnis einer FLIM-Messung an BPAE-Zellen (Bovine Pulmonary Artery Endothelial cells der Marke FluoCells von Molecular Probes) [11,12].

4 Fazit

Im Gegensatz zu Weißlichtquellen müssen die Pulse abstimmbarer Faserlaser nicht mehr spektral gefiltert werden. Ein AOTF wird hier nur eingesetzt, um den Strahl zu modulieren, abzuschwächen oder kom-

plett zu blockieren. Mit einer typischen Repetitionsrate von 40 MHz – das entspricht 25 ns zwischen zwei Pulsen – sind solche Laserquellen für FLIM-Experimente geeignet und decken den Großteil aller Farbstoffabklingzeiten ab. Da die kurzen, scharfen Pulse keine Nachpuls-Effekte aufweisen, kann ohne Totzeit mit der Messung begonnen werden.

Literaturhinweise:

- [1] J.R. Lakowicz, H. Szmajnski, K. Nowaczyk, K.W. Berndt, M. Johnson, *Fluorescence lifetime imaging*, Anal. Biochem. **202**, 316-330 (1992)
- [2] R. Pepperkok, A. Squire, S. Geley, P.I.H. Bastiaens, *Simultaneous detection of multiple green fluorescent proteins in live cells by fluorescence lifetime imaging microscopy*, Curr. Biol. **9**, 269-272 (1999)
- [3] J.R. Lakowicz, H. Szmajnski, *Fluorescence lifetime-based sensing of pH, Ca²⁺, K⁺ and glucose*, Sensors and Actuators, B: Chemical **11**, 133-143 (1993)
- [4] H. Wallrabe, A. Periasamy, *Imaging protein molecules using FRET and FLIM microscopy*, Current Opinion in Biotechnology **16**, 19-27 (2005)
- [5] E.P. Buurman et al., *Fluorescence lifetime imaging using a confocal laser scanning microscope*, Scanning **14**, 155-159 (1992)
- [6] W. Denk, J.H. Strickler, W.W. Webb, *Two-photon laser scanning fluorescence microscopy*, Science **248**, 73-76 (1990)
- [7] E. Gratton, S. Breusegem, J. Sutin, Q. Ruan, N. Barry, *Fluorescence lifetime imaging for the two-photon microscope: time-domain and frequency-domain methods*, J Biomed Opt **8**, 381-390 (2003)
- [8] J.R. Lakowicz, K.W. Berndt, *Lifetime-selective fluorescence imaging using an rf phase-sensitive camera*, Rev. Sci. Instrum. **62**, 1727-1734 (1991)
- [9] H.C. Gerritsen, M.A.H. Asselbergs, A.V. Agronskaia, W.G.J.H.M. Van Sark, *Fluorescence lifetime imaging in scanning microscopes: acquisition speed, photon economy and lifetime resolution*, J Microsc **206**, 218-224 (2002)
- [10] ISS Data Tables, *Lifetime Data of Selected Fluorophores*, www.iss.com/resources/reference/data_tables/LifetimeDataFluorophores.html
- [11] www.becker-hickl.de/pdf/intune-flim1.pdf
- [12] products.invitrogen.com/invn/product/F36924

Ansprechpartner:

Dr. Marion Lang
 Technical Marketing
 Toptica Photonics AG
 Lochhamer Schlag 19
 D-82166 Gräfelfing
 Tel. 089/85837-123
 Fax 089/85837-200



eMail: marion.lang@toptica.com
 Internet: www.toptica.com