

Pointillismus mit einzelnen Molekülen

Fluoreszenzmikroskopie jenseits der Beugungsgrenze

von Mike Heilemann

Der Auflösung mikroskopischer Verfahren ist durch die Beugungsgrenze eine natürliche Schranke gesetzt. Strukturen, die näher als die halbe Wellenlänge des verwendeten Lichts zusammenliegen, können nicht aufgelöst werden. Doch Forscher haben einen Weg gefunden, diese Grenze zu umgehen. Die entstehenden Bilder ähneln dem Pointillismus in der Malerei.

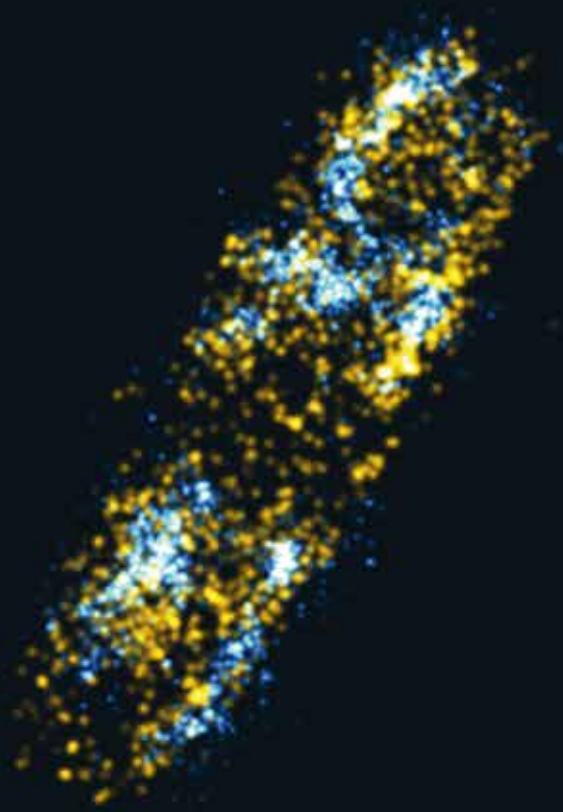
Proteine, die zentralen Bausteine der Zelle, haben Abmessungen von nur wenigen Nanometern. Ihre räumliche Anordnung, meist in definiert zusammengesetzten Proteinkomplexen, ist entscheidend mit deren Funktion verbunden. Mit klassischen lichtmikroskopischen Verfahren lassen sich solche Strukturen nur begrenzt beobachten, denn die Auflösung eines konventionellen Lichtmikroskops ist fundamental auf etwa die Hälfte der Beobachtungswellenlänge begrenzt, im sichtbaren Bereich des Spektrums also auf mehrere Hundert Nanometer.

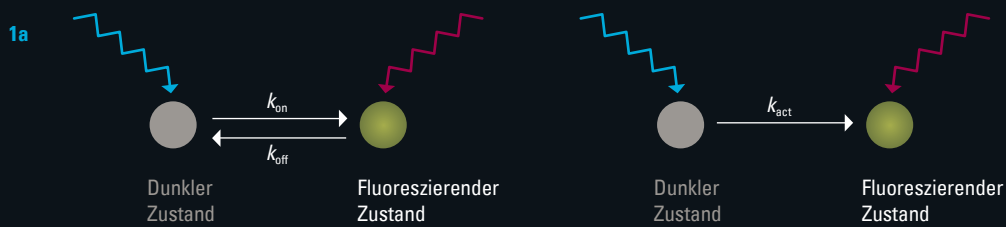
In den vergangenen zwei Jahrzehnten sind neue Verfahren der Lichtmikroskopie entwickelt worden, welche die Beugungsgrenze umgehen und eine Auflösung kleinster zellulärer Strukturen ermöglichen. Diese basieren auf der Detektion fluoreszierender Farbstoffe, die zunächst an Zielmoleküle – beispielsweise ein spezifisches Protein – gekoppelt werden. Ein sehr populäres Verfahren setzt dabei auf die Detektion einzelner Fluoreszenzfarbstoffe, um die Auflösungsgrenze zu umgehen –, diese ist nämlich nur

dann eine Einschränkung, wenn ein Bild »in einem Zug« aufgenommen wird. Wird jedoch das Fluoreszenzsignal jedes Moleküls einzeln und nacheinander ausgelesen, so kann die Position eines fluoreszenzmarkierten Proteins sehr genau bestimmt werden. Nachdem auf diese Weise die Position aller Proteine einzeln bestimmt wurde, kann aus der Gesamtheit dieser Koordinaten ein hochaufgelöstes Bild rekonstruiert werden.

Eine Revolution in der zellbiologischen Forschung

Die Fluoreszenzmikroskopie ist aus vielen Bereichen der alltäglichen Forschung nicht mehr wegzudenken. Insbesondere die zellbiologische Forschung wurde durch diese Methode in den vergangenen Jahrzehnten revolutioniert: Sie kann zelluläre Strukturen mit hohem Kontrast sichtbar machen, und zentrale biologische Prozesse lassen sich in lebenden Zellen verfolgen. Zusammen mit der Entwicklung immer sensitiverer Detektoren ist heute die Visualisierung einzelner

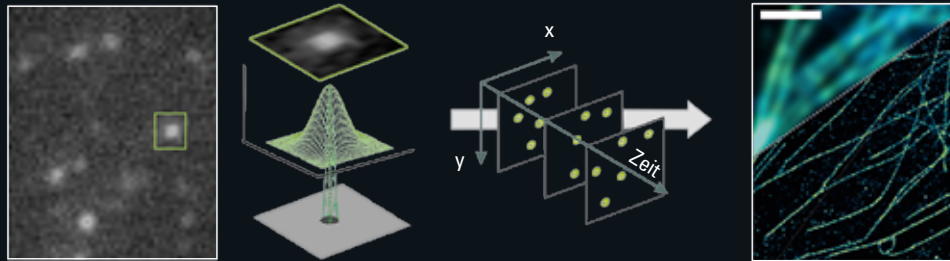




Prinzip der hochauflösenden Fluoreszenzmikroskopie durch Detektion einzelner Fluoreszenzfarbstoffe

1a Photoschaltbare Fluoreszenzfarbstoffe können durch Bestrahlung mit Licht definierter Wellenlänge ein- und ausgeschaltet werden.

1b



1b Auf diese Weise kann das Fluoreszenzsignal einer dicht markierten Probe zeitlich aufgetrennt werden und können mit geeigneten Detektoren die Signale einzelner Farbstoffe sichtbar gemacht werden. Mit diesem Verfahren können zelluläre Strukturen, wie beispielsweise Mikrotubulofilamente, mit einer Auflösung von etwa 20 nm dargestellt werden.

Fluoreszenzfarbstoffe möglich: Hierdurch wurde das Forschungsgebiet der Einzelmolekülmikroskopie und -spektroskopie begründet.

Wie jedes Licht-basierte Mikroskopieverfahren unterliegt auch die Fluoreszenzmikroskopie der »Beugungsgrenze«, einer fundamentalen physikalischen Einschränkung, welche erstmals von Ernst Abbe 1873 formuliert wurde: Objekte, die einen Abstand von weniger als der halben Wellenlänge des emittierten Fluoreszenzlichtes haben (das heißt in etwa 200 bis 300 Nanometer), können optisch nicht mehr aufgelöst werden. Das hat zur Folge, dass gerade die wichtigen funktionellen Bausteine einer Zelle wie Protein-

komplexe mit Lichtmikroskopie nicht mehr aufgelöst werden können und lange Zeit nur für die Elektronenmikroskopie zugänglich waren.

Neue Verfahren der Fluoreszenzmikroskopie können diese Auflösungsgrenze umgehen. Dabei lassen sich zwei grundlegende Ansätze unterscheiden: die stochastischen und die deterministischen Verfahren. Bei den stochastischen Verfahren werden Fluoreszenzfarbstoffe einzeln und nacheinander detektiert, deren Position genau bestimmt und aus allen Positionsdaten ein hochaufgelöstes Bild rekonstruiert. Beispiele sind die Methoden der

(»direct) stochastic optical reconstruction microscopy« ((d)STORM) und die (»fluorescence) photoactivated localization microscopy« ((F)PALM). Bei den deterministischen Verfahren werden geeignete Lichtmuster erzeugt, welche zu einer räumlichen Begrenzung der Fluoreszenzmikroskopie führen. In diese Gruppe gehören die »stimulated-emission depletion« (STED) und die (»saturated) structural illumination microscopy« ((S)SIM). Für die Entwicklung von mikroskopischen Verfahren zur hochauflösenden Fluoreszenzmikroskopie wurden W. E. Moerner (Stanford), Eric Betzig (Janelia Farm) und Stefan Hell (Göttingen) 2014 mit dem Nobelpreis für Chemie ausgezeichnet.

Die Beugungsgrenze clever umgehen

Stochastische Verfahren zur hochauflösenden Fluoreszenzmikroskopie basieren auf der sequenziellen Detektion des Fluoreszenzlichts einzelner Farbstoffmoleküle. Anders als bei der auflösungsbegrenzten konventionellen Mikroskopie, bei der das Licht aller Fluoreszenzfarbstoffe zur gleichen Zeit ausgelesen wird, kann auf diese Weise die Auflösungsgrenze clever umgangen werden: das Fluoreszenzlicht eines einzelnen Farbstoffmoleküls hinterlässt nämlich ein genau definiertes geometrisches »Muster« auf einer hochempfindlichen CCD-Kamera. Es kann mathematisch sehr genau angenähert und somit die Position des Farbstoffmoleküls auf wenige Nanometer genau bestimmt werden. Werden nun alle Farbstoffmoleküle nacheinander auf diese Art und Weise detektiert und deren Position bestimmt, kann man aus der Gesamtheit der Positionen ein hochaufgelöstes Bild rekonstruieren (Abb. 1).

Damit dieses Verfahren grundsätzlich funktioniert, braucht man Fluoreszenzfarbstoffe mit besonderen Eigenschaften: Diese müssen auf eine



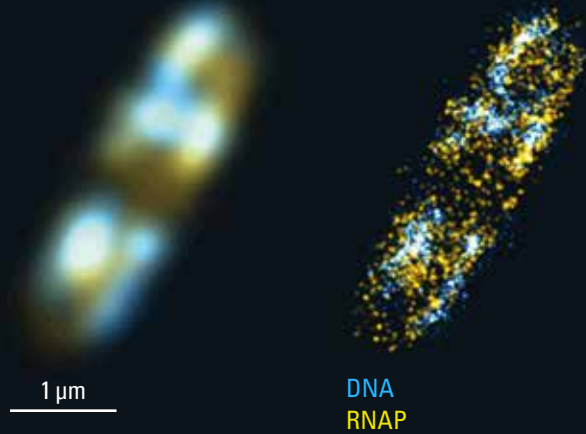
Der Autor

Prof. Dr. Mike Heilemann, Jahrgang 1976, studierte Chemie an den Universitäten Konstanz, Montpellier und Heidelberg. Das Forschungsgebiet seiner Arbeitsgruppe ist die Entwicklung von sensitiven Mikroskopieverfahren und deren Anwendung zur Untersuchung biomolekularer Strukturen und Prozesse.

heilemann@chemie.uni-frankfurt.de

www.smb.uni-frankfurt.de

In einem nächsten Schritt wird die räumliche Position der Fluoreszenzfarbstoffe mathematisch auf wenige Nanometer genau bestimmt. Durch die Aufnahme und Auswertung von großen Bilderserien (typischerweise 5.000 bis 20.000 Einzelbilder) wird die Position von sehr vielen Farbstoffen bestimmt und aus deren Koordinaten ein künstliches Bild rekonstruiert. Mit diesem Verfahren können zelluläre Strukturen mit einer Auflösung von circa 20 nm dargestellt werden. (Maßstabsbalken 1 µm)



2 Auflösungsbegrenzte (links) und hochauflösende Fluoreszenzmikroskopie (rechts) des Proteins RNA Polymerase (RNAP; gelb) sowie der DNA (blau) in einem E.-coli-Bakterium. Während in der konventionellen Fluoreszenzmikroskopie nur Umrisse der zellulären Strukturen im Bakterium sichtbar werden, liefert die hochauflösende Mikroskopie einen viel genaueren Blick auf die räumliche Organisation des Proteins zur DNA.

geeignete Art, beispielsweise mit Licht, von einem »dunklen« in einen fluoreszierenden Zustand gebracht werden. Solche Farbstoffe nennt man photoaktivierbare oder photoschaltbare Fluoreszenzfarbstoffe. Ohne diese besonderen Fluoreszenzfarbstoffe würden die stochastischen Verfahren scheitern: In dicht gepackten Proteinkomplexen wären zu viele Fluoreszenzfarbstoffe konzentriert, so dass diese nicht einzeln detektiert werden könnten. Durch die Manipulation mit Licht gelingt es nun, jeden Farbstoff einzeln »anzuschalten« und nacheinander das Fluoreszenzsignal auszulesen. Dicht gepackte Proteinkomplexe, aber auch andere biologische Strukturen wie beispielsweise das Chromatin, können so sichtbar gemacht und untersucht werden (Abb. 2).

Ordnung in der zellulären Maschinerie von »E. coli«
Besonders interessant ist die hochauflösende Fluoreszenzmikroskopie, um den strukturellen Aufbau und die Zusammensetzung von kleinen

biologischen Systemen zu untersuchen, etwa von Proteinkomplexen in kleinen biologischen Organismen wie Bakterien. Hier haben lichtmikroskopische Verfahren in der Vergangenheit nur sehr begrenzt zur Beobachtung zellulärer Prozesse beitragen können. Unsere Arbeitsgruppe hat beispielsweise das gramnegative Darm-Bakterium *Escherichia coli* untersucht. Es hat eine Länge von etwa 3 bis 5 Mikrometer und einen Durchmesser von etwa 1 Mikrometer. In diesem kleinen Raum sind sämtliche zellulären Prozesse untergebracht, etwa die Regulation des Zellwachstums, die Zellteilung, aber auch die Reaktion auf die Umweltbedingungen. Anders als bei den viel größeren Säugerzellen sind in *E. coli* keine Kompartimente bekannt, jedoch ist auch in diesem Organismus von einer gewissen Ordnung auszugehen. Durch hochauflösende Mikroskopie konnten wir molekulare Maschinen in *E. coli* visualisieren und deren Organisation untersuchen. Hierzu zählen Proteinkomplexe, welche die Transkription orchestrieren, das heißt aus der genetischen Information der DNA die für die Proteinsynthese notwendige RNA herstellen. Die außerordentlich dichte Packung dieser Proteinkomplexe konnte visualisiert und quantifiziert werden, ebenso die räumliche Anordnung der Proteinkomplexe relativ zu einer weiteren wichtigen zellulären Struktur, dem bakteriellen Chromosom, das die DNA enthält (Abb. 2).

Seit ihrer Einführung vor etwa zehn Jahren hat die hochauflösende Fluoreszenzmikroskopie eine bemerkenswerte Verbreitung in Forschungslaboren erfahren. An der Goethe-Universität werden diese Verfahren eingesetzt, um die Organisation und Funktion von Proteinen in Zellmembranen zu verstehen, die Stöchiometrie von Membrankomplexen zu bestimmen und die Ultrastruktur in Bakterien zu untersuchen. ●

Literatur

- 1 Fürstenberg, A. and M. Heilemann, Single-molecule localization microscopy-near-molecular spatial resolution in light microscopy with photo-switchable fluorophores. *Phys Chem Chem Phys*, 2013, 15(36): p. 14919–30.
- 2 Endesfelder, U., et al., Multiscale spatial organization of RNA polymerase in *Escherichia coli*. *Biophys J*, 2013. 105(1): p. 172–81.

AUF DEN PUNKT GEBRACHT

- Fluoreszierende Moleküle, gezielt zum Leuchten angeregt und durch mathematische Rekonstruktion exakt geortet, machen Details unterhalb der Beugungsgrenze des Lichts sichtbar.
- Proteinstrukturen, Funktionsbereiche innerhalb von Zellen oder eindringende Erreger können mit Fluoreszenzmikroskopie untersucht werden. Diese Methode hat die zellbiologische Forschung in den vergangenen Jahren revolutioniert.