

Dreidimensionale Nanoskopie: biologische Nanostrukturen im Fokus

Peter Dedecker, Cristina Flors, Jun-ichi Hotta, Hiroshi Uji-i und Johan Hofkens*

Fluoreszenz · Mikroskopie · Photochrome Rhodamine ·

Photoschaltbare Verbindungen · Zwei-Photonen-Aktivierung

Ein wichtiges Forschungsziel ist es, die Organisation von lebenden Zellen, Geweben und Materialien im Nanometer-Bereich zu verstehen, und noch immer ist es eine der bedeutendsten Aufgaben der Wissenschaft, Einblick in kleine Strukturen des Lebens zu erhalten. Solche Einblicke können Mikroskopie-Techniken wie die Elektronenmikroskopie geben. Diese Techniken sind allerdings nur bedingt verwendbar, da sie mit einer aufwändigen und destruktiven Probenvorbereitung und -vermessung einhergehen oder keine Möglichkeit bieten, Details unterhalb der Probenoberfläche darzustellen.

Die Fluoreszenzmikroskopie ist eine der am besten geeigneten und gängigsten Techniken, aber auch ihre Einsatzmöglichkeiten sind noch beschränkt. Wie jede Mikroskopieart kann sie Details nur bis zu einer bestimmten Höchstauflösung darstellen. Diese so genannte Beugungsgrenze folgt aus der Wellennatur des Lichts und beträgt bei der optischen Mikroskopie ca. 250 nm, d.h., zwei Objekte, deren Entfernung voneinander weniger als 250 nm beträgt, können nicht unterschieden werden. Dies lässt den Schluss zu, dass die Nanostruktur von Zellen und Materialien mit direkten optischen Methoden nicht abbildbar ist. Genauer gesagt ist der (wichtigste) Grund für die beschränkte Auflösung, dass ein fluoreszierendes Punktobjekt von vernachlässigbarer Größe (z.B. ein einzelnes Molekül) nach der Abbildung durch das Mikroskop nicht als ein Punkt, sondern als ein wesentlich größeres dreidimensionales Objekt erscheint (Abbildung 1). Da sich die Intensitätsverteilungen von nahe zusammen liegenden Objekten überlappen, ist es nicht mehr möglich, zwischen eng benachbarten Molekülen zu unterscheiden und somit sehr feine Details der Probe darzustellen.

In letzter Zeit haben sich einige Arbeitsgruppen der Überwindung dieser Beugungsgrenze gewidmet. Es gelang ihnen, Bilder mit noch nie zuvor erhaltener Genauigkeit zu erhalten.^[1] 2006 erschienen einige Publikationen, die alle auf einem ähnlichen Ansatz gründeten: der Photoaktivierungs-

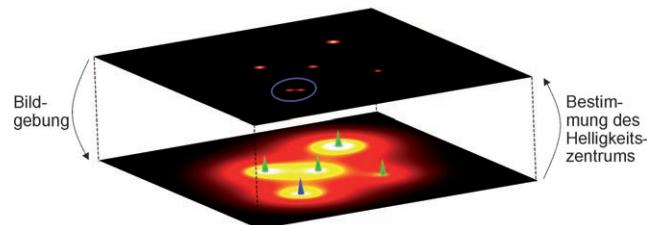


Abbildung 1. Das Ergebnis der Beugung: Die ursprünglich quasipunktförmigen Fluoreszenzmitter werden durch das Mikroskop unscharf abgebildet. Die Positionen der isolierten Emitter können aus dem Intensitätsprofil durch Bestimmung des Zentrums größter Helligkeit (durch die Markierung gekennzeichnet) ermittelt werden. Allerdings können Moleküle, die näher beieinander liegen als die Beugungsgrenze, nicht getrennt werden (blaue Markierung und blauer Kreis).

Lokalisierungs-Mikroskopie (PALM).^[2-4] PALM beruht auf der Möglichkeit, individuelle, klar voneinander getrennte Emitter einfach durch Bestimmung des Schwerpunkts der Emissionsverteilung nanometergenau zu lokalisieren (Abbildung 1). Ist die Position aller Emitter auf diese Weise bestimmbar, so kann man durch eine sorgfältige Bearbeitung der Fluoreszenzabbildung ein Bild der Probe in Nanometer-Auflösung konstruieren. Leider sind die erhaltenen Daten aber nur dann aussagekräftig, wenn die Emission eines einzelnen, isolierten Emitters betrachtet wird. Wenn man jedoch an der Bildgebung unterhalb der Beugungsgrenze interessiert ist, muss man davon ausgehen, dass sich in der Probe viele Fluorophore befinden, die nur wenige Nanometer Abstand voneinander haben. Die einzige Möglichkeit für die Anwendung dieser Lokalisierungsmethode besteht darin, die Fluoreszenzemissionen zeitlich zu trennen, sodass innerhalb eines beugungsbegrenzten Bereichs immer nur ein einzelner Fluorophor Licht emittiert.

Bei der PALM gelingt dies mithilfe der Photoaktivierung – dem stochastischen Anschalten der Fluoreszenzemission auf Einzelmolekülebene – und anschließender Photobleichung oder einer anderen Form der Desaktivierung. PALM-Messungen basieren damit auf wiederholten Zyklen von Ein- und Ausschalten, wobei während eines bestimmten Zyklus nur die Fluoreszenz „angeschalteter“ Moleküle detektiert werden kann (Abbildung 2). Da das Anschalten der Fluoreszenz ein stochastischer Vorgang ist, werden in jedem Zy-

[*] P. Dedecker, Dr. C. Flors, Dr. J.-i. Hotta, Dr. H. Uji-i,
Prof. Dr. J. Hofkens
Department of Chemistry and INPAC
Katholieke Universiteit Leuven
Celestijnlaan 200F, 3001 Heverlee (Belgien)
Fax: (+32) 16-327-989
E-Mail: johan.hofkens@chem.kuleuven.be

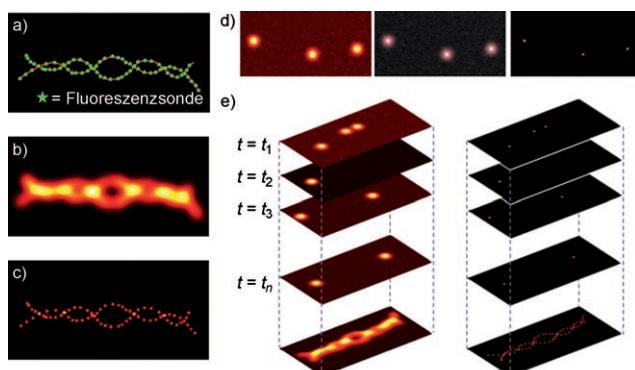


Abbildung 2. Das PALM-Prinzip: a) Ein mit photoaktivierbaren Fluoreszenzmarkierungen gekennzeichnetes Zielobjekt. b) Beugungsbegrenzte Fluoreszenzabbildung. c) Mit der PALM-Methode rekonstruiertes Bild. d) Das Prinzip der nanometergenauen Lokalisierung mit einem zweidimensionalen Gauß-Angleich: links: CCD-Abbildung (charge-coupled device) von aktivierten Fluoreszenzmolekülen; Mitte: zweidimensionaler Gauß-Angleich; rechts: Rekonstruktion des Bildes durch Bestimmung des Gaußschen Schwerpunkts des aktivierte Moleküls. e) Photoaktivierungs-Lokalisierungs-Zyklen: CCD-Abbildungen, aufgenommen zu verschiedenen Zeitpunkten (links), zeigen die Emission unterschiedlicher Moleküle, die individuell nanometergenau lokalisiert werden (rechts). Daraus kann anschließend das gesamte Bild rekonstruiert werden.

klus verschiedene Moleküle aktiviert. Wenn diese Moleküle hinreichend weit voneinander entfernt sind, kann man ein Bild mit hoher Auflösung aufbauen. Die Fluoreszenzemission der Probe muss bis hinunter zur Einzelmolekülebene über Photobelichtung kontrolliert werden, was in jüngster Zeit viele Arbeiten auf dem Gebiet photoschaltbarer fluoreszierender Proteine^[5–9] und anderer Verbindungen^[10–12] stimuliert hat. Die Methode wurde allerdings bisher hauptsächlich auf fluoreszierende Proteine angewendet.^[2,4,13] Die Grundlage von PALM und verwandten Techniken ist die stochastische Natur aller Einzelmolekülprozesse in Kombination mit dem Auftreten eines fluoreszierenden und eines nichtfluoreszierenden Zustands. Damit ist das Fluoreszenz-Photoschalten ideal für diese Messungen geeignet, wie Hell et al. 2003 anmerken.^[14] Es können aber auch andere Phänomene wie Diffusion in Kombination mit einer zeitweiligen Adsorption an eine Oberfläche^[15] oder individuelle Umsätze in chemischen Reaktionen^[16] genutzt werden.

Auch wenn bereits einige beeindruckende Ergebnisse erzielt wurden, hat diese Technik Grenzen: So werden viele Photoaktivierungszyklen zur Bestimmung der Positionen einer großen Zahl an Molekülen benötigt, was zu sehr langen Messzeiten führt (bis zu Stunden). Des Weiteren bietet die Technik keine gute Auflösung in axialer Richtung (d.h., die Ortung ist nur in der Probenebene, senkrecht zur optischen Achse des Mikroskops präzise); deshalb sollten die Proben entweder sehr dünn sein, oder sie müssen mit TIRF-Geometrie belichtet werden (TIRF = totale interne Reflexion). Zusätzlich können eine spontane Aktivierung der Farbstoffmoleküle oder ein relativ geringer Kontrast zwischen dem ein- und ausgeschalteten Zustand zu einem signifikanten Fluoreszenzhintergrund führen, der die Analyse erschwert.

Eine aktuelle Arbeit von Fölling et al.^[17] weist einen Weg zur Überwindung dieser Hürden. In der von ihnen entwickelten Erweiterung dieser Technik, genannt PALMIRA (PALM mit unabhängiger Durchführung der Aufnahme), wird dies auf zweierlei Weise erreicht, und zwar durch das rationale Design und die Synthese einer neuen photoaktivierbaren Verbindung bei gleichzeitiger Erweiterung der experimentellen Prozedur auf eine Zwei-Photonen-Aktivierung der Fluoreszenz.

Die photoaktivierbare Verbindung, genannt SpaRh, ist ein auf Rhodamin basierendes photochromes System, das durch Photobelichtung zwischen einem nichtfluoreszierenden und einem fluoreszierenden Zustand geschaltet werden kann, während die spontane Bildung des fluoreszierenden Zustands sehr langsam geschieht. Diese Photoaktivierung erfordert ultraviolettes Licht, wogegen der hellen Zustand des Chromophors grünes Licht absorbiert und rotes Licht emittiert. Dank der klaren Trennung dieser Absorptionsbanden kann das Auftreten eines fluoreszierenden Hintergrunds als Resultat einer verbleibenden Emission von Molekülen im ausgeschalteten Zustand fast gänzlich vermieden werden, und zusammen mit der langsamen thermischen Aktivierung der fluoreszierenden Form ist so eine dichtere Markierung der Probe möglich. Die Rückreaktion zum dunklen Zustand ist thermisch induziert, wobei die Geschwindigkeitskonstante von der Umgebung abhängt und die Lebensdauer des hellen Zustands in polaren Medien kürzer ist (Millisekunden). Die Tatsache, dass es sich bei dem Farbstoff um ein Rhodamin-derivat handelt, ist für einige Messungen vorteilhaft, da nicht alle Zellbereiche einfach mit einem genetisch kodierten fluoreszierenden Protein markiert werden können; in solchen Fällen ist eine direkte chemische Markierung erforderlich.

Die Autoren demonstrieren die Verwendbarkeit von SpaRh in PALM-basierter hochauflösender Mikroskopie: Individuelle Farbstoffmoleküle erzeugen genügend Photonen (im Bereich von über 300 Photonen binnen 2 ms bis zu ca. 900 Photonen binnen 20 ms), um bei sehr kurzen Integrationszeiten (2–20 ms) ihre Lokalisierung mit hoher Genauigkeit (11–14 nm) zu ermöglichen. Diese Befunde belegen überdies, dass die begrenzte Lebensdauer des hellen Zustands von SpaRh kein Nachteil ist – vielmehr ermöglicht sie sehr schnelle Messzyklen und verkürzt damit die erforderliche Messdauer stark. Während frühere PALM-Experimente Messdauern von über zwei Stunden erforderten,^[4] gelingt nun die Aufnahme aussagekräftiger Bilder in nur einer bis drei Minuten. Somit ist die Verwendung dieses Farbstoffs ein weiterer Schritt auf dem Weg zu einer dynamischen PALM. Diese dynamischen Messungen würden erleichtert, wenn die einzelnen Moleküle mehr als einmal aktiviert und lokalisiert werden könnten, d.h., wenn der einzige limitierende Faktor für ihre Erfassung die Photobleichung wäre. Dies wird im Prinzip durch die kurze Lebensdauer des hellen Zustands in wässriger Umgebung bewirkt, denn die Desaktivierung der Moleküle in den nichtfluoreszierenden Zustand erfolgt schneller, als eine Photobleichung stattfinden kann. Auf diese Weise können die Moleküle in aufeinander folgenden Zyklen immer wieder von Neuem aktiviert werden.

Das im letzten Abschnitt beschriebene Experiment ist möglicherweise der innovativste Beitrag dieser Publikation

und nutzt die gute Auflösung in axialer Richtung, die durch Zwei-Photonen-Absorption erreicht werden kann. Durch Aktivierung der Farbstoffmoleküle in einer dünnen Schicht mit Pikosekunden-Pulsen roten Lichts können die Autoren die Fluoreszenz effektiv auf allein diese Schicht beschränken, was eine Tiefenauflösung ähnlich derjenigen eines konfokalen Mikroskops ergibt. Nach Messungen in verschiedenen Ebenen der Probe können die erhaltenen Schichten zusammengesetzt werden, und man erhält ein dreidimensionales, hochaufgelöstes Gesamtbild (Abbildung 3).

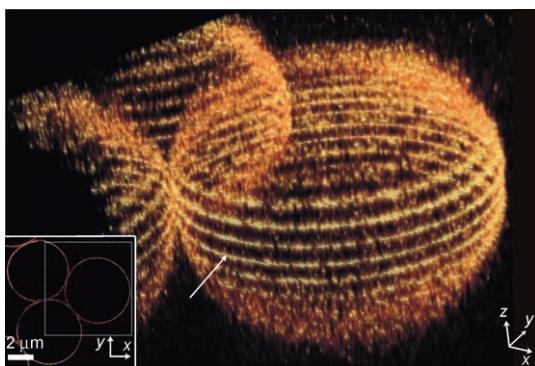


Abbildung 3. Rekonstruierte dreidimensionale PALM-Abbildung von Silicium-Kügelchen (Durchmesser 5 μm), überzogen mit SpaRh, wie von Fölling et al. beschrieben. Wiedergabe mit Genehmigung aus Lit. [17].

In einer ähnlichen Studie erweiterten Hell und Mitarbeiter die Verwendung des PALM-Mikroskops auf die gleichzeitige Detektion und Analyse von zwei unterschiedlichen Markierungen,^[18] was die Anwendungsmöglichkeiten dieser Technik auch auf die Untersuchung molekularer Wechselwirkungen ausweitet.

Wir sind der Überzeugung, dass PALM zu einer grundlegenden und weit verbreiteten Methode werden wird. Eine dreidimensionale Bildgebung und eine schnelle Aufnahme standen auf der „Wunschliste“ für diese Mikroskopietechnik – daher sind die Arbeiten von Fölling et al. entscheidend für ihre Anwendung bei der intrazellulären Bildgebung. PALM

eröffnet uns damit einen neuen Einblick in die faszinierende Welt biologischer Nanostrukturen.

Online veröffentlicht am 17. Oktober 2007

-
- [1] S. W. Hell, *Science* **2007**, *316*, 1153–1158.
 - [2] S. T. Hess, T. P. K. Girirajan, M. D. Mason, *Biophys. J.* **2006**, *91*, 4258–4272.
 - [3] M. J. R. Rust, M. B. Bates, X. Z. Zhuang, *Nat. Methods* **2006**, *3*, 793–796.
 - [4] E. Betzig, G. H. Patterson, R. Sougrat, O. W. Lindwasser, S. Olenych, J. S. Bonifacino, M. W. Davidson, J. Lippincott-Schwartz, H. F. Hess, *Science* **2006**, *313*, 1642–1645.
 - [5] K. A. Lukyanov, D. M. Chudakov, S. Lukyanov, V. V. Verkusha, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2005**, *6*, 885–891.
 - [6] R. Ando, H. Mizuno, A. Miyawaki, *Science* **2004**, *306*, 1370–1373.
 - [7] S. Habuchi, R. Ando, P. Dedecker, W. Verheijen, H. Mizuno, A. Miyawaki, J. Hofkens, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2005**, *102*, 9511–9516.
 - [8] R. Ando, C. Flors, H. Mizuno, J. Hofkens, A. Miyawaki, *Biophys. J.* **2007**, *92*, L97–L99.
 - [9] L. V. Schäfer, G. Groenhof, A. R. Klingen, G. M. Ullmann, M. Boggio-Pasqua, M. A. Robb, H. Grubmüller, *Angew. Chem.* **2007**, *119*, 536–542; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2007**, *46*, 530–536.
 - [10] T. Fukaminato, T. Umemoto, Y. Iwata, S. Yokojima, M. Yoneyama, S. Nakamura, M. Irie, *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 5932–5938.
 - [11] M. Bossi, V. Belov, S. Polyakova, S. W. Hell, *Angew. Chem.* **2006**, *118*, 7623–7627; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2006**, *45*, 7462–7465; .
 - [12] M. Heilemann, E. Margeat, R. Kasper, M. Sauer, P. Tinnefeld, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 3801–3806.
 - [13] C. Geisler, A. Schönle, C. Von Middendorff, H. Bock, C. Eggeling, A. Egner, S. W. Hell, *Appl. Phys. A* **2007**, *88*, 223–226.
 - [14] S. W. Hell, S. Jakobs, L. Kastrup, *Appl. Phys. A* **2003**, *77*, 859–860.
 - [15] A. Sharonov, R. M. Hochstrasser, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2006**, *103*, 18911–18916.
 - [16] M. B. J. Roeffaers, B. F. Sels, H. Uji-i, F. C. De Schryver, P. A. Jacobs, D. E. De Vos, J. Hofkens, *Nature* **2006**, *439*, 572–575.
 - [17] J. Fölling, V. Belov, R. Kunetsky, R. Medda, A. Schönle, A. Egner, C. Eggeling, M. Bossi, S. W. Hell, *Angew. Chem.* **2007**, *119*, 6382–6386; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2007**, *46*, 6266–6270.
 - [18] H. Bock, C. Geisler, C. A. Wurm, C. von Middendorff, S. Jakobs, A. Schönle, A. Egner, S. W. Hell, C. Eggeling, *Appl. Phys. B* **2007**, *88*, 161–165.