

Auf dem Weg von Mikro zu Nano: Optische 3D-Bildgebung in der Herzforschung

Dr. Josef Madl und Dr. Eva Rog-Zielinska

Fluoreszenzmikroskopie ist ein bedeutendes Werkzeug in der modernen Herzforschung [1]. Am Institut für Experimentelle Kardiovaskuläre Medizin (IEKM) wurden kürzlich zwei der modernsten gegenwärtig verfügbaren Fluoreszenzmikroskope installiert, welche einen detaillierten Einblick in Struktur und Funktion des Herzens erlauben.

Die Methode

Fluoreszenzmikroskopie wird genutzt, um in biologischen Geweben Moleküle sichtbar zu machen, welche den Aufbau und die Funktion von Organen darstellen können. Dafür werden die gewünschten Moleküle mit speziellen Farbstoffen markiert. Mit hochsensitiven Mikroskopen werden die Farbstoffe angeregt und das daraufhin abgegebene Fluoreszenzlicht detektiert. Dadurch kann die Verteilung der Moleküle visualisiert werden. Bei entsprechender Auswahl verschiedener Fluoreszenzfarben ist es möglich, mehrere Moleküle gleichzeitig zu vermessen. Fluoreszenzmikroskopie liefert strukturelle Daten, kann aber auch funktionelle Informationen bereitstellen. So können mit Hilfe von spannungssensitiven Farbstoffen oder Kalziumindikatoren Aktionspotentiale und Kalziumwellen minimal invasiv verfolgt werden [2].

Biologische Gewebe sind relativ dick, verglichen mit den Größenabmessungen von einzelnen Zellen [1]. Um dennoch zelluläre Strukturen im Inneren von Gewebepreparaten ansehen zu können, kann es notwendig sein, die Probe zu schneiden. Dies könnte aber gerade jene Strukturen verändern oder sogar zerstören, an denen man interessiert ist. Mit geeigneten Mikroskopen ist es heutzutage möglich, die Probe rein optisch zu „schneiden“. So wird zum Beispiel bei einem konfokalen Mikroskop ein Laserstrahl auf einen möglichst kleinen Punkt in der Probe fokussiert und es wird dann nur das dort abgegebene Licht detektiert. Dieser Punkt wird in einer Ebene durch

die Probe gerastert (Laser scanning confocal microscope, Abb. 1), wodurch hoch aufgelöste Bildschnitte aus dem Inneren von Präparaten aufgenommen werden können – ohne sie mechanisch zu zerstören. Eine andere optische „Schnitt-

Parameter, der am ehesten der Tondauer entspricht, ist die Fluoreszenzlebensdauer. Konventionelle Konfokalmikroskope messen meist nur die Farbe und die Helligkeit. Die Farbe zeigt an, welche Moleküle wo lokalisiert sind, während

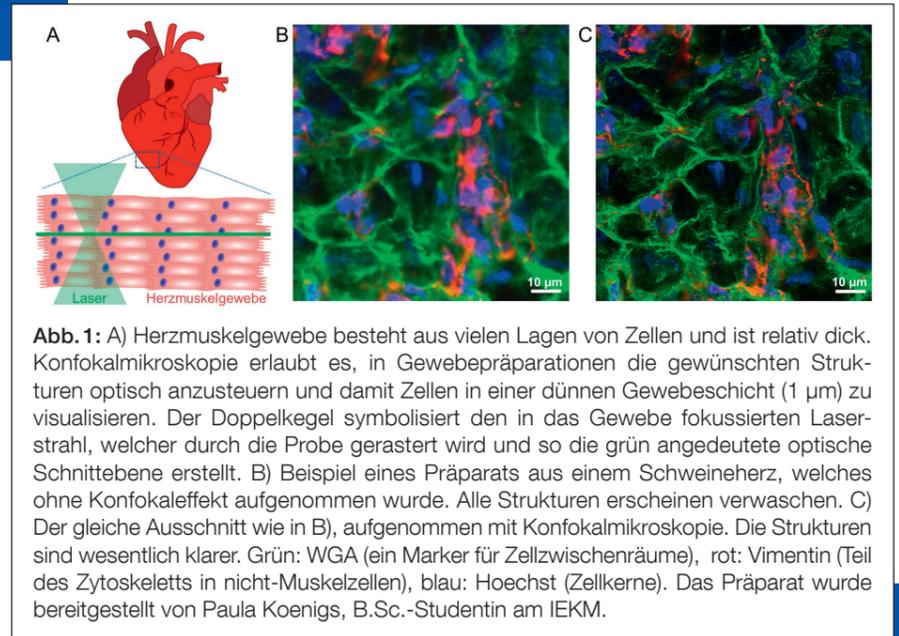


Abb. 1: A) Herzmuskelgewebe besteht aus vielen Lagen von Zellen und ist relativ dick. Konfokalmikroskopie erlaubt es, in Gewebepreparationen die gewünschten Strukturen optisch anzusteuern und damit Zellen in einer dünnen Gewebeschicht (1 µm) zu visualisieren. Der Doppelkegel symbolisiert den in das Gewebe fokussierten Laserstrahl, welcher durch die Probe gerastert wird und so die grün angedeutete optische Schnittebene erstellt. B) Beispiel eines Präparats aus einem Schweineherz, welches ohne Konfokaleffekt aufgenommen wurde. Alle Strukturen erscheinen verwaschen. C) Der gleiche Ausschnitt wie in B), aufgenommen mit Konfokalmikroskopie. Die Strukturen sind wesentlich klarer. Grün: WGA (ein Marker für Zellzwischenräume), rot: Vimentin (Teil des Zytoskeletts in nicht-Muskelzellen), blau: Hoechst (Zellkerne). Das Präparat wurde bereitgestellt von Paula Koenigs, B.Sc.-Studentin am IEKM.

technik“ wird bei der Multiphotonen-Mikroskopie verwendet, welche nicht-lineare Effekte nutzt, um eine optische Schnittebene zu erzeugen. Am IEKM werden seit dem 1. September 2018 ein Konfokal- und ein Multiphotonenmikroskop von Leica betrieben.

Ein Mehr an Informationen sehen

Ein kurzer Exkurs: Wenn auf einem Klavier eine Partitur gespielt wird, kann ein geübter Zuhörer theoretisch fast alle Informationen auf dem Notenblatt erhören, ohne dieses zu lesen. Der gehörte Ton entspricht der Note, die Lautstärke der Festigkeit des Tastenanschlags und die Tondauer dem Notenwert. In der Fluoreszenzmikroskopie korrespondieren in Analogie dazu die Farbe mit dem Ton und die Helligkeit mit der Lautstärke. Der

die Helligkeit Auskunft darüber gibt, wie viele Moleküle sich dort befinden. Eine Besonderheit der neuen IEKM-Mikroskope ist, dass diese auch die Fluoreszenzlebensdauer messen können.

Wie kann diese Information in der Herzforschung genutzt werden? Die Lebensdauer eines Farbstoffes wird durch seine unmittelbare Umgebung beeinflusst. Damit ist es zum Beispiel möglich, zwei Zellpopulationen zu unterscheiden, etwa gesunde und kranke Zellen, selbst wenn sie mit demselben Farbstoff angefärbt sind. Auch wenn Farbe und Intensität sich nicht wesentlich unterscheiden, kann die Fluoreszenzlebensdauer signifikante Unterschiede aufweisen, die sonst übersehen würden (Abb. 2). Warum wird diese Methode also nicht öfter genutzt? Die typische Fluoreszenzlebensdauer liegt im Bereich von Nanosekunden. Zur Veranschaulichung: Eine Sekunde verhält sich zu einer Nanosekunde wie

ein ganzes Menschenleben (80 Jahre) zu der Zeit, die es braucht, „Fluoreszenzlebensdauerbild“ zu sagen (2,5 Sekunden). Es ist schwierig, derart winzige Zeitspannen präzise zu messen. Der Umgang mit Systemen, welche dies

verwendeten Wellenlänge (ca. 180 nm für grünes Licht) auflösen zu können. Mittlerweile gibt es verschiedene, zum Teil hochkomplexe Superresolution-Methoden (Nobelpreis 2014), mit denen man die optische Auflösung signifikant

somit optimal aufgestellt, um in den nächsten Jahren bahnbrechende Beiträge zur kardiovaskulären Forschung zu liefern.

Die Anschaffung dieser Mikroskope wurde über einen gemeinsamen Großgeräteantrag von Mitarbeitern des IEKM und der Kardiologie und Angiologie I sowie der Experimentellen und Klinischen Pharmakologie und Toxikologie realisiert. Die Kosten von über 1,4 Millionen € wurden gemeinsam von der Deutschen Forschungsgemeinschaft (DFG) und dem Ministerium für Wissenschaft, Forschung und Kunst des Landes Baden-Württemberg getragen. Die Plattform wird von Dr. Josef Madl in enger Zusammenarbeit mit Dr. Eva Rog-Zielinska, Emmy-Noether-Nachwuchsgruppenleiterin (4D-Imaging, IEKM), betreut.

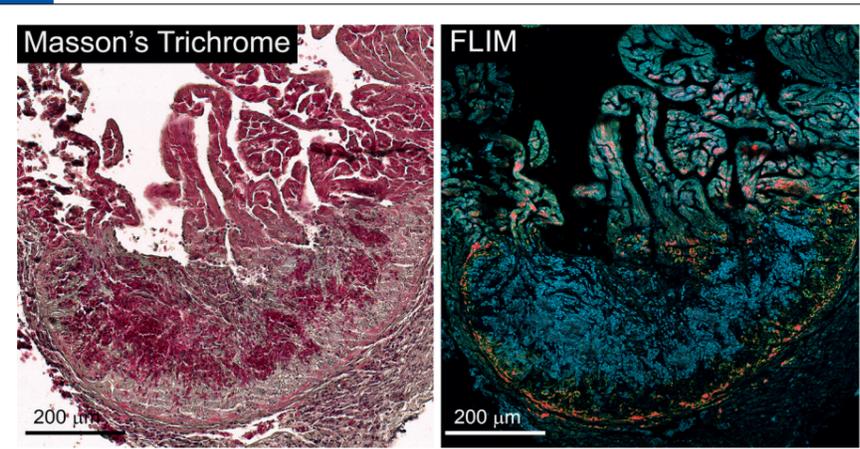


Abb. 2: Gewebepreparat aus einem Fischherz, welches sich nach einer Verletzung regeneriert hat. Links ist eine histologische Färbung zu sehen. Die Farbstoffe färben verschiedene Zellen mit leicht unterschiedlicher Intensität an, aber die Gewebefärbung an sich ist relativ homogen und es gibt nur geringe Farbunterschiede, die Auskunft über verschiedene Zellen geben könnten. Im Fluoreszenzlebensdauerbild vom selben Präparat (rechts) sind erhebliche Unterschiede zwischen dem unverletzten und dem regenerierten Gewebe zu erkennen. Diese Technik erhöht, ohne zusätzlichen experimentellen Aufwand, den Gewinn an Informationen. Dieses Präparat wurde von Dr. J. Esser und Prof. Dr. M. Moser (Kardiologie und Angiologie I) bereitgestellt, die Mikroskopie wurde von Dr. E. Rog-Zielinska (IEKM) durchgeführt.

leisten können, war bislang vorwiegend hochspezialisierten Mikroskopie-Experten vorbehalten. Leica hat das Fluoreszenzlebensdauermodul vollständig in die eigene Systemumgebung integriert. Dies erlaubt es auch Forschern, deren Hauptexpertise nicht in der Mikroskopie liegt, diese Technik effektiv zu nutzen.

Mikro bis Nano: Am Auflösungslimit

Die räumliche Auflösung eines Mikroskops ist durch die Beugung von Lichtwellen begrenzt. So sollte es laut Ernst Abbe (1840–1905) auch bei Nutzung der besten Optik eigentlich nicht möglich sein, mit Licht Strukturen einer Größe unterhalb von etwa einem Drittel der

verbessern kann. Ein einfach zu nutzendes, auf Dekonvolution basiertes Superresolution-Modul ist direkt in die IEKM-Systeme integriert und ermöglicht es, die Auflösung bis 120 nm zu treiben. Um auch hier eine Größenvorstellung zu geben: 120 Nanometer sind jene Länge, um welche ein Fingernagel in zwei Minuten wächst.

Bestens aufgestellt für die Zukunft

Die neuen Systeme am IEKM gehören aktuell zu den modernsten kommerziellen Fluoreszenzmikroskopen weltweit. Laut Leica ist diese Kombination an High-End-Bildgebungssystemen in Europa einmalig. Die Mikroskopieplattform am IEKM ist

Am IEKM wurden zwei hochmoderne Fluoreszenzmikroskope in Betrieb genommen, welche zukünftig die Herzforschung in Freiburg unterstützen werden. Diese Systeme bieten neben etablierten Methoden der 3D-Bildgebung auch international einzigartige Möglichkeiten zur Probenvermessung.

Literatur

1. Johnston CM et al., Optogenetic targeting of cardiac myocytes and non-myocytes: Tools, challenges and utility. *PBMP* 2017, 130, 140–149.
2. Wang K et al., Cardiac tissue slices: preparation, handling, and successful optical mapping. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2015, 308, H1112–H1125.

Kontaktadressen

Dr. Josef Madl
 Universitäts-Herzzentrum
 Freiburg • Bad Krozingen
 Institut für Experimentelle Kardiovaskuläre Medizin
 Elsässer Straße 2q • 79110 Freiburg
 Tel.: 0761-270-63953
 Fax: 0761-270-63959
 E-Mail: josef.madl@universitaets-herzzentrum.de

Dr. Eva Rog-Zielinska
 Universitäts-Herzzentrum
 Freiburg • Bad Krozingen
 Institut für Experimentelle Kardiovaskuläre Medizin
 Elsässer Straße 2q • 79110 Freiburg
 Tel.: 0761-270-63954
 Fax: 0761-270-63959
 E-Mail: eva.rog-zielinska@uniklinik-freiburg.de