



Fluoreszenz-Lebenszeit-Bilder in der Mikroskopie: es gibt mehr zu sehen

Dr. Rolf T. Borlinghaus

Leica Microsystems

Herkömmliche Fluoreszenzbilder zeigen die Helligkeit der Emission in räumlicher Verteilung. Solche Bilder enthalten aber noch weitere Information, die in Intensitätsbildern verborgen bleibt.

Um diese verborgenen Informationen aufzudecken, wird die Emission nach der Lebensdauer des angeregten Zustandes aufgespalten. Man spricht von „Fluorescence-Lifetime-Imaging“ (FLIM), oder auch von „ τ -mapping“. Dieses Verfahren kann Unterschiede offenbaren, die in der gewöhnlichen Fluoreszenzmikroskopie nicht wahrgenommen werden können. Solche Unterschiede sind durch die molekulare Umgebung des Farbstoffs verursacht, beispielsweise durch den pH-Wert, die Polarität oder andere molekulare Komponenten. Weiter ist das FLIM-Signal besser geeignet für quantitative Untersuchungen, denn die Ergebnisse sind präziser und reproduzierbarer als herkömmliche Helligkeitsmessungen. Für die modernen FRET-Biosensoren, beispielsweise zur Messung von Ca^{2+} oder cAMP-Konzentrationen in lebenden Zellen ist FLIM das ideale Verfahren.

Bis vor kurzem waren die Verfahren zur Aufnahme von FLIM Bilder recht komplex und langwierig, weshalb nur ein kleiner Kreis von Spezialisten sich diesem Thema gestellt hatte. Zudem konnten Bilder nur mit sehr geringen Aufnahmeraten aufgezeichnet werden, was in der Regel bei Präparaten lebenden Materials nicht sinnvoll ist. Durch neue Technologie und neue Auswerteverfahren hat sich dies in der jüngsten Zeit grundlegend geändert. Die Aufnahmeraten sind mindestens 10-fach höher und die Anforderungen an den Benutzer solcher

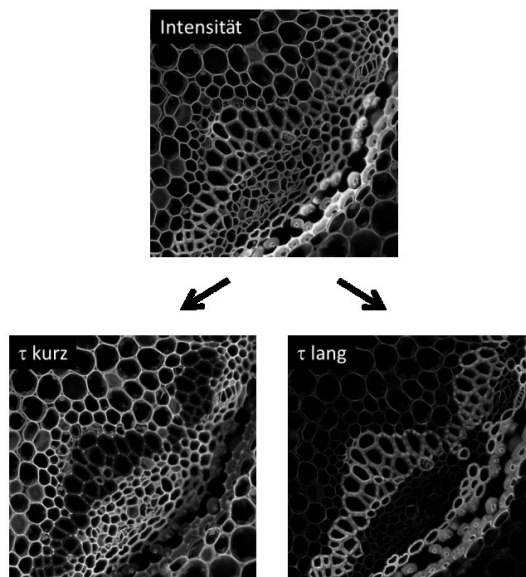


Abb. 1: Oben ein Intensitätsbild, wie man es im gewöhnlichen konfokalen Mikroskop sieht. Darunter dieselbe Stelle, aufgezeichnet mit derselben spektralen Einstellung; links bei kurzer Fluoreszenz-Lebenszeit, rechts bei langer Fluoreszenz-Lebenszeit. Sehr deutlich ist die Auftrennung in zwei verschiedene Signale zu sehen, die im einfachen Intensitätsbild nicht erkennbar sind. (Optische Schnitte aus *Convallaria majalis* Rhizom, Ex 651nm, Em 718-794nm, gefärbt mit Safranin und FastGreen.)

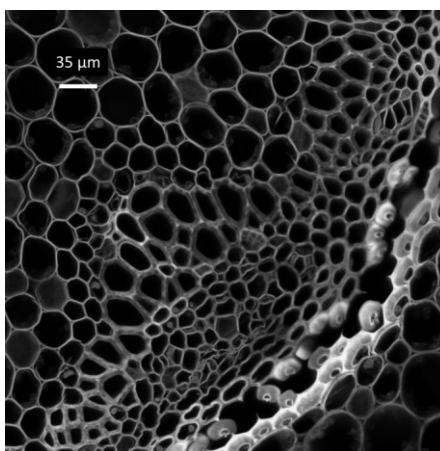


Abb. 2: Intensitätsbild bei einer einfachen Fluoreszenzaufnahme mit einem Farbkanal. Darstellung in Grauwerten. Dieses Bildkonzept entspricht einer „schwarz-weiß“ Aufnahme mit einer Kamera.

Geräte nicht wesentlich verschieden von denen gewöhnlicher konfokaler Mikroskope.

In diesem Artikel soll vor allem erläutert werden, wie man Intensitätsbilder und Lebenszeitbilder farblich kodieren kann und wie sich in auch in schmalen spektralen Bändern aus der Kombination der beiden Kontrastverfahren neue Einblicke ergeben.

Intensitätsbilder

Üblicherweise verstehen wir unter einem „Bild“ die Verteilung der Lichtintensität über eine zweidimensionale Fläche. Das gilt für antike Gemälde, für Aufnahmen mit modernen Digitalkameras und auch für konfokale Fluoreszenzbilder [1]. Ein Bild enthält also Information über lokale Eigenschaften des abgebildeten Objektes, wobei die Information wesentlich von der Farbe (Wellenlänge) des beleuchtenden Lichtes abhängt. Die Leuchtkraft oder Helligkeit wird in der Regel in Grauwerten kodiert, das sind relative Helligkeitszahlen, die aus den elektrischen Signalen des Sensors berechnet und in einem digitalen Speicher aufgezeichnet werden.

Wird nur ein spektrales Band verwendet, stellt man das Bild am besten in grau dar (Abbildung 2), salopp spricht man dann von einem schwarz-weiß-Bild. Dabei werden dunkle Strukturen auch im Bild dunkel dargestellt. Dunkel sind Stellen, an denen wenige Photonen gemessen werden. An hellen Stellen werden viele Photonen pro Zeiteinheit registriert.

Anfänglich wird man ein Fluoreszenzbild so interpretieren, als würden im Präparat an hellen Stellen viele Farbstoffmoleküle zu finden sein (hohe Konzen-

tration) und an dunklen Stellen nur wenige oder gar keine. Das ist zum größten Teil auch korrekt. Die Helligkeit hängt aber auch davon ab, wie intensiv die Beleuchtung ist, ob die Farbstoffe schon in der Sättigung sind, ob schon Farbstoffmoleküle ausgebleichen sind und ob andere Moleküle in der Umgebung des Farbstoffes die Anregung löschen („quenching“). Hinzu kommt, dass die Intensität der Beleuchtung in der Tiefe des Präparates durch parasitäre Absorption und Streuung abnimmt. Das alles führt dazu, dass quantitative Messungen über die Intensität weitreichende Kalibrationen und Kontrollmessungen erfordern.

Die Intensitäten lassen sich auch statt in Grauwerten in Farben darstellen (Abbildung 3). Dabei entsteht ein „Falschfarbenbild“, wie es etwa von einer Wärmebildkamera bekannt ist. Oft wird schwarz durch die Farbe Blau dargestellt und weiß (hell) durch die Farbe Rot. Die Intensitätswerte dazwischen folgen dann dem natürlichen Farbspektrum des weißen Lichtes. Es sind aber beliebige farbliche Zuordnungen zu den einzelnen Grauwerten ebenso möglich.

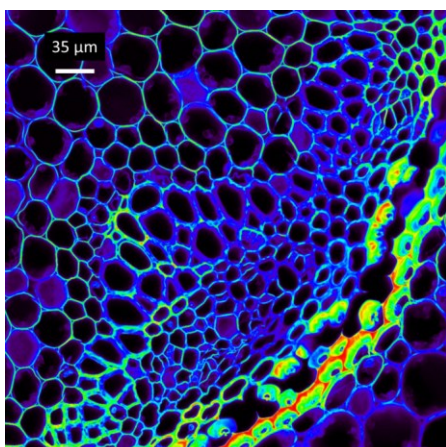


Abb. 3: Dasselbe Bild, aber in „Falschfarben“. Durch geschickte Wahl der Farbtabelle lassen sich unter geeigneten Bedingungen verschiedene Strukturen segmentieren.

Das zelluläre Geschehen ist ein sehr komplexes Zusammenspiel von vielerlei organischen Substanzen, kleinen Molekülen und Polymeren, und von Ionen. Um zu verstehen, wie die unterschiedlichen Komponenten miteinander in Wechsel-

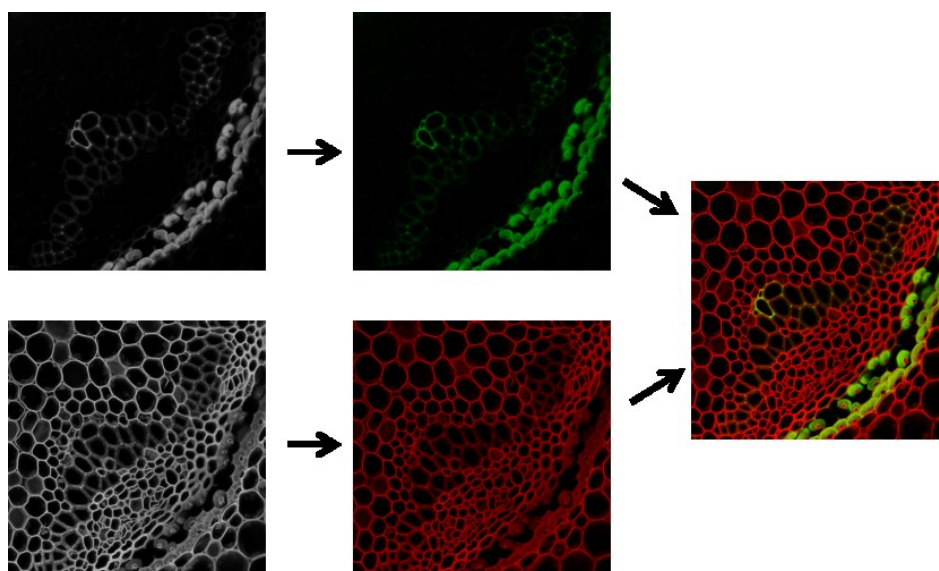


Abb. 4: 2-Kanal Fluoreszenz. Die Intensitätsbilder der beiden Fluoreszenzbänder sind links abgebildet. In der Mitte dieselben Bilder, nun aber mit jeweils einer anderen Farbe versehen. Die Helligkeit wird dabei in die Farbsättigung übertragen. Die Überlagerung der beiden farbigen Bilder ergibt das rechte Bild (Anregung 503 nm, Emission 515-525 nm und 700-800 nm.)

wirkung treten, färbt man mehrere dieser Objekte mit fluoreszierenden Farbstoffen an. Darum ist die Aufzeichnung mehrerer Fluoreszenzkanäle in der biomedizinischen Forschung sehr wichtig geworden. Der einfachste Fall, nämlich eine Anregung mit nur einer Farbe und Aufzeichnung in zwei spektralen Bändern ist in Abbildung 4 gezeigt. Die Intensitätsbilder der zwei Emissionskanäle werden mit willkürlich ausgewählten Farben digital koloriert (wobei man freilich versucht, die originalen Farben so weit wie möglich zu imitieren). Diese Farbbilder werden dann in einem neuen Bild überlagert, in dem man nun die Korrelation der eingefärbten Objekte studieren kann. Die Farben haben in so einem „overlay“-Bild eine ganz andere Bedeutung als in einem Falschfarbenbild. In gleicher Weise erzeugt unser Auge in drei spektralen Bändern jeweils Graubilder, die im Gehirn zu einem Farbbild überlagert werden.

τ -Bilder

Ein Satellitenbild der Alpen am Mittelmeer zeigt die Helligkeitsverteilung der drei physiologischen Farbkanäle. Wir sehen schneebedeckte weiße Gipfel, grüne Waldflächen, braune Äcker und blaues und grünes Wasser. Eine topographische Landkarte desselben Gebietes nutzt ein völlig anderes Konzept zur

Bildentstehung. Meerestiefen werden in zunehmend satteren Blautönen und Bergeshöhen in zunehmend satteren Rottönen dargestellt.

Auch der Fluoreszenzprozess bietet außer Intensitätsmessungen auch noch einen anderen Parameter, den man wie in einer topographischen Karte bildlich auswerten kann: die Fluoreszenz-Lebensdauer. Nach der Anregung eines Fluoreszenzmoleküles bleibt das Elektronensystem für eine kurze Zeit im angeregten Zustand, bevor es unter Aussendung eines längerwelligen Photons wieder in den Grundzustand zurückkehrt. Diese „kurze Zeit“ ist für ein einzelnes angeregtes Molekül nicht vorhersehbar, dennoch findet man für eine jede Molekülspezies einen typischen Wert, den man mit der Fluoreszenz-Lebensdauer τ bezeichnet. Ganz ähnlich, wie man den ebenso stochastischen Zerfall radioaktiver Atomkerne mit der Halbwertszeit $t_{1/2}$ charakterisiert. Diese typische Lebenszeit kann man mit geeigneten Verfahren messen [2]. Das präziseste Verfahren ist die „zeitkorrelierte Einzelphotonenzählung“ (TCSPC für time correlated single photon counting). Wie das im Einzelnen funktioniert, soll hier nicht erläutert werden, die Literaturzitate können für ein vertieftes Studium herangezogen werden[3][4].

Die typische Fluoreszenz-Lebenszeit ist einerseits durch das Farbstoffmolekül selbst festgelegt, wird aber auch durch die molekulare Umgebung modifiziert. Sie ist aber unabhängig von der Farbstoffkonzentration, unabhängig von der Beleuchtungsintensität und wird durch Bleichvorgänge nicht verändert. Es gibt also gute Gründe, sich mit der Fluoreszenz-Lebenszeit zu befassen, wenn quantitative Messungen beabsichtigt sind. Ein τ -Bild entsteht, wenn man statt der Intensität einfach die in jedem Pixel gemessene Lebenszeit in die Bildmatrix einträgt. Die Lebenszeiten werden dabei so normiert, dass sie in die Graustufenleiter gewöhnlicher Bilder passen, also z. B. in 256 Stufen eingeteilt (für 8-Bit Systeme). Das Ergebnis ist in Abbildung 5 zu sehen. Hier wurden die gemittelten Ankunftszeiten aller Photonen der einzelnen Pixel in Grauwerte umgerechnet.

Und ebenso wie für die Intensitäten, kann man auch das τ -Bild mit Falschfarben kodieren (Abbildung 6)

Es fällt auf, dass diese Bilder zunächst etwas unscharf wirken. Das liegt an unseren Erwartungen, die wir an Fluoreszenzbilder stellen. Die Lebenszeiten sind nicht so verteilt, wie die Intensitäten. Wenn an einer Stelle eine mittlere Lebenszeit gemessen wird, dann ergibt sich daraus ein Zahlenwert; unabhängig davon, ob das Bild an dieser Stelle hell oder dunkel ist. In Bereichen, in denen gar kein Präparat vorhanden ist, versucht das Gerät Lebenszeiten aus dem Dunkelsignal zu extrahieren. Eine dunkle Stelle wegen des kleinen Signals weniger ist signifikant als eine helle Stelle im Präparat. Darum kreuzt man die τ -Messung mit der Helligkeitsmessung. Ein solches FLIM-Bild ist in Abbildung 7 zu sehen.

Schon in diesem Bild ist mehr zu sehen, als in einem gewöhnlichen konfokalen Bild: kräftig grün ist etwas ganz anderes als kräftig rot. Ein genaueres Separationsverfahren soll im nächsten Abschnitt vorgeführt werden.

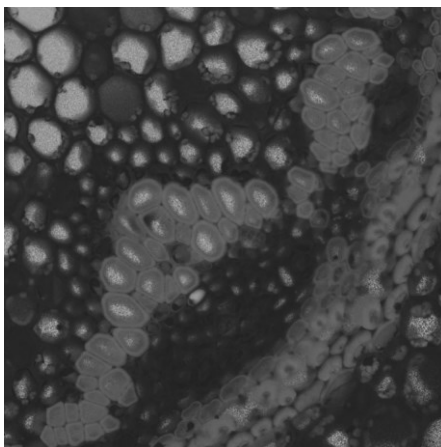


Abb. 5: τ -Bild. Die unterschiedlichen Lebenszeiten sind durch unterschiedliche Helligkeiten kodiert. Dunkel: kurze Lebenszeit, hell: lange Lebenszeit.

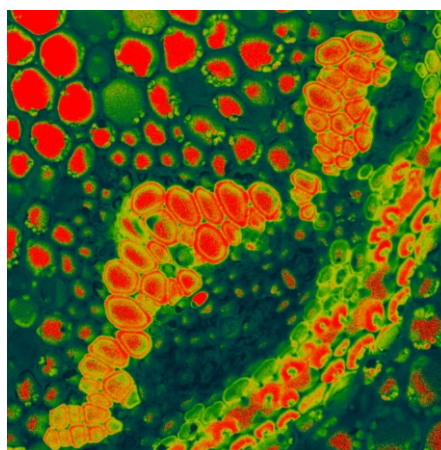


Abb. 6: τ -Bild in Falschfarben. Farbtabelle mit spektralen Farben, blau 0,2 ns bis rot 3 ns.

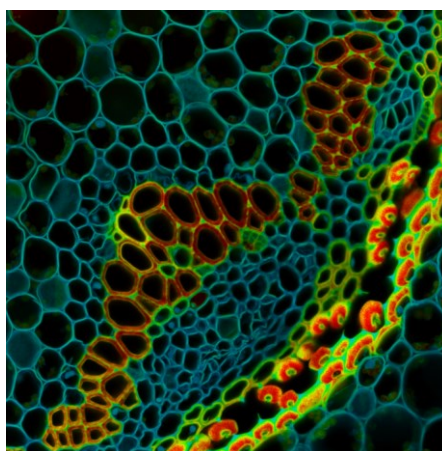


Abb. 7: Komposit-Bild aus Helligkeit und Lebenszeit. Die Lebenszeiten sind über die Farbe wie in Abbildung 6 kodiert, die Helligkeit über die Farbsättigung.

Mehr Kanäle in der Fluoreszenzmikroskopie

In Abbildung 4 haben wir die Emission in zwei verschiedenen spektralen Bändern aufgezeichnet. Die kürzerwellige Emission haben wir in grün, die längerwellige in rot dargestellt. Nun können wir jeden dieser Kanäle weiter aufspalten, indem wir unterschiedlichen Fluoreszenz-Lebensdauern nachspüren. Damit erhalten wir eine andere Kontrastmethode.

Zunächst soll der grüne Kanal untersucht werden. Da die Farben später für einen anderen Zweck verwendet werden, gehen wir von einem Graubild der Intensität aus. Das ist in Abbildung 8 ganz links zu sehen.

Wenn wir nun Daten mit Fluoreszenz-Lebenszeiten aufzeichnen, lässt sich diese Emission durch Fitverfahren in drei unterschiedliche Lebenszeit-Bilder aufspalten, ein alternatives Verfahren zur mittleren Ankunftszeit. Das ist in Abbildung 8 in der Mitte zu sehen. Die drei „Unterkanäle“ sind zunächst auch wieder Graubilder, die man willkürlich einfärben kann, etwa in die Farben blau, grün und rot. Das ist in der unteren Zeile in der Mitte von Abbildung 8 dargestellt. Durch Überlagern der drei farbigen Bilder erhalten wir das Bild auf der rechten Seite. Die Farben kodieren hier aber nicht Bänder des sichtbaren Spektrums, sondern unterschiedliche Lebensdauern.

In gleicher Weise können wir mit dem roten Kanal aus Abbildung 4 verfahren (Abbildung 9).

Während ein reiner Intensitätskontrast ein recht homogenes Bild ergibt, erhält man durch den Lebenszeit-Kontrast zusätzliche Information, wie in Abbildung 1 schon angedeutet. Das dort gezeigte Beispiel stammt aus der Separation des zweiten Farbkanals. Statt nur zwei Fluoreszenzkanäle der Intensitäten können wir hier 6 verschiedene Kanäle extrahieren (Abbildung 10).

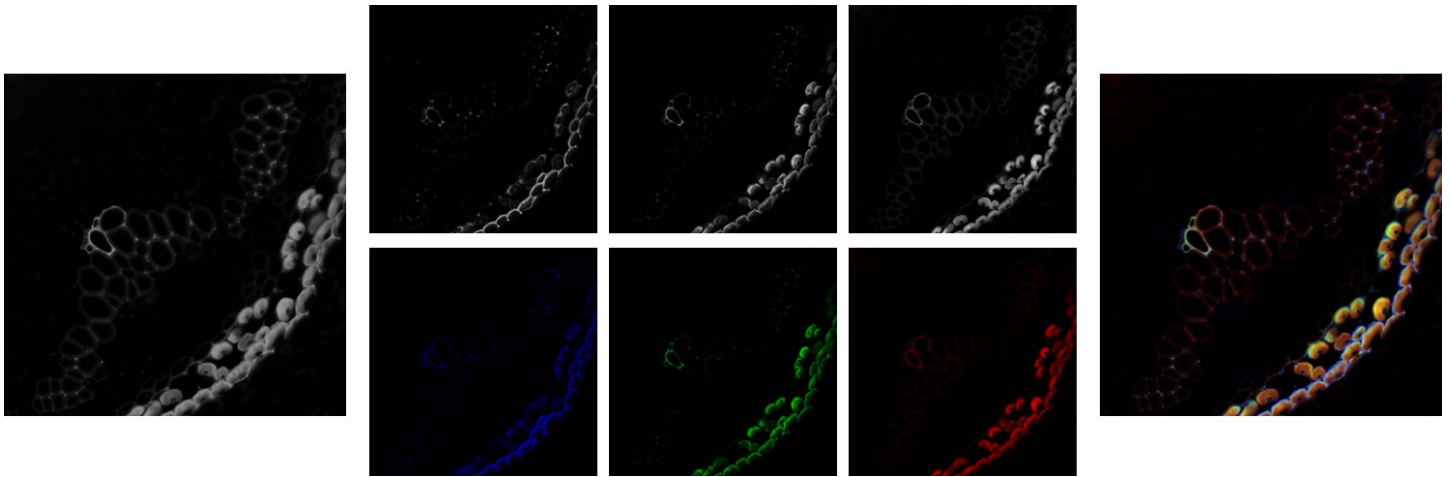


Abb. 8: erster Farbkanal wird in mehrere Lebenszeit-Kanäle aufgetrennt. Details im Text. Man beachte, dass trotz des extrem schmalen spektralen Bandes von 10nm doch deutlich verschiedene Verteilungen der Lebenszeit-Komponenten nachgewiesen werden können (0,3ns, 1,0ns und 2,9ns).

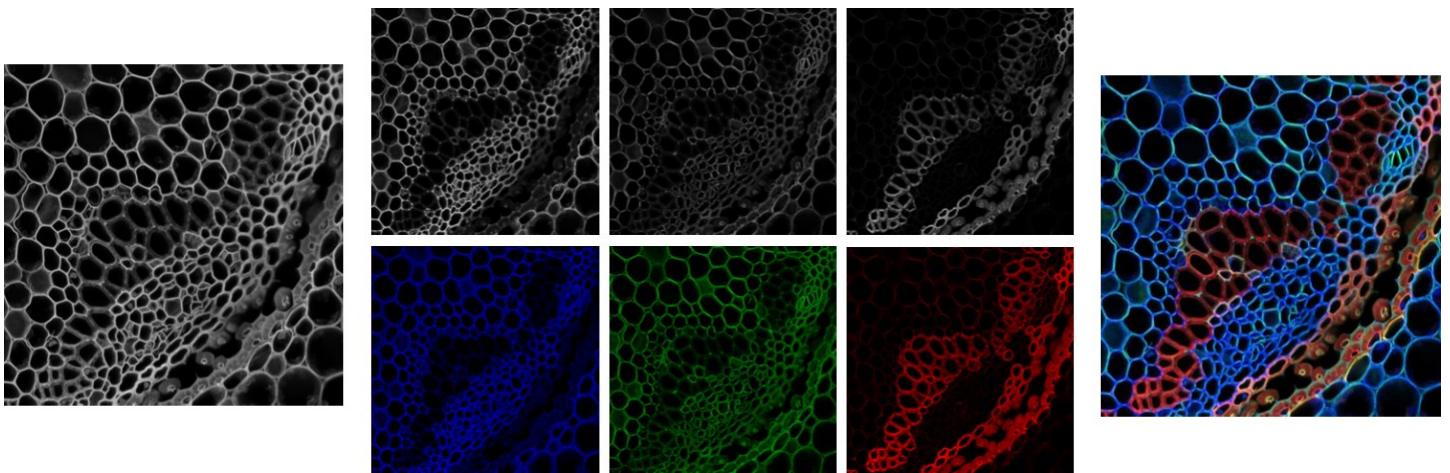


Abb. 9: zweiter Farbkanal wird in mehrere Lebenszeit-Kanäle aufgetrennt. Details im Text (0,2ns, 0,7ns und 2,0ns).

Die Interpretation dieser Befunde ist nun freilich für dieses spezielle Präparat zunächst spekulativ. Die Einlagerung der Farbstoffe in unterschiedliche Gewebekomponenten kann sehr wohl zu unterschiedlichen Lebensdauern führen. Was genau hier passiert bleibt der Neugier des Experimentators anheimgestellt. In der Praxis wird man freilich die Experimente so „designen“, dass die unterschiedlichen Farb- und τ -Kanäle die gewünschten Informationen liefern. Das können Signale von Autofluoreszenzen sein, auch von wichtigen fluoreszierenden Metaboliten in lebenden Zellen, etwa aus dem NAD/H System [5]. Oder die Signale molekulargenetisch eingeführter Biosensoren für die unterschiedlichsten zellulären Komponenten [6]. Für strukturelle Untersuchungen könnte man beispielsweise in das sichtbare

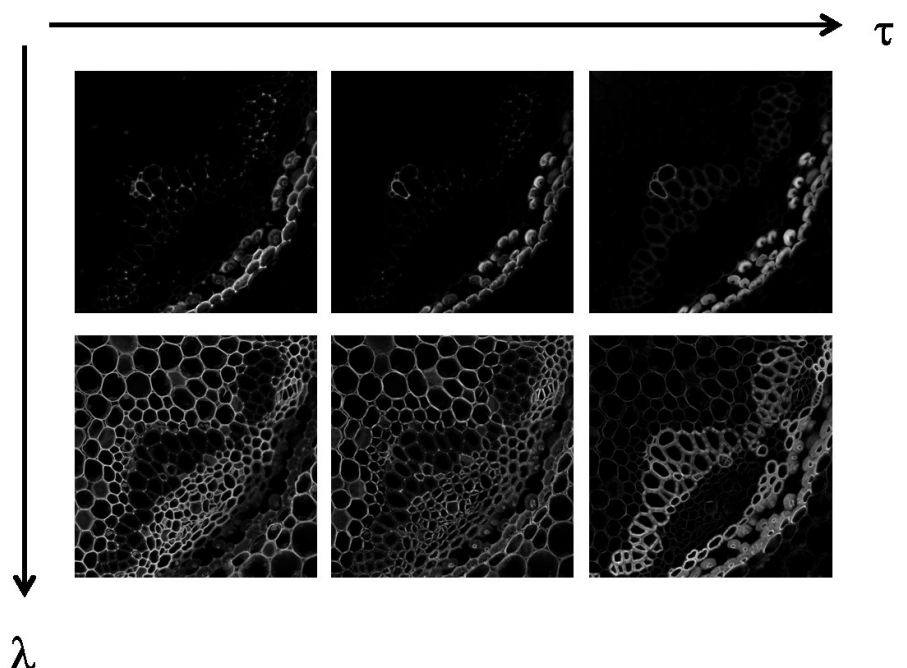


Abb. 10: 6 unterschiedliche Fluoreszenzkanäle in zwei Farben (oben grün, unten rot) zu jeweils 3 Lebenszeiten.

Spektrum nicht nur ca. 5 spektral separierbare Farbstoffe unterbringen, sondern in jedem Band nochmals 2-3 Farbstoffe mit gleicher Emissionsfarbe aber anderer Lebenszeit, also 10...15 Kanäle, usf.

Was ist heute anders?

Das bei Anwendern favorisierte TCSPC-Verfahren war bis dato vor allem durch die eingesetzten Detektoren in der Aufnahmegeschwindigkeit begrenzt.

Hybrid-Detektoren (HyDs) und eine clevere Auswertungssoftware gestatten nun, mindestens 10-fach schneller Daten aufzuzeichnen. Manche Anwender berichten 30-100-fach höhere Geschwindigkeit [7]. Das ist natürlich insbesondere in der sehr aktuellen Mikroskopie an lebenden Systemen besonders relevant.

Fluoreszenz-Lebenszeit Bilder waren seither ein schwieriges und langwieriges Unterfangen. Wie schon eingangs erwähnt, war die Methode nicht jedermann zugänglich und eine gewisse Affinität für Technik war zwingende Voraussetzung. Leica hat mit dem konfokalen **SP8 FALCON** kürzlich ein Gerät vorgestellt, das nicht schwieriger zu bedienen ist, als ein gewöhnliches konfokales Mikroskop. Um FLIM-Bilder aufzunehmen, muss man nicht viel mehr tun, als einen weiteren Detektionskanal einzurichten. Und auch die Datenauswertung ist automatisiert und einfach anzuwenden. Das trifft insbesondere auf komplexe Datenvolumen zu, etwa dreidimensionale Bildstapel, Zeitserien, Mosaikbilder oder spektrale Aufnahmereihen. FLIM Daten werden hier genauso erzeugt wie für einzelne Bilder. Es gibt keine Kompatibilitätsprobleme, keine aufwändigen Datentransfers von Hand und keine komplexen Zuordnungsvorschriften.

Fluoreszenz-Lebenszeit als bildgebendes Verfahren erlaubt, den herkömmlichen Intensitätskontrast in einem weiteren Kontrastverfahren nochmals weiter aufzufächern. Damit lassen sich zusätzliche Informationen aus einem Experiment gewinnen. FLIM hat daher sicher eine vielversprechende Zukunft in Forschung und Routine in der Biologie und Medizin.

Literatur

[1] Borlinghaus RT: *„Konfokale Mikroskopie in Weiß – optische Schnitte in allen Farben“* Springer Verlag Berlin-Heidelberg (2016) ISBN 978-3-662-49358-8; DOI 10.1007/978-3-662-49359-5

[2] Becker W & Bergmann A: *„Lifetime Imaging Techniques for Optical Microscopy“* Becker & Hickl (2003)

[3] Becker W: *“Fluorescence lifetime imaging – techniques and applications”*. *J. Microscopy* 247/2, pp 119-136 (2012)

[4] Gerritsen HC et al: *“Fluorescence Lifetime Imaging in Scanning Microscopy”* in *“Handbook of confocal Microscopy”* Pawley J, Ed. Springer New York (2006)

[5] Georgakoudi I et al: *NAD(P)H and Collagen as in Vivo Quantitative Fluorescent Biomarkers of Epithelial Pre-cancerous Changes*. *Cancer Research* 62, 682– 687 (2002)

[6] Ponsioen B et al: *Detecting cAMP-induced Epac activation by fluorescence resonance energy transfer: Epac as a novel cAMP indicator*. *EMBO reports* 5/12 pp 1176-1180 (2004)

[7] Jalink K et al: *“Precise and lightning-fast spectral confocal FLIM for screening and kinetic analysis”*. *Webinar BitsizeBio*, June 26th 2018.