



Polarisationserhaltende Faseroptik für die Fluoreszenzmikroskopie

LASER BEAM COMBINER MIT INTEGRIERTEM AOTF IN DER BIOPHOTONIK

Viele Methoden in der Biophotonik benötigen Laserlicht in einem breiten Spektralbereich. RGBV-Faseroptik in Kombination mit einem AOTF ermöglicht geschlossene, stabile und kompakte Systeme, die unter Erhalt der Polarisation eine gleichzeitige Einkopplung, Kollimation und Schaltung mehrerer Strahlquellen zwischen 400 und 660 nm möglich macht.

**ANJA KRISCHKE
ULRICH OECHSNER
CHRISTIAN KNOTHE
BERNHARD BRENNER
TIM SCHOLZ**

Mit moderner Fluoreszenzmikroskopie ist es möglich, die fundamentalen Bausteine allen Lebens mit einer Detailgenauigkeit zu untersuchen, an die vor wenigen Jahren nicht zu denken war. So lassen sich beispielsweise die Bewegungsabläufe von sogenannten Motorproteinen beobachten (Bild 1), die beim intrazellulären Transport biologischer Lasten, aber auch bei der Muskelkontraktion beteiligt sind. Für Fluoreszenzuntersuchungen solcher Systeme wird Laserlicht mit den verschiedensten

Wellenlängen benötigt, welches definiert in das verwendete Mikroskop eingekoppelt werden muss. Dies ist in Freistrahl-optik nur bedingt und mit viel Aufwand machbar.

Die Lösung ist die Faserkopplung der verwendeten Laserstrahlquellen in eine gemeinsame, polarisationserhaltende *singlemode* Faser (PM-Faser) mithilfe spezieller apochromatischer Optiken und einer dichroitischen Strahlüberlagerung [1]. Diese kann direkt mit einem anschließenden akusto-optischen durchstimmbaren Filter (AOTF) verbunden werden, mit dem ein Schalten der kombinierten Wellenlängen erfolgt.

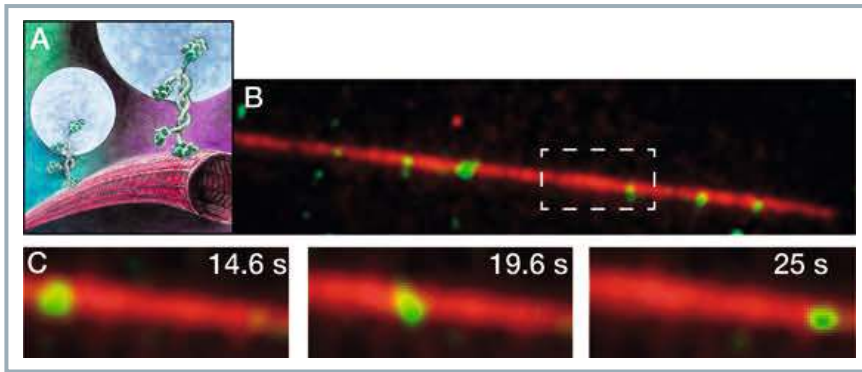
Details zu der benötigten optischen Performance der Einkoppeloptik sowie zu den PM-Fasern in einem RGBV-Aufbau

(Wellenlängenbereich 400 bis 660 nm) finden sich in [1]. Als Laserstrahlquellen für kombinierte Wellenlängen kommen beispielsweise Diodenlaser, frequenzverdoppelte Laser, Gaslaser und optisch gepumpte Halbleiterlaser (OPSL) zum Einsatz.

Der Einsatz von Faseroptik erlaubt es, die Lichtquellen sowie den Messaufbau

KONTAKT

Schäfte+Kirchhoff GmbH
22525 Hamburg, Deutschland
Tel. +49 40 853997-0
info@sukhamburg.de
www.sukhamburg.com
Vision: Stand 1.A02



1 Momentaufnahme einzelner laufender Kinesin-1-Moleküle (A) (Tetramethylrhodamin-markiert, grün) entlang eines immobilisierten Cy5-markierten Mikrotubulus (Länge 34 μm , rot) in Gegenwart von 2 mM ATP (B). Ein einzelnes Kinesin-Molekül (grün) bewegt sich prozessiv (C) entlang des immobilisierten Mikrotubulus (Laufgeschwindigkeit 500 bis 600 nm/s). Video siehe [2]

räumlich voneinander zu trennen. Diese werden mechanisch und thermisch entkoppelt, gegenseitige negative Beeinflussungen werden vermieden. Die Lichtführung selbst ist geschlossen (geringe Laserschutzklasse), sie ist unempfindlich gegenüber Schwingungen sowie langzeitstabil hinsichtlich Temperaturschwankungen. Oft kann auch ein schon mit Laserstrahlquellen ausgestatteter Messplatz umgerüstet und die Stabilität und der Messkomfort deutlich erhöht werden. Aufwendige, mechanisch instabile und schwer zu justierende Freistrahlmensuren entfallen.

TIRF-Mikroskopie an Motorproteinen

Neben herkömmlicher Fluoreszenzmikroskopie wird die verwandte TIRF-Mikroskopie (*total internal reflection fluorescence microscopy* oder auch *evanescent field microscopy*) in der Arbeitsgruppe von Prof. Brenner an der Medizinischen Hochschule Hannover (MHH) eingesetzt. Mit diesem Verfahren können die Motorproteine Kinesin, Dynein und Myosin wie auch zytoskelett-assoziierte Moleküle wie das Tau-Protein funktionell charakterisiert werden [2-6].

Bei der TIRF-Mikroskopie wird das physikalische Prinzip der Totalreflexion ausgenutzt (Bild 2). Auf das Deckglas wird eine wässrige Lösung aufgebracht, in der sich die zu untersuchenden Proteine befinden. Das Laserlicht wird in die vordere Brennebene des Mikroskopobjektivs fokussiert und trifft dann unter einem großen Winkel auf das Deckglas. An der Grenzfläche Deckglas/Lösung findet dabei ein Übergang vom optisch

dichteren in ein optisch dünneres Medium statt, was bei geeignetem großem Winkel (gemessen relativ zur Flächennormale) eine Totalreflexion an dieser Grenzfläche zur Folge hat. Um dies zu erreichen wird ein Mikroskopobjektiv mit sehr großer numerischer Apertur ($NA > 1$) verwendet. Die große NA wird durch Immersionsöl zwischen Mikroskopobjektiv und Deckglas ermöglicht.

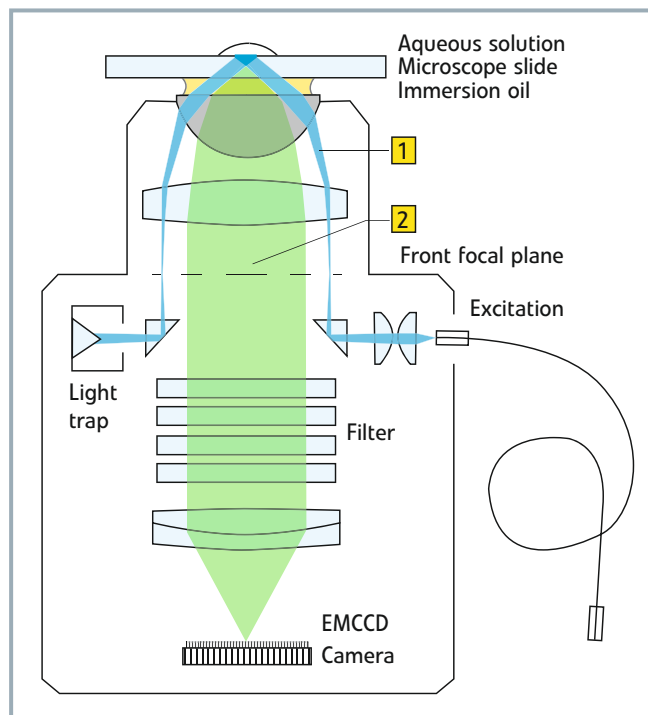
Bei der Totalreflexion an der Grenzfläche wird alles Licht reflektiert, allerdings dringt ein evaneszentes, exponentiell abfallendes, elektromagnetisches Feld in einem Randbereich bis circa 300 nm ein. Eine Anregung von fluoreszierenden Stoffen ist also auf eine sehr dünne Schicht an der Grenzfläche begrenzt und eine

selektive Anregung von Fluorophoren ohne diffuse Hintergrundfluoreszenz möglich.

Fluorophore sind Moleküle, welche nach definierter Anregung Licht aussenden. Sie können gezielt an bestimmte Strukturen angebracht werden und machen eine lokalisierte Visualisierung individueller Moleküle möglich, sodass Bewegungsabläufe direkt sichtbar werden. Das Fluoreszenzsignal, welches zu größeren Wellenlängen hin verschoben ist, wird mithilfe des Mikroskopobjektivs eingesammelt.

Für die einzelnen Fluorophore sind dabei bestimmte Anregungswellenlängen notwendig. Idealerweise wird also eine Lichtquelle aus mehreren schmalbandigen Anregungswellenlängen verwendet, die einzeln ansteuerbar sind. Eine definierte Abfolge von Anregungspulsen verschiedener Wellenlängen ist notwendig um die Fluorophore gezielt anzuregen und deren Ausbleichen zu vermeiden.

Mit dieser Technik lässt sich die Bewegung von Kinesin (Bild 1, A) auf dem Zytoskelett visualisieren. Bild 1 zeigt eine Abfolge von TIRF-Aufnahmen. Das Tetramethylrhodamin-markierte Kinesin (in Grün dargestellt, Anregung bei 532 nm) läuft über einen CY5-markierten Mikrotubulus (in Rot dargestellt, Anregung bei 633 nm) (Bild 1, B) [2]. Dabei lässt sich über einen Zeitraum von mehreren Sekunden (Bild 1, C) eine gezielte Fort-



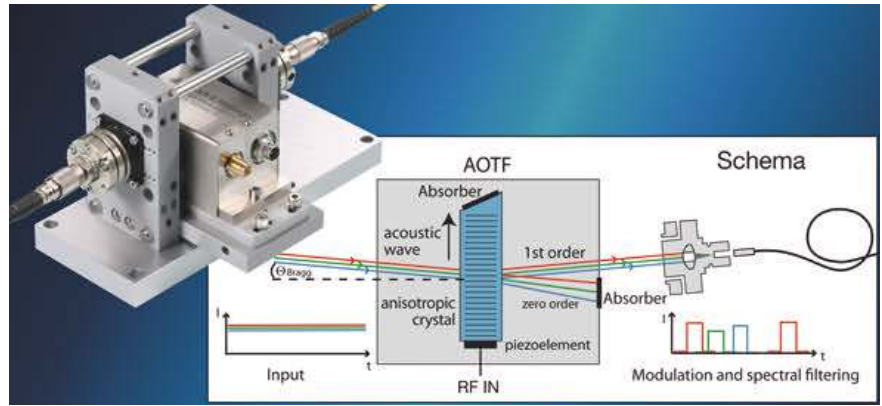
2 Schema eines Invers-TIRF-Mikroskops. Durch die Einkopplung von Laserlicht (1) in einem großen Winkel wird eine Totalreflexion an der Grenzfläche (Glas / wässrige Lösung) erzeugt. Das resultierende Fluoreszenzsignal (2) wird über das Objektiv gesammelt und auf eine gekühlte Kamera abgebildet. Streulicht der Anregung wird mithilfe von Notch-Filtern unterdrückt.

► bewegung eines einzelnen Kinesins beobachten.

Komponenten für den TIRF-Aufbau

Zur Anregung der Fluorophore wurden an der MHH verschiedene Laserlinien eines Argon-Ionenlasers (476, 488 und 514 nm) und ein HeNe-Laser (633 nm) verwendet. Diese wurden mithilfe von Laserstrahlkopplern in je eine PM-Faser gekoppelt. Anschließend wurden die verschiedenen Wellenlängen in einem RGBV Beam Combiner kombiniert, sodass sie gemeinsam in eine Faser eingekoppelt werden konnten. Im darauf folgenden fasergekoppelten AOTF wurde die für die Fluoreszenzmikroskopie wichtige Wellenlängenselektion mit hohen Schaltfrequenzen (bis wenige MHz) realisiert. Eine weitere PM-Faser macht dann eine gezielte Lichtleitung zum Mikroskop auch über große Distanzen möglich.

Eine Alternative zu einem RGBV Beam Combiner mit separatem AOTF ist ein RGBV Beam Combiner mit kombiniertem AOTF.



3 Fasergekoppelter AOTF und optisches Schema. Polychromatische Laserstrahlung wird an akustischen Wellen gebeugt. Die Strahlen, welche die Bragg-Bedingung erfüllen, verlassen den Kristall in einem gemeinsamen Winkel und können moduliert in eine PM-Faser eingekoppelt werden.

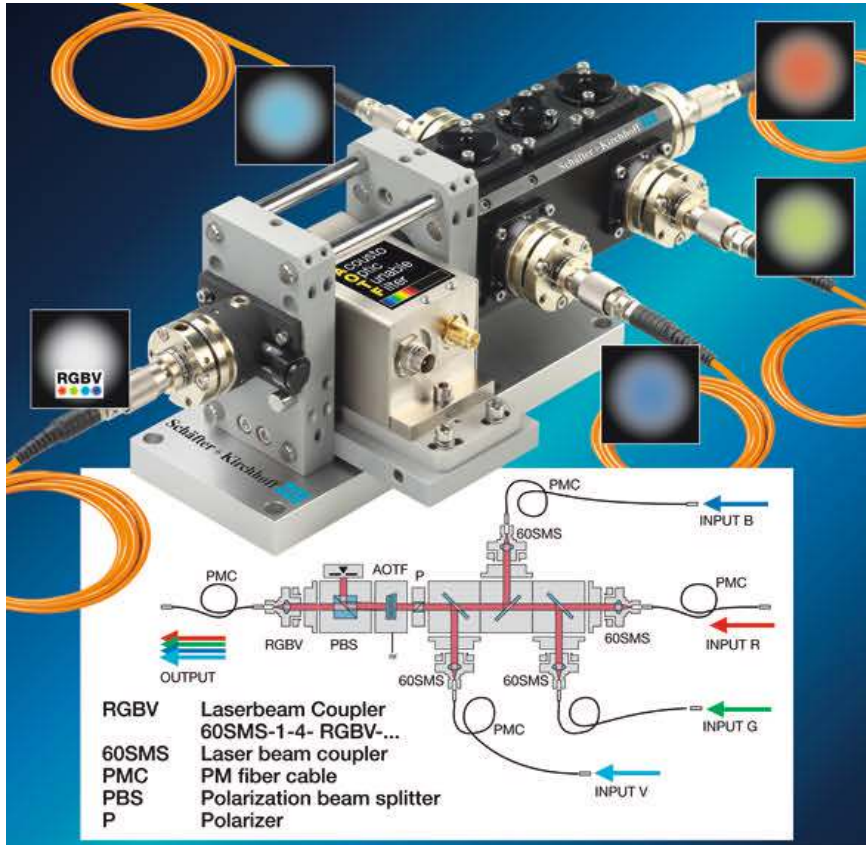
AOTF – ein durchstimmbarer akusto-optischer Filter

Bei vielen Anwendungen ist es notwendig, verschiedene Wellenlängen gezielt und mit hoher Frequenz (mehrere Hundert MHz) schalten zu können. AOTFs sind durchstimmbare akusto-optische Filter, die es bei geringen Schaltzeiten ermöglichen, mehrere Wellenlängenkanäle einzeln anzusprechen und zu modulieren.

Sie zeichnen sich weiterhin durch eine hohe Transmission und hohe Extinktion aus und sind langzeitstabil.

Ein AOTF (Bild 3) besteht aus einem optisch anisotropen Kristall, an den ein Piezoelement angebracht ist, welches eine akustische Welle erzeugt. Diese durchläuft den Kristall und erzeugt eine Art laufendes Brechungsindexgitter. Der Eingangsstrahl wird an diesem Gitter gebeugt (Bragg-Beugung). Die Amplitude der akustischen Welle bestimmt dabei die Intensität des gebeugten Strahls, die akustische Frequenz den Winkel, unter dem dieser gebeugt wird. Ein geringer Frequenzshift (einige MHz) erfolgt aufgrund von Energie- und Impulserhaltung. Werden gleichzeitig verschiedene akustische Frequenzen unterschiedlicher Amplitude an den AOTF angelegt, können die korrespondierenden optischen Wellenlängen gleichzeitig moduliert und geschaltet werden.

Meist wird der gebeugte Strahl 1. Ordnung verwendet. Dieser ist bei AOTFs, im Gegensatz zu AOMs, nicht dispersiv. Der Beugungswinkel ist für einen großen Wellenlängenbereich gleich, und das modulierte Licht kann anschließend in eine gemeinsame Faser eingekoppelt werden. Prinzipbedingt ist die maximale Modulationsfrequenz limitiert durch die Zeit, die die akustische Welle benötigt, um den gesamten Strahldurchmesser zu durchqueren (in etwa 110 bis 400 ns pro Millimeter Strahldurchmesser).



4 Ein RGBV Laser Beam Combiner kombiniert in diesem Fall vier Wellenlängen. Die Einkopplung in eine gemeinsame polarisationserhaltende Faser erfolgt über einen apochromatischen Laserstrahlkoppler.

RGBV-Faseroptik mit anschließendem AOTF

Das Schalten zwischen verschiedenen Wellenlängen kann direkt mit der Strahlüberlagerung kombiniert werden. Dies

macht eine Faserkopplung zwischen AOTF und Strahlkombination unnötig, erhöht den Durchsatz, und die zusätzlichen Freiheitsgrade beim Einkoppeln in den AOTF erhöhen die Koppelleffizienz in einem breiten Spektralbereich.

Im RGBV Laser Beam Combiner wird die durch PM-Faserkabel herangeführte Strahlung der einzelnen Laserstrahlquellen kollimiert, mittels dichroitischer Spiegel kombiniert und schließlich in die gemeinsame Ausgangsfaser eingekoppelt (vergleiche Schema in **Bild 4**). Aufgrund der Polarisationsabhängigkeit der dichroitischen Strahlkombinierer ist eine Einkopplung mit definierter Polarisation über eine PM-Faser wichtig. Die kollimierten Strahlen erreichen anschließend den AOTF in dem die Modulation der verschiedenen Wellenlängen erfolgt.

Zur Kollimation der Eingangsstrahlen werden ebenfalls Laserstrahlkoppler mit gegebenenfalls apochromatischem Objektiv benutzt (sollten mehrere Wellenlängen in eine Faser eingekoppelt worden sein). **Bild 4** zeigt einen RGBV Beam Combiner mit AOTF, welcher rotes, grünes, blaues und violettes Laserlicht von vier verschiedenen Quellen zu »weißem« Licht kombiniert und schaltet.

Die Transmissionen der verwendeten dichroitischen Kombinierspiegel (hier als Langpassfilter ausgelegt) legen fest, welche Wellenlängen miteinander kombiniert werden können. Im in **Bild 4** gezeigten Beispiel wurden diese an die nominellen Wellenlängen 405, 460/488, 532 und 630 nm angepasst. Der erste Dichroit spiegelt das grüne Licht ein und lässt das rote Licht mit hoher Transmission durch. Die folgenden zwei Dichroite spiegeln entsprechend das blaue und violette Licht ein, während die bereits kombinierten Wellenlängen hochtransparent transmittiert werden. Für jede Konfiguration in einem anderen Spektralbereich ist allerdings eine genaue Anpassung der Dichroite an die Wellenlängenkombination notwendig.

Der RGBV Laser Beam Combiner (mit anschließendem AOTF) bildet im Gegensatz zu entsprechenden Freistrahlssystemen eine stabile optomechanische Einheit. Der modulare Aufbau macht auch kleinere Einheiten möglich, die spezifisch auf die Kombination von entsprechenden Laserstrahlquellen und Wellenlängen optimiert sind. Nach vollständiger Kombination aller Wellenlängen wird das resultierende (modulierte) Licht über einen

Laserstrahlkoppler in eine breitbandige PM-Faser und dann definiert beispielsweise in ein Mikroskop eingekoppelt.

Fazit

Das Koppeln von Laserstrahlquellen in PM-Fasern stellt die Basis für eine effiziente Nutzung von Lasern bei Anwendungen in der Wissenschaft und in der Industrie dar. Solche können nach einer Strahlkombination als Lichtquellen für Fluoreszenzmikroskope eingesetzt werden und schaffen eine definierte Schnittstelle zwischen Lichtquelle und Mikroskop. Besonders empfindliche Messaufbauten (zum Beispiel zur Beobachtung von Motorproteinen) profitieren von einer räumlichen Trennung von Strahlquelle und Messsystem. Aufwendige und schwierig zu justierende Strahlumlenkungen entfallen. Ein hoher technischer Standard der optischen und mechanischen Komponenten ermöglicht langzeitstabile, modulare und kompakte faseroptische Systeme.

LITERATUR

- 1 www.laser-photonik.de/LP110060, siehe auch www.sukhamburg.com/produkte/faseroptik.html
- 2 www.mh-hannover.de/24164.html
- 3 M. Amrute-Nayak et al: »Inorganic phosphate binds to the empty nucleotide binding pocket of conventional Myosin II«, J Biol Chem. 283(7), S. 3773-3781, 2008
- 4 M. Amrute-Nayak et al: »Targeted optimization of a protein nanomachine for operation in biohybrid devices«, Angew Chem Int Ed Engl. 49(2), S. 312-316, 2010
- 5 A. Rump et al: »Myosin-1C associates with microtubules and stabilizes the mitotic spindle during cell division«, J Cell Sci. 124(15), S. 2521-2528, 2011
- 6 M.H. Hinrichs et al: »Tau protein diffuses along the microtubule lattice«, J Biol Chem., 27. Sept, 2012: doi:10.1074/jbc.M112.369785.

AUTOREN

Dipl.-Phys. ANJA KRISCHKE, Dr. ULRICH OECHSNER und Dr. CHRISTIAN KNOTHE arbeiten bei Schäfer+Kirchhoff an der Entwicklung hochwertiger optomechanischer und faseroptischer Systeme.

Prof. Dr. med. BERNHARD BRENNER und Dr. TIM SCHOLZ forschen am Institut für Molekular- und Zellphysiologie der Medizinischen Hochschule Hannover (MHH) an den molekularen Grundlagen von Bewegungs- und Transportprozessen im menschlichen Organismus.

■ www.laser-photonik.de

Online: **LP110176**