Abschlussbericht zum PTJ Verbundprojekt 3D-FLIM

der Firma LaVision BioTec GmbH

3D-FLIM

- Beschleunigung komplexer Bioanalytic -

Multiexponentielles t-Mapping in vitro und in vivo

1.5.2005 – 30.4.2008

I Kurzdarstellung

I.1 Aufgabenstellung des Teilvorhabens

Ziel des Gesamtvorhabens war die Erforschung eines Messsystems zur schnellen Aufnahme von dreidimensionalen FLIM-Daten mit hoher Zeit- und Ortsauflösung.

Die wesentlichste Aufgabe des Teilvorhabens der Firma LaVision BioTec war die opto-mechanische Realisierung, die Ansteuerung und die Synchronisation des Echtzeit 3D-FLIM Mikroskops und der erforderlichen Messabläufe. Zudem sollten im Hinblick auf die applikativen Fragestellungen innovative Messtechniken und Auswertemethoden für die 2-Photonen Mikroskopie erarbeitet werden. Dazu zählte z. B. ein Verfahren zur Streulichtbefreiung der Daten und Erhöhung der Ortsauflösung. Darüber hinaus war LaVision BioTec verantwortlich für die Einbindung der von den Partnern erstellten Software und Hardware in das Gesamtsystem.

I.2 Voraussetzungen, unter denen das Teilvorhaben durchgeführt wurde

Der wesentliche Teil der Forschungs- und Entwicklungsaktivitäten wurde in den Laborräumen der Firma LaVision BioTec durchgeführt. Die integrativen Arbeiten am Gesamtsystem sowie die Erforschung der Applikationen fanden gemeinsam mit den Partnern an der GBF in Braunschweig statt, da das finale 3D-FLIM Mikroskop dort aufgebaut wurde.
Für die aufwändige Erforschung der neuartigen 2-Photonen Messtechniken konnte fast vollständig auf bei LaVision BioTec vorhandenes Material zurückgegriffen werden. Insbesondere das kontinuierliche Vorhandensein eines Ti:Sa Lasersystems und eines kompletten 2-Photonen Mikroskops, das baugleich zu dem an der GBF installierten war, haben die durchzuführenden Arbeiten erheblich erleichtert und beschleunigt.
Zur Ansteuerung und Synchronisation aller Komponenten des 3D-FLIM Messsystems sowie zur Realisierung von komplexen Messabläufen wurde die Software Plattform ImSpector der Firma LaVision BioTec eingesetzt. Aufgrund der flexiblen Architektur konnten innerhalb der Projektlaufzeit nicht nur die gesteckten Ziele erreicht, sondern zusätzliche für die applikative Forschung relevanten Funktionen eingebunden werden.

Die Forschungsmittel für Geräteinvestitionen wurden in einen optischen Tisch sowie einen leistungsfähigen Computer investiert.

I.3 Planung und Ablauf des Vorhabens

Mit Beginn des Projektes wurde die opto-mechanische Integration der PicoStar in das bei der GBF bereits vorhandene 2-Photonen Mikroskop geplant und realisiert. Parallel dazu wurde die Einbindung der wichtigsten Hardware Komponenten in die zur Steuerung des Gesamtsystems eingesetzte Software ImSpector durchgeführt und eine Systematik zur rekursiven Aufnahmesteuerung erarbeitet. Bereits im Juli 2006 konnten an der GBF erste

3D-FLIM-Messungen an modifizierten Pankreaszellen durchgeführt werden. Die dabei erreichten τ-Bildraten lagen zu diesem Zeitpunkt mit 0,5 Hz bereits weit über allen konkurrierenden Techniken.
Die anschließende Funktionserprobungsphase verdeutlichte insbesondere den hohen Anspruch der applikativen Fragestellungen und führte zu der Einsicht, dass die gesteckten Ziele nicht ohne erheblichen Mehraufwand auf der messtechnischen Seite zu erreichen sind. Wesentliche Ursache dafür war, dass es sich bei den Pankreasinseln und dem Pankreas um optisch sehr dichte Proben handelt und die NAD(P)H Signale zusätzlich sehr schwach waren.
Unmittelbar im Anschluss an die erste Testphase wurde daher z. B. eine hochsensitive Referenz-Detektionsmethode basierend auf der Abtastung mit einem einzelnen Strahl entwickelt, die in stark streuenden Proben zusätzlich zu den FLIM-Daten morphologisch hochaufgelöste Bilder liefert. Parallel dazu wurde mit der Erarbeitung verschiedener neuer Techniken begonnen, die für erfolgreiche in vivo Experimente unabdingbar sind. Zu nennen ist hier insbesondere eine Elektronik zur Synchronisation der Probenabtastung auf die Atmung von Kleintieren, ein optisches System zur variablen Objektivausleuchtung und ein spezieller in vivo Probentisch.
Auf der technischen Seite konnten alle wesentlichen Ziele wie geplant im Rahmen der Verbundlaufzeit realisiert werden. Die Erforschung der Applikationen hingegen war trotz der vielfältigen neuartigen Messmethoden bis hin zum Projektende nur bedingt möglich. Insbesondere konnte die Aufnahme von τ-Bildern in Echtzeit in Pankreasinseln oder dem Pankreas aufgrund der schwachen Signale des NAD(P)H, der hohen optischen Dichte der Proben und der mangelnden Sensitivität der PicoStar nicht erreicht werden.

I.4 Wissenschaftlicher und technischer Stand vor Projektbeginn

I.4.1 Parallelisierte 2-Photonen Mikroskopie

Die Kombination von 2-Photonen-Mikroskopie und flächiger Detektion von Fluoreszenzlebensdauern ist nur mit Multistrahl Systemen sinnvoll durchzuführen und wurde in der Wissenschaft bislang noch nicht systematisch verfolgt. Den einzigen uns bekannten Ansatz gab es in der Gruppe von S. Hell am MPI für biophysikalische Chemie in Göttingen, der die PicoStar Kamera von LaVision in einem Pilotexperiment an ein parallelisiertes 2-Photonen Mikroskop, basierend auf einem Mikrolinsenrad zur Strahlaufteilung, adaptiert hat. Die dort verwendete Strahlteilungstechnik besitzt wesentliche Nachteile gegenüber der Strahlaufteilung mit Planoptiken wie sie im System von LaVision BioTec realisiert wurde. Der Scankopf TriM Scope ermöglicht eine interferenzfreie und flexible Anregung im Inneren der Probe mit konkurrenzlos hohen Bildraten. Dabei entspricht die optische Auflösung der von Einzelstrahlmikroskopen.
Als konkurrierende Techniken sind Mikro-MRI und OCT zu nennen, die über noch höhere Abbildungstiefen aber nicht über die erforderliche Sub-Mikrometer Ortsauflösung verfügen. Beide haben zudem wesentliche Einschränkungen hinsichtlich der funktionalen Abbildung.
Das TriM Scope wurde zu Projektbeginn bereits seit zwei Jahren vertrieben. Das der Messmethode zugrunde liegende Verfahren der parallelisierten 2-Photonen Mikroskopie

ist weltweit patentrechtlich geschützt (DE 199 04 592.5-42, F 0001405, US 09/492,641, UK 2 346 453 A) und LaVision BioTec hält exklusive Lizenzen dieser Patente. Weitere Patente zur Herstellung breitbandiger 50%-Strahlteilerschichten und zur variablen Einstellung der Strahlzahl waren zum Start des Projektes eingereicht und befanden sich in der Prüfungsphase.

I.4.2 Fluoreszenz Lebensdauer Messtechnik

Bereits vor Projektbeginn existierten zahlreiche Verfahren im Frequenz- und Zeitraum zur Messung von Fluoreszenzlebensdauern. Ein wesentlicher Unterschied für die Einsetzbarkeit der Techniken zur Erforschung lebender Proben besteht zwischen flächig, linienweise und punktuell arbeitenden FLIM-Messsystemen.
Die punktuellen Messsysteme (fokussierter Laserstrahl, TCSPC) sind mit deutlichem Abstand am weitesten verbreitet. Aufgrund der sequentiellen Messung des Fluoreszenzzerfalls in allen Probenpunkten beträgt die Aufnahmezeit für ein 512 x 512 Pixel großes Bild jedoch typischerweise mehr als 40 Sekunden.
Streak-Kamera basierte FLIM-Messsysteme ermöglichen hingegen die simultane Messung des Fluoreszenzabklingverhaltens entlang einer Linie im Probenvolumen. Für ein 512 x 512 Pixel τ-Bild werden jedoch immer noch 512 Zeilen sequentiell abgetastet. Eine Kombination mit der 2- Photonen-Mikroskopie ist nicht möglich, da die hohe Pulsrate der eingesetzten Ti:Sa-Laser nicht mit den derzeit erhältlichen Streak-Kameras synchronisierbar ist. TCSPC und Streak-Kamera basierte Methoden sind somit für schnelle 3D-FLIM Messungen nicht geeignet.
Flächige Messtechniken basierend auf bildverstärkten CCD-Kameras erlauben die simultane Aufnahme der Fluoreszenzlebensdauer in allen Punkten einer Ebene im Probenvolumen. Ein τ-Bild kann in nur wenigen Sekunden generiert werden. Der Einsatz der Fluoreszenzlebensdauer als Kontrastverfahren zur Untersuchung lebender Proben oder dynamischer Vorgänge ist daher ausschließlich mit flächigen FLIM-Systemen möglich.
Der in diesem Verbundvorhaben verfolgte technische Ansatz basiert auf der bildverstärkten Kamera PicoStar des Partners LaVision. Die extrem hohe Pulswiederholrate des Bildverstärkersystems erlaubt die Aufzeichnung aller Laserpulse eines mit 80 MHz laufenden Ti:Sa-Lasers und besitzt damit als einzige Technik das Potenzial für eine Echtzeit FLIM-Messtechnik. Das bislang existierende Gerät ist durch Unterbrechungen der Signalintegration limitiert, da zur Aufzeichnung des Zeitverlaufs des Fluoreszenzsignals die Phasenverschiebung des Bildverstärkeröffnungszeitpunktes synchron mit der Bildaufnahme verlaufen muss. Dies erforderte eine externe Kameraansteuerung und bedingte einen sequentiellen Ablauf von Signalintegration und Auslesen der Kamera.
Die Eigenschaften der von LaVision entwickelten PicoStar für die zeitaufgelöste Fluoreszenz-Messtechnik sind weltweit einzigartig und es bestehen keine relevanten Schutzrechte.

I.5 Zusammenarbeit mit anderen Stellen

Im Rahmen des Verbundvorhabens wurde das integrierte Messsystem zusammen mit dem Partner LaVision GmbH aufgebaut und getestet. Die vom Projektpartner TU-

Braunschweig ausgearbeitete multi-exponentielle FLIM Auswertung nach der Prony-Methode wurde in die ImSpector Software implementiert.
Über die Zusammenarbeit mit den Verbundprojektpartnern hinaus wurde ein F&E-Auftrag an die GBF in Braunschweig zur Erforschung des NAD(P)H Metabolismus von Pankreasinseln in vitro und in vivo unter Einsatz des erarbeiteten 3D-FLIM Mikroskops vergeben. Der Standort des finalen Demonstrators ist in den Laborräumen des Arbeitsgruppenleiters Dr. Gunzer an der GBF. Ein detaillierter Abschlussbericht der GBF zur Funktionserprobung des 3D-FLIM Mikroskops und zur Erforschung der ausgewählten Applikationen liegt dem Abschlussbericht für das Gesamtvorhaben bei.

Mit der Firma Sill Optics wurde ein aus drei achromatischen Linsen bestehendes optisches System realisiert, dass eine kontinuierliche Variation des Ti:Sa Laserstrahldurchmessers ermöglicht.

II Eingehende Darstellung

II.1 Verwendung der Zuwendung, erzielte Ergebnisse

Die wesentlichen Ziele des Teilvorhabens von LaVision BioTec waren die Realisierung des Echtzeit 3D-FLIM Mikroskops sowie die Erforschung innovativer Messtechniken und Auswertemethoden für die parallelisierte 2-Photonen Mikroskopie. Zudem sollten alle Systemkomponenten in die vorhandene Software ImSpector integriert und für das Gesamtsystem eine präzise Messablaufsteuerung erstellt werden. In der Teilvorhabensbeschreibung wurden folgende Ziele formuliert:

a) Implementierung der Auswertesoftware für dynamisches multiexponentielles 3D-FLIM in das Aufnahmeprogramm; Ausbau des 3D-FLIM Mikroskops an der GBF
b) Implementierung einer rekursiven Aufnahmesteuerung zur dynamischen Anpassung der Messparamter
c) Funktionserprobung des 3D-FLIM-Mikroskops bei der GBF; Ausarbeitung von Datenreduktions und Darstellungsalgoritmen; Synchrone Messung von Intensitäts- und FLIM-Daten mit verschiedenen Detektionskanälen
d) Strukturierte Anregung zur Streulichtunterdrückung und Erhöhung der Ortsauflösung; Erarbeitung einer Methodik zum schnellen z-Scanning

Nach den ersten Probemessungen an Pankreasinseln und am Pankreas einer lebenden Maus wurde schnell klar, dass die applikativen Ziele und angestrebten in vivo Experimente eine erhebliche Erweiterung der Messmethodik erfordern. Die dazu von LaVision BioTec durchgeführten Arbeiten waren nicht in der Teilvorhabensbeschreibung berücksichtigt und werden in folgendem Punkt behandelt:

e) Erarbeitung anwendungsspezifischer Messmethoden

II.1.a Ausbau des 2-Photonen Mikroskops an der GBF; Implementierung der Auswertesoftware für multi-exponentielles FLIM

Ausbau des 2-Photonen Mikroskops an der GBF

Zur opto-mechanischen Integration des PicoStar Bildverstärkersystems in das bei der GBF vorhandene parallelisierte 2-Photonen Mikroskop TriM Scope wurden zwei verschiedene Konzepte realisiert und erprobt.

Insbesondere musste dabei die im Vergleich zu den üblicherweise eingesetzten CCD Kameras schlechtere Ortsauflösung des FLIM-Detektors kompensiert werden. Die theoretische laterale Auflösung des 2-Photonen Mikroskops beträgt bei Einsatz eines 20x Objektivs mit 0.95 NA und einer Anregungswellenlänge von 800nm etwa 400nm. Durch die 20-fache Vergrößerung der Objektiv-Tubuslinsen-Kombination ergibt dies 8µm am Ort des Detektors. Da die Ortsauflösung der PicoStar bedingt durch die MCP-Struktur nur etwa 20µm beträgt wurde zum wesentlichen Erhalt der Bildqualität eine 2-fach Nachvergrößerungsoptik in den Detektionsstrahlengang integriert. An sehr kleinen fluoreszierenden Kugeln (Durchmesser 200nm) durchgeführte Auflösungsmessungen mit und ohne Nachvergrößerung bestätigten die theoretischen Werte.

Die mechanische Adaption des relativ schweren Detektors an das Mikroskopstativ wurde zunächst senkrecht über dem Trinokulartubus ausgeführt. Wegen mangelnder Stabilität im Betrieb mit der 2-fach Nachvergrößerung wurde dieses Konzept jedoch nach den ersten Tests verworfen und eine zweite, deutlich aufwändigere, Version zur rückseitigen Montage realisiert.

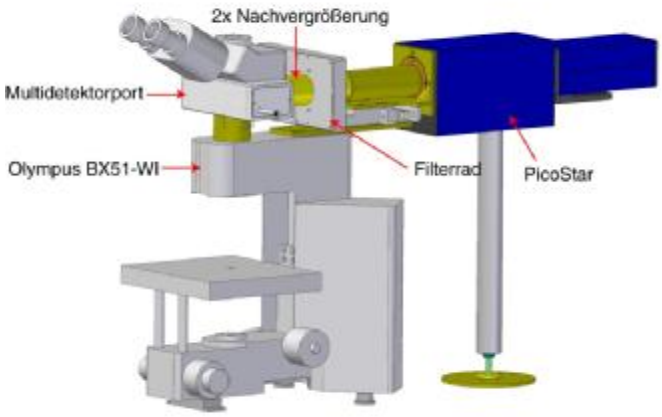

Abbildung 1: Finale Adaption der PicoStar an das aufrechte Mikroskop; Integration des Multidetektorports

Die finale Version ist mechanisch sehr stabil und erlaubt eine einfache und präzise Verschiebung des Detektors entlang der optischen Achse zur Anpassung der Photokathodenebene an die Bildebene des Mikroskops.

Erstellung von Auswertesoftware für FLIM-Datensätze

Zunächst wurde für mono-exponentielle Zerfälle eine Darstellungsform implementiert, die aus einer FLIM-Bildserie direkt ein τ-Bild generiert. Eine Besonderheit der Software Architektur ist dabei, dass die Berechnung des τ-Bildes parallel zur Datenaufnahme läuft und dem Benutzer damit ein unmittelbares Feedback über die Qualität der Messung liefert. Mittels einer Histogrammfunktion kann die durchschnittliche Lebensdauer und die Abweichung in ausgewählten Regionen berechnet werden. Bei der Beschränkung auf nur drei verschiedene Gate-Positionen konnte mit der Ausgangsversion der PicoStar bereits ein τ-Bild pro Sekunde aufgenommen werden.

Die im Rahmen des Projektes vom Partner TU-Braunschweig erarbeitete multi-exponentielle FLIM Auswertung der Messdaten $I_{xy}(t_n)$[10] basiert auf der Lösung des Gleichungssystems:

$$I(t) = I_1 * \exp(-t/\tau_1) + I_2 * \exp(-t/\tau_2) + ...$$

zur Bestimmung der Parameter τ_{ixy} und I_{ixy} nach der Prony-Methode. Während bei der Verwendung eines iterativen Verfahrens wie z.B. der Levenberg-Marquard-Methode die Zahl der Iterationsschritte und damit die erforderliche Rechenzeit von den lokalen Konvergenzeigenschaften abhängt, handelt es sich bei der Berechnung nach der Prony-Methode um eine geschlossene Lösung des Gleichungssystems. Dies ermöglicht eine simultane Berechnung für alle Bildpunkte x,y. In enger Abstimmung mit dem Partner LaVision wurde die Auswertemethode zur Berechnung der ersten zwei Glieder τ_{2xy}, I_{1xy}, I_{2xy} bzw. I_{2xy}/I_{1xy} der Fluoreszenzparameter aus den Messdaten analog zu der Einbindung in DAVIS auch in ImSpector integriert.

Darüber hinaus wurde eine weitere Auswertungs- und Klassifizierungsmethode für multi-exponentielle Fluoreszenzzerfälle in ImSpector implementiert. Der als Phasor Approach bekannte Ansatz wurde von E. Gratton erfunden und bietet wesentliche Vorteile für die schnelle und eindeutige Klassifizierung von Mono- und Bi-exponentiellen Zerfällen. Die erforderliche Rechenzeit zur Kalkulation eines τ-Bildes kann damit nochmals verkürzt werden.
Aus zeitlichen Gründen konnte diese Methode leider nicht mehr für die applikative Verbundforschung eingesetzt werden.

II.1.b Implementierung einer rekursiven Aufnahmesteuerung zur dynamischen Anpassung der Messparameter

Zur Erstellung einer rekursiven Aufnahmesteuerung für das Echtzeit 3D-FLIM Messsystem mussten zunächst verschiedene neue Geräte in die Steuersoftware ImSpector eingebunden werden.
Neben den speziell für die Applikationen und in vivo Experimente entwickelten Komponenten (siehe II.1.e) zählte dazu insbesondere die Trigger Delay Unit (TDU), die zur variablen Verzögerung des synchron zum Laserpuls ausgesandten elektrischen Pulses eingesetzt wird. Die überarbeitete Version der Firma LaVision bietet erheblich verbesserte Delay-Schaltgeschwindigkeiten. Die TDU wurde zu-

dem in das Synchronisations- und Messkonzept des an der GBF aufgebauten 2-Photonen Mikroskops integriert (Synchronisation mit dem Galvo-Scanner, z-Trieb, Filterrad...).
Die als High Rate Imager (HRI) bezeichnete Steuereinheit der PicoStar wurde ebenfalls in ImSpector integriert. Dies ermöglicht die automatische Veränderung der wichtigsten Parameter wie z. B. die Breite der zeitlichen Gates oder die MCP-Spannung während der Messung. Durch den Einsatz kurzer Gates für den steilen Abfall zu Beginn der Fluoreszenzabklingkurve und längerer im Bereich des flacheren Abfalls kann die Aufnahmezeit für ein τ-Bild deutlich reduziert werden. Interessant ist dies insbesondere für multi-exponentielle Zerfälle.
Die in ImSpector integrierte Scriptsprache Python erlaubt den Aufruf komplexer Funktionen und Abläufe. Durch eine wesentliche Erweiterung im Rahmen der Verbundforschung können nun verschiedenste Messvorschriften definiert und automatisch nacheinander ausgeführt werden. Dies ermöglicht beispielsweise voll automatisierte Langzeitbeobachtungen oder die wechselweise Aufnahme von τ-Bildern und Intensitätsbildern. Darüber hinaus besteht die Möglichkeit, zwischen zwei Messpunkten Auswertungsalgorithmen oder externe Programme automatisch auszuführen und die Ergebnisse zur Anpassung der Messparameter einzusetzen. Die somit geschaffene rekursive Aufnahmesteuerung erlaubt die kontinuierliche Optimierung der Mess- und Systemparameter während einer Messung.

Script zur wiederholten Aufnahme von zwei 4D-Datensätzen

```
savePath = "c:/data/run"            #definiert den Speicherort
for x in range(10):                 #Anzahl der Wiederholungen
IS.RunMeasurement("4D Messung B an Probenstelle A")
IS.RunMeasurement("4D Messung B an Probenstelle B ")

IS.SaveMeasurementData(" 4D Messung B an Probenstelle A", savePath + str(x))
IS.SaveMeasurementData(" 4D Messung B an Probenstelle B", savePath + str(x))

time.sleep(1)                       #Wartezeit zwischen zwei Wiederholungen
```

Abbildung 2: Python Script zur wiederholten Aufnahme von zwei 3D-Volumen an unterschiedlichen Stellen in der Probe

II.1.c Funktionserprobung des 3D-FLIM-Mikroskops bei der GBF; Datenreduktions- und Darstellungsalgorithmen; simultane Aufnahme von Intensitäts- und FLIM-Bildern

<u>Funktionserprobung des 3D-FLIM-Mikroskops bei der GBF</u>
Die Spezifizierung der wesentlichen Eigenschaften der neuen Messtechniken und Auswertemethoden für das Echtzeit 3D-FLIM Mikroskop wurden bei LaVision in Göttingen (Detektor) und LaVision BioTec in Bielefeld (Mikroskopie) durchgeführt.
Die Funktionserprobung des Gesamtsystems bei der GBF wurde hingegen in enger Kooperation mit allen Partnern durchgeführt. Nach der Installation der PicoStar konnten bereits im Juli 2006 trotz der aufgetretenen Adaptionsprobleme erste FLIM-Messungen an modifizierten Pankreaszellen erfolgreich durchgeführt werden. Zudem konnte durch Einsatz des FLIM-Kontrastes die Aktivierung der Pha-

gozythose von Neutrophilen anhand des Anstiegs der Fluoreszenzlebensdauer im Membranbereich der Zellen nachgewiesen werden.
Eine detaillierte Darstellung der Funktionserprobung, der durchgeführten Experimente, der Ergebnisse und der aufgetretenen Probleme findet sich im Bericht der GBF, der dem Abschlussbericht für das Gesamtvorhaben beiliegt.

Datenreduktions- und Darstellungsmethoden; anwendungsspezifische Software
Die Arbeit mit dem Gesamtsystem an der GBF verdeutlichte relativ schnell die Notwendigkeit verschiedener spezifischer Verbesserungen in der Software, die bei der Beantragung des Vorhabens noch nicht ersichtlich waren.
So musste die Messablaufsteuerung komplett überarbeitet und die Definition eigener Messungen vereinfacht werden.

Abbildung 3: Dialog für die Messablaufsteuerung

Die neue Systematik gibt einen direkten Überblick über die gesamte Messschleife. Eine neue Funktion (Continous Grabbing) schaltet bei Aufruf automatisch alle Datenachsen ab und startet eine kontinuierliche, endlose Bildaufnahme mit dem aktivierten Detektor und Rastermodus. Währenddessen kann der Benutzer alle weiteren Messparameter verändern um schließlich die optimalen Einstellungen für die nachfolgende Messung festzulegen. Die wichtigste Neuerung ist jedoch die Einführung von vordefinierten Messkonfigurationen, die einfach aus einer Liste ausgewählt werden können. Mit dem Umschalten zwischen zwei verschiedenen Modi können beliebige Geräteeinstellungen automatisch geändert werden. Dies erlaubt den Wechsel zwischen fundamental unterschiedlichen Messabläufen mit nur einem Mausklick. Eigene Modi können frei definiert werden und erscheinen fortan ebenfalls in der Liste. Eine wichtige Anwendung im Rahmen von 3D-FLIM ist die schnelle Umschaltung vom Einzelstrahl- auf den Multistrahlmodus. Damit kann z. B. unmittelbar im Anschluss an die Aufnahme eines FLIM-Datensatzes dasselbe Probenvolumen noch einmal mit höchster Ortsauflösung abgetastet werden. Die Definition der abzutastenden Bildfelder und die Bildrate wurde durch die

Einführung physikalischer Parameter erheblich vereinfacht. Ein Scanfeld ist nun vollständig definiert durch seine Kantenlängen, die Zeilenfrequenz des Scanners und die Pixelzahlen.

Die vielfältigen Betriebsmodi des 3D-FLIM Mikroskops erforderten eine Automatisierung der Synchronisation des gesamten Messsystems. Mittels einer Auto-Trigger Funktion wählt die Software nun beim Start jeder Messung den für die Messaufgabe optimalen Modus aus. Für sehr schnelle Aufnahmen zur Beobachtung dynamischer Prozesse in einer Probenebene ist dies z. B. der CCD Restart-Modus, bei dem während des Auslesens eines Bildes bereits das nächste belichtet wird, so dass keinerlei Totzeiten entstehen. Für komplexe Messungen, in deren Verlauf die Parameter verschiedener Geräte variiert werden (TDU, z-Stepper…), wird hingegen ein Synchronisationsmodus gewählt, der den Frame-Trigger des Scanners als Startsignal für die Bildaufnahme benutzt.

Als wesentliches Problem stellte sich die Größe von typischen dreidimensionalen FLIM-Datensätzen heraus. Bedingt durch die Speicherverwaltung des 32-Bit Windows Betriebssystems wird selbst bei 4 GB Arbeitsspeicher nur eine maximale Datensatzgröße von etwa 1,5 GB zugelassen. Zur Aufnahme und Verwaltung größerer Datensätze wurde eine in ImSpector bislang nur rudimentär vorhandene Funktion zur kontinuierlichen Speicherung von Messdaten auf die Festplatte erheblich erweitert. Der neu programmierte Image Series Viewer ermöglicht, einen mehrfarbigen 4-dimensionalen Datensatz beliebiger Größe mittels eines Thumbnail-Previews zu durchsuchen und den interessierenden Anteil zur Auswertung in ImSpector einzuladen.

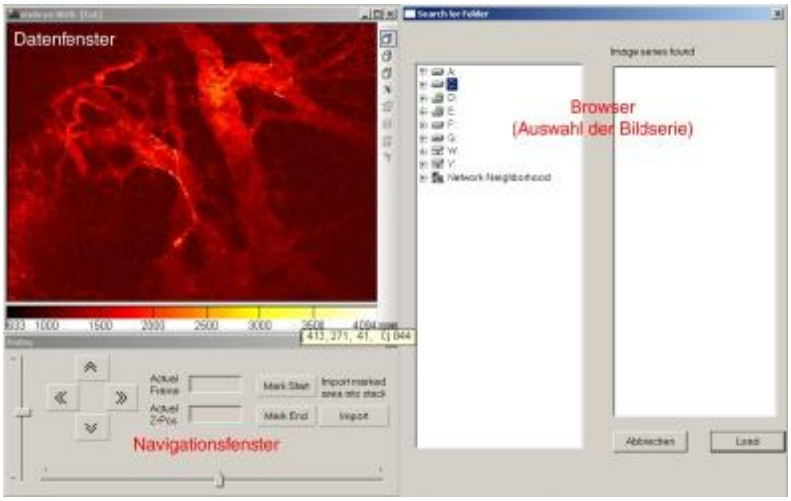

Abbildung 4: Image Series Viewer zur Darstellung und Bearbeitung von Datensätzen beliebiger Größe

Mittels des Navigationsfensters kann der Benutzer sich innerhalb des Datensatzes bewegen und mit wenigen Mausklicks den interessanten Bereich zur Auswertung importieren. Zudem wurde eine Funktion zur Datenreduktion erarbeitet, die Langzeitmessungen ermöglicht, indem Messdaten direkt komprimiert und als MPEG-

Video auf die Festplatte geschrieben werden. Durch die hohe Kompressionsrate erlaubt dies die Aufnahme extrem langer Bilderserien mit hoher Bildrate. Zur eindeutigen zeitlichen Einsortierung wird jedem Bild die exakte Aufnahmezeit zugeordnet und bei Bedarf in einer Ecke des Bildes angezeigt. Zudem erlaubt der Viewer die Bearbeitung mehrfarbiger Datensätze. Für die Mehrzahl der Anwendungen ist dies essentiell, da typischerweise Interaktionen zwischen verschiedenen Zellen oder zwischen Zellen und Gewebebestandteilen beobachtet werden sollen.

Simultane Aufnahme von Intensitäts- und FLIM-Bildern

Zur flexiblen Registrierung der Fluoreszenz mit unterschiedlichen Detektoren wurde ein Multidetektorport erarbeitet und in das 2-Photonen Messsystem an der GBF integriert (Abb. 1). Dieses Modul erlaubt die einfache Umschaltung zwischen der PicoStar, einer CCD-Kamera und einem PMT und ermöglicht damit die Korrelation der Fluoreszenzlebensdauerbilder mit räumlich höchstaufgelösten CCD- oder PMT-Bildern.

Alternativ kann eine der drei Positionen mit einem Intensitätsteiler oder dichromatischen Spiegel bestückt werden, so dass simultan Fluoreszenzintensitäts- und Fluoreszenzlebensdauerbilder aufgenommen werden können.

II.1.d [redacted]

[redacted]

[redacted]

[redacted]

[redacted]

[redacted]

[redacted]

[redacted]

[redacted]

[redacted]

[redacted]

[redacted]

II.2 Zahlenmäßiger Nachweis

Trotz erheblicher zusätzlicher Forschungsarbeiten konnte das Teilvorhaben mit der beantragten Zuwendung und dem geplanten Personalaufwand durchgeführt werden. Ein kleiner Teil der Mittel des F&E-Auftrages an die GBF wurde auf LaVision BioTec umgewidmet, da einige Auftragsarbeiten von LaVision BioTec übernommen wurden.

Die einzige außerplanmäßige Investition war ein optischer Tisch, der für Testaufbauten in Bielefeld benötigt wurde.

Der detaillierte zahlenmäßige Nachweis liegt diesem Abschlussbericht bei.

II.3 Notwendigkeit und Angemessenheit der geleisteten Arbeit

Wie bereits unter II.1.c und II.1.e dargestellt wurden im Vergleich zur ursprünglichen Teilvorhabensbeschreibung erhebliche zusätzliche Anstrengungen unternommen, um die applikativen Ziele zu Erreichen.
Kompensiert wurde dies zum Teil dadurch, dass die geplante Erforschung der Methode zur Streulichtunterdrückung und Auflösungserhöhung zum Projektstart bereits relativ weit fortgeschritten war. Zudem wurde wie in II.1.d dargestellt die Methode zum schnellen z-Scanning nicht erarbeitet, da sie keinen Vorteil für die praktischen Arbeiten gebracht hätte.

II.4 Voraussichtlicher Nutzen und Verwertbarkeit der Ergebnisse mit Bezug zum Verwertungsplan

Ziel des Projektes war die Erstellung eines Messsystems, das nach Projektende für die wesentliche Beschleunigung quantitativer FLIM-Messungen einsetzbar ist und als Gesamtgerät von der Firma LaVision BioTec vermarktet werden kann. Die für die Vermarktung relevante Innovation lag dabei insbesondere auf der gerätetechnischen Seite.
Das erarbeitete 3D-FLIM Mikroskop erlaubt die extrem schnelle Aufnahme dreidimensionaler FLIM-Daten. Diese können zudem in Echtzeit verarbeitet, archiviert und für den Nutzer dargestellt werden. Die erreichten τ-Bildraten sind unseres Wissens weltweit einzigartig. Es wurde ein offenes Systemkonzept realisiert, das eine spätere Anpassung einzelner Komponenten an den Stand der Technik erlaubt. Das gilt insbesondere auch für den Detektor.
Es hat sich gezeigt, dass die verwendete PicoStar Kamera derzeit der schnellste Detektor für FLIM-Messungen ist, wobei auch Nachteile bei der Empfindlichkeit bestehen. Diese Nachteile konnten im Rahmen des Projektes nicht kompensiert werden, was mit dazu beigetragen hat, dass die Untersuchung von Pankreasinseln nur beschränkt möglich war. Dieser Nachteil ist jedoch wahrscheinlich nur für ei-

nen kleinen Teil der potentiellen Anwender limitierend. Ein Problem für die unmittelbare Vermarktung ist jedoch, dass noch keine biologisch relevante Anwendung mit der erforschten Technik deutlich besser als mit anderen Methoden gezeigt werden konnte. Daher müssen im nächsten Schritt weitere potentielle Anwendungen und Applikationsfelder identifiziert und diese gemeinsam mit interessierten Wissenschaftlern evaluiert werden. Interessant erscheint nach wie vor die Diabetesforschung zu sein, aber auch die Krebsforschung, die Gentechnik, das Tissue-Engineering (künstliche Haut oder Organe) und die gewebebezogene Medikamentensuche.
Die verzögerte Verwertung des Gesamtsystems wird jedoch vermutlich dadurch kompensiert werden, dass zahlreiche neue Methoden (strukturierte Beleuchtung, Synchronisationselektronik, sensitiver Einzelstrahldetektor, XYZ-Probentisch) erarbeitet wurden, die evtl. auch alleinstehend verkauft werden können. Definitiv bedeuten die neuartigen Messtechniken einen erheblichen Vorteil für den Verkauf der 2-Photonen Mikroskope der Firma LaVision BioTec.
Insgesamt ist das Interesse auf dem Markt für 2-Photonen Mikroskopie in Kombination mit Lebensdauermesstechnik innerhalb der Verbundlaufzeit enorm gestiegen. Das durch das Projekt gewonnene Know-how und der erlangte technische Vorsprung wird es der Firma LaVision BioTec ermöglichen einen deutlichen Anteil an dem gewachsenen Markt zu erlangen.

II.5 Fortschritte an anderen Stellen im Rahmen der Projektlaufzeit

Vom CSEM und der Universität Siegen wurde ein neuartiger CMOS-Bildsensor entwickelt, der in der Lage ist, die durch Licht erzeugten Ladungsträger in Abhängigkeit von einem Modulationssignal auf verschiedene Sammelstellen zu verteilen. Bei einem sinusförmig modulierten Lichtsignal ermöglicht dies die direkte Bestimmung der Phasenlage des gemessenen Lichtes im Vergleich zum abgestrahlten. Von der Firma Mesa Imaging wird eine auf dieser Technik basierende Kamera (SwissRanger) vertrieben, die mit 30 MHz moduliert werden kann. Die entsprechenden Verschlusszeiten liegen zwischen 10-20 ns und sind dementsprechend deutlich größer als die der PicoStar (200 ps). Die Sensitivität einer CMOS-basierten Kamera ist zudem sehr gering.
Im Bereich der flächigen Fluoreszenzlebensdauermesstechnik ist nach wie vor kein Detektor bekannt, der geeigneter zur schnellen FLIM-Messung mit hoher Ortsauflösung wäre als die PicoStar.

Im Bereich der parallelisierten 2-Photonen Mikroskopie gab es während der Projektlaufzeit keine nennenswerten Fortschritte an anderer Stelle. Die Eigenschaften des TriM Scopes, insbesondere die Abbildung tiefer Probenschichten mit hohen Bildraten, sind nach wie vor weltweit einzigartig.

II.6 Veröffentlichungen

Die im Teilprojekt der Firma LaVision BioTec durchgeführten Arbeiten führten bislang zu zwei Veröffentlichungen:

1. Niesner RA, Andresen V, Gunzer M: *Intravital two-photon microscopy: focus on speed and time resolved imaging modalities.* Immunological Reviews 2007

2. Niesner RA, Narang P, Spiecker H, Andresen V, Gericke KH, Gunzer M: *Selective Detection of NADPH Oxidase in Polymorphonuclear Cells by Means of NAD(P)H-Based Fluorescence Lifetime Imaging.* Journal of Biophysics 2008

III Anlage: Erfolgskontrollbericht

[redacted]

[redacted]

[redacted]

[redacted]

[redacted]

[redacted]

[redacted]

[redacted]

[redacted]

[redacted]

[redacted]

[redacted]

[redacted]

[redacted]