

Optoakustische Bildgebung

Schallschalter: Photoschaltbare Reporter und Sensoren in der Optoakustik

SIMON GÖLLNER, KANUJ MISHRA, ANDRE C. STIEL
ARBEITSGRUPPE CELL ENGINEERING AM INSTITUT FÜR BIOLOGISCHE UND
MEDIZINISCHE BILDGEBUNG (IBMI), HELMHOLTZ ZENTRUM MÜNCHEN

Optoacoustic imaging offers a unique combination of observation volume and achievable resolution *in vivo*. However, the use of transgene labeling agents has been impractical because their signal is low compared to the background of the tissue. Thus, detection was limited to large numbers of cells. We tackle this problem by using switchable agents – switching creates a signal modulation which allows to separate the labeled cells from the constant background – making it virtually invisible.

DOI: 10.1007/s12268-022-1861-z
© Die Autoren 2022

■ Bildgebende Verfahren, insbesondere solche, die in lebenden Organismen durchgeführt werden können, also *in vivo*, ermöglichen den modernen Lebenswissenschaften wichtige Einblicke in Anatomie, physiologische Prozesse und zelluläre Funktionen. Solche Einblicke dienen sowohl dem grundlegenden funktionalen Verständnis als auch der Erforschung pathologischer Zustände und der Entwicklung entsprechender Therapien. Hier spielen *in vivo*-Bildgebungsverfahren eine besondere Rolle, da sie es ermöglichen, dynamische Veränderungen – z. B. im Rahmen einer therapeutischen Intervention – zu visualisieren und damit besser zu verstehen. Optoakustik ist hier eine spannende Methode, da sie eine einzigartige Kombination aus dem zu beobachtenden Volumen (z. B. eine ganze Geweberegion) und der Auflösung bietet. Bisher gab es jedoch einen gravierenden Nachteil für die Anwendung in den Lebenswissenschaften. Markierungsstoffe für Zellen, die von diesen selbst hergestellt werden (genetisch codiert) waren bisher impraktikabel, da ihr Signal gering ist, im Vergleich zum sehr starken Hintergrund des Gewebes, der z. B. durch Blut verursacht wird. Dadurch war nur die Detektion einer sehr großen Anzahl von Zellen möglich. Wir lösen dieses Problem, indem wir schaltbare Markierungsstoffe verwenden –

durch das Schalten erreichen wir eine wiederholte zeitliche Änderung des Signals (Modulation), welche es uns erlaubt, die Signale der Zellen vom konstanten Hintergrund zu trennen – der Hintergrund wird quasi unsichtbar.

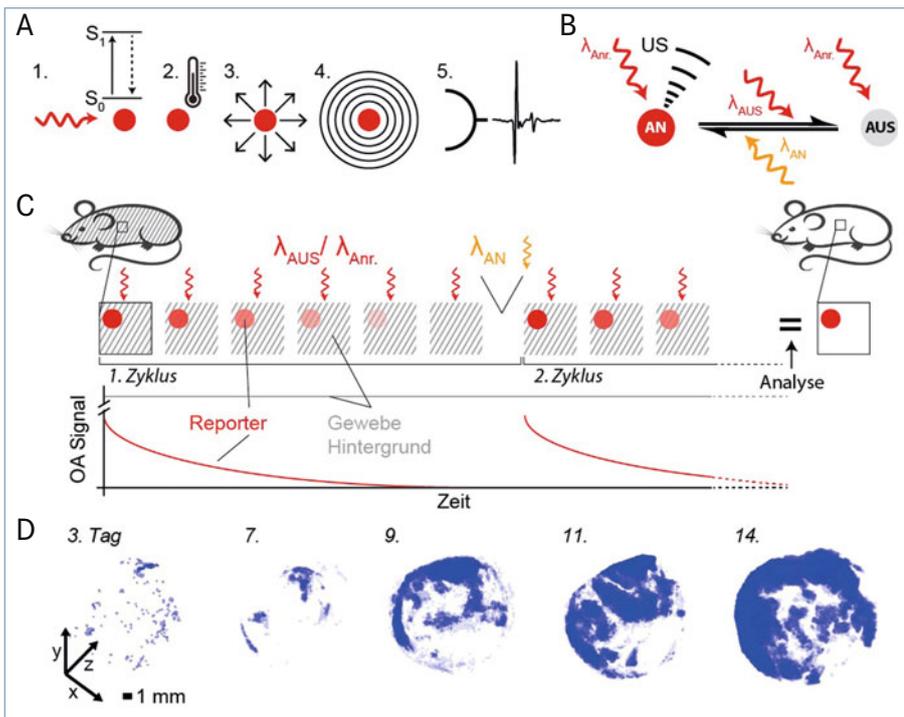
Optoakustische Bildgebung – tiefer sehen mit Licht und Schall

Unter den *in vivo*-Bildgebungsverfahren ist die Optoakustik (auch Photoakustik genannt) eine spannende und relativ neue Methode. Die Optoakustik nutzt die Vorteile der Anregung durch Licht, nämlich die wellenlängenabhängigen spezifischen Absorptionseigenschaften eines Moleküls, vermeidet aber gleichzeitig das generell schlechte Verhältnis aus Eindringtiefe und Auflösung von vollständig optischen Methoden [1]. Bei rein optischen Methoden ist die Tiefe im Gewebe, in der noch Strukturen mit einer gewissen Auflösung visualisiert werden können, begrenzt. Zellen können beispielsweise nur in Tiefen bis zu 100 Mikrometern und mit speziellen Multiphotonentechniken bis zu ungefähr 700 Mikrometern aufgelöst werden. Jenseits dieser Tiefe nimmt die Auflösung vollständig optischer Methoden aufgrund der Streuung des Lichts rapide ab, sodass z. B. bei der Visualisierung von Bereichen im Inneren einer Maus mit der Ganz-

tierfluoreszenz- oder Biolumineszenzbildgebung nur Auflösungen von wenigen Millimetern üblich sind. Solche Auflösungen ermöglichen es nicht, zelluläre Zusammenhänge im Gewebe zuverlässig zu erkennen, um z. B. die Migration und Ko-Lokalisation von Zellen des Immunsystems im ganzen Versuchstier zu verfolgen. Die optoakustische Bildgebung umgeht dieses Problem, indem sie das Licht nur für die Anregung nutzt, aber Ultraschall detektiert. Ultraschall wird in weitaus geringerem Maße im Gewebe gestreut und absorbiert und erlaubt daher eine höhere Auflösung im tieferen Gewebe. Der Ultraschall entsteht, wenn Licht von Chromophoren aufgenommen wird und die Energie nicht nur als Fluoreszenz wieder emittiert wird, sondern auch als Wärme freigesetzt wird. Der winzige Temperaturanstieg führt zu einer Ausdehnung der Umgebung; unter den extrem kleinen räumlichen (Nanometer) und zeitlichen Bedingungen (Nanosekunden) führt dies zu einer Ultraschallwelle, welche detektiert werden kann (**Abb. 1A**). Dieses Phänomen trifft sogar auf die Mehrzahl der natürlichen Chromophore zu, von denen nur die wenigsten Fluoreszenzeigenschaften zeigen. Ein sehr gutes optoakustisches Signal und damit Kontrast bietet z. B. der rote Blutfarbstoff (Hämoglobin), andere „natürliche“ (endogene) Kontraste in der Optoakustik stammen von dem Pigment Melanin oder von Fettmolekülen ab [2].

Photoschaltbare Proteine ermöglichen es, den Hintergrund unsichtbar zu machen

Ein weiterer Vorteil der optischen Anregung ist die Möglichkeit, Naturstoffe wie Pigmente, aber hauptsächlich chromophortragende Proteine als Markierungsstoffe zu nutzen. Solche natürlichen Substanzen können oft genetisch codiert werden, d. h., man sorgt durch Veränderung des genetischen Codes dafür, dass die Synthese des Markierungsstoffs von der Zelle übernommen wird. Damit sind z. B. genetisch veränderte Labortiere möglich, welche die Bildgebung spezifischer markierter Zellgruppen über ihr



▲ **Abb. 1:** Photoschalten in der optoakustischen Bildgebung. **A**, Prinzip der Optoakustik: 1. Anregung des Chromophors und nicht radiative Abregung, 2. Erhöhung der lokalen Temperatur durch nicht radiative Relaxation des angeregten Chromophors, 3. Expansion der umgebenden Lösung durch die Erwärmung, 4. Entstehung von Ultraschall und 5. Detektion des Ultraschalls. **B**, Prinzip des Photoschaltens. Ein Chromophor kann durch Licht bestimmter Wellenlängen ($\lambda_{AN}/\lambda_{AUS}$) reversibel zwischen einem AN- und AUS-Zustand geschaltet werden. Im AN-Zustand kann der Chromophor angeregt werden ($\lambda_{Anr.}$) und die Anregung führt zu einem Signal. Hier dargestellt ist Ultraschall (US), aber genauso gut möglich ist Fluoreszenzemission. **C**, Prinzip der Signaltrennung in der Optoakustik mittels Photoschaltens. Normalerweise ist das Signal des Gewebehintergrunds (grau) wesentlich stärker als das Signal der markierten Zellen. Durch Modulation des Signals der mit photoschaltbaren Markierungstoffen markierten Zellen (Reporter), hier schematisch für 2 Zyklen gezeigt, lässt sich das Signal vom Hintergrund trennen und macht letzteren quasi unsichtbar. **D**, optoakustische Tomographie (Zusammenarbeit mit Vasilis Ntziachristos, TUM & Helmholtz Munich) einer Maus mit implantierten HCT 116-Darmtumorzellen, markiert mit einem photoschaltbaren Protein. Eine Visualisierung auch kleiner Tumore ist möglich und damit die Verfolgung ihrer Entwicklung und Therapie in der Forschung. Aus [7].

gesamtes Leben ohne weitere äußere Einflussnahme zulassen. Zu den bekanntesten Markierungsproteinen zählen die fluoreszierenden Proteine (Nobelpreis Chemie 2008, [3]), insbesondere das grün fluoreszierende Protein (GFP). Die Nutzung solcher Markierungsstoffe stellt in der Optoakustik aber eine Herausforderung dar. Dies liegt daran, dass zwar z. B. Hämoglobin eine sehr gute Visualisierung des Gefäßnetzwerks mittels Optoakustik ermöglicht, gleichzeitig das entstehende Signal aber auch ein starker Hintergrund für die Visualisierung von spezifischen Zellen oder Gewebe auf der Basis von Markierungsstoffen darstellt. Daher konnten bisher die hohe Auflösung und der intrinsische anatomische Kontrast (Gefäße) der optoakustischen Bildgebung nicht effektiv im Zusammenhang mit markierten Zellen

genutzt werden. Hier haben wir (und parallel eine amerikanische Gruppe von Forschern) eine Lösung gefunden. Diese Lösung nutzt eine spezielle Klasse solcher proteinbasierter Kontrastmittel, die photoschaltbaren Proteine [4]. Diese Proteine können reversibel zwischen einem AN-Zustand, indem ein Signal sichtbar ist, und einem AUS-Zustand mit Licht verschiedener Wellenlängen geschaltet werden (**Abb. 1B**). Die Schalteigenschaft dieser Proteine konnte schon einmal einen entscheidenden Beitrag zur Entwicklung der Bildgebung leisten, da die Proteine in der hochauflösenden Fluoreszenzmikroskopie eingesetzt werden können (Nobelpreis Chemie 2014, [5]). Das Problem des Hintergrundsignals in der Optoakustik lösen wir, indem wir das Signal der mit schaltbaren Proteinen markierten Zellen AN

und AUS schalten. Damit wird eine zeitliche Modulation des Signals erzeugt, die eine Trennung vom Signal der intrinsischen Kontraste ermöglicht, welches keine (lichtabhängige) Modulation zeigt (Hämoglobin etc., **Abb. 1C**, [6]). Mit der Verbindung von photoschaltbaren Proteinen als Markierungstoff und Optoakustik können wir markierte Tumore im Inneren der Maus mit hoher Auflösung visualisieren (**Abb. 1D**, [7]). Aktuell liegt die Sensitivität noch in Bereichen von tausenden von Zellen [8], aber wir arbeiten fortwährend an einer Optimierung der Sensitivität bis hin zu nur wenigen markierten Zellen. Solche hochsensitiven *in vivo*-Methoden mit hoher Auflösung sind u. a. eine Möglichkeit, verbesserte Einblicke in immunologische oder entwicklungsbiologische Prozesse zu erhalten.

Proteinengineering erlaubt es, Proteine den Bedürfnissen anzupassen

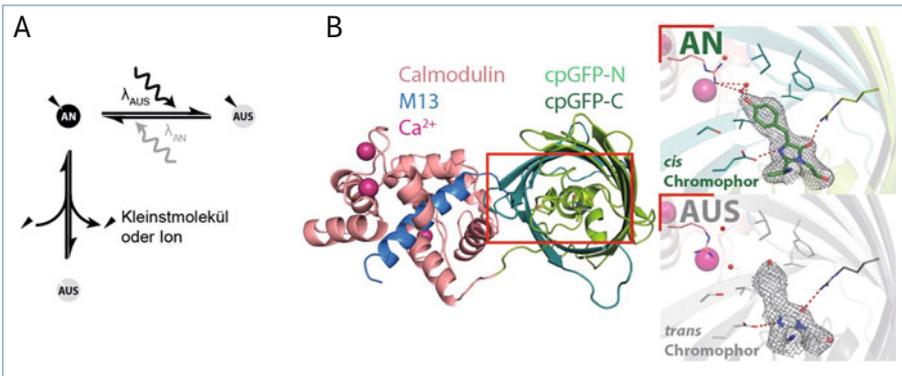
Ein entscheidender Beitrag für diese Entwicklung und einer der Schwerpunkte unserer Arbeit ist die Weiterentwicklung der photoschaltbaren Markierungstoffe in Bezug auf Signal, Schaltverhalten und Stabilität. Bei den für die Optoakustik relevanten photoschaltbaren Markierungsproteinen handelt es sich hauptsächlich um Bacteriophytochrome. Diese sind aufgrund ihrer Absorption im Nahinfraroten besser für die Bildgebung in Geweben geeignet, da das Gewebe selbst dort kaum absorbiert. Wir nutzen dazu Protein Engineering, d. h., wir verändern die Proteine gezielt, um damit ihre Eigenschaften für die Optoakustik zu verändern. Wir betreiben diese Entwicklung durch eine Kombination von randomisierten Veränderungen und Screening (in Analogie *directed evolution* genannt). Flankiert wird diese Strategie durch Spektroskopie, welche es uns ermöglicht, über die Absorptions-, Fluoreszenz- und optoakustischen Spektren die photophysikalischen Konsequenzen der Mutationen besser zu verstehen und damit interessante Aminosäurepositionen im Protein immer mehr „einzukreisen“. Wir arbeiten dabei auch stark mit der Strukturbiologie zusammen, um durch die Röntgenstrukturanalyse interessanter Proteinvarianten auch strukturelle Rückschlüsse ziehen zu können.

Sensoren zur Visualisierung von Kleinstmolekülen und Ionen

Genetisch codierte Markierungsstoffe, welche die Visualisierung von Zellen oder

Hier steht eine Anzeige.





▲ **Abb. 2:** Photoschaltbare Sensoren. **A**, Prinzip photoschaltbarer Sensoren. Der Sensor kann nur geschaltet werden, wenn das Zielmolekül (schwarzes Dreieck) gebunden ist. **B**, strukturelle Veränderungen beim Photoschalten des Sensorprototyps (Zusammenarbeit mit Dierk Niessing, Universität Ulm & Helmholtz Munich). Der Schaltvorgang basiert auf einer cis/trans-Isomerisierung und ist bei vielen anderen schaltbaren Markierungsproteinen ähnlich. Links ist die gesamte Struktur im AN-Zustand dargestellt, rechts Vergrößerungen der Chromophorregion im AN- und AUS-Zustand. Aus [10].

zellulären Strukturen ermöglichen, sind ein entscheidender Aspekt zum Verständnis der Abläufe in Zellen oder ganzen Organismen. Ein zweiter Aspekt ist die Visualisierung der unzähligen Ionen und Kleinmoleküle, welche den Metabolismus und die intra- und extrazelluläre Kommunikation, Signalweiterleitung und Verarbeitung ermöglichen. Nur ein Verständnis der strukturellen und der funktionalen Komponente erlaubt uns ein vollumfängliches Bild des Lebens. Eine elegante Möglichkeit zur Visualisierung der dynamischen Verteilung von Ionen und Kleinmolekülen sind die genetisch codierten Sensoren [9]. Dies sind sozusagen konditionale Markierungsstoffe, d. h. nur in Anwesenheit des Zielmoleküls kann ein Signal detektiert werden, während sie in seiner Abwesenheit „unsichtbar“ sind. Bisher waren solche Sensoren auf z. B. klassische Fluoreszenzbildgebung beschränkt, jedoch haben wir in unserer neuesten Arbeit die konditionale Eigenschaft der Sensoren mit dem Konzept des Photoschaltens kombiniert (**Abb. 2A** und **B**). Anhand eines Prototyps für einen Calciumsensor, der nur in Anwesenheit von Calciumionen photoschaltbar ist, konnten wir zeigen, dass auch genetisch codierte Sensoren für die Trennung vom Hintergrundsignal in der Optoakustik genutzt werden können (**Abb. 3A**, [10]).

Mit dem photoschaltbaren Calciumsensor schließt sich auch der Kreis zur hochauflösenden Fluoreszenzmikroskopie. Diese ermöglicht es, mit Auflösungen weit unterhalb von 200 Nanometern (Beugungsgrenze) die zellulären Strukturen besser zu beobachten und zu verstehen. Unser Sensorkonzept

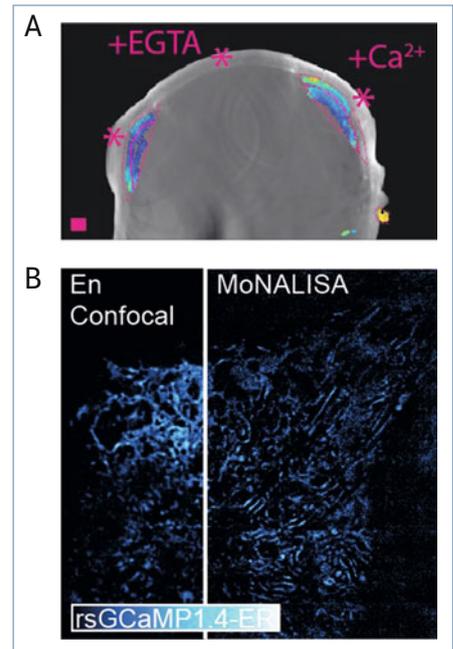
ist nun einer der ersten Schritte, die hochauflösende Mikroskopie auch für die Visualisierung der Verteilung von Ionen und Kleinmolekülen in der Zelle mit Auflösungen jenseits der Beugungsgrenze zu nutzen (**Abb. 3B**). Hier besteht die Annahme, dass auch diese Verteilung zeitlich sowie räumlich in der Zelle organisiert ist und entscheidend zu ihren Funktionen beiträgt.

Ausblick

In Zukunft werden wir das Konzept photoschaltbarer Sensoren weiterverfolgen, um zum einen Sensoren mit anderen Zielmolekülspezifitäten zu konstruieren und zum anderen die Sensoren (im Gegensatz zu unseren konzeptionellen Prototypen) für die jeweilige Bildgebung anzupassen. Bei unserem Prototyp handelt es sich um einen Sensor auf der Basis GFP-ähnlicher Proteine, welcher für die Anwendung im Gewebe durch die geringe Eindringtiefe von Licht im blauen Spektralbereich noch nicht ideal ist. Einer der nächsten Schritte wird es sein, das Konzept schaltbarer Sensoren auf nahinfrarote Bacteriophytochrome zu übertragen. Wir hoffen, durch diese Technologie in den nächsten Jahren die Möglichkeit zu haben, die Verteilung bestimmter Metabolite in Tumoren zu visualisieren. Damit ließen sich z. B. Phänomene der regionalen Ineffektivität von CAR-T-Therapien erforschen und zur Entwicklung optimierter Verfahren beitragen.

Danksagung

Die Autoren danken Klaudia Winkler, Sooruban Shanmugaratnam und Anna Fuchs für



▲ **Abb. 3:** Exemplarische Nutzung photoschaltbarer Sensoren für die Visualisierung spezifischer Moleküle, hier Calcium. **A**, Zur Demonstration der Nutzung in der Optoakustik wurden Tumorzellen, die den Sensor (rsGCaMP1.1) exprimieren, subkutan in einer Maus implantiert (Positionen mit * markiert). Dabei wurden die Zellen entweder zusammen mit Calcium, zusammen mit dem Calcium Chelatier EGTA oder unbehandelt implantiert. Nur die Implantate mit Calcium sind sichtbar; wobei ohne Behandlung das zelluläre Calcium ausreicht. **B**, hochauflösende Fluoreszenzmikroskopie (MoNALISA, Zusammenarbeit mit Ilaria Testa, KTH) unter Nutzung des photoschaltbaren Calciumsensors (hier rsGCaMP1.4-ER). Der Sensor wurde mittels einer Signalsequenz in das endoplasmatische Retikulum lokalisiert. Dort kann eine Auflösung unterhalb der Beugungsgrenze aufgrund des vorhandenen Calciums – und damit Photoschaltens des Sensors – beobachtet werden. Die Hoffnung ist, dass mit besseren Versionen des Sensors (diese ist noch relativ „dunkel“) subzelluläre Calciumverteilungen mit Auflösungen jenseits des Beugungslimits aufgelöst werden können. Maßstab 1 mm (B) und 5 µm (C). Aus [10].

ihre kritischen Anmerkungen zum Manuskript. Arbeiten von Andre C. Stiel und der Arbeitsgruppe Cell Engineering werden gefördert durch die Deutsche Forschungsgemeinschaft (DFG), den Europäischen Forschungsrat (ERC) im Rahmen des Forschungs- und Innovationsprogramms Horizon 2020 der Europäischen Union unter der Finanzhilfvereinbarung Nr. 101002646 (Switch2See) und das Forschungs- und Innovationsprogramm Horizon Europe der Euro-

päischen Union im Rahmen der Finanzhilfvereinbarung Nr. 101046667 (SWOPT). ■

Literatur

- [1] Ntziachristos V (2010) Going deeper than microscopy: the optical imaging frontier in biology. *Nat Methods* 7: 603–614
- [2] Karlas A, Pleitez MA, Aguirre J, Ntziachristos V (2021) Optoacoustic imaging in endocrinology and metabolism. *Nat Rev Endocrinol* 17: 323–335
- [3] Tsien RY (2009) Constructing and exploiting the fluorescent protein paintbox (nobel lecture). *Angew Chemie Int Ed* 48: 5612–5626
- [4] Mishra K, Fuenzalida-Werner JP, Ntziachristos V, Stiel AC (2019) Photocontrollable proteins for optoacoustic imaging. *Anal Chem* 91: 5470–5477
- [5] Eggeling C, Willig KI, Sahl SJ, Hell SW (2015) Lens-based fluorescence nanoscopy. *Q Rev Biophys* 48: 178–243
- [6] Stiel AC, Deán-Ben XL, Jiang Y et al. (2015) High-contrast imaging of reversibly switchable fluorescent proteins via temporally unmixed multispectral optoacoustic tomography. *Opt Lett* 40: 367
- [7] Mishra K, Stankevych M, Fuenzalida-Werner JP et al. (2020) Multiplexed whole-animal imaging with reversibly switchable optoacoustic proteins. *Sci Adv* 6: eaaz6293
- [8] Li L, Shemetov AA, Balaban M et al. (2018) Small near-infrared photochromic protein for photoacoustic multi-contrast imaging and detection of protein interactions in vivo. *Nat Commun* 9: 2734
- [9] Greenwald EC, Mehta S, Zhang J (2018) Genetically encoded fluorescent biosensors illuminate the spatiotemporal regulation of signaling networks. *Chem Rev* 118: 11707–11794
- [10] Mishra K, Fuenzalida-Werner JP, Pennacchiotti F et al. (2022) Genetically encoded photo-switchable molecular sensors for optoacoustic and super-resolution imaging. *Nat Biotechnol* 40: 598–605

Funding note: Open Access funding enabled and organized by Projekt DEAL.
Open Access: Dieser Artikel wird unter der Creative Commons Namensnennung 4.0 International Lizenz veröffentlicht, welche die Nutzung, Vervielfältigung, Bearbeitung, Verbreitung und Wiedergabe in jeglichem Medium und Format erlaubt, sofern Sie den/die ursprünglichen Autor(en) und die Quelle ordnungsgemäß nennen, einen Link zur Creative Commons Lizenz beifügen und angeben, ob Änderungen vorgenommen wurden. Die in diesem Artikel enthaltenen Bilder und sonstiges Drittmaterial unterliegen ebenfalls der genannten Creative Commons Lizenz, sofern sich aus der Abbildungslegende nichts anderes ergibt. Sofern das betreffende Material nicht unter der genannten Creative Commons Lizenz steht und die betreffende Handlung nicht nach gesetzlichen Vorschriften erlaubt ist, ist für die oben aufgeführten Weiterverwendungen des Materials die Einwilligung des jeweiligen Rechteinhabers einzuholen. Weitere Details zur Lizenz entnehmen Sie bitte der Lizenzinformation auf <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/deed.de>.

Korrespondenzadresse:

Dr. André Stiel
 Helmholtz Zentrum München
 Deutsches Forschungszentrum für Gesundheit
 und Umwelt
 Institut für Biologische und Medizinische
 Bildgebung
 Ingolstädter Landstraße 1
 D-85764 Neuherberg
andre.stiel@helmholtz-muenchen.de

AUTOREN



Simon Göllner

Studium der Laser- und Plasmatechnologie an der Hochschule für Angewandte Wissenschaften und Kunst, Göttingen. Aktuell Doktorand für Spektroskopie- und Screeningtechnologien für photoschaltbare Proteine in der Forschungsgruppe „Cell Engineering“ am Helmholtz Zentrum München am Institut für Biologische und Medizinische Bildgebung.



Kanuj Mishra

Studium der Medizinischen Biotechnologie am All India Institute of Medical Sciences (AIIMS) in New Delhi, Indien. Aufenthalt am Department for Neuroanatomy der Universität des Saarlandes, Homburg. 2017–2021 Doktorarbeit in der Forschungsgruppe „Cell Engineering“ am Helmholtz Zentrum München am Institut für Biologische und Medizinische Bildgebung. 2021 Promotion.



André C. Stiel

Studium der Biologie (Schwerpunkt Biophysik) an der Ruhr-Universität Bochum. Doktorarbeit an der Universität Heidelberg und am Max-Planck-Institut für biophysikalische Chemie in Göttingen. Postdoc-Aufenthalte an den Max-Planck-Instituten in Göttingen und Tübingen und Forschungstätigkeiten am Howard Hughes Medical Institute in Ashbur, VA, USA. Aktuell Gruppenleiter der unabhängigen Forschungsgruppe „Cell Engineering“ am Helmholtz Zentrum München am Institut für Biologische und Medizinische Bildgebung. 2020 ERC Consolidator Grant. 2021 Koordinator eines EIC Pathfinder Konsortiums.

Hier steht eine Anzeige.



Springer