

7. Fluoreszenzmethoden

7.1 Grundlagen

7.2 Fluoreszenz-Mikroskopie (FLIM, FRAP, PALM, STED, STORM, etc.)

7.3 Fluoreszenz-Diagnose

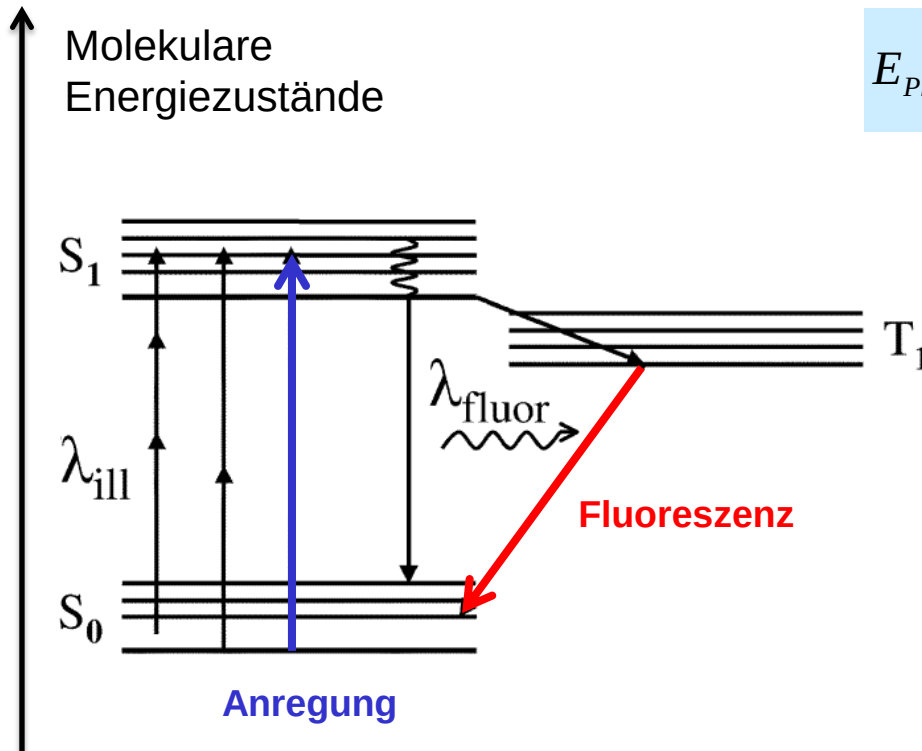
7. Fluoreszenzmethoden

7.1 Grundlagen

7.2 Fluoreszenz-Mikroskopie (FLIM, FRAP, PALM, STED, STORM, etc.)

7.3 Fluoreszenz-Diagnose

Jablonski-Diagramm

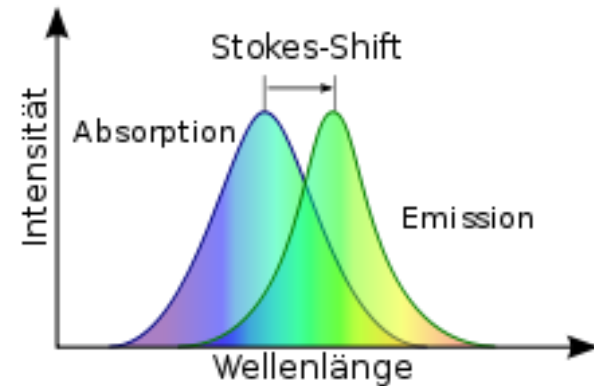


Photonen-Energie

$$E_{ph} = \hbar \omega = \frac{2\pi \cdot \hbar \cdot c}{\lambda} \quad (7.1)$$

$$\hbar = 1.05 \cdot 10^{-34} \text{ J} \cdot \text{s}$$

Plancksches Wirkungsquantum



J. Bille W. Schlegel (Hrsg.)

Medizinische Physik 3

Medizinische Laserphysik

Fluoreszenz:

Spontane Lichtemission nach vorhergehender Anregung (meist mit kurzwelligerem Licht)

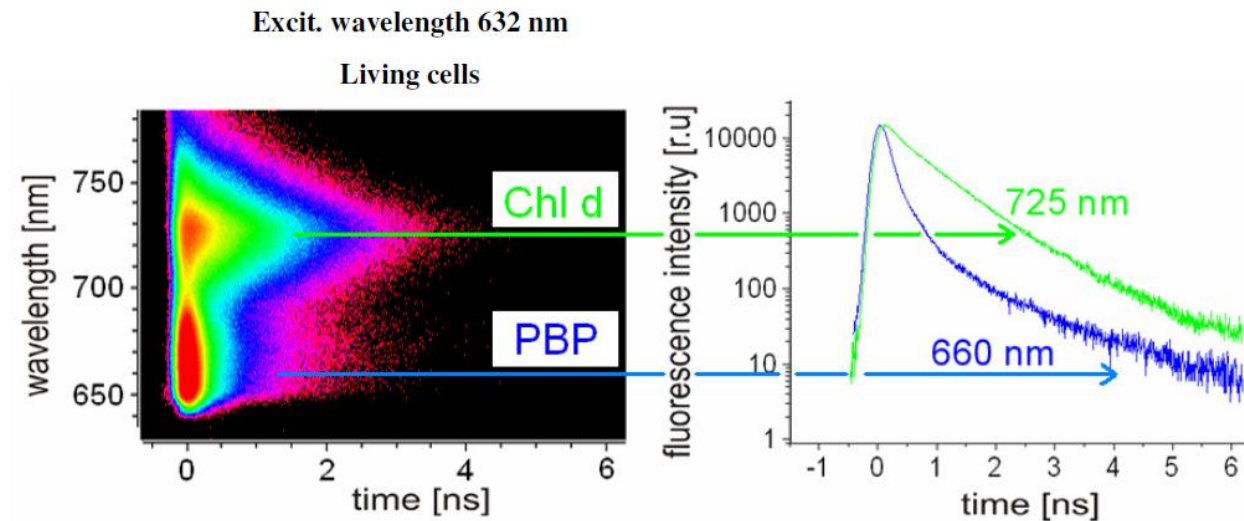
Zeitverhalten: Emission im ps bis ns-Bereich nach Anregung
Zeitverhalten gibt Aufschluss über Molekülzustand / Dynamik
(→ siehe FLIM – Fluorescence Lifetime Imaging)

$$I_{FL}(t) = I_0 \cdot e^{-t/\tau}$$

τ = Molekülspezifische Lebensdauer

(7.2)

Beispiel: Zeit und Spektral aufgelöste Analyse von Photosynthese-Prozessen



http://sol.physik.tu-berlin.de/~marent/files/FJ-Schmitt_Multidimespek.pdf

Spektrales Verhalten: Spektrum gibt Aufschluss über Molekulare Zusammensetzung
(→ Fluoreszenzspektroskopie)

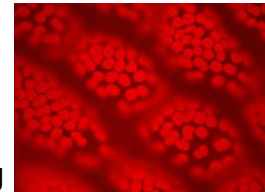
Autofluoreszenz

Einige Objekte fluoreszieren bei der Anregung (mit meist kurzwelligem Licht) von sich aus, ohne dass weitere Präparationschritte notwendig sind.

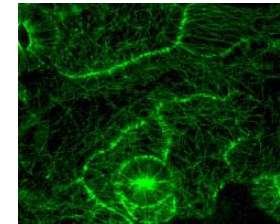
Beispiele:

Chlorophyll (Anregung im grünen → Fluoreszenz im Roten)

Moos Chloroplasten - grün Anregung



Proteine: z.B. GFP (green fluorescent protein)



Fundusautofluoreszenz (FAF)

→ Retina - Diagnose

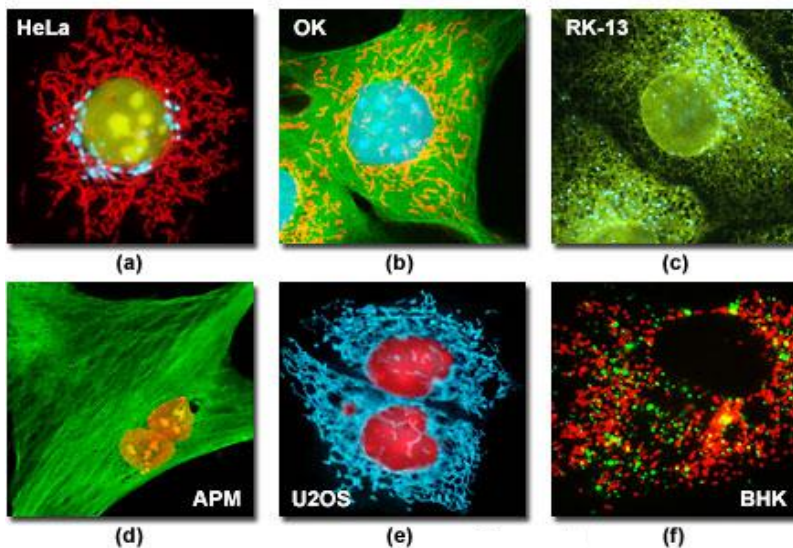
Das retinale Pigmentepithel (RPE) ist wichtig für die Versorgung der lichtempfindlichen Zellen der Retina. In den Zellen des RPE sammeln sich im Laufe des Lebens Restprodukte (**Lipofuszin**). Darüber hinaus entsteht Lipofuszin, wenn krankhafte Prozesse zu degenerativen Veränderungen der Netzhaut führen. Lipofuszin ist Fluoreszierend → Diagnosemöglichkeit



Farbstoffe mit spezifischen
Fluoreszenzeigenschaften

➔ Anlagerung in spezifischen Bereichen
(Zellbereichen) oder Stoffen

➔ Bildgebung dieser Bereiche
➔ oder Nachweis der Stoffe



Probe	Ex (nm)	Em (nm)	Notes
Reactive and conjugated probes			
Hydroxycoumarin	325	386	Succinimidyl ester
Aminocoumarin	350	445	Succinimidyl ester
Methoxycoumarin	360	410	Succinimidyl ester
Cascade Blue	(375);401	423	Hydrazide
Pacific Blue	403	455	Maleimide
Pacific Orange	403	551	
Lucifer yellow	425	528	
NBD	466	539	NBD-X
R-Phycoerythrin (PE)	480;565	578	
PE-Cy5 conjugates	480;565;650	670	aka Cychrome, R670, Tri-Color, Quantum Red
PE-Cy7 conjugates	480;565;743	767	
Red 613	480;565	613	PE-Texas Red
PerCP	490	675	Peridinin chlorophyll protein
TruRed	490,675	695	PerCP-Cy5.5 conjugate
FluorX	494	520	(GE Healthcare)
Fluorescein	495	519	FITC; pH sensitive
BODIPY-FL	503	512	
TRITC	547	572	TRITC
X-Rhodamine	570	576	XRITC
Lissamine Rhodamine B	570	590	
Texas Red	589	615	Sulfonyl chloride
Allophycocyanin (APC)	650	660	
APC-Cy7 conjugates	650;755	767	PharRed

<http://flowcyt.salk.edu/fluo.html>

Fluoreszenzmarker

= Fluoreszierende Stoffe die sich in bestimmten Gebieten anlagern

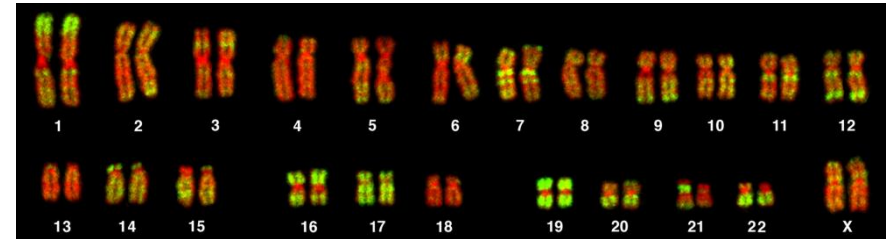
Anwendungen:

DNA-Sequenzen:

Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH)

Kopplung von DNA-Sequenzen an

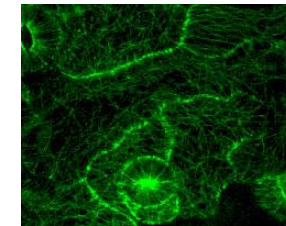
Fluoreszenz-Stoffe



(Quelle: Dr. Imma Rost, München)

Proteine: z.B. GFP (green fluorescent protein), YFP, RFP

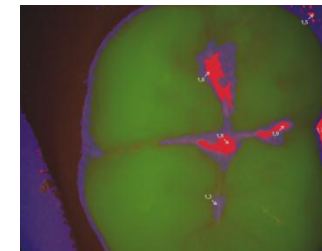
→ Anlagerung in bestimmten Zellbestandteilen



Porphyrine (Bestandteile bzw. Vorläuferstufen des Häm und Chlorophyll)

→ Stoffwechselvorgänge

(Tumorerkennung, Karies-Erkennung, etc.)



<http://www.chance-praxis.de>

7. Fluoreszenzmethoden

7.1 Grundlagen

7.2 Fluoreszenz-Mikroskopie (FLIM, FRAP, PALM, STED, STORM, etc.)

7.3 Fluoreszenz-Diagnose

Fluoreszenz-Mikroskopie

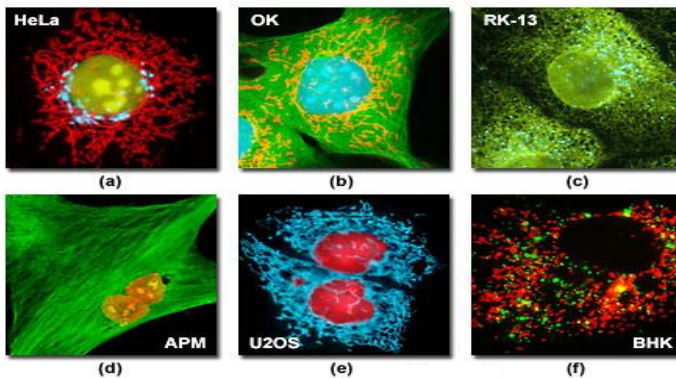
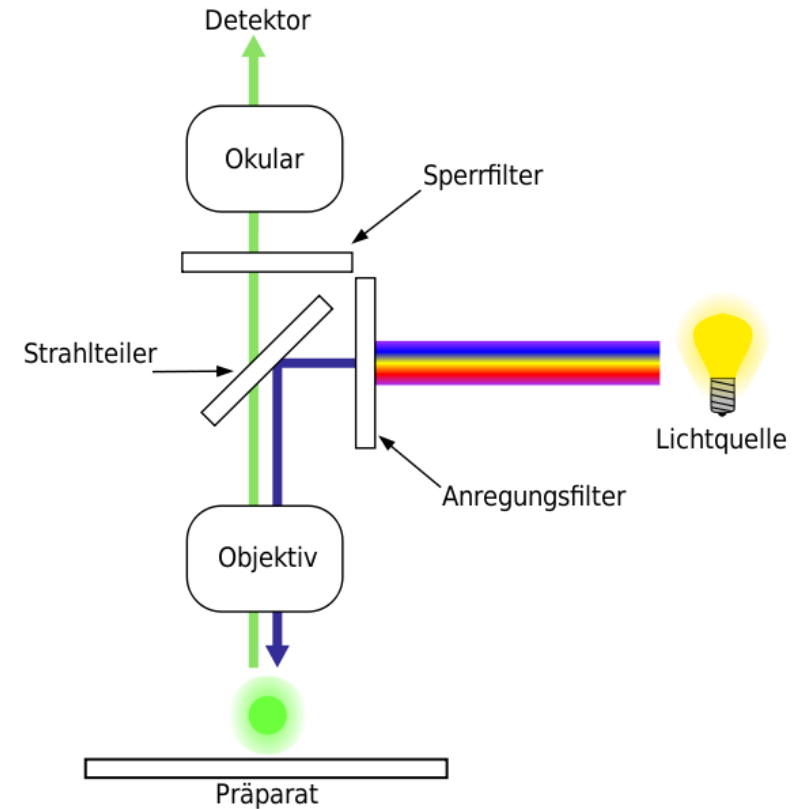
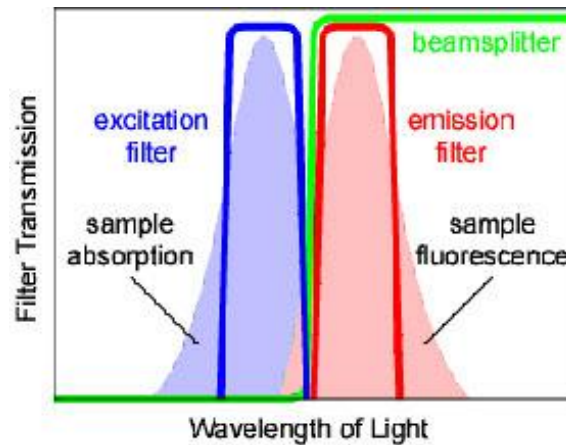


Prinzip:

Objekt wird mit bestimmter Spektralverteilung beleuchtet (meist blau oder UV-Licht).
Fluoreszierende Substanzen emittieren längerwelliges Licht. Dieses wird beobachtet.

Filter:

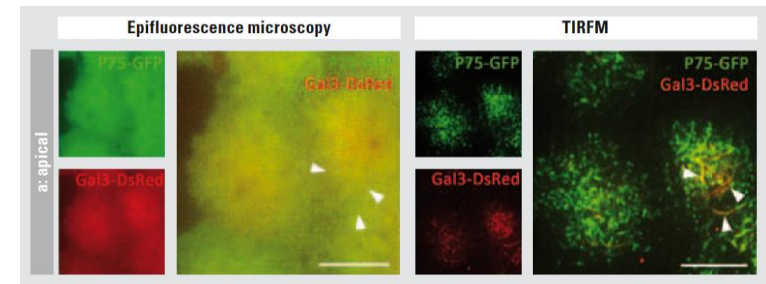
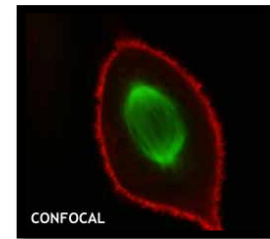
Notwendig zur
Trennung von
-Anregung
-Emission
und zur Einkopplung



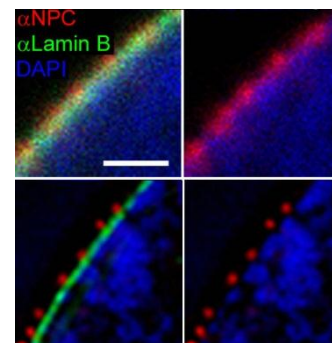
http://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/thumb/1/1d/Fluoreszenzmikroskopie_2008-09-28.svg/585px-Fluoreszenzmikroskopie_2008-09-28.svg.png

Fluoreszenz-Eigenschaften des Objektes lassen sich in **Kombination** mit vielen Mikroskopie-Arten zur Kontrastverbesserung nutzen:

- Konfokale Fluoreszenzmikroskopie
- TIRF – Mikroskopie
- Lichtscheiben Mikroskopie (SPIM)
- Strukturierte Beleuchtung (SIM)
- 4P-Mikroskopie



<http://www.biochem.uni-frankfurt.de>



Wikimedia Commons:
Lothar Schermelleh

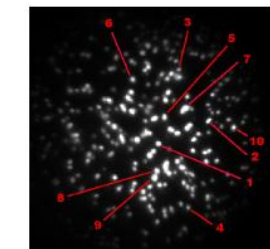
Fluoreszenz-Lifetime-Mikroskopie (FLIM)

➔ Zusätzlicher Informationsgewinn durch Analyse des Zeitverhaltens der Fluoreszenz

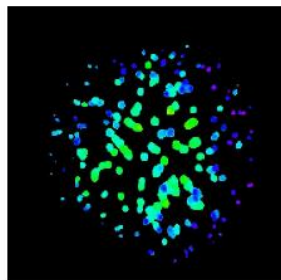
FLIM = Fluoreszenz-Lifetime-Microscope

Notwendig: ps-Laser zur def. Anregung

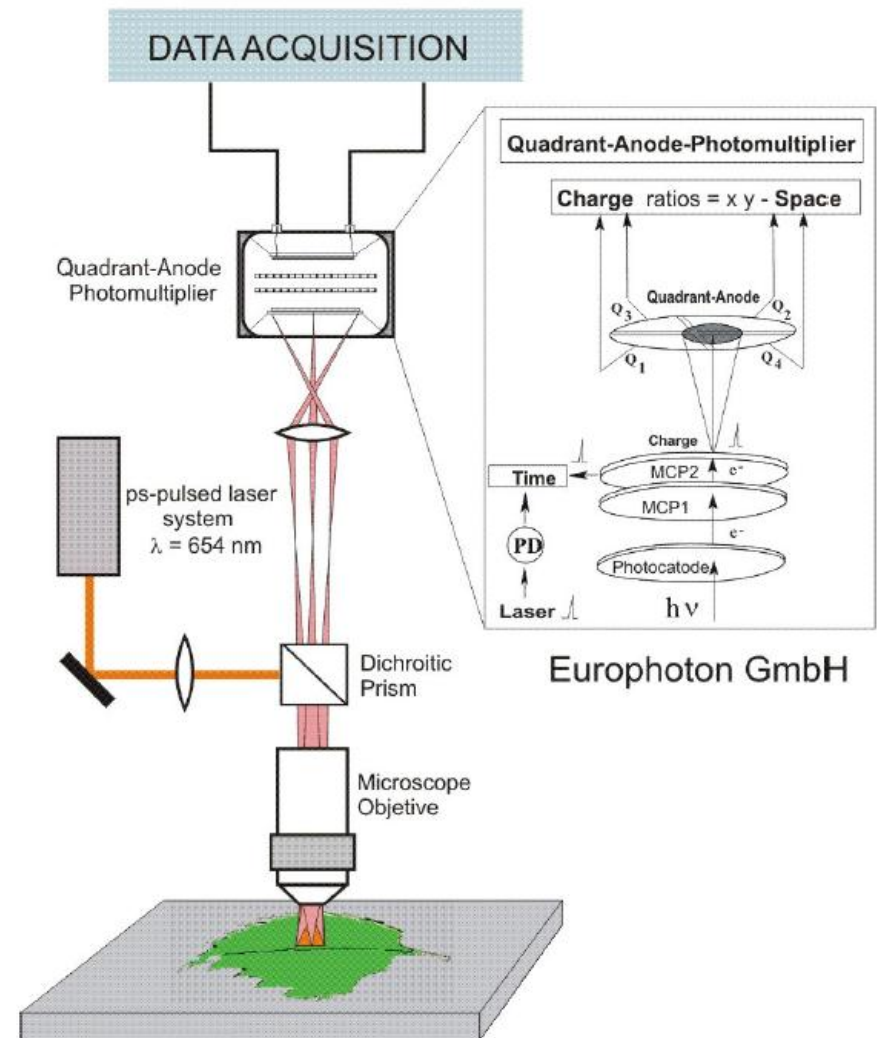
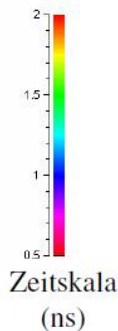
$$I_{FL}(t) = I_0 \cdot e^{-t/\tau}$$



Fluoreszenzintensität



Zeitverhalten der Fluoreszenz



Photobleaching:

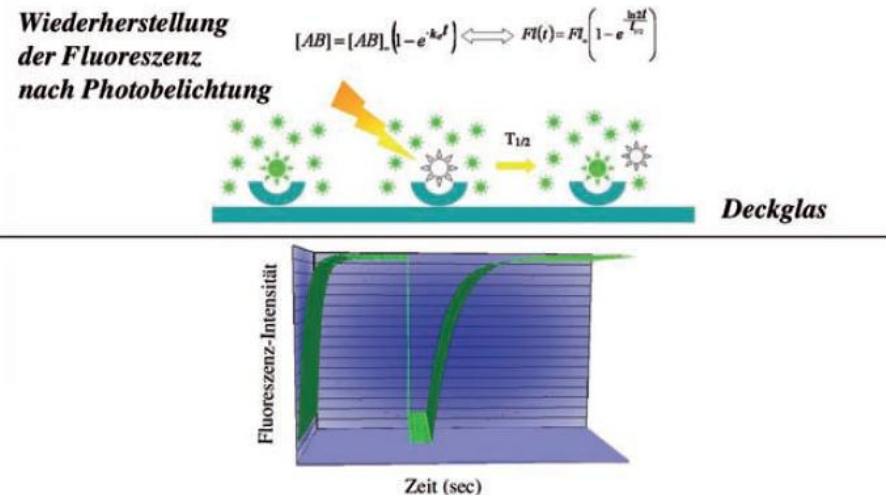
Durch hohe Lichtintensität (z.B. kurzen Lichtpuls) wird die Fluoreszenzeigenschaft zerstört.

Erst durch Neubildung von fluoreszierenden Molekülen wächst das Fluoreszenzsignal wieder an. (Recovery)

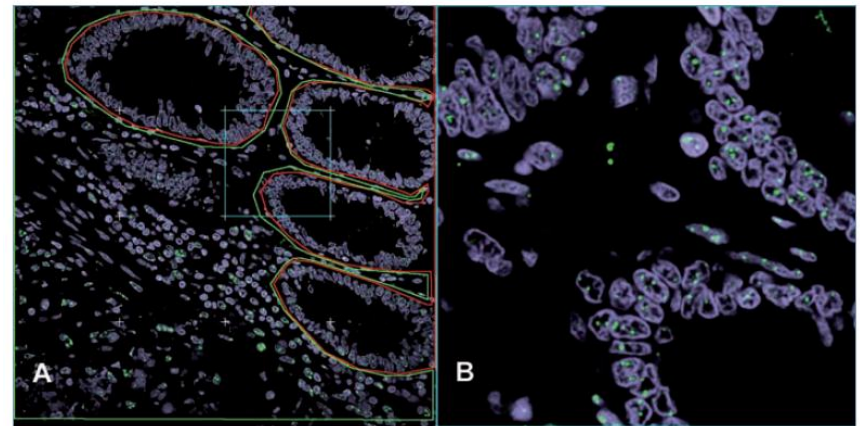
$$I_{FRAP} \propto I_0 \cdot (1 - e^{-t/\tau})$$

FRAP = Fluorescence Recovery after Photobleaching

- ➔ Beobachtung des Wiederaanwachsens des F-Signals
- ➔ Einblicke in Bildungs- oder Diffusions-Reaktionen
- ➔ Diagnosemöglichkeit



BIOspektrum | 03.09 | 15. Jahrgang

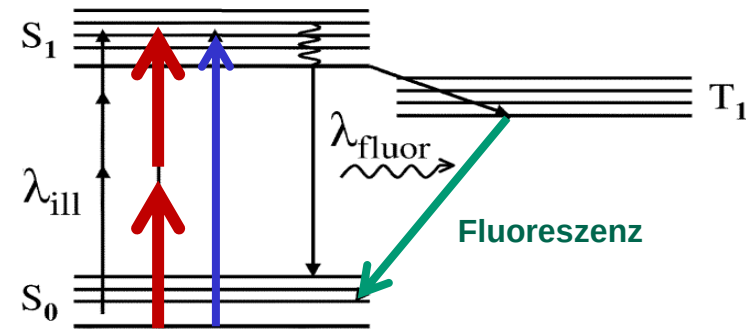


Konventionellen Fluoreszenzanregung:

Ein-Photonen Prozess (linear)

$$I_{FL} \propto I_{Anregung}$$

→ Das Anregungslicht (blau) erzeugt im Präparat (grau) nicht nur im Fokus Fluoreszenz (grün) sondern auch darüber und darunter.



Prinzip der Multiphotonen- Fluoreszenzanregung:

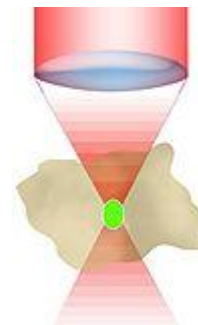
Nutzung des Zweiphotonen-Effekts, d.h. zwei Photonen niedriger Energie (rot) erzeugen bei sehr hoher Photonendichte Fluoreszenz.

$$I_{FL} \propto I_{Anregung}^2$$

→ Nur im Fokuspunkt liegt eine genügend hohen Photonendichte vor, um die Fluoreszenzanregung zu erzeugen, nicht aber darüber und darunter.

→ Auflösungserhöhung in axialer Richtung

Mehr-Photon
(nicht-linear)



Ein-Photon
(linear)



Fluoreszenz zur Auflösungssteigerung (STED)

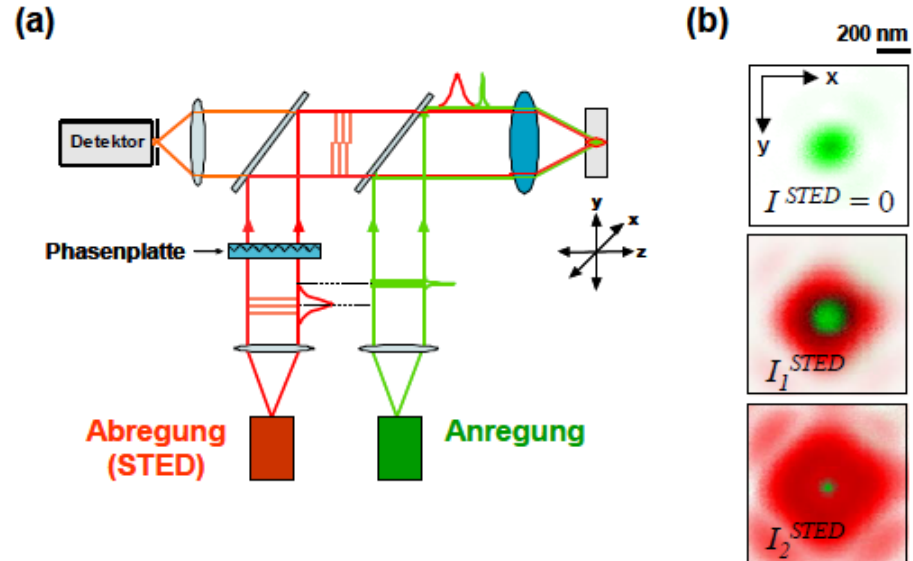


STED = Stimulated Emission Depletion

Gezielte An- und Abregung (Depletion)
fluoreszierender Bereiche

→ Erzeugung eines Fluoreszenzbereiches
der kleiner als die Auflösungsgrenze
ist !

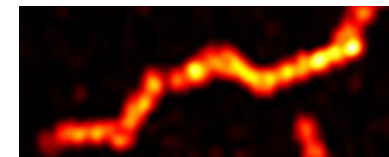
→ Auflösung: bis **10-50nm !!**
($\ll$ Abbe-Limit)



Deutscher Zukunftspreis 2006

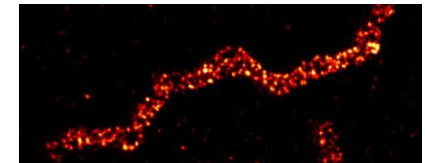


DEUTSCHER ZUKUNFTSPREIS
Preis des Bundespräsidenten
für Technik und Innovation



← normal

STED →



Prof. Dr. rer. nat. Stefan W. Hell
Universität Heidelberg

<http://www.deutscher-zukunftspreis.de/content/team1>

PALM = Photoactivated Localization Microscopy

STORM = Stochastic Optical Reconstruction Microscopy

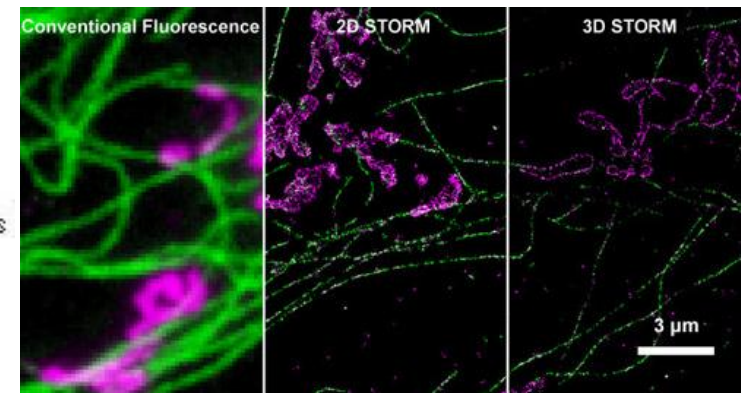
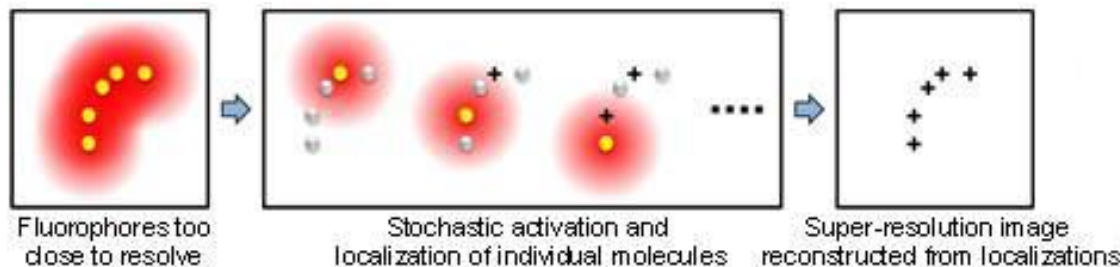
Beide Verfahren beruhen auf gezieltes An- und Abschalten **einzelner** Moleküle.

Im Bild entsteht dann ein verwaschenes Punktbild des Einzelmoleküls

➔ Dieses ist beugungsbegrenzt !

➔ Aber: Der Schwerpunkt des Punktbildes kann besser als die Auflösungsgrenze bestimmt werden

Nacheinander-Anschalten vieler Moleküle liefert dann eine hochaufgelöstes Bild.



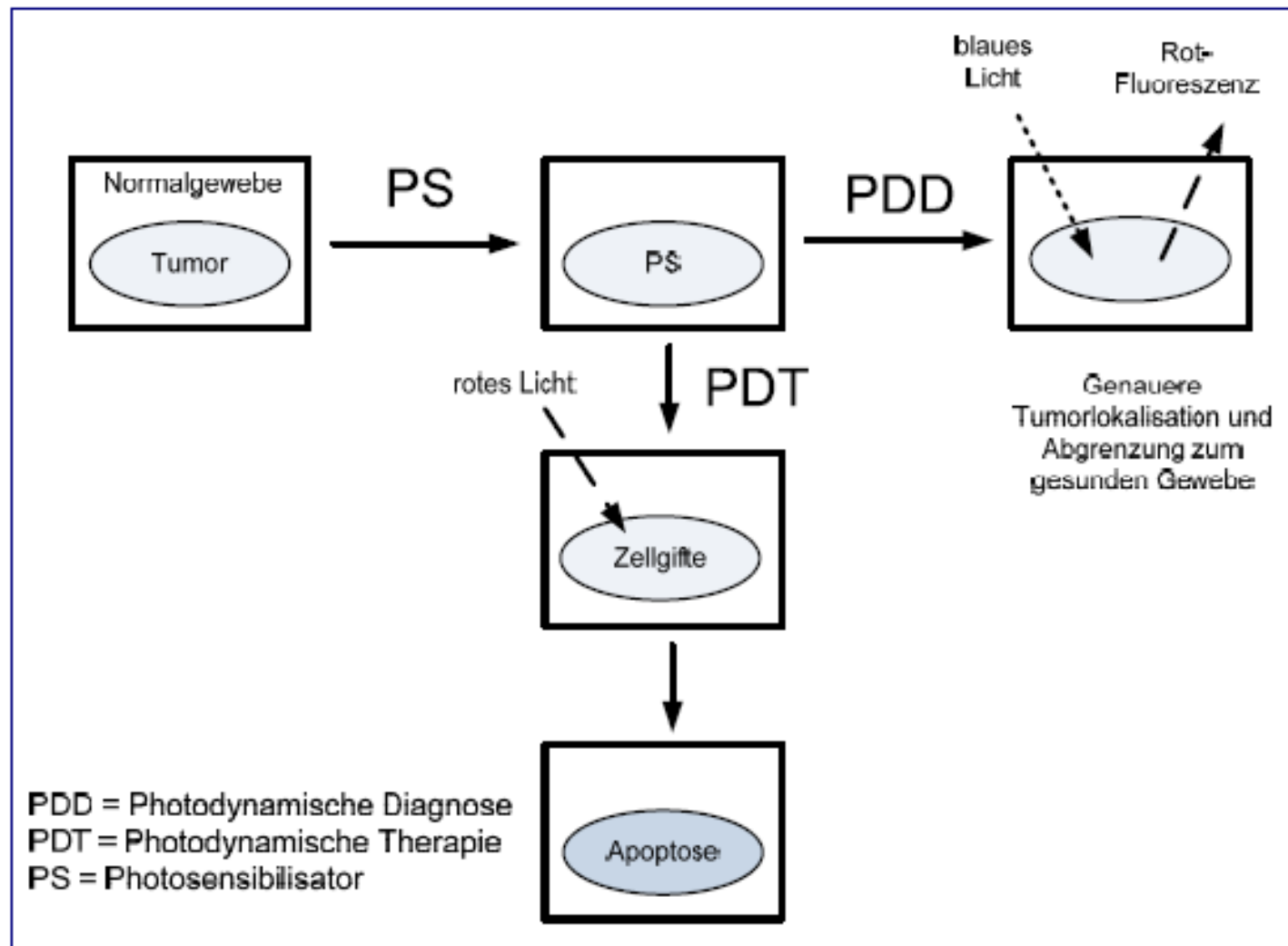
<http://huanglab.ucsf.edu/STORM.jpg>

7. Fluoreszenzmethoden

7.1 Grundlagen

7.2 Fluoreszenz-Mikroskopie (FLIM, FRAP, PALM, STED, STORM, etc.)

7.3 Fluoreszenz-Diagnose



PS = Photosensibilisation

Bei der PDD und PDT wird speziell die Tatsache benutzt, dass sich bestimmte **Farbstoffe (Photosensibilisatoren)** wie Porphyrine in malignen (kranken) Zellen ansammeln.

PDD = Photodynamische Diagnose:

Das betroffene Gewebe wird mit Licht einer Wellenlänge bestrahlt, die nahe beim Absorptionsmaximum des Photosensibilisators liegt. Detektion der Fluoreszenz liefert orts aufgelöste Information über betroffenes Gewebe.

PDT = Photodynamische Therapie:

Bestrahlung mit hoher Intensität im Absorptionsmaximum. Jetzt wird eine zytotoxische Reaktion des Photosensibilisators gestartet. Als Photosensibilisatoren werden dabei überwiegend **Porphyrine** und **5-Aminolävulinsäure (5-ALA)** eingesetzt.

Der eigentliche photophysikalische Prozess verläuft in mehreren Schritten und erfordert die Anwesenheit von Sauerstoff.

Absorption und Streuung von Licht limitieren den Einsatz auf obeflächennahe Bereiche

$$N(z) = N_0 \exp(-(\alpha + \mu_s) \cdot z) \quad (7.3) \quad = \text{modifiziertes Lambert-Beersches Gesetz}$$

= Zahl der nicht-absorbierten und nicht-gestreuten Photonen

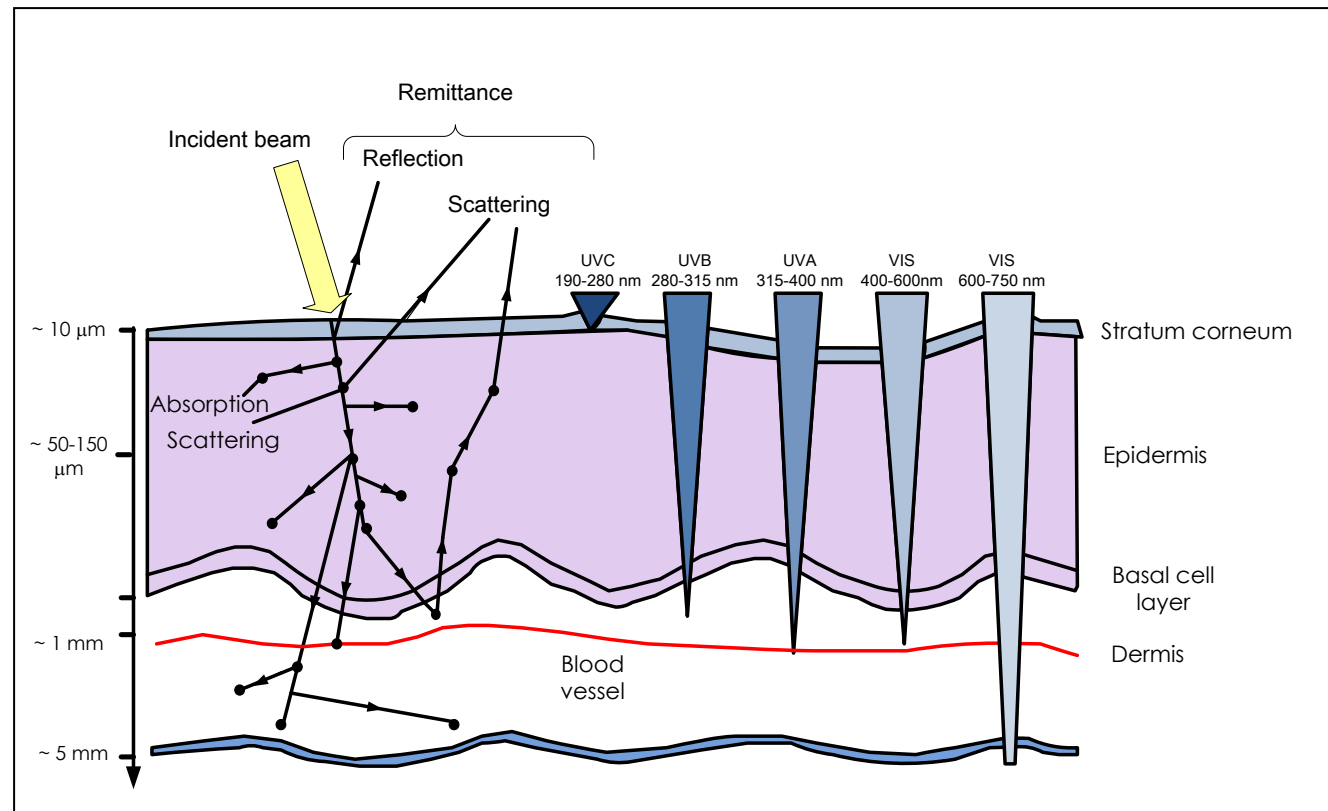
Absorptionskoeffizient α

Streukoeffizient μ_s

Eindringtiefe

$$\Delta z \approx 1/(\alpha + \mu_s)$$

→ Hohe Eindringtiefe
im Bereich 800nm (NIR)

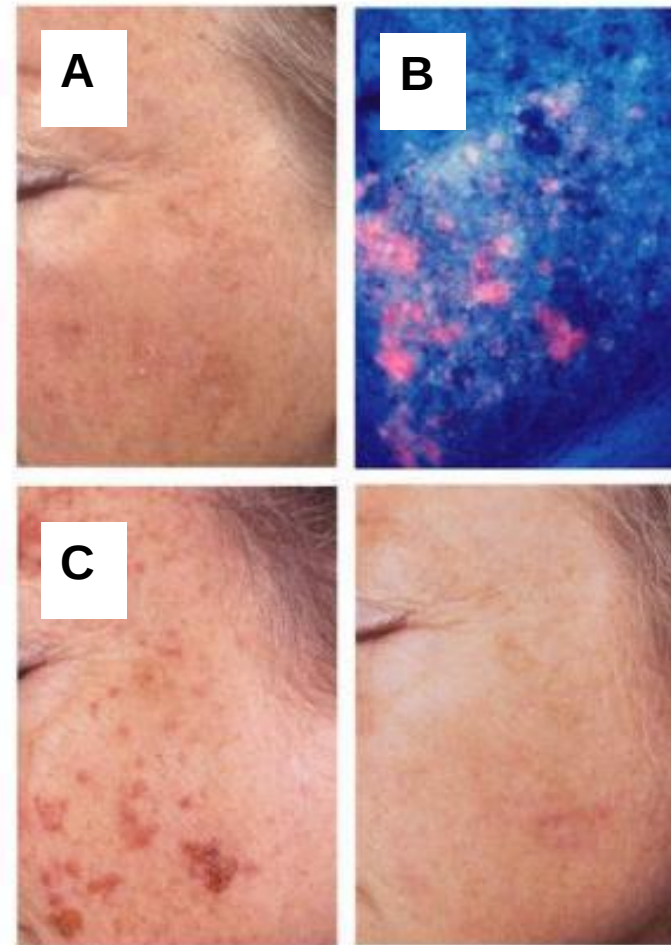


Anwendungsgebiet der PDD

Dermatologie
Urologie
Gynäkologie
Neuro-und HNO-Chirurgie

Anwendungsgebiete der PDT:

Dermatologie
Urologie
Gynäkologie
Augenheilkunde



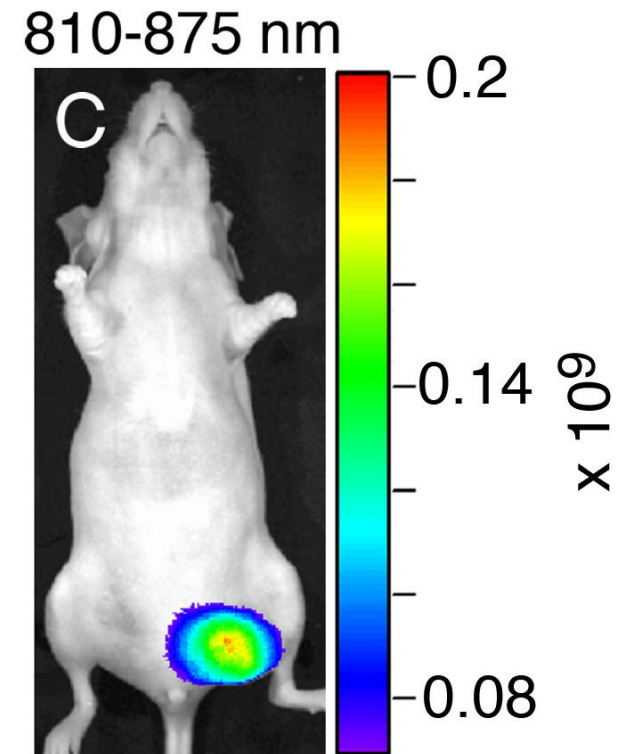
PDT bei Hautkrebs

Bilder: Journal Onkologie 11/2003
www.journalonko.de/reddyphp/image.php?id=588

Die **Fluoreszenztomographie** ist ein in der In-vivo-Diagnostik verwendetes bildgebendes Verfahren. Sie ist eine spezielle Form der diffusen optischen Tomographie.

Mit der Fluoreszenztomographie kann die Verteilung von Fluorophoren in biologischem Gewebe dreidimensional erfasst und quantifiziert werden.

Das Verfahren wird vor allem in der Forschung und in präklinischen Studien verwendet.



http://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/1/1c/Fluorescence_Imaging_06.jpg

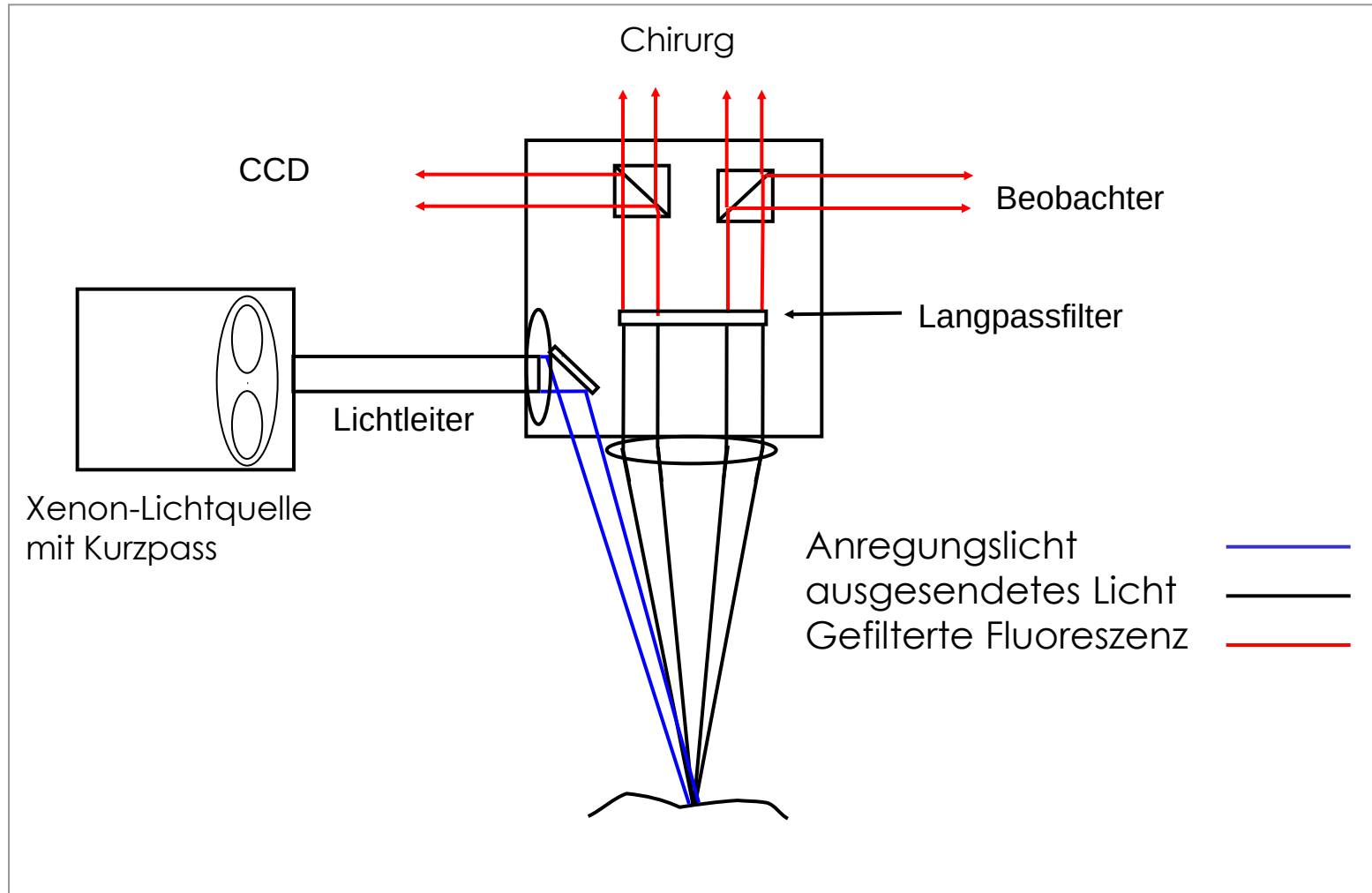
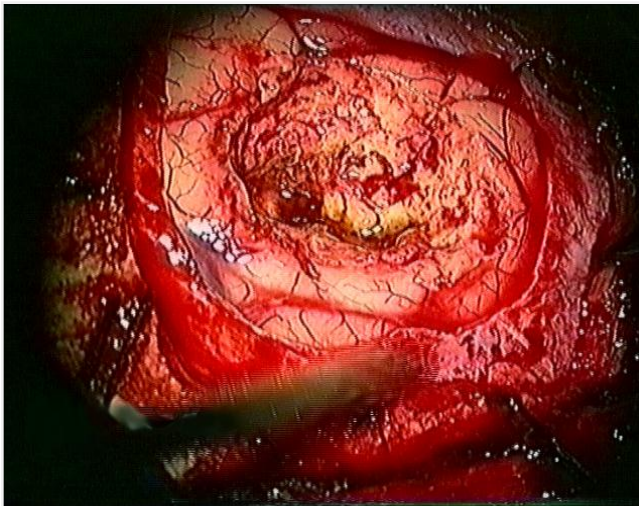


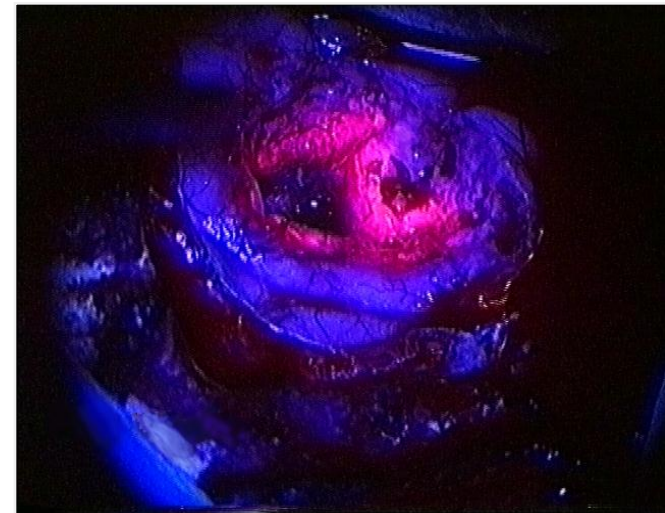
Fig. 2: BLUE 400: Anordnung der Filter in der Mikroskop-System

Duch 5-ALA unterstützte Glioblastome Resektion – BLUE 400



Beleuchtung mit weißem Licht

- Nekrose klar erkennbar
- wachstumsfähiger Tumorränder unklar

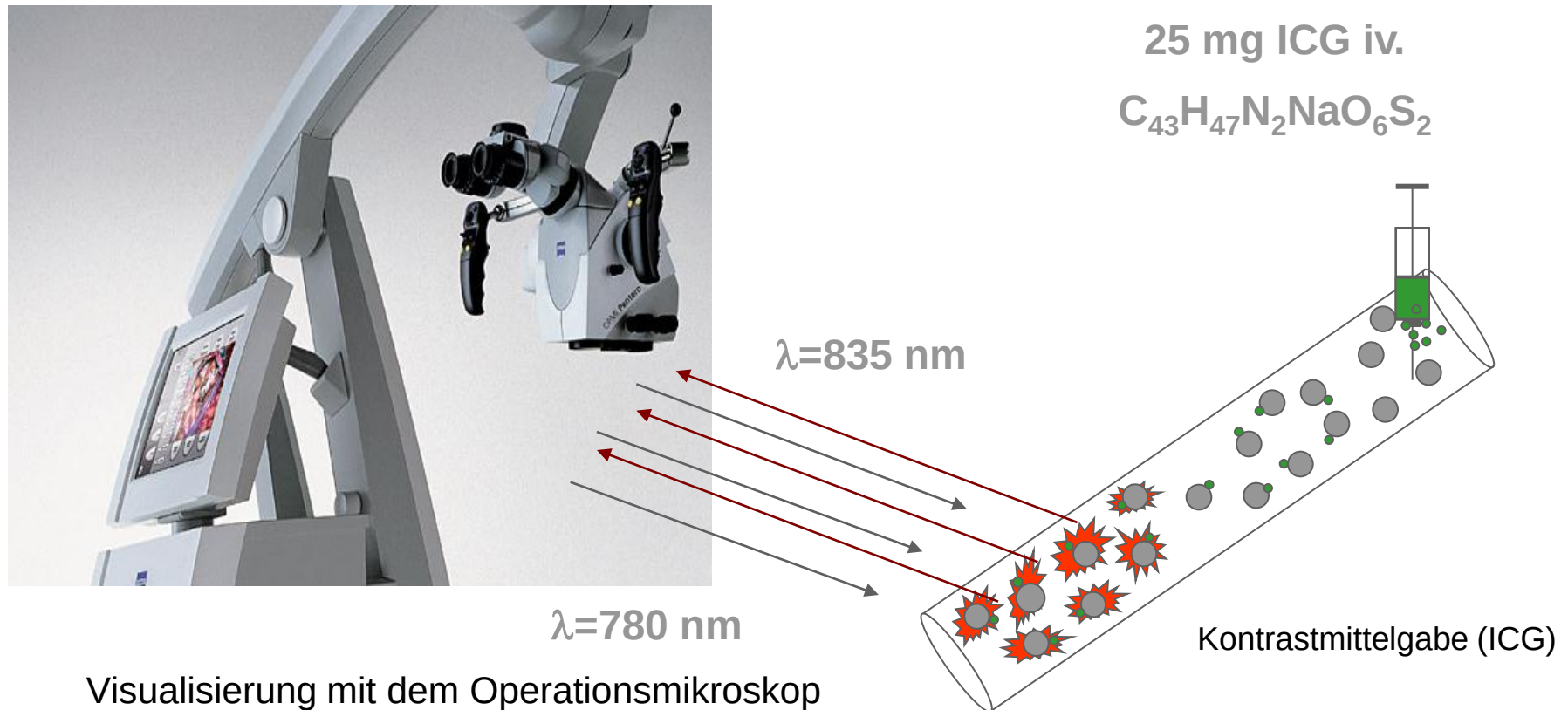


Blau-violetten Beleuchtung

- Nekrose zeigt keine Fluoreszenz
- Tumorränder stark fluoreszierend
- "Normal" Gewebe nicht fluoreszierend

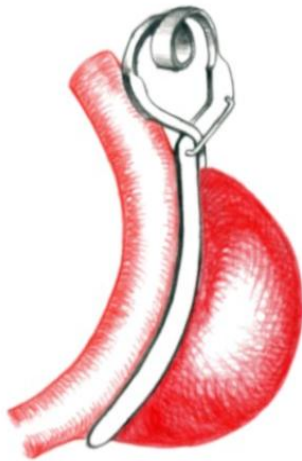
Fluoreszenz ermöglicht intraoperative Diagnostik

Beispiel: **INFRAROT 800 (Zeiss)**: Prinzip Fluoreszenzgestützte Video-Angiographie

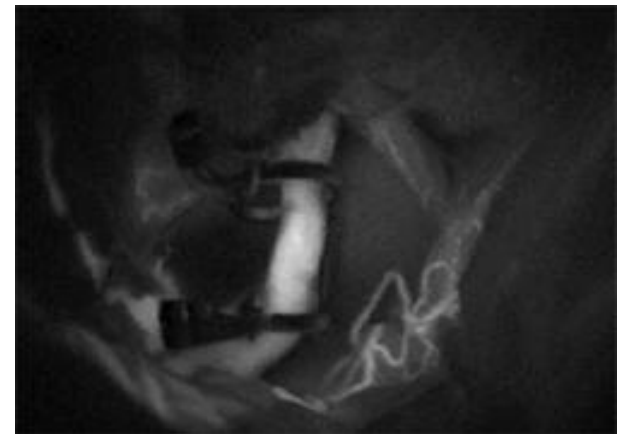
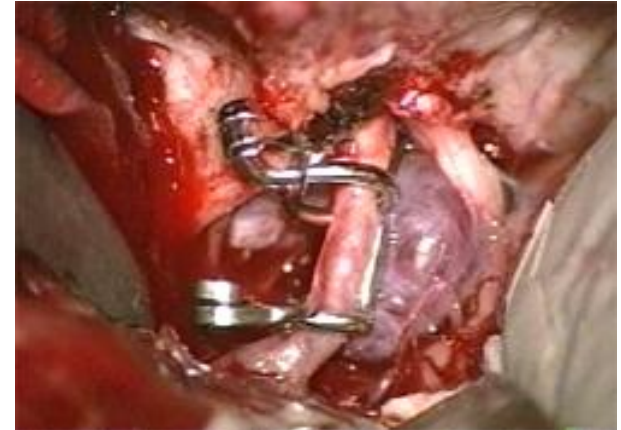
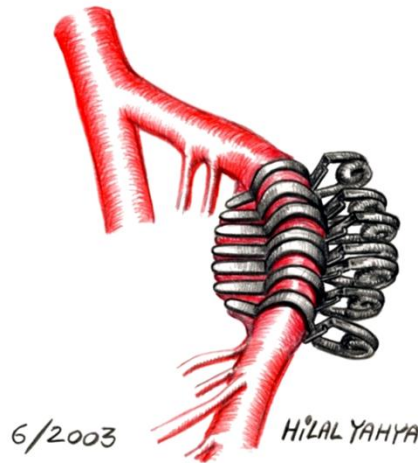


INFRAROT 800

- belegt eine vollständigen Verschluss des Anurysmas
- belegt die Erhaltung der offenen Arterie



Aneurysma-Clipping



Fluoreszenzmethoden sind:

- ein junges Forschungsfeld
- Schlüssel zu vielen Super-Auflösungs-Mikroskopie-Methoden
➔ STED, PALM, STORM
- Interessant für die medizinische Diagnose und Therapie