

Lokalisationsmikroskopie

Lichtoptische Nanoskopie

CHRISTOPH CREMER

KIRCHHOFF-INSTITUT FÜR PHYSIK (KIP), UNIVERSITÄT HEIDELBERG

Neue Methoden im Bereich der Lichtmikroskopie überwinden die bislang für absolut gehaltene Grenze der Auflösung. Das hier vorgestellte lokalisationsmikroskopische Verfahren erlaubt es, die räumliche Verteilung einzelner fluoreszenzmarkierter Moleküle in ganzen Zellen mit einer effektiven optischen Auflösung im 10nm-Bereich zu vermessen.

Novel methods of visible light microscopy have overcome the limits of resolution hitherto thought to be insurmountable. The localization microscopy technique presented here allows it to measure the spatial distribution of single fluorescence labelled molecules in entire cells with an effective optical resolution in the 10 nm regime.

■ Für die moderne, molekularbiologisch ausgerichtete Zellbiologie waren lichtmikroskopische Analyseverfahren bis vor kurzem von geringerer Bedeutung. Dies lag an der auf wenige hundert Nanometer begrenzten optischen Auflösung (1 nm). Diese Grenze galt seit den Arbeiten von Ernst Abbe (1873) aufgrund der Wellennatur des Lichts als nicht überwindbar. Ernst Abbe postulierte, dass es

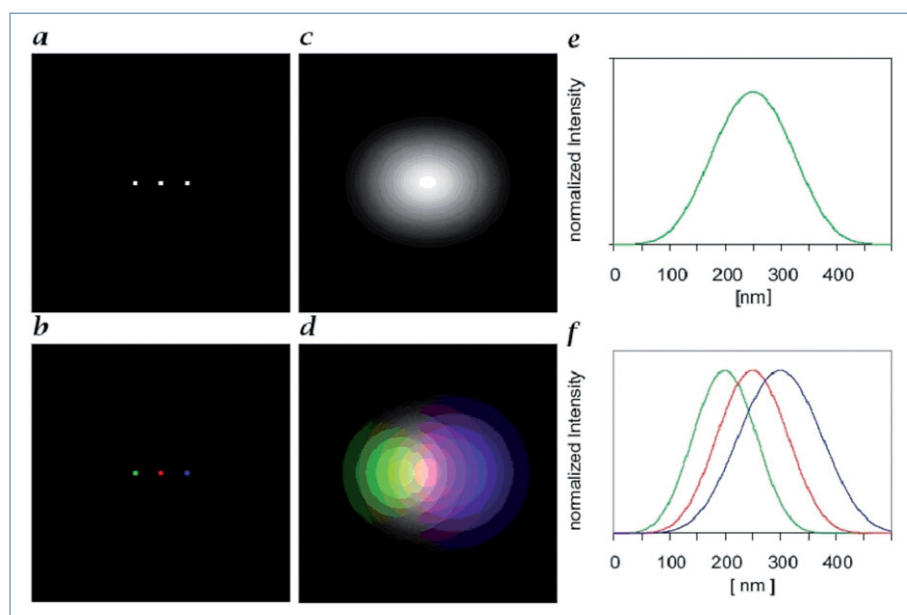
„eine bestimmte kleinste Distanz des Unterscheidbaren“ gibt, die „niemals über den der halben Wellenlänge des blauen Lichts um ein Nennenswerthes hinausgehen wird“^[1]. Viele der entscheidenden zellulären Nanostrukturen haben aber eine sehr viel geringere Größe als diese „konventionelle“ Auflösung von ca. 200 nm; daher konnten sie mithilfe des Lichts nicht mehr analysiert werden, z. B.

konnten zwei nebeneinanderliegende „punktförmige“ Objekte mit einem Abstand kleiner als 200 nm nicht mehr voneinander unterschieden werden. Solche Analysen wären jedoch von großer Bedeutung. Beispielsweise wird angenommen, dass die Nanostruktur von Chromatindomänen eine wichtige funktionelle Bedeutung für die Genregulation hat^[2].

In den letzten Jahren sind eine Reihe von Methoden entwickelt worden, die gerade dies möglich gemacht haben: die bislang für absolut gehaltene Grenze der lichtmikroskopischen Auflösung zu überwinden. Dem Heidelberger Physiker Prof. Stefan Hell (heute Direktor am Max-Planck-Institut für Biophysikalische Chemie in Göttingen) ist die erste Realisation eines Lasermikroskopieverfahrens zu verdanken, das eine lichtoptische Auflösung von einzelnen, einander benachbarten Makromolekülen desselben Typs in der Zelle ermöglicht^[3].

Ein weiterer, zu der von Hell entwickelten *Stimulated Emission Depletion* (STED)-Mikroskopie komplementärer Zugang zu einer lichtoptischen „Nanoskopie“ zellulärer Strukturen sind Verfahren der *Spectrally Assigned Localization Microscopy* (SALM). Grundlage dieser sich derzeit rasch in verschiedenen Varianten entwickelnden Technik ist die Spektrale Präzisionsdistanzmikroskopie (SPDM) oder Spektrale Lokalisationsmikroskopie. Ihre Anfänge reichen bis in die 1990er-Jahre zurück, als sie erstmals für fernfeldfluoreszenzmikroskopische Anwendungen konzipiert und in *Proof-of-Principle*-Experimenten realisiert wurde^[4-7]. Diese Methode ermöglicht es, zelluläre Nanostrukturen fluoreszenzoptisch zu analysieren und damit wesentliche Fragen der molekularen Biophysik, Zellbiologie und molekularmedizinischen Forschung mit wichtigen biologischen, systembiologischen und medizinischen Anwendungen zu bearbeiten.

Die **Abbildung 1** zeigt schematisch das SPDM-Prinzip: Als Beispiel stelle man sich drei „punktförmige“, einfarbig leuchtende Biomoleküle vor, die voneinander einen Abstand von nur 50 nm haben, also viermal kleiner als die konventionelle Grenze der optischen Auflösung von ca. 200 nm (**Abb. 1A**).



▲ **Abb. 1:** Prinzip der Spektralen Präzisionsdistanzmikroskopie (SPDM). **A, C, E**, drei im Abstand von jeweils 50 nm liegende Biomoleküle derselben spektralen Signatur. **B, D, F**, drei im Abstand von jeweils 50 nm liegende Biomoleküle mit verschiedenen spektralen Signaturen. Weitere Details im Text; aus [5].

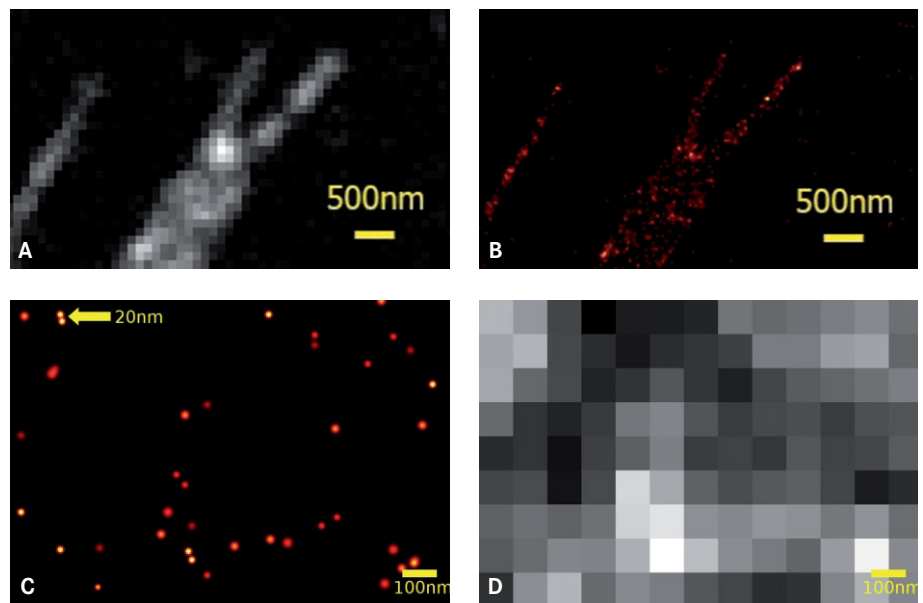
Von jedem dieser Moleküle wird aufgrund der Wellennatur des Lichts durch die Mikroskopoptik ein Beugungsscheibchen mit einem Durchmesser von etwa 200 nm erzeugt; diese überlagern sich (**Abb. 1C**). Ein Intensitätsquerschnitt durch die Mitte dieses „Beugungsbildes“ (**Abb. 1E**) gibt eine glockenförmige Helligkeitskurve, die fast identisch ist mit der durch ein einziges Molekül erzeugten. Es ist also nicht mehr möglich, festzustellen, wo die drei Moleküle im Bildfeld lokalisiert sind, und welchen Abstand sie voneinander haben. Hat jedes der eng benachbarten Moleküle jedoch eine andere spektrale Signatur, so wird eine Orts- und Abstandsbestimmung der einzelnen Moleküle möglich.

Unter einer spektralen Signatur kann jede Eigenschaft des von einem „punktförmigen“ Objekt/Molekül emittierten Lichts verstanden werden, die es erlaubt, den Ort des betreffenden Objekts/Moleküls mit optischen Mitteln festzustellen und von anderen Molekülen in der Nachbarschaft zu unterscheiden. Dies geschieht zum Beispiel mithilfe von verschiedenen Fluoreszenzemissionsspektren (Spektralfarben). In **Abbildung 1** wurde angenommen, dass jedes der zu trennenden eng benachbarten Moleküle eine andere „Farbe“ trägt (**Abb. 1B**), z. B. grün, rot und blau. Trennt man bei der Aufnahme durch geeignete optische Filter das grüne, das rote und das blaue Licht voneinander, so erhält man drei gegeneinander leicht versetzte Beugungsscheibchen: ein grünes, ein rotes, und ein blaues (**Abb. 1D**).

Das Maximum des roten Beugungsscheibchens gibt den Ort des rot leuchtenden Moleküls an; das Maximum des blauen Beugungsscheibchens gibt den Ort des blau leuchtenden Moleküls an (**Abb. 1F**) usw. Die Maxima (bzw. die äquivalenten Schwerpunkte der Fluoreszenzintensitätsverteilung) können mit hoher Präzision (Nanometerbereich) unabhängig voneinander bestimmt werden.

Da man die Beugungsscheibchen aufgrund ihrer Farben voneinander genau unterscheiden kann, ist es gleichgültig, wie fern oder wie nah voneinander andersfarbige Beugungsscheibchen liegen. Auf diese Weise kann man den Ort von Molekülen lichtmikroskopisch auch dann noch feststellen, wenn sie (wie in **Abbildung 1**) nur einen Abstand von 50 nm haben.

Mit dem hier beschriebenen SPDM-Verfahren können im Prinzip molekular aufgelöste Abbildungen von Nanostrukturen gewonnen werden, sofern die wesentliche Grundbedingung, die optische Isolation,



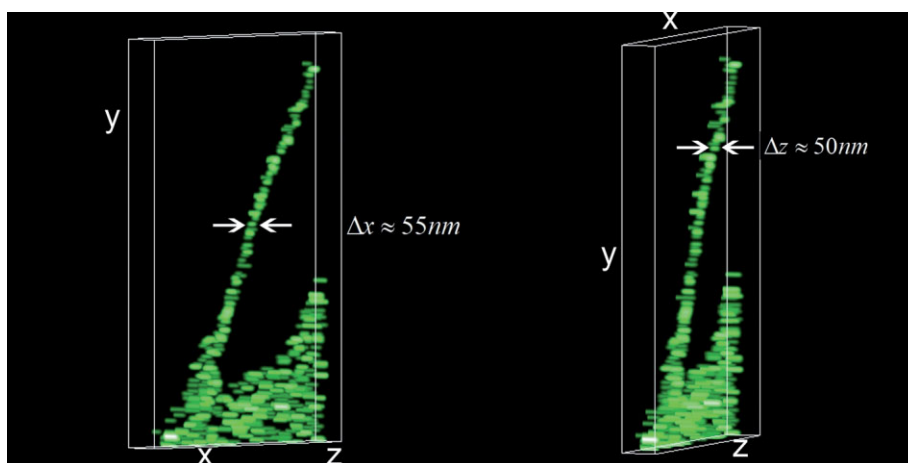
▲ **Abb. 2:** Lichtoptische Nanoskopie (SPDM) von menschlichen Krebszellen (Ausschnitte). Dargestellt sind fluoreszenzmarkierte individuelle Proteine desselben Typs in der Membran. **A**, bei „konventioneller“ Hochauflösung. **B**, bei molekularer Auflösung (SPDM)^[12]. **C**, ein sehr kleiner Ausschnitt fluoreszenzmarkierter Membranproteine eines anderen Typs (SPDM). **D**, derselbe Ausschnitt wie in **(C)** aber mit konventioneller Hochauflösung (M. Gunkel, Y. Weiland, P. Müller *et al.*/KIP).

erfüllt werden kann. Dies bedeutet, dass der Abstand zwischen zwei Molekülen derselben spektralen Signatur mindestens so groß sein muss wie der Durchmesser des Beugungsscheibchens, das heißt mindestens so groß wie die Halbwertsbreite (FWHM) der das optische System beschreibenden Punktabbildungsfunktion (PSF).

Allerdings ist die Anzahl der in einem Beugungsscheibchen befindlichen Biomoleküle, die aufgrund von Unterschieden im Fluoreszenzemissionsspektrum getrennt voneinander detektiert werden können, relativ gering (derzeit < 10). Außerdem stellt die hierbei erforderliche nanometerpräzise Kalibrierung von multiplen chromatischen Aberrationen hohe zusätzliche Anforderungen an die Messtechnik. Eine große Anzahl von spektralen Signaturen ist jedoch in vielen Fällen erforderlich, z. B. um große Proteincluster mit sehr vielen Molekülen innerhalb eines Durchmessers von 200 nm lateral (bzw. von 600 nm in Richtung der optischen Achse) auflösen zu können. Beispiele hierfür reichen von Proteinaggregaten auf der Zellmembran über Zytoskelettstrukturen zu Kernporenkomplexen, Reparaturkomplexen oder Genomnanostrukturen.

Über Unterschiede in Spektralfarben hinaus gibt es jedoch noch weitere Möglichkeiten, auch eng benachbarte Moleküle voneinander lichtoptisch zu unterscheiden. Bei-

spielsweise könnte man die Beugungsscheibchen von ganz eng zusammenliegenden, nur in einer einzigen Spektralfarbe leuchtenden Molekülen auch dann voneinander trennen, wenn diese Moleküle ihre Leuchtkraft zeitlich verändern würden, wie das makroskopisch bei Leuchttürmen geschieht. Auch dies ist eine spektrale Signatur^[4]. Diese Veränderung der von Fluorochromen emittierten Lichtemission kann auf verschiedene Weise geschehen. Man kann z. B. das von zwei nahe beieinander befindlichen Molekülen M1 und M2 ausgehende Lichtsignal S1 bzw. S2 (und damit ihre räumliche Position) auch dann getrennt voneinander detektieren, wenn diese Lichtsignale dieselbe spektrale Emission haben, sich jedoch in ihrer Blinkfrequenz unterscheiden (z. B. S1: 1 x pro 100 ms, S2: 3 x pro 100 ms). Die Lichtsignale können jedoch auch dann bereits voneinander getrennt registriert werden, wenn in einem ersten Zeitabschnitt Δt_1 M1 ein einziges Mal aufleuchtet, während M2 dunkel ist; und in dem darauffolgenden Zeitabschnitt Δt_2 M2 ein einziges Mal aufleuchtet, während M1 dunkel ist. Bei ausreichender Anzahl der detektierten Photonen (Größenordnung 10^3) genügt ein einziger „Lichtblitz“ bereits zur nanometergenauen Lokalisation des Moleküls. Welches Signal als erstes und welches als zweites detektiert wird, spielt dabei keine Rolle: Die unabhängig voneina-



▲ **Abb. 3:** 3D-Nanoskopie eines kleinen Ausschnitts aus einer menschlichen Krebszelle. Die erreichte 3D-Auflösung ist etwa 1/12 der hier zur Beleuchtung verwendeten Wellenlänge von ca. 500 nm. Die Aufnahmezeit für die ganze Zelle beträgt ca. 150 Sekunden. Aus [12].

nder aufgrund von S1 für M1 und aufgrund von S2 für M2 erhaltenen Positionen werden in dieselbe „Karte“ eingetragen. Ob diese Reihenfolge festgelegt oder zufällig ist, spielt ebenfalls keine Rolle: Unabhängige Messungen sehr vieler Positionen von M1, M2, M3 usw. ergeben das Bild, ähnlich wie bei den neoimpressionistischen Gemälden des Poin-tillismus. Da bei jedem aufgenommenen Bild die Grundbedingung der optischen Isolation erfüllt sein muss, müssen je nach Fragestellung bis zu mehrere tausend Einzelbilder aufgenommen und ausgewertet werden. Dies setzt geeignete Software für die automatische Bildaufnahme und -analyse voraus.

In den letzten beiden Jahren wurden erstmals in derselben Spektralfarbe leuchtende Moleküle eingesetzt (aber mit verschiedener spektraler Signatur aufgrund von Blinkeigenschaften); dabei wurden sie durch Licht in der für SPDM erforderlichen Weise mithilfe eines ersten Laserstrahls (Wellenlänge λ_1) „angeschaltet“ und mithilfe einer zweiten Laserwellenlänge λ_2 so lange zur Fluoreszenz angeregt, bis sie ausgebleicht wurden und damit („abgeschaltet“) werden konnten. Durch die Kombination vieler tausender Einzelaufnahmen derselben Zelle konnten mithilfe laseroptischer Präzisionsmessungen „Lokalisationsbilder“ mit ganz wesentlich verbesserter effektiver optischer Auflösung gewonnen werden^[8–10].

Die Anwendung dieser neuen SALM-Nanoskopieverfahren schien bis vor kurzem schwierig zu sein, weil allgemein angenommen wurde, dass nur ganz speziell hergestellte und mit großem Aufwand einsetzbare Moleküle in der Lage seien, durch Licht in geeigneter Weise an- und abgeschaltet wer-

den zu können. Es wurden z. B. spezifische photoaktivierbare Varianten aus der Gruppe der *Green Fluorescent Proteins* (GFPs) verwendet^[8, 9] oder schaltbare Paare von Cyanfarbstoffmolekülen. Außerdem erforderte das Photoschalten eines bestimmten Molekültyps meist verschiedene Laserfrequenzen.

Unsere Heidelberger KIP-Arbeitsgruppe konnte kürzlich zeigen, dass dieses Schalten unter bestimmten photophysikalischen Bedingungen auch für viele „ganz gewöhnliche“ Farbstoffmoleküle realisiert werden kann, von konventionellen GFPs bis zu weit verbreiteten Alexa- und Fluoreszeinfarbstoffen. Außerdem fanden wir, dass für das Photoschalten eines bestimmten Molekültyps eine einzige Laserwellenlänge geeigneter Intensität ausreichend ist. Die kombinierte Anwendung^[10, 11] dieser beiden Befunde erleichtert ganz wesentlich die Anwendbarkeit der SPDM-Methode auf zahlreiche Gebiete der biophysikalischen, zellbiologischen und medizinischen Forschung.

Derzeit wird in unserer Arbeitsgruppe am Heidelberger Kirchhoff-Institut mit SPDM eine lichtoptische Auflösung (2D) zellulärer Nanostrukturen von etwa 10 nm realisiert, bei detektierten Moleküldichten bis zu 130.000 pro Zellfläche oder ca. 40 aufgelösten Molekülen pro Beugungsscheibchenfläche. Die Bestauflösung entspricht etwa 1/50 der eingesetzten Laserwellenlänge, dem Durchmesser eines einzelnen größeren Proteins oder 1/1.000 Durchmesser eines Zellkerns. Ein Beispiel wird in **Abbildung 2** gezeigt. Gegenwärtig können wir derartige Bilder mit fast molekularer Auflösung von ganzen Zellen in etwa einer Minute gewinnen, was auch erste SPDM-Aufnahmen von lebenden Zellen

erlaubt hat. Kameras mit höherer Aufnahme-frequenz sollten eine Reduktion der für mehrere tausend Einzelbilder benötigten Gesamtaufnahmezeiten auf wenige Sekunden erlauben. Durch Kombination von SPDM mit einem weiteren in unserer Arbeitsgruppe entwickelten Nanoskopieverfahren, der *Spatially Modulated Illumination* (SMI)-Mikroskopie^[13], ist es kürzlich gelungen, eine 3D-Auflösung zellulärer Nanostrukturen von ca. 40–50 nm zu verwirklichen. **Abbildung 3** zeigt das 3D-Bild eines kleinen Teils einer menschlichen Krebszelle; bei ihr wurden Proteine auf der Membran so markiert, dass ihre Verteilung in dünnen Zellausläufern in allen drei Dimensionen vermessen werden konnte.

Die SPDM/STED-Methoden haben die lichtoptische Auflösung schon jetzt um ein Vielfaches verbessert im Vergleich zu allen bislang mit konventionellen Lichtmikroskopieverfahren erzielten Werten. Unsere theoretischen Überlegungen lassen erwarten, dass eine noch viel bessere Auflösung möglich ist: Die von der Physik her gegebene Grenze der lichtoptischen Auflösung sollte mit SPDM im Bereich von wenigen Atomdurchmessern liegen, also bei ca. 1/1.000 der eingesetzten Wellenlänge. Dies würde über die Biophysik und Biomedizin hinaus weitere interessante Anwendungen in den Material- und Geowissenschaften eröffnen.

Danksagung

Bei der Entwicklung der oben skizzierten laseroptischen Entwicklungen am Kirchhoff-Institut für Physik haben zahlreiche Diplomanden, Doktoranden, wissenschaftliche Mitarbeiter sowie weitere Kooperationspartner mitgewirkt, denen hier sehr herzlich gedankt sei. Die Forschungen wurden unterstützt vom Land Baden-Württemberg, der DFG, dem BMBF und der EU. ■

Literatur

- [1] Abbe, E. (1873): Beiträge zur Theorie des Mikroskops und ihrer mikroskopischen Wahrnehmung. *Arch. Mikrosk. Anat.* 9: 411–468.
- [2] Cremer, T., Cremer, C. (2001): Chromosome territories, nuclear architecture and gene regulation in mammalian cells. *Nat. Rev. Genet.* 2: 292–301.
- [3] Hell, S. W. (2007): Far-field optical nanoscopy. *Science* 316: 1153–1158.
- [4] Cremer, C., Hausmann, M., Bradl, J., Rinke, B.: German Patent Application No. 196.54.824.1/DE, submitted Dec 23, 1996, European Patent EP 1997953660, 08.04.1999, Japanese Patent JP 1998528237, 23.06.1999, United States Patent US 09331644, 25.08.1999.
- [5] Cremer, C., Edelmann, P., Bornfleth, H., Kreth, G., Münch, H., Luz, H., Hausmann, M., (1999): Principles of Spectral Precision Distance confocal microscopy for the analysis of molecular nuclear structure. In: Jähne, B., Haußecker, H., Geißler, P. (Hrsg.): *Handbook of Computer Vision and Applications*, Vol. 3. Academic Press San Diego, New York.

- [6] Heilemann, M., Herten, D. P., Heintzmann, R., Cremer, C., Müller, C., Tinnefeld, P., Weston, K. D., Wolfrum, J. (2002): High-resolution colocalization of single dye molecules by fluorescence lifetime imaging microscopy. *Anal. Chem.* 74: 3511–3517.
- [7] Esa, A., Edelmann, P., Trakthenbrot, L., Mamriglio, N., Rechaviv, G., Hausmann, M., Cremer, C. (2000): Three-dimensional spectral precision distance microscopy of chromatin nanostructures after triple-colour DNA labelling: a study of the BCR region on chromosome 22 and the Philadelphia chromosome. *J. Microsc.* 199: 96–105.
- [8] Betzig, E., Patterson, G. H., Sougrat, R., Lindwasser, O. W., Olenych, S., Bonifacino, J. S., Davidson, M. W., Lippincott-Schwartz, J., Hess, H. F. (2006): Imaging Intracellular Fluorescent Proteins at Nanometer Resolution. *Science* 313: 1642–1645.
- [9] Hess, S., Girira jun. T., Mason, M. (2006): Ultra-High Resolution Imaging by Fluorescence Photoactivation Localization Microscopy. *Biophys. J.* 91: 4258–4272.
- [10] Egner, A., Geisler, C., von Middendorff, C., Bock, H., Wenzel, D., Medda, R., Andresen, M., Stiel, A. C., Jakobs, S., Eggeling, C., Schönle, A., Hell, S. W. (2007): Fluorescence nanoscopy in whole cells by asynchronous localization of photoswitching emitters. *Biophys. J.* 93: 3285–3290.
- [11] Reymann, J., Baddeley, D., Gunkel, M., Lemmer, P., Stadter, W., Jegou, T., Rippe, K., Cremer, C., Birk, U. (2008): High-precision structural analysis of subnuclear complexes in fixed and live cells via spatially modulated illumination (SMI) microscopy. *Chromosome Res.* 16: 367–382.

- [12] Lemmer, P., Gunkel, M., Baddeley, D., Kaufmann, R., Urich, A., Weiland, Y., Reymann, J., Müller, P., Hausmann, M., Cremer, C. (2008): SPDM: Light microscopy with single-molecule resolution at the nanoscale. *Appl. Phys. B* 93: 1–12.
- [13] Baddeley, D., Batram, C., Weiland, Y., Cremer, C., Birk, U. J. (2007): Nanostructure analysis using spatially modulated illumination microscopy. *Nat. Protoc.* 2: 2640–2646.

Korrespondenzadresse:

Prof. Dr. Christoph Cremer
Kirchhoff-Institut für Physik
Universität Heidelberg
Im Neuenheimer Feld 227
D-69120 Heidelberg
Tel.: 06221-549271
Fax: 06221-549112
cremer@kip.uni-heidelberg.de
www.kip.uni-heidelberg.de

AUTOR



Christoph Cremer

1963–1964 Studium Generale (Philosophie, Theologie, Geschichte), Universitäten Freiburg und LMU München. 1963–1970 Studium der Physik, LMU München. 1976 Promotion zum Dr. rer. nat. in Biophysik/Genetik, Universität Freiburg. 1983 Dr. med. habil. für Humangenetik und Experimentelle Zytogenetik, Universität Freiburg i. Br. Seit 1983 Professor für Angewandte Optik und Informationsverarbeitung, Fakultät für Physik und Astronomie, Universität Heidelberg. 2004 Adjunct Professor an der University of Maine, Department of Physics. 2005 Leiter der Kooperationseinheit „Biophysik der Genomstruktur“, Institut für Pharmazie und Molekulare Biotechnologie, Universität Heidelberg.