

Photoactivated Localization Microscopy (PALM) Mikroskopie jenseits der Auflösungsgrenze

RAPHAEL MANCK | REINHARD FISCHER

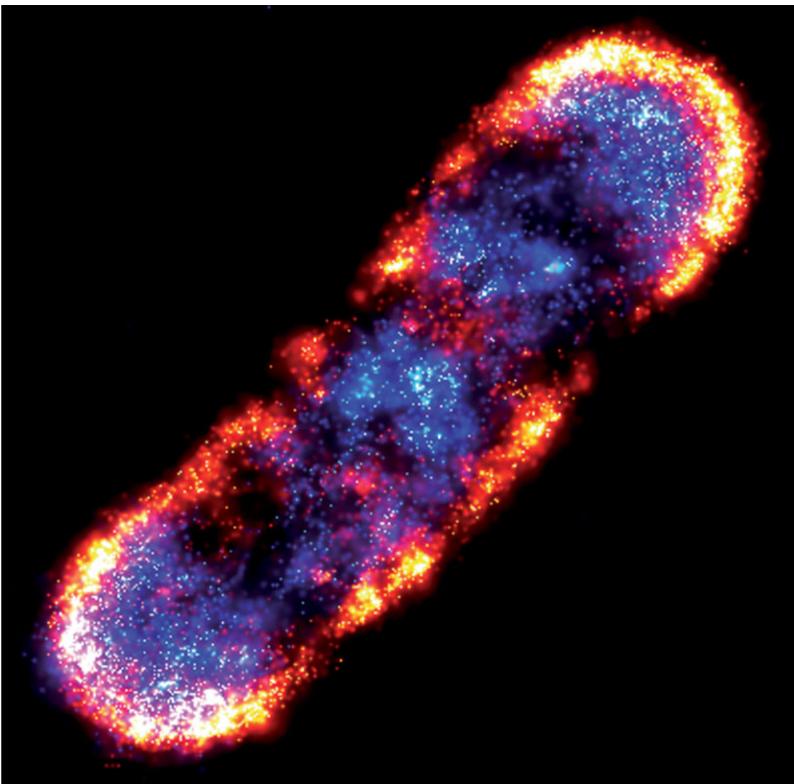


ABB. 1 PALM-Aufnahme einer *Escherichia coli*-Zelle mit fluoreszent markiertem Chemotaxis Rezeptor. Jeder Bildpunkt entspricht einem einzelnen Protein. Bild: <http://newscenter.lbl.gov/feature-stories/2009/07/06/spontaneous-assembly/>

Die Auflösung konventioneller Licht- und Fluoreszenzmikroskope ist durch die Gesetze der Physik limitiert. Genauer gesagt ist das Licht hierbei der limitierende Faktor. Mit so genannten Super-Resolution-Mikroskopietechniken wie der Photoactivated Localization Microscopy (PALM) ist es auch mittels Fluoreszenzmikroskopie möglich, eine bis auf wenige Nanometer genaue Auflösung zu erzielen.

Die mit einem grünen Pfeil markierten Begriffe werden im Glossar auf Seite ■ erklärt.

Das erste Mikroskop wurde bereits 1595 von Hans und Zacharias Hansen entwickelt. Jedoch werden eher Antonie van Leeuwenhoek, der für die Fertigung seiner Mikroskope berühmt war, und Robert Hooke mit dieser bahnbrechenden Erfindung in Verbindung gebracht (Abbildung 2a). Hooke veröffentlichte 1665 sein richtungsweisendes Werk *Micrographia* [10], welches detaillierte Zeichnungen von pflanzlichen und tierischen Präparaten enthielt. Hier fällt auch zum ersten Mal der Begriff der Zelle, mit dem Hooke die poröse Struktur von Kork beschrieb (Abbildung 2b). Diese Strukturen sind selbstverständlich keine Zellen nach heutiger Definition, dennoch geht der Begriff der Zelle darauf zurück. Mit diesen einfachen Mikroskopen gelang es van Leeuwenhoek bereits im 17. Jahrhundert als erster Bakterien, Protozoen und Spermien zu beobachten und zu beschreiben. Durch permanente Verbesserung in der Fertigung der Mikroskope, technologische Weiterentwicklungen wie die der Phasenkontrastmikroskopie, das Prinzip des Differentialinterferenzkontrastes und die Entdeckung geeigneter Färbelösungen, wurde es schließlich möglich, immer kleiner werdende Objekte und Strukturen auch innerhalb von Zellen zu untersuchen. Allerdings sind auch moderne Mikroskope in ihrer Auflösung begrenzt.

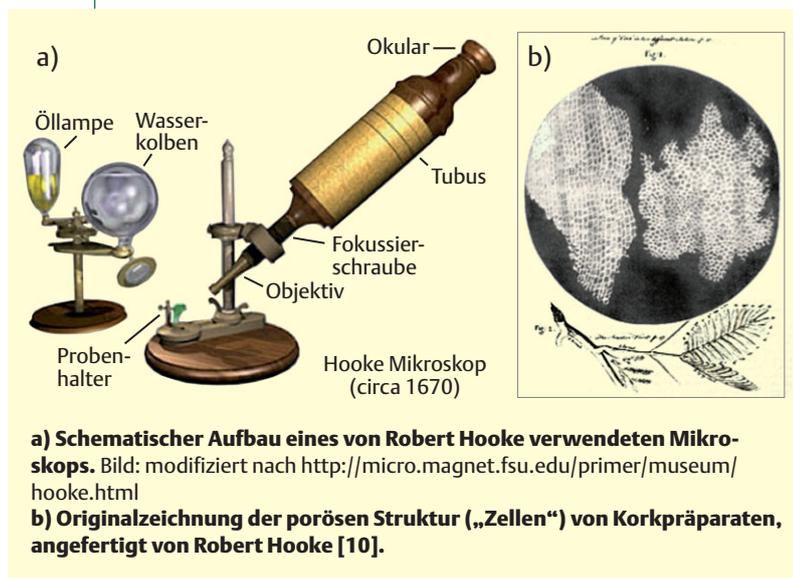
Ernst Abbe und die Auflösungsgrenze

Der deutsche Physiker Ernst Abbe publizierte bereits 1873 die Theorie der Auflösungsgrenze und zeigte mit den Formeln $\text{Auflösung}_{x,y} = \lambda / (2n \times \sin \alpha)$ und $\text{Auflösung}_z = 2 \lambda / (n \times \sin \alpha)^2$ die Grenzen konventioneller Licht- oder Fluoreszenzmikroskopie auf [1]. Hierbei steht λ für die Wellenlänge des Lichts, n für die Brechzahl des Mediums zwischen der Probe und dem Objektiv und α für den halben Öffnungswinkel des Objektivs. Ohne die Formeln im Einzelnen abzuleiten oder zu diskutieren, sollen sie nun angewendet werden, um die Auflösungsgrenze zu berechnen. Geht man von kurzwelligem UV-nahem oder blauem Licht mit einer Wellenlänge von circa 380 nm beziehungsweise 400 nm aus und setzt diese in die Gleichungen ein, so wird klar, dass eine Auflösung von maximal 200 nm in der xy-Achse und 500 nm in der z-Achse möglich ist (Abbil-

dung 3a). Im Klartext bedeutet das, dass zwei Objekte, die näher als 200 nm in der xy-Achse und 500 nm in der z-Achse beieinander liegen, für den Betrachter als ein einziger verwaschener Bildpunkt erscheinen (Abbildung 3b). Dieses Phänomen ist generell unter dem Ausdruck *point spread function* (PSF) bekannt (Abbildung 3a). Eine solche Auflösung nahe der theoretischen Grenze war erst mit moderneren Mikroskopen möglich. Jedoch unterliegen selbst moderne Geräte diesen physikalischen Beschränkungen. Da viele intrazelluläre Komponenten wie das aus Mikrotubuli, Aktin und Intermediärfilamenten bestehende Cytoskelett oder sekretorische Vesikel erheblich kleiner sind oder zu dicht zusammen liegen, um sie mit konventioneller Mikroskopie voneinander getrennt auflösen zu können (Abbildung 3c), sind Wissenschaftler schon lange bestrebt, die Auflösungsgrenze zu durchbrechen.

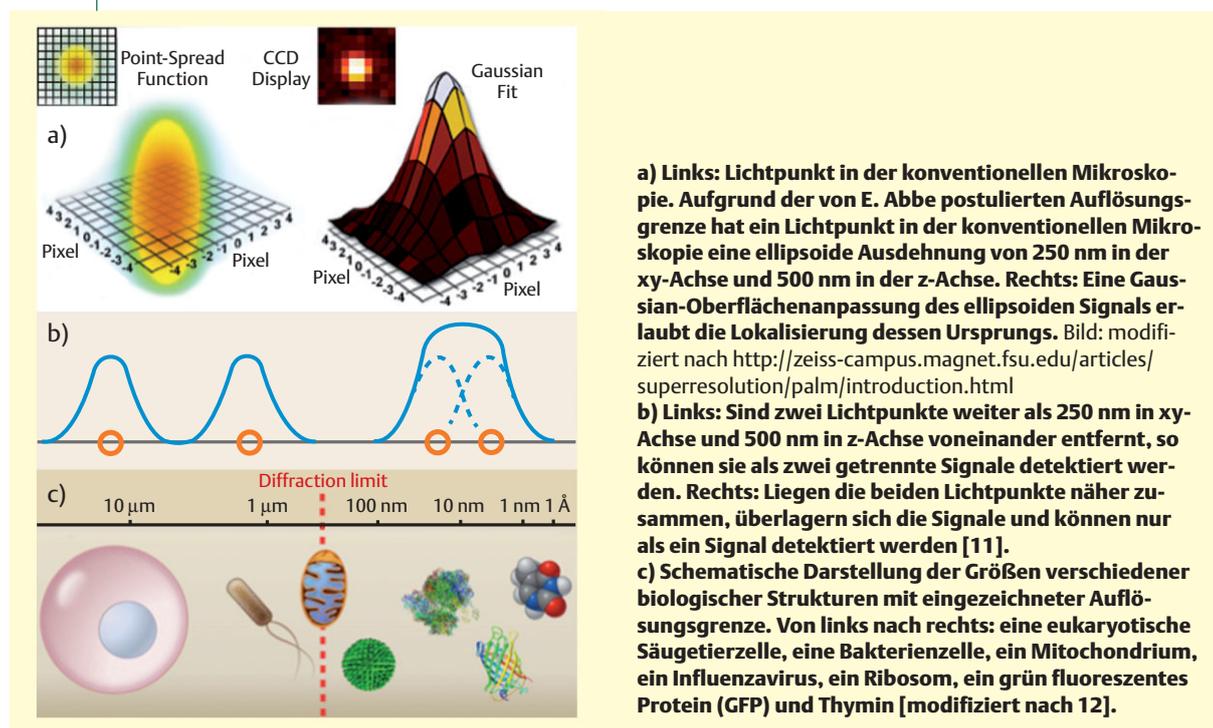
Eine Methode, um die Auflösungsgrenze im Vergleich zur Lichtmikroskopie zu verbessern, ist in der Elektronenmikroskopie (EM) realisiert. Aus den Gleichungen von Abbe wird klar, dass die beschränkende Größe bei lichtoptischen Mikroskopen die Wellenlänge des eingesetzten Lichts ist. Der denkbar einfache Ansatz in der Elektronenmikroskopie ist es, die eingesetzte Wellenlänge zu verringern, indem ein Elektronenstrahl anstelle eines Lichtstrahls verwendet wird. Trotz der unglaublich hohen Auflösung, die mit Elektronenmikroskopen erreicht wird, sind diese vor allem in der Zellbiologie nur begrenzt einsetzbar. In der Rasterelektronenmikroskopie werden die Präparate fixiert und mit

ABB. 2 | DIE ANFÄNGE DER MIKROSKOPIE



Gold bedampft, bevor sie unter Hochvakuum im Elektronenmikroskop betrachtet werden können. In der Durchlichtelektronenmikroskopie werden die Objekte ebenfalls fixiert, entwässert und in ein Polymermaterial eingebettet. Dieses wird anschließend zu Dünnschnitten verarbeitet, die im Elektronenmikroskop analysiert werden können. In beiden Anwendung werden also nur abgetötete Objekte beobachtet und dynamische Prozesse können nur diskontinuierlich untersucht wer-

ABB. 3 | DIE AUFLÖSUNGSGRENZE – EINE GRENZE DER WAHRNEHMUNG



den. Zudem können die Proben bei der Präparation beschädigt werden, was zu Artefakten führen kann.

Eine weitere Methode zur Überwindung der Auflösungs-grenze ist die Rasterkraftmikroskopie (*Atomic Force Microscopy* oder kurz AFM). Bei der AFM wird eine nanoskopisch kleine Messnadel – ein Cantilever – welche an der Spitze aus nur noch einem einzigen Atom besteht, in einem definierten Raster über das Präparat gezogen. So können Höhenunterschiede im Präparat visualisiert werden und eine Auflösung von bis zu 5 nm erreicht werden. Durch die physische Art der Bildaufnahme können zwar auch lebende Präparate verwendet werden, jedoch ist es nicht möglich, intrazelluläre Vorgänge zu beobachten.

Somit ist die lichtoptische Mikroskopie immer noch die wichtigste Methode, um intrazelluläre Vorgänge *in vivo* mit einer Genauigkeit im Nanometerbereich zu visualisieren. Für viele dieser Methoden war zunächst eine weitere Neuerung nötig, nämlich die Etablierung der Fluoreszenzmikroskopie.

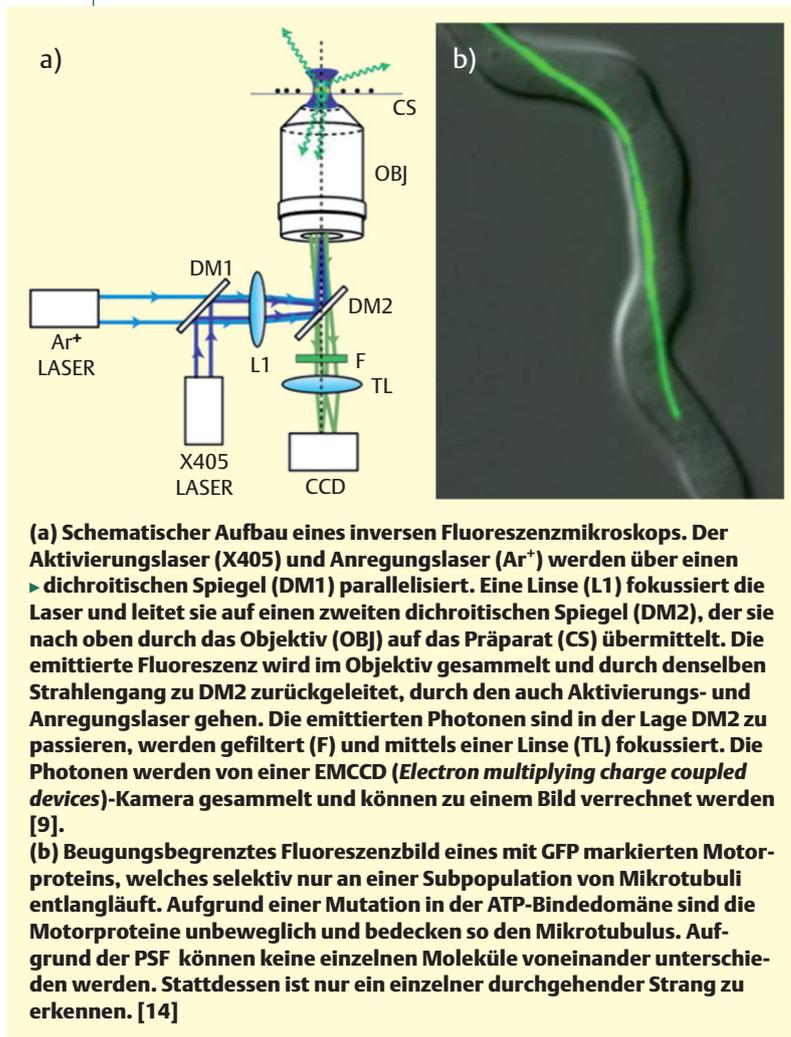
Leuchtende Farbstoffe – Die Fluoreszenzmikroskopie

Bei der Fluoreszenzmikroskopie [8] spielen Fluorophore eine zentrale Rolle. Diese Atome oder Moleküle werden hierbei mit Licht einer spezifischen Wellenlänge angeregt, welches sie absorbieren können. Das daraufhin von den Fluorophoren emittierte energieärmere, längerwellige Licht kann anschließend detektiert und schlussendlich auf die menschliche Retina abgebildet werden. Fluorophore, die in der Fluoreszenzmikroskopie Anwendung finden, können vielfältiger Natur sein. Im einfachsten Fall wird die Autofluoreszenz von Stoffen wie Chlorophyll in Pflanzen ausgenutzt, wobei diese Art von Fluoreszenz generell nicht gewünscht ist. Sehr viele Stoffe oder Organellen weisen Autofluoreszenz auf und erzeugen so starkes, unspezifisches Hintergrundrauschen.

Um jedoch bestimmte Moleküle innerhalb von Zellen zu visualisieren, werden diese im Normalfall durch zusätzliche Stoffe markiert. Durch zum Beispiel mit Rhodamin fluoreszent markierte Liganden wie Phalloidin, die spezifisch an intrazelluläre Komponenten binden, können gezielt Organellen, Strukturen oder Einzelmoleküle gefärbt werden. Ebenfalls gängige Praxis ist die Immunfluoreszenz oder Immunohistochemie, bei der Zellbestandteile mit markierten Antikörpern sichtbar gemacht werden. Eine weitere Methode, um Proteine *in vivo* fluoreszent zu markieren, ist sie schon auf DNA Level mit einem so genannten *Tag* zu versehen, das zusammen mit dem Protein exprimiert wird und ein Fusionsprotein bildet (Abbildung 4a). Diese DNA *Tags* codieren beispielsweise für fluoreszente Proteine wie das grün fluoreszierende Protein (GFP) aus der Qualle *Aequorea victoria* [5] oder das rot fluoreszierende Protein (RFP) aus der Koralle *Acropora millepora* [13]. Ist die so veränderte DNA die einzige Kopie eines Gens in dem Organismus, so ist automatisch das Protein, das durch dieses Gen codiert wird, markiert und kann mikroskopisch untersucht werden. Diese Technologie hat in der Biologie zu einem echten Quantensprung der Analyse-möglichkeiten geführt und wurde vor einiger Zeit mit dem Nobelpreis honoriert.

Inzwischen ist eine breite Palette fluoreszierender Proteine aus verschiedenen Organismen in unterschiedlichen Farben kommerziell verfügbar, um auch mehrere Proteine simultan untersuchen und unterscheiden zu können. Durch intensive Suche und Mutagenese-Experimente bekannter Proteine wurden auch besondere Fluorophore entdeckt oder entwickelt wie zum Beispiel DsRed-E5. Bei dieser DsRed Variante dauert die Faltung und die autokatalytische Bildung des Chromophors sehr lange, sodass erst nach einiger Zeit die richtige Konformation erreicht wird, die eine rote Emission erlaubt. Bevor es zu dieser Konformation kommt, bildet sich ein grün fluoreszentes Intermediat. Diese „Timer“-Eigenschaft ermöglicht es, das unge-

ABB. 4 | FLUORESZENZMIKROSKOPIE



fähre Alter eines Proteins zu bestimmen und so Rückschlüsse auf Proteinschicksale zu schließen. Für *Super Resolution* Mikroskopietechniken wie PALM, die in der Lage sind, die Auflösungsgrenze zu überwinden, sind vor allem die Fluorophore von Bedeutung, deren Fluoreszenz sich zuverlässig kontrollieren lässt.

Fluorophore für die *Super Resolution* Mikroskopie

Oft hängt das Gelingen eines Experimentes von der Wahl des richtigen Fluorophors ab. Es existieren zur Zeit drei Hauptgruppen von Fluorophoren, die für die *Super Resolution* Mikroskopie Verwendung finden. Die erste Gruppe wird generell als **photoaktivierbare Fluorophore** bezeichnet. Sie waren die ersten Fluorophore, deren Emission kontrolliert beeinflusst werden konnte. Das Besondere an diesen fluoreszenten Farbstoffen ist, dass ihr Absorptionsspektrum, also die Wellenlänge des Lichts, die benötigt wird um eine Fluoreszenz hervorzurufen, verschoben werden kann. Dies wird durch die Bestrahlung mit violettem oder ultraviolettem Licht erreicht. Dieser Effekt geht meistens mit einem bis zu 100fachen Anstieg der Fluoreszenz einher.

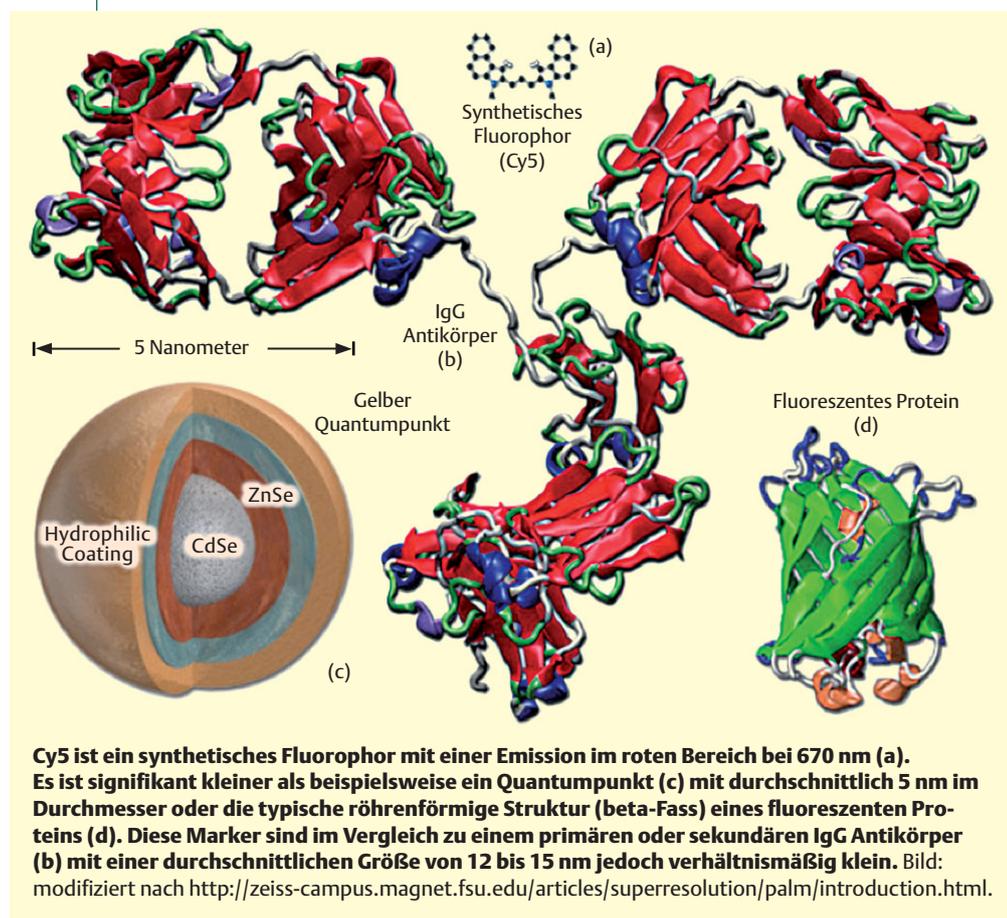
Die zweite Gruppe besteht aus **photoschaltbaren Fluorophoren**, die sozusagen einen optischen „An“ und „Aus“ Schalter besitzen. Bestrahlung mit einer bestimmten Wellenlänge hat zur Folge, dass die Fluoreszenz verschwindet und das Fluorophor „abgeschaltet“ wird. Nach Anregung mit einer anderen bestimmten Wellenlänge lässt sich die Fluoreszenz wiederum „anschalten“.

Fluorophore der dritten Gruppe werden im Allgemeinen als **photokonvertierbare Fluorophore** bezeichnet. Diese Farbstoffe sind in der Lage, nach Anregung mit einer bestimmten Wellenlänge ihre Emissionswellenlänge zu einer anderen zu verschieben. Sie können somit nach Anregung eine grüne Emission in rote verschieben.

Synthetische Fluorophore und Quantumpunkte

Synthetische Farbstoffe und anorganische Quantumpunkte sind Fluorophore, die ebenfalls Anwendung in der *Super Resolution* Mikroskopie finden. Synthetische Fluorophore, die die oben genannten Eigenschaften aufweisen, sind Varianten von Rhodaminderivaten, Cya-

ABB. 5 | DURCHSCHNITTliche GRÖßEN VON FLUOROPHOREN UND ANTIKÖRPERN



Cy5 ist ein synthetisches Fluorophor mit einer Emission im roten Bereich bei 670 nm (a). Es ist signifikant kleiner als beispielsweise ein Quantumpunkt (c) mit durchschnittlich 5 nm im Durchmesser oder die typische röhrenförmige Struktur (beta-Fass) eines fluoreszenten Proteins (d). Diese Marker sind im Vergleich zu einem primären oder sekundären IgG Antikörper (b) mit einer durchschnittlichen Größe von 12 bis 15 nm jedoch verhältnismäßig klein. Bild: modifiziert nach <http://zeiss-campus.magnet.fsu.edu/articles/superresolution/palm/introduction.html>.

ninfarbstoffen und Alexa Fluor®-Farbstoffen. Diese organischen Kohlenwasserstoffe gehören zu den Polymethin-Farbstoffen, die eine quartäre Ammoniumgruppe als Elektronenakzeptor und eine tertiäre Aminogruppe als Elektronendonator besitzen. Sie sind in der Lage, durch die besondere Anordnung der Elektronen (delokalisiertes π -Elektronensystem) Licht zu absorbieren. Quantumpunkte sind anorganische Nanokristalle, die aus einem CdSe-Kern in einer ZnS-Hülle und hydrophiler Beschichtung bestehen (Abbildung 5c). Bei diesen Nanokristallen bestimmt die Größe des Kerns das Emissionsprofil.

Diese Farbstoffe können entweder reversibel photoschaltet oder irreversibel photoaktiviert werden. Sie zeichnen sich vor allem durch ihre Helligkeit, ihre Photostabilität und gutem Kontrast gegenüber dem Hintergrund aus. Die Menge an emittierten Photonen pro Molekül entspricht zudem einem Vielfachen der Menge, die fluoreszente Proteine emittieren können. Da die Genauigkeit, mit der ein Molekül lokalisiert werden kann, von der Anzahl an detektierten Photonen abhängt, sind diese Fluorophore ideal, da eine große Menge an Photonen detektiert werden kann. Das Problem der synthetischen Fluorophore und Quantumpunkte liegt darin, sie an das gewünschte Ziel zu bin-

den. Es gibt zwar synthetische Fluorophore, die ohne zusätzliche Adaptoren spezifisch an ein bestimmtes Ziel binden können, jedoch müssen die meisten von ihnen und alle Quantumpunkte an primäre oder sekundäre Antikörper konjugiert werden. Erst durch spezifische Antikörper ist es möglich, die Farbstoffe gezielt an ein bestimmtes Ziel zu binden. Da Antikörper nicht durch die Zellmembran frei diffundieren können, müssen die Zellen dafür fixiert und permeabilisiert werden. Das Problem hierbei ist, dass Zellen den Fixierungsprozess mit zum Beispiel Paraformaldehyd nicht überleben und es zu Artefakten durch Quervernetzungen der Zellkomponenten oder erhöhtem Hintergrundrauschen durch Autofluoreszenz kommt.

Ein weiteres Problem ist, dass das Markieren mit Antikörpern nicht sehr effizient ist und so nur ein Teil der in der Zelle eigentlich vorhandenen Moleküle beobachtet werden kann. Problematisch ist auch der Antikörper selbst. Die durchschnittliche Größe eines Antikörpers beträgt circa 12 bis 15 nm (Abbildung 5). In der Praxis bedeutet das, dass das eigentliche Fluoreszenzsignal sich nicht direkt am Ziel befindet. Der Antikörper schafft somit einen Raum zwischen Ziel und Fluorophor in der Größe des Antikörpers in potenziell allen drei möglichen räumlichen Achsen. Der Einsatz von Antikörpern zur Markierung zellulärer Komponenten ist in der konventionellen Lichtmikroskopie weit verbreitet. Hier ist jedoch die Auflösung nicht hoch genug, so dass dieser Abstand zwischen Ziel und Fluorophor nicht ins Gewicht fällt. Im Maßstab der *Super Resolution* Mikroskopie sind 10 nm allerdings eine Distanz, die in den gewonnenen Daten Interpretationsspielraum offen lässt.

Fluoreszente Proteine

Um lebende Zellen beobachten zu können, muss auf fluoreszente Proteine zurückgegriffen werden, deren Fluoreszenz ebenfalls kontrolliert werden kann. Im Gegensatz zu den synthetischen Fluorophoren oder Quantumpunkten, bei welchen nur photoschaltbare oder photoaktivierbare Fluorophore zu finden sind, können fluoreszente Proteine auch photokonvertierbare Eigenschaften besitzen. Da fluoreszente Proteine wie alle Proteine von DNA codiert sind, müssen sie nicht als Protein in die Zellen eingeschleust werden. An das gewünschte Protein fusioniert sind sie kovalent gebunden, was zur Folge hat, dass auch alle so exprimierten Proteine in der Zelle markiert sind und beobachtet werden können. Neben den photokontrollierbaren Eigenschaften müssen sie auch genügend hohen Kontrast gegenüber dem Hintergrund besitzen, was eines ihrer größten Probleme darstellt, da sie je nach Fluorophor um ein Vielfaches weniger Photonen emittieren als synthetische Fluorophore oder Quantumpunkte. Des Weiteren sollen sie sich möglichst schnell und zuverlässig *in vivo* in die richtige Konformation falten.

Die photokonvertierbaren Proteine sind potenziell die Fluorophore, die am geeignetsten für die *Super Resolution*-Mikroskopie sind. Jedoch sind die meisten Proteine dieser Gruppe Dimere oder Tetramere und daher für das Markieren von anderen Proteinen nicht immer unproblematisch. Hier besteht durch die tetramere Assoziation der Fusionsproteine die Gefahr, dass das Protein in seiner Funktionalität extrem behindert oder gar ganz blockiert wird. Es gibt jedoch bereits photokonvertierbare Fluorophore, die durch Mutagenese so verändert wurden, dass sie nur noch eine monomere Struktur aufweisen und somit Probleme wie Mislokalisierungen oder Dysfunktion minimieren.

Richtungsweisend ist ein Hybridprotein, das sowohl photoschaltbare als auch photokonvertierbare Eigenschaften aufweist [2]. Das nach der griechischen Regenbogengöttin benannte IrisFP-Fluorophor wurde ursprünglich durch Zufallsmutagenese des EosFP aus der Steinkoralle *Lobophyllia hemprichii* entwickelt. Das ursprünglich tetramere EosFP besitzt photokonvertierbare Eigenschaften, die es ermöglichen, eine grüne Fluoreszenz nach Anregung mit Licht einer Wellenlänge von 390 nm irreversibel ins rote zu verschieben. Aus diesem Grund wurde zuerst eine tetramere Version von IrisFP verfügbar. Durch weiterführende Mutagenese Experimente konnten später eine dimere und schließlich eine monomere Variante entwickelt werden.

Nach Anregung mit einem schwachen Laser bei 405 nm wechselt IrisFP reversibel von einem nicht-fluoreszenten zu einem grün-fluoreszenten Zustand. Wird die Intensität des 405 nm Lasers verstärkt, so wird das grüne Emissionsspektrum irreversibel nach rot verschoben. Die rote Form von IrisFP kann wiederum photoreversibel in eine nicht-fluoreszente Form überführt werden, die wieder aktiviert werden kann (Abbildung 6). Diese zahlreichen kontrollierbaren Zustände machen IrisFP zu einem der potenziell leistungsfähigsten Fluorophore der *Super Resolution* Mikroskopie.

Superauflösende lichtoptische Mikroskopie

Zur Zeit existieren zwei Herangehensweisen, um mit lichtoptischen Geräten die durch die Wellenlänge des Lichts abhängige Auflösungsgrenze zu durchbrechen. Die erste Variante ist ein System, das auf einer strukturierten Beleuchtung basiert, wie sie in der *Structured Illumination Microscopy* (SIM) oder *Stimulated Emission Depletion* (STED)-Mikroskopie realisiert ist [11].

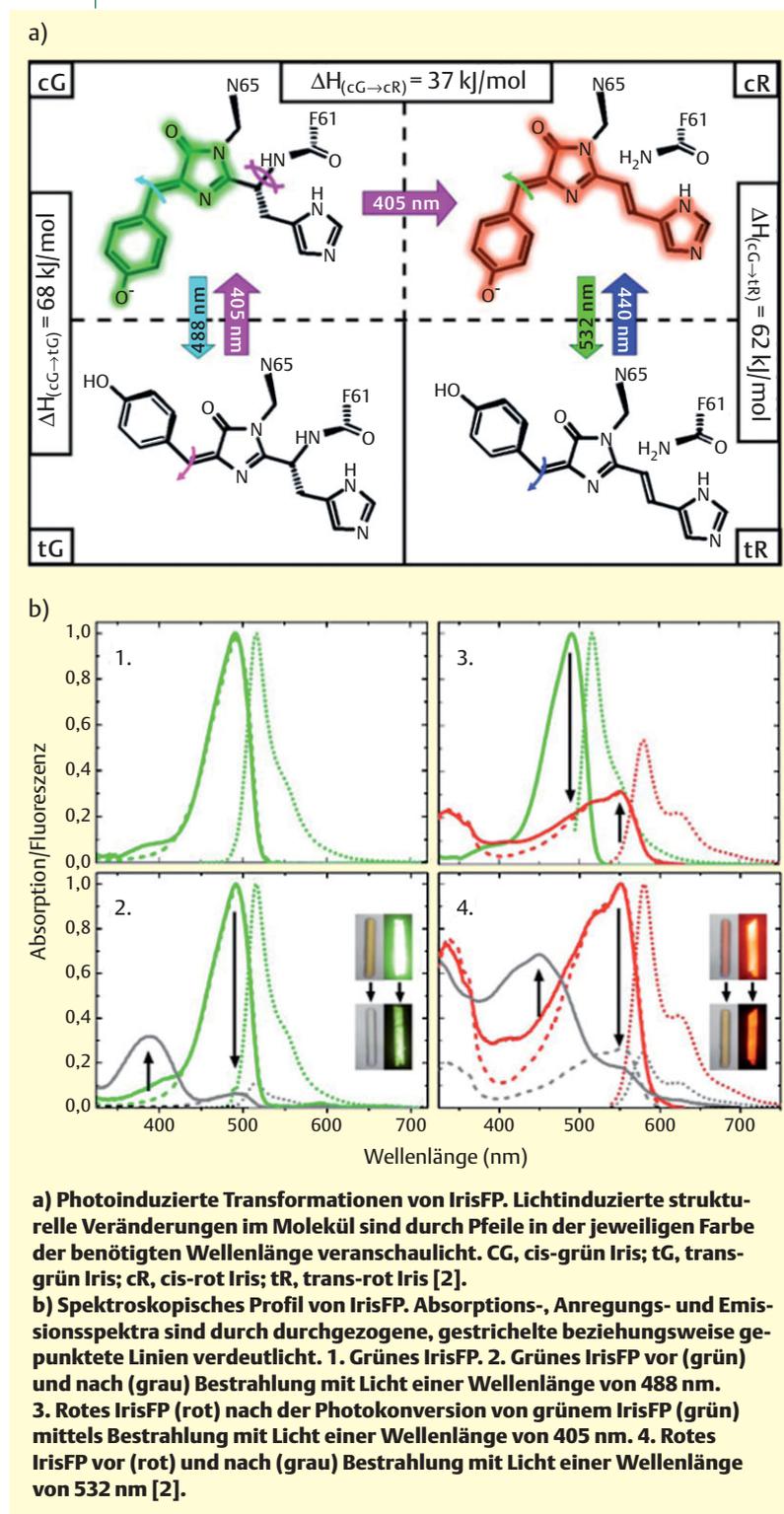
Die zweite Variante nutzt die Eigenschaften photoschaltbarer oder photoaktivierbarer Fluorophore, um sogar einzelne Moleküle innerhalb einer Probe zu detektieren. Ein solches System, das sich diese Technik zunutze macht um die Auflösungsgrenze zu durchbrechen, bezeichnet man als *Photoactivated Localization Microscopy* oder kurz PALM [4]. Es beruht prinzipiell auf zwei einfachen Voraussetzungen:

Die erste ist die Möglichkeit, einzelne Moleküle innerhalb einer Probe detektieren und deren Position auf wenige Nanometer genau bestimmen zu können. Da ein PALM ein Fluoreszenzmikroskop ist, sind die Aufnahmen prinzipiell immer noch beugungsbegrenzt und unterliegen somit den von Ernst Abbe postulierten Limitierungen. Da man jedoch weiß, dass ein Signal einer Aufnahme dem Zentrum eines Fluorophors entspringt, kann dieses Zentrum mit Hilfe der Gaußschen Verteilung berechnet werden. Die Präzision, mit der die Position eines solchen Signals bestimmt werden kann, hängt von der Menge an detektierten Photonen ab, die von einzelnen Fluorophoren ausgehen. Nicht zuletzt dank neuer EMCCD (*Electron multiplying charge coupled devices*) Kameras, die in der Lage sind, sogar einzelne Photonen zu detektieren und leistungsstarken Lasern ist PALM heutzutage eine einfach anzuwendende Technik geworden (Abbildung 7).

Die genaue Lokalisierung von Signalen ist allerdings nur zuverlässig realisierbar, wenn das Hintergrundrauschen sehr gering ist. Daher werden solche *Super Resolution Mikroskope* meistens mit einer Technologie namens TIRF (*Total Internal Reflection*) kombiniert [3]. Hierbei wird die Probe von unten einem Lichtstrahl ausgesetzt, der an der Grenze von Deckglas zu Präparat totalreflektiert wird. Das erzeugt eine evaneszente (abklingende) Welle in das Präparat hinein, von der nur an der Oberfläche liegende fluoreszente Moleküle zur Emission angeregt werden können. Mit dieser Methode erreicht man im Durchschnitt eine Eindringtiefe von 100 bis 200 nm in die Probe hinein, was einen Großteil der natürlich auftretenden Hintergrundfluoreszenz in biologischen Systemen schon stark minimiert, da nur ein Bruchteil der in der Probe vorhandenen Fluorophore angeregt wird. Das allein reicht jedoch noch nicht aus, um ein aussagekräftiges hoch auflösendes Bild zu erhalten, da immer noch zu viele Fluorophore angeregt werden und es unmöglich wäre, diese voneinander zu unterscheiden oder ihren exakten Ursprung zu bestimmen.

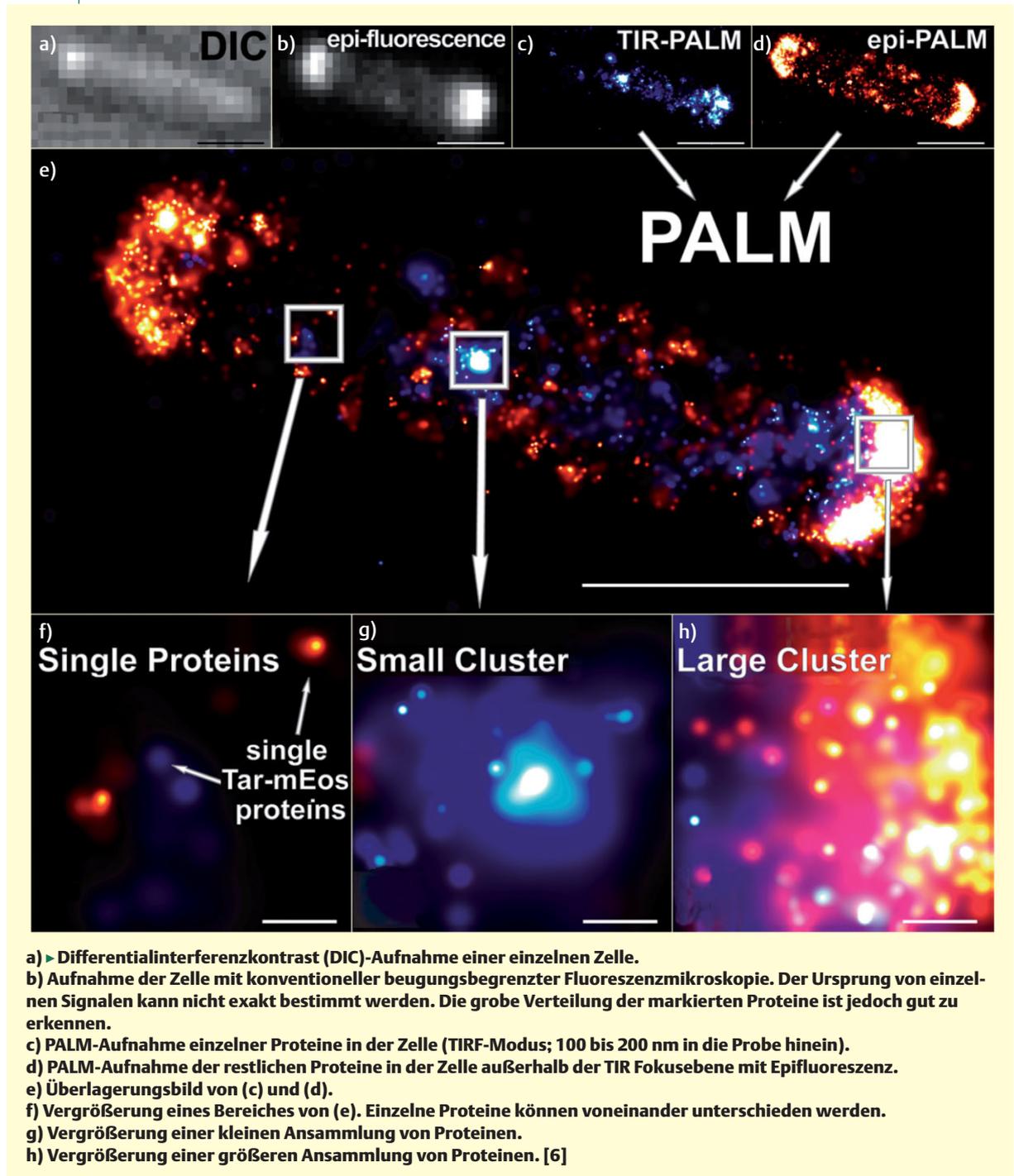
Daher ist die zweite Voraussetzung die Möglichkeit einzelne Fluorophore kontrolliert zu aktivieren und damit nur den Ursprung einer kleinen Subpopulation von Signalen zu bestimmen. Hier kommen die Eigenschaften der photoschaltbaren Fluorophore zum Tragen. Die Bildaufnahme bei der PALM Mikroskopie erfolgt deshalb sequenziell (Abbildung 8): Mit einem Aktivierungslaser werden in einem räumlich begrenzten Feld einzelne Fluorophore photoaktiviert, photokonvertiert oder photogeschaltet. Die Stärke des Lasers wird hierbei so gering gewählt, dass statistisch gesehen keine zwei Fluorophore angeregt werden, die zu nahe beieinander liegen, um sie voneinander unterscheiden zu können. Nur die so aktivierten Fluorophore können mit einem ständig aktiven Anregungslaser mit einer bestimmten Wellenlänge angeregt und ihre Position durch

ABB. 6 IRISFP – EIN RICHTUNGSWEISENDES FLUORESCENTES PROTEIN



die Emission exakt berechnet und aufgezeichnet werden. Das Ausbleichen der Fluorophore nach einer bestimmten Zeit verhindert, dass diese erneut angeregt und lokalisiert werden. Dieser Zyklus wird mehrere

ABB. 7 | PALM-AUFNAHME EINER ESCHERICHIA COLI ZELLE MIT MEOS MARKIERTEM CHEMOTAXIS-REZEPTOR



tausendmal pro Aufnahme wiederholt und die einzelnen Bildpunkte am Ende zu einem Gesamtbild zusammengefügt. Die sequenzielle Bildaufnahme hat zur Folge, dass die Dauer des Aufnahmeprozesses mehrere Minuten beträgt. Aus diesem Grund sind viele Experimente, die mit PALMs arbeiten, statische Experimente, also Experimente mit fixierten und damit toten Pro-

ben, in denen sich nichts mehr bewegt. Ist die Zelle und alle darin enthaltenen Komponenten fixiert, spielt weniger die Aufnahmezeit als die Gesamtmenge an visualisierten Fluorophoren und im Endeffekt die Geduld des Experimentators eine Rolle. Werden lebende Zellen betrachtet, so kommt das Problem von sich bewegenden Signalen auf. Hier besteht die Schwierigkeit darin,

ABB. 8 | BILDAUFNAHMEVERFAHREN IN DER PHOTOACTIVATED LOCALIZATION MIKROSKOPIE

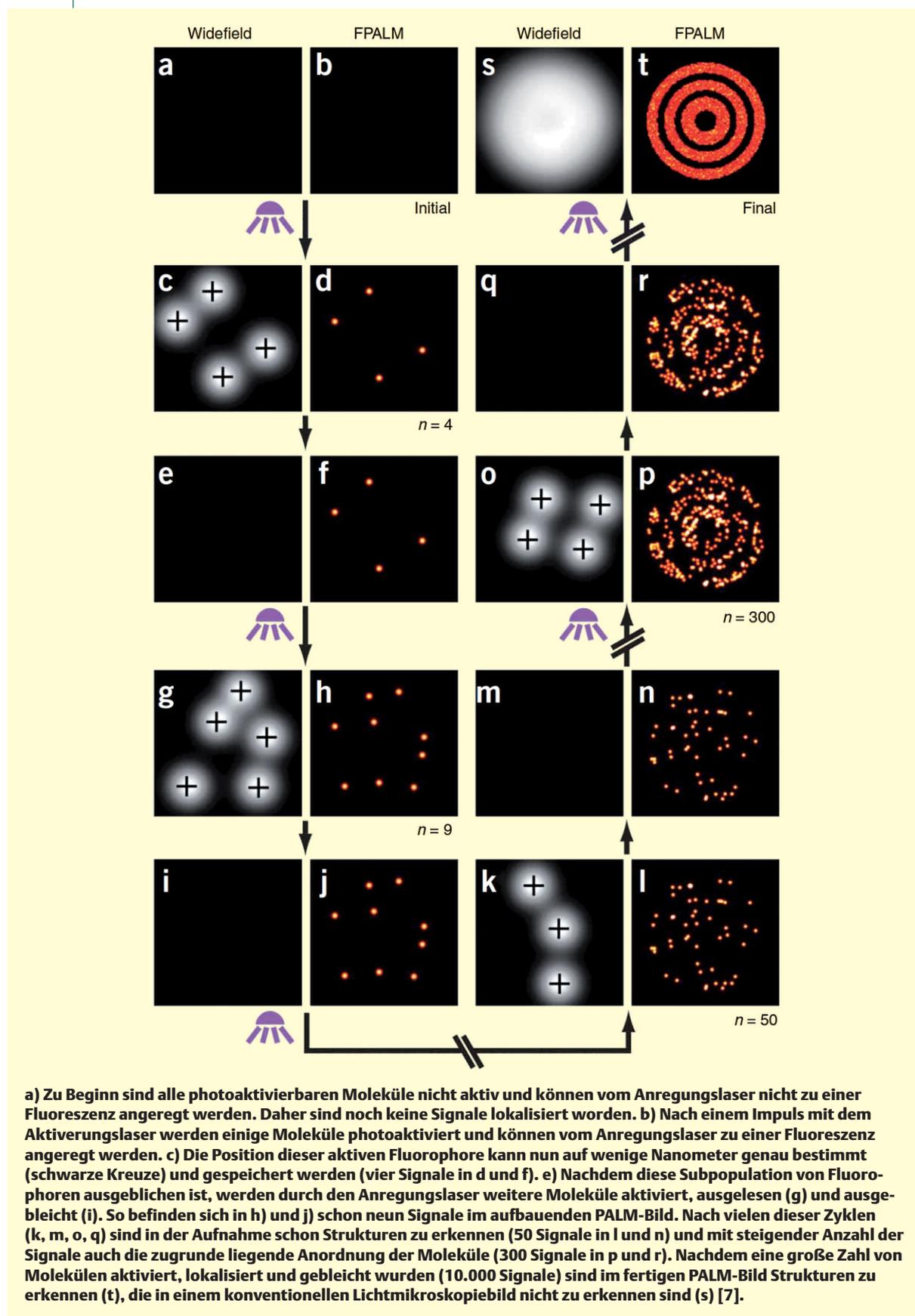
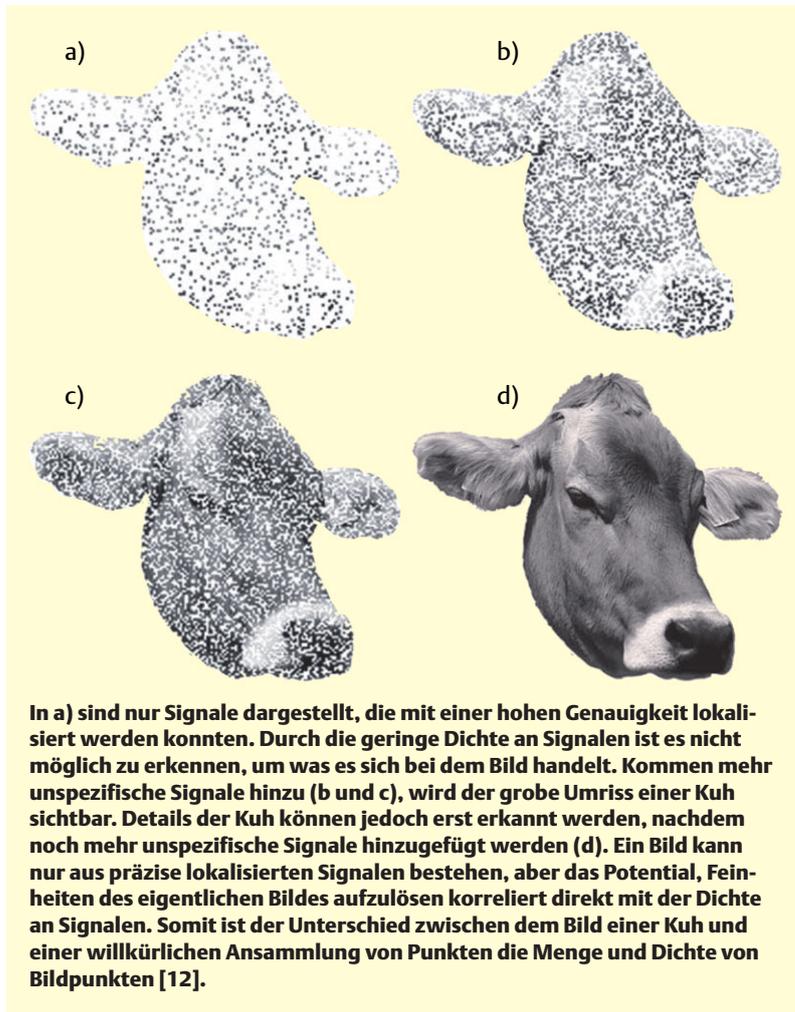


ABB. 9 | PRÄZISION, AUFLÖSUNG UND DICHTHE VON SIGNALLEN IN PALM-AUFNAHMEN



GLOSSAR

Artefakt: Veränderung einer Probe durch den Präparationsprozess oder das Auftreten falscher Signale durch Autofluoreszenz in der Fluoreszenzmikroskopie.

Absorption: Aufnahme von Energie aus einfallender Strahlung bestimmter Wellenlänge.

dichroitischer Spiegel: ein Spiegel, der nur einen Teil des Lichtspektrums reflektiert und den Rest passieren lässt.

Differentialinterferenzkontrast: eine Methode der Lichtmikroskopie, bei der die Unterschiede in der optischen Weglänge in der Probe vom Mikroskop in Helligkeitsunterschiede umgewandelt und sichtbar gemacht werden.

Emission: Aussendung von Licht einer bestimmten Wellenlänge.

Hintergrundrauschen: Fluoreszenz, die von Fluorophoren oder autofluoreszenten Komponenten außerhalb der Fokusebene stammt.

zwischen bereits aufgenommenen und neuen Signalen zu unterscheiden. Deshalb muss die Bildaufnahme hier schneller erfolgen als bei fixierten Zellen. Eine schnellere Bildaufnahme heißt in diesem Fall unter anderem, dass die Stärke des Lasers erhöht wird. Starke Laserstrahlung kann allerdings Zellen erheblich schädigen und so zu verfälschten Informationen führen. Daher sind lebende Objekte prinzipiell auch für PALM-Mikroskopie geeignet, sie sind jedoch wesentlich schwieriger zu handhaben, da die Vitalität und Fitness der Zellen immer kritisch beurteilt werden muss.

Eine Kuh oder nur ein paar Bildpunkte? Die Dichte an Signalen macht den Unterschied

Eine Besonderheit von PALM ist, dass der Experimentator bestimmen kann, wie viele Moleküle in der endgültigen Aufnahme dargestellt werden sollen. So ist es zum Beispiel möglich, nur Moleküle im fertigen Bild erscheinen zu lassen, deren Position auf weniger als 10 nm genau bestimmt werden konnte. Allerdings muss hierbei beachtet werden, dass man mit steigender Genauigkeit dieser Grenze natürlich weniger Bildpunkte im endgültigen Bild erhält. Werden beispielsweise Proteine untersucht, die im Zellkern lokalisiert sind, und zieht nur Signale in Betracht, die mit höchster Genauigkeit lokalisiert werden konnten, wird man zwar exakte Informationen über die Verteilung und Position von einzelnen Molekülen innerhalb des Zellkerns erhalten – der Zellkern als Ganzes wird jedoch nicht zu erkennen sein. Erst wenn unspezifischere Signale hinzukommen, wird der Zellkern theoretisch sichtbar (Abbildung 9). Eine solche Dichte an Signalen ist jedoch bei der *Super Resolution* Mikroskopie praktisch nicht realisierbar. Zieht man die durchschnittliche Größe eines Fluorophors in Betracht, so müsste die komplette Ebene nur aus photoaktivierten Fluorophoren bestehen, was in Zellen nie der Fall sein kann. Dies ist jedoch auch nicht nötig, da das Ziel eines PALM-Experimentes in der Regel ist, möglichst akkurate Informationen zur Lokalisation von Molekülen zu erhalten.

Es war ein langer Weg bis zu diesem Stand der Technik. Viele einzelne Aspekte und Voraussetzungen wie die mathematischen und physikalischen Grundlagen, Kameratechnik und Fluorophore mussten erst erforscht, entwickelt und etabliert werden, um PALM so anwendbar zu machen, wie es heute von Wissenschaftlern tagtäglich getan wird. Aufgrund der langen Bildaufnahme-prozedur sind Videos, die vor allem in der Zellbiologie von großer Bedeutung sind, nur begrenzt möglich. Verbesserte Auflösung und schnellere Bildsequenzen könnten es sogar ermöglichen, Proteinkomplexe wie DNA oder RNA-Polymerasen in Aktion zu beobachten. Durch die ständige Weiterentwicklung der Mikroskope und immer neue Fluorophore mit besseren Eigenschaften darf man gespannt sein, was die Zukunft hier noch bringen wird.

Zusammenfassung

Die Auflösung konventioneller lichtoptischer Mikroskope ist aufgrund physikalischer Gesetze durch die Wellenlänge des eingesetzten Lichts begrenzt. Die Größe vieler essentieller intrazelluläre Komponenten wie das Cytoskelett oder sekretorische Vesikel liegt jedoch weit unter dieser Auflösungs-grenze. Super Resolution Mikroskopie Techniken wie Photoactivated Localization Microscopy ermöglichen es diese Grenze zu durchbrechen. Durch kontrolliertes Aktivieren einer Subpopulation von photoaktivierbaren Fluorophoren in einer Probe kann die Position eines jeden Moleküls auf wenige Nanometer genau bestimmt werden.

Summary

Super Resolution Microscopy

Resolution in conventional light microscopy is restricted by the borders of physics. The limiting factor is the wavelength of the used light. Nevertheless, many essential intracellular components such as the cytoskeleton or secretory vesicles are in size well below this diffraction limit. Super Resolution Microscopy techniques such as Photoactivated Localization Microscopy make it possible to break through this diffraction barrier. Controlled activation and sampling of a subpopulation of photoactivatable fluorophores enables localization of probes in a nanometric scale.

Schlagworte

PALM, Mikroskopie, Fluorophor, Super Resolution

Literatur

- [1] E. Abbe, Beiträge zur Theorie des Mikroskops und der mikroskopischen Wahrnehmung, Archiv für Mikroskopische Anatomie 1873, 9, 413–418.
- [2] V. Adam et al., Structural characterization of IrisFP, an optical high-lighter undergoing multiple photo-induced transformations, PNAS 2008, 105(47), 18343–18348.
- [3] D. Axelrod, Cell-substrate contacts illuminated by total internal reflection fluorescence, J. Cell Biol. 1981, 89, 141–145.
- [4] E. Betzig et al., Imaging intracellular fluorescent proteins at nanometer resolution, Science 2006, 313(5793), 1642–1645.
- [5] M. Chalfie et al., Green fluorescent protein as a marker for gene expression, Science 1994, 263, 802–805.
- [6] D. Greenfield et al., Self-organization of the *Escherichia coli* chemotaxis network imaged with super-resolution light microscopy, PLOS Biol. 2009, 7(6), e1000137.
- [7] T. J. Gould, V. V. Verkhusha, S. T. Hess, Imaging biological structures with fluorescence photoactivation localization microscopy, Nature Prot. 2009, 4(3), 291–308.
- [8] O. Heimstädt, Das Fluoreszenzmikroskop. Z. Wiss. Mikrosk. 28, 1911, 330–337.
- [9] S. T. Hess, T. P. K. Girirajan, M. D. Mason, Ultra-high resolution imaging by fluorescence photoactivation localization microscopy, Biophys. J. 2006, 91(11), 4258–4272.
- [10] R. Hooke, Micrographia: or, Some physiological descriptions of minute bodies made by magnifying glasses. London: J. Martyn and J. Allestry, 1665.
- [11] B. Huang, H. Babcock, X. Zhuang, Breaking the diffraction barrier: super-resolution imaging of cells, Cell 2010, 143(7), 1047–1058.
- [12] G. Patterson, M. Davidson, S. Manley, J. Lippincott-Schwartz, Superresolution imaging using single-molecule localization, Annu. Rev. Phys. Chem 2010, 61, 345–367.
- [13] D. Veith, M. Veith, Biologie fluoreszierender Proteine: Ein Regenbogen aus dem Ozean. Biol. Unserer Zeit 2005, 35, 394–404.
- [14] N. Zekert, R. Fischer, The *Aspergillus nidulans* kinesin-3 UncA motor moves vesicles along a subpopulation of microtubules, Mol. Biol. Cell 2009, 20(2), 673–684.

Die Autoren



Raphael Manck, geb. 1987 in Speyer, studierte Biologie am Karlsruher Institut für Technologie (KIT) und beschäftigte sich in seiner Bachelor Thesis mit dem polaren Wachstum von filamentösen Pilzen. Zur Zeit vertieft er diese Studien in seiner Master Thesis, die er wie seine Bachelor Thesis am Institut für Angewandte Biowissenschaften bei Professor Reinhard Fischer anfertigt. Bei diesen zellbiologischen Fragestellungen spielen mikroskopische Arbeiten mit Fluoreszenzmikroskopen eine wichtige Rolle.



Reinhard Fischer, geb. 1962 in Bad Berleburg, studierte Biologie an der Philipps-Universität in Marburg und promovierte 1990 unter der Anleitung von Prof. Dr. R.K. Thauer. 1991 Postdoc am gleichen Institut. 1992–1993 DFG-Stipendiat im Labor von Prof. Dr. W.E. Timberlake am Dept. of Genetics, University of Georgia, Athens, USA. 1994–2004 leitete er eine Forschungsgruppe an der Philipps Universität und am MPI für terrestrische Mikrobiologie. Er habilitierte sich 1998 und war bis 2004 als Hochschuldozent tätig. 2004 erhielt er eine C3-Professur für Angewandte Mikrobiologie an der Universität Karlsruhe und hat seit 2007 hat eine W3-Professur für Mikrobiologie am Karlsruher Institut für Technologie (KIT) inne.

Korrespondenz:

Raphael Manck
Karlsruher Institut für Technologie (KIT)
Institut für Angewandte Biowissenschaften
Mikrobiologie
Hertzstr. 16
76187 Karlsruhe
E-Mail: raphael.manck@kit.edu



Die Autoren sind Mitglieder bei der Vereinigung für Allgemeine und Angewandte Mikrobiologie (VAAM).
www.vaam.de