

# Hochauflösende Mikroskopie mit kleinen organischen Farbstoffen\*\*

Mike Heilemann,\* Sebastian van de Linde, Anindita Mukherjee und Markus Sauer\*

Die Fluoreszenzmikroskopie ermöglicht die dreidimensionale Bildgebung von lebenden Zellen und Geweben und ist aus der biologischen und biomedizinischen Forschung nicht mehr wegzudenken. Ihr entscheidender Vorteil gegenüber anderen bildgebenden Verfahren wie der Elektronenmikroskopie liegt in der Möglichkeit, dynamische Prozesse in lebenden Zellen beobachten zu können, ein Schwachpunkt bleibt aber die Begrenzung der räumlichen Auflösung in der Bildebene auf etwa 200 nm.<sup>[1]</sup> Um dieses Problem zu umgehen, sind in der Vergangenheit unterschiedliche Methoden zur hochauflösenden Mikroskopie unterhalb der Beugungsgrenze entwickelt worden, die photoschaltbare oder photoaktivierbare fluoreszierende Proteine oder organische Farbstoffe einsetzen.<sup>[2]</sup> Zurzeit nutzen die meisten hochauflösenden Methoden das kontrollierte Schalten von Fluoreszenzfarbstoffen zwischen einem fluoreszierenden („An“-) und einem nichtfluoreszierenden („Aus“-) Zustand, um die Auflösung zu erhöhen.<sup>[2–10]</sup>

Die Anwendung kommerzieller Farbstoffe für die hochauflösende Mikroskopie war bisher jedoch stark eingeschränkt. Hier stellen wir einen neuen Ansatz vor, der den Einsatz einer Vielzahl an Fluoreszenzfarbstoffen zur hochauflösenden Mikroskopie ermöglicht. Wir zeigen, dass die häufig verwendeten Alexa-Fluor- und ATTO-Farbstoffe, die den gesamten Bereich des sichtbaren elektromagnetischen Spektrums abdecken, unter ähnlichen Bedingungen reversibel zwischen einem „An“- und einem „Aus“-Zustand geschaltet werden können. Das von uns entwickelte Prinzip erfordert lediglich die Zugabe von Thiolen wie  $\beta$ -Mercaptoethylamin (MEA), Dithiothreitol (DTT) oder Glutathion (GSH) als Reduktionsmittel, die einen langlebigen nichtfluoreszierenden Zustand der Farbstoffe erzeugen. Da insbesondere Sauerstoff nicht aus der Lösung entfernt werden muss und Reduktionsmittel wie Glutathion in  $\mu\text{M}$ - bis  $\text{mM}$ -Konzentrationen im Zellplasma vorkommen, kann diese Methode zur hochauflösenden Mikroskopie in lebenden

Zellen mit nahezu molekularer Auflösung (um 20 nm) eingesetzt werden.

Die präzise Lokalisierung einzelner Moleküle, verbunden mit der Photoaktivierung oder dem reversiblen Photoschalten einzelner Fluoreszenzsonden, ermöglicht die Rekonstruktion hochaufgelöster Fluoreszenzbilder.<sup>[5–15]</sup> Photoschaltbare Moleküle werden auf diese Weise in verschiedenen hochauflösenden Methoden eingesetzt, z. B. für PALM („photoactivated localization microscopy“),<sup>[5]</sup> FPALM („fluorescence photoactivation localization microscopy“),<sup>[6]</sup> STORM („stochastic optical reconstruction microscopy“)<sup>[8]</sup> und dSTORM („direct STORM“).<sup>[10]</sup> Das zugrundeliegende Prinzip ist ähnlich: Zunächst wird die zu mikroskopierende Probe durch Immunfluoreszenz oder durch Coexpression eines fluoreszierenden Proteins sehr dicht mit einem photoschaltbaren Fluoreszenzfarbstoff markiert. Im nächsten Schritt werden nahezu alle Fluorophore ausgeschaltet, und nur ein sehr kleiner Anteil wird im fluoreszierenden Zustand belassen. Die Position dieser einzelnen Farbstoffmoleküle wird durch Anpassen einer Gauß-Funktion an das Fluoreszenzsignal auf wenige Nanometer genau bestimmt. Die Genauigkeit der Lokalisierung hängt von der Zahl der detektierten Photonen ab, sowie von dem Hintergrundsignal, das durch Autofluoreszenz oder benachbarte Sonden im „Aus“-Zustand verursacht wird.<sup>[16]</sup> Daraus leiten sich die Schlüsseleigenschaften für geeignete Photoschalter ab: ein hoher Kontrast zwischen „An“- und „Aus“-Zustand, ein hoher Extinktionskoeffizient sowie eine hohe Quantenausbeute im „An“-Zustand. Durch wiederholtes Anschalten, Lokalisieren und Ausschalten solcher Photoschalter können Fluoreszenzbilder mit einer Auflösung von 20 nm rekonstruiert werden.<sup>[8–10, 12–14]</sup>

Im Vergleich zu fluoreszierenden Proteinen zeigen organische Farbstoffe eine höhere Fluoreszenzausbeute in ihrem „An“-Zustand – ein entscheidender Vorteil für die hochauflösende Mikroskopie. Darüber hinaus ist eine sehr große Auswahl an organischen Farbstoffen mit unterschiedlichen spektralen Eigenschaften oder chemischen Modifikationen kommerziell erhältlich. Die Kupplung an Peptide oder Proteine, an DNA- oder RNA-Fragmente sowie Haarnadelstrukturen oder an kleine organische Moleküle gelingt mithilfe einfacher chemischer Reaktionen. Durch Proteinmarkierungstechniken<sup>[17, 18]</sup> können organische Farbstoffe spezifisch an Zielproteine in lebenden Zellen gebunden werden. Aus diesen Gründen stellen organische Farbstoffe und Strategien zur gezielten genetischen Markierung einen vielversprechenden Ansatz für die hochauflösende Fluoreszenzmikroskopie dar.

In der hochauflösenden Mikroskopie mit organischen Fluoreszenzfarbstoffen müssen die meisten Moleküle in einen nichtfluoreszierenden „Aus“-Zustand mit einer Fluoreszenzquantenausbeute nahe Null gebracht werden. Da-

[\*] Dr. M. Heilemann, S. van de Linde, Dr. A. Mukherjee,

Prof. Dr. M. Sauer

Angewandte Laserphysik & Laserspektroskopie

Universität Bielefeld

Universitätsstraße 25, 33615 Bielefeld (Deutschland)

Fax: (+49) 521-106-2958

E-Mail: heileman@physik.uni-bielefeld.de

sauer@physik.uni-bielefeld.de

Homepage: <http://www.physik.uni-bielefeld.de/experi/d3/>

[\*\*] Diese Arbeit wurde durch die Forschungsschwerpunkte Biophotonik und Systembiologie (FORSYS) des Bundesministeriums für Bildung und Forschung (BMBF, Nr. 13N9234 und 0315262) unterstützt.



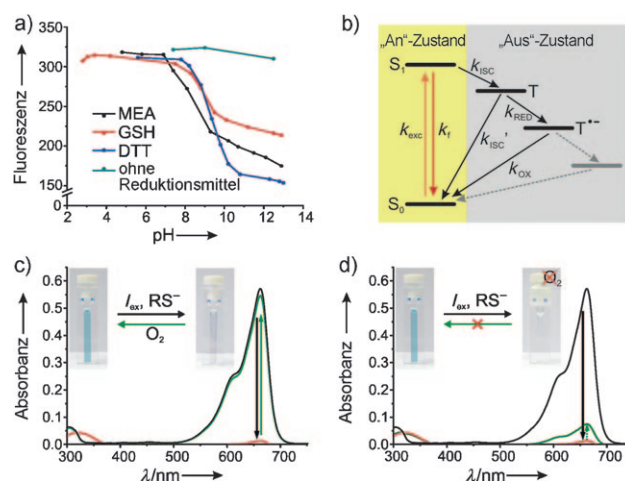
Hintergrundinformationen zu diesem Beitrag sind im WWW unter <http://dx.doi.org/10.1002/ange.200902073> zu finden.

durch wird das zeitlich getrennte Auslesen des Fluoreszenzsignals einzelner Farbstoffmoleküle möglich, die sich noch im „An“-Zustand befinden, sowie die anschließende Lokalisierung der einzelnen Emitter. Erreicht werden kann dies, indem durch lichtinduzierte Prozesse langlebige „Aus“-Zustände erzeugt werden, deren Lebensdauer deutlich länger ist als die der fluoreszierenden „An“-Zustände. Beispielsweise wurden durch UV-Anregung photoaktivierbare Rhodaminamid-Derivate<sup>[11]</sup> oder langlebige Triplettzustände in Rhodamin-Derivaten<sup>[9]</sup> zur hochauflösenden Mikroskopie eingesetzt. Hierzu wurden die Proben in einer Polyvinylalkohol-Matrix mit geringem Sauerstoffgehalt eingebettet, um die Lebensdauer des Triplettzustands zu verlängern. Darüber hinaus mussten sehr hohe Anregungsintensitäten eingesetzt werden ( $>10 \text{ kW cm}^{-2}$ ). Auf ähnliche Weise wurde gezeigt, dass langlebige Radikalanionen von Carbocyanin-Farbstoffen in der hochauflösenden Mikroskopie eingesetzt werden können.<sup>[14]</sup> Jedoch bleibt der Einsatz organischer Farbstoffe eingeschränkt, da zur Erzeugung langlebiger „Aus“-Zustände Sauerstoff aus der Lösung entfernt und farbstoffspezifische Reduktions- und Oxidationsmittel zugefügt werden müssen, was mit der Mikroskopie in lebenden Zellen nicht vereinbar ist.<sup>[8,10,14,19,20]</sup>

In früheren Arbeiten konnte gezeigt werden, dass manche rot fluoreszierende Farbstoffe in Gegenwart von Sauerstoff und  $\beta$ -Mercaptoethylamin reversibel zwischen einem fluoreszierenden und einem nichtfluoreszierenden Zustand geschaltet werden können.<sup>[12]</sup> Da auch die Fluoreszenz der meisten Rhodamin- oder Oxazin-Farbstoffe sehr effizient durch Stöße mit Elektronendonoren, beispielsweise Tryptophan oder Guanosin, gelöscht werden kann,<sup>[21–26]</sup> haben wir eine allgemeine Methode zur hochauflösenden Mikroskopie mit kleinen organischen Farbstoffen unter physiologischen Bedingungen entwickelt.

Mit Ausnahme einiger Carbocyanin-Farbstoffe, z. B. Cy3, Cy5 und Alexa-Fluor 647, gehören nahezu alle kommerziell erhältlichen Fluoreszenzfarbstoffe mit Absorptionsmaxima zwischen 480 und 700 nm zu den Rhodaminen oder Oxazinen. Sie teilen somit die gleiche grundlegende Struktur des Chromophors<sup>[27]</sup> und weisen ähnliche Redox Eigenschaften auf.<sup>[21,23,28]</sup> Somit sollte es möglich sein, die Fluoreszenzlöschung von Rhodamin- und Oxazin-Derivaten für das reversible Photoschalten einzusetzen.

Das Ziel erster Experimente zur Fluoreszenzlöschung von Alexa-Fluor- und ATTO-Farbstoffen mit verschiedenen Elektronendonoren war es, ein Reduktionsmittel zu finden, das den etwas energieärmeren Triplettzustand löscht, jedoch nicht den Singulettzustand. Wir fanden heraus, dass Reduktionsmittel mit Thiolgruppen, wie MEA, DTT und GSH, den Triplettzustand von Rhodamin- und Oxazin-Derivaten in wässriger Lösung selektiv und in Abhängigkeit vom pH-Wert löschen. Da die meisten Thiole (RSH) einen  $\text{pK}_{\text{S}(\text{SH})}$ -Wert um 8–9<sup>[29–31]</sup> besitzen und die reduzierende Spezies das Thiolat-anion ( $\text{RS}^-$ ) ist, weist die Reduktionseffizienz dieser Substanzen oberhalb von pH 9, ab dem die Thiolgruppe ionisiert ist, ein Plateau auf. Für  $\text{pH} > 9$  wird zusätzlich der Singulettzustand von ATTO655 gelöscht, und es findet ein Elektronentransfer von den Thiolen statt (Abbildung 1 a). Der etwas energieärmere Triplettzustand wird bereits bei pH 7–8 durch



**Abbildung 1.** Prinzip des Photoschaltens am Beispiel von ATTO655.

a) Löschung der Fluoreszenz von ATTO655 in Gegenwart von 100 mM MEA, GSH und DTT mit zunehmendem pH-Wert (Zugabe von KOH). Die grüne Kurve wurde ohne Zugabe eines Thiois gemessen, in PBS (pH 7.4) oder 100 mM Kaliumboratpuffer (pH 9.0 und 12.5), und zeigt eine leichte Abnahme des Fluoreszenzsignals von ATTO655 aufgrund einer nucleophilen Addition bei höherem pH-Wert. b) Übergänge und Reaktionen beim reversiblen Photoschalten von Alexa-Fluor- und ATTO-Farbstoffen. Auf die Anregung der Farbstoffmoleküle ( $k_{\text{exc}}$ ) in den ersten angeregten Singulettzustand  $S_1$  wird die Energie entweder durch Fluoreszenzemission wieder abgegeben ( $k_f$ ), oder das Molekül geht in einen Triplettzustand über ( $k_{\text{isc}}$ ). Der Triplettzustand  $T$  wird entweder entvölkert ( $k_{\text{isc}}'$ ) oder durch  $\text{RS}^-$  zum Radikalanion  $T^{*+}$  reduziert ( $k_{\text{red}}$ ), das durch molekularen Sauerstoff oxidiert wird ( $k_{\text{ox}}$ ) oder zu anderen nichtfluoreszierenden Spezies weiterreagiert. c,d) Absorptionsspektren von ATTO655 in Gegenwart von 100 mM MEA bei pH 9.3 unter Bestrahlung bei 658 nm mit  $140 \text{ mW cm}^{-2}$  (Details siehe Text).

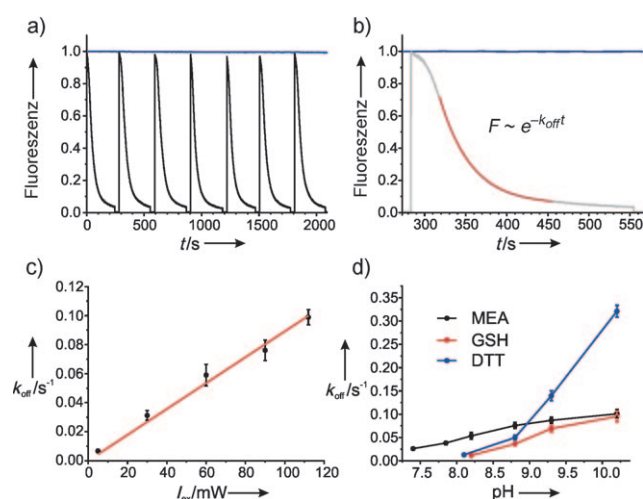
RSH/ $\text{RS}^-$  gelöscht. Des Weiteren kommt es zu einer Konkurrenzreaktion der Thiolationen ( $\text{RS}^-$ ) mit molekularem Sauerstoff, der Triplettzustände entvölkert<sup>[20]</sup> und in wässrigen Lösungen unter Standardbedingungen in Konzentrationen um  $250 \mu\text{M}$  auftritt.<sup>[32]</sup> Aus diesen Gründen sind der pH-Wert der Lösung und die Thiolkonzentration wichtige experimentelle Parameter. Für die selektive und effiziente Löschung des Triplettzustands unter physiologischen Bedingungen (pH 7–8) werden Thiolkonzentrationen von 10–100 mM benötigt (Abbildung S1a).

Die im ersten Reaktionsschritt gebildeten Radikalanionen können durch molekularen Sauerstoff wieder oxidiert werden, oder sie reagieren weiter zu stabileren nichtfluoreszierenden Spezies mit einer Lebensdauer von hunderten von Millisekunden in Gegenwart von Sauerstoff (Abbildung 1 b und S3a,b). Durch Bestrahlung werden ATTO655-Moleküle in wässriger Lösung mit 100 mM MEA bei pH 9.3 innerhalb weniger Minuten in einen stabilen „Aus“-Zustand gebracht (Abbildung 1 c, rote Kurve). Die ursprüngliche Farbe der Lösung kann durch kurzes Schütteln nahezu vollständig wiederhergestellt werden (Abbildung 1 c, grüne Kurve). Aus dieser Beobachtung ziehen wir zwei Schlüsse: 1) Sauerstoff (oder andere Oxidationsmittel, Abbildung S1b) ist für den Übergang in den „An“-Zustand notwendig und wird während der Reaktion in der Lösung verbraucht, 2) der „Aus“-Zustand ist thermisch sehr stabil. Diese Schlüsse werden gestützt

durch die Beobachtung, dass die farbige Lösung nicht zurückgewonnen werden kann, wenn der Sauerstoff in der Lösung vor der Bestrahlung durch Stickstoff ersetzt wurde (Abbildung 1 d).

Aus diesen Ergebnissen schließen wir, dass das Thiolation  $\text{RS}^-$  zunächst mit einem Farbstoffmolekül im Triplettzustand reagiert und dabei ein Radikalanion sowie ein Thiylradikal bildet ( $\text{T} + \text{RS}^- \rightarrow \text{T}^\cdot + \text{RS}^\cdot$ ). Diese Thiylradikale reagieren in wässriger Lösung mit Thiolen oder Thiolaten, oder sie dimerisieren zu Disulfiden oder reagieren mit molekularem Sauerstoff.<sup>[30,33]</sup> Bei diesen Reaktionen können Superoxidradikale sowie Wasserstoffperoxid entstehen. Abhängig von den experimentellen Bedingungen entstehen aus den Farbstoff-Radikalanionen durch Folgereaktionen stabile Spezies, die nicht fluoreszieren. Sowohl die Radikalanionen als auch Folgeprodukte werden durch molekularen Sauerstoff oxidiert, und der fluoreszierende Zustand wird hoch effizient wiederhergestellt. Da die Bildung von Superoxidradikalen und Wasserstoffperoxid weniger effizient ist, wird hauptsächlich Sauerstoff aus der Lösung verbraucht. Sowohl die Oxidation der Thiole als auch der Verbrauch von Sauerstoff verlaufen leichter bei höheren pH-Werten und einer höheren Konzentration an Thiolationen.<sup>[30,33]</sup>

Der Mechanismus des reversiblen Schaltens kann mit einfachen Fluoreszenzexperimenten in einer Küvette studiert werden. Abbildung 2 a zeigt, wie die Fluoreszenzfarbstoffe in



**Abbildung 2.** Photoschalten von ATTO655. a) Bestrahlung von ATTO655 bei 658 nm mit  $140 \text{ mWcm}^{-2}$  in Gegenwart (schwarz) und Abwesenheit (blau) von 100 mM MEA bei pH 7.4. Das Fluoreszenzsignal wurde durch leichtes Schütteln der Lösung wiederhergestellt. b) Die Abnahme des Fluoreszenzsignals kann in einem großen Bereich mit einer monoexponentiellen Funktion angenähert werden, um  $k_{\text{off}}$  zu bestimmen. c)  $k_{\text{off}}$  hängt im Bereich von 6 bis  $140 \text{ mWcm}^{-2}$  linear von der Anregungsintensität ab (100 mM MEA, pH 9.3). d) Zusammenhang von  $k_{\text{off}}$  mit dem pH-Wert für MEA, GSH und DTT ( $140 \text{ mWcm}^{-2}$ , 658 nm).

einer Lösung vielfach reversibel zwischen einem „An“- und einem „Aus“-Zustand geschaltet werden können, wobei nur minimale Verluste der gesamten Fluoreszenzintensität auftreten. Für diese Experimente wurde eine  $10^{-6} \text{ M}$  Lösung von ATTO655 in Wasser mit 100 mM MEA versetzt und mit

$110 \text{ mW}$  (entsprechend  $140 \text{ mWcm}^{-2}$ ) bei 658 nm bestrahlt. Die Geschwindigkeitskonstante für die Bildung des „Aus“-Zustands,  $k_{\text{off}}$ , kann aus dem nahezu exponentiellen Abfall der Fluoreszenzintensität durch eine monoexponentielle Anpassung (rote Kurve, Abbildung 2b) bestimmt werden. Hierbei ist zu beachten, dass die gemessene Abnahme der Fluoreszenzintensität eine Überlagerung der Bildung des „Aus“-Zustands mit Diffusionsprozessen darstellt und dass während der Reaktion Sauerstoff und Wasserstoffperoxid gebildet werden.

Obgleich diese Nebenreaktionen nur in geringem Maß ablaufen, tragen sie zum Abklingen der Fluoreszenz bei und erschweren die Bestimmung der Kinetik, sodass wir nur einen Teil der Kurve zur Anpassung herangezogen haben. Werden keine Thiole zugegeben, bleibt die Fluoreszenzintensität hingegen konstant (blaue Kurve in Abbildung 2a,b). Wird die Küvette geöffnet, löst sich frischer Sauerstoff, und der fluoreszierende Zustand kann durch leichtes Schütteln innerhalb von wenigen Sekunden wiederhergestellt werden. Dieses Photoschalten zwischen einem „An“- und einem „Aus“-Zustand ist in hohem Maße reversibel (Abbildung 2b): Mehr als 95 % der Farbstoffmoleküle können nach zehn Schaltzyklen noch in ihren fluoreszierenden Zustand gebracht werden. Diese Tatsache belegt, dass so reaktive Verbindungen wie Superoxidradikale und Wasserstoffperoxid selbst in Ensembleexperimenten nur in niedrigen Konzentrationen gebildet werden.

Wie für einen lichtinduzierten Prozess zu erwarten, wird die Bildung der Radikalanionen und der Folgeprodukte bei ausreichender Konzentration an  $\text{RS}^-$  hauptsächlich durch die Bestrahlungsintensität bestimmt. In Gegenwart von 100 mM MEA bei pH 9.3 hängt die Bildungsgeschwindigkeit des „Aus“-Zustands im Bereich von  $6\text{--}140 \text{ mWcm}^{-2}$  linear mit der Bestrahlungsintensität zusammen (Abbildung 2c). Darüber hinaus steigt  $k_{\text{off}}$  für ATTO655 in Gegenwart von 100 mM MEA, DTT und GSH drastisch mit steigendem pH-Wert (Abbildung 2d). Hierbei wurde der Bereich  $\text{pH} > 10.2$  nicht mehr berücksichtigt, da ATTO655 und einige andere Fluoreszenzfarbstoffe – vermutlich durch eine nucleophile Addition von  $\text{OH}^-$  – irreversibel zerstört werden (auch zu sehen an der fallenden Fluoreszenzintensität von ATTO655 in Abwesenheit von  $\text{RS}^-$  bei  $\text{pH} > 10$ , Abbildung 1a). Um eine schnelle Bildung von Radikalanionen in Ensembleexperimenten zu erreichen, wurden diese bei pH 9.3 ausgeführt (Abbildung 1c und Abbildung 1d). Während Verbindungen mit einer Thiolgruppe, wie MEA und GSH, eine nahezu lineare Abhängigkeit für  $k_{\text{off}}$  vom pH-Wert zeigen, beobachten wir für DTT einen komplizierteren Zusammenhang (Abbildung 2d). Auf diese Weise lässt sich über den pH-Wert der Lösung elegant die Lebensdauer des „An“-Zustands der Farbstoffe einstellen. Die Lebensdauer des „Aus“-Zustands ist abhängig von den Redoxeigenschaften des Farbstoffs, der Sauerstoffkonzentration und der Zugänglichkeit des Farbstoffmoleküls für Sauerstoff.

Die einfache Steuerung des reversiblen Schaltprozesses von kleinen organischen Farbstoffen mithilfe von Thiolen in wässriger Lösung nutzen wir in der hochauflösenden Mikroskopie des Cytoskeletts fixierter Zellen. Exemplarisch haben wir acht solche Fluoreszenzfarbstoffe ausgewählt

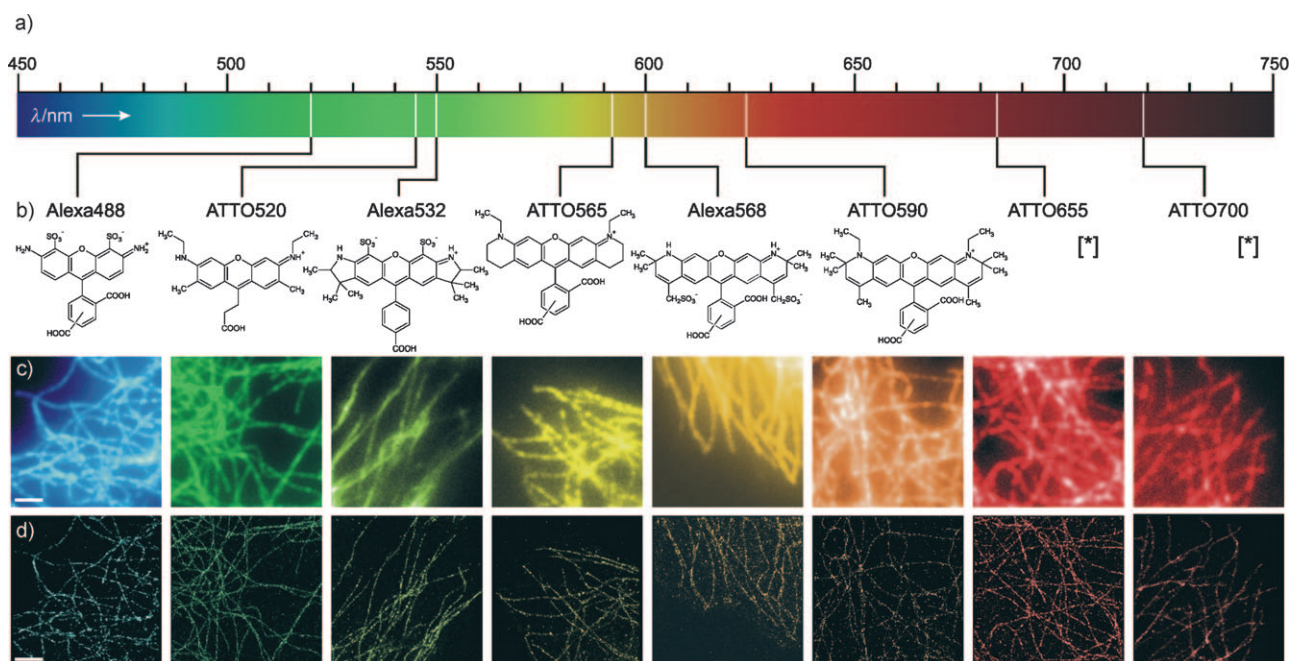


(Abbildung 3). Für die Immunfluoreszenzmikroskopie des Mikrotubulin-Netzwerks von COS-7-Zellen wurden diese zunächst mit einem Primärantikörper und anschließend mit einem farbstoffmarkierten Sekundärantikörper behandelt. Sekundärantikörper mit jeweils 3–6 Molekülen der Farbstoffe Alexa-Fluor 488, Alexa-Fluor 532 und Alexa-Fluor 568 sind kommerziell erhältlich. Die Farbstoffe ATTO520, ATTO565, ATTO590, ATTO655 und ATTO700 wurden an Fab-Fragmente gekuppelt, wobei ein Markierungsgrad von 1 bis 2 erreicht wurde. Die Fluoreszenzbilder wurden mit Totalreflexionsfluoreszenzmikroskopie aufgenommen. Entsprechend den Absorptionsmaxima der Farbstoffe wurden diese angeregt mit den Wellenlängen 488 nm (Alexa-Fluor 488), 514 nm (ATTO520 und Alexa-Fluor 532), 568 nm (ATTO565, ATTO590, und Alexa-Fluor 568) und 647 nm (ATTO655 und ATTO700). Die gleichen Sekundärantikörper können prinzipiell auch für die Markierung jeder anderen zellulären Struktur eingesetzt werden (Abbildung S2).

Die Anregungsintensität wurde so gewählt, dass die Lebensdauer des „Aus“-Zustands wesentlich länger ist als die des „An“-Zustands (Abbildung S3a,b), um sicherzustellen, dass nur ein kleiner Anteil der Farbstoffmoleküle aktiviert ist. Die Punktabbildungsfunktionen jedes dieser Farbstoffmoleküle wurde mit einer Gauß-Funktion angenähert; somit wurde die Position des Moleküls mit hoher Genauigkeit bestimmt. Nach mehreren tausend Positionsbestimmungen wurden aus den einzelnen Koordinaten hochaufgelöste Bilder

rekonstruiert (Abbildung 3d), die eine deutlich bessere räumliche Auflösung zeigen als in Abbildung 3c. Um eine optische Auflösung von ungefähr 20 nm zu erhalten, wurden zwischen 10000 und 20000 Einzelbilder mit einer Frequenz von 10 bis 33 Hz aufgenommen (Abbildung S3c). Höhere Aufnahme Frequenzen können mit schnellen EMCCD-Kameras und höherer Anregungsintensität erzielt werden. Unter den gewählten experimentellen Bedingungen wurde für alle Fluorophore eine Fluoreszenzzählrate von 10–30 kHz erhalten. Mit einem Signal von 500 bis 3000 Photonen wurden die Fluorophore lokalisiert; die theoretische erwartete Genauigkeit liegt hierbei bei 5 bis 15 nm.<sup>[16]</sup>

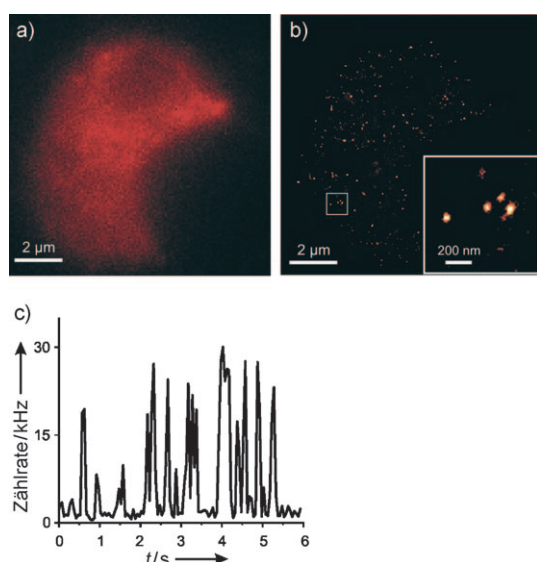
An dieser Stelle muss erwähnt werden, dass die erreichbare Auflösung nicht nur durch die Zahl der detektierten Photonen und die mechanische Stabilität des Mikroskops bestimmt ist, sondern auch durch die Markierungsdichte. Gemäß dem Nyquist-Shannon-Theorem<sup>[34]</sup> muss der Abstand zweier lokalisierter Moleküle mindestens halb so groß sein wie die gewünschte Auflösung. Um also eine optische Auflösung von 20 nm zu erreichen, müssen die farbstoffmarkierten Antikörper in einem Abstand von höchstens 10 nm an der Zielstruktur binden, was durch die Größe von etwa 7 nm für einen IgG-Antikörper erschwert wird. Ferner ist zu berücksichtigen, dass bei der Immunfluoreszenz häufig ein Primär- und ein Sekundärantikörper eingesetzt werden. In diesem Zusammenhang ist der Einsatz der kleineren fluoreszierenden Proteine von Vorteil, da höhere Markierungs-



**Abbildung 3.** Hochoflösende Fluoreszenzaufnahmen des Cytoskeletts eukaryotischer Zellen nach dem dSTORM-Prinzip<sup>[10]</sup> für acht Alexa-Fluor- und ATTO-Farbstoffe aus dem gesamten sichtbaren Spektrum. a,b) Emissionsmaxima und Strukturformeln von Alexa-Fluor 488, ATTO520, Alexa-Fluor 532, ATTO565, Alexa-Fluor 568, ATTO590, ATTO655 und ATTO700 ([\*] Strukturformel nicht verfügbar). c) Immunfluoreszenzaufnahmen (TIRF-Mikroskopie) der Mikrotubuli von COS-7-Zellen (Maßstab 2 µm) und d) rekonstruierte Bilder mit höherer Auflösung. Die Experimente wurden in PBS mit 10–200 mM MEA ausgeführt, die Aufnahme Frequenz betrug 10–20 Hz, und die Anregungsintensitäten lagen bei 1–4 kWcm<sup>-2</sup> (angepasst für die unterschiedlichen Extinktionskoeffizienten der Fluoreszenzfarbstoffe bei den jeweiligen Anregungswellenlängen). Alexa-Fluor 488: 488 nm, 3 kWcm<sup>-2</sup>, 100 mM MEA; ATTO520: 514 nm, 3 kWcm<sup>-2</sup>, 100 mM MEA; Alexa-Fluor 532: 514 nm, 1.5 kWcm<sup>-2</sup>, 100 mM MEA; ATTO565: 568 nm, 1.5 kWcm<sup>-2</sup>, 100 mM MEA; Alexa-Fluor 568: 568 nm, 1.5 kWcm<sup>-2</sup>, 100 mM MEA; ATTO590: 568 nm, 4 kWcm<sup>-2</sup>, 200 mM MEA; ATTO655: 647 nm, 1.5 kWcm<sup>-2</sup>, 10 mM MEA; ATTO700: 647 nm, 4 kWcm<sup>-2</sup>, 100 mM MEA.

lichten erreicht werden können. Allerdings sind fluoreszierende Proteine in der Regel weniger photostabil als organische Farbstoffe. Auch ist nicht auszuschließen, dass die Kupplung mit einem fluoreszierenden Protein (z. B. GFP, mit einem Molekulargewicht von 27 kDa) durchaus die Funktion des Zielproteins beeinflussen kann. In dieser Hinsicht bieten kleine organische Farbstoffe mehr Variabilität.

Wie in Abbildung 2 d gezeigt, ist die hochauflösende Mikroskopie mit kleinen organischen Farbstoffen nicht auf das Reduktionsmittel MEA beschränkt, es können auch andere Thiole wie GSH in physiologischer Umgebung eingesetzt werden. Das Tripeptid GSH ist ein niedermolekulares Antioxidans, das in eukaryotischen Zellen weit verbreitet ist und in diesen eine Schutzfunktion übernimmt. Die Thiolgruppen von GSH liegen in reduzierter Form und in millimolarer Konzentration vor.<sup>[35]</sup> Aufgrund dieser Tatsache untersuchten wir die hochauflösende Mikroskopie in lebenden Zellen mit ATTO655, ATTO680, ATTO700 und ATTO520 (Abbildung 4 und S4). Diese organischen Farbstoffe wurden ge-



**Abbildung 4.** Hochauflösende Fluoreszenzaufnahme von mRNA in lebenden A549-Zellen durch Zugabe von Oligo-dT (43-mer), markiert mit ATTO655. a) Die Fluoreszenzaufnahme (TIRF-Mikroskopie) des Zellkerns einer lebenden A549-Zelle zeigt ein gleichmäßiges Fluoreszenzsignal der markierten Oligonucleotide. b) Rekonstruiertes Fluoreszenzbild mit höherer Auflösung aus einer Messung bei 647 nm mit  $1.5 \text{ kW cm}^{-2}$  und einer Aufnahme Frequenz von 20 Hz. c) Das Fluoreszenzsignal eines einzelnen Punktes aus dem vergrößerten Ausschnitt in (b) setzt sich vermutlich aus mehreren Farbstoffmolekülen zusammen. Die zeitliche Veränderung des Fluoreszenzsignals demonstriert, dass ATTO655 und andere organische Farbstoffe (Abbildung S3) als reversible Photoschalter in lebenden Zellen eingesetzt werden können.

wählt, weil sie leicht reduzierbar sind, sodass niedrige millimolare Konzentrationen an Thiolen bereits ausreichen, um sie in den langlebigen „Aus“-Zustand zu versetzen.

Die In-situ-Hybridisierung von RNA ist eine gängige Methode zur Lokalisierung von RNA-Molekülen in fixierten Zellen, jedoch gibt es einen großen Bedarf für die Visuali-

sierung von RNA in lebenden Zellen, um zu prüfen, ob das Verteilungsmuster der RNA in fixierten Zellen auch die Situation in lebenden Zellen widerspiegelt. Die Behandlung von Zellen bei der Fixierung kann nicht nur Muster stiften, sondern auch die Morphologie der Zelle verändern.<sup>[36,37]</sup>

Um RNA in lebenden Zellen zu detektieren, wird eine komplementäre Oligonucleotidsequenz mit einem Farbstoffmolekül markiert. In unseren Experimenten wurden A549-Zellen mit Oligo-dT (43-mer) transfiziert, und nach mehrfachem Waschen im Zellkulturmedium wurden Fluoreszenzbilder aufgenommen (Abbildung 4). Da Oligo-dT-Sequenzen an Poly-A-Sequenzen der RNA binden, gelingt es mithilfe von markierten Oligo-dT-Sequenzen, die RNA durch Fluoreszenzmikroskopie zu lokalisieren und ihre Mobilität zu messen. Nach erfolgreicher Transfektion der Zellen mit den markierten Oligo-dT-Sequenzen ist bei sehr niedrigen Anregungsintensitäten (um  $0.1 \text{ kW cm}^{-2}$ ) das Fluoreszenzsignal gleichmäßig über den Zellkern verteilt. Wird die Anregungsleistung auf  $1.5 \text{ kW cm}^{-2}$  erhöht, so werden die meisten Farbstoffmoleküle über eine Reduktion des Triplettzustands durch GSH ausgeschaltet. Ferner beobachten wir das reversible An- und Ausschalten einzelner Farbstoffmoleküle in der Zelle, sodass auf diese Weise eine Untersuchung der mRNA in lebenden Zellen mit hochauflösender Mikroskopie möglich ist. Das hochaufgelöste Fluoreszenzbild zeigt einige Signale und Cluster im Kern, die für die Dauer der Messung (ca. 500 s) unbeweglich erscheinen. Das Vorliegen immobiler RNA im Kern ist auf die Bindung zu Kernproteinen zurückzuführen oder auf Wechselwirkung mit anderen Hindernissen.<sup>[38,39]</sup> Darüber hinaus berichten einige Arbeiten, dass Oligo-dT-Sequenzen zumindest kurzzeitig mit „nuclear speckle domains“<sup>[36,37]</sup> oder unbeweglichen Elementen der Transkriptions-, Spleiß- oder Polyadenylierungsmaschinerie wechselwirken.<sup>[40]</sup>

Unsere Ergebnisse stellen ein universelles Rezept dar, um kommerziell erhältliche organische Farbstoffe zur hochauflösenden Mikroskopie in Zellen einzusetzen. Dieses Konzept ist übertragbar auf alle gängigen Rhodamin- und Oxazinfarbstoffe im sichtbaren Spektrum. Der zugrundeliegende Mechanismus ist ein effizienter Übergang zwischen einem fluoreszierenden und einem nichtfluoreszierenden Zustand der Farbstoffmoleküle in Gegenwart millimolarer Konzentrationen von Thiolen. Die Lebensdauer des „An“-Zustands kann durch die Anregungsintensität gesteuert werden. Dabei muss sichergestellt sein, dass die Konzentration des reduzierenden Thiolats ausreicht, um den Triplettzustand zu entvölkern und über die Bildung eines Radikalanions und weitere Reaktionsschritte einen stabilen „Aus“-Zustand zu erhalten.

Die Lebensdauer des „Aus“-Zustands, d. h. die benötigte Zeit, um die reduzierte Spezies durch Sauerstoff zu oxidieren und somit zum Singulettzustand zurückzukehren, hängt direkt von der Sauerstoffkonzentration ab. Die durchschnittliche Lebensdauer des „Aus“-Zustands kann weiter verringert werden, indem Antikörper mit höherem Markierungsgrad eingesetzt werden. In diesem Fall ist der „Aus“-Zustand eines Antikörpers statistisch durch der Zahl der an diesen gekuppelten Farbstoffmoleküle bestimmt. Um eine schnellere Bildaufnahme zu erreichen, können höhere Bestrahlungsintensitäten eingesetzt werden, sodass die Lebens-

dauern von „An“- und „Aus“-Zustand verkürzt werden. Hierbei muss beachtet werden, dass zu hohe Intensitäten zu Schäden an Zellen führen können.

Obgleich der pH-Wert und die GSH-Konzentration in unterschiedlichen Zelltypen und Zellstadien stark variieren, ist das vorgestellte Konzept für Experimente in lebenden Zellen mit ausgewählten Farbstoffen geeignet (z.B. ATTO520, ATTO655, ATTO680 und ATTO700; Abbildung 4, S3 und S4). Besonders erwähnenswert ist, dass geeignete Farbstoffe für Lebendzellexperimente durch Messungen in Küvetten gefunden werden können. Die Einfachheit dieser Methode und der Einsatz kleiner organischer Farbstoffe eröffnen der hochauflösenden Mikroskopie mit mehreren Farben damit völlig neue Bereiche. Darüber hinaus bietet sich dieser Ansatz, in Verbindung mit spezifischen Markierungstechniken für kleine organische Farbstoffe, als vielversprechende Methode für die zukünftige hochauflösende Mikroskopie und hochpräzise Colokalisationsmikroskopie an.

Eingegangen am 17. April 2009,  
veränderte Fassung am 29. Mai 2009  
Online veröffentlicht am 7. August 2009

**Stichwörter:** Beugungsgrenze · Farbstoffe/Pigmente · Hochauflösende Mikroskopie · Lebendzellmikroskopie · Photoschalter

- [1] E. Abbe, *Arch. Mikrosk. Anat.* **1873**, 9, 413.
- [2] S. W. Hell, *Science* **2007**, 316, 1153.
- [3] S. W. Hell, J. Wichmann, *Opt. Lett.* **1994**, 19, 780.
- [4] S. W. Hell, M. Kroug, *Appl. Phys. B* **1995**, 60, 495.
- [5] 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.
- [6] S. T. Hess, T. P. Girirajan, M. D. Mason, *Biophys. J.* **2006**, 91, 4258.
- [7] P. Dedecker, J. Hotta, C. Flors, M. Sliwa, H. Uji-i, M. B. Roeffaers, R. Ando, H. Mizuno, A. Miyawaki, J. Hofkens, *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, 129, 16132.
- [8] M. Bates, B. Huang, G. T. Dempsey, X. Zhuang, *Science* **2007**, 317, 1749.
- [9] J. Fölling, M. Bossi, H. Bock, R. Medda, C. A. Wurm, B. Hein, S. Jakobs, C. Eggeling, S. W. Hell, *Nat. Methods* **2008**, 5, 943.
- [10] M. Heilemann, S. van de Linde, M. Schüttelz, R. Kasper, B. Seefeldt, A. Mukherjee, P. Tinnefeld, M. Sauer, *Angew. Chem.* **2008**, 120, 6266; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, 47, 6172.
- [11] M. Bossi, J. Fölling, V. N. Belov, V. P. Boyarskiy, R. Medda, A. Egner, C. Eggeling, A. Schönlé, S. W. Hell, *Nano Lett.* **2008**, 8, 2463.
- [12] S. van de Linde, R. Kasper, M. Heilemann, M. Sauer, *Appl. Phys. B* **2008**, 93, 725.
- [13] S. van de Linde, M. Sauer, M. Heilemann, *J. Struct. Biol.* **2008**, 164, 250.
- [14] C. Steinhauer, C. Forthmann, J. Vogelsang, P. Tinnefeld, *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, 130, 16840.
- [15] M. Heilemann, P. Dedecker, J. Hofkens, M. Sauer, *Laser Photonics Rev.* **2009**, 3, 180.
- [16] R. E. Thompson, D. R. Larson, W. W. Webb, *Biophys. J.* **2002**, 82, 2775.
- [17] I. Chen, A. Y. Ting, *Curr. Opin. Biotechnol.* **2005**, 16, 35.
- [18] M. Fernández-Suárez, A. Y. Ting, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2009**, 9, 929.
- [19] M. Heilemann, E. Margeat, R. Kasper, M. Sauer, P. Tinnefeld, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, 127, 3801.
- [20] J. Vogelsang, R. Kasper, C. Steinhauer, B. Person, M. Heilemann, M. Sauer, P. Tinnefeld, *Angew. Chem.* **2008**, 120, 5545; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, 47, 5465.
- [21] M. Sauer, K.-T. Han, R. Müller, S. Nord, A. Schulz, S. Seeger, J. Wolfrum, J. Arden-Jacob, G. Deltau, N. J. Marx, C. Zander, K. H. Drexhage, *J. Fluoresc.* **1995**, 5, 247.
- [22] J. P. Knemeyer, N. Marme, M. Sauer, *Anal. Chem.* **2000**, 72, 3717.
- [23] N. Marmé, J. P. Knemeyer, M. Sauer, J. Wolfrum, *Bioconjugate Chem.* **2003**, 14, 1133.
- [24] H. Neuweiler, A. Schulz, M. Bohmer, J. Enderlein, M. Sauer, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, 125, 5324.
- [25] H. Neuweiler, M. Sauer, *Curr. Pharm. Biotechnol.* **2004**, 5, 285.
- [26] H. Neuweiler, S. Dooze, M. Sauer, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2005**, 102, 16650.
- [27] V. Buschmann, K. D. Weston, M. Sauer, *Bioconjugate Chem.* **2003**, 14, 195.
- [28] T. Heinlein, J. P. Knemeyer, O. Piester, M. Sauer, *J. Phys. Chem. B* **2003**, 107, 7957.
- [29] W. W. Cleland, *Biochemistry* **1964**, 3, 480.
- [30] U. Burner, W. Jantschko, C. Obinger, *FEBS Lett.* **1999**, 443, 290.
- [31] E. Madej, P. Wardman, *Arch. Biochem. Biophys.* **2007**, 462, 94.
- [32] R. C. Weast, Chemical Rubber Company, **1979**.
- [33] U. Burner, C. Obinger, *FEBS Lett.* **1997**, 411, 269.
- [34] C. E. Shannon, *Proc. IRE* **1949**, 37, 10.
- [35] H. Sies, *Free Radical Biol. Med.* **1999**, 27, 916.
- [36] R. W. Dirks, C. Molenaar, H. J. Tanke, *Histochem. Cell Biol.* **2001**, 115, 3.
- [37] C. Molenaar, A. Abdulle, A. Gena, H. J. Tanke, R. W. Dirks, *J. Cell Biol.* **2004**, 165, 191.
- [38] J. P. Leonetti, N. Mecht, G. Degols, C. Gagnor, B. Lebleu, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1991**, 88, 2702.
- [39] J. C. Polit, E. S. Browne, D. E. Wolf, T. Pederson, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1998**, 95, 6043.
- [40] J. P. Knemeyer, D. P. Herten, M. Sauer, *Anal. Chem.* **2003**, 75, 2147.