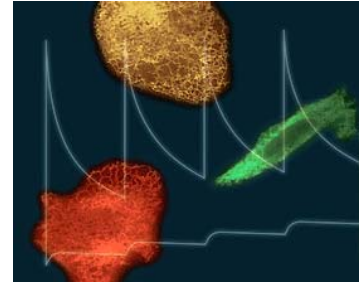
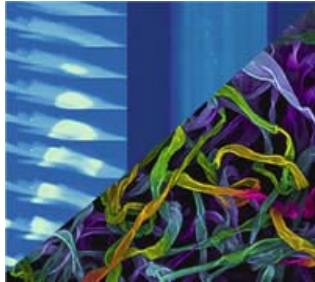


## Mikroskopietrends '05

### Konzepte, Anwendungen und Perspektiven



## Abstracts

---

### Life Science: Neue Wege und Techniken in der Mikroskop-Optik

Dr. Thomas Sure

*Leica Microsystems CMS GmbH Wetzlar, Leica Optics Center*

In den letzten Jahren sind die Anforderungen an die Abbildungsleistungen von Mikroskopobjektiven ständig gestiegen. Dies gilt für die Konfokal-Mikroskopie, insbesondere für die 4PI-Konfokal-Mikroskopie, beim simultanen Einsatz verschiedener Wellenlängen. Besonders beachtet werden muss hierbei der Einfluss der geometrischen als auch der chromatischen Aberrationen auf die Intensitätsverteilung entlang der optischen Achse. Es werden die daraus resultierenden Anforderungen an das Objektiv-Layout sowie die notwendige Messtechnik im Bereich der Fertigungstechnologie zur Realisierung des hohen Qualitätsanspruchs diskutiert.

---

---

## **Fast Imaging: Neues aus der konfokalen Welt**

Dr. René Hessling

*Carl Zeiss Göttingen, Training, Application and Support Center*

Mit der Kombination der bereits mehrfach ausgezeichneten konfokalen Laser Scanning Mikroskope LSM 510 META und LSM 5 LIVE zu einem einzigen System, dem LSM 5 DUO, hat der Unternehmensbereich Mikroskopie von Carl Zeiss einen flexiblen Arbeitsplatz geschaffen, der eine bisher unerreichte Vielfalt an Experimenten ermöglicht.

Das LSM 5 DUO gestattet schnelles Linien-Scannen, ultrapräzises Punkt-Scannen, spektrale und nichtlineare Bildaufnahme sowie flexible optische Mikromanipulation der Präparate – alles mit nur einem Mikroskop und einer leistungsstarken Lasereinheit. Sämtliche Systemfunktionen werden mit derselben Software und Echtzeitelektronik gesteuert und realisiert. Das Ergebnis ist eine hocheffiziente Gesamtlösung, die hinsichtlich Flexibilität neue Maßstäbe setzt.

Mit der Einführung einer weiteren Systemeinheit zur pixelgenauen Beleuchtung und Probenmanipulation, dem LSM DuoScan, können einzigartige Gerätekomponenten von Carl Zeiss zu Systemen kombiniert werden, deren experimentelle Vielseitigkeit für die biomedizinische Forschung unübertroffen ist. Das LSM DuoScan gestattet in Verbindung mit einem der Laser Scanning Mikroskope LSM 510, LSM 510 META oder LSM 5 LIVE die Photomanipulation von Proben in frei definierbaren Bereichen (Regions of Interest, ROI's) mit Licht verschiedener Wellenlängen.

Photobleichverfahren wie FRAP, FLIP oder FLAP sind moderne und vielseitig verwendete Methoden zur Untersuchung hochdynamischer Prozesse in lebenden Zellen. Diese Anwendungen erfordern auf der einen Seite eine sehr präzise Beleuchtung von subzellulären Regionen mit hoher Laserleistung. Andererseits wird eine sehr hohe Aufnahmegeschwindigkeit benötigt, um dynamische Prozesse, wie Diffusion oder aktiven Transport von fluoreszenzmarkierten Stoffen unmittelbar nach den Bleichereignissen aufzuzeichnen. Diese Anforderungen werden ebenfalls bei Anwendungen benötigt, die mit Hilfe von violetterem Licht bei 405nm bestimmte fluoreszierende Proteine photoaktivieren oder photokonvertieren und ebenso bei Uncaging-Experimenten mit UV-Licht. Gerade die Kombination von zwei unabhängige Scannergruppen in den Systemen LSM 5 DUO, LSM 5 LIVE DuoScan, LSM 510 DuoScan und LSM 510 META DuoScan bietet somit die benötigte Flexibilität und Geschwindigkeit für anspruchsvolle Anwendungen in der Lebendzellmikroskopie.

---

## Fast Imaging in der Weitfeldmikroskopie

Dr. Olaf Selchow

*Zentrales Labor für Mikroskopie und Bildanalyse, SFB 495, Universität Stuttgart*

„Fast Imaging“ - das möglichst schnelle Aufnehmen vieler Bilder – wird für Studien an lebenden Proben (Zellen, Geweben, Organen und Organismen) ein immer wichtigerer Aspekt der Lichtmikroskopie. Die Untersuchung dynamischer Prozesse in lebenden Proben erfordert zeitliche Auflösungen von wenigen Millisekunden bis Sekunden (Calcium Waves, Vesikel Transport, Cilienschlag, Zell-Motilität, etc.). Ebenso verlangen Hochdurchsatz-Systeme und andere Mikroskopie-Bereiche nach schnellen Kameras und Detektoren. Nachdem im Jahr 2004 in diesem Forum die neuen Entwicklungen in der Konfokalmikroskopie diskutiert wurden (R. Nitschke) sollen hier nun Anwendungen und Techniken des „Fast Imaging“ in der Weitfeldmikroskopie im Mittelpunkt stehen.

Die Weitfeldmikroskopie ist für viele Anwendungen der Mikroskopie nach wie vor die Methode der Wahl. Vor allem bei der Untersuchung dynamischer Prozesse in lebenden Proben sowie für die hochsensitive Detektion schwacher Fluoreszenz-Signale und für schnelle Durchlicht-Kontrast-Mikroskopie hat die parallele Beleuchtung aller Bildpunkte und deren simultane Detektion mit schnellen Kameras oft große Vorteile gegenüber konfokalen Laser Scanning Mikroskopen.

Die Leistungsfähigkeit von Mikroskop-Systemen für „Fast Imaging“ hängt wesentlich von der richtigen Wahl der Komponenten für Beleuchtung, Trennung von Beleuchtungslicht und Signal sowie dem Detektionssystem ab. Schnelle, spezifische Anregungs-Lichtquellen und hochsensitive, schnelle Kameras sowie – abhängig von der Anwendung – schnelle Filterwechsler oder Räder müssen gut auf einander abgestimmt und synchronisiert werden um ihre individuellen technischen Spezifikationen in vollem Umfang nutzen zu können. In diesem Beitrag soll der Stand der Technik der auf dem Markt erhältlichen Systeme für die Weitfeldmikroskopie unter dem Aspekt der Aufnahmegeschwindigkeit diskutiert werden.

---

## **„Broadband-Imaging“ mit neuer Konfokaltechnologie**

Dr. Stefan Terjung

*Advanced Light Microscopy Core Facility, EMBL Heidelberg*

Konfokale Laser Scanning Mikroskopie ist ein wichtiges Werkzeug aktueller biologischer Forschung. Das Anwendungsspektrum reicht von der hochaufgelösten Lokalisierung Fluoreszenz-markierter Proteine auf fixierten Proben und Einzelmolekül Detektion bis zur schnellen Aufnahme von 4D Zeiterien ganzer Organismen in vivo.

Neuste Entwicklungen im Gebiet der Konfokalmikroskopie erweitern das Spektrum, in dem diese Technik in der biologischen Forschung eingesetzt werden kann und ermöglichen „Breitband Mikroskope“, die einem weiten Bereich verschiedener Anwendungen, wie z.B. FRAP und FRET, gerecht werden. Neue Entwicklungen in der Konfokaltechnologie und ihre Vorteile in der Biologie werden im Kontext aktueller Forschung dargestellt und ein Ausblick auf zukünftige Entwicklungsmöglichkeiten gegeben.

---

## **Life Cell Imaging: Theorie und Praxis**

Dr. Christoph R. Bauer

*Dep. Of Molecular Biology - Frontiers in Genetics, Bioimaging Platform  
University of Geneva, Schweiz*

Imaging living samples of cells or other organisms places new demands on microscope instrumentation and the microscopist.

In this lecture I will first give an overview on possible instrument setups and the requirements they should fulfil. Emphasis will be given to subjects like instrument choice (confocal or widefield), stability (xy, z) and environmental control (temperature, CO<sub>2</sub>, humidity).

In the second part I will focus on phototoxicity and bleaching as the most demanding challenges for live cell imaging. This part will start again with optimization of instrument parameters (choice of objectives, filters, shutters, camera etc.), but will then stress optimization of imaging parameters (dynamic range, binning, stepsize, time intervals etc.).

In the last part I will present some results of live cell imaging applications that we obtained with our widefield fluorescence workstation (Leica AS MDW).

---

## Molecular Imaging von Micro bis Macro

Dr. Carsten Grötzing

*AG Molekulare Bildgebung, Gastroenterologie, Charité Berlin*

Die Molekulare Bildgebung von Krankheitszuständen zählt zu den wichtigsten Entwicklungsgebieten der modernen Medizin. Optische Technologien spielen dabei vor allem als hochauflösende mikroskopische oder oberflächennahe makroskopische Verfahren eine zunehmende Rolle. Obwohl praktisch alle derzeit existierenden Ansätze dazu noch auf experimenteller Ebene stehen, sind doch wichtige Anwendungsfelder schon absehbar. Vor allem endoskopische Verfahren bieten sich dazu an. Während des letzten Jahrzehnts haben sich Peptidrezeptoren aus der Familie der G-Protein-gekoppelten Rezeptoren (GPCRs) als geeignete molekulare Zielstrukturen sowohl für die bildgebende Diagnostik wie auch für die Therapie von Tumoren erwiesen. Zahlreiche Tumorzellen überexprimieren auf ihrer Oberfläche GPCRs. Für viele neuroendokrine Tumoren ist die molekular definierte bildgebende Diagnostik mittels Somatostatin-Rezeptor-Szintigrafie die Methode der Wahl und seit Jahren klinischer Alltag. Peptidische Liganden sind chemisch-synthetisch leicht zugänglich, vielfältig modifizierbar und mit verschiedensten Signalmolekülen zu versehen. Damit bilden markierte Peptidliganden von GPCRs geeignete Sonden für die bildgebende Diagnostik (und Therapie) von Tumoren. Dennoch sind wesentliche Fortschritte insbesondere bei den weiter verbreiteten Adenokarzinomen z.B. des Gastrointestinaltraktes bisher ausgeblieben.

Aber nicht nur GPCRs sind als Zielmoleküle für diagnostische und therapeutisch wirksame Sonden interessant. Peptide sind auch als Liganden für andere tumoren-othelassozierte Oberflächenproteine geeignet. Zahlreiche Untersuchungen mit Phagenbibliotheken, kombinatorischer Chemie und definierten Peptidbibliotheken haben gezeigt, dass aus peptidischen Zufallssequenzen de novo hochaffine Liganden für verschiedenste Proteine gewonnen werden können. Langfristig verspricht diese Strategie nicht nur hochselektive Liganden für die Bildgebung zu liefern, sondern gleichzeitig zielsuchende Moleküle für therapeutische Ansätze wie die radioablativ Intervention zu identifizieren. Da der bildgebenden Diagnostik am Menschen stets die Charakterisierung von biochemischen und zellbiologischen Phänomenen im experimentellen (Zellkultur-)System vorangeht, spielt die Mikroskopie auf dem Wege der Kontrastmittelentwicklung eine wichtige Rolle. Mikroskopisch können sowohl Bindung wie auch Endozytose und Transportvorgänge innerhalb der Zelle visualisiert werden.

---

## **Heterodyn - CARS - Mikroskopie**

Dr. Harald Telle / Dr. Bernd Bodermann

*AG Mikrooptische Messtechnik, Physikalisch-Technische Bundesanstalt, Braunschweig*

Die kohärente Anti-Stokes-Raman-Streuung (CARS) kann zur molekülspezifischen, hochauflösenden Bildgebung eingesetzt werden. Damit entfällt eine Anfärbung, die z. B. bei biologischen Proben wegen ihrer oft toxischen Wirkung unerwünscht ist. Das CARS-Verfahren nutzt die Ramanresonanz, etwa von Schwingungsübergängen, die mittels zweier optischer Felder angeregt wird. Die so erzeugte kollektive Materialanregung wird durch inelastische Streuung eines dritten Feldes nachgewiesen. Üblicherweise wird das so erzeugte schwache Anti-Stokes-Signal, zeitlich gemittelt, direkt mit einem Photomultiplier nachgewiesen.

Wir haben dieses konventionelle CARS-Mikroskopie-Schema in zwei wesentlichen Punkten verbessert: 1. Das Anti-Stokes-Signal wird mit Hilfe eines impulsförmigen Überlagerungssignals, dessen Frequenz und Phase denen des Anti-Stokes-Signals entsprechen, heterodyn-detektiert. Durch den sog. Heterodyn-Gewinn lassen sich jetzt einzelne Signal-Photonen auch mit unempfindlichen Detektoren nachweisen. Zudem werden inkohärente Untergrundsignale, etwa durch Zweiphotonen-Fluoreszenz, wirkungsvoll unterdrückt. 2. Der kurze Überlagerungs-Impuls dient zur Diskriminierung des Abfrageprozesses vom Anregungsprozess. Somit lassen sich beide Vorgänge zeitlich trennen. Dies erlaubt, die Phasenrelaxationszeit verschiedener Moleküle als Kontrastmechanismus auszunutzen. Damit lassen sich unerwünschte kohärente Untergrundsignale, etwa von Wasser, wirkungsvoll unterdrücken.

---

## **Spektrales Lochfüllen als neue Perspektive für die Lichtmikroskopie**

Dr. Matthias Wollenhaupt / Prof. Dr. Thomas Baumert

*FB Experimentalphysik, Universität Kassel*

Spektral modulierte Femtosekunden Laserpulse werden zur Kontrolle nichtlinearer optischer Prozesse verwendet. Anwendungen derartig modulierter Laserpulse in der nichtlinearen Mikroskopie werden diskutiert. Neben der Kontrolle der Multiphotonenanregung mit Hilfe phasenmodulierter Laserpulse wird der Effekt der spektralen Amplitudenmodulation in Kombination mit Selbstphasenmodulation experimentell demonstriert.

Zu diesem Zweck wird mit Hilfe eines optischen Modulators [1] ein schmales Frequenzband innerhalb des breitbandigen Spektrums eines Femtosekunden Laserpulses entfernt. Die Regeneration dieser spektralen Komponenten durch Selbstphasenmodulation in der Probe wird experimentell untersucht [2]. Als transparente Probe dient ein dünner Wasserstrahl. Wir präsentieren ein einfaches physikalisches Modell für die experimentellen Beobachtungen. Insbesondere wird erklärt wie es zum Wiederauffüllen des spektralen Loches durch die Selbstphasenmodulation kommt. Auch die überraschende Beobachtung, dass die eliminierten Spektralkomponenten bei hohen Anregungsintensitäten die unmodulierten Spektralkomponenten an Intensität übersteigen wird im Rahmen dieses Modell verständlich. Mögliche Anwendungen dieses neuartigen Kontrastmechanismus auf dem Gebiet der nichtlinearen Mikroskopie werden angesprochen.

1. Präkelt A, Wollenhaupt M, Assion A, Horn C, Sarpe-Tudoran C, Winter M, Baumert T. 2003. Compact, robust and flexible setup for femtosecond pulse shaping. *Rev. Sci. Instr.* 74(11):4950-4953
2. Präkelt A, Wollenhaupt M, Sarpe-Tudoran C, Assion A, Baumert T. 2005. Filling a spectral hole via self-phase modulation. *Appl. Phys. Lett.* 87(12):121113-1-121113-3