

Fluoreszenznanoskopie einzelner DNA-Moleküle mit Fluoreszenz-verhinderung durch stimulierte Emission (STED)**

F. Persson, P. Bingen, T. Staudt, J. Engelhardt, J. O. Tegenfeldt und Stefan W. Hell*

Für die Lebenswissenschaften spielt die Fluoreszenzmikroskopie eine wichtige Rolle, obwohl ihre Auflösung lange auf $\Delta r = \lambda/(2NA) > 200$ nm begrenzt war. (λ ist die Wellenlänge des Lichtes und NA die numerische Apertur des Objektivs.) Mitte der 1990er Jahre entstanden neue Mikroskopiekonzepte, die Auflösungen jenseits dieser Beugungsgrenze ermöglichen. Diesen Konzepten folgend schaltet man die Fluoreszenz des Farbstoffes so aus, dass Objekte, die näher als Δr zusammenliegen, gezwungen werden, nacheinander zu fluoreszieren.^[1,2] Je nachdem, wie dieses Ausschalten umgesetzt wird, unterscheidet man zwei Gruppen: Die erste Gruppe umfasst unter anderem die STED-Mikroskopie (STED = Stimulated Emission Depletion, stimulierte Emissionslöschung);^[2] hier ist die Koordinate, an der Fluoreszenz erlaubt ist, durch ein Lichtmuster vorgegeben, das eine Intensitätsverteilung mit einer kontrollierbaren Nullstelle aufweist, z.B. ein Doughnut-Muster. Die zweite Gruppe ermöglicht Fluorophoren stochastisches Emittieren im Raum in der Weise, dass innerhalb eines Durchmessers von $\lambda/(2NA)$ nur ein einzelner Fluorophor leuchtet. Die Emissionskoordinate wird dann bestimmt, indem man die Fluoreszenz auf eine Kamera abbildet, gefolgt von einer Schwerpunktsberechnung.^[3,4] In beiden Gruppen sind Abbildungen unterhalb der Beugungsgrenze möglich, indem man nacheinander eine repräsentative Zahl von Farbstoffmolekülen des Objekts fluoreszieren lässt und nachweist.^[1]

Während einige dieser Techniken bereits auf DNA-Systeme angewendet wurden, gelang bisher noch keine qualitativ hochwertige Nanoskopie an DNA-Molekülen.^[5–7] Dies ist

bedauerlich, da viele Funktionen (wie die Genexpression) dafür bekannt sind, durch Biegen, Schleifenbildung, Supercoiling und anderen Konformationsänderungen reguliert zu werden, und zwar auf Längenskalen unterhalb der Beugungsgrenze.^[8] Viele Konformationsänderungen der DNA geschehen im Bereich von 100 bis 1000 Basenpaaren, entsprechend 35 bis 350 nm, mit der Persistenzlänge von DNA (normalerweise ca. 50 nm) als grundlegender Längenskala. Um Konformationsänderungen und Variationen der DNA zu untersuchen, muss man sicherstellen, dass die vorgegebene Struktur nicht nur durchgehend gefärbt, sondern auch durchgehend detektiert wird. Insbesondere muss zwischen zusammenhängenden DNA-Strängen, in mehrere Teilstücke zerbrochenen Strängen und Anordnungen aus mehreren überlagerten Strängen unterschieden werden können.^[9]

Diese Anforderungen an die optische Nanoskopie von DNA-Strängen, die mit handelsüblichen interkalierenden Farbstoffen wie YOYO-1 (YOYO) gefärbt sind, lassen vermuten, dass die deterministische Natur der STED-Nanoskopie einen grundlegenden Vorteil gegenüber dem stochastischen Ansatz, der „stochastic ground state depletion followed by individual molecule return“ (GSDIM, später auch dSTORM genannt), hat.^[10–12] Während bei der STED-Nanoskopie wenige Photonen aus der Probe ausreichen, um ein Molekül zu identifizieren, hängt die Auflösung stochastischer Techniken im Wesentlichen quadratisch von der Zahl der Photonen ab. Die Genauigkeit wird weiter verringert, wenn Farbstoffmoleküle mit festem Dipolmoment nicht genau im Fokus liegen;^[13] für YOYO-Moleküle ist dies nicht unwahrscheinlich, da ihr Übergangsdipolmoment durch Interkalation an helikale DNA gekoppelt ist.^[14] Zudem führt eine Grundzustandsentvölkerung dazu, dass der Farbstoff in einen reaktiveren Zustand gepumpt wird.^[10–12] Dies hat möglicherweise Schädigungen oder Brüche der DNA-Stränge zur Folge (z.B. durch Elektronentransfer),^[5–7] liegt aber der GSDIM-Methode zugrunde. Im Unterschied dazu ist STED so konzipiert, dass das Molekül in den Grundzustand gepumpt wird und so vor Photoreaktionen geschützt sein sollte.^[15] Um sicherzustellen, dass bei GSDIM nur ein Fluorophor von einem dunklen in einen hellen Zustand innerhalb eines beugungsbegrenzten Volumens übergeht, muss man letztlich die Farbstoffkonzentration an die Lebensdauer des Dunkelzustandes anpassen. Dies ist schwierig, weil der Farbstoff-DNA-Komplex viele Dunkelzustände entlang des DNA-Stranges annehmen kann.^[5–7] Wenn diese Bedingung aber nicht erfüllt ist, erfolgt die Abbildung der DNA-Stränge und -Konformationen nicht durchgehend bzw. unzuverlässig. Dies gilt besonders für Punkte, an denen Biegungen und Schleifenbildung auftreten; hier ist eine nanoskalige Auflösung besonders wichtig. Aus all diesen Gründen haben wir uns dazu

[*] Dr. F. Persson,^[†] Prof. J. O. Tegenfeldt
Fakultät für Physik, Universität Göteborg
Fysikgränd 3, 412 96 Göteborg (Schweden)
P. Bingen,^[†] Dr. T. Staudt, Dr. J. Engelhardt, Prof. S. W. Hell
Abteilung Optische Nanoskopie,
Deutsches Krebsforschungszentrum (DKFZ)
Im Neuenheimer Feld 280, 69120 Heidelberg (Deutschland)
Fax: (+49) 6221-54-51210
E-Mail: shell@gwdg.de

[†] Diese Autoren haben zu gleichen Teilen zu dieser Arbeit beigetragen.

[**] Diese Arbeit wurde durch das 7. EU-Rahmenprogramm (7RP/2007-2013; Fördernummer 201418 (READNA)), Fördermittel des schwedischen Forschungsrates (2007-584 und 2007-4454), eine Young-Investigators-Förderung vom HSFP (RGY0078/2007-C) und ein AFR-PhD-Stipendium vom Nationalen Forschungsfonds, Luxemburg (TR-PHD BFR08-059) unterstützt. Wir danken Christoph Muus für das Vorbereiten von DNA-Proben sowie Patrick Hoyer und Matthias Reuss für die kritische Durchsicht der Übersetzung.

Hintergrundinformationen zu diesem Beitrag sind im WWW unter <http://dx.doi.org/10.1002/ange.201100371> zu finden.

entschlossen, einzelne DNA-Moleküle mit STED-Nanoskopie zu untersuchen.

Bei der von uns eingesetzten STED-Nanoskopie wird ein gepulster Anregungsstrahl mit einem Doughnut-förmigen STED-Strahl überlagert. Dieser verbietet es allen Farbstoffmolekülen, die dem Anregungslicht ausgesetzt sind, zu fluoreszieren, mit Ausnahme derjenigen, die im Zentrum des Doughnuts liegen. Durch Rastern der zeitlich gekoppelten Strahlen über die Probe werden die Details des fluoreszierenden Objekts zeitlich nacheinander aufgenommen.

Die Bilder wurden mit zwei unterschiedlichen, gepulsten STED-Wellenlängen (568 und 647 nm) aufgenommen. Der asymmetrische, dimere Cyaninfarbstoff YOYO wird wegen seiner Helligkeit und der 500fachen Fluoreszenzerhöhung nach Interkalation häufig für Einzelmolekül-DNA-Studien verwendet. Allerdings neigen interkalierende Cyaninfarbstoffe dazu, Lichtschäden an DNA-Farbstoff-Komplexen zu fördern, was sich in erhöhtem Bleichen und Brechen der DNA (Photonicking) bemerkbar macht. Photonicking kann drastisch reduziert werden, indem Sauerstoff aus dem Puffer entfernt wird. Die Wirkung von Sauerstoff auf das Bleichen bleibt bislang jedoch unklar; die Oxidation der DNA-Basenpaare trägt vermutlich zur Bleichwirkung bei.^[16] Wir fanden heraus, dass die Zugabe von β -Mercaptoethanol (BME) sowohl Photonicking als auch Bleichen reduziert. In den STED-Aufnahmen wurde festgestellt, dass die höchste Photostabilität bei Aufnahmen mit 20–50 Photonen pro Pixel (mit einer Pixelgröße von ca. 25 nm) bei einer Pixelintegrationszeit von 100 μ s erreicht wurde.

Mit einem STED-Strahl bei 568 nm erhalten wir eine 5–6-mal bessere Auflösung gegenüber derjenigen von normaler, konfokaler Mikroskopie (Abbildung 1), die ihrerseits bereits eine deutliche Verbesserung bezüglich Kontrast und Auflösung gegenüber der Epifluoreszenzmikroskopie (Abbildung 2c) bietet. Man beachte die Übereinstimmung in der Variation der Intensität entlang der DNA-Stränge zwischen den STED- und den konfokalen Bildern (Abbildung 1). Um zu untersuchen, über welchen Wellenlängenbereich STED noch wirksam ist, wurde STED an DNA auch bei 647 nm gemessen, wo die Emissionsintensität von YOYO nur noch 3% des Maximums beträgt. Dennoch ist die DNA 3–4-mal besser aufgelöst als bei herkömmlicher konfokaler Mikroskopie (Abbildung 2). Dies belegt die Anwendbarkeit von STED über einen Bereich von 80 nm. Knicke entlang der DNA können durch eine spezifische DNA-Sequenz oder durch die Bindung von Proteinen oder kleinen Molekülen auftreten. Abbildung 2 zeigt, dass STED diese feinen Strukturen auflösen kann, die konfokaler Mikroskopie verborgen bleiben.

Zur Untersuchung der komplexen Lichtschäden, die der DNA durch den STED-Strahl zugefügt werden (Basenpaar/Farbstoff 5:1), wurden nacheinander ein konfokales Bild, ein STED-Bild und ein weiteres konfokales Bild aufgenommen ($\lambda_{\text{STED}} = 568$ nm). Während das zweite konfokale Bild eine $(50 \pm 9)\%$ niedrigere Fluoreszenz durch Bleichen aufweist, wurde weder im STED noch in der zweiten konfokalen Aufnahme Photonicking beobachtet. Eine weitere Serie mit drei aufeinander folgenden konfokalen Bildern zeigte eine Verringerung des Fluoreszenzsignals um $(34 \pm 16)\%$. STED

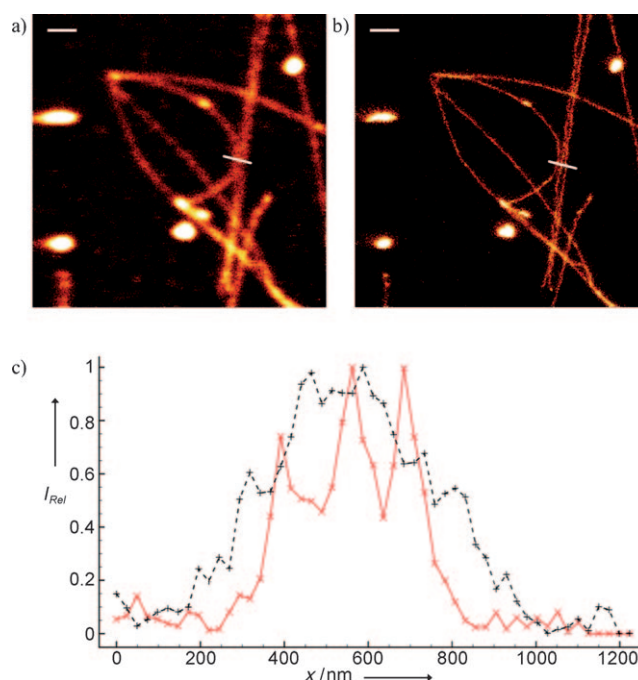


Abbildung 1. a) Konfokale Abbildung von mit YOYO gefärbter λ -DNA (Basenpaar/Farbstoff 5:1) mit b) dem entsprechenden STED-Bild (Rohdaten). Das STED-Bild ist vor dem konfokalen aufgenommen worden. Maßstab: 1 μ m. c) Durchschnitt dreier Linienprofile aus dem STED- (durchgezogene, rote Linie) und dem konfokalen Bild (gestrichelte, schwarze Linie). Die Liniensprofile entstammen der Position der weißen Linien in den obigen Bildern. Die drei deutlichen Spitzen mit unterschiedlichen DNA-Molekülen werden nur mit STED aufgelöst.

hat zwar eine Bleichwirkung, die sich aber kaum von der bei einer gewöhnlichen, konfokalen Messung unterscheidet. Weitere Einzelheiten bezüglich STED-Messungen mit einem niedrigeren Farbstoff/DNA-Verhältnis (kompatibel mit Einzelmoleküluntersuchungen von DNA-Protein-Interaktionen) finden sich in den Hintergrundinformationen.

Wir haben hier gezeigt, dass STED-Nanoskopie Aufnahmen von DNA bei einer Auflösung von ca. 45 nm ermöglicht. Dieser Wert ist vergleichbar mit der Persistenzlänge freier DNA, einer grundlegenden Längenskala der Polymerphysik. Die Variation des Fluoreszenzsignals entlang des DNA-Moleküls stimmt gut mit der von konfokaler Mikroskopie überein. Dies belegt die Anwendbarkeit von STED auf die Bildgebung einzelner DNA-Moleküle und eine künftige mögliche Verwendung für die Untersuchung von Signalvariationen, die aus sequenzspezifischer Farbstoffbindung oder teilweises Schmelzen der DNA resultieren. Die von uns gezeigte Kombination von Hochauflösung und Durchgängigkeit des Signals ist von entscheidender Bedeutung für die Visualisierung kleiner Konformationsänderungen sowie für die optische Abbildung von DNA.^[9] Außerdem konnten wir zeigen, dass STED über einen relativ breiten Wellenlängenbereich (mindestens 80 nm) angewendet werden kann. Bei größeren Wellenlängen werden in der Regel weniger Lichtschäden induziert, die Auflösungsverbesserung ist gleichwohl noch deutlich. Da die STED-Technik auf molekularen Übergängen zwischen den beiden grundlegenden Zuständen eines Fluo-

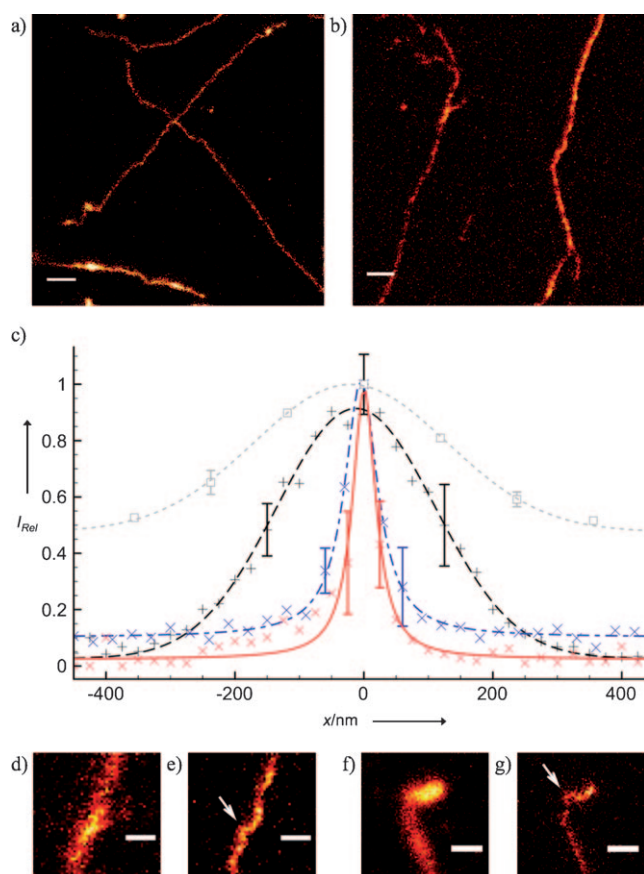


Abbildung 2. Typische STED-Rohdaten-Bilder von mit YOYO gefärbter λ -DNA (Basenpaar/Farbstoff 5:1) unter Anwendung von a) $\lambda_{\text{STED}} = 568$ nm und b) $\lambda_{\text{STED}} = 647$ nm. Maßstab in (a) und (b): 1 μm . c) Eine Kurve zeigt den Durchschnitt von elf Linienprofilen eines einzigen DNA-Strangs, mit zugehörigen Profilen der Epifluoreszenz (gepunktete, hellgraue Linie), konfokalen (gestrichelte, schwarze Linie) und STED-Nanoskopie mit $\lambda_{\text{STED}} = 647$ nm (strichgepunktete, blaue Linie) und 568 nm (durchgezogene, rote Linie); die entsprechenden Halbwertsbreiten wurden durch Anlegen von Ausgleichskurven zu (300 ± 11) nm (Gauß), (238 ± 5) nm (Gauß), (62 ± 2) nm (Lorentz) bzw. (42 ± 3) nm (Lorentz) bestimmt. Die Fehlerbalken entsprechen einer Standardabweichung. Beispiele von DNA-Segmenten mit Biegungen und Knicken, die sichtbar im STED-Bild unter Anwendung von e) $\lambda_{\text{STED}} = 647$ nm und g) $\lambda_{\text{STED}} = 568$ nm, jeweils aber nicht auflösbar in den entsprechenden konfokalen Bildern (d) und (f) sind. Maßstab in (d)–(g): 500 nm.

rophors, d. h. dem Grundzustand und dem ersten elektronisch angeregten Zustand, beruht, erwarten wir, dass sie sich zur bevorzugten Methode für die optische Erforschung der DNA auf molekularer Ebene entwickeln wird.

Experimentelles

λ -Bakteriophagen-DNA (Amersham Biosciences) wurde mit YOYO-1 (Invitrogen) gefärbt, mit einem Basenpaar/Farbstoff-Verhältnis von 5:1 und 20:1. Vor den Experimenten wurde die gefärbte DNA auf $1 \mu\text{g mL}^{-1}$ mit entgastem $0.5 \times$ Tris-Borat-EDTA (TBE)-Puffer und 5% (v/v) β -Mercaptoethanol (Sigma Aldrich) verdünnt und auf mit Poly-L-Lysin beschichteten Deckgläschen gestreckt. Details siehe Hintergrundinformationen.

Die Anregung der DNA erfolgte mit einer gepulsten Laserdiode (PicoQuant) mit Emission bei $\lambda_{\text{Anregung}} = 470$ nm mit einem Spitzenbestrahlungswert von $15\text{--}65 \text{ kW cm}^{-2}$ in der Probe (durchschnittliche Leistung von $1\text{--}4 \mu\text{W}$), synchronisiert mit einem STED-Laser bei $\lambda_{\text{STED}} = 568$ und 647 nm über eine schnelle Photodiode (OCF-401; Becker & Hickl GmbH). Der STED-Strahl wurde mit einem aktiv modengekoppelten (APE) Krypton-Laser (Coherent Inc.) erzeugt, mit Pulsbreiten von 1.5 ns (568 nm) und 300 ps (647 nm) bei einer Wiederholrate von 71.25 MHz und Höchstbestrahlungen von $20\text{--}30 \text{ MW cm}^{-2}$ (568 nm) und $210\text{--}360 \text{ MW cm}^{-2}$ (647 nm) in der Probe (Durchschnittsleistung von $45\text{--}70$ mW (568 nm) oder $130\text{--}220$ mW (647 nm)). Eine Vortex-Phasenplatte (RPC Photonics) wurde verwendet, um den für STED notwendigen Doughnut zu generieren. Die Anregungs- und STED-Strahlen wurden mit akustooptischen Filtern (Crystal Technologies) kombiniert und in ein Stativ (DMI 4000B; Leica Microsystems GmbH) eingekoppelt, das mit einem $63 \times$ (NA 1.30, Leica)-Ölimmersionsobjektiv und einem Drei-Achsen-Piezo-Scanner (PI) ausgestattet ist. Die emittierte Fluoreszenz wurde durch einen Band-Pass-Filter (HQ510/40M; Chroma) gefiltert und konfokal mit einer Avalanche Photodiode (SPCM-AQR-13-FC; PerkinElmer) und einer Datenerfassungs-Software (ImSpector, MPI Biophysikalische Chemie Göttingen) detektiert. Die Pixelgrößen betrugen 25 und 40 nm für $\lambda_{\text{STED}} = 568$ bzw. 647 nm bei einer Pixel-integrationszeit von $100 \mu\text{s}$. Die entsprechenden konfokalen Bilder wurden mit den gleichen Parametern aufgenommen.

Eingegangen am 15. Januar 2011

Online veröffentlicht am 6. Mai 2011

Stichwörter: DNA · Einzelmoleküluntersuchungen · Farbstoffe/Pigmente · Fluoreszenz · Stimulierte Emissionslöschung

- [1] S. W. Hell, *Science* **2007**, *316*, 1153–1158.
- [2] S. W. Hell, J. Wichmann, *Opt. Lett.* **1994**, *19*, 780–782.
- [3] M. J. Rust, M. Bates, X. W. Zhuang, *Nat. Methods* **2006**, *3*, 793–795.
- [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] C. Flors, N. J. Ravarani, D. T. F. Dryden, *ChemPhysChem* **2009**, *10*, 2201–2204.
- [6] C. Flors, *Biopolymers* **2011**, *95*, 290–297.
- [7] C. Flors, *Photochem. Photobiol. Sci.* **2010**, *9*, 643–648.
- [8] J. M. G. Vilar, L. Saiz, *Curr. Opin. Genet. Dev.* **2005**, *15*, 136–144.
- [9] E. T. Dimalanta, A. Lim, R. Runnheim, C. Lamers, C. Churas, D. K. Forrest, J. J. de Pablo, M. D. Graham, S. N. Coppersmith, S. Goldstein, D. C. Schwartz, *Anal. Chem.* **2004**, *76*, 5293–5301.
- [10] H. Bock, C. Geisler, C. A. Wurm, C. Von Middendorff, S. Jakobs, A. Schonle, A. Egner, S. W. Hell, C. Eggeling, *Appl. Phys. B* **2007**, *88*, 161–165.
- [11] J. Fölling, M. Bossi, H. Bock, R. Medda, C. A. Wurm, B. Hein, S. Jakobs, C. Eggeling, S. W. Hell, *Nat. Methods* **2008**, *5*, 943–945.
- [12] M. Heilemann, S. van de Linde, M. Schüttelz, R. Kasper, B. Seefeldt, A. Mukherjee, P. Tinnefeld, M. Sauer, *Angew. Chem.* **2008**, *120*, 6266–6271; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, *47*, 6172–6176.
- [13] J. Engelhardt, J. Keller, P. Hoyer, M. Reuss, T. Staudt, S. W. Hell, *Nano Lett.* **2011**, *11*, 209–213.
- [14] F. Persson, F. Westerlund, J. O. Tegenfeldt, A. Kristensen, *Small* **2009**, *5*, 190–193.
- [15] J. Hotta, E. Fron, P. Dedeker, D. P. F. Janssen, C. Li, K. Müllen, B. Harke, J. Bückers, S. W. Hell, J. Hofkens, *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 5021–5023.
- [16] C. Kanony, B. Akerman, E. Tuite, *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*, 7985–7995.