

Der Ophthalmologe

Zeitschrift der Deutschen Ophthalmologischen Gesellschaft

**Elektronischer Sonderdruck für
S. Dithmar**

Ein Service von Springer Medizin

Ophthalmologe 2010 · 107:1037–1042 · DOI 10.1007/s00347-010-2183-y

© Springer-Verlag 2010

zur nichtkommerziellen Nutzung auf der
privaten Homepage und Institutssite des Autors

T. Ach · G. Best · M. Ruppenstein · R. Amberger · C. Cremer · S. Dithmar

Hochauflösende Fluoreszenzmikroskopie des retinalen Pigmentepithels mittels strukturierter Beleuchtung

Hochauflösende Fluoreszenz- mikroskopie des retinalen Pigmentepithels mittels strukturierter Beleuchtung

Veränderungen des retinalen Pigmentepithels (RPE) sind bei Erkrankungen wie der altersabhängigen Makuladegeneration (AMD) von entscheidender Bedeutung. Vor allem die intrazelluläre Anhäufung verschiedener autofluoreszierender Pigmente wie Melanin und Lipofuszin spielt dabei eine wichtige Rolle [2, 7, 18]. Zur Visualisierung von Autofluoreszenzphänomenen insbesondere im RPE sind verschiedene Techniken entwickelt worden. Moderne Scanning-Laser-Ophthalmoskope (SLO) mit veränderbaren Anregungswellenlängen haben sich dabei besonders in der In-vivo-Autofluoreszenzdarstellung etabliert und ermöglichen Aussagen zur Fluorophorverteilung mit einer lateralen Auflösung im Mikrometerbereich [5, 22]. Für das Verständnis von physiologischen und pathologischen Veränderungen sind weitergehende Einblicke auch auf subzellulärer Ebene wünschenswert. Höhere Auflösungen wurden in Ex-vivo-Versuchen bereits mit der konfokalen Zweiphotonenmikroskopie (Auflösung im Submikrometerbereich) erzielt [1]. Mit der Ex-vivo-Elektronenmikroskopie (Auflösung im Nanometerbereich) lässt sich zwar eine noch bessere Darstellung erreichen, diese nimmt primär aber keine Autofluoreszenzsignale auf und erfordert zudem eine aufwendige Probenvorbereitung [19]. Die Mikroskopie mittels strukturierter Beleuch-

tung ist eine Technik, die es erstmals ermöglicht, Autofluoreszenzen des retinalen Pigmentepithels lichtmikroskopisch mit einer Auflösung im Nanometerbereich darzustellen [10, 14, 15]. Wir stellen in dieser Arbeit zum ersten Mal die Ex-vivo-Anwendung dieser Technik an RPE-Zellen dar.

Material und Methoden

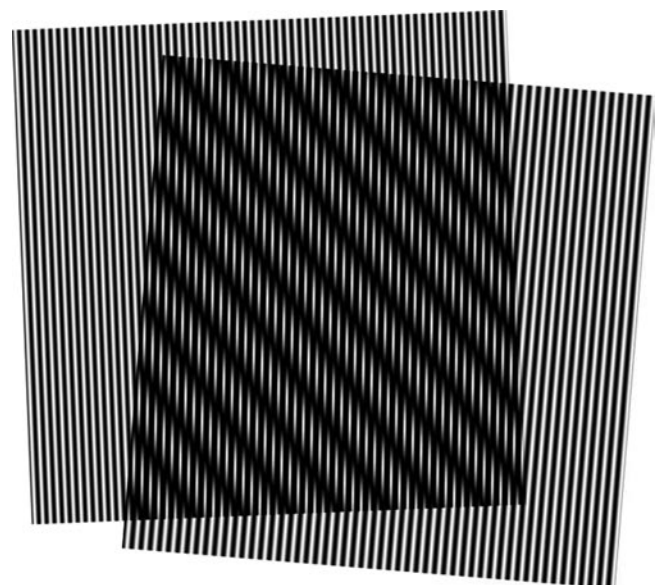
Der Bulbus eines 68-jährigen Patienten (vorangegangenes Perforationstrauma; makroskopisch keine erkennbaren Verletzungen oder Veränderungen von Retina und RPE außer einzelnen Drusen) wurde sofort nach Enukleation in 4%

Paraformaldehyd und „phosphat buffered saline“ (PBS, pH_{7,4}) fixiert, anschließend in Paraffin eingebettet. Für die mikroskopischen Untersuchungen wurden horizontale Schnitte (4 µm) angefertigt, in Xylolol entparaffiniert, schrittweise in Ethanol (3×5 min) rehydriert und mit SlowFade Antifade Eindeckmedium (Invitrogen, Carlsbad, USA) und Deckgläsern bedeckt. Zum Schutz vor Ausbleichung wurden die Proben in Dunkelheit gelagert.

Die schriftliche Einwilligung zur weiteren Verwendung für wissenschaftliche Zwecke wurde vor der Enukleation ein-

Teile dieser Arbeit wurden auf dem 107. DOG-Kongress präsentiert.

Abb. 1 ► Moiré-Effekt. Werden zwei Gitter überlagert, entsteht durch die Überlagerung ein gröberes Gitter, dessen Struktur aufgezeichnet werden kann. Solange die Struktur des groben und eines der feinen Gitter bekannt ist, kann das Aussehen des anderen feinen Gitters berechnet werden



Strukturierte Beleuchtung

Die Auflösung eines Mikroskops ist durch die Wellenlänge des detektierten Lichts begrenzt, hervorgerufen durch die Endlichkeit einer maximal übertragbaren Frequenz eines Objekts im Raum (Grenzfrequenz). Frequenzen oberhalb dieser Grenze können prinzipiell nicht von einem Objektiv übertragen werden, was damit einen Tiefpassfilter für Bildfrequenzen darstellt und höhere Frequenzen abschneidet. In der Fluoreszenzmikroskopie ist es möglich, durch Verwenden einer inhomogenen Beleuchtung das Objekt so zu modulieren, dass die Bildinformationen in den detektierbaren Raum verschoben und zuvor nicht darstellbare Frequenzen in den übertragbaren Bereich gebracht werden. Der resultierende Effekt lässt sich anschaulich mit dem sog. Moiré-Effekt erklären (■ **Abb. 1**): Bei der Überlagerung zweier feiner, unterschiedlich angeordneter Gitter kann ein größeres Gitter erscheinen, welches auch mit geringer Auflösung darstellbar ist. Solange die Eigenschaften (z. B. Beleuchtungsintensität) eines der feinen Gitter bekannt sind und das resultierende (Moiré-)Gitter zur Verfügung steht, kann das andere feine Gitter (und damit z. B. die Fluorochromverteilung) rekonstruiert werden.

Damit lässt sich die laterale Auflösung im Vergleich zu herkömmlichen Weitfeldmikroskopietechniken verdoppeln [10]. Außerdem ist es mit einer strukturierten Beleuchtung möglich, Signale außerhalb des Fokus zu entfernen. Es resultiert ein optischer Schnitt, ähnlich wie bei einem konfokalen Mikroskop. Die Auflösungsverbesserung bei der konfokalen Mikroskopie kann aber nur bei einer annähernd geschlossenen Blende erreicht werden, hält damit aber viel Licht aus dem Fokus zurück. Gerade bei schwach fluoreszierenden biologischen Proben (insbesondere bei der Detektion von Autofluoreszenzen) muss die Blende deshalb weit geöffnet werden, wodurch nur eine marginale Auflösungsverbesserung erreicht werden kann und sich der bildverbessernde Effekt der Konfokalmikroskopie hauptsächlich auf das Bilden optischer Schnitte reduziert.

Um mit der strukturierten Beleuchtung die laterale Auflösung auf Objekt-

ebene zu erhöhen, wurden 10 Aufnahmen bei leicht unterschiedlichen Positionen des Beleuchtungsgitters angefertigt. Für eine homogene Auflösung wurde das Gitter zusätzlich um 60° und 120° rotiert, und es wurden an diesen Positionen ebenfalls jeweils 10 Aufnahmen angefertigt. Damit wurden für jede Anregungswellenlänge 30 Aufnahmen erstellt. Als Anregungswellenlängen wurden 488, 568 und 647 nm gewählt.

Das emittierte Autofluoreszenzsignal wurde mit einer CCD-Kamera (sensicam qe, PCO, Kelheim) aufgenommen; zur Auskopplung des emittierten Fluoreszenzsignals wurde ein Detektionssperrfilter (Z488/568/647 M V2, AHF Analysetechnik, Tübingen) verwendet. Die erzeugten Rohdaten konnten mit der von Heintzmann et al. entwickelten Software rekonstruiert werden [13, 14, 15].

Um spektrale Variationen in der Fluoreszenzantwort besser sichtbar zu machen, wurden die Intensitäten der einzelnen Kanäle auf einen gemeinsamen Maximalwert normiert.

Die gewonnenen Autofluoreszenzsignale bei den verschiedenen Anregungswellenlängen konnten außerdem farblich kodiert werden (488 nm = blau; 568 nm = grün; 647 nm = rot). Durch Überlagerung der Aufnahmen ließen sich damit softwareunterstützt (Matlab R2009a, The Mathworks Inc.) Autofluoreszenzmuster innerhalb einzelner RPE-Zellen bzw. RPE-Zellgranula bestimmen.

Ergebnisse

Die Aufnahmen der Epifluoreszenzmikroskopie bei 404 nm zeigen autofluoreszierende Strukturen im Bereich des RPE und angrenzendem Gewebe. Reste der Photorezeptoraußensegmente wie auch Gewebe unterhalb der Bruch-Membran zeigen ein schwaches Autofluoreszenzsignal. Die Bruch-Membran stellt sich als deutlich fluoreszierendes Band dar. Innerhalb der RPE-Zellen geben meist runde Granula die stärksten Fluoreszenzsignale (■ **Abb. 2**). Zwischen RPE-Zellen und Bruch-Membran zeigen Drusen ebenfalls ein leichtes Autofluoreszenzsignal.

Durch die strukturierte Beleuchtung lassen sich die fluoreszierenden Strukturen weiter auflösen (■ **Abb. 3** exempla-

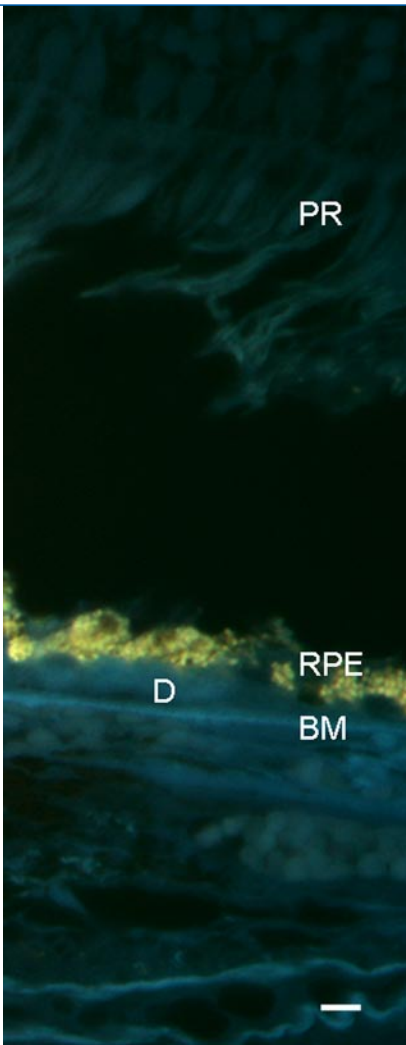


Abb. 2 ▲ Epifluoreszenzmikroskopie (404 nm) im Bereich der Makula. Stärkste Autofluoreszenzsignale zeigen rundliche Granula innerhalb von RPE Zellen. Photorezeptoraußensegmente (PR), Bruch-Membran (BM), schwach fluoreszierende Druse (D). Artefaktische Abhebung der Netzhaut durch die Präparation. (Vergr. 40:1, Balken 10 µm)

geholt. Alle Prozeduren in dieser Arbeit folgen die Richtlinien der Deklaration von Helsinki.

Vor der Anwendung der strukturierten Beleuchtung wurden autofluoreszierende Strukturen des RPE im Bereich der Makula mittels Epifluoreszenzmikroskopie detektiert (LEICA DMRB; Solms, Anregungswellenlänge 404 nm; Vergrößerung 40:1) und aufgenommen (PHASE, Lübeck, QuantiCam). Diese dienten als Orientierung für die anschließenden Aufnahmen mit strukturierter Beleuchtung.

T. Ach · G. Best · M. Ruppenstein · R. Amberger · C. Cremer · S. Dithmar

Hochauflösende Fluoreszenzmikroskopie des retinalen Pigmentepithels mittels strukturierter Beleuchtung

Zusammenfassung

Hintergrund. Die Akkumulation autofluoreszierender Substanzen innerhalb des retinalen Pigmentepithels (RPE) ist für die Pathogenese beispielsweise der altersabhängigen Makuladegeneration (AMD) relevant. Bisherige fluoreszenzmikroskopische Techniken erlauben die In-vivo-Darstellung von Fluorophoren des Augenhintergrunds im Mikrometerbereich, Ex-vivo-Untersuchungen erreichen derzeit Auflösungen bis 200 nm. Wir stellen hier erstmals die Ex-vivo-Anwendung der strukturierter Beleuchtung als eine spezielle Form der hochauflösenden Fluoreszenzmikroskopie an Zellen des RPE dar.

Methoden. Vom Bulbus eines 68-jährigen Patienten wurden histologische Schnitte hergestellt. Mit Hilfe der Epifluoreszenzmikroskopie konnten fluoreszierende RPE-Zellen markiert werden. Die strukturierte Beleuchtung benutzt eine inhomogene Beleuchtung,

um primär nicht auflösbare Strukturen, in Analogie zum Moiré-Effekt, auflösbar zu machen. Damit wurden von RPE-Zellen bei verschiedenen Anregungswellenlängen (488, 568 und 647 nm) Aufnahmen angefertigt und mittels spezieller Software rekonstruiert. Die verschiedenen Anregungsmuster der fluoreszierenden Granula in den RPE Zellen wurden zusätzlich farblich kodiert und ausgewertet.

Ergebnisse. Mittels strukturierter Beleuchtung können Autofluoreszenzsignale des RPE detektiert werden. Autofluoreszierende Strukturen lassen sich lateral mit einer Auflösung von 110 nm (488 nm Anregung) darstellen. Durch die Verwendung verschiedener Wellenlängen können nacheinander unterschiedliche Pigmente zur Autofluoreszenz angeregt werden. Lipofuszin zeigt v. a. bei 488 nm und 568 nm Signale. Die verbesserte

Auflösung ermöglicht außerdem die Darstellung intragranulärer Ansammlungen von Fluorophoren und weist auf eine inhomogene Zusammensetzung hin.

Schlussfolgerung. Die Anwendung der strukturierter Beleuchtung ermöglicht die Darstellung fluoreszierender Strukturen in RPE-Zellen ex vivo in einer bisher nicht möglichen Auflösung von 110 nm. Intrazelluläre Fluoreszenzmuster in einzelnen Zellkompartimenten lassen sich visualisieren und durch Verwendung verschiedener Anregungswellenlängen weiter auftrennen.

Schlüsselwörter

Lipofuszin · Melanin · Strukturierte Beleuchtung · Autofluoreszenz · Retinales Pigmentepithel

High-resolution fluorescence microscopy of retinal pigment epithelium using structured illumination

Abstract

Background. The accumulation of autofluorescent bodies in retinal pigment epithelium (RPE) cells has an impact on the pathogenesis of retinal diseases, including age-related macular degeneration. While current in vivo fluorescence microscopy allows a lateral resolution of fluorophores in a micrometer range, with ex vivo microscopy a lateral resolution down to 200 nm is possible. For the first time, we used structured illumination microscopy for ex vivo high-resolution fluorescence microscopy of RPE cells.

Methods. Histological sections were prepared from a 68-year-old patient. With epifluorescence microscopy, fluorescent RPE cells were detectable. Structured illumination us-

es inhomogeneous illumination for resolution of previously nonresolvable structures, similar to the Moiré effect. Images were taken from RPE cells at different excitation wavelengths (488, 568, and 647 nm) and were reconstructed with special software. The different excitation patterns of the fluorescent granules in the RPE cells were colour-coded and analysed.

Results. With structured illumination microscopy, autofluorescence signals of RPE cells were detectable, and a lateral resolution of 110 nm could be achieved. Using varying wavelengths, different pigments were excitable. Lipofuscin gave the highest signals, at 488 and 568 nm. The improved resolution

showed inhomogeneous intragranular fluorophore patterns.

Conclusion. Structured illumination microscopy enabled us to generate images of fluorescent structures in RPE cells ex vivo with a lateral resolution of 110 nm. With the use of different excitation wavelengths, intracellular fluorescence patterns in single cell compartments are visible and allow further differentiation.

Keywords

Lipofuscin · Melanin · Structured illumination · Autofluorescence · Retinal pigment epithelium

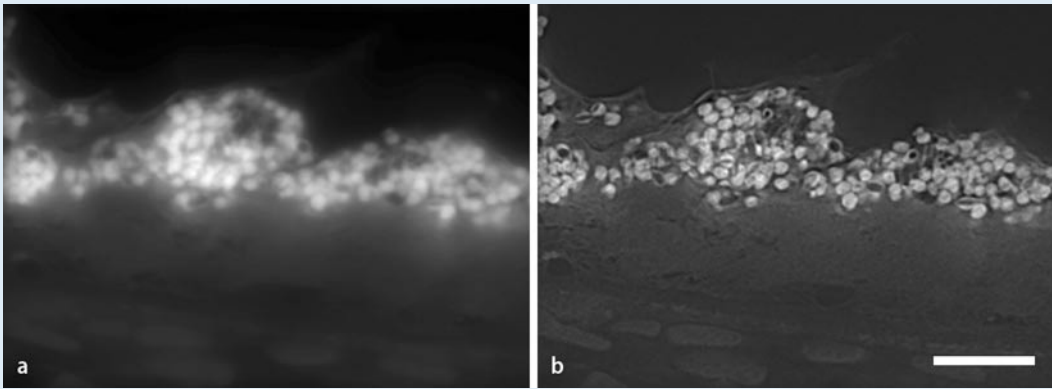


Abb. 3 ▲ Auflösung ohne (a) und mit (b) strukturierter Beleuchtung (Exzitation 488 nm). Dargestellt sind die beiden RPE-Zellen über der Druse aus **Abb. 2**. **a** Auflösung eines herkömmlichen Standardfluoreszenzmikroskops. Einzelne Granula lassen sich gegeneinander abgrenzen, Aussagen zu intragranulärer Fluorophorverteilung sind nicht möglich. **b** Auflösung mit strukturierter Beleuchtung (laterale Auflösung bis 110 nm). Einzelne Granula lassen sich deutlicher gegeneinander abgrenzen, Autofluoreszenzmuster einzelner Granula sind darstellbar. (Balken 10 µm)

risch bei 488 nm). In **Abb. 3a** ist eine Aufnahme ohne strukturierte Beleuchtung mit einer herkömmlichen Fluoreszenzmikroskopie gezeigt. In **Abb. 3b** ist die verbesserte Auflösung mit strukturierter Beleuchtung zu sehen. Die einzelnen Granula lassen sich deutlicher gegeneinander abgrenzen, Autofluoreszenzmuster in einzelnen Granula sind darstellbar. Eine laterale Auflösung nach Abbe bis etwa 110 nm kann mit Hilfe der strukturierten Beleuchtung erreicht werden und verdoppelt damit die bisher mit der Fluoreszenzmikroskopie erzielbare Auflösungsfähigkeit.

Die verschiedenen Anregungswellenlängen erlauben außerdem Aussagen zu intrazellulären Verteilungsmustern von autofluoreszierenden Pigmenten. Lipofuszin zeigt bei allen Anregungswellenlängen ein Autofluoreszenzsignal, jedoch mit deutlich abnehmender Intensität zu höheren Wellenlängen hin. Melanin zeigt bei allen Wellenlängen ein im Vergleich zu Lipofuszin deutlich abgeschwächtes Signal. Mit der strukturierten Beleuchtung lassen sich Lipofuszin und Melanin sowohl getrennt als auch kombiniert (Melanolipofuszin) in einzelnen Granula darstellen. Besonders die feinen Lipofuszinanlagerungen um Melaninpigmente können damit klar abgebildet werden (**Abb. 4**).

Die Verwendung unterschiedlicher Anregungswellenlängen ermöglicht zusätzliche Aussagen zu Verteilungsmustern von Fluorophoren in den einzelnen

Granula. Durch eine farbliche Kodierung der Fluoreszenzsignale, die bei den verwendeten Anregungswellenlängen erzielt werden, ergeben sich nach Rekonstruktion Überlagerungsbilder (**Abb. 5**). Die Anregung mit 647 nm ist in den Bildern als roter Farbkanal dargestellt, 568 nm als grüner und 488 nm als blauer Kanal.

In den normierten Bildern zeigen sich die lipofuszingefüllten Granula überwiegend in einer blau-grünen Färbung, es stellen sich aber auch gelbe und rote Einlagerungen dar, was einer verstärkten Anregung von Fluorophoren bei höheren Wellenlängen entspricht.

Melaninpigmente erscheinen in dieser Abbildung als rot-braune Ablagerungen und liegen teils isoliert, teils auch von einem feinen blau-fluoreszierenden Band umgeben, vor (Melanolipofuszin). Beachtenswert ist die intragranuläre Darstellung einzelner Ansammlungen von Fluorophoren, die durch die hohe Auflösung möglich wird.

Diskussion

Einlagerungen von autofluoreszierenden Pigmenten in den Zellen des retinalen Pigmentepithels kommen physiologisch vor, können aber auch bei verschiedenen retinalen Erkrankungen wie der AMD eine wichtige Rolle spielen [4, 6, 17]. Da diese Einlagerungen fluoreszenzmikroskopisch detektiert werden können, haben Autofluoreszenzaufnahmen des Fundus einen entscheidenden Platz in der Dia-

gnostik und Verlaufskontrolle von AMD und anderen retinalen Erkrankungen gefunden [5, 21].

Mit der üblicherweise verwendeten SLO lassen sich auf einfache Weise Aufnahmen anfertigen, die Aussagen zur Fluorophorverteilung des Fundus zulassen. Laterale Auflösungen im Mikrometerbereich sind dabei möglich. Sowohl die In-vivo-SLO als auch modernste Ex-vivo-Fluoreszenzmikroskopieaufnahmen erlauben derzeit aber keine weitere Aussage bezüglich der Verteilung von fluoreszierenden Strukturen in einzelnen intrazellulären Granula. Für das weitere Verständnis zu physiologischen und pathologischen Vorgängen während der Anreicherung fluoreszierender Moleküle sind deshalb Aufnahmetechniken mit verbesserter Auflösungsfähigkeit wünschenswert. Eine Weiterentwicklung stellt die konfokale Zweiphotonenmikroskopie dar, mit der Ex-vivo-Aufnahmen mit einer lateralen Auflösung im Submikrometerbereich möglich sind [1, 11]. Noch bessere Auflösungen konnten bisher nur mit der Elektronenmikroskopie erreicht werden, die aber ohne zusätzliche Markierung und aufwendige Probenaufbereitung keine Aussage zu Fluoreszenzen zulässt [8, 19].

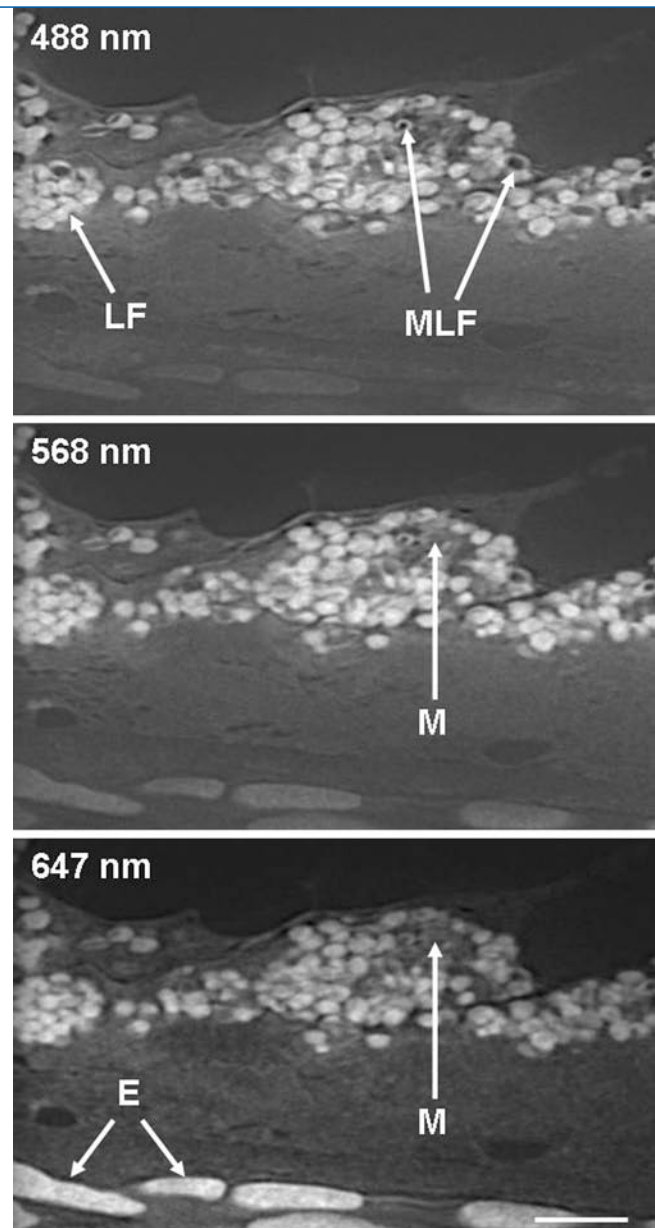
Wir stellen in dieser Arbeit erstmals die Anwendung einer strukturierter Beleuchtung in der Weitfeldmikroskopie von RPE-Zellen vor. Mit strukturierter Beleuchtung lassen sich einzelne Granula in den RPE-Zellen bis zu einer lateralen Auflösung von 110 nm darstellen. Damit er-

höht sich die laterale Auflösungsfähigkeit im Vergleich zu herkömmlichen konfokalen Weitfeldmikroskopen um den Faktor 2 [10] und eröffnet neue Einblicke in die Fluoreszenzeigenschaften intrazellulärer Granula mit bisher nicht möglicher Präzision.

Die verwendeten Anregungswellenlängen dieser Arbeit befinden sich nahe am Anregungsmaximum von Lipofuszin (480 nm; [20]). Bei der verwendeten Wellenlänge von 648 nm kann außerdem bereits Melanin (633 nm) angeregt werden [9]. Hauptsächlich Lipofuszin zeigt in den Granula bei 488 nm und 568 nm eine deutliche Anregung, diese lässt aber zu 647 nm hin wieder nach. Demgegenüber hat Melanin bei 488 nm eine kaum nachweisbare Autofluoreszenz, die auch mit zunehmender Anregungswellenlänge nicht sonderlich steigt. Besonders deutlich lässt sich dies an Melanolipofuszin zeigen. Die hyperfluoreszenten Lipofuszingranula zeigen ein deutliches Signal bei 488 nm und 568 nm, was zu höheren Wellenlänge hin abnimmt. Das zentral in diesen Granula liegende Melaninpigment weist bei 647 nm nur ein leicht verstärktes Signal auf. Gibbs et al. haben gezeigt, dass sich isoliertes Melanin bereits bei 633 nm anregen lässt. In anderen Arbeiten konnte gezeigt werden, dass gebundenes Melanin – wie es auch in der hier verwendeten Probe vorliegt – und unterschiedliche Probenzubereitungen zu Änderungen der Autofluoreszenzeigenschaften des Melanins führen können [3, 9, 16]. Des Weiteren kann die noch deutlich vorhandene Anregung von Lipofuszin bei 647 nm in unseren Untersuchungen ein schwächeres Autofluoreszenzsignal von Melanin verschleiern.

Die verbesserte Auflösung und die farbliche Markierung der Fluoreszenzsignale bei unterschiedlichen Wellenlängen erlauben zusätzlich Aussagen zu intragranulären Anregungseigenschaften von Fluorophoren. So lassen sich Anhäufungen von unterschiedlich anregbaren Fluorophoren nachweisen. Hier überwiegt die Anregung des Lipofusins bei 488 nm und 568 nm, sichtbar an blauen und grünen intragranulären Fluorophoransammlungen. Daneben gibt es aber auch Granula mit einer Verschiebung der Fluorophoranregung in den Bereich höherer Wel-

Abb. 4 ▶ Strukturierte Beleuchtung von intrazellulären RPE-Granula bei Anregungswellenlängen von 488, 568 und 647 nm. Lipofuszingranula (LF) zeigen bei 488 und 568 nm ein starkes Autofluoreszenzsignal, lassen bei 647 nm aber in der Anregungsfähigkeit wieder nach. Melanin (M) zeigt, im Vergleich zu Lipofuszin, ein deutlich schwächeres Signal. Feine Lipofuszingranula um Melaninpigmente lassen sich gut erkennen (MLF Melanolipofuszin; E Erythrocyten, verformt durch die Enge der Kapillare; Balken 10 µm)



lenlängen (gelb, rosa). Elektronenmikroskopisch bestehen Lipofuszingranula aus etwa 50 nm kleinen Untereinheiten, die möglicherweise unterschiedliche Fluorophore enthalten [12]. Unsere Aufnahmen mit strukturierter Beleuchtung können diese feinen Untereinheiten nicht einzeln auflösen. Die in nahezu allen Granula nachweisbaren inhomogenen Fluorophoransammlungen könnten aber einen groben lichtmikroskopischen Nachweis dieser Untereinheiten bedeuten.

Mit der strukturierten Beleuchtung steht nun eine Methode zur Verfügung, die durch eine verbesserte laterale Auflösung weitere Einblicke in die Stoffwechselprozesse der autofluoreszierenden Pig-

mente auch auf subzellulärer Ebene erlaubt. Vorteilhaft für die Ex-vivo-Untersuchungen ist die einfache Probenzubereitung. Einschränkend muss angemerkt werden, dass sich durch die Probenzubereitung Änderungen in den Autofluoreszenzeigenschaften der RPE-Pigmente ergeben können. Ferner kann die Bestrahlung der Proben mit Licht zu ungewünschten Bleicheffekten führen. Bei den durchgeführten Untersuchungen wurden die Proben deshalb vor, zwischen und nach den Messungen von Licht ferngehalten. Die halbautomatische Durchführung der Messungen ermöglicht außerdem äußerst kurze Belichtungszeiten (etwa 50 ms pro Messung in einer Gitterposition).

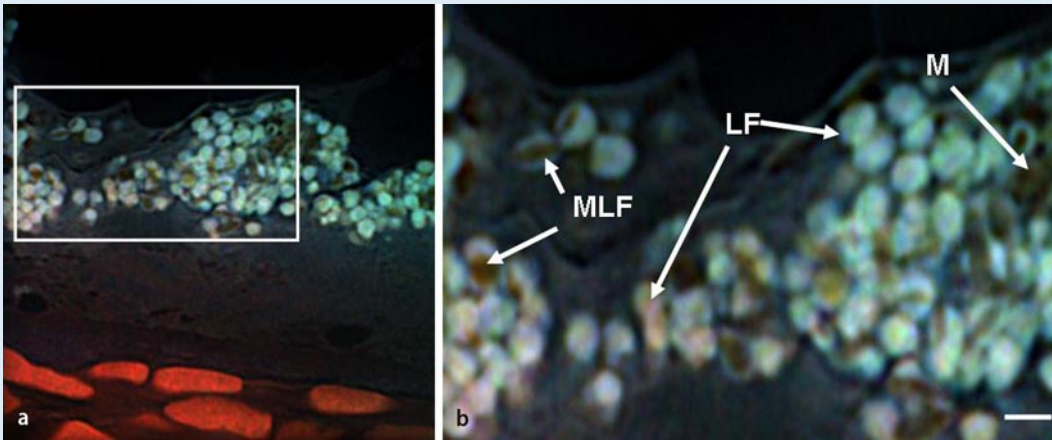


Abb. 5 ▲ Strukturierte Beleuchtung mit Überlagerung wellenlängenabhängiger Anregungsintensitäten. Farbliche Kodierung der Anregung bei unterschiedlichen Wellenlängen (488 nm = blau; 568 nm = grün; 647 nm = rot). **a** Rekonstruktion der in **Abb. 4** gezeigten Signale bei den verwendeten Wellenlängen. **b** Das in **a** eingezeichnete Rechteck in vergrößerter Darstellung. Unterschiedlich anregbare Strukturen lassen sich zwischen einzelnen Granula und auch innerhalb einzelner Granula visualisieren. Zum Großteil zeigt sich hier eine Anregung bei 488 nm und 568 nm (Blau-Grün-Bereich). Melaninpigment (*M*) stellt sich als dunkelrot-braune Struktur dar (*LF* Lipofuscin, *MLF* Melanolipofuscin, Balken 1 µm)

Fazit für die Praxis

Wir stellen in dieser Arbeit die Anwendung der strukturierten Beleuchtung zur Darstellung von Autofluoreszenzphänomenen des retinalen Pigmentepithels vor. Mit dieser Technik können autofluoreszierende Strukturen mit einer bisher nicht erreichten lateralen Auflösung von bis zu 110 nm dargestellt werden. Diese Technik erlaubt die Visualisierung von intrazellulären Fluorophoren innerhalb einzelner Zellkompartimente wie den Lysosomen. Die Verwendung unterschiedlicher Anregungswellenlängen ermöglicht außerdem eine weitere Aufgliederung der Fluorophore und somit bessere Einblicke beispielsweise in den für die Pathogenese der AMD bedeutsamen Lipofuscinstoffwechsel.

Korrespondenzadresse

Prof. Dr. S. Dithmar
 Universitäts-Augenklinik Heidelberg
 Im Neuenheimer Feld 400, 69120 Heidelberg
 stefan.dithmar@med.uni-heidelberg.de

Danksagung. Die Autoren danken Herrn Dr. Rainer Heintzmann (Randall Division of Cell and Molecular Biophysics, King's College London, UK) für die Bereitstellung der zur Rekonstruktion verwendeten Software.

Interessenkonflikt. Der korrespondierende Autor gibt an, dass kein Interessenkonflikt besteht.

Literatur

1. Bindowald-Wittich A, Han M, Schmitz-Valckenberg S et al (2006) Two-photon-excited fluorescence imaging of human RPE cells with a femtosecond Ti:Sapphire laser. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 47:4553–4557
2. Boulton M, Dayhaw-Barker P (2001) The role of the retinal pigment epithelium: topographical variation and ageing changes. *Eye (Lond)* 15:384–389
3. Boulton M, Docchio F, Dayhaw-Barker P et al (1990) Age-related changes in the morphology, absorption and fluorescence of melanosomes and lipofuscin granules of the retinal pigment epithelium. *Vision Res* 30:1291–1303
4. Delori FC, Dorey CK, Staurengi G et al (1995) In vivo fluorescence of the ocular fundus exhibits retinal pigment epithelium lipofuscin characteristics. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 36:718–729
5. Delori FC, Fleckner MR, Goger DG et al (2000) Autofluorescence distribution associated with drusen in age-related macular degeneration. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 41:496–504
6. Docchio F, Boulton M, Cubeddu R et al (1991) Age-related changes in the fluorescence of melanin and lipofuscin granules of the retinal pigment epithelium: a time-resolved fluorescence spectroscopy study. *Photochem Photobiol* 54:247–253
7. Eldred GE (1995) Lipofuscin fluorophore inhibits lysosomal protein degradation and may cause early stages of macular degeneration. *Gerontology* 41(Suppl 2):15–28
8. Feeney-Burns L (1980) The pigments of the retinal pigment epithelium. *Curr Top Eye Res* 2:119–178
9. Gibbs D, Cideciyan AV, Jacobson SG, Williams DS (2009) Retinal pigment epithelium defects in humans and mice with mutations in MYO7A: imaging melanosome-specific autofluorescence. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 50:4386–4393
10. Gustafsson MG (2000) Surpassing the lateral resolution limit by a factor of two using structured illumination microscopy. *J Microsc* 198:82–87
11. Han M, Giese G, Schmitz-Valckenberg S et al (2007) Age-related structural abnormalities in the human retina-choroid complex revealed by two-photon excited autofluorescence imaging. *J Biomed Opt* 12:024012
12. Haralampus-Grynawski NM, Lamb LE, Clancy CM et al (2003) Spectroscopic and morphological studies of human retinal lipofuscin granules. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100:3179–3184
13. Heintzmann R, Cremer C (1999) Laterally modulated excitation microscopy: improvement of resolution by using a diffraction grating. *Proc SPIE* 185–185
14. Heintzmann R, Benedetti PA (2006) High-resolution image reconstruction in fluorescence microscopy with patterned excitation. *Appl Opt* 45:5037–5045
15. Heintzmann R, Ficz G (2006) Breaking the resolution limit in light microscopy. *Brief Funct Genomic Proteomic* 5:289–301
16. Kayatz P, Thumann G, Luther TT et al (2001) Oxidation causes melanin fluorescence. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 42:241–246
17. Kellner S, Kellner U, Weber BH et al (2009) Lipofuscin- and melanin-related fundus autofluorescence in patients with ABCA4-associated retinal dystrophies. *Am J Ophthalmol* 147:895–902, 902
18. Schraermeyer U, Heimann K (1999) Current understanding on the role of retinal pigment epithelium and its pigmentation. *Pigment Cell Res* 12:219–236
19. Schraermeyer U, Peters S, Thumann G et al (1999) Melanin granules of retinal pigment epithelium are connected with the lysosomal degradation pathway. *Exp Eye Res* 68:237–245
20. Sparrow JR, Nakanishi K, Parish CA (2000) The lipofuscin fluorophore A2E mediates blue light-induced damage to retinal pigmented epithelial cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 41:1981–1989
21. Rueckmann A von, Fitzke FW, Bird AC (1997) Fundus autofluorescence in age-related macular disease imaged with a laser scanning ophthalmoscope. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 38:478–486
22. Rueckmann A von, Schmidt KG, Fitzke FW et al (1998) Dynamics of accumulation and degradation of lipofuscin in retinal pigment epithelium in senile macular degeneration. *Klin Monbl Augenheilkd* 213:32–37