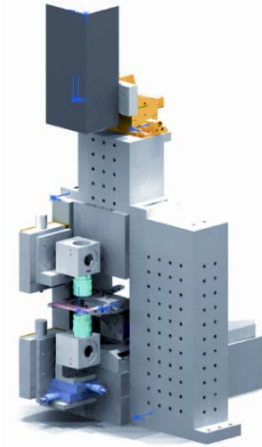


Neuer Meilenstein in der Optischen Nanoskopie:

GFP-Superresolution Imaging von zellulären Nanostrukturen

Diese lichtoptische Nanoskopie hat das Potenzial, die gesamte molekularbiologische, medizinische und pharmazeutische Forschung zu revolutionieren und dient der Entwicklung neuer Strategien zur Vorbeugung, Risikosenkung und Therapie von Krankheiten.

Aus Prof. Cremers Entwicklungen zur Unterschreitung der durch Abbe 1873 postulierten optischen Auflösungsgrenze resultiert das weltweit schnellste Nanolichtmikroskop, welches die großflächige Untersuchung supramolekularer Komplexe unter Lebendzellbedingungen ermöglicht. Dieses Vertico-SMI kann als einziges Nanoskop weltweit 3D-Daten ganzer lebender Zellen in weniger als zwei Minuten aufnehmen, wobei das hoch aufgelöste Bild aus mehreren tausend Einzelbildern per Computer zusammengesetzt wird.



Diese Kombination macht das Cremer-Nanoskop einzigartig:

- **Weitfeld bis zu 5000 μm^2** (z.B. mehrere Zellen)
- **höchste Auflösung: 10 nm in 2D, 40 nm in 3D, unter Verwendung sichtbaren Laserlichts**
- **extrem schnell: 30 s für komplette Aufnahme (2000 Bilder)**
- **normale, sehr etablierte Fluoreszenzmoleküle wie GFP**
- **Co-Lokalisation zweier Farbstoffe aus GFP-Familie**
- **bis zu mehreren Millionen Einzelmoleküle pro Gesichtsfeld/Zelle detektierbar**
- **alle GFP-exprimierenden Zellen/Tiere sofort untersuchbar**
- **in vivo- Aufnahmen von Zellverbänden möglich**

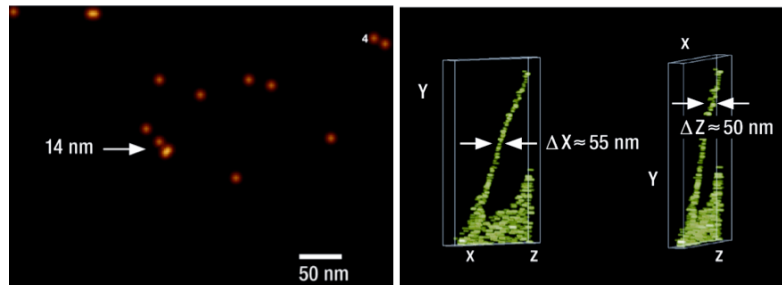
Biotechnologische und medizinische Anwendungen (Auswahl)

- **Altersbedingte neurobiologische Degenerationserscheinungen**
- **Krebsrelevante Genominstabilitäten durch Umwelteinflüsse**
- **Viren:** „Andocken“ von Viren an Zelloberflächen und intrazellulär
- **Bakterien:** z.B. Entwicklung neuer Antibiotika
- **Stammzellen:** Reprogrammierung adulter Stammzellen zur Gewebeerneuerung
- **Pharmabereich:** Wirkstoffscreening und Wirkstoffverteilung
- **Hochdurchsatzanlage:** Integration möglich
- **3 D-Analyse** der Genomstruktur und von Molekularen Zellmaschinen für lebenswichtige Vorgänge
- **Materialforschung:** z. B. Schadensanalyse.

Die einzelnen Methoden werden ständig weiterentwickelt. Es laufen verschiedene Kooperationsprojekte im biomedizinischen Bereich, weitere Projekte sind in Einreichungs- und Bewilligungsverfahren.

Prototyp des Vertico-SMI: Das erste optische Nanoskop für den Routineeinsatz, das schnell genug ist, lebende Zellen zu beobachten

- **Schnell + weit + nano + in vivo:** Mit dieser Kombination setzt sich das Vertico SMI an die Spitze.
- SMI (Spatially Modulated Illumination) steht für eine spezielle Art der laseroptischen Beleuchtung und Vertico für die vertikale Anordnung der Mikroskopachse, die es ermöglicht, fixierte, aber auch lebende Zellen mit einer effektiven optischen Auflösung von 10 Nanometern in 2D zu analysieren.
- In Kombination mit der Lokalisationsmikroskopie SPDM (Spectral Precision Distance Microscopy) können nanoskopische 3D-Aufnahmen mit einer Auflösung von 40 nm durchgeführt werden.
- **Einzigartige Auflösung:** Moleküle sind im Abstand von nur 14 nm klar unterscheidbar (Krebszelle, Abb. li.). Das 3D-Bild von grün fluoreszierenden Membranproteinen wird durch die Kombination von SMI und SPDM erreicht. Kleinst messbarer Abstand zwischen zwei Molekülen ist hier 50 nm (re.).

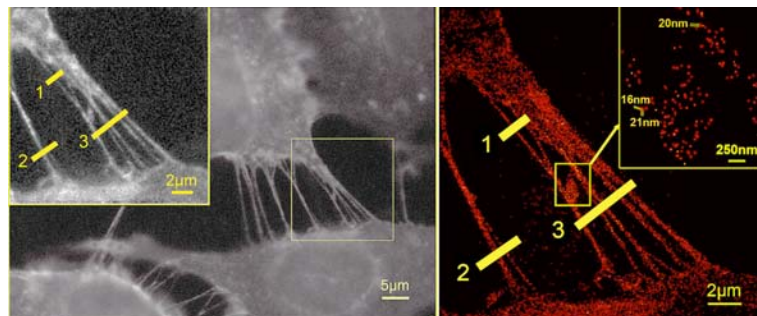


Vorteile zu vergleichbaren Nanoskopiemethoden:

- Die US-Entwicklungen *PALM* und *SIM/OMX* arbeiten ebenfalls mit Weitfeldmikroskopietechniken, verfügen aber nicht über diese außergewöhnliche Aufnahmegeschwindigkeit, so dass keine Aufnahmen von lebenden Zellen mit hohen Moleküldichten möglich sind.
- Die in Harvard entwickelte *STORM*-Technologie ist zwar schnell, benötigt aber einen für lebende Zellen schädlichen pH-Wert.
- Fokussierende nanoskopische Methoden wie *STED* und *ISOSTED* erreichen zwar schnelle Aufnahmen in kleinen Arealen, würden allerdings für einen großen Bereich, wie er mit der Weitfeldmikroskopie erfasst werden kann, wiederum zu lange brauchen, da zuerst viele Einzelbereiche nanoskopisch erfasst werden müssen.

Endlich möglich: Moleküle zählen in extremen Weitfeldaufnahmen mit gewöhnlichen Fluoreszenzmolekülen aus der GFP-Gruppe

- Einsatz konventioneller, sehr gut etablierter und preisgünstiger Fluoreszenzfarbstoffe, wie des 2008 nobelpreisgekrönten GFP (green fluorescent protein) mit seinen Farbvarianten, bis hin zu weit verbreiteten „Alexa“- und Fluoreszeinfarbstoffen möglich.
- Grundlage für diese SPDM_{phymod} sind Blinking-Phänomene, ausgelöst durch reversibles Bleichen.
- Es sind einzelne Moleküle gleicher Spektralfarbe detektierbar.
- Zählen einzelner Moleküle bis zur Dichte von 1000/μm² - derzeit durchführbar in einer Region von 5000 μm².
- In einem großen Gesichtsfeld lassen sich bis zu mehrere Millionen Einzelmoleküle eines bestimmten Typs lokalisieren.
- Aussagen über Aktivität von Proteinen oder Genen durch örtliche Bestimmung einzelner Moleküle (z. B. Wirksamkeitskontrolle von Medikamenten).
- Weitfeldaufnahmen von Membranausläufern von vier Brustkrebszellen (Abb.): Sogar im extremen Weitfeld (hier 4300 μm²) ist noch Nano möglich (hier Lokalisationsgenauigkeit ca. 16 nm). Im Ausschnitt wurden 15.000 Lck-Tyrosinkinase-Moleküle gezählt, markiert mit dem gängigen Fluoreszenzprotein YFP (Yellow Fluorescent Protein) (aus Lemmer et al., Journal of Microscopy, im Druck).



- Größe des messbaren Areal abhängig von Markierungsdichte und verfügbaren Lasern – zukünftige Entwicklung der Arbeitsgruppe gehen in Richtung Aufnahmen in einer Region von 200 μm x 200 μm (40 000 μm^2) durch Einsatz eines stärkeren Lasers, bzw. einer besseren Lichtquelle.
- Zukünftig nicht nur Aufnahmen von Zellverbänden, sondern auch ganzer Zebrafische denkbar.

Vorteile zu vergleichbaren Nanoskopiemethoden:

- Diese können nur photoschaltbare und photoaktivierbare, d.h. spezielle, teure Fluoreszenzfarbstoffe einsetzen.
- Die erreichte Moleküldichte ist um Faktor 30 besser als die beste konventionelle Lichtmikroskopie, und dies bei einer 20 mal besseren räumlichen Auflösung.
- Eine einzige Laserwellenlänge geeigneter Intensität genügt bei SPDM_{phymod} für das Photoschalten eines bestimmten Molekültyps – zwei Laserwellenlängen sind hingegen notwendig bei photoschaltbaren Fluoreszenzmolekülen (weitere technische Vereinfachung).
- SPDM_{phymod} ist einfach, schnell, ökonomisch und universell für die Probenaufbereitung einsetzbar

Beachtlicher Vorteil für Forscher im biologisch-medizinischen Bereich:

- Alle mit GFP (oder RFP, YFP)-markierten Genkonstrukte (weltweit Millionen vorhanden) können nun nanoskopisch genauso einfach wie bei der konfokalen Fluoreszenzmikroskopie betrachtet werden.
- In den weltweiten Labors existieren kultivierbare Zellen, die grün-leuchtende Proteine herstellen, für fast jede biologische oder medizinische Fragestellung. Es gibt bereits viele transgene Tiere, welche grüne fluoreszierende Fusionsproteine in sich tragen, vom Fadenwurm über die Fruchtfliege bis hin zu Wirbeltieren wie Zebrafisch, Maus, Primaten. Somit ist vielfältiges Untersuchungsmaterial bereits vorhanden und kann ohne zusätzliche Bearbeitung einfach wie gewohnt für die normale Konfokale Fluoreszenzmikroskopie eingesetzt werden.

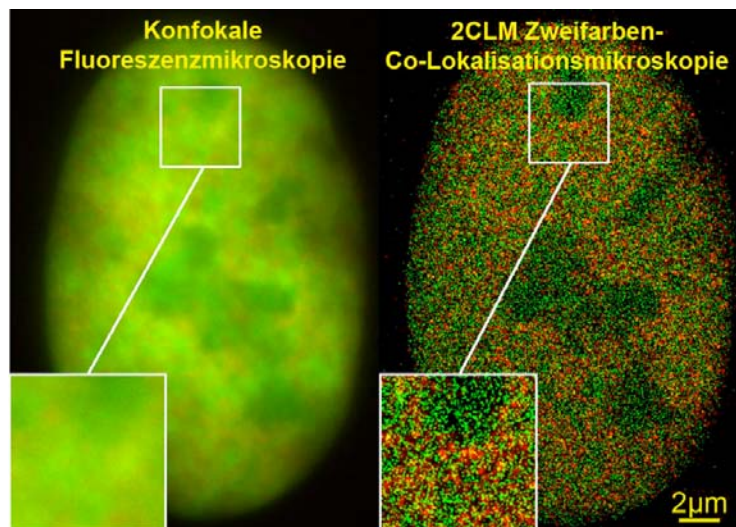
Co-Lokalisationsmikroskopie: Zwei Proteine – zwei Farben Wo 2CLM der FRET-Technik überlegen ist

120.000 einzelne Moleküle im Zellkern gezählt (220 μm^2)

- Mit Erweiterung der SPDM lassen sich zwei verschiedene Fluoreszenzmoleküle detektieren (2CLM, 2Colour Localisation Mikroskopy)
- Markierung beider Proteine mit gängigen Fluoreszenzmolekülen; Messung durch verschiedene Fluoreszenz-Emissions-Wellenlängen
- Verteilung und Anzahl der Proteine ermöglicht Aussagen über „Hot Spots“, Zentren erhöhter Proteinaktivität.

Vorteile zu vergleichbaren Nanoskopiemethoden:

- Blick in einen Knochenkrebszellkern: Mit normaler Fluoreszenzmikroskopie sind Strukturdetails nicht erkennbar (Abb. l.). Mit der Zweifarben-Co-Lokalisationsmikroskopie 2CLM (r.) lassen sich 70.000 Histonmoleküle (rot: RFP-H2A) und 50.000 Chromatinremodellings-Proteine (grün: GFP-Snf2H) in einem Gesichtsfeld von 470 μm^2 und einer „optischen Schichtdicke“ von 600 nm lokalisieren. Markiert wurde jeweils mit gewöhnlichen Fluoreszenzmarkern.
- 2CLM ist die einzige Methode in der optischen Nanoskopie, welche Co-Lokalisation im Weitfeld mit konventionellen Fluorochromen wie GFP ermöglicht.
- Mit der 2CLM sind durch die hohe Auflösung wesentlich genauere Aussagen über mögliche Proteininteraktionen möglich als mit der für diese Fragestellung bevorzugt eingesetzten FRET-(Fluorescence Resonance Energy Transfer) Technik. Dies ist von großer Bedeutung für die Untersuchung „Biomolekularer Maschinen“ in der Zelle, da dort der Abstand zweier Proteine oftmals erheblich größer ist als der mit FRET analysierbare Bereich (wenige nm).



Markt für das optische Nanoskop

- Enormer weltweiter Bedarf besteht in den **Instituten** für die molekularbiologische, medizinische und pharmazeutische Forschung.
Stand der Technik ist die Arbeit mit konfokalen Fluoreszenzmikroskopen, die jedoch keine molekulare Auflösung ermöglichen. Da nahezu jedes mittlere und größere Institut in diesen Bereichen über ein konfokales Fluoreszenzmikroskop verfügt (Kosten ca. 250 T€), wären diese Institute potenzielle Abnehmer eines optischen Nanoskops.
- **Pharmakonzerne:** Wirkstoffscreening. Zusätzlich kann durch das Zählen der Moleküle festgestellt werden, wie viele Wirkstoffmoleküle tatsächlich den Ort ihrer Bestimmung erreichen.
- **Krankenhäuser, kleinere Labors und Arztpraxen:** Diagnostik mit einfacherer Nanoskopversion
- **Automatisierungsanlagen für Hochdurchsatz-Screenings:** Hier ist das Nanoskop integrierbar. Untersuchungen können vorgenommen werden in Mikrotiterplatten im 96er oder 384er well-Format. Neben Zellkernen und bestimmten Zellarealen können ganze Zellen oder Zellverbände, wie z.B. Teile von durchsichtigen Zebrafischlarven untersucht werden.
- **Materialforschungseinrichtungen** für z.B. zur Schadensanalyse. Hierzu können Fluorochrome in Risse eingebracht und so Bruchstellen analysiert werden. Prinzipiell eignet sich die lichtoptische nanoskopische Untersuchung für jedes Material, auf welches man Fluorochrome aufbringen kann oder welches selbst fluoresziert.

Patentportfolio

In USA, Europa bzw. Deutschland sind alle Basispatente erteilt. Das Patentportfolio umfasst Mikroskopie, Fluoreszenzfarbstoffnutzung, Genommarkierung, Hochdurchsatzverfahren (HTS) und Computersimulation.

Preisvarianten und Markteinführung

- Prototypen können für Testzwecke an der Universität Heidelberg hergestellt werden.
- Materialpreis pro Gerät: 100 TE Euro zuzüglich der Kosten für die Kamera. Zum Vergleich: Das einzige auf dem Markt erhältliche optische Nanoskop, das weit weniger leistungsfähig ist als die hier beschriebene Erfindung, kostet über 1 Million Euro.
- Downscaling ist im Unterschied zu anderen Nanoskopen möglich: „Abgespeckte“ Formen für bestimmte Fragestellungen in Diagnoselabors oder Arztpraxen einsetzbar (ab 10 TE Materialwert).
- Mit einem geeigneten Lizenznehmer im Optikbereich ist eine Markteinführung des Nanoskops ab sofort möglich.

Ansprechpartner:

Prof. Dr. Dr. Christoph Cremer
Lehrstuhl für Angewandte Optik & Informationsverarbeitung,
Kirchhoff Institut für Physik & Biophysik der Genomstruktur, Institut für Pharmazie und Molekulare Biotechnologie,
sowie BioQuant-Zentrum,
Universität Heidelberg
Im Neuenheimer Feld 227/364/267
69120 Heidelberg
Tel. +49-6221 54-9252 (Administration Frau Dipl.-Phys. Bach: 54-9271)
Fax +49-6221 54-9112
E-Mail: cremer@kip.uni-heidelberg.de;
http://www.kip.uni-heidelberg.de/AG_Cremer/

Ansprechpartnerin für die Verwertung:

Dr. Andrea Nestl, Innovationsmanagerin
Technologie-Lizenz-Büro (TLB) der Baden-Württembergischen Hochschulen GmbH
Ettlinger Straße 25
76137 Karlsruhe
Tel. +49 721-79004-56
Fax +49 721-79004-79
E-Mail: anestl@tlb.de
<http://www.tlb.de>