

# Ein ermüdungsarmes photoschaltbares fluoreszierendes Protein für die optische Nanoskopie\*\*

G. Ulrich Nienhaus\*

Datenspeicherung · Fluoreszenzsonden · Imaging-Substanzen · Photochemie · STED/RESOLFT

Die Funktion biologischer Makromoleküle kann nur im Kontext ihrer komplexen, natürlichen Umgebung vollständig verstanden werden. Daher wurden in den letzten Jahren viele Untersuchungen mit dem Ziel durchgeführt, funktionale Prozesse direkt in lebenden Zellen, Geweben oder ganzen Organismen zu beobachten. Die fluoreszenzbasierte optische Mikroskopie ist dabei eine Schlüsselmethode, denn sie ist minimalinvasiv und ermöglicht die zwei- wie auch dreidimensionale Bildgebung über längere Zeiträume. Allerdings erfordert diese Technik die spezifische Markierung ausgewählter Strukturen mit Fluoreszenzsonden, was oft mit erheblichem Aufwand verbunden ist. Man erreicht so jedoch eine enorme Selektivität, sodass ein ausgewählter Prozess gezielt und ohne Störung durch die vielen anderen, gleichzeitig ablaufenden Prozesse beobachtet werden kann. Auch ist die Fluoreszenzmikroskopie höchst empfindlich – man kann problemlos einzelne Fluoreszenzmitter detektieren. Ein großer Nachteil der konventionellen optischen Fernfeldmikroskopie liegt in der eher moderaten räumlichen Auflösung, die durch Beugung auf etwa die halbe Wellenlänge des sichtbaren Lichts limitiert ist (200–400 nm). Da die typischen Abmessungen von Biomolekülen im Nanometerbereich liegen, ist eine Bildgebung auf molekularer Ebene nicht möglich. In den letzten Jahren wurden jedoch verschiedene Varianten der optischen Mikroskopie vorgestellt, die die Abbesche Auflösungsgrenze überwinden und die Auflösung signifikant verbessern.<sup>[1]</sup> In all diesen Höchstauflösungs- oder Nanoskopiekonzepten werden fluoreszierende Marker eingesetzt, deren Emissionseigenschaften durch Licht gezielt beeinflusst werden können. Grotjohann et al. haben in einer aktuellen Arbeit in *Nature* ein neues fluoreszierendes

Protein mit exzellenten Eigenschaften für die optische Nanoskopie vorgestellt.<sup>[2]</sup> Dieses reversibel schaltbare EGFP (rsEGFP; EGFP = enhanced green fluorescent protein) verspricht ein wichtiges Hilfsmittel für die hochauflösende Bildgebung von lebenden Zellen zu werden.

Die erste praktikable Fernfeldmikroskopietechnik mit Höchstauflösung, die STED-Mikroskopie (STED = stimulated emission depletion), wurde 1994 von Hell und Wichmann vorgestellt.<sup>[3]</sup> Hierbei wird das Bild Pixel für Pixel aufgenommen, indem die Probe mit einem scharf fokussierten, beugungslimitierten Laserfleck (Airy-Scheibe) von einigen hundert Nanometern Durchmesser in der Fokusebene abgerastert wird. Der Durchmesser des Laserflecks begrenzt die Auflösung eines konventionellen Laser-Scan-Konfokalmikroskops: Alle Fluorophore innerhalb des Flecks werden gleichzeitig angeregt; ihre Emissionssignale können nicht getrennt werden (Abbildung 1a). In der STED-Mikroskopie werden die angeregten Fluorophore einem weiteren, dem so genannten „Depletions-“ oder Abregungsstrahl ausgesetzt, der dem Anregungsstrahl räumlich überlagert ist. Sein Intensitätsprofil hat die Form eines Torus, mit null Intensität im Zentrum. Alle Fluorophore am Rand des Anregungsbereichs werden so durch stimuliertes Emission abgeregelt. Nur Fluorophore im Zentrum bleiben elektronisch angeregt und emittieren Fluoreszenzlicht, das detektiert und als Funktion der Scannerposition abgespeichert wird. Diese Anregungs-/Abregungssequenz wird ständig wiederholt, während das Bild mit Nanometerpräzision abgerastert wird. Die räumliche Begrenzung der Fluoreszenzmitter und damit die Auflösung sind allein durch die Intensität des Abregungsstrahls definiert; die Auflösung ist daher theoretisch unbegrenzt.<sup>[1]</sup>

Die STED-Mikroskopie hat den großen Vorteil, dass sie eine intrinsische physikalische Eigenschaft eines Fluorophors nutzt, nämlich die Fähigkeit zur stimulierten Abregung. Die hohen spontanen Abregungsraten, die durch die kurzen Fluoreszenzlebensdauern (typischerweise 1–5 ns) gegeben sind, erfordern allerdings hohe Intensitäten des Abregungslichts, um der spontanen Abregung der Fluoreszenz vorzukommen. Es wurde aber rasch erkannt, dass sich das STED-Konzept, also die kombinierte Aktivierung/Desaktivierung von Fluorophoren, verallgemeinern lässt.<sup>[4]</sup> Alle auf dieser Strategie basierenden Ansätze wurden unter dem Akronym RESOLFT (reversible saturable optical fluorescence transition) zusammengefasst. Ein Fluorophor, der mit Hilfe von Licht schnell und effizient zwischen einem fluores-

[\*] Prof. Dr. G. U. Nienhaus

Institut für Angewandte Physik  
und

Center for Functional Nanostructures (CFN)

Karlsruher Institut für Technologie (KIT)

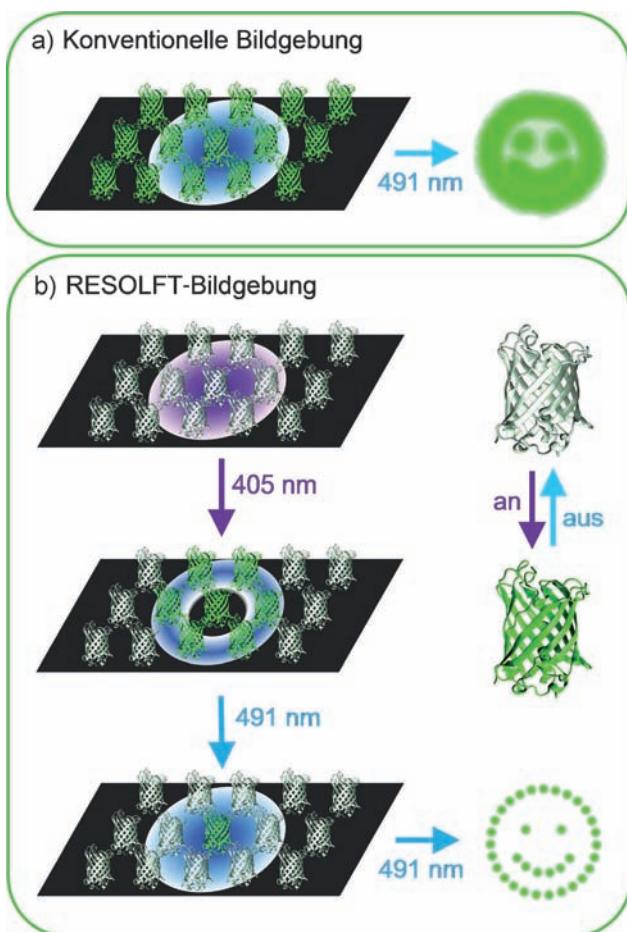
Wolfgang-Gaede-Straße 1, 76131 Karlsruhe (Deutschland)  
und

Department of Physics

University of Illinois at Urbana-Champaign  
Urbana, IL 61801 (USA)

E-Mail: uli.nienhaus@kit.edu

[\*\*] Der Autor dankt für finanzielle Unterstützung durch die Deutsche Forschungsgemeinschaft (Center for Functional Nanostructures und Ni 291/9).



**Abbildung 1.** a) Bei der konventionellen Bildgebung werden viele Fluorophore gleichzeitig durch einen fokussierten Lichtstrahl angeregt, während dieser die Probe abrastert. b) Bei der RESOLFT-Mikroskopie werden die Chromophore mit 405-nm-Licht lokal aktiviert (Dauer ca. 100 µs). Anschließend werden die Moleküle in der Peripherie durch 491-nm-Licht (ca. 10 ms) wieder deaktiviert. Dieser Strahl hat null Intensität in seinem Zentrum, sodass die Moleküle dort aktiviert bleiben und über ihre Emission detektiert werden können.

zierenden und nicht fluoreszierenden Zustand hin- und hergeschaltet werden kann, jedoch nur kleine spontane Übergangsraten zeigt, ist für RESOLFT geeignet. Bei spontanen Übergängen, z.B. im Bereich von Millisekunden, kann der Abregungsstrahl für RESOLFT um Größenordnungen schwächer sein als für STED. Das Prinzip ist in Abbildung 1b dargestellt. Fluorophore, die sich zunächst im nicht emittierenden Zustand befinden, werden durch einen scharf fokussierten Laserfleck mit Licht geeigneter Wellenlänge in den emittierenden Zustand überführt. Danach werden die Fluorophore in der Peripherie des Flecks durch einen Lichtpuls anderer Wellenlänge deaktiviert, sodass anschließend nur noch die Moleküle im Zentrum fluoreszieren.

Anstelle der punktförmigen Aktivierung/Desaktivierung kann auch eine periodische, linienförmige Beleuchtung verwendet werden, um in Kombination mit photoschaltbaren Fluorophoren in einem Weitfeldmikroskop durch SSIM (saturated structured illumination microscopy) optische Abbildungen mit Höchstauflösung zu generieren.<sup>[5]</sup> Ein weiteres

Prinzip wurde in den Lokalisationsmikroskopieverfahren mit Höchstauflösung [PALM (photo-activation localization microscopy) und STORM (stochastic optical reconstruction microscopy)] realisiert.<sup>[6]</sup> Hierbei sind die Farbstoffe zunächst deaktiviert. Anschließend werden sie ganz vereinzelt aktiviert, sodass sich ihre individuellen Emissionsmuster in einem einzelnen Kamerabild nicht überlagern. Die Schwerpunkte der Fluoreszenzsignale der einzelnen Emittoren sind sehr genau bestimmbar. Aus diesen Positionen wird anschließend ein hochstauflöstes Bild aus typischerweise  $10^2$ – $10^4$  einzelnen Kamerabildern rekonstruiert.

Die gezielte Markierung von Strukturen in der lebenden Zelle wurde durch die rasante Entwicklung einer Vielzahl von fluoreszierenden Proteinen (FPs) stark vereinfacht.<sup>[7]</sup> Diese Markerproteine können auf DNA-Ebene mit einem Zielprotein fusioniert werden. Das Gen des Fusionskonstruktes kann in eine Zelle eingebracht werden, worauf diese das Fusionsprotein synthetisiert. Trotz der zusätzlichen Markerdomäne zeigt das Zielprotein meist seine normale Funktion (was allerdings stets überprüft werden muss). In den letzten Jahren wurden photoaktivierbare FPs für den Einsatz in der höchstauflösenden Mikroskopie entwickelt. Man unterscheidet zwei Arten der Photoaktivierung: Photokonversion bezeichnet den irreversiblen Übergang von einem nicht fluoreszierenden in einen fluoreszierenden Zustand oder von einer Emissionswellenlänge zu einer anderen. Photoschalten bedeutet den reversiblen Wechsel zwischen einem nicht fluoreszierenden und einem fluoreszierenden Zustand. Für die Lokalisationsmethoden reicht ein einziger Aktivierungsvorgang; es kann also jedes photoaktivierbare FP verwendet werden. Die RESOLFT-Methode benötigt jedoch schaltbare FPs, die sich viele Male zwischen den Zuständen hin- und herschalten lassen. Eine zehnfache Auflösungsverbesserung erfordert zehn Schaltvorgänge für jede räumliche Dimension, also  $10^2$  ( $10^3$ ) Zyklen für die Bildgebung in zwei (drei) Dimensionen. FPs sind weniger photostabil als gute synthetische Farbstoffe; viele können nur einige wenige Male geschaltet werden, bevor sie photobleichen. Die große Bedeutung der Arbeit von Grotjohann et al.<sup>[2]</sup> beruht auf der Tatsache, dass rsEGFP mehr als  $10^3$  Schaltzyklen durchlaufen kann und damit eine hervorragende RESOLFT-Bildgebung ermöglicht.

Ausgehend von monomerem EGFP wurden durch Kombination von gerichteter und Zufallsmutationen fünf weitere Aminosäuren ausgetauscht (Q69L/V150A/V163S/S205N/A206K), um schließlich rsEGFP zu erhalten. Dessen Fluoreszenz wird durch violettes (405-nm-)Licht an- und durch cyanfarbenes (491-nm-)Licht ausgeschaltet (Abbildung 1b). In vitro konnte eine Verringerung der Ausgangsfluoreszenz auf 1–2% erzielt werden (bei pH 7.5). Mithilfe von Fusionproteinen wurden die exzellenten Eigenschaften von rsEGFP sowohl in *E. coli*- und PtK2-Zellen als auch an Schichtpräparaten des murinen Hippocampus demonstriert. Mit einer um etwa sechs Größenordnungen geringeren Intensität des Depletionsstrahls als bei STED konnten Auflösungen von ca. 40 nm erzielt werden. Höhere Leistungen ermöglichen vielleicht noch bessere räumliche Auflösungen. Bei STED hingegen sind die Intensität des Abregungslichts durch Multi-photonenabsorption und Photobleichen enge Grenzen ge-

setzt. Eine ähnliche Messzeit wie bei den anderen Höchstauflösungsmethoden wurde mit rsEGFP für RESOLFT erreicht. Diese hängt von der Schaltkinetik des FP-Markers ab. Durch weitere Mutationen kann die Messzeit möglicherweise noch etwas verringert werden.

Außer für die zelluläre Bildgebung können photoaktivierbare FPs auch in der zwei- und dreidimensionalen Datenspeicherung eingesetzt werden.<sup>[8]</sup> Grotjohann et al.<sup>[2]</sup> haben in ihrer Arbeit rsEGFP-Anwendungen sowohl in der WORM- als auch der WMRM-basierten zweidimensionalen Datenspeicherung demonstriert (WORM = write once, read many; WMRM = write many, read many).

Viele Labore weltweit sind derzeit bestrebt, die FP-Technologie voranzutreiben. Photoaktivierbare FPs sind dabei wegen ihrer Schlüsselfunktion für die Nanoskopie von besonderem Interesse.<sup>[9]</sup> Hohe Photostabilität und vielfache Schaltbarkeit sind fundamentale Eigenschaften eines jeden exzellenten Fluoreszenzmarkers. Mit rsEGFP haben Grotjohann et al. einen wesentlichen Fortschritt in der Entwicklung von vielseitigen und zugleich robusten FP-Markern erzielt.

Eingegangen am 15. November 2011  
Online veröffentlicht am 10. Januar 2012

- 
- [1] a) S. W. Hell, *Science* **2007**, *316*, 1153–1158; b) P. N. Hedde, G. U. Nienhaus, *Biophys. Rev.* **2010**, *2*, 147–158.
  - [2] T. Grotjohann, I. Testa, M. Leutenegger, H. Bock, N. T. Urban, F. Lavoie-Cardinal, K. I. Willig, C. Eggeling, S. Jakobs, S. W. Hell, *Nature* **2011**, *478*, 204–208.
  - [3] S. W. Hell, J. Wichmann, *Opt. Lett.* **1994**, *19*, 780–782.
  - [4] S. W. Hell, M. Dyba, S. Jakobs, *Curr. Opin. Neurobiol.* **2004**, *14*, 599–609.
  - [5] R. Heintzmann, M. G. Gustafsson, *Nat. Photonics* **2009**, *3*, 362–364.
  - [6] a) S. T. Hess, T. P. Girirajan, M. D. Mason, *Biophys. J.* **2006**, *91*, 4258–4272; b) 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; c) M. J. Rust, M. Bates, X. Zhuang, *Nat. Methods* **2006**, *3*, 793–795.
  - [7] G. U. Nienhaus, *Angew. Chem.* **2008**, *120*, 9130–9132; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, *47*, 8992–8994.
  - [8] V. Adam, H. Mizuno, A. Grichine, J. Hotta, Y. Yamagata, B. Moeyaert, G. U. Nienhaus, A. Miyawaki, D. Bourgeois, J. Hofkens, *J. Biotechnol.* **2010**, *149*, 289–298.
  - [9] a) T. Brakemann, A. C. Stiel, G. Weber, M. Andresen, I. Testa, T. Grotjohann, M. Leutenegger, U. Plessmann, H. Urlaub, C. Eggeling, M. C. Wahl, S. W. Hell, S. Jakobs, *Nat. Biotechnol.* **2011**, *29*, 942–947; b) J. Fuchs, S. Böhme, F. Oswald, P. N. Hedde, M. Krause, J. Wiedenmann, G. U. Nienhaus, *Nat. Methods* **2010**, *7*, 627–630.