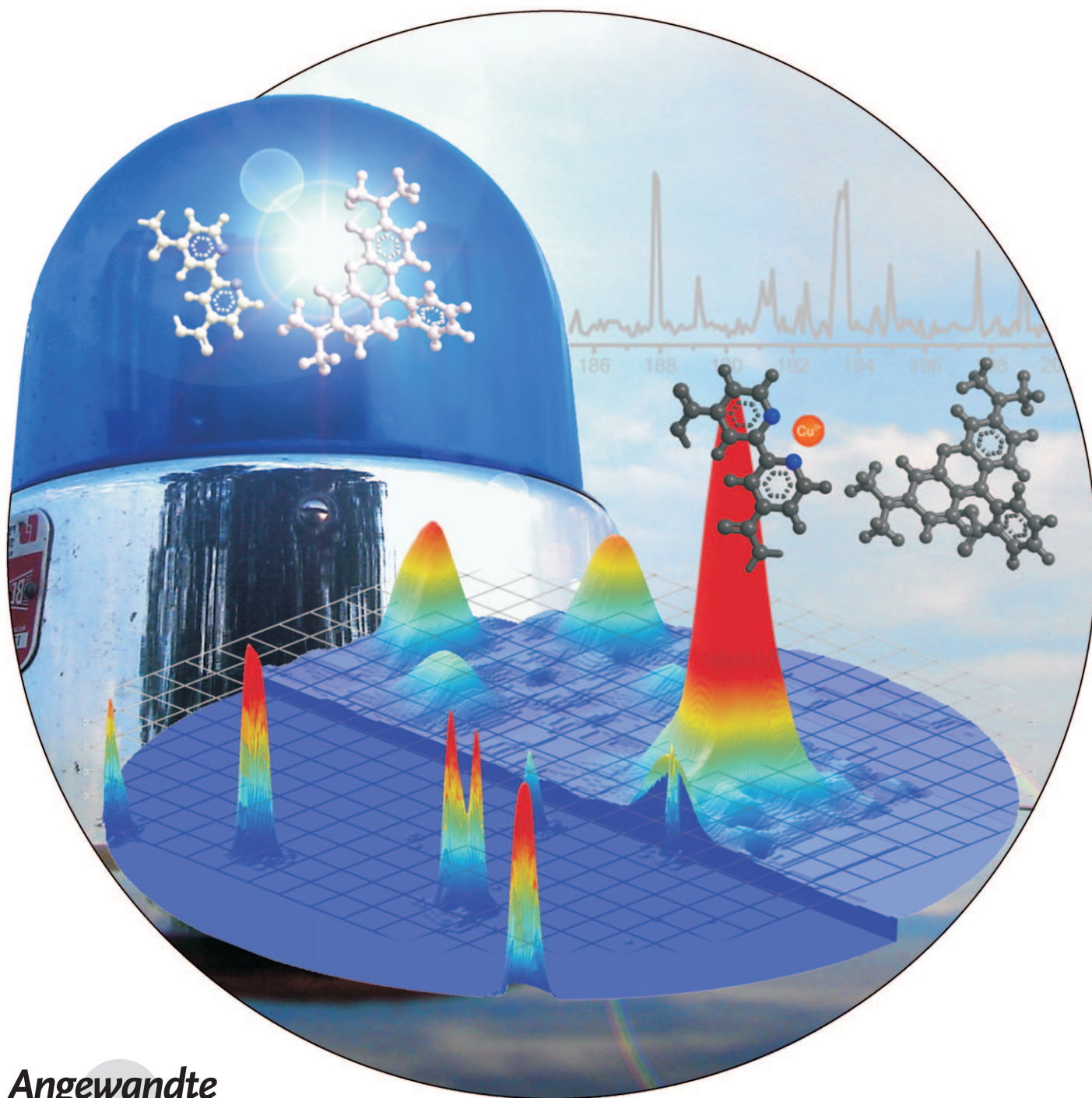


Hochauflösende Mikroskopie mit reversiblen chemischen Reaktionen**

Michael Schwering, Alexander Kiel, Anton Kurz, Konstantinos Lymperopoulos, Arnd Sprödefeld, Roland Krämer und Dirk-Peter Herten*



Angewandte
Chemie

Die Fluoreszenzmikroskopie hat sich in den vergangenen Jahrzehnten zu einer leistungsfähigen Standardmethode entwickelt, mit der sowohl Strukturen als auch dynamische Prozesse in lebenden Zellen untersucht werden können. Diese Entwicklung wurde durch die Entdeckung fluoreszierender Proteine unterstützt, die genetisch an dem Zielprotein angebracht und direkt in lebenden Zellen exprimiert werden können.^[1] Die Auflösung der optischen Mikroskopie ist aufgrund von Beugungsphänomenen aber auf ungefähr 200 nm innerhalb der Bildebene und 500 nm längs der optischen Achse begrenzt. Diese Auflösungsgrenze liegt ca. 1–2 Größenordnungen über der Größe vieler interessanter makromolekularer Komplexe und Aggregate.^[2]

Unlängst wurden verschiedene Konzepte experimentell umgesetzt, mit deren Hilfe diese Beugungsgrenze umgangen werden kann, sodass nun Abbildungen mit einer Auflösung von 10–30 nm möglich sind.^[3–6] Die bekanntesten Methoden sind die STED-Mikroskopie (Stimulated Emission Depletion) sowie die auf der Lokalisierung von einzelnen Molekülen beruhenden Verfahren STORM (Stochastic Optical Reconstruction Microscopy) und PALM (Photo-Activation Localization Microscopy).^[7–12] Überlappende Punktabbildungsfunktionen benachbarter Objekte werden hierbei zeitlich voneinander getrennt – durch lichtinduziertes Schalten zwischen einem hellen („an“) und einem dunklen Zustand („aus“).

Die STED-Mikroskopie nutzt dieses Prinzip, indem, nach der herkömmlichen konfokalen Anregung, ein zweiter ringförmiger Laserpuls umliegende Fluorophore durch stimulierte Emission in den Grundzustand zurückführt. Aufgrund der Nullstelle im Zentrum des STED-Pulses erscheint die Punktabbildungsfunktion der emittierten Fluoreszenz verschmälert.^[8] Die Abbildung wird im Zeilenrasterverfahren erzeugt, und die Präzision der Bildaufnahme hängt von der Intensität des STED-Pulses, von der Präzision des Mikroskoptischen und den optischen Eigenschaften des Fluoreszenzfarbstoffs ab.

Bei STORM und PALM werden hingegen Farbstoffe bzw. fluoreszierende Proteine stochastisch an- und ausgeschaltet. Dabei wird stets nur eine kleine Subpopulation angeschaltet, deren Punktabbildungsfunktionen nicht überlappen. Diese werden im Einzelmolekülmikroskop mit einer hochemp-

findlichen EMCCD-Kamera in einer Bildfolge aufgezeichnet.^[9–12] Die Zentren der einzelnen Punktabbildungsfunktionen erscheinen nun zeitlich getrennt und können daher jeweils mit einer Genauigkeit im Nanometerbereich lokalisiert werden. Durch wiederholtes Aufnehmen und Lokalisieren von einzelnen Fluorophoren wird ein hochaufgelöstes Bild rekonstruiert. PALM beruht auf der einmaligen Photoaktivierung und nachfolgenden Photozerstörung fluoreszierender Proteine, während bei STORM die Fluorophore reversibel zwischen An- und Aus-Zuständen geschaltet werden, bis es zu einer irreversiblen Photozerstörung kommt. Hierbei wird jedoch eine zusätzliche Laserlinie während der Bildaufnahme benötigt, um den An-Zustand des Fluoreszenzfarbstoffs zu (re)aktivieren.

Eine Weiterentwicklung von STORM ermöglicht es, die Dauer des Aus-Zustands durch Zugabe einer Mischung aus Reduktions- und Oxidationsmittel (reducing and oxidizing system, ROXS) einzustellen.^[13,14] Hierdurch konnten die experimentellen Bedingungen insoweit vereinfacht werden, dass nur noch eine Laserlinie sowohl für das Schalten als auch für die Bildaufnahme benötigt wird.^[15] Dennoch ist der Übergang vom An- in den Aus-Zustand immer noch lichtinduziert und hängt somit von der Anregungsleistung ab. Bei STORM hängen Anregungsleistung und Markierungsdichte stark voneinander ab.^[16] Bei hohen Markierungsdichten können einzelne Farbstoffmoleküle nur dann zeitlich getrennt werden, wenn der Anteil der Moleküle im Aus-Zustand weiter erhöht wird. Dies wird normalerweise durch Erhöhung der Anregungsleistung erreicht. Folglich müssen die experimentellen Bedingungen gleichermaßen auf die Anforderungen des lichtinduzierten Schaltens und der Bildaufnahme abgestimmt werden, da die Auflösung außerdem von der Zahl an detektierten Photonen abhängt.^[17] Deswegen verfolgen wir den Ansatz, das lichtinduzierte Schalten durch andere lichtunabhängige Prozesse zu ersetzen, die aber dennoch kontrolliert werden können. Anders als die STED-Mikroskopie ist das lichtinduzierte Schalten in den Einzelmolekülmethoden stochastisch – das heißt, die Fluorophore werden zufällig, ohne räumlichen oder zeitlichen Zusammenhang, an- und ausgeschaltet. Daher erscheint jeder andere stochastische nicht-lichtinduzierte Prozess auf dieses Konzept übertragbar. Beispiele hierfür sind chemische Reaktionen, sofern Reaktionskinetiken und Quantenausbeute geeignet sind, um zeitlich getrennte Punktabbildungsfunktionen zu erzeugen.^[18] Unlängst wurde dieses Konzept genutzt, um katalytisch aktive Zentren in Zeolithen und mesoporösen Silicaten zu lokalisieren. Hierbei machte man sich die Änderung der spektroskopischen Eigenschaften fluorogener Substrate zu Nutze, die entweder fluoreszierend wurden oder eine starke Verschiebung der Emissionswellenlänge aufwiesen.^[19–21] Allerdings ist uns bislang keine Verallgemeinerung als Mikroskopiemethode bekannt, um z.B. biologische Strukturen zu lokalisieren.

Kürzlich berichteten wir über kinetische Messungen der Komplexbildung zwischen Kupfer(II) und einem Bipyridin-Derivat im thermodynamischen Gleichgewicht als erstes Beispiel für die Untersuchung homogener chemischer Reaktionen mit Methoden der Einzelmolekül-Fluoreszenzspektroskopie.^[22] In diesem System wird die Komplexbildung

[*] M. Schwering, Dr. A. Kiel, A. Kurz, Dr. K. Lympieropoulos, Priv.-Doz. Dr. D.-P. Herten
Cellnetworks Cluster & Physikalisch-Chemisches Institut
Universität Heidelberg
Im Neuenheimer Feld 267, 69120 Heidelberg (Deutschland)
Fax: (+49) 6221-54-51-220
E-Mail: dirk-peter.herten@urz.uni-hd.de
Dr. A. Sprödefeld, Prof. Dr. R. Krämer
Anorganisch-Chemisches Institut
Universität Heidelberg
Im Neuenheimer Feld 270, 69120 Heidelberg, (Deutschland)

[**] Wir danken der DFG (EXC 81, SFB 623) und dem BMBF (ForSys, VIROQUANT) für finanzielle Unterstützung sowie Markus Sauer (Univ. Würzburg) und Steve Wolter (Univ. Bielefeld) für die Datenanalyse-Software.



Hintergrundinformationen zu diesem Beitrag sind im WWW unter <http://dx.doi.org/10.1002/ange.201006013> zu finden.

mit einem Kupfer(II)-Ion durch eine ausgeprägte Fluoreszenzlöschung der immobilisierten Sonde signalisiert. Kinetische Studien an einzelnen Sonden sind möglich, weil die Assoziation und Dissoziation der Kupfer(II)-Ionen die Sonde reversibel zwischen einem An- und einem Aus-Zustand schaltet. Hier demonstrieren wir die Anwendung der reversiblen Kupfer(II)-Komplexbildung als stochastischen Schalter zum Einsatz in der optischen Nanoskopie. Wir nennen diese Methode CHIRON (CHemically Improved Resolution for Optical Nanoscopy), um den chemischen Mechanismus zu unterstreichen. Wir werden im Folgenden dennoch die allgemeinere Bezeichnung Lokalisationsmikroskopie verwenden. Die Dauer des An-Zustands kann in diesem System durch Änderung der Cu^{II} -Konzentration abgestimmt werden.^[22] Deswegen eignet sich diese Methode, um einzelne Punktabbildungsfunktionen zeitlich, das heißt in unterschiedlichen Bildern, zu trennen. In Analogie zu STORM, PALM und verwandten Techniken werden einzelne Punktabbildungsfunktionen lokalisiert, und anschließend wird ein hochaufgelöstes Bild rekonstruiert.

Die Sonde beruht, wie bereits in vorherigen Publikationen beschrieben, auf einer Doppelstrang-DNA (22 bp) als Grundgerüst, um den Chelator 2,2'-Bipyridin-4,4'-dicarbonsäure und den Farbstoff Tetramethylrhodamin (TMR) in räumliche Nähe zueinander zu bringen.^[22,23] Das Bipyridin-Derivat wird an das aminomodifizierte 5'-Ende der DNA gekuppelt, während der komplementäre Strang am 3'-Ende mit TMR markiert wird. Zusätzlich weist der zweite Strang auch ein biotinyliertes 5'-Ende auf, um eine Bindung mit Streptavidin zu ermöglichen. Beide Stränge wurden mithilfe von HPLC gereinigt und vor den Experimenten hybridisiert.

Zur mikroskopischen Charakterisierung wurden die Sonden durch Streptavidin-Biotin-Bindung auf Deckgläsern immobilisiert, die mit einem Gemisch aus Kälberserum (BSA) und BSA-Biotin (ca. 5 %) belegt waren (siehe Abbildung 1 und *Experimentelles*). Im TIR-Fluoreszenzmikroskop (TIRFM; TIR = interne Totalreflexion) erscheinen einzelne Sonden (10 ms Belichtungszeit) bei unterschiedlichen CuSO_4 -Konzentrationen als individuelle beugungsbegrenzte Punkte (siehe die Hintergrundinformationen). Aus diesen Daten wurden Fluoreszenzspuren zur weiteren Analyse extrahiert (Abbildungen 1a–c). In Abwesenheit von Cu^{II} zeigen die Sonden eine konstante Fluoreszenzemission, bis sie photozerstört werden (Abbildung 1a). Nur wenn Cu^{II} hinzugefügt wird, tritt ein stochastisches Blinken auf der Sekundenskala auf (Abbildungen 1b und c), das der reversiblen Kupfer(II)-Komplexierung an die Sonde zugeschrieben werden kann.^[22] In der Lokalisationsmikroskopie ist das Verhältnis zwischen Aus- und An-Zustand ein kritischer Parameter für die Auflösungsverbesserung in Abhängigkeit der Markierungsdichte.^[17] Normalerweise wird das Aus/An-Verhältnis über die Veränderung der Laserintensitäten erreicht. In unserem Ansatz wird dieses Aus/An-Verhältnis durch die Konzentration an CuSO_4 bestimmt. Eine Erhöhung der CuSO_4 -Konzentration von 200 nM (Abbildung 1b) auf 2 μM (Abbildung 1c) führt zu signifikant kürzeren An-Zeiten als Resultat einer erhöhten Zahl an Assoziationsreaktionen.^[19]

Abbildung 1d zeigt einzelne Bilder aus einem Video, das mit einer Bildfrequenz von 30 Hz, einer Belichtungszeit von

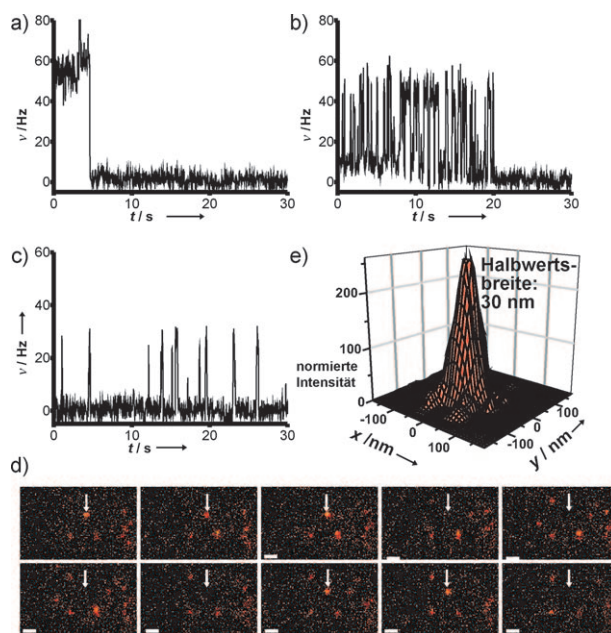


Abbildung 1. Zeitaufösende TIRF-Mikroskopie (Anregung bei 532 nm, 600 μW ; Bildfrequenz 30 Hz; Belichtungszeit 10 ms) von immobilisierten Sonden, die durch die Bindung von Kupfer(II) gelöscht werden. Zeitaufösende Messungen a) ohne Kupfer(II) zeigen eine konstante Fluoreszenz bis zur Photozerstörung, während bei CuSO_4 -Konzentrationen von b) 200 nM und c) 2 μM diskrete, zufällig verteilte Sprünge zwischen An- und Aus-Zuständen auftreten. d) Ausschnitte aus einem Film bei einer CuSO_4 -Konzentration von 2 μM zeigen, dass verschiedene immobilisierte Sonden unabhängig voneinander blinken und einzeln lokalisiert werden können. Der Pfeil markiert das Molekül, dessen Spur in (c) gezeigt ist. e) Das Gauß-Profil, das durch mehrfache Lokalisierungen eines Punkts entsteht, hat eine Halbwertsbreite von 30 nm.

10 ms und einer CuSO_4 -Konzentration von 200 nM aufgenommen wurde. Der Pfeil markiert den Punkt, dessen Fluoreszenzspur in Abbildung 1b gezeigt ist. Offensichtlich können bereits bei einer Kupfersulfat-Konzentration von 200 nM einzelne Sonden durch das diskrete Blinken in unterschiedlichen Bildern aufgelöst werden. Um zu testen, ob ähnliche Auflösungen erreicht werden wie in anderen Veröffentlichungen zur Lokalisationsmikroskopie, wurde ein komplettes Video (1000 Bilder) mit einer Lokalisationssoftware^[24] analysiert. Die wiederholte Positionsbestimmung von Punktabbildungen mithilfe eines Gauß-Modells erbrachte eine laterale Auflösung von ungefähr 30 nm; im Vergleich dazu beträgt die beugungsbegrenzte Auflösung unseres TIRF-Mikroskops etwa 250 nm (Abbildung 1e). Die laterale Auflösung verbessert sich somit um einen Faktor von ca. 10 und ist damit mit derjenigen bei anderen Ansätzen vergleichbar, die auf photoinduziertem Schalten beruhen. Die Auflösung ist gleichermaßen abhängig von der Zahl der Bilder und der Zahl der Photonen pro Punktabbildungsfunktion.^[7–12]

Als nächstes wurde die Anwendbarkeit dieser Methode in biologischen Proben getestet. Dazu wurden Mikrotubuli in fixierten Mausfibroblasten mit monoklonalen bovinen α -Tubulin-Antikörper markiert (siehe *Experimentelles*). Wie aufgrund der Vorexperimente (Abbildung 1a–c) zu erwarten, hängt die Qualität der Lokalisationsmethode sowohl von der

Markierungsdichte als auch von der Kupferkonzentration ab. Wir haben verschiedene CuSO_4 -Konzentrationen im Bereich von 1–40 μM getestet (siehe die Hintergrundinformationen). Zu geringe Mengen an Kupfersulfat führen zu überlappenden Punktabbildungsfunktionen und Artefakten in der Lokalisations-Analyse (Abbildungen S1a und b), während bei hohen Konzentrationen die Punktdichte und die Quantenausbeute zu gering werden (Abbildungen S1c und d). Die besten Ergebnisse wurden mit 12 μM Kupfersulfat erzielt. Abbildung 2a zeigt die normale TIRFM-Aufnahme eines markierten Fibroblasten nach Zugabe von 12 μM CuSO_4 . Dieses Bild ist die Summe aus 8000 Einzelbildern, die über einen Zeitraum von 400 Sekunden (20 Hz) aufgenommen wurden. Die Mikrotubuli der Fibroblasten sind als verschwommene Struktur erkennbar. Die einzelnen Bilder wurden einer Lokalisations- und Rekonstruktionsanalyse unterzogen, was die Auflösung signifikant verbesserte (Abbildung 2b). Die Vergrößerung einzelner Regionen ermöglicht die Auflösung einzelner Fasern, während das TIRFM-Bild nur verschwommene Strukturen offenbart (Abbildung 2c). Die Verbesserung der Auflösung wird nochmals in Abbildung 2e verdeutlicht, die das Intensitätsprofil einer TIRFM- (rot) und der

zugehörigen Lokalisationsaufnahme (grün) vergleicht, das sich aus der Intensität entlang der blauen Linie in Abbildung 2c und d ergibt. Während die TIRFM-Aufnahme nur einen breiten Verlauf zeigt, können im Lokalisationsbild zwei getrennte Fasern aufgelöst werden.

Besonders hervorzuheben ist, dass die Fluoreszenzlöschung aus dem angeregten Singulett-Zustand (vgl. Lit. [19]) heraus geschieht und die beschriebene Lokalisationsmethode somit unabhängig von der Anregungsleistung ist. Um dies zu zeigen, wurden kinetische Untersuchungen unter Variation der Anregungsleistung durchgeführt. Die Messungen der An/Aus-Fluktuationen der immobilisierten Sonden wurden mit 20 Hz und bei einer Aufnahmezeit von 25 ms durchgeführt. Die Filme wurden anschließend mit der Lokalisationssoftware^[24] analysiert, und aus diesen Werten wurden binäre (An/Aus-)Spuren rekonstruiert. Dies wurde für ca. 100 Moleküle pro Experiment gemacht. Die An/Aus-Zeiten wurden aus diesen Spuren mit einer selbstgeschriebenen MATLAB-Routine extrahiert, und die relative Häufigkeit wurde gegen die Dauer des An- und Aus-Zustands in Histogrammform aufgetragen (siehe die Hintergrundinformationen). Auf den ersten Blick wird deutlich, dass die An/Aus-Zeiten nicht signifikant von der Laserintensität abhängen, wenn Kupfersulfat im Puffer vorhanden ist. Nur wenn kein Kupfer(II) vorliegt, wird eine Leistungsabhängigkeit der An/Aus-Zeiten sichtbar. Die An/Aus-Histogramme werden am besten mit einem exponentiellen Zweikomponentenmodell beschrieben, auf dessen Grundlage sich Zeitkonstanten ableiten und deren Amplitude bestimmen lassen (siehe die Hintergrundinformationen). In Gegenwart von Kupfer(II) zeigen weder die An/Aus-Zeiten noch die Amplituden eine Abhängigkeit von der Laserleistung. Die Ergebnisse sind in den Abbildungen 3a und b zusammengefasst und zeigen die Auftragung der amplitudengewichteten An/Aus-Zeiten gegen die Anregungsleistung ohne Kupfer und bei 10 μM CuSO_4 . Offensichtlich steigt die Länge der An-Zeiten mit zunehmender Laserleistung, wenn kein Kupfer(II) vorliegt. Bei etwa 800 μW kommt es zur Sättigung, auf die dann wieder eine leichte Abnahme folgt (Abbildung 3a). Auch die Länge der Aus-Zeiten (Abbildung 3b) zeigt bis ungefähr 800 μW zunächst eine Abnahme, bis sie sich ebenfalls stabilisiert. Der Grund dieser Fluktuationen ist bisher unklar; es könnte sich um ein Artefakt der Datenanalyse durch den Lokalisationsalgorithmus aufgrund eines zu niedrigen Signal/Rausch-Verhältnisses handeln. Wichtiger ist aber, dass die An-Zeiten bis auf kleine Fluktuationen konstant bleiben, wenn Cu^{II} in der Lösung vorhanden ist. Die Aus-Zeiten zeigen lediglich eine leichte Verkürzung mit ansteigender Anregungsleistung. Dies ist jedoch wahrscheinlich auf den großen Fehler bei der Schätzung der Amplitude zurückzuführen. Sowohl die Daten in Abbildung 3a und b als auch die Daten aus den Hintergrundinformationen zeigen, dass die Fluoreszenzlöschung für den Kupfer(II)-Komplex viel weniger intensitätsabhängig ist als für die freie Sonde. Das belegt, dass die zugehörigen Komplexbildungskinetiken den Schaltprozess steuern und keine photoinduzierten Prozesse.

Wir haben auch den Einfluss anderer Metallionen untersucht, die an das Bipyridin-Derivat binden und als mögliche Löschmoleküle für die Lokalisationsmikroskopie infrage

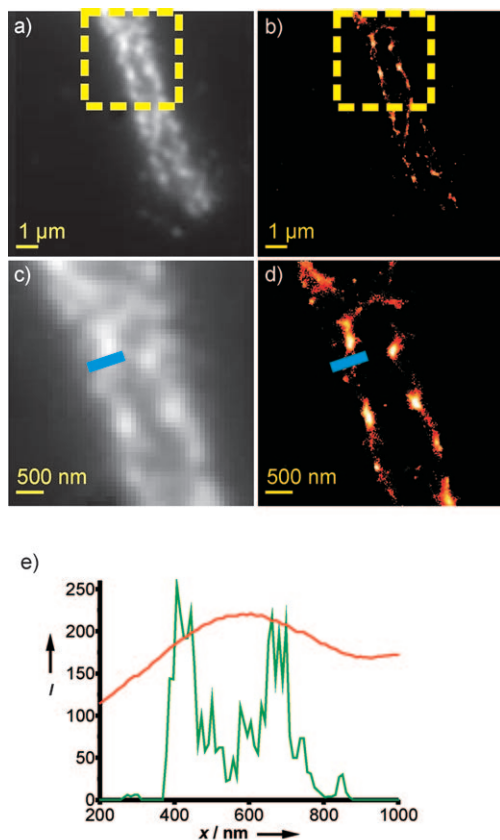


Abbildung 2. TIRF-Experimente (Anregung 532 nm, 600 μW , Bildfrequenz 20 Hz; 12 μM CuSO_4) mit fixierten Mausfibroblasten. a) Normales TIRFM-Bild, aufsummiert über 8000 Einzelaufnahmen. b) Das rekonstruierte Lokalisationsbild für (a) löst einzelne Mikrotubuli auf. c,d) Vergrößerte Ausschnitte aus (a) und (b). e) Das Intensitätsprofil entlang der blauen Linie in (c) (rot) zeigt ein breites Band aus dem TIRFM-Bild. Im Profil des Lokalisationsbilds (d) (grün) sind Details aufgelöst, die aus dem TIRFM-Bild nicht ersichtlich sind.

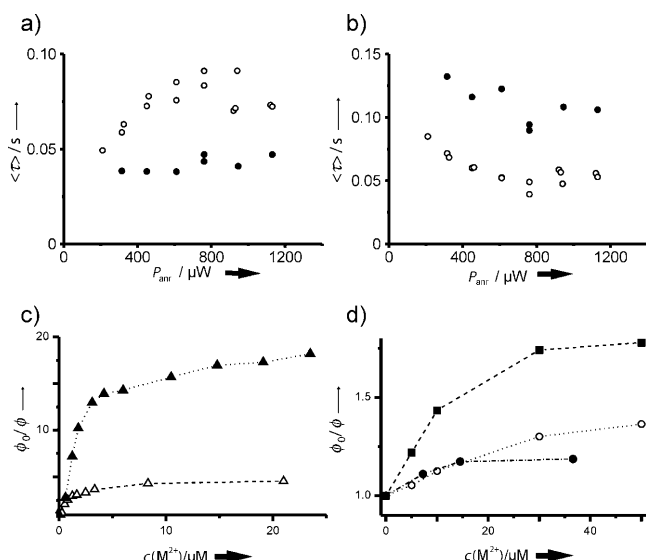


Abbildung 3. a,b) Dauer der An-Zeiten (a) und Aus-Zeiten (b), aufgetragen gegen die Anregungsleistung mit $10 \mu\text{M}$ CuSO_4 (●) sowie ohne Kupfer(II) (○). Im Unterschied zur Sonde ohne Kupfer(II) werden die Fluktuationsraten bei Komplexbildung nicht oder nur schwach durch die Anregungsleistung beeinflusst. c,d) Stern-Volmer-Auftragungen zeigen die inverse relative Quantenausbeute der Sonde bei unterschiedlichen Konzentrationen von verschiedenen M^{2+} -Ionen: c) Cu^{II} (▲), Ni^{II} (△); d) Fe^{II} (■), Mn^{II} (○), Co^{II} (●).

kommen. Die Abbildungen 3c und d zeigen Stern-Volmer-Auftragungen, bei denen die inverse relative Quantenausbeute Φ_0/Φ gegen die Konzentration $c(\text{M}^{2+})$ der Metallsalze aufgetragen ist. Die Zunahme von Φ_0/Φ mit steigender Metallionen-Konzentration weist darauf hin, dass die Bindung all dieser Metallionen zu einer Löschung führt. Die effizienteste Fluoreszenzlöschung tritt für Cu^{2+} auf (Abbildung 3c). Auch Ni^{2+} löscht, allerdings um einen Faktor 10 schlechter. Beide Kurven zeigen eine Sättigung bei einer Konzentration von ungefähr $3 \mu\text{M}$ – ein Anzeichen für eine spezifische Komplexbildung des zweizähligen Bipyridin-Liganden. Andere Metallionen wie Fe^{2+} , Mn^{2+} und Co^{2+} löschen weniger effizient, obwohl immer noch eine Sättigung und somit die Komplexbildung beobachtet werden kann (Abbildung 3d). Zusätzlich wurden Mg^{2+} und Ca^{2+} getestet, aber bei beiden trat keine merkliche Änderung der Fluoreszenzintensität auf. Dennoch hat das vorgestellte Konzept in dieser Hinsicht ein großes Potenzial: Während Cu^{2+} unsere Sonde am besten zu löschen scheint, kann das Sondendesign durch Austausch des Farbstoffs und/oder des Chelatliganden so verändert werden, dass auch Mg^{2+} und Ca^{2+} genutzt werden könnten, um eine bessere biologische Kompatibilität zu erreichen.

Zusammenfassend haben wir gezeigt, dass die Verknüpfung reversibler chemischer Reaktionen mit fluoreszierenden Zuständen, wie bei der beschriebenen Komplexbildung von Cu^{II} , eine Alternative zu lichtgetriebenen einzelmolekülbasierten Lokalisationsmethoden darstellt, die der optischen Nanoskopie neue Wege eröffnen kann. Durch Einstellen der Kupfer(II)-Konzentration können mit unserer Methode die für Lokalisationsmikroskopie benötigten An/Aus-Verhältnisse erreicht werden. Anregungsleistung und Wellenlänge

sind hierbei vom Schaltprozess entkoppelt und können für die optimale Datenaufnahme angepasst werden. Als positiven Nebeneffekt haben wir einen drastischen Anstieg der Photostabilität beobachtet, sobald Kupfersulfat zugegeben wird. Die vorgestellte Sonde erscheint sehr vielseitig, weil Ligand, Farbstoff und Metallkation variiert werden können. Damit bestehen vielfältige Möglichkeiten, Einfluss auf Parameter wie das An/Aus-Verhältnis, die Quantenausbeute und die Fluoreszenzwellenlänge zu nehmen und z. B. auch eine Parallelanalyse („Multiplexing“) zu ermöglichen. Bisher wurden unsere Experimente mit fixierten Zellen durchgeführt. Ob diese Methode für Experimente mit lebenden Zellen geeignet ist, wird in naher Zukunft untersucht werden. Die Sonde erscheint aber derzeit noch nicht ideal für Routineanwendungen, da sie aufgrund des kurzen Oligonukleotids recht groß ist. Das Oligonukleotidgerüst wird momentan verwendet, um weitere Chelatoren und Farbstoffe zu testen, aber der Ersatz durch eine kleinere und kompaktere Struktur erscheint möglich. Das sollte dann auch die Einführung einer reaktiven Seitengruppe ermöglichen, mit der Proteine und Antikörper direkt markiert werden können. Außerdem sollte erwähnt werden, dass eine große Zahl unterschiedlicher Farbstoffe kommerziell erhältlich ist, deren Fluoreszenz durch verschiedene Metallionen gelöscht werden kann. Es bietet sich daher an, Fluoreszenzindikatoren für Ca^{2+} oder Mg^{2+} zu untersuchen, die für eine Markierung funktionalisiert werden können. Der Vorteil solcher Indikatoren liegt in einer besseren Biokompatibilität, weil die betreffenden Ionen bereits in Zellen vorliegen.

Experimentelles

Die TIRF-Mikroskopie-Messungen wurden mit einem selbstgebauten Mikroskop aufgenommen. Dieses besteht aus einem Zeiss Axiovert 200 Mikroskop, in das ein Dauerstrichlaser (532 nm; World Star Tech TECGL-30: 532 nm, 30 mW, Toronto, Kanada) über den Backport eingekoppelt ist. Die Fluoreszenz wurde über ein Objektiv (Olympus, PlanApochromat TIRF 100 \times , numerische Apertur: 1.45, Center Valley, Pennsylvania, USA) gesammelt und durch einen dichroitischen Strahlteiler und einen Bandpassfilter (z 532/633 und HQ 585/60, AHF Analytentechnik, Tübingen) vom Anregungslicht getrennt. Die Aufnahmen wurden mit einer rückwärtig belichteten EMCCD-Kamera (Andor iXon^{EM} + 897, Dublin, Irland) gemacht.

Zur Immobilisierung der Sonden für die TIRF-Mikroskopie wurden LabTek-Achtkammer-Deckgläser (Fisher Scientific GmbH, Schwerte, Deutschland) verwendet, die zuvor zweimal mit 1 % Flusssäure und entionisiertem Wasser gereinigt wurden. Die Oberflächen wurden in 10 mM Phosphatpuffer (PBS) bei Raumtemperatur präpariert. Zunächst wurde die Oberfläche 30 Minuten mit einer Mischung aus 5 mg mL^{-1} BSA und biotinyliertem BSA (20:1) inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit PBS wurde die Oberfläche weitere 30 Minuten mit $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ Streptavidin inkubiert, gefolgt von einem weiteren Waschschritt mit PBS. Zum Schluss wurde die DNA-Sonde (0.3 nM) zugefügt und 30 Minuten inkubiert. Nach einem Waschschritt mit 10 mM 3-(N-Morpholino)propansulfonsäure (MOPS)-Puffer (pH 7.5) waren die Proben für die Mikroskopie vorbereitet.

Für die biologischen Tests wurden die Mausfibroblasten (3T3, NIH, DSMZ, Braunschweig) über Nacht in Achtkammer-Deckgläsern (Nunc/Thermo Fisher Scientific, Langenselbold) in Phenolrot-freiem Medium (DMEM, Sigma Aldrich, Taufkirchen) kultiviert. Nach einem Waschschritt mit 10 mM PBS wurden die Zellen 20 Minuten mit 4 % Paraformaldehyd (PFA) fixiert, drei- bis fünfmal je

5 Minuten mit PBS gewaschen, 10 Minuten mit TritonX-100 permeabilisiert und weitere dreimal 5 Minuten mit PBS gewaschen. Die Mikrotubuli wurden anschließend 1 Stunde mit einem biotinylierten monoklonalen bovinen α -Tubulin-Antikörper (mouse IgG1, monoclonal 236-10501, biotin-XX conjugate, Invitrogen, Darmstadt) inkubiert und dreimal mit PBS gewaschen. Danach wurde $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ Streptavidin in PBS hinzugefügt, und nach 30 Minuten wurde nichtgebundenes Streptavidin durch fünfmaliges Waschen mit PBS entfernt. Zum Schluss wurde die DNA-Sonde hinzugefügt ($2 \mu\text{g mL}^{-1}$), und die mit Antikörpern markierten Zellen wurden weitere 30 Minuten inkubiert. Der Überschuss an DNA-Sonde wurde durch fünfmaliges Waschen mit PBS entfernt. Nach dem vorsichtigen Entfernen aller Flüssigkeit wurde MOPS-Puffer auf die Zellen gegeben, um die TIRF-Messungen durchzuführen.

Eingegangen am 25. September 2010

Online veröffentlicht am 15. Februar 2011

Stichwörter: Auflösungsgrenze · Chemische Schalter · Fluoreszenzsonden · Einzelmolekülspektroskopie · Mikroskopische Lokalisierung

- [1] R. Y. Tsien, *Angew. Chem.* **2009**, *121*, 5721–5736; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, *48*, 5612–5621.
- [2] E. Abbe, *Arch. Mikrosk. Anat. Entwicklungsmech.* **1873**, *9*, 413–468.
- [3] S. W. Hell, *Science* **2007**, *316*, 1153–1158.
- [4] B. Huang, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2010**, *14*, 10–14.
- [5] G. Patterson, M. Davidson, S. Manely, J. Lippincott-Schwartz, *Annu. Rev. Phys. Chem.* **2010**, *61*, 345–367.
- [6] M. G. Gustafsson, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2005**, *102*, 13081–13086.
- [7] S. W. Hell, J. Wichmann, *Opt. Lett.* **1994**, *19*, 780–782.
- [8] T. A. Klar, S. Jakobs, S. W. Hell, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2000**, *97*, 8206–8210.
- [9] E. Betzig, G. H. Patterson, H. F. Hess, *Science* **2006**, *313*, 1642–1645.
- [10] M. J. Rust, M. Bates, X. W. Zhuang, *Nat. Methods* **2006**, *3*, 793–795.
- [11] S. T. Hess, T. P. K. Girirajan, M. D. Mason, *Biophys. J.* **2006**, *91*, 4258–4272.
- [12] M. Heilemann, S. van de Linde, M. Schüttelpelz, R. Kasper, B. Seefeldt, A. Mukherjee, P. Tinnefeld, M. Sauer, *Angew. Chem.* **2008**, *120*, 6266; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, *47*, 6172–6176.
- [13] J. Vogelsang, R. Kasper, C. Steinhauer, B. Person, M. Heilemann, M. Sauer, P. Tinnefeld, *Angew. Chem.* **2008**, *120*, 5545–5550; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, *47*, 5465–5469.
- [14] M. Heilemann, S. van de Linde, A. Mukherjee, M. Sauer, *Angew. Chem.* **2009**, *121*, 7036–7041; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, *48*, 6903–6908.
- [15] T. Cordes, J. Vogelsang, M. Anaya, C. Spagnuolo, A. Gietl, W. Summerer, A. Herrmann, K. Müllen, P. Tinnefeld, *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 2404–2409.
- [16] S. Van de Linde, S. Wolter, M. Heilemann, M. Sauer, *J. Biotechnol.* **2010**, *149*, 260–266.
- [17] R. E. Thompson, D. R. Larson, W. W. Webb, *Biophys. J.* **2002**, *82*, 2775–2783.
- [18] J. Vogelsang, C. Steinhauer, C. Forthmann, I. H. Stein, B. Person-Skegro, T. Cordes, P. Tinnefeld, *ChemPhysChem* **2010**, *11*, 2475–2490.
- [19] M. B. J. Roelfaers, G. De Cremer, J. Libeert, R. Ameloot, P. Dedecker, A. J. Bons, M. Bückins, J. A. Martens, B. F. Sels, D. E. De Vos, J. Hofkens, *Angew. Chem.* **2009**, *121*, 9449; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, *48*, 9285–9289.
- [20] G. De Cremer, B. F. Sels, D. E. De Vos, J. Hofkens, M. B. J. Roelfaers, *Chem. Soc. Rev.* **2010**, *39*, 4703–4717.
- [21] G. De Cremer, M. B. J. Roelfaers, E. Bartholomeeusen, K. Lin, P. Dedecker, P. P. Pescarmona, P. A. Jacobs, D. E. De Vos, J. Hofkens, B. F. Sels, *Angew. Chem.* **2010**, *122*, 920; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2010**, *49*, 908–911.
- [22] A. Kiel, J. Kovacs, A. Mokhir, R. Krämer, D. P. Herten, *Angew. Chem.* **2007**, *119*, 3427–3430; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2007**, *46*, 3363–3366.
- [23] M. Jäger, A. Kiel, D. P. Herten, F. A. Hamprecht, *ChemPhysChem* **2009**, *10*, 2486–2495.
- [24] Die Lokalisationssoftware wurde uns von S. Wolter (Universität Bielefeld) und M. Sauer (Universität Würzburg) zur Verfügung gestellt. S. Wolter, M. Schüttelpelz, M. Tscherepanow, S. van de Linde, M. Heilemann, M. Sauer, *Journal of Microscopy* **2009**, *237*, 12–22.