

Neue Laser für die biomedizinische Zweiphotonen-Anregungsmikroskopie

Eine neue Generation von Hochleistungs-Femtosekundenfaserlasern, die in den wichtigen Anregungswellenlängen von 920 nm und 1 μm mit bisher unerreichten Leistungen emittieren, kann den Titan-Saphir-Laser in der Zweiphotonenmikroskopie ersetzen.

Pascal Dupriez, Spark Lasers
Marco Weisser, Laser 2000

Um unser Verständnis des Gehirns oder spezifischer Pathologien zu verbessern, muss die Grundlagenforschung komplexe Echtzeitinteraktionen biologischer Verbindungen in lebendem Gewebe dreidimensional visualisieren. Dabei wird üblicherweise die Fluoreszenzmikroskopie eingesetzt, die auf der linearen Einzelphotonenanregung basiert. Diese Technik beruht auf der Anregung eines fluoreszierenden Moleküls durch ein typischerweise im sichtbaren Bereich emittiertes Photon. Das angeregte Molekül kehrt in den Grundzustand zurück, indem es ein Photon niedrigerer Energie aussendet (**Bild 1a**), also mit einer Wellenlänge größer als die des anregenden Photons.

Hierbei ergeben sich jedoch Nachteile. Die lineare Natur der Anregung impliziert eine starke Fluoreszenzemission entlang des optischen Wegs, was zu einer Unschärfe im Bild führt, die die räumliche Auflösung und den Kontrast erheblich mindert. Die Nutzung einer Lochblende, die einen Großteil des Lichts aus dem Fokus ausblendet, verbessert die dreidimensionale Auflösung. Die konfokale Mikroskopie bringt allerdings auch eine hohe Streuung und Ver-

luste bei den kurzen Anregungswellenlängen mit sich.

Bildgebung mittels Zweiphotonenmikroskopie

Die Zweiphotonenmikroskopie wurde eingeführt, um eine dreidimensionale Auflösung im Mikrometerbereich in dicken oder lebenden Proben zu erzielen. Sie hat sich zur effektivsten Technik für die Fluoreszenzabbildung in tiefen Geweben entwickelt. Hierbei werden nicht lineare Prozesse zur Anregung des fluoreszierenden Moleküls genutzt. Zwei niederenergetische Photonen sind in diesem Fall notwendig, um das Molekül in den gleichen angeregten Zustand zu versetzen, der die Emission eines Photons entsprechend der fluoreszierenden Wellenlänge nach dem konventionellen Zerfallsprozess ermöglicht (**Bild 1b**). Optische Nichtlinearitäten treten nur bei hoher Intensität auf. Das heißt, im Falle eines fokussierten Strahls findet die Zweiphotonenanregung ausschließlich im Brennpunkt statt, in dem die maximale optische Intensität erreicht wird. Aufgrund des beschriebenen nicht linearen Phänomens wird die Auflösung durch ein Anregungsvolumen definiert, das kleiner ist als das vom fokussierten Strahl abgedeck-

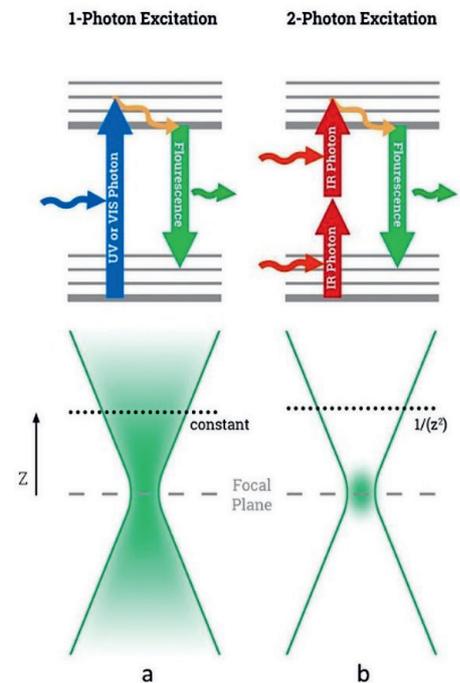


Bild 1: Grundlagen der (a) Ein-Photonen-Anregung und (b) Zwei-Photonen-Anregung in der Fluoreszenzmikroskopie

te Volumen. Mit dem winzigen Anregungsfleck wird die Probe typischerweise dreidimensional abgetastet, um eine Volumenabbildung zu erzeugen. Diese Charakteristik bietet entscheidende Vorteile für die Tiefenschärfe in der hochauflösenden Mikroskopie. Die nichtlineare Anregung ist von Natur aus sehr lokal und unterliegt nicht der Problematik unerwünschter Emission außerhalb des Fokus. Darüber hinaus sind die Anregungswellenlängen doppelt so hoch wie bei der konfokalen Mikroskopie. Hierbei sind Streuung und Verluste deutlich reduziert, was viel tieferliegende Strukturen zu Tage fördert, ohne den Bildkontrast und die Auflösung zu beeinträchtigen. Während die konfokale Mikroskopie im Fall von Hirngewebe auf Bilder in einer ➤

Fazit

Ultrakurz gepulste Faserlaser entwickeln sich aufgrund ihrer hohen Leistung, geringen Größe und Zuverlässigkeit zum bevorzugten Werkzeug für anspruchsvolle Anwendungen in den Neurowissenschaften oder der Onkologie. Spark Lasers hat Femtosekundenlaser für die Zweiphotonenmikroskopie entwickelt, mit einer Kombination aus hoher Spitzenleistung, GDD-Vorkompensation, schneller Modulation und Faserkopplung. Die neue Generation von Faserlasern zeigt, dass sich hochwertige Bilder erzeugen und Vorteile beim Formfaktor, dem geringen Wartungsaufwand und den niedrigen Betriebskosten gegenüber herkömmlichen Titan-Saphir-Lasern nutzen lassen. Der Zukunftstrend liegt in einer höheren Leistungsskalierung.



Bild 2: Modengekoppelter Faserlaser Alcor von Spark Lasers, der zur Anregung bei 920 nm und 1064 nm mit zwei Köpfen bei nur einem Controller ausgestattet ist

Tiefe von weniger als $100\ \mu\text{m}$ beschränkt ist, schafft die Zweiphotonenmikroskopie Aufnahmen im Submikrometerbereich mit einer bis dato beispiellosen Tiefe von mehreren Hundert Mikrometern, was diese Methode zu einem nützlichen Werkzeug für die In-vivo-Analyse in den Neurowissenschaften macht.

Da die Zweiphotonenanregung eine intrinsisch hohe Auflösung liefert, ist der optische Grundaufbau im Vergleich zur konfokalen Mikroskopie relativ einfach. Die Erzeugung nicht linearer Effekte erfordert jedoch den Einsatz von ultrakurz gepulsten Lasern, die hohe Spitzenleistungen bei geringer Pulsenergie erzeugen können, um die Zersetzung lebender Zellen zu vermeiden.

Titan-Saphir-Laser wurden in wissenschaftlichen Anwendungen aufgrund der kombinierten ultrakurzen Femtosekundenpulse und der Durchstimmbareit von Wellenlängen (von etwa 680 bis 1080 nm) standardmäßig eingesetzt, was sie zu einem relevanten wissenschaftlichen Werkzeug für Experimente mit Multiphotonenanregungen (MPE) machte. Aufgrund der Spitzeneffizienz von Titan-Saphir bei der Anregungswellenlänge von 800 nm wurden bei dieser Wellenlänge umfangreiche Forschungsarbeiten durchgeführt. Höhere Wellenlängen

wie 920 nm und von 1030 bis 1120 nm werden inzwischen jedoch bevorzugt, um Streuung und optische Schäden zu reduzieren und fluoreszierende Proteine wie GFP, GCamp, RCamp oder tdTomato anzuregen.

Um die Wellenlängenbereiche mit bisher nicht realisierbaren Leistungen verfügbar zu machen, wurde eine neue Generation von Faserlasern entwickelt. Modengekoppelte Femtosekundenfaserlaser mit Wellenlängen von 1030 bis 1070 nm sind seit Anfang der 2000er-Jahre kommerziell verfügbar und werden in vielen wissenschaftlichen und industriellen Anwendungen eingesetzt. Vorteilhaft sind neben deutlicher Steigerung der Effizienz der extrem reduzierte Platzbedarf, die industrielle Zuverlässigkeit und Robustheit. Die meisten Anwendungen in der Zweiphotonenmikroskopie erfordern besonders hohe Tiefenschärfen und daher eine hohe mittlere Leistung im Wattbereich mit 100 fs Pulsdauer und Wiederholraten um 80 MHz. Diese Spezifikationen werden von Faserlasern bei Wellenlängen von $1\ \mu\text{m}$ routinemäßig erfüllt, blieben aber bei 920 nm bis Januar 2018 unerreichbar.

Dies hat sich mit der Einführung des Alcor 920 (Bild 2 in der Dualvariante mit Einzelcontroller) von Spark Lasers geän-

dert, dem ersten Femtosekundenfaserlaser, der bis zu 2 Watt mittlerer Leistung sowohl bei 920 nm als auch bei 1064 nm erzeugt und damit den gestiegenen Anforderungen von Anwendungen in der Zweiphotonenmikroskopie gerecht wird.

Die nächste Generation von Ultrakurzpulslasern

Aufgrund ihrer herausragenden Eigenschaften haben Faserlaser die konventionellen Festkörperlaser in einigen wichtigen industriellen Anwendungen schnell ersetzt. Dazu zählt die Materialbearbeitung wie Schneiden, Schweißen oder Beschriften von Bauteilen in unterschiedlichsten Dimensionen. Gerade Femtosekundenfaserlaser übertreffen heute die herkömmlichen Titan-Saphir-Laser und entwickeln sich zur besten Alternative und damit zu einer künftigen Schlüsseltechnologie in Mikroskopiesystemen.

Bei der für die Zweiphotonenmikroskopie erforderlichen kurzen Pulsdauer von weniger als 200 fs können komplexe Optiken im Strahlweg die Bildqualität deutlich verschlechtern. Dies geschieht durch die induzierte Gruppengeschwindigkeitsdispersion (GDD), weshalb die ultrakurzen Pulse vor dem Verlassen des Lasers korrigiert werden müssen. Die in der Elektronik des Laserkopfs integrierte GDD-Vorkompensation hebt die induzierte GDD im optischen System exakt auf und stellt damit sicher, dass die Pulsdauer auf der Probe so kurz wie möglich ist. Das Kompensationspektrum reicht von 0 bis $-90\,000\ \text{fs}^2$. Es übertrifft damit die Anforderungen der meisten optischen Systeme. Da die Laserstrahlen mit 920 nm und 1064 nm auf einen unterschiedlichen Dispersionsgrad treffen können, lässt sich die GDD-Vorkompensation für jede Wel-

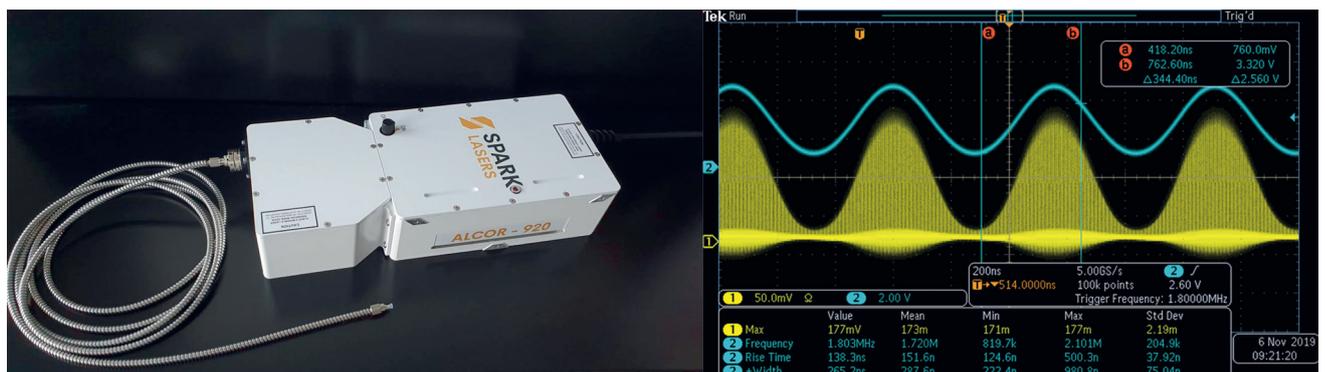


Bild 3: Femtosekundenfaserlaser Alcor FLeXSight mit GDD-Vorkompensation, schneller Leistungsmodulation und robuster Faserführung. Links: an ein 2 m langes Faserkabel gekoppelter Laser; Rechts: Demonstration der analogen Leistungsmodulation, bei der die optische Pulsfolge (gelb) bei 80 MHz dem elektrischen Signal (blau) exakt folgt.

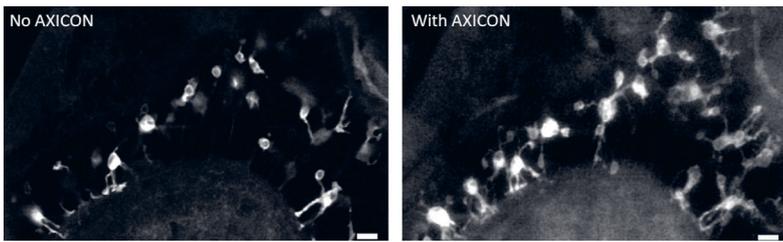


Bild 4: Einebenenbilder von Mikrogliazellen in Zebrafischen, aufgenommen mit einem Multiphotonen-Videoratenmikroskopiesystem (VM5) von Bliq Photonics ohne (links) oder mit (rechts) volumetrischem Axicon-Modul. Das Axicon-Bild (rechts) hat eine Schärfentiefe (DOF) von $30\ \mu\text{m}$ (Z). Maßstabsbalken: $20\ \mu\text{m}$.

lenlänge individuell mit der gleichen Präzision steuern.

Die Feineinstellung der mittleren Leistung ist grundlegend, um die Anregung in der Probe zu optimieren: Eine zu geringe Leistung erzeugt keine Fluoreszenz und eine zu hohe Leistung kann zu einem Photobleaching (Fluorophor wird fotochemisch zerstört) führen oder lebende Zellen beschädigen. Da die konventionelle Zweiphotonenmikroskopie auf dem Punkt-zu-Punkt-Scannen basiert, muss der Laserstrahl an jeder Ecke des Scanmusters abgeschaltet werden, um eine konstante Scangeschwindigkeit im gesamten abgebildeten Volumen zu gewährleisten. Der neue Laser (Alcor XSight) erreicht dies mit einer Leistungsanpassung von 0 bis 100%, einem schnellen on/off (über ein TTL-Signal getriggert) sowie analoger Modulation mit einer Ansprechzeit von weniger als $1\ \mu\text{s}$.

Kleiner dimensionierte Laserquellen, die mehr Funktionen wie Leistungsmodulation oder GDD-Vorkompensation beinhalten, reduzieren die Komplexität und die Kosten von Mikroskopen. Gleichzeitig erlauben sie es Forschern aber auch, den optischen Abstand zwischen der Laserquelle und der Probe zu verringern und damit die Gesamtstabilität zu erhöhen.

Die Faserübertragung von Femtosekundenpulsen ist aufgrund des geringen Gewichts und der Flexibilität der optischen Faser eine sehr attraktive Lösung für diverse Anwendungen. Aus System-sicht liegt die Strategie in der Miniaturisierung von Scannern und Optiken sowie in der Verwendung von zwei Faseroptiken: eine für die Anregung und eine zum Erfassen der Fluoreszenz. Dies ermöglicht kompakte Zweiphotonensysteme, die durch direkte Anwendung am Objekt Echtzeitanalysen in einer für beispielsweise ein Tier stressfreien Umgebung

durchführbar machen. Für solche Anwendungen kann ein 2 m langes optisches Faserkabel genutzt werden, um Femtosekundenpulse direkt auf die Probe zu lenken (Bild 3). Da sich die optische Faser während des Experiments bewegen soll, wird sie einmodig und polarisiert gehalten, sodass die Puls- und Strahlqualität unter allen Umgebungsbedingungen (Biegung, Wicklung, Temperaturschwankungen und anderes) unverändert bleibt. Die Kombination von Modulation und GDD-Vorkompensation mit der Faseranbindung ermöglicht es Forschern nun, die Pulsdispersion, die Pulsintensität und die räumliche Lage der Pulse zu kontrollieren.

Beispielanwendungen zur Bildgebung

Ultraschnelle Faserlaser werden in der Zweiphotonenmikroskopie beispielsweise bei der Lichtscheibenfluoreszenzmikroskopie (LSFM) verwendet. Im Folgenden wurde der Alcor 920 in einem von Bliq Photonics entwickelten Multiphotonenmikroskop eingesetzt, das Bessel-Strahlen

mit Axicon-Technologie nutzt. Bei gleicher Abtastzeit ermöglicht das Modul die Abdeckung einer größeren Schärfentiefe und liefert mehr Informationen als eine einzelne Ebene. Mit dieser Methode wurden Mikrogliazellen in Zebrafischen untersucht. Die In-vivo-Abbildungen von den GFP-markierten Zellen zeigt Bild 4. Die hochwertigen Aufnahmen sind somit das Ergebnis aus der Kombination eines modernen Mikroskopiesystems und dem Hochleistungs-Femtosekundenfaserlaser.

Bild 5 zeigt die Abbildung von Eierstockzellen einer Maus, die mit dem Alcor bei $920\ \text{nm}$ mit Bliq Photonics' Multiphotonen-Videoratenmikroskops ohne und mit dem SLAM-Superauflösungsmodul aufgenommen wurden. Beide Systeme erreichen kombiniert mit den Faserlasern eine hohe Auflösung bei hohem Kontrast. mg ■

Online-Service

Informationen zu den Alcor-Lasern von Spark Lasers
www.photonik.de/33400

Kontakt

Marco Weisser
Technischer Vertrieb
und Entwicklungsin-
genieur
Laser 2000 GmbH
Argelsrieder Feld 14
82234 Wessling
Tel. +49 8153 405-52
Fax +49 8153 405-33
m.weisser@laser2000.de
www.laser2000.de

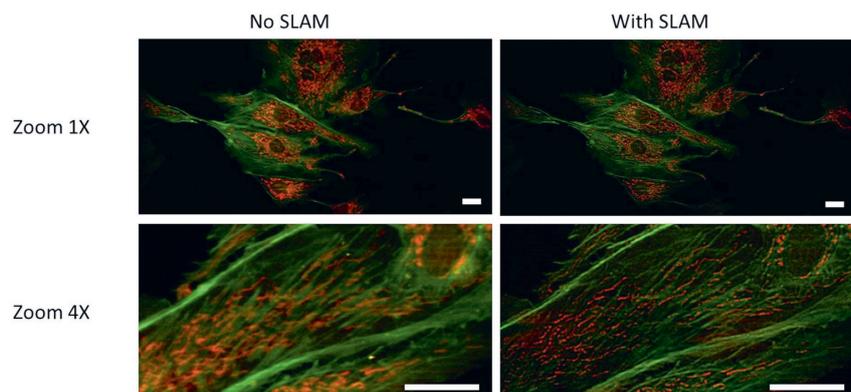


Bild 5: Eierstockzellen der Maus (grün: Aktin-Filamente, rot: Mitochondrien), aufgenommen wie in Bild 4. SLAM (switching laser mode) verbessert die Auflösung beider Systeme um bis zu 100%. Maßstabsbalken: $20\ \mu\text{m}$.