

Dreidimensionale Tomographie im mittleren Infrarotbereich von endogenen und exogenen Molekülen in einer einzelnen Zelle mit subzellulärer Auflösung**

Luca Quaroni,* Martin Obst,* Marcus Nowak und Fabio Zobi*

Abstract: Mikroskopie im mittleren infraroten Spektralbereich liefert detaillierte chemische Informationen über eine Probe bei moderater Ortsauflösung und wird daher immer häufiger für die Charakterisierung von biologischen Proben wie etwa einzelnen Zellen verwendet. Aufgrund der Komplexität der Probentopographie sind konventionelle 2D-Bildgebungen jedoch in ihren Möglichkeiten limitiert, spezifische Informationen zur Probenzusammensetzung mit subzellulären Strukturen in Verbindung zu bringen. Wir stellen hier eine Methode und detaillierte Versuchsbeschreibungen vor, welche es ermöglichen, diese Einschränkungen durch Kippserientomographie mit einem konventionellen Infrarot-Labormikroskop zu umgehen. Basierend auf dem intrinsischen IR-Absorptionskontrast ermöglicht dieser Ansatz, quantitative 3D-Verteilungen von molekularen Komponenten zu erstellen. Wir demonstrieren die Methode anhand der Quantifizierung der Verteilung eines exogenen Metallcarbonyl-Komplexes innerhalb einer Zelle sowie durch die Darstellung der Veränderungen der Koordinationsumgebung des Komplexes in verschiedenen Zellkompartimenten.

Chemisch spezifische Verfahren zur Bildgebung von Zellen und Geweben basieren auf spektroskopischen Techniken, welche die chemische Zusammensetzung einer Probe erfassen. Die Messungen werden in einer optischen Konfiguration durchgeführt, die Spektromikroskopie bzw. spektromikroskopische Bildgebungen erlaubt. Die Mehrheit der chemisch sensitiven Bildgebungsmethoden basieren entweder auf Schwingungsspektroskopie oder Röntgenabsorption.^[1] Im Rahmen der schwingungsspektroskopischen Methoden hat sich vor allem die Absorption von Infrarotlicht im mittleren infraroten Spektralbereich (mid-IR) durchgesetzt, um de-

taillierte Informationen über die molekulare Zusammensetzung auf mikroskopischer Ebene zu erhalten. Als mikroskopische Methode wird dieser Ansatz immer häufiger eingesetzt, um die biochemische Zusammensetzung sowohl von fixierten als auch von lebenden Zellen und Geweben zu untersuchen, einschließlich der Aufnahme und Verteilung von exogenen Stoffen.^[1c,2] Die spektroskopische Information basierend auf der Absorption von IR-Licht ist in einem IR-mikroskopischen Experiment mit der Ortsinformation einer 2D-Bildgebung verknüpft, welche auf dem Fokalebenenarray(FPA)-Detektor entsteht. Dies resultiert in der ortaufgelösten Information über die chemische Zusammensetzung der gesamten Probe.^[3,4]

Trotz der Fülle an Information in einem 2D-IR-Bild ist dieses Format immanent beschränkt durch die Schwierigkeiten, die einzelnen Teilbeiträge einer komplexen 3D-Struktur zu einem 2D-Bild aufzuschlüsseln.^[5] Mit den immer mehr zunehmenden Anforderungen an IR-Experimente müssen solche Limitierungen beseitigt werden. In einigen Fällen kann Infrarotmikroskopie in abgeschwächter Totalreflexion (ATR) hilfreich sein, insbesondere in Situationen, in denen man sich die geringe Eindringtiefe des evaneszenten Feldes zu Hilfe nehmen kann, um selektiv örtlich aufgelöste Informationen zu erhalten; jedoch ist diese Methode nicht generell für alle Fragestellungen einsetzbar.^[6]

Ein wichtiges Anwendungsbeispiel von IR-Mikroskopie ist die Untersuchung der zellulären Aufnahme von pharmakologischen Wirkstoffen, welche bislang oft durch Probleme vereitelt wurde, präzise subzelluläre Verteilungen dieser Stoffe aus IR-Bildern zu berechnen.^[7] Die Untersuchung zellinterner metabolischer Prozesse ist ein weiteres Gebiet, in dem die Bildgebung und die präzise Quantifizierung von subzellulären Konzentrationsgradienten von kritischer Bedeutung sind.^[4c] Das Konzept, quantitative Information aus IR-Absorptionsspektren zu gewinnen, basiert auf der Kenntnis des Strahlengangs durch die untersuchten zellulären Strukturen; dieser kann jedoch nicht aus 2D-Bildern erschlossen werden. Ähnliche Probleme treten auf, wenn Raman-Spektroskopie oder CARS zur Bildgebung von zellulären Strukturen eingesetzt werden. Jedoch erlaubt die im Vergleich zur IR-Strahlung deutlich geringere Tiefenschärfe bei Raman-Messungen eine 3D-Rekonstruktion durch Aufnahmen verschiedener Fokusebenen entlang der Strahlachse.^[7,8] Im mittleren infraroten Spektralbereich ist dies jedoch nicht möglich, da die Tiefenschärfe meist größer ist als die Dicke der Zellen.

Dieses Problem konnten wir durch die Entwicklung einer Methode lösen, die es uns erlaubt, dreidimensionale tomographische IR-Datensätze von Zellen zu erstellen. Die prin-

[*] Dr. L. Quaroni,^[4] Prof. Dr. F. Zobi
Département de Chimie, Université de Fribourg
Chemin de Musée 9, 1700 Fribourg (Schweiz)
E-Mail: quaroni@bluewin.ch
fabio.zobi@unifr.ch

Dr. M. Obst, Prof. Dr. M. Nowak
Institut für Geowissenschaften
Eberhard Karls-Universität Tübingen
Hölderlinstraße 12, 72074 Tübingen (Deutschland)
E-Mail: martin.obst@uni-tuebingen.de

[+] Derzeitige Adresse: Functional Genomics Center Zurich
8057 Zürich (Schweiz)

[**] Wir danken Holger Marxer, Tübingen, für seine Hilfe am IR-Mikroskop und Wolfgang Kürner, Tübingen, für die Fabrikation des Motorhalters.

 Hintergrundinformationen zu diesem Beitrag sind im WWW unter <http://dx.doi.org/10.1002/ange.201407728> zu finden.

zipielle Durchführbarkeit eines tomographischen Experiments im mittleren infraroten Spektralbereich wurde von Martin et al.^[9] bereits vorgestellt, jedoch an einer Synchrotron-IR-Strahlinie. Die Notwendigkeit von Synchrotron-Strahlung dürfte die Verbreitung der Methode stark einschränken. Wir zeigen hier, dass es mit einem konventionellen Laborgerät im mittleren infraroten Spektralbereich möglich ist, subzelluläre Strukturen chemisch spezifisch und tomographisch abzubilden.

Dazu haben wir Kippserien von Transmissionsbildern einer einzelnen Zell-Lage der Epidermis von *Allium cepa* aufgenommen. Experimentelle Details sind im Anhang aufgeführt und erläutert. Der Versuchsaufbau ist in der Supplementary Figure 1 in den Hintergrundinformationen (SI) gezeigt. Die Zellen sind ziegelsteinförmig angeordnet und haben eine Größe von etwa $180 \times 80 \times 40 \mu\text{m}$. Abbildung 1 zeigt 2D-Bilder einer einzelnen Zelle im Absorptionskontrast verschiedener ausgewählter Absorptionsbanden im IR-Spektrum und Bilder der jeweiligen 3D-Rekonstruktion. Die 2D-Bilder sind IR-Bilder, in welchen der Grauwert jedes Pixels der Absorption einer spezifischen Absorptionsbande entspricht, wobei weiß die höchste Absorption darstellt. Beispielhaft ist in der Supplementary Figure 2 (SI) ein Spektrum dargestellt, in dem die spezifischen Absorptionsbanden markiert sind.

Als Beispiele zeigen wir 3D-Bilder von drei ausgewählten Banden zellulärer Bestandteile. Die Absorption bei 1538 cm^{-1} (Abbildung 1a–e) ist charakteristisch für die Amidgruppe in Polypeptiden; diese ist im Bereich des Zellkerns oft verstärkt. Die Absorption bei 1740 cm^{-1} (Abbildung 1f–j) wird hauptsächlich durch die Carbonylgruppe in Estern verursacht. Acetylierte Polysaccharide sind hierbei die Hauptbestandteile in der Pflanzenzellwand. Die Absorption bei 2917 cm^{-1} (Abbildung 1k–o) ist charakteristisch für Alkylketten von Fettsäuren. Tomographische Rekonstruktionen, basierend auf diesen Absorptionsbanden, zeigen deutlich die räumliche Verteilung der subzellulären Strukturen, einschließlich Zellwand, Zellkern und einer großen Vakuole, die in Abbildung 1 mit V markiert ist, und den größten Teil des Zellvolumens einnimmt.

Ein besonderes Beispiel in dieser speziellen Probe ist die Identifizierung und Lokalisierung des Zellkerns. Die mikroskopischen Bilder sowohl im sichtbaren als auch im IR-Spektralbereich (Abbildung 1) zeigen mehrere zellinterne Strukturen in der Größenordnung eines Zellkerns. Insbesondere zwei dieser Strukturen, die in Abbildung 1b,e mit **A** und **B** gekennzeichnet sind, überlappen sogar. Jedoch wird durch die unterschiedliche Intensität der Absorptionsbanden bei 1538 cm^{-1} (Abbildung 1b–e) und 2917 cm^{-1} (Abbildung 1k–o) eine unterschiedliche Zusammensetzung der beiden Strukturen offensichtlich. **A** zeigt dabei eine niedrigere Absorption der Alkylketten bei 2917 cm^{-1} als **B**, was auf

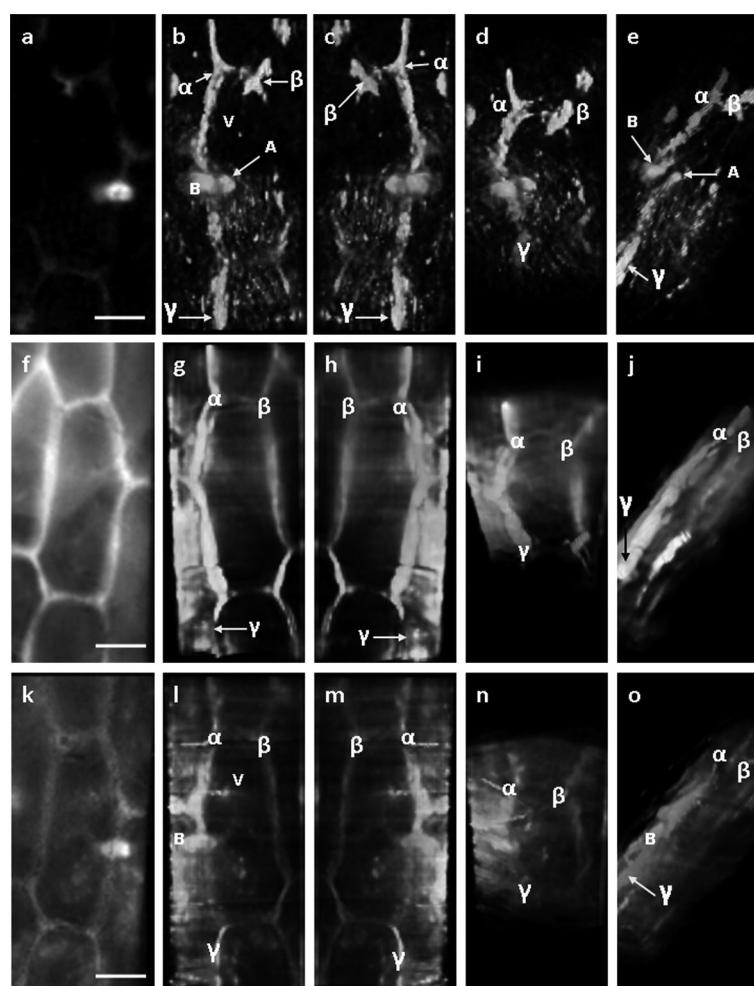


Abbildung 1. 3D-tomographische IR-Bilder von Zellen aus *Allium cepa* basierend auf dem Absorptionskontrast unterschiedlicher molekularer Komponenten. a) 2D-IR-Bild im Absorptionskontrast bei 1538 cm^{-1} . b–e) 3D-Rekonstruktionen bei 1740 cm^{-1} aus verschiedenen Perspektiven. f) 2D-IR-Bild im Absorptionskontrast bei 1740 cm^{-1} . g–j) 3D-Rekonstruktionen bei 1740 cm^{-1} . k) 2D-IR-Bild im Absorptionskontrast bei 2917 cm^{-1} . l–o) 3D-Rekonstruktionen bei 2917 cm^{-1} aus verschiedenen Perspektiven. α , β , γ markieren drei Punkte auf der Zellwand als visuelle Hilfe zum besseren Verständnis der Orientierung der Abbildungen. A und B markieren die Positionen der beiden Strukturen, die im Text diskutiert werden. V markiert die Position der Vakuole. Maßstabsbalken 50 μm .

einen niedrigeren Lipidgehalt hindeutet. Im Falle von 2D-Bildern könnte dieser Unterschied im spektralen Absorptionsverhalten eine Zugehörigkeit zum Zellkern in keinem der beiden Fälle ausschließen, da die Absorption ebenso in Bereichen unter- und oberhalb der Struktur entstehen könnte. Im Gegensatz dazu sind die 3D-Bilder eindeutig. Abbildung 2 zeigt Ausschnitte aus einer Rekonstruktion, welche die detaillierte Struktur der fraglichen Zellkomponenten hervorheben. Nur die Struktur **A** liegt dabei in der gleichen Ebene wie die Zellwand. Struktur **B** liegt auf einer Ebene außerhalb der Zelle und erstreckt sich noch über die Zellwand hinaus, was eine Zugehörigkeit zum Zellkern ausschließt. Zudem ist die Struktur **A** in Abbildung 1k–o kaum sichtbar, was einen niedrigen Lipidgehalt aufzeigt, wie dies für einen Zellkern zu erwarten ist.^[5] Die Struktur **B** scheint ein Tropfen mit einem

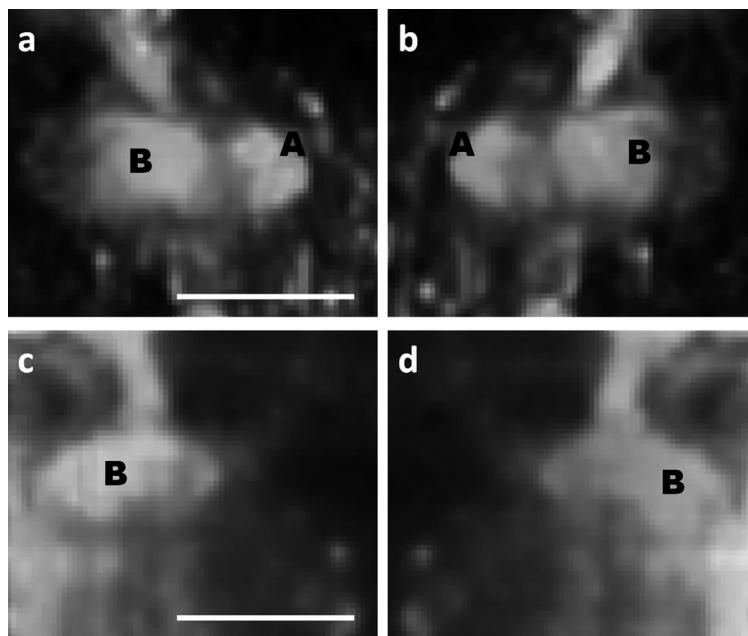


Abbildung 2. Detaildarstellung des Zellkerns der *Allium cepa*-Zelle. a,b) 3D-Rekonstruktion bei 1538 cm⁻¹ aus verschiedenen Perspektiven. c,d) 3D-Rekonstruktion bei 2917 cm⁻¹ aus verschiedenen Perspektiven. A und B markieren die Positionen der im Text diskutierten Partikel. Maßstabsbalken 50 µm.

hohen Gehalt an langketigen Alkanen zu sein, sehr wahrscheinlich ein Sphärosom (Lipidtröpfchen). Im optischen Mikroskop unterscheidet man Zellkerne von Sphärosomen üblicherweise durch selektive Färbung.^[10] Dagegen zeigen wir in unserem Versuch, dass diese auch ohne jegliche Anfärbung leicht unterschieden werden können.

Verschiedene Strukturen, die von der Zellwand ausgehen, wie etwa Filamente mit einem Querschnitt von 5–7 µm, können ebenso bei 2917 cm⁻¹ ($\lambda = 3.4 \mu\text{m}$) abgebildet werden, was auf eine gute Ortsauflösung der Bilder hindeutet. Zu einer ähnlichen Schlussfolgerung kommt man bei Betrachtung des Abstands zwischen Zellkern und Sphärosom in Abbildung 1 und Abbildung 2. Bei 1538 cm⁻¹ ($\lambda = 6.5 \mu\text{m}$) ist der Zellkern mit einer Größe von 20–25 µm klar begrenzt und abgetrennt vom nahegelegenen Spärosom. Im Gegensatz dazu überlappen die beiden Strukturen in 2D-IR-Bildern. Die Supplementary Figure 4 (SI) zeigt, dass die beiden Objekte mit einem Abstand von 8.5 µm gemäß dem Rayleigh-Kriterium vollständig aufgelöst sind. Die Auflösung in den 3D-Bildern ist vergleichbar mit derjenigen von 2D-Bildern mit dem gleichen Gerät. Trotzdem wir die Ortsauflösung in dieser Bildgebungskonfiguration nicht quantitativ erfasst haben, und diese als geringer einschätzen als das Beugungslimit, deutet die Möglichkeit, Objekte im Abstand von 8.5 µm auseinanderzuhalten, darauf hin, dass die Ortsauflösung nicht viel schlechter als das Beugungslimit ($\approx 5 \mu\text{m}$ bei 2917 cm⁻¹ und $\approx 10 \mu\text{m}$ bei 1538 cm⁻¹, mit der Optik, die in diesen Versuchen verwendet

wurde) sein kann (siehe Hintergrundinformationen).

Wir haben die Möglichkeiten getestet, IR-Tomographie anzuwenden, um die subzelluläre Verteilung exogener Stoffe zu untersuchen. Dazu haben wir die 3D-Verteilung eines Trisaqua-Triscarbonyl-Rheniumkomplexes Rheniumkomplexes [Re(CO)₃(H₂O)₃] (**1**, siehe Supplementary Scheme 1 (SI) für eine Darstellung der Struktur) gemessen. Komplex **1** ist ein weithin verbreitetes Synthon für die Herstellung von CO-freisetzenden Molekülen, einer neuen Klasse von pharmazeutischen Wirkstoffen, die derzeit getestet wird.^[11]

Die Möglichkeit, die zelluläre Aufnahme von Metallcarbonyl-Komplexen in 2D-Bildern im mittleren IR-Spektralbereich darzustellen, wurde bereits gezeigt.^[7,12] Komplex **1** zeigt zwei deutliche Absorptionsbanden von CO (A1 und E, basierend auf ihren symmetrischen Eigenschaften) in der spektralen Region von 2050–1850 cm⁻¹ (Supplementary Figure 2 (SI)). Wir haben die Aufnahme von **1** durch energiedispersiv Röntgenmikroanalyse (EDXMA, Supplementary Figure 3 (SI)) nachgewiesen und dessen Verteilung unter Zuhil-

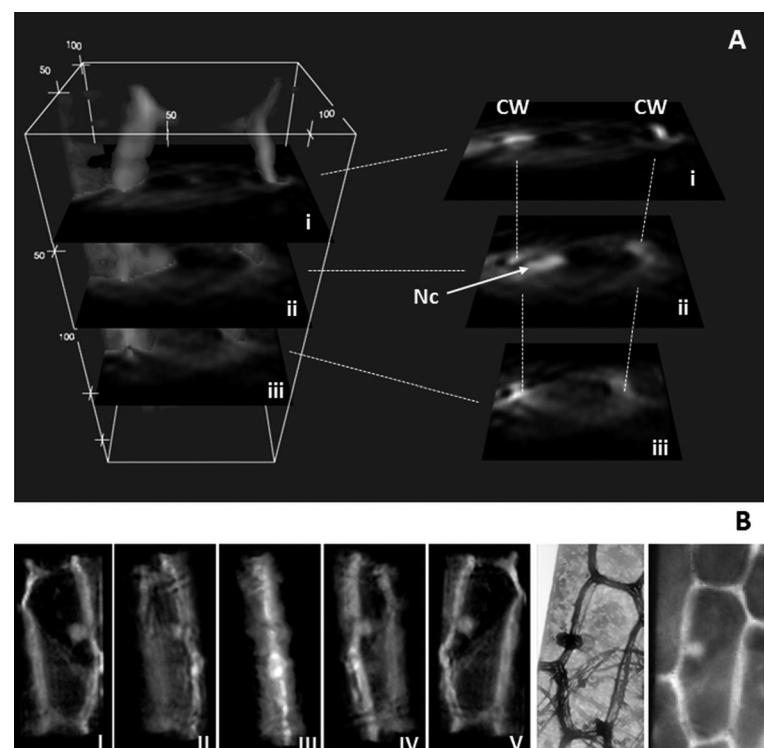


Abbildung 3. 3D-computertomographische Rekonstruktion der zellulären Verteilung der A1-Streckfrequenz von **1**. A) Rendering des Zellvolumens mit Querschnitten an ausgewählten Stellen. Querschnitte rechts mit den entsprechenden Positionen im Zellvolumen links. CW = Zellwand; Nc = Zellkern. Die vertikalen gepunkteten Linien verbinden die Position der höchsten A1-Intensitäten in der Zellwand. B) Volumendarstellung, gedreht um eine vertikale Achse in Schritten von 45° von links nach rechts von 0° (I) bis 180° (VII). Die Winkelserie wird ergänzt durch ein Transmissionsbild eines Laserrastermikroskops bei 488 nm, das die detaillierte Struktur der Zelle zeigt, und durch eines der 2D-IR-Absorptionsbilder, die für die 3D-Rekonstruktion verwendet wurden.

fenahme der CO-Absorptionsbanden rekonstruiert (A1 bei 2021 cm^{-1} und E bei 1890 cm^{-1}). Die tomographische Bildgebung der A1-Streckbande zeigt eine Anreicherung des Moleküls in der Zellwand und im Zellkern (Abbildung 3). Es wird hierbei auch deutlich, dass eine Aufnahme von **1** in das Lipidtröpfchen vernachlässigbar ist – eine Erkenntnis, die in 2D-Bildgebungen kaum möglich wäre. Vorhergehende 2D-Bildgebungen und Experimente zur zellulären Verteilung von **1** hatten Schwierigkeiten mit der Interpretation der IR-Bilder im Bereich des Zellkerns aufgrund der störenden Topographie der Zelle.^[7] Dagegen ist die Verteilung von **1** zwischen Zellkern und anderen zellulären Bestandteilen in Abbildung 3 eindeutig. Um zusätzliche Details aufzuzeigen, ist in den Hintergrundinformationen ein Video der sich drehenden 3D-Rekonstruktion hinterlegt.

Die Konzentration von **1** kann auf Basis des Lambert-Beer-Gesetzes (siehe Hintergrundinformationen) über die 2D-IR-Bilder der Absorptionsbande A1 in Abbildung 3 in den verschiedenen Zellkompartimenten bestimmt werden. Eine präzise Abschätzung des Strahlengangs durch die Probe an den verschiedenen Stellen erfolgt dabei über die 3D-Rekonstruktion. Damit wurde beispielsweise im Zellkern eine Konzentration von **1** in Höhe von 10 mm errechnet.

Die Verfügbarkeit der rekonstruierten 3D-Verteilungen der spektralen Absorptionsbanden ermöglicht die quantitative Analyse der Kolokalisierung endogener und exogener chemischer Verbindungen durch verschiedene Ansätze der Korrelationsanalyse. Abbildung 4 zeigt ein Beispiel eines solchen Ansatzes, in dem – Voxel für Voxel der 3D-Verteilung – die Intensitäten der beiden Absorptionsbanden gegeneinander in einem 2D-Histogramm aufgetragen werden („Scatterplot“).^[13] Absorptionsbanden von räumlich hoch korrelierten Spezies ergeben dabei eine Verteilung mit dem Schwerpunkt um eine Gerade mit spezifischer Steigung. Im Gegensatz dazu resultieren Absorptionsbanden, die räumlich nicht korreliert sind, in vertikalen bzw. horizontalen Verteilungen, oder ganz ohne einen erkennbaren Trend. Verschiedene Absorptionsbanden des gleichen Moleküls zeigen eine gleiche räumliche Verteilung und dadurch eine enge, diagonale Verteilung im Scatterplot (Abbildung 4). Eine Quantifizierung der Korrelation ist eine effiziente Möglichkeit, spektrale Merkmale zu identifizieren, die in einer Zelle kolokalisiert sind. Es erlaubt zudem die Identifizierung von Banden des gleichen Moleküls, welche hochkorreliert sein müssen. Dieser Ansatz ist ein wichtiges Hilfsmittel, um die Komplexität von zellulären IR-Spektren zu interpretieren.^[14]

Beispielhaft ist in Abbildung 4 der Scatterplot der Absorptionsbanden A1 und Ea des Komplexes **1** dargestellt. Dieser Plot wurde sowohl für das gesamte Zellvolumen (Abbildung 4A) als auch für verschiedene Zellkompartimente wie Zellwand (Abbildung 4B) und Zellkern (Abbildung 4C) berechnet. Dabei wird sofort klar, dass der Scatterplot für den Zellkern eine hohe Korrelation der Banden A1 bei 2021 cm^{-1} und E bei 1881 cm^{-1} (hier mit Ea bezeichnet) zeigt, während die anderen Scatterplots eine deutlich geringere Korrelation aufweisen. Die Absorptionsbanden im Zellkern müssen daher von einer bestimmten molekularen Spezies verursacht werden. In anderen zellulären Bereichen zeigt der Komplex **1** eine heterogene Struktur und verursacht

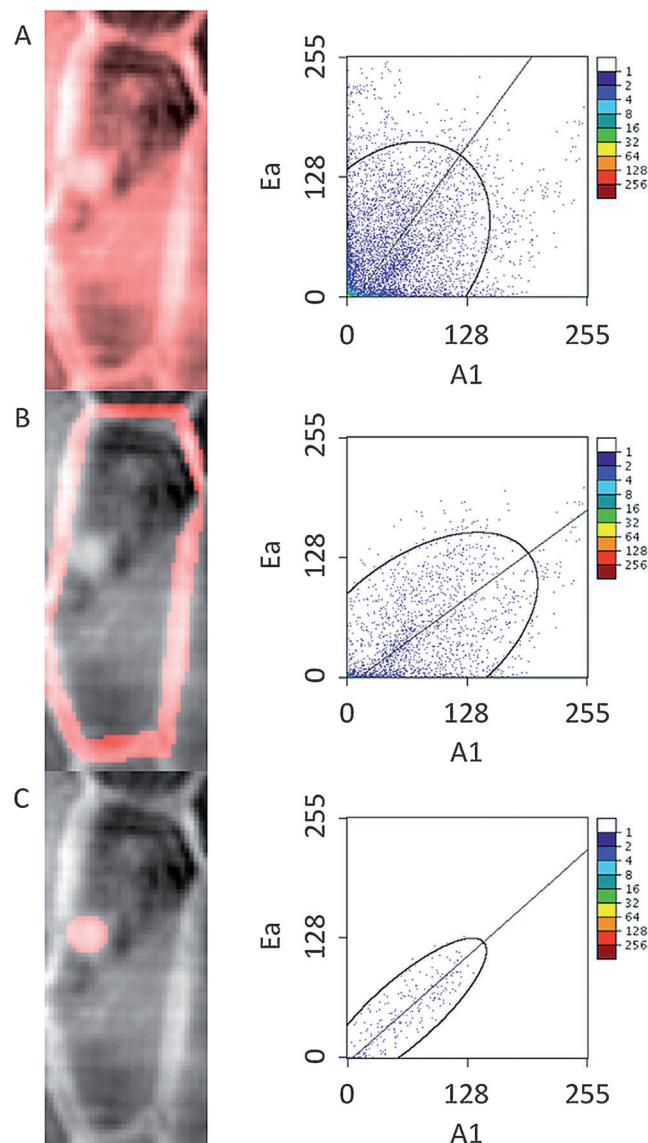


Abbildung 4. 2D-Histogramme der Absorptionsbanden A1 und Ea in unterschiedlichen Teilvolumina der rekonstruierten Zelle. A) Scatterplot des gesamten Zellvolumens. Die Verteilung ist sehr breit und das Auftreten von Clustern von Datenpunkten zeigt, dass es Bereiche gibt, in welchen A1 und Ea korrelieren, aber auch Bereiche, in welchen die beiden Komponenten unabhängig zu sein scheinen. Die Linie zeigt die Hauptachse der Verteilung zusätzlich zur 95 % Konfidenzellipse dieses linearen Modells zur Beschreibung der Datenverteilung. B) Scatterplot aus der Region der Zellwand. Wenn die Analyse auf die Zellwand beschränkt wurde, sind die Datenpunkte enger um die Hauptachse verteilt, was auch durch die langgestreckte 95 % Konfidenzellipse verdeutlicht wird. C) Im Bereich des Zellkerns sind die beiden Spezies Ea und A1 hochkorreliert, wie durch die schmale Konfidenzellipse verdeutlicht wird. Der statistische Gesamtfehler (RMSE) des Modellangleichs wird für (A), (B) und (C) jeweils reduziert von 38 über 34 bis zu 14.

daher mehrere A1- und E-Absorptionsbanden und daher eine geringere Korrelation zwischen beiden. Diese Beobachtung deutet darauf hin, dass Komplex **1** durch einen spezifischen Mechanismus in den Zellkern aufgenommen wird, der eine strukturelle Homogenität der Koordinationsumgebung des Komplexes sicherstellt. Im Gegensatz dazu basiert die

Wechselwirkung mit der Zellwand auf einer unspezifischen Bindung des Re-Zentrums mit der Polysaccharidstruktur und resultiert daher in einer heterogenen Koordinationsumgebung.

Die hier vorgestellte Methode zur 3D-tomographischen Bildgebung im mittleren infraroten Spektralbereich stellt ein neues Hilfsmittel zur Verfügung, das die Möglichkeiten der Mikroskopie im mittleren Infrarotbereich in der Zellphysiologie deutlich erweitert. In unserer Studie haben wir gezeigt, dass Experimente mit Zellen problemlos auf konventionellen IR-Laborgeräten durchgeführt werden können, welche mit einem FPA-Detektor und einer thermischen Lichtquelle ausgestattet sind. Die Möglichkeit, Tomographie im mittleren infraroten Spektralbereich an einem konventionellen Laborgerät durchzuführen, wird vermutlich große Auswirkungen auf die Bedeutung dieser Technik haben. Benchtop-Infrarotmikroskope können problemlos in einem Zellbiologielabor aufgestellt werden. Wir erwarten daher, dass die Einführung der zellulären IR-Tomographie die IR-Bildgebung von biologischen Systemen revolutionieren kann, vor allem in Kombination mit der optischen Nahfeldmikroskopie mit Auflösungen unterhalb der jeweiligen Wellenlänge.^[15] Die Methode ist nicht auf Pflanzenzellen beschränkt, sondern kann auch für andere Zellen und Proben eingesetzt werden, die Transmissionsabbildungen im mittleren spektralen IR-Bereich zugänglich sind.

Eingegangen am 29. Juli 2014,
veränderte Fassung am 14. September 2014
Online veröffentlicht am 13. November 2014

Stichwörter: Chemische Bildgebung · Einzelzellstudien · Infrarot-Tomographie

- [1] a) M. Obst, G. Schmid, *Methods Mol. Biol.* **2014**, *1117*, 757–781; b) A. F. Palonpon, J. Ando, H. Yamakoshi, K. Dodo, M. Sodeoka, S. Kawata, K. Fujita, *Nat. Protoc.* **2013**, *8*, 677–692; c) A. F. Palonpon, M. Sodeoka, K. Fujita, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2013**, *17*, 708–715; d) J. P. Pezacki, J. A. Blake, D. C. Danielson, D. C. Kennedy, R. K. Lyn, R. Singaravelu, *Nat. Chem. Biol.* **2011**, *7*, 137–145; e) L. Quaroni, T. Zlateva, *Analyst* **2011**, *136*, 3219–3232; f) G. Schmid, F. Zeitvogel, L. Hao, P. Ingino, M. Floetenmeyer, Y. D. Stierhof, B. Schroeppel, C. J. Burkhardt, A. Kappler, M. Obst, *Geobiology* **2014**, *12*, 340–361; g) G. Schmid, F. Zeitvogel, L. Hao, P. Ingino, W. Kuerner, J. J. Dynes, C. Ka-

runakaran, J. Wang, Y. Lu, T. Ayers, C. Schietinger, A. P. Hitchcock, M. Obst, *Microsc. Microanal.* **2014**, *20*, 531–536; h) J. Wang, A. P. Hitchcock, C. Karunakaran, A. Prange, B. Franz, T. Harkness, Y. Lu, M. Obst, J. Hormes, *AIP Conf. Proc.* **2011**, *1365*, 215–218.

- [2] A. Kretlow, Q. Wang, J. Kneipp, P. Lasch, M. Beekes, L. Miller, D. Naumann, *Biochim. Biophys. Acta Biomembr.* **2006**, *1758*, 948–959.
- [3] I. W. Levin, R. Bhargava, *Annu. Rev. Phys. Chem.* **2005**, *56*, 429–474.
- [4] a) P. Lasch, D. Naumann, *Biochim. Biophys. Acta Biomembr.* **2006**, *1758*, 814–829; b) C. Matthäus, B. Bird, M. Miljkovic, T. Chernenko, M. Romeo, M. Diem, *Methods Cell Biol.* **2008**, *89*, 275–308; c) L. Quaroni, T. Zlateva, B. Sarafimov, H. W. Kreuzer, K. Wehbe, E. L. Hegg, G. Cinque, *Biophys. Chem.* **2014**, *189*, 40–48.
- [5] P. Lasch, A. Pacifico, M. Diem, *Biopolymers* **2002**, *67*, 335–338.
- [6] a) M. K. Kuimova, K. L. Chan, S. G. Kazarian, *Appl. Spectrosc.* **2009**, *63*, 164–171; b) T. P. Wrobel, K. M. Marzec, K. Majzner, K. Kochan, M. Bartus, S. Chlopicki, M. Baranska, *Analyst* **2012**, *137*, 4135–4139.
- [7] a) S. Clède, F. Lambert, C. Sandt, Z. Gueroui, N. Delsuc, P. Dumas, A. Vessières, C. Pollicar, *Biotechnol. Adv.* **2013**, *31*, 393–395; b) F. Zobi, L. Quaroni, G. Santoro, T. Zlateva, O. Blacque, B. Sarafimov, M. C. Schaub, A. Y. Bogdanova, *J. Med. Chem.* **2013**, *56*, 6719–6731.
- [8] B. R. Wood, P. R. Stoddart, D. McNaughton, *Aust. J. Chem.* **2011**, *64*, 593–599.
- [9] M. C. Martin, C. Dabat-Blondeau, M. Unger, J. Sedlmair, D. Y. Parkinson, H. A. Bechtel, B. Illman, J. M. Castro, M. Keilweitz, D. Buschke, B. Ogle, M. J. Nasce, C. J. Hirschmugl, *Nat. Methods* **2013**, *10*, 861–864.
- [10] G. E. Holcomb, A. C. Hildebrandt, R. F. Evert, *Am. J. Bot.* **1967**, *54*, 1204–1209.
- [11] a) R. Motterlini, L. E. Otterbein, *Nat. Rev. Drug Discovery* **2010**, *9*, 728–U724; b) F. Zobi, *Future Med. Chem.* **2013**, *5*, 175–188.
- [12] S. Clède, F. Lambert, C. Sandt, S. Kascakova, M. Unger, E. Harté, M. A. Plamont, R. Saint-Fort, A. Deniset-Besseau, Z. Gueroui, C. Hirschmugl, S. Lecomte, A. Dazzi, A. Vessières, C. Pollicar, *Analyst* **2013**, *138*, 5627–5638.
- [13] F. Zeitvogel, G. Schmid, L. Hao, P. Ingino, M. Obst, *J. Microsc.*, DOI: 10.1111/jmi.12187.
- [14] L. Quaroni, T. Zlateva, *Anal. Chem.* **2014**, *86*, 6887–6895.
- [15] a) I. Amenabar, S. Poly, W. Nuansing, E. H. Hubrich, A. A. Govyadinov, F. Huth, R. Krutokhvostov, L. Zhang, M. Knez, J. Heberle, A. M. Bittner, R. Hillenbrand, *Nat. Commun.* **2013**, *4*, 2890; b) H. A. Bechtel, E. A. Muller, R. L. Olmon, M. C. Martin, M. B. Raschke, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2014**, *111*, 7191–7196.