

Femtosekunden-Laser-Mikroskopie in der Biomedizin

Femtosecond Laser Microscopy in Biomedicine

Karsten König*, Institut für Anatomie II, Friedrich Schiller Universität Jena

Eingang 23. Dezember 1999

Key words

Femtosecond laser, multiphoton microscopy, fluorescence, PDT, nanosurgery

Abstract

Near infrared femtosecond laser microscopes provide new tools for multi-photon fluorescence diagnostics, nonlinear photochemistry and nanosurgery within living cells and tissues. Based on two-photon excited autofluorescence, non-invasive "optical biopsies" with high spatial resolution can be obtained from the patients. At TW/cm^2 -light intensities femtosecond laser pulses enable nanoprocessing with cut sizes between 100 to 300 nm. The "nanoscalpel" provides the possibility to perform intracellular surgery of chromosomes and other organelles.

Kurzfassung

Nahe infrarote Femtosekunden-Lasermikroskope stellen neuartige Werkzeuge für die Multiphotonen-Fluoreszenzdiagnostik, die nichtlineare Photochemie und die Nanochirurgie innerhalb von Zellen und innerhalb von vitalem Gewebe bereit. Basierend auf der Zweiphotonen-angeregten Autofluoreszenz können nichtinvasiv „optische Biopsien“ mit hoher räumlicher Auflösung von Patienten erhalten werden. Bei TW/cm^2 Lichtintensitäten erlauben Femtosekunden-Laserpulse die Nanobearbeitung mit Schnittbreiten von 100 bis 300 nm. Das „Nanoskalpell“ ermöglicht die Durchführung intrazellulärer Operationen von Chromosomen und anderen Zellorganellen.

Inhalt

- 1 Einleitung
- 2 Aufbau eines Femtosekunden-Lasermikroskops hoher räumlicher und zeitlicher Auflösung
- 3 Die nichtinvasive hochauflösende optische Biopsie
- 4 Bioverträglichkeit von Femtosekundenpulsen
- 5 Das Nanoskalpell
- 6 Zusammenfassung
- 7 Literatur

1 Einleitung

Konventionelle Lasermikroskope in den Biowissenschaften nutzen ultraviolette (UV) und sichtbare Strahlung für eine optische Diagnostik und Mikrochirurgie. Eine breite Anwendung haben insbe-

sondere konfokale Laserscanning-Mikroskope für 3D-Fluoreszenzbilder zellulärer Strukturen gewonnen. Üblicherweise wird sichtbare Strahlung eines Helium-Neon-Lasers, Argonionen-Lasers oder Kryptonionen-Lasers sowie die UV-Strahlung von Gasionen-Lasern und Stickstoff-Lasern eingesetzt. Eine Vielzahl endogener Fluorophore (z.B. Tryptophan, NADH, NADPH und Flavine) sowie exogener Fluorophore (z.B. DAPI, Hoechst, Fura, Indo) besitzt lediglich Absorptionsbanden im UV- und blauen Spektralbereich. Die Verwendung von UV- und kurzweiliger sichtbarer Strahlung hat jedoch die Nachteile der geringen Lichteindringtiefe und des Potentials umfangreicher photochemisch induzierter Zellschädigung. Eine neue Richtung in der Lasermikroskopie in den Biowissenschaften stellt die Nahe-Infrarot- (NIR) Mikroskopie dar, die auf der Anwendung von Laserstrahlung im Spektralbereich von 700 nm bis etwa 1100 nm beruht. Dieser Bereich stellt aufgrund geringer Absorptions- und Streukoeffizienten das „optische Fenster von Zellen und Gewebe“ dar. Da der Absorptionskoeffizient von Wasser unter 0.1 cm^{-1} liegt, sind Zellen ohne Hämoglobin, Melanin und Chlorophyll bei diesen Wellenlängen nahezu transparent. Die Lichteindringtiefen in biologischem Gewebe liegen im Bereich einiger Millimeter. Wichtigste Anwendungen der NIR-Mikroskopie sind die Laserpinzette („optical trap“) [1] und die Multiphotonen-Mikroskopie [2]. Die Multiphotonenanregung elektronischer Zustände, basierend auf der simultanen Absorption von Photonen, wurde 1931 durch

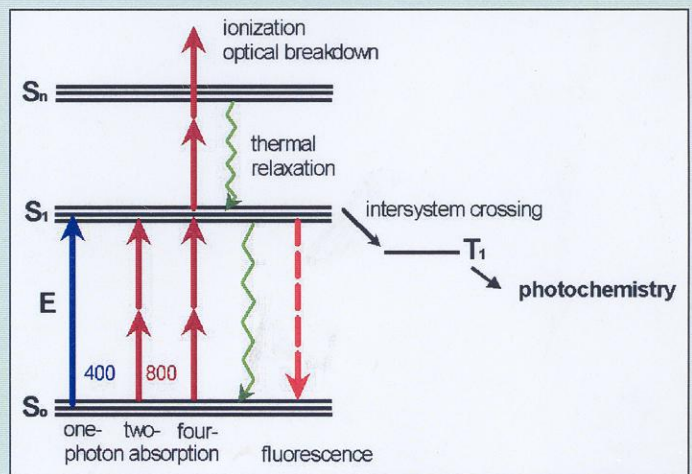


Abb. 1 Prinzip der nicht-resonanten Multiphotonenanregung. Zwei oder drei NIR-Photonen ermöglichen durch simultane Absorption die Emission sichtbarer Fluoreszenzstrahlung und das Auslösen photochemischer Reaktionen. Multiphotonenprozesse unter Mitwirkung von mindestens vier Photonen können einen optischen Durchbruch induzieren.

Fig. 1 Principle of non-resonant multi-photon excitation. Two or three NIR-photons may induce visible fluorescence and photochemical reactions by simultaneous absorption. Multiphoton processes involving at least four photons may induce optical breakdown.

* PD Dr. rer. nat. Karsten König, Institut für Anatomie II, Friedrich Schiller Universität Jena, Teichgraben 7, D-07743 Jena, E-mail kkoee@mit-n.uni-jena.de

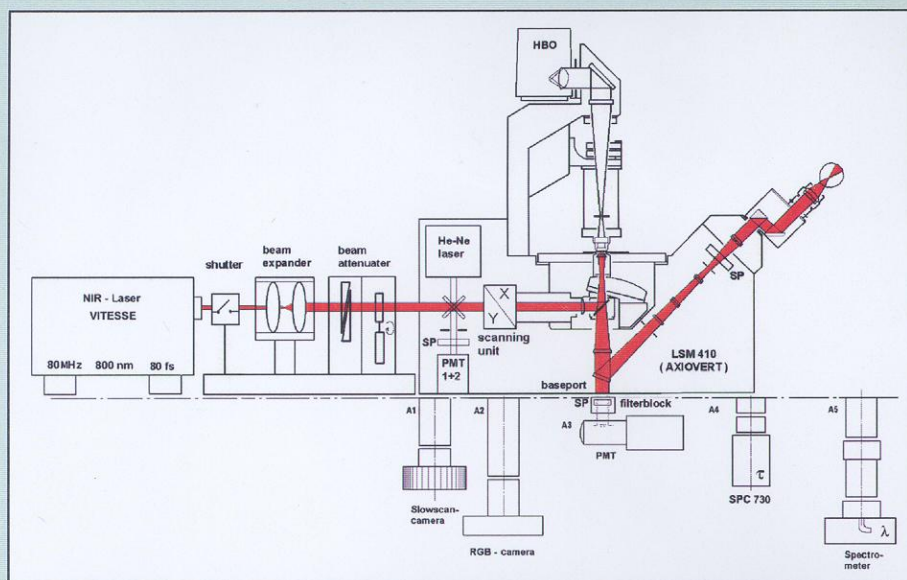


Abb. 2 Schematische Darstellung eines Multiphotonenmikroskops mit der Möglichkeit der räumlich aufgelösten Darstellung (i) der Fluoreszenzintensität (3D-Imaging), (ii) des Fluoreszenzspektrums (Mikrospektrofluorometrie), (iii) der Fluoreszenzlebensdauer (τ -mapping, 4D-Mikroskopie) und (iv) für nano-chirurgische Eingriffe. Die empfindliche Detektion ist mittels Baseport-Detektor möglich.

Fig. 2 Schematic presentation of a multiphoton microscope setup with the possibility of spatially resolved (i) fluorescence intensity imaging (3D imaging), (ii) fluorescence spectroscopy (microspectrofluorometry), (iii) fluorescence lifetime mapping (τ -mapping, 4D microscopy) and (iv) for nanosurgery. The sensitive detection is possible with a baseport detector.

Frau Göppert-Meyer [3] in ihrer Promotion vorausgesagt, 1961 durch Kaiser und Garret an Leuchtkristallen realisiert [4] und 1990 durch Denk, Strickler und Webb erstmals an biologischen Zellen durch Kombination eines 100 fs-Farbstofflasers mit einem Scanningmikroskop realisiert [2]. Die nicht-resonante Zweiphotonen- und Dreiphotonen-Anregung intrazellulärer Fluorophore (Abb. 1) erfordert Photonenflussdichten von $> 10^{48} \text{ cm}^{-2}\text{s}^{-1}$ bzw. Lichtintensitäten im MW/cm²- bis GW/cm²-Bereich. Diese werden durch beugungsbegrenzte Fokussierung des NIR-Strahls mit einem Objektiv hoher numerischer Apertur > 1 in einem Sub-Femtoliter Fokussvolumen erzielt. Prinzipiell lassen sich derartige Lichtintensitäten bereits bei Einkopplung eines 100 mW cw Lasers erreichen [5], effizienter erfolgt die nichtlineare Fluoreszenzanregung jedoch mit ultrakurzen Pulsen im Watt- und Kilowatt-Bereich und mittleren Leistungen $< 10 \text{ mW}$. Das geringe Fluoreszenzanregungsvolumen kann mittels Strahlscanner mit typischen Strahlverweilzeiten von wenigen Mikrosekunden pro Voxel über das Target geschoben und die Fluoreszenz dreidimensional mit Submikrometer-Auflösung effizient detektiert werden.

2 Aufbau eines Femtosekunden-Lasermikroskops hoher räumlicher und zeitlicher Auflösung

Neben der räumlich aufgelösten Detektion der Fluoreszenzintensität $I(x,y,z)$, können das Emissionsspektrum $I(x,y,z,\lambda)$, Mikrospektrofluorometrie und die Fluoreszenzlebensdauer ($\tau(x,y,z)$; τ -mapping) erfasst werden. Die Abbildung 2 stellt schematisch unser modifiziertes Laserscanning-Mikroskop dar, das sowohl konfokale 3D-Einphotonen-Mikroskopie als auch 4D-Multiphotonen-Mikroskopie ($I + \tau$) ermöglicht und auf der Einkopplung der NIR-Strahlung eines kompakten 1 W, 80 MHz Ti:Saphir-Lasers („Vitesse“, Coherent) mit 80 fs Ausgangspulsbreite basiert. Infolge der optischen Dispersion kommt es bei Transmission der ultrakurzen Pulse insbesondere durch Mikroskop und Zellkammer zu einer Pulsverbreiterung auf Werte um 180 fs an der Probe. Typische Werte für die Dispersion und Transmission des Gesamtsystems sind 5000 fs² und 30 % [6].

Die Abbildungen 3 und 4 demonstrieren zweiphotonenangeregte Fluoreszenzaufnahmen von vitalen Chinesische-Hamster-Ovar (CHO)-Zellen, die als Zellmonolayer auf dem 170 μm dicken Innenfenster einer miniaturisierten Zellkammer („MiniCeM“, JenLab

GmbH, Jena) unter sterilen Bedingungen kultiviert und mikroskopiert wurden. Dargestellt sind Aufnahmen des DNA-Markers Hoechst in unterschiedlicher Tiefe von Zellen in Metaphase. Hoechst weist ein Ein-Photonen-Absorptionsmaximum bei 352 nm auf. Angeregt wurde bei 800 nm mit 2 mW mittlerer NIR-Leistung. Die Abbildung 4 demonstriert Beispiele von Fluoreszenzabklingkurven von interessierenden intrazellulären Sub-Femtoliter-Volumina von Zellen mit unterschiedlichen fluoreszierenden Proben, die durch „Parken“ des NIR-Laserstrahls (Spot-Modus) im gewünschten Areal mittels Single-Photon-Counting („SPC 730“, Becker-Hickl GmbH, Berlin) gewonnen wurden. Durch Scannen mit Bildaufnahmezeiten von 10 bis 60 s konnten sowohl die Fluoreszenzintensität als auch die komplette Fluoreszenzabklingkurve pro Pixel in verschiedenen z-Ebenen (4D Aufnahmen) von Hoechst-inkubierten Zellen erstellt werden.

3 Die nichtinvasive hochauflösende optische Biopsie

Eine vielversprechende Applikation der Multiphotonen-Mikroskopie ist die nicht-invasive „optische Biopsie hoher räumlicher Auflö-

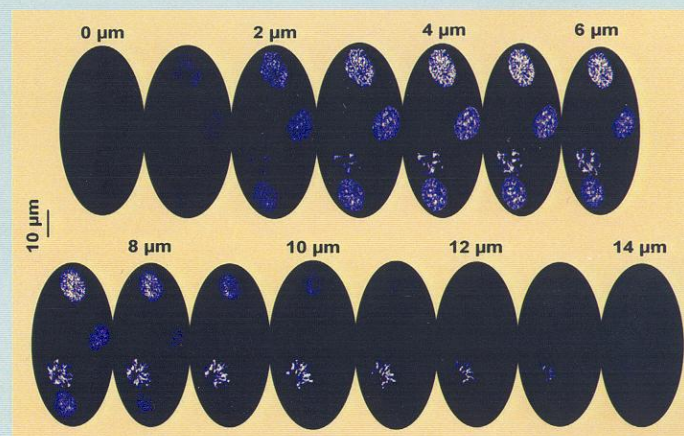


Abb. 3 3D-Aufnahmen einer Hoechst-markierten vitalen CHO Zelle durch Zweiphotonen-Anregung mit 170 fs-Laserpulsen.

Fig. 3 3D images of a Hoechst-labeled living CHO cell obtained by two-photon excitation with 170 fs laser pulses.

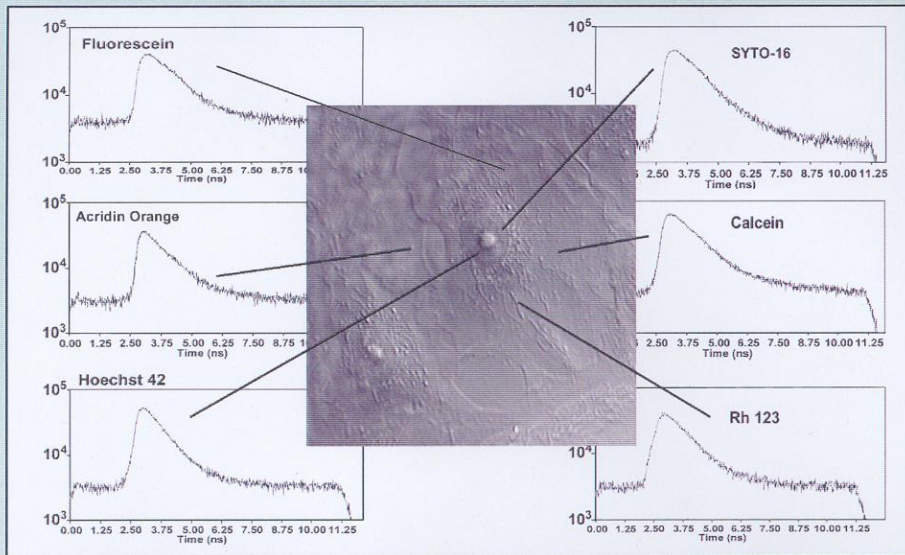


Abb. 4 Fluoreszenzabklingkurven von Zweiphotonen-angeregten Fluoreszenzmarkern aus intrazellulären Sub-Femtoliter-Fluoreszenzangregungsvolumina in der vitalen Zelle.

Fig. 4 Fluorescence decay curves of two-photon excited fluorescent probes from sub-femtoliter fluorescence excitation volumes within the living cell.

sung“ pathologischer Veränderungen. So ist beispielsweise erstmals die Detektion intrazellulärer Strukturen durch Zweiphotonen-Anregung von endogenen Fluorophoren wie NADH, NADPH, Flavine, Porphyrine, Kollagen, Elastin und Melanin mittels NIR-Strahlung auch in tiefen Zellschichten der Haut möglich. Die *Abbildung 5* demonstriert 3D-*in vivo*-Autofluoreszenz-Aufnahmen der Haut im Armbereich. Angeregt wurde bei 800 nm. Zwei Ebenen in 20 und 70 µm Tiefe sind beispielhaft dargestellt. Deutlich sind einzelne Zellen und fluoreszierende Gewebestrukturen anhand ihrer nichtlin-ear angeregten Autofluoreszenz zu erkennen [7].

4 Bioverträglichkeit von Femtosekundenpulsen

Untersuchungen zur Bioverträglichkeit ultrakurzer Pulse belegen, dass eine Femtosekunden-Lasermikroskopie lebender Zellen innerhalb eines „optischen Intensitätsfensters“ ohne Beeinträchtigung des Metabolismus, der Reproduktion und der Vitalität möglich ist. So können beispielsweise CHO-Zellen stundenlang bei einer mitt-

leren Leistung von 2 mW bzw. einer Peakintensität von 200 GW/cm² (780 nm) mit dem Laserscanningmikroskop bestrahlt werden, ohne dass eine Änderung des Teilungsverhaltens der bestrahlten Zelle sowie der Tochterzellen eintritt (Zellklonierungs-Assay). Eindrucksvoll wurde die Bioverträglichkeit am Beispiel 24 Stunden lang bestrahlter Hamsterembryonen demonstriert, die nach Rückverpflanzung in den Uterus der Mutter gesund zur Welt kamen [8]. Trotz der enormen Lichtintensitäten von GW/cm² können die mittleren Temperaturerhöhungen von maximal 2 K als unkritisch angesehen werden [9, 10].

Dennoch treten oberhalb bestimmter Schwellwerte, also außerhalb des „optischen Intensitätsfensters“, Photoschäden auf. So wurde bei Bestrahlung von CHO-Zellen mit 170 fs Pulsen ein beeinträchtigtes Reproduktionsverhalten, unkontrolliertes Zellwachstum und Apoptose-typische lethale Wirkungen beobachtet. Ultrastrukturuntersuchungen belegen, dass Mitochondrien Haupttargets der Photoschädigung darstellen. Es zeigt sich, dass Strahlung < 800 nm ein höheres Schädigungspotential aufweist als längerwellige Strahlung. Daher kann eine lineare Wasseraufheizung nicht verantwortlich für die Photoschädigung sein. Auch belegen unsere Studien, dass eine 780 nm-induzierte Zellschädigung nicht der Bestrahlung des Zellkerns bedarf und damit eine primäre Schädigung durch Dreiphotonen-Absorption der Kern-DNA ausgeschlossen werden kann. Untersuchungen in Abhängigkeit von der Pulsdauer τ (*Abb. 6*) zeigen, dass bei gleicher Photonenenergie Femtosekundenpulse destruktiver als Pikosekundenpulse wirken. Die Zellschädigung folgt näherungsweise einer P^2/τ -Relation (P : mittlere Leistung). Da bei Zweiphotonen-Fluoreszenzaufnahmen die Fluoreszenzintensität der gleichen Relation folgt, weisen Pikosekunden- und Femtosekunden-Lasermikroskope das gleiche – durch den Quotient aus den minimal erforderlichen Leistungen zur Zellschädigung und zur Fluoreszenzdarstellung – relative optische Intensitätsfenster für sichere Mikroskopie auf. In Abhängigkeit vom Detektor und der Fluoreszenzquantenausbeute des Fluorophors sind Werte von 1 bis 30 üblich, so dass beim Einsatz von 200 fs Pulsen mittlere Leistungen von 100 µW bis 3 mW und beim Einsatz von 1,8 ps Pulsen 300 µW bis 9 mW empfohlen werden [11]. In Abhängigkeit von dem verwendeten Fluorophor können aber auch phototoxische Reaktionen bei Intensitäten im sicheren optischen Intensitätsfenster infolge photodynamischer Effekte auftreten. So kann eine Zweiphotonen-Anregung des intrazellulären Fluorophors und Photosensibilisators Protoporphyrin IX mit 800 nm-Strahlung durch Energietransfer die Bildung von hochreaktivem Singulett-Sauerstoff verursachen und zu fehlender Zellreproduktion und Letalität führen [12]. Dies kann für eine gezielte photodyna-

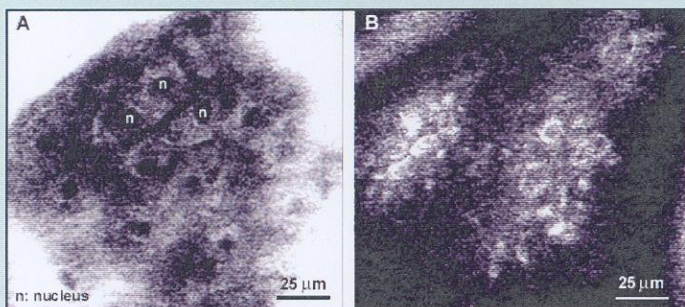


Abb. 5 *In vivo* nichtlinear angeregte Autofluoreszenzaufnahmen von Patienten erlauben nichtinvasive optische Biopsien. Zwei Aufnahmen aus 20 und 70 µm Gewebetiefe eines tiefenaufgelösten Bildstapels der 800 nm angeregten Autofluoreszenz des menschlichen Armes sind dargestellt. Zellen und fluoreszierende Gewebestrukturen sind deutlich erkennbar.

Fig. 5 *In vivo* non-linearly excited autofluorescence images of patients enable non-invasive optical biopsies. Two images at 20 and at 70 µm depth of a stack of depth-resolved 800 nm excited autofluorescence images of a human forearm are depicted. Cells and fluorescent tissue structures are clearly seen.

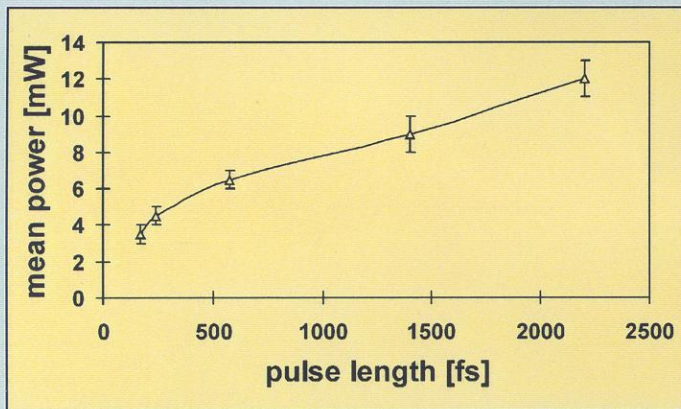


Abb. 6 Zellschädigung in Abhängigkeit von der Pulsdauer. Dargestellt ist die mittlere Leistung (80 MHz), bei der die Hälfte der bestrahlten Zellen ein unnormales Teilungsverhalten zeigt (50 % Klonierungseffizienz). Diese Zellen teilen sich nicht, produzieren teilungsunfähige Tochterzellen, zeigen ein unkontrolliertes Wachstum oder einen Apoptose-typischen lethalen Effekt.

Fig. 6 Cell damage depending on the pulse duration. Depicted is the mean power (80 MHz) at which the reproduction behavior of half of the cells is impaired (50 % cloning efficiency). These cells do not divide, produce non-reproductive daughter cells, become giant cells or undergo an apoptosis-like lethal process.

mische Inaktivierung unerwünschter Zellen genutzt werden. Eine Photodynamische Therapie mittels NIR-aktivierter Porphyrine wird dadurch möglich (Zweiphotonen-PDT).

5 Das Nanoskalpell

Bei einer Erhöhung der mittleren Leistungen von Femtosekundenpulsen auf Werte zwischen 30 und 50 mW und damit verbundenen Peakintensitäten im TW/cm²-Bereich kann in bestimmten intrazellulären Bereichen infolge von Mehrphotonen-Prozessen ein

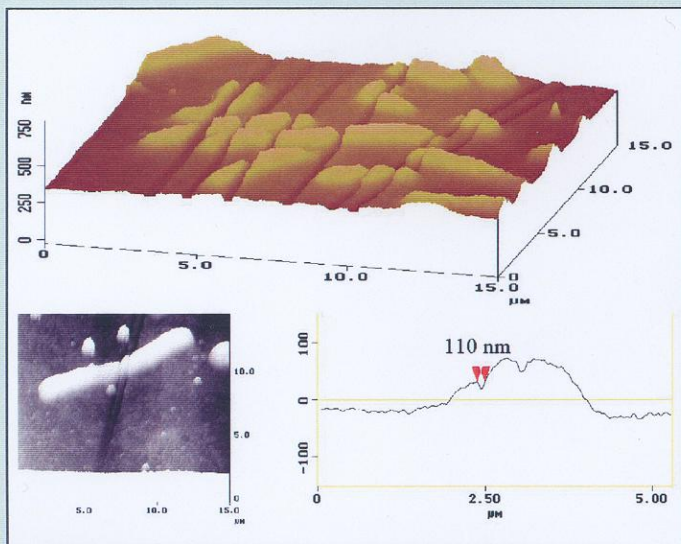


Abb. 7 Intensive 800 nm Femtosekunden-Pulse ermöglichen die Bearbeitung von humanen Chromosomen mit einer Schnittgenauigkeit von 110 nm. Aufnahme: Fritzsche, Riemann, König.

Fig. 7 Intensive 800 nm femtosecond laser pulses allow processing of human chromosomes with a cut size of 110 nm.

optischer Durchbruch und eine Plasmabildung ausgelöst werden. Die Schwelle für den optischen Durchbruch im Zellmaterial liegt unter der von Wasser bzw. vom umgebenen Medium. Dies kann für eine hochpräzise Bearbeitung intrazellulärer Strukturen durch Plasma-induzierte Ablation genutzt werden. Durch ein Fein-Tuning der Laserleistung wird erreicht, dass nur im Zentralteil des beugungsbegrenzten Beleuchtungsspots die erforderliche Intensität für einen Materialabtrag erzielt wird. Dadurch können auch Schnittbreiten und Bohrlöcher mit Abmessungen kleiner als der Beleuchtungsspot erzielt und photothermische und photomechanische Destruktionen der Umgebung vermieden werden. Wir setzen die Mehrphotonen-induzierte Ablation für das Schneiden humaner Chromosomen ein.

Messungen mit dem Kraftmikroskop ergeben, dass dabei hochpräzise Dissektionen mit einer Schnittbreite von unter 300 nm möglich sind. Zudem können Schnitte mit partiellem Abtrag (Kerben) mit einer Schnittpräzision von 110 nm erzeugt werden (Abb. 7). Dies dürften weltweit

die feinsten Laser-schnitte in biologischen Materialien sein. Damit sind chirurgische Eingriffe mit einer Genauigkeit von einem Faktor 500 bis 1000 Mal feiner als die Breite eines menschlichen Haares möglich. Die NIR-Mikroskopie eröffnet

die Möglichkeit, ein „Nanoskalpell“ für die Durchführung von Operationen im Innern einer Zelle, des Zellkerns oder einer Zellorganelle zur Verfügung zu stellen. So konnten wir die Durchtrennung eines Chromosoms mittels Nanochirurgie im Innern einer sich in der Metaphase befindlichen Zelle demonstrieren [7, 13]. Die äußere Zellwand wurde dabei nicht geschädigt, und die Zelle blieb nach dem Eingriff vital und teilte sich erneut (Abb. 8).

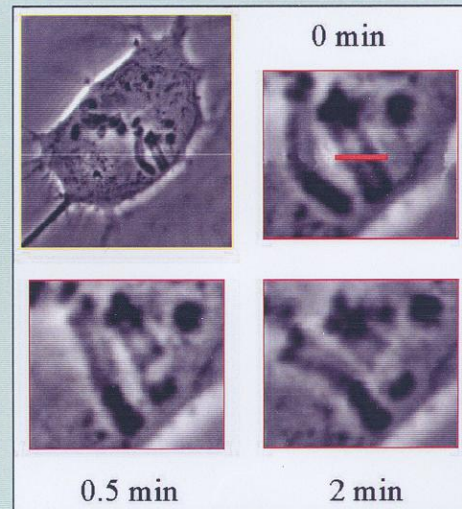


Abb. 8 Nanochirurgie im Innern einer vitalen Zelle. Die kurzzeitige (μ s) Einwirkung von intensiven 170 fs-Pulsen im TW/cm²-Bereich ermöglicht die Dissektion von Chromosomen ohne Beeinträchtigung anderer Zellbestandteile. Die Zelle überlebt und teilt sich anschließend.

Fig. 8 Nanosurgery within a living cell. The short μ s illumination with 170 fs pulses at TW/cm²-intensities enables the dissection of chromosomes without affecting other cellular components. The cells survive and undergo cell division.

6 Zusammenfassung

Das NIR-Multiphotonen-Mikroskop ist somit weit mehr als ein diagnostisches Instrument mit hoher räumlicher und zeitlicher Auflösung für die Untersuchung vitaler Zellen. Es ist auch ein potentielles Werkzeug für die Erstellung nichtinvasiver optischer Biopsien, für die Auslösung hochlokalisierter intrazellulärer photochemischer Reaktionen und ist zudem ein minimal invasives Skalpell für die Bearbeitung von Nano- und Mikrostrukturen im Innern von Zellen und Geweben.

7 Literatur

- [1] A. ASHKIN, J.M. DZIEDZIC: *Optical trapping and manipulation of viruses and bacteria*. Science 235 (1987) 1517-1520
- [2] W. DENK, J.H. STRICKLER, W.W. WEBB: *Two-photon laser scanning microscope*. Science 248 (1990) 73-76
- [3] M. GÖPPERT-MEYER: *Über Elementarakte mit zwei Quantensprüngen*. Göttinger Dissertation. Ann. Phys. 9 (1931) 273-294
- [4] W. KAISER, C. GARRET: *Two-photon excitation in CaF₂:Eu²⁺*. Phys. Rev. Lett. 7 (1961) 229-231
- [5] K. KÖNIG, H. LIANG, M.W. BERNIS, B.J. TROMBERG: *Cell damage by Near-IR microbeams*. Nature 377 (1995) 20-21
- [6] K. KÖNIG: *Optische Mikromanipulation und Zweiphotonen-Anregung vitaler Zellen mittels Naher Infrarot Mikroskopie*. Shaker-Verlag, 1999, In Druck
- [7] K. KÖNIG: *Invited Review: Multiphoton Microscopy in Life Sciences*. Eingereicht in J. Microsc.
- [8] J.M. SQUIRRELL, D.L. WOKOSIN, J.G. WHITE, B.D. BAVISTER: *Long-term two-photon fluorescence imaging of mammalian embryos without compromising viability*. Nature Biotechnol. 17 (1999) 763-762
- [9] Y. LIU, D.K. CHENG, G.J. SONEK, M.W. BERNIS, C.F. CHAPMAN, B.J. TROMBERG: *Evidence for localized cell heating induced by near infrared optical tweezers*. Biophys. J. 68 (1995) 2137-2144
- [10] A. SCHÖNLE, S. HELL: *Heating by absorption in the focus of an objective lens*. Opt. Lett. 23 (1998) 325
- [11] K. KÖNIG, T.W. BECKER, P. FISCHER, I. RIEMANN, K.-J. HALBHUBER: *Pulse-length dependence of cellular response to intense near-infrared laser pulses in multiphoton microscopes*. Opt. Lett. 24 (1999) 113-115
- [12] K. KÖNIG, I. RIEMANN, P. FISCHER: *Photodynamic therapy by non-resonant two-photon excitation*. SPIE Proceed. 3592 (1999). In Druck
- [13] K. KÖNIG, I. RIEMANN, P. FISCHER, K.-J. HALBHUBER: *Intracellular nanosurgery with near infrared femtosecond laser pulses*. Cell. mol. Biol. 45 (1999) 195-201

Anzeige(n)