

Mikroskopie von Nervenzellaktivität im funktionierenden Gehirn

Benjamin F. Grewe, Universität Zürich, Schweiz
 Waldemar Staffel, Stefan Götz, Bernt Götz, piezosystem jena GmbH, Jena

Die Erforschung der Funktionsweise neuronaler Zellnetzwerke am intakten Gehirn war bisher aufgrund technischer Limitierungen nur begrenzt möglich. Erst die 3D-Laser-Scanning-Mikroskopie erlaubt Messungen neuronaler Netzwerkaktivitäten mit hoher räumlicher und zeitlicher Auflösung. Schnelle akustooptische und Piezo-Technologie-Verfahren ermöglichen dabei Echtzeitmessungen im Mikrometer-Millisekunden-Bereich.

Im menschlichen Gehirn wird die uns umgebende Welt mit allen darin enthaltenen Reizen in Form von definierten Erregungsmustern bestimmter vernetzter Gehirnzellen abgebildet. Die ankommenden Erregungsmuster werden anschließend in höheren Gehirnbereichen weiterverarbeitet, integriert und analysiert, was wiederum unter bestimmten Voraussetzungen zu einer Reaktion auf das Erregungsmuster bzw. zu einer resultierenden Handlung führen kann. Trotz der fundamentalen Bedeutung dieser neuronalen Zell-Aktivitäts-Codes ist wenig über die grundsätzlichen Eigenschaften und Wirkprinzipien der zugrunde liegenden Zell-Netzwerke bekannt. Der Grund hierfür ist einfach. Die Untersuchungen von Zell-

Aktivitäts-Mustern erfordern schnelle wiederholte Messungen vieler Neuronen am intakten Gehirn. Erst dann wäre es möglich, gezielt die Funktionsweise von Zellnetzwerken zu erfassen, zu analysieren und so die Reaktionen ganzer Netzwerke zu verstehen. Derartige Messungen sind jedoch technisch schwierig und blieben deshalb bisher oft rudimentär. Erst die Erfindung der 2-Photonen-Laser-Scan-Mikroskopie (2PLSM) – entwickelt von Webb und Denk Anfang der 90er Jahre [1] - ermöglichte als erstes bildgebendes Verfahren, Gehirnzell-Aktivität im funktionierenden Gehirn von Mäusen optisch zu messen. Bei diesem Verfahren wird ein fokussierter Laserstrahl Punkt für Punkt über ein zu messendes

fluoreszierendes Objekt gescannt und an jedem Punkt die Fluoreszenz gemessen. Das Resultat ist - ähnlich wie bei Röhrenfernsehern - ein aus Pixeln zusammengesetztes Bild des gescannten Objekts oder des gescannten Hirnareals (**Bild 1**). Werden nun die Neuronen im Gehirn zuvor mit einem Fluoreszenzindikator gefärbt - üblicherweise ein organischer, kalziumsensitiver Farbstoff, der seine Fluoreszenzstärke bei steigender Kalziumkonzentration ändert - können elektrische Aktivitäten der Gehirnzellen, sogenannte Aktionspotentiale, indirekt über intrazelluläre Fluoreszenzänderungen des Indikators sichtbar gemacht werden.

Da sich die Kommunikation unter den Neuronen jedoch innerhalb einiger Millisekunden abspielt, waren Echtzeitmessungen der Gehirnzell-Aktivität in drei Dimensionen mittels 2PLSM bisher - oft auch wegen der zeitlichen Auflösung des Laser-Scanners - nur mit einigen Hz möglich [2, 3]. Erst neuartige 2PLSM-Verfahren, welche akustooptische Laser-Scanner (AODs) verwenden, ermöglichen schnelle, vorerst aber nur zweidimensionale Messungen neuronaler Aktivität mit bis zu 500 Hz [4]. Um jedoch ein komplettes neuronales Netzwerk zu erfassen, muss der Messbereich auf ein Volumen erweitert werden, welches zumindest im 100 Hz Takt gemessen wird. Der Flaschenhals für die 3D-Scanrate war bisher üblicherweise der mechanische Z-Scanner am Objektiv, der den Laserfokus axial zum eigentlichen Laserstrahl bewegt.

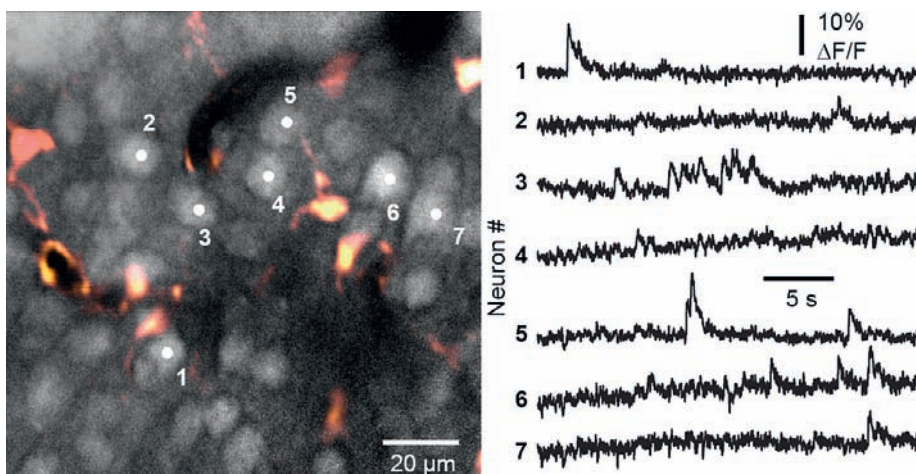


Bild 1: Neuronale Zellpopulation im Neokortex einer Maus (links). Die Aktivität der Neuronen wird indirekt über einen kalziumsensitiven Farbstoff gemessen, der bei zunehmender intrazellulärer Kalziumkonzentration (aktive Zelle) seine Fluoreszenzeigenschaften ändert. Die rechts gezeigten relativen Fluoreszenzsignale ($\Delta F/F$) verdeutlichen die Aktivität der mit weißen Punkten markierten Zellen. Zusätzlich wurde ein anderer Zelltyp, sogenannte Astrozyten mit einem roten, nicht kalziumsensitiven Farbstoff angefärbt. Die Zellaktivitätsmessungen wurden vorerst in 2D mit einer Messgeschwindigkeit von 298 Hz durchgeführt. Abbildung geändert nach [4]

Schnelles AOD-basiertes 2-Photonen-Laser-Scanning-Mikroskop

Bei der 2-Photonen-Mikroskopie wird mittels eines starken, fokussierten Laserstrahls ein nichtlinearer optischer Effekt erzeugt, bei dem gleichzeitig zwei (oder auch meh-

rene) Photonen von einem Molekül (z.B. einem fluoreszenten Farbstoff) absorbiert werden können. Die Wellenlänge des verwendeten Laserlichts liegt dabei im infraroten (IR) Bereich bei 720-900 nm. Die Energie zur Anregung des Farbstoffes wird durch Absorption zweier Photonen halber Energie bzw. doppelter Wellenlänge erreicht. Die Intensität des erzeugten Fluoreszenz-Signals steigt dabei mit der Zahl der eingestrahlenen Photonen zum Quadrat. Die Ablenkung des Laserstrahls erfolgt nicht über träge Spiegel sondern über zwei orthogonal angeordnete akustooptische Kristalle mit zusätzlicher Dispersions-Kompensation. Obwohl die Scantechnik dabei sehr der eines konfokalen Laser-Scanning Mikroskops ähnelt, hat die 2-Photonen-Technik hinsichtlich der Anwendungen in vivo, also am funktionierenden Gehirn, entscheidende Vorteile:

- Hohe Eindringtiefe – aufgrund der geringen Streuung und Absorption des IR-Laserlichts können mit der 2-Photonen Mikroskopie-Technik Scantiefen von mehreren hundert Mikrometern bis hin zu einem Millimeter erreicht werden.
- Gewebeschonung und weniger Ausbleichen von Fluoreszenzfarbstoffen – durch Anregung des Fluoreszenzfarbstoffes nur innerhalb eines extrem kleinen Fokuspunktes. Ebenen über und unter der Fokusebene sind nicht von Bleicheffekten betroffen und werden zudem nicht zusätzlich durch z.B. phototoxische Effekte belastet. Ein weiterer Vorteil ist, dass das umliegende Gewebe durch den Einsatz eines infraroten Laserstrahls (halbe Wellenlänge) weniger thermischer belastet wird.
- 3D-Mikroskopie möglich – da die gesamte Fluoreszenz nur innerhalb eines Fokuspunktes angeregt wird, ist es bei axialer Verschiebung des Fokuspunktes auch möglich, sequentiell verschiedene Z-Ebenen der Probe zu scannen.

Um eine hohe Photonendichte im Fokuspunkt zu erreichen, ist die Basis eines jeden 2-Photonen-Mikroskops (**Bild 2**) ein durchstimmbarer Kurzpuls-Laser, üblicherweise ein Titanium-Saphire(Ti:Sa)-Laser mit Pulsdauern im Bereich von 80-140 fs. Ein Scankopf führt den Laserstrahl mittels akustooptischen Kristallen über das zu untersuchende Objekt. Die Fokussierung des Laserstrahls auf einen Punkt übernimmt eine spezielle Scanoptik, bestehend aus einer Scanlinse, einer Tubuslinse und einem Objektiv. Das durch einen dichroitischen Strahlteiler (üblicherweise Langpass, z.B. LP750) vom infraroten Laserlicht getrennte Fluoreszenzlicht wird auf den Photodetektor (PMT) gelenkt. Innerhalb des Detektors ist es dann möglich, mit weiteren dichroitischen Spiegeln die einzelnen Wellenlängenbereiche separiert zu detektieren, welche den parallelen Einsatz

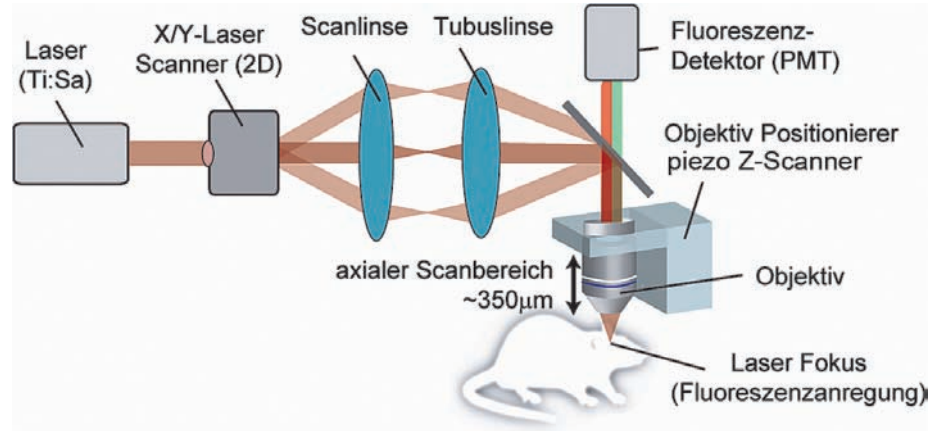


Bild 2: Vereinfachter Aufbau eines 2-Photonen-Laser-Scanning-Mikroskops, mit dem sich die neuronale Aktivität im Gehirn einer Maus mit hoher räumlicher und zeitlicher Auflösung messen lässt

verschiedener Farbstoffe zur Markierung spezieller Zelltypen im Gehirn ermöglichen.

Schnelles Scannen in der dritten Dimension

Um nun die Kalziumfluoreszenzsignale mehrerer hundert Neuronen - welche in drei Dimensionen angeordnet sind - zu messen, wird das Laser-Scanning Verfahren um die dritte Dimension entlang der Z-Achse erweitert. Ein sinusförmig schwingendes Mikroskopobjektiv, synchronisiert mit einem schnellen 2D-Scanner des Mikroskops, ermöglicht, mit dem Fokus des Laserstrahls wiederholt ein abgeschlossenes Scan-Areal in 3D zu scannen (**Bild 3**). Mit Hilfe dieser neuartigen Methode des räumlichen Messens in drei Dimensionen können die Funktions-

weisen neuronaler Informationsverarbeitung sowohl bei einzelnen Zellen als auch auf dem Niveau von vielen vernetzten Neuronen in drei Dimensionen untersucht werden.

Die Z-Scan-Technologie

Die wichtigsten Anforderungen an den Z-Scanner lassen sich in vier grundlegenden Punkten zusammenfassen:

- großer axialer Scan-Bereich
- hohe Bewegungsgeschwindigkeit (Frequenz, Amplitude)
- geringer Einfluss einer zusätzlichen Objektivmasse auf die Schnelligkeit der Bewegung
- hohe Führungsgenauigkeit bzw. geringe Verkipfung.

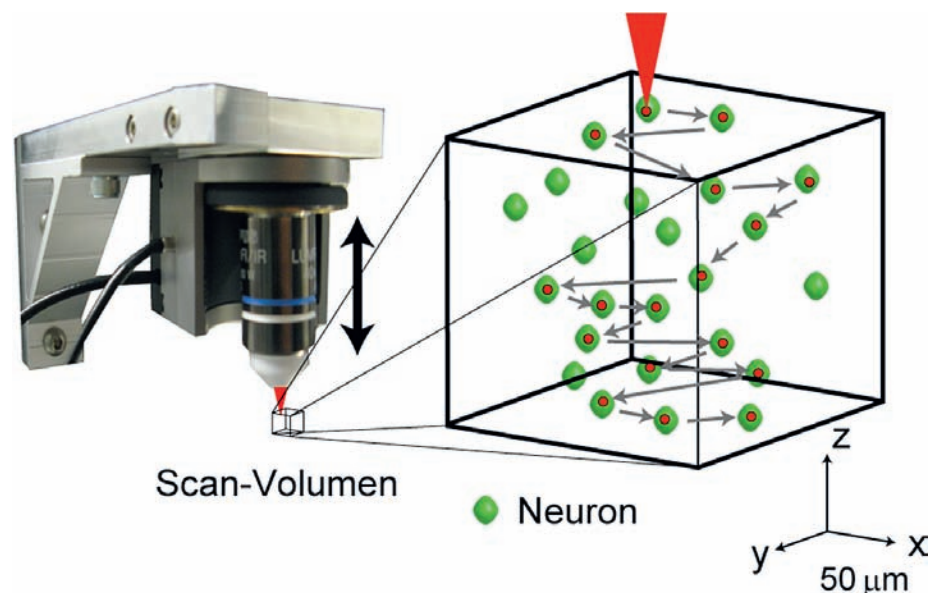


Bild 3: Kombiniert man ein schnelles 2-dimensionales akustooptisches Scanverfahren mit einem schnellen Z-Scanner, kann die Aktivität mehrerer Neuronen auch in 3D mit einer hohen zeitlichen Auflösung gemessen werden

Dazu sollte das Z-Scan-Element eine hohe Eigenfrequenz und eine hohe Steifigkeit besitzen. Diese Eigenschaften können sowohl durch das Design als auch durch das Antriebsprinzip beeinflusst werden. Immer wenn schnelle Bewegungen zusammen mit hohen Antriebskräften und hoher Steifigkeit gefragt sind, führt kaum ein Weg an einem piezo-betriebenen Positionierer vorbei.

Zusammenfassung und Ausblick

Das hier vorgestellte neue Laserscanverfahren ermöglicht erstmals im Rahmen der 2-Photonen-Mikroskopie schnelle funktionelle Aufnahmen neuronaler Netzwerkdy- namik im intakten Gehirn. Die Methode nutzt dabei die neusten Fortschritte bei der Anfärbung von Neuronen mit fluoreszen- ten Kalziumindikatoren aus, um neuronale

Aktionspotentiale besser messbar bzw. sichtbar zu machen. Bei diesen Messungen ist es wichtig, die Empfindlichkeit der Fluoreszenzaufnahme soweit zu verbessern, dass möglichst jedes einzelne Aktionspotenzial, also jedes einzelne neuronale Signal detektiert wird. Da Neuronen sehr schnell kommunizieren, ist es zudem entscheidend, die zelluläre Aktivität mit hoher zeitlicher Auflösung zu erfassen. Nur die Kombination aus Messsensitivität und Messschnelligkeit erlaubt eine komplette quantitative Charakterisierung der Netzwerkdy- namik. Dazu zählt beispielsweise die Analyse von Korrelationen zwischen einzelnen Neuronen in kleinen neuronalen Netzwerken in Echtzeit.

Bisher war jedoch die Zeitauflösung von 3D-Laserscanningmethoden auf etwa zehn Messungen pro Sekunde beschränkt [5]. Im Gegensatz dazu erreichen 2D-Laserscanningverfahren schon heute eine Zeitauf- lösung von mehreren hundert Messungen pro Sekunde [4]. Unter Verwendung von AOD-Scan-Kristallen in Verbindung mit der neuen Piezo-Z-Scan-Technologie soll es in Zukunft möglich sein, neuronale Aktivität in 3-Dimensionen mit noch höheren Messra- ten zu untersuchen (Bild 4). Die Ergebnisse könnten bspw. für das Verständnis neuro- naler Oszillationen oder synaptischer Plas- tizität von großer Bedeutung sein. Ein wei- teres Ziel ist die Unterscheidung bestimmter Zelltypen, insbesondere der hemmenden Interneuronen, z.B. mit Mithilfe genetischer Fluoreszenzmarker [6]. Weitere zukünftige Anwendungen der hier vorgestellten 2-Pho- tonen-Scan-Methode könnten sich auch in Verbindung mit neuartigen, genetisch codierten lichtaktivierbaren Ionenkanälen

ergeben [7]. Mittels dieser Proteine könnten Erregungszustände eines neuronalen Netz- werkes nicht nur gemessen sondern auch optisch direkt beeinflusst werden.

Abschließend lässt sich sagen, dass wei- tere rasante Fortschritte bei neuronalen Netzwerkmessungen zu erwarten sind. Die Entwicklungen von Fluoreszenzindikatoren und neuartigen und schnellen Mikroskopi- techniken spielen dabei eine bedeutende Rolle. Eine präzise und detaillierte Analyse der neuronalen Netzwerkdy- namiken, basie- rend auf Messungen am funktionierenden Gehirn, wird zum besseren Verständnis der Funktionsweise des Gehirns beitragen.

Literaturhinweise:

- [1] W. Denk, J. H. Strickler, W. W. Webb, *Two-photon laser scanning fluorescence microscopy*, Science, 1990, 248, 73-76
- [2] J. N. Kerr, D. Greenberg, F. Helmchen, *Imaging input and output of neocortical networks in vivo*, Proc Natl Acad Sci U S A, 2005, 102, 14063-14068
- [3] B. F. Grewe, F. Helmchen, *Optical probing of neuronal ensemble activity*, Curr Opin Neurobiol, 2009, 19, 520-529
- [4] B. F. Grewe, D. Langer, H. Kasper, B. M. Kampa, F. Helmchen, *High-speed in vivo calcium imaging reveals neuronal network activity with near-millisecond precision*, Nat Methods, 2010, 7, 399-405
- [5] W. Gobel, B. M. Kampa, F. Helmchen, *Imaging cellular network dynamics in three dimensions using fast 3D laser scanning*, Nat Methods, 2007, 4, 73-79
- [6] K. Sohya, K. Kameyama, Y. Yanagawa, K. Obata, T. Tsumoto, *GABAergic neurons are less selective to stimulus orientation than excitatory neurons in layer II/III of visual cortex, as revealed by in vivo functional Ca2+ imaging in transgenic mice*, J Neurosci, 2007, 27, 2145-2149
- [7] F. Zhang, A. M. Aravanis, A. Adamantidis, L. de Lecea, K. Deisseroth, *Circuit-breakers: optical technologies for probing neural signals and systems*, Nat Rev Neurosci, 2007, 8, 577-581

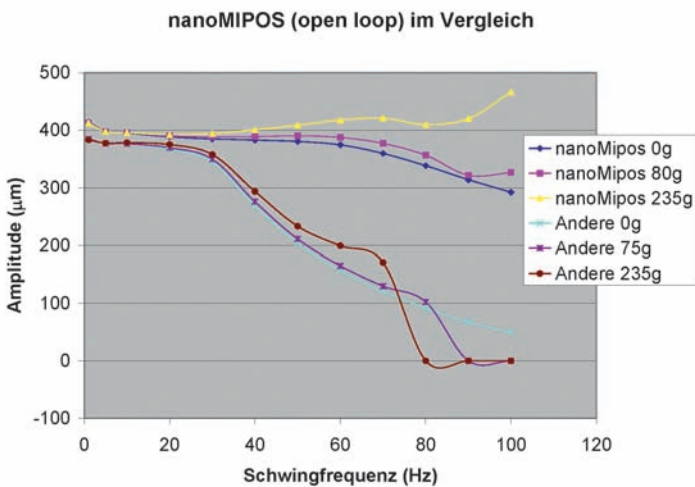


Bild 4: Vergleich der Frequenzverhalten von Positionierern bei verschiedenen Objektivgewichten, aufgetragen sind Schwingamplituden oder Hubamplituden über Schwingfrequenz

Für den hier vorgestellten Anwendungsfall wurde der Objektivpositionierer nanoMIPOS 400 in Verbindung mit der schnellen Ansteuerungselektronik 30V300 nanoX eingesetzt. Das bidirektionale Antriebsprinzip sorgt für eine hochfrequente Zug- und Schiebebewegung. Der nanoX-Verstärker ermöglicht einen Dauerstrom von 300 mA bei einer niedrigen Restwelligkeit des Ausgangssignals von max. 0,3 mV (RMS). Präzise elektrische Ansteuerungen sind Voraussetzung für Auflösungen im Nanometer- und Sub-Nanometer-Bereich. Der vergleichsweise hohe Dauerstrom ermöglicht zudem, das System bei hohen Frequenzen oszillatorisch zu betreiben. Ein Einfluss auf die Positionsgenauigkeit der äußerst sensiblen und empfindlichen Messungen wurde nicht festgestellt. **Bild 4** zeigt das Frequenzverhalten verschiedener Objektivpositionierer [5] im Vergleich. Aus den ermittelten Frequenzgängen der hier verglichenen Positioniersysteme bei unterschiedlichen Objektivgewichten lässt sich der unterschiedliche Arbeitsbereich der Systeme erkennen. Ein deutlicher Anstieg des Hubes in der Kurve bei >80 Hz ist auf die besonders hohe Resonanzfrequenz des von uns verwendeten Systems zurückzuführen.

Ansprechpartner:

Dr. Benjamin F. Grewe
Institut für Hirnforschung,
Abt. Neurophysiologie
Universität Zürich,
Winterthurerstraße 190,
CH-8057 Zürich
Tel.: +41 44 / 635 3328
Fax: +41 44 / 635 3303
E-Mail: grewe@hifo.uzh.ch



Waldemar Staffel
Sales & technical support
piezosystem jena GmbH
Pruessingstraße 27
D-07745 Jena, Germany
Tel: 03641 / 6688-33
Fax: 03641 / 6688-66
E-Mail: WStaffel@piezोजना.com

