

Aus dem Bereich Physiologie
Theoretische Medizin und Biowissenschaften
der Medizinischen Fakultät
der Universität des Saarlandes, Homburg/Saar

**Etablierung von Photoaktivierter Lokalisations- und Stochastischer Optischer
Rekonstruktionsmikroskopie und Anwendung an zytotoxischen T-Lymphozyten und
Chromaffinzellen der Nebenniere**

Dissertation zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin

der Medizinischen Fakultät

der UNIVERSITÄT DES SAARLANDES

2012

vorgelegt von: Moritz Ruben Medart
geboren am 14.03.1987 in Speyer

Inhaltsverzeichnis

Verzeichnis der Abkürzungen	IV
Zusammenfassung / Summary	VI
1. Einleitung und Fragestellung	1
1.1 Einleitung: Technischer Teil	1
1.1.1 Fluoreszenzmikroskopie.....	1
1.1.1.1 Fluoreszenz.....	1
1.1.1.2 Färbetechniken.....	3
1.1.1.3 Prinzipieller Aufbau eines Fluoreszenzmikroskops.....	4
1.1.2 Auflösung und Beugung.....	5
1.1.3 Optische Auflösungsgrenze.....	7
1.1.4 Rayleigh-Kriterium und Halbwertsbreite.....	8
1.1.5 Hochauflösende Mikroskopie.....	9
1.1.6 SIM.....	9
1.1.7 STED-Mikroskopie.....	12
1.1.8 TIRF-Mikroskopie.....	14
1.1.9 Einzelmolekül-Lokalisationsmikroskopie.....	17
1.1.9.1 PALM.....	20
1.1.9.2 STORM.....	22
1.1.9.3 dSTORM.....	22
1.1.9.4 Photoschalten synthetischer Fluorophore.....	23
1.2 Einleitung: Biologischer Teil	25
1.2.1 HeLa-Zellen.....	25
1.2.2 Bovine Chromaffinzellen.....	25
1.2.3 Zytotoxische T-Zellen.....	26
1.2.4 Mikrotubuli.....	26
1.2.5 Aktinfilamente.....	27
1.3 Fragestellung	28
2. Material und Methodik	29
2.1 Material	29
2.1.1 Substanzen.....	29
2.1.2 Enzyme.....	29

2.1.3 Antikörper und Peptidfarbstoffe.....	30
2.1.4 Medien, Puffer und sonstige Lösungen.....	30
2.1.5 Geräte, Deckgläser und Zellkultur-Platten.....	31
2.1.6 Mikroskop-Prototyp.....	31
2.1.7 Auswertprogramme.....	31
2.2 Methodik.....	32
2.2.1 Molekularbiologische Methoden.....	32
2.2.1.1 Restriktionsspaltung.....	32
2.2.1.2 Dephosphorylierung des Vektors.....	33
2.2.1.3 Gelelektrophorese und -extraktion.....	33
2.2.1.4 Ligation.....	34
2.2.1.5 Transformation.....	34
2.2.1.6 Plasmidisolation.....	34
2.2.2 Kultur der HeLa-Zellen.....	35
2.2.3 Präparation und Kultur boviner Chromaffinzellen.....	36
2.2.4 Präparation und Kultur muriner zytotoxischer T-Zellen.....	36
2.2.5 Präparation und Kultur humaner zytotoxischer T-Zellen.....	37
2.2.6 Transfektion boviner Chromaffinzellen.....	38
2.2.7 Transfektion der HeLa-Zellen.....	38
2.2.8 Transfektion muriner zytotoxischer T-Zellen.....	38
2.2.9 Beschichtung der Deckgläser.....	39
2.2.10 Fixierung der Zellen.....	39
2.2.11 Verwendete Färbeverfahren.....	40
2.2.11.1 Aktin-Färbung.....	41
2.2.11.2 Mikrotubuli-Färbung.....	41
2.2.11.3 Syntaxin-1-Färbung.....	42
2.2.11.4 Syntaxin-11-Färbung.....	42
2.2.11.5 Perforin-Färbung.....	42
2.2.12 Herstellung von „Photo-Switching-“ und „Oxygen-Scavenger-Buffer“.....	42
2.2.13 Driftausgleich und Positionsangleichung bei Mehrkanalaufnahmen.....	43
2.2.14 Aufnahme von dSTORM- und PALM-Rohdaten.....	44
2.2.15 Verarbeitung der Rohdaten.....	45
2.2.16 Nachträgliche Bildoptimierung.....	46
2.2.17 Reinigung der HI-Deckgläser.....	47

3. Ergebnisse	48
3.1 Etablierung von PALM und dSTORM	48
3.1.1 PALM-Aufnahme von Aktinfilamenten einer HeLa-Zelle.....	49
3.1.2 dSTORM-Aufnahmen von Aktinfilamenten in HeLa-Zellen.....	50
3.1.3 dSTORM-Aufnahmen von Mikrotubuli in HeLa-Zellen.....	53
3.2 Anwendung an anderen Zelltypen und -strukturen	56
3.2.1 Mikrotubuli in murinen zytotoxischen T-Zellen.....	56
3.2.2 Vesikel und Syntaxin-1 in einer bovinen Chromaffinzelle.....	58
3.2.3 Vesikel und Syntaxin-11 in einer humanen zytotoxischen T-Zelle.....	61
4. Diskussion	63
4.1 Möglichkeiten und Einschränkungen der Einzelmolekül-Lokalisationsmikroskopie	63
4.2 Technische Weiterentwicklungen	67
4.2.1 Verbesserung des Auflösungsvermögens.....	67
4.2.2 3D-Techniken.....	69
4.2.2 Live-Cell-Imaging.....	70
4.3 Syntaxin-1: Wie groß sind die Cluster wirklich?	74
4.4 Syntaxin-11: Ein „klassisches“ t-SNARE?	75
5. Literaturverzeichnis	77
6. Publikationen	83
7. Danksagung	84
8. Curriculum Vitae	85

Verzeichnis der Abkürzungen

AGT	O ⁶ -Alkylguanin-DNA-Alkyltransferase
BSA	Bovines Serumalbumin
CD	<i>engl. cluster of differentiation</i>
CLSM	Konfokales Laser-Scanning-Mikroskop
CMV	Cytomegalovirus
c-SMAC	zentrales supramolekulares Aktivierungscluster
eDHFR	Dihydrofolatreduktase des Bakteriums Escherichia coli
FCS	<i>engl. fetal calf serum</i>
FHL4	Familiäre Hämophagozytische Lymphohistiozytose, Typ 4
FP	Fluoreszierendes Protein
GFP	Grünfluoreszierendes Protein
DMEM	Dulbecco's modified Eagle medium
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DPBS	Dubecco's phosphate buffered saline
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EMCCD	<i>engl. electron multiplying charge-coupled device</i>
FWHM	Halbwertsbreite, <i>engl. full width at half maximum</i>
HeLa	Henrietta Lacks
HI	<i>engl. high index</i>
Ig	Immunglobulin
IL2	Interleukin-2
iPALM	<i>engl. interferometric PALM</i>
ITS-X	Insulin-Transferrin-Selenium-X
LDCV	<i>engl. large dense-core vesicle</i>
λ	Wellenlänge
M	Molar
MEA	Mercaptoethylamin
MHC	<i>engl. major histocompatibility complex</i>
MTOC	Mikrotubuli Organisationszentrum
NA	Numerische Apertur
NPY	Neuropeptid Y
PA-FP	Photoaktivierbares fluoreszierendes Protein
PALM	Photoaktivierte Lokalisationsmikroskopie
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung, <i>engl. phosphate buffered saline</i>
PFA	Paraformaldehyd
PC-FP	Photokonvertierbares fluoreszierendes Protein
PS-FP	Photoschaltbares fluoreszierendes Protein
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	Umdrehungen pro Minute, <i>engl. rounds per minute</i>
RPMI	Roswell Park Memorial Institute

PSF	Punktspreizfunktion, <i>engl. point-spread-function</i>
SAP	Alkalische Phosphatase der Garnele, <i>engl. shrimp alkaline phosphatase</i>
SDS	Natriumdodecylsulfat, <i>eng. sodium dodecyl sulfate</i>
SIM	Strukturierte Beleuchtungsmikroskopie, <i>engl. structured-illumination microscopy</i>
SNAP	<i>engl. synaptosomal-associated protein</i>
SNARE	<i>engl. soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor attachment protein receptor</i>
STED	Stimulierte Emissionsauslöschungsmikroskopie, <i>engl. stimulated emission depletion microscopy</i>
(d)STORM	(direkte) Stochastische Optische Rekonstruktionsmikroskopie
tdEos	tandem dimer Eos
TIRF-M	Totalreflexionsfluoreszenzmikroskopie, <i>engl. total internal reflection fluorescence microscopy</i>
TMP	Trimethoprim
U	Unit
UV	Ultraviolett
VAMP	<i>engl. vesicle-associated membrane protein</i>
v/v	Volumenanteil
w/v	Gewicht pro Volumen, <i>engl. weight per volume</i>

Zusammenfassung

Bereits seit 1873 ist bekannt, dass das Auflösungsvermögen optischer Instrumente durch die Beugung des Lichts begrenzt ist. In den letzten Jahren gelang es jedoch verschiedene fluoreszenzmikroskopische Verfahren zu entwickeln, mit denen es möglich ist, die klassische optische Auflösungsgrenze zu umgehen. Zu den leistungsfähigsten Methoden gehören die Photoaktivierte Lokalisationsmikroskopie und die Stochastische Optische Rekonstruktionsmikroskopie. Beide Techniken beruhen auf dem Prinzip der hochpräzisen Lokalisation einzelner Farbstoffmoleküle und werden deshalb zusammenfassend als Einzelmolekül-Lokalisationsmikroskopie bezeichnet.

In Professor Rettigs Labor im Physiologischen Institut der Universität des Saarlandes, Homburg, stand der Prototyp eines Mikroskops zur Verfügung, mit welchem neben Strukturierter Beleuchtungsmikroskopie auch Einzelmolekül-Lokalisationsmikroskopie betrieben werden konnte. Zu Beginn meiner Arbeit wurde das Gerät jedoch ausschließlich für die Strukturierte Beleuchtungsmikroskopie genutzt; zur Photoaktivierten Lokalisations- und zur Stochastischen Optischen Rekonstruktionsmikroskopie gab es noch keinerlei Erfahrungen. Diese beiden Techniken zu erproben war erster Gegenstand meiner Arbeit.

Anhand von Zytoskelettfärbungen in HeLa-Zellen konnten die genannten Verfahren so zur Anwendung gebracht werden, dass ein deutlicher Auflösungsvorteil im Vergleich zur konventionellen Lichtmikroskopie erreicht wurde. Da auch das Auflösungsvermögen der Strukturierten Beleuchtungsmikroskopie bei Weitem übertroffen werden konnte, wurde die Einzelmolekül-Lokalisationsmikroskopie als eine Standardtechnik im Labor etabliert.

Nach der erfolgreichen Validierung von Photoaktivierter Lokalisations- und Stochastischer Optischer Rekonstruktionsmikroskopie lag mein wissenschaftlicher Schwerpunkt auf der Erforschung des Mikrotubulsystems in der immunologischen Synapse von zytotoxischen T-Lymphozyten. Mittels hochauflösender Aufnahmen aus Perspektive der Zielziele erfolgte eine detaillierte Beschreibung der morphologischen Charakteristika. Zwischen Zentrosom und immunologischer Synapse wird in der Literatur eine enge räumliche Beziehung postuliert. Diese konnte ich mithilfe von Einzelmolekül-Lokalisationsmikroskopie mit nanometergenauer Auflösung darstellen.

Mein zweites wissenschaftliches Ziel war es die Verteilung von Syntaxin-Clustern in der Plasmamembran von Chromaffinzellen und zytotoxischen T-Lymphozyten zu untersuchen. Im Rahmen dessen erfolgte die erstmalige hochauflösende Vermessung von Syntaxin-1-Clustern mithilfe

von Einzelmolekül-Lokalisationsmikroskopie. Es stellte sich heraus, dass diese deutlich kleinere Ausmaße aufwiesen als in früheren, auf konventioneller Mikroskopie beruhenden Untersuchungen gezeigt worden war.

Außerdem wurde der räumliche Zusammenhang zwischen Syntaxin-Clustern und sekretorischen Granula sowohl in Chromaffin- als auch zytotoxischen T-Lymphozyten analysiert. In der hochauflösenden Rekonstruktion wurde vielfach eine Kollokalisierung von Syntaxin-1 und sekretorischen Vesikeln in den Chromaffinzellen beobachtet. Dagegen zeigte sich keine Kollokalisierung von Syntaxin-11 und lytischen Granula in den zytotoxischen T-Lymphozyten.

Summary

“Establishment of photoactivated localization microscopy and stochastic optical reconstruction microscopy and application to cytotoxic T-lymphocytes and chromaffin cells of the suprarenal gland”

Since 1873, it has been known that the resolution capacity of optical instruments is limited by the diffraction of light. However, over the last few years several fluorescent-microscopic approaches have been developed that allow the circumvention of the classical optical resolution limit. Among the most powerful methods are photoactivated localization microscopy and stochastic optical reconstruction microscopy. Both techniques rely on the principle of a highly precise localization of single dye molecules, and are therefore called single-molecule localization microscopy.

At Professor Rettig’s laboratory in the Institute of Physiology at the University of Saarland, Homburg, there was a microscope prototype available, where in addition to structured illumination microscopy, single molecule localization microscopy could be performed. During the initial stages of my work, the device was exclusively used for structured illumination microscopy. There was no experience in photoactivated localization microscopy and stochastic optical reconstruction microscopy. Testing both of these techniques was the first aim of my work.

On the basis of cytoskeleton staining in HeLa-Cells, these methods were applied achieving a clear advantage in resolution in comparison with conventional light microscopy. Since the resolution capacity of structured illumination microscopy was significantly exceeded as well, single-molecule localization microscopy has been established as a standard technique in the laboratory.

After the successful validation of photoactivated localization microscopy and stochastic optical reconstruction microscopy, my main scientific emphasis was focused on elucidating the microtubule system of the immunological synapse in cytotoxic T-lymphocytes. By use of high resolution images from the perspective of the target cell, I made a precise description of the morphologic properties. One finding which is postulated in the literature is a close spatial relationship between the centrosome and the immunological synapse. Using single-molecule localization microscopy, I was able to describe this in nanoscale resolution.

My second scientific aim was to investigate the distribution of Syntaxin-clusters in the plasma membrane of chromaffin cells and cytotoxic T-lymphocytes. This work led to the first high-resolution measurement of Syntaxin-1-clusters using single-molecule localization microscopy. It turned out that these exhibited significantly smaller sizes than shown by previous studies based on conventional microscopy.

Furthermore, the spatial relationship between Syntaxin-clusters and secretory granules was analyzed in chromaffin cells as well as in cytotoxic T-lymphocytes. In my high-resolution reconstruction, a colocalization between Syntaxin-1 and secretory vesicles could be observed many times in the chromaffin cells, whereas Syntaxin-11 and lytic granules did not show any colocalization in the cytotoxic T-lymphocytes.

1. Einleitung

Die Einleitung dieser Arbeit ist in einen technischen und einen biologischen Teil gegliedert. Die technische Einleitung soll zuerst die Grundlagen moderner Fluoreszenzmikroskopie darstellen und die beugungsbedingte Begrenzung des Auflösungsvermögens erklären. Es schließt sich ein Überblick über die wichtigsten fluoreszenzmikroskopischen Techniken zur Umgehung der Auflösungsgrenze an. Besonders detailliert werden die verschiedenen Verfahren der Einzelmolekül-Lokalisationsmikroskopie, welche für diese Arbeit verwendet wurden, am Ende des technischen Teils erläutert. Im biologischen Teil der Einleitung werden die im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Zelltypen sowie einige der abgebildeten Zellstrukturen vorgestellt. Da jedoch der technische Aspekt im Vordergrund stand, handelt es sich hierbei lediglich um eine kurze Basisinformation.

1.1 Einleitung: Technischer Teil

1.1.1 Fluoreszenzmikroskopie

In der Biologie dient die Fluoreszenzmikroskopie der vergrößerten Darstellung von spezifisch markierten Zellstrukturen. Nach Anregung durch Licht leuchten die gefärbten Bestandteile der Zelle vor einem dunklen Hintergrund. Der hohe Kontrast erlaubt das Erkennen und Unterscheiden von sonst kaum abgrenzbaren Strukturen. Die Fluoreszenzmikroskopie eignet sich sowohl für fixierte als auch für lebendige Proben.

1.1.1.1 Fluoreszenz

Grundlage der Fluoreszenz ist die Anregbarkeit von Farbstoffmolekülen durch Licht einer bestimmten Wellenlänge. Elektronen des Farbstoffmoleküls absorbieren die Photonen und gelangen dadurch vom elektronischen Grundzustand (S_0) in einen energetisch höheren, angeregten Zustand (S_n). Von

einem angeregten Zustand gibt es nun verschiedene Möglichkeiten zurück in den Grundzustand zu gelangen.

Erfolgt der Übergang von einem höheren in ein niedrigeres Energieniveau durch Wärmeabgabe, spricht man von Interner Konversion. Hierbei werden keine Strahlen emittiert. Der Übergang vom zweiten angeregten Singulett-Zustand (S_2) zum ersten angeregten Singulett-Zustand (S_1) erfolgt stets durch Interne Konversion und ist folglich immer strahlungslos. Er spielt somit in der Lichtmikroskopie nur eine untergeordnete Rolle. Der Übergang vom S_1 -Zustand in den Grundzustand S_0 kann dagegen durch Emission eines Photons erfolgen. Hierbei bleibt der Elektronenspin erhalten. Der Vorgang wird als Fluoreszenz bezeichnet. Bemerkenswert ist, dass die abgegebenen Photonen stets eine längere Wellenlänge aufweisen als die zuvor absorbierten Photonen. Diese Rotverschiebung wird Stokes-Shift genannt. Die Ursache des Stokes-Shifts liegt darin, dass Elektronen innerhalb eines angeregten Zustandes S_n verschiedene Schwingungsniveaus aufweisen können. Nach Anregung durch Absorption eines Photons werden typischerweise hohe Schwingungsniveaus erreicht. Bevor die Rückkehr zum Grundzustand durch Photonenemission erfolgt, gelangen die Elektronen jedoch durch Mechanismen, wie beispielsweise die Interne Konversion, stets ins niedrigste S_1 -Schwingungsniveau. Aus diesem Grund steht für die Abgabe des Photons weniger Energie zur Verfügung als dem Elektron durch Aufnahme des anregenden Photons zugeführt wurde. Der Energieverlust manifestiert sich als Rotverschiebung.

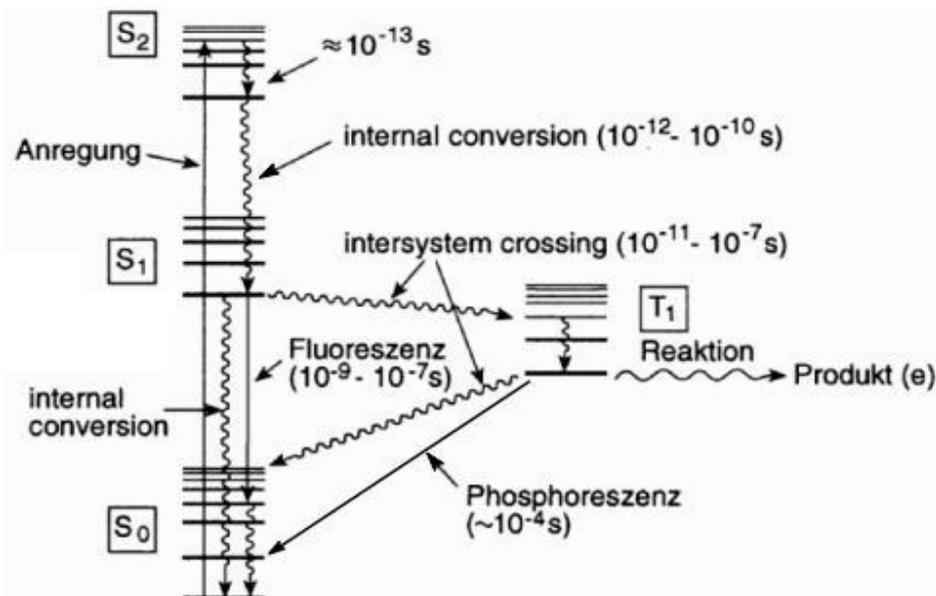


Abbildung 1: Jablonski-Schema. Die gewellten Pfeile stellen strahlungslose Übergänge dar, die geraden Pfeile solche mit Strahlung. Die Kürzel S und T stehen für Singulett- und Triplett-Zustand. Die Bezeichnungen beziehen sich auf die Multiplizität elektronischer Zustände. Diese werden von der Gesamtsumme der Elektronenspins eines Moleküls bestimmt. Innerhalb eines angeregten Zustandes S_n sind verschiedene Schwingungsniveaus möglich, was durch die horizontalen Linien dargestellt wird. Nach Latscha HP et al. 2008

Im angeregten Zustand S_1 kann es außerdem zur Spinumkehr eines Elektrons kommen. Dies führt zum Triplettzustand (T_1). Man spricht von strahlungsloser Interkombination bzw. *engl. intersystem crossing*. Der T_1 -Zustand ist immer noch angeregt, jedoch energetisch auf niedrigerem Niveau als der Singulettzustand S_1 . Vom Grundzustand S_0 aus können Elektronen nie direkt in den Triplettzustand gelangen.

Findet die Rückkehr vom T_1 -Zustand zum Grundzustand S_0 unter Abgabe eines Photons statt, spricht man von Phosphoreszenz. Es kommt hierbei zur erneuten Umkehr des Elektronenspins. Während Fluoreszenz ein sehr schneller und kurzer Vorgang ist, handelt es sich bei Phosphoreszenz um einen langsameren Prozess. Phosphoreszenz bleibt deshalb nach Abschalten des Anregungslichts deutlich länger bestehen als Fluoreszenz, welche beinahe sofort endet. Daneben kann eine Rückkehr von T_1 in den Grundzustand durch Übertragung des Elektronenspins auf ein anderes Molekül erfolgen. Auch eine strahlungslose Rückkehr zum Grundzustand unter Wärmeabgabe ist möglich (Latscha HP et al. 2008).

1.1.1.2 Färbetechniken

Zur Markierung von Zellstrukturen stehen verschiedene Möglichkeiten zur Verfügung. Weit verbreitet ist das als Immunfluoreszenz bezeichnete Färben von Zielstrukturen mit spezifischen Antikörpern, wobei die zu färbende Struktur dem Antikörper dabei als Antigen dient. Im Falle von direkter Immunfluoreszenz ist der Antikörper an einen Farbstoff gekoppelt. Hiervon abzugrenzen ist die indirekte Immunfluoreszenz, bei welcher die Probe zusätzlich mit einem zweiten (Sekundär-) Antikörper behandelt wird. Der Sekundär-Antikörper bindet an den ersten (Primär-)Antikörper, wobei nur der Sekundäre fluoreszenzmarkiert ist. Im Vergleich zur direkten Variante besitzt die indirekte Immunfluoreszenz eine deutlich höhere Sensibilität. Grund hierfür ist, dass ein Primär-Antikörper verschiedene Epitope und somit Bindungsstellen für mehrere Sekundär-Antikörper aufweist. Darüber hinaus gestattet die Möglichkeit zur Kombination verschiedener Primär- und Sekundär-Antikörper einen flexibleren und kostengünstigeren Einsatz. Antikörper werden als mono- oder polyklonal klassifiziert. Monoklonale Antikörper stammen von einem einzigen B-Zellklon, der durch Hybridisierung mit einer Myelomzelle immortalisiert wurde. Sie weisen somit alle eine identische Spezifität und Affinität für ein und dasselbe Epitop auf (Köhler G & Milstein C 1975). Im Gegensatz hierzu stammen polyklonale Antikörper von unterschiedlichen B-Zellen ab. Sie binden an verschiedene Epitope der Zielstruktur und weisen folglich unterschiedliche Spezifitäten auf.

Neben der Nutzung von Antikörpern besteht die Möglichkeit der Proteinfärbung mit spezifischen Liganden. Als Beispiel sei hier das Gift des Knollenblätterpilzes, Phalloidin, genannt, welches hochspezifisch an Aktin bindet. Durch Fusion von Phalloidin mit einem Farbstoff steht ein exzellenter Aktinmarker zur Verfügung.

Eine weitere Möglichkeit zur Markierung von Zellbestandteilen ist der Einsatz des in der Qualle *Aequorea victoria* entdeckten grünfluoreszierenden Proteins (GFP). Das Gen für GFP lässt sich gezielt mit bekannten DNA-Abschnitten fusionieren. Nach Einbringung eines solchen DNA-Konstrukts in die Zelle wird das entsprechende Protein zusammen mit dem GFP synthetisiert. Die Funktion des Proteins wird durch GFP nicht beeinflusst, womit diese Technik insbesondere für die Untersuchung lebendiger Zellen geeignet ist. Mittlerweile ist eine große Anzahl von verschiedenfarbigen fluoreszierenden Proteinen verfügbar, welche das gesamte Spektrum des sichtbaren Lichts abdecken. Es ist somit auch möglich, mehrere Strukturen gleichzeitig darzustellen.

Zumindest an fixierten Proben können die verschiedenen Techniken beinahe beliebig kombiniert werden. Einzige Voraussetzung ist, dass die Emissionsspektren der eingesetzten Farbstoffe weit genug auseinander liegen und sich durch Filtersätze trennen lassen.

1.1.1.3 Prinzipieller Aufbau eines Epifluoreszenzmikroskops

Um das Anregungs- vom Fluoreszenzlicht zu trennen, macht man sich den bereits angesprochenen Stokes-Shift zu Nutze. Sogenannte dichroitische Spiegel sind in der Lage, kurzwelliges Licht zu reflektieren und gleichzeitig langwelliges Licht passieren zu lassen. Im Idealfall trennt der dichroitische Spiegel die Frequenzen genau zwischen Absorptions- und Emissionsmaximum eines Fluorophors.

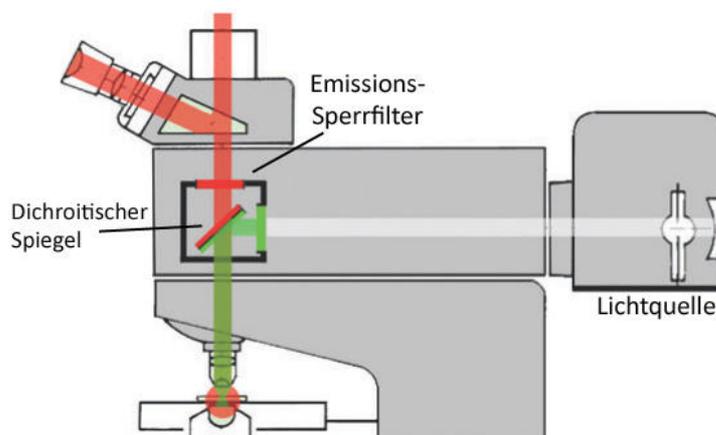


Abbildung 2: Aufbau eines Epifluoreszenzmikroskops. Das Anregungslicht ist grün, das Fluoreszenzlicht rot dargestellt. Nach Lichtmann JW & Conchello J 2005

Der dichroitische Spiegel wird in einem Winkel von 45° in den Strahlengang eingebracht. Er reflektiert das seitlich eintreffende Anregungslicht somit im rechten Winkel auf die Probe. In Epifluoreszenzmikroskopen passiert das Anregungslicht, bevor es die Probe erreicht, das Objektiv. Hierdurch wird es fokussiert, was sicherstellt, dass nur der beobachtete Probenausschnitt beleuchtet wird. In nicht beobachteten Bereichen der Probe findet somit kein Ausbleichen statt. Neben seiner Funktion der vergrößernden Abbildung kommt dem Objektiv in diesem Typ von Mikroskop also zusätzlich die Aufgabe des Kondensors zu. Als Lichtquellen dienen meist Quecksilberlampen oder Laser.

Die von den angeregten Farbstoffmolekülen emittierten Photonen breiten sich in alle Richtungen aus. Ein Teil von ihnen wird durch das Objektiv eingefangen und in Richtung Okular bzw. Detektorkamera weitergeleitet. Nachdem der dichroitische Spiegel passiert ist, wird durch einen zusätzlichen Sperrfilter noch die gewünschte Emissionswellenlänge des Fluoreszenzbildes isoliert.

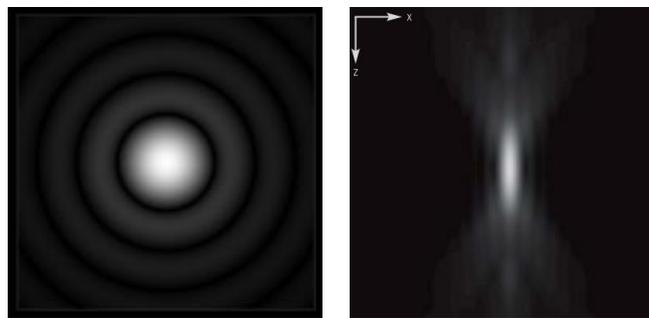
Eines der Hauptprobleme der Fluoreszenzmikroskopie ist das Ausbleichen der Farbstoffe. Nach einer gewissen Anzahl von Fluoreszenzzyklen kommt es durch Bildung reaktiver Sauerstoffspezies zu irreversiblen Veränderungen der Farbstoffmoleküle, welche hierdurch ihre fluoreszierenden Eigenschaften verlieren. Es wird angenommen, dass insbesondere angeregte Fluorophore im Triplett-Zustand anfällig für Reaktionen mit molekularem Sauerstoff sind. Durch Entwicklung stabilerer Farbstoffe und sogenannter Anti-Fading-Zusätze konnte dem Ausbleichen jedoch begegnet werden (Lichtmann JW & Conchello J 2005). Das gegenwärtig fundamentalste Problem der Fluoreszenzmikroskopie ist die beugungsbedingte Begrenzung des Auflösungsvermögens.

1.1.2 Auflösung und Beugung

Die Auflösung entspricht dem minimalen Abstand, ab welchem zwei Punkte voneinander unterschieden werden können. Als Faustregel für die erreichbare Auflösung gilt die halbe Wellenlänge des emittierten Lichts. Da sich das Spektrum des sichtbaren Lichts von ungefähr 400 bis 700 nm erstreckt, müssen zwei Punkte also mindestens 200 nm voneinander entfernt liegen, damit sie getrennt wahrgenommen werden können. Liegen sie näher beieinander, erscheinen sie als ein einziger, elliptischer Fleck. Zwar kann dieser Fleck mittels stärkerer Linsen weiter vergrößert werden. Die zwei Punkte bleiben jedoch weiterhin nicht auflösbar.

Der Grund hierfür liegt in der Wellennatur des Lichts und den damit einhergehenden Beugungsphänomenen. Als Beugung bzw. Diffraktion bezeichnet man im Allgemeinen die Ablenkung von Wellen an einem Hindernis. In der Mikroskopie ist die Ablenkung der wellenförmigen Photonen

gemeint, welche unter anderem beim Passieren der optischen Apertur – dem Hindernis – auftritt. Die Folge ist, dass bei der mikroskopischen Darstellung einer punktförmigen Lichtquelle ein verschwommenes Abbild entsteht, dessen Helligkeitsverteilung dreidimensional als Punktspreizfunktion (PSF, engl. *point-spread-function*) beschrieben wird. In der lateralen Bildebene erscheint die PSF als sogenannte Airy-Scheibe. Es handelt sich um einen zentralen Kreis, der von konzentrischen Ringen abnehmender Intensität umgeben wird. Das zentrale Intensitätsmaximum wird als 0. Beugungsordnung bezeichnet, die Ringe werden fortlaufend nummeriert. Axial betrachtet erscheint die PSF als Ellipse. Für die Entstehung der Beugungsordnungen sind Interferenzen verantwortlich, wie in Abbildung 5 gezeigt wird.

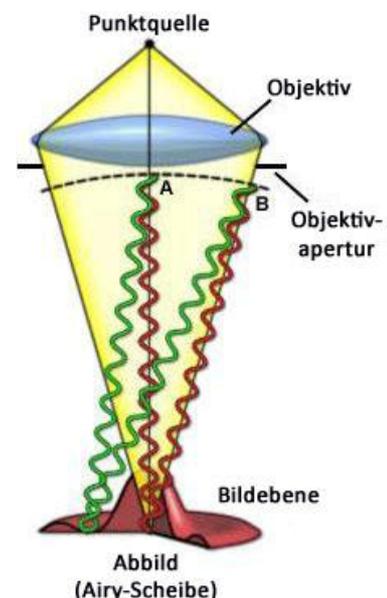


Abbildungen 3 und 4: Airy-Scheibe als Horizontalschnitt durch die PSF (links) und PSF axial betrachtet (rechts). Aus der Zeiss-Broschüre „Die konfokale Laser Scanning Mikroskopie - Grundlagen“, zu finden auf www.zeiss.de

Für die Mikroskopie ist das Verständnis der verbreiterten Abbildung einer Punktlichtquelle von großer Bedeutung, da die Ausdehnung der Punktspreizfunktion das Auflösungsvermögen bestimmt, siehe Abschnitt 1.1.4. Des Weiteren basieren spezielle Methoden der hochauflösenden Bildgebung, z.B. die STED-Mikroskopie, auf einer Modifizierung der PSF und erlauben so eine Umgehung der optischen Auflösungsgrenze (www.microscopyu.com).

Abbildung 5: Die Airy-Scheibe ist das Resultat von Interferenzen, also Überlagerungen der Wellenamplituden verschiedener Photonen. Die Amplituden der rot gezeichneten Wellen addieren sich aufgrund von Phasengleichheit, es entsteht das zentrale Maximum durch konstruktive Interferenz. In grün ist die Entstehung des ersten Minimums durch destruktive Interferenz illustriert. Hier heben sich die Amplituden der Wellen genau auf. Weiter peripher schließt sich die 1. Beugungsordnung an.

Nach www.microscopyu.com/articles/superresolution/diffractionbarrier.html



1.1.3 Optische Auflösungsgrenze

Bereits 1873 erkannte der deutsche Physiker Ernst Abbe, dass die mittels Lichtmikroskopie erreichbare Auflösung nicht nur von der Qualität des Mikroskops bestimmt wird, sondern (durch Beugungsphänomene) limitiert ist (Abbe E 1873). Man spricht seither vom Beugungs- bzw. Abbe-Limit oder einfach von der optischen Auflösungsgrenze.

Abbe stellte fest, dass das Auflösungsvermögen eines Mikroskops sowohl von der Wellenlänge des verwendeten Lichts (λ) als auch von der numerischen Apertur (NA) des Objektivs bestimmt wird. Die numerische Apertur ist ein Maß für die Fähigkeit des Objektivs Licht zu fokussieren. Sie wird durch den Brechungsindex des Immersionsmediums (n) und den Öffnungswinkel des Objektivs (α) bestimmt. Seine Überlegungen fasste Ernst Abbe mathematisch zu folgender Gleichung zusammen:

$$(1) \quad d_{xy} = \lambda / 2 NA$$

$$\text{wobei gilt } NA = n \cdot \sin(\alpha)$$

Die ursprüngliche Abbe-Formel wurde später durch Sir Rayleigh modifiziert zu (Rayleigh JWS 1896):

$$(2) \quad d_{xy} = 0,61 \lambda / NA$$

Der errechnete Wert d_{xy} entspricht dem Mindestabstand zwischen zwei Punkten in der Lateralebene. Die beiden Formeln unterscheiden sich lediglich im Faktor, welcher von 0,5 in der originalen Abbe-Formel später in 0,61 geändert wurde. Praktisch ist diese Änderung wenig relevant, da die unter theoretischen Idealbedingungen errechnete Maximalauflösung mit konventioneller Lichtmikroskopie ohnehin kaum erreicht werden kann. Grund hierfür ist, dass selbst bei perfekter Ausrichtung des Strahlengangs und idealer Wahl aller Komponenten, wie Immersionsöl und Deckgläser, biologische Proben stets optische Inhomogenitäten aufweisen. Diese führen zu nicht beeinflussbaren Ablenkungen sowohl der anregenden als auch der emittierten Lichtstrahlen.

Das axiale Auflösungsvermögen fällt deutlich geringer aus als das laterale, was an der elliptischen Form der PSF in z-Richtung liegt. Es errechnet sich durch:

$$(3) \quad d_z = 2 \lambda / NA^2$$

Setzt man typische Werte ein erhält man z.B. die folgenden Rechnungen:

$$d_{xy} = 567 \text{ nm} / 2 \cdot 1,44 = 197 \text{ nm}$$

$$d_z = 2 \cdot 567 \text{ nm} / (1,44)^2 = 547 \text{ nm}$$

Dass die Vergrößerung eine von der Auflösung verschiedene Größe ist, wird auch daran ersichtlich, dass sie in keiner der angegebenen Formeln Beachtung findet.

1.1.4 Rayleigh-Kriterium und Halbwertsbreite

Um die Frage objektiv beantworten zu können, ab wann zwei Punkte unterscheidbar sind, wurde eine Reihe von Kriterien eingeführt. Weit verbreitet ist das Rayleigh-Kriterium, benannt nach dem englischen Astronomen Sir Rayleigh. Es besagt, dass zwei Punkte dann auflösbar sind, wenn ihr Abstand zueinander mindestens so groß ist, dass sich das Intensitätsmaximum von Punkt eins im ersten Intensitätsminimum von Punkt zwei befindet (Demtröder W 2009). Der zentrale Hellbereich der Airy-Scheibe von Punkt eins muss also mindestens im ersten Dunkelbereich der Airy-Scheibe von Punkt zwei liegen. Ist der Abstand geringer, reicht der Kontrast nicht aus; die beiden Hauptmaxima überlappen und können somit nicht mehr aufgelöst werden. Die Entfernung beider Maxima voneinander entspricht der Auflösung.

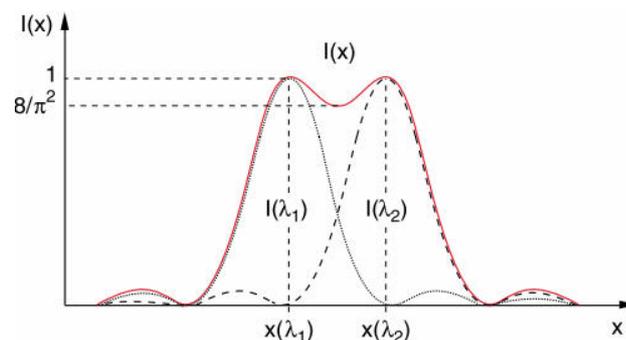


Abbildung 6: Gerade eben noch nach dem Rayleigh-Kriterium auflösbare Punktlichtquellen. Aus Demtröder W 2009

Um die Auflösung bei Vorhandensein nur einer einzelnen Struktur quantifizieren zu können, wird meist auf die Halbwertsbreite (engl. *full width at half maximum*, FWHM) zurückgegriffen. Alle gemessenen Auflösungen in Bildern dieser Arbeit wurden – sofern nicht anders gekennzeichnet – nach diesem Kriterium bewertet.

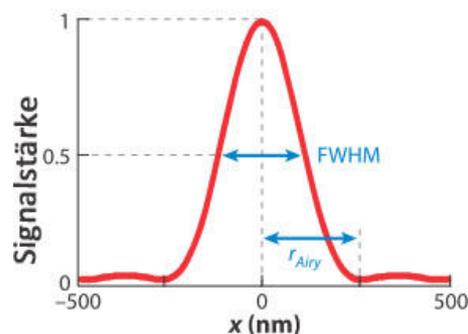


Abbildung 7: Halbwertsbreite (FWHM). Nach Toomre D & Bewersdorf J 2010

1.1.5 Hochauflösende Mikroskopie

In den letzten Jahren sind zahlreiche Verfahren entwickelt worden, welche die optische Auflösungsgrenze auf unterschiedliche Weise umgehen und somit Lichtmikroskopie jenseits des eigentlichen Auflösungslimits ermöglichen. Man spricht von hochauflösender Mikroskopie (*engl. super-resolution microscopy*). Zu nennen sind insbesondere die Interne Totalreflexionsfluoreszenzmikroskopie (TIRF, Axelrod D 1981), die Stimulierte Emissionsauslöschungsmikroskopie (STED, Hell SW & Wichmann J 1994), die Strukturierte Beleuchtungsmikroskopie (SIM, Gustafsson MGL 2000), die Photoaktivierte Lokalisationsmikroskopie (PALM, Betzig E et al. 2006) sowie die Stochastische Optische Rekonstruktionsmikroskopie (STORM, Rust MJ et al. 2006) bzw. die direkte Stochastische Optische Rekonstruktionsmikroskopie (dSTORM, Heilemann M et al. 2008).

Die Verfahren lassen sich in zwei Gruppen unterteilen: eine Gruppe basiert auf der strukturierten Anregungsbeleuchtung. Hierzu zählen SIM und STED. Ihr gegenüber steht die Gruppe der Einzelmolekül-Lokalisationsverfahren, deren bedeutendste Vertreter STORM, dSTORM und PALM darstellen. Die TIRF-Mikroskopie als ältestes Verfahren zur Umgehung des Beugungslimits nimmt eine Sonderstellung ein, da sie als einzige Technik ausschließlich die axiale Auflösung verbessert.

Auf den folgenden Seiten soll ein Überblick über die genannten Techniken zur hochauflösenden Fluoreszenzmikroskopie gegeben werden. Der für diese Arbeit verwendete Mikroskop-Prototyp der Firma Zeiss ist für die Verfahren SIM, PALM, STORM bzw. dSTORM sowie TIRF-Mikroskopie geeignet.

1.1.6 Strukturierte Beleuchtungsmikroskopie (SIM)

Bei der Strukturierten Beleuchtungsmikroskopie (SIM, *engl. structured illumination microscopy*) handelt es sich um ein fluoreszenzmikroskopisches Weitfeldverfahren. SIM ermöglicht eine Verdopplung des Auflösungsvermögens im Vergleich zu herkömmlicher Fluoreszenzmikroskopie in lateraler und axialer Ebene. Die hochauflösende Bildinformation wird durch serielle Beleuchtung der Probe mit einem Lichtgitter in verschiedenen Positionen gewonnen (Gustafsson MGL 2000).

Das Prinzip von SIM basiert auf dem Moiré-Effekt. Überlagert man beispielsweise zwei Linienmuster mit unterschiedlichem Winkel, kommt es zu Interferenzerscheinungen, welche sich als Moiré-Streifen manifestieren. Es handelt sich hierbei um ein neues, periodisches Linienmuster, dessen Linienbreite und -abstand viel größer sind als dies bei den zugrunde liegenden Mustern der Fall ist. Zu ähnlichen Phänomenen kommt es auch bei komplexen, nicht linienartigen Musterüberlagerungen. In

SIM wird eine fluoreszenzmarkierte biologische Probe mit einem sinuswellenförmigen Beleuchtungsmuster angeregt. Auch hier tritt der Moiré-Effekt auf.

Zwar ist die Abbildung des Moiré-Musters beugungslimitiert. Da die Moiré-Streifen jedoch deutlich verbreitert sind, können sie in gewissem Rahmen auch dann aufgenommen werden, wenn die ihnen zugrunde liegenden Strukturen jenseits der Auflösungsgrenze liegen. Die hochauflösende Bildinformation ist also in den Moiré-Streifen enthalten.

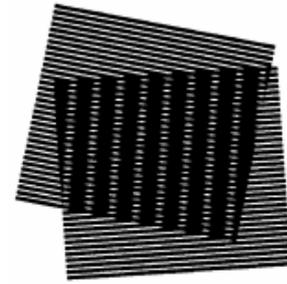


Abbildung 8: Moiré-Effekt im überlappenden Bereich der beiden Linienmuster. Aus Gustafsson MGL 2000

Das Beleuchtungsmuster wird durch Einsetzen eines Beugungsgitters in den Strahlengang des Mikroskops generiert. Hierdurch wird das Laserlicht in mehrere Strahlen bzw. Beugungsordnungen aufgeteilt. Bis auf die 0. und die beiden ersten (-1. und +1. Ordnung) werden alle Beugungsordnungen geblockt, um ungeordnete Interferenz zu verhindern. Die verbleibenden drei Lichtstrahlen werden auf die hintere Brennebene des Objektivs fokussiert. Dort entsteht ein dreidimensionales Interferenzmuster, dessen Linienabstand idealerweise nahe am Auflösungslimit liegt (Carlton PM 2008).

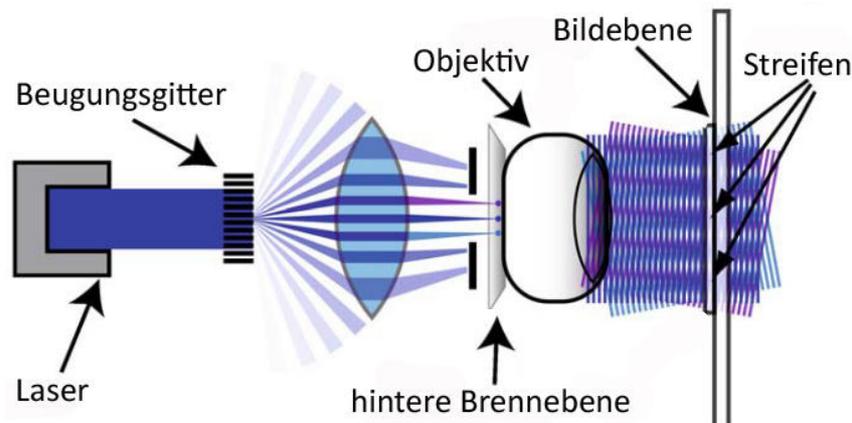


Abbildung 9: Erzeugung des Gittermusters in der Objektebene. Nach Carlton PM 2008

Um das Funktionsprinzip von SIM zu veranschaulichen, bedient man sich oft der schematischen Darstellung im Frequenzraum¹, siehe Abbildung 10 und Fußnote auf der nächsten Seite. Da das Moiré-Muster im Vergleich zu den zugrunde liegenden Strukturen deutlich verbreitert ist, weist es im Frequenzraum eine reduzierte Raumfrequenz auf. Mittels Strukturierter Beleuchtung werden also Frequenz- und somit Bildinformationen in Richtung Zentrum verschoben. Hierdurch erklärt sich, wie SIM die Auflösungsgrenze umgeht: Subdiffraktäre Frequenzen werden ins Sichtfeld transportiert. Die hochfrequente Bildinformation wird jedoch nur in Richtung der Strukturierung gewonnen. Eine

gleichmäßige Auflösungsverbesserung kann durch Rotation des Beleuchtungsmusters erzielt werden. Um ein hochauflösendes Bild rekonstruieren zu können, müssen die ursprünglichen Positionen der verschobenen Frequenzen ermittelt werden. D.h. die ins Sichtfeld verschobenen Frequenzinformationen müssen von denen getrennt werden, die sich bereits ohne Strukturierte Beleuchtung dort befanden. Bewerkstelligt wird dies durch Verrechnung von Bildern mit verschiedenen Positionen des Beleuchtungsgitters. Bei einer Anzahl von fünf Bildern verschiedener Gitterposition ist das Gleichungssystem lösbar. Insgesamt werden zur Erstellung eines SIM-Bildes je fünf Gitterpositionen in drei verschiedenen Orientierungen, d.h. also 15 Einzelaufnahmen, benötigt (Weisshart K et al. 2010).

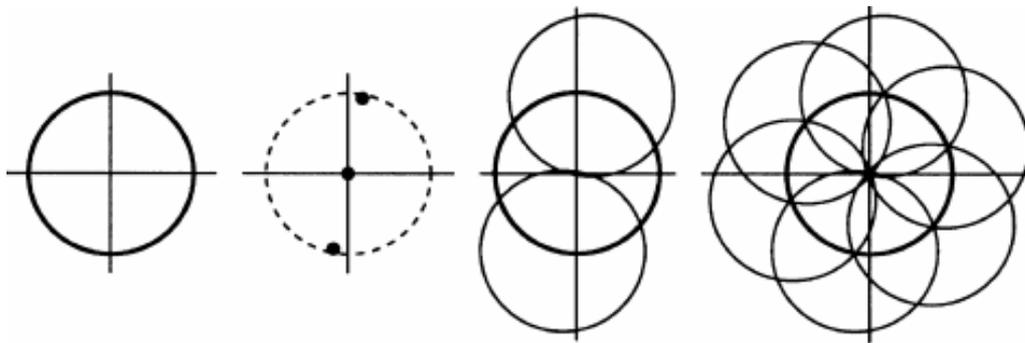


Abbildung 10: Schematische Darstellung des Frequenzraums. Die Kreislinie im linken Bild markiert die optische Auflösungsgrenze. Mittels Strukturierter Beleuchtung wird hochfrequente Bildinformation ins Sichtfeld transportiert. Rechts kennzeichnen die ans Sichtfeld angrenzenden Kreise subdiffraktäre Frequenzen, welche durch SIM zugänglich werden. Insgesamt kann eine „Verdopplung“ des Sichtfeldes erzielt werden. Dies entspricht einem um den Faktor 2 gesteigerten Auflösungsvermögen. Aus Carlton PM 2008

Vorteile bietet SIM vor allem aufgrund ihrer sehr einfachen Handhabung. Insbesondere ist die Wahl der Farbstoffe unkompliziert, da sich sowohl organische Farbstoffe als auch fluoreszierende Proteine problemlos eignen und beliebig kombinieren lassen. Schwachstelle dieser Methode ist der im

¹**Frequenzraum:** Zwischen Orts- und Frequenzraum besteht eine reziproke Beziehung; mittels Fourier-Transformation können beide reversibel ineinander überführt werden. Es liegt die Überlegung zugrunde, dass jedes Graustufenbild als komplexe Überlagerung verschiedener sinusoidaler Intensitätswellen angesehen werden kann. Das Graustufenbild entspricht der reellen Bilddarstellung im Ortsraum. Dagegen steht ein Pixel im Frequenzraum für eine Sinuswelle des Ortsraums, welche durch das gesamte reelle Bild verläuft. Die Amplitude der Sinuswelle wird durch die Intensität des Pixels angegeben, die Frequenz durch den Abstand des Pixels vom Zentrum; je höher die Frequenz, desto weiter die Entfernung zur Frequenzbildmitte. Die Ausrichtung der Sinuswelle steht senkrecht zur gedachten Linie zwischen Pixel und Zentrum. Die optische Auflösungsgrenze entspricht der maximal abbildbaren Frequenz einer Sinuswelle im reellen Bild. Nach Fourier-Transformation ist das Abbe-Limit also der größtmögliche Zentrumsabstand, welcher in Abbildung 10 durch eine Kreislinie markiert ist. Alles innerhalb des Kreises ist abbildbar und wird als Sichtfeld bezeichnet. Bildinformationen jenseits des optischen Auflösungslimits befinden sich außerhalb des Sichtfelds (Carlton PM 2008).

Vergleich zu anderen hochauflösenden Techniken geringere Auflösungsgewinn. Auch ist die Verrechnung der Rohdaten rechen- und zeitintensiv. SIM wurde für diese Arbeit als Referenztechnik genutzt, um qualitativ hochwertige Vergleichsaufnahmen zu PALM- und dSTORM-Bildern zur Verfügung zu haben.

1.1.7 Stimulierte Emissionsauslöschungsmikroskopie (STED)

Die Stimulierte Emissionsauslöschungsmikroskopie (STED, engl. *stimulated emission depletion*) gehört neben PALM und dSTORM zu den leistungsfähigsten hochauflösenden fluoreszenzmikroskopischen Techniken. Als alternatives Verfahren steht die STED-Mikroskopie also gewissermaßen in Konkurrenz zur in dieser Arbeit verwendeten Einzelmolekül-Lokalisationsmikroskopie.

Das Prinzip der STED-Mikroskopie ähnelt dem des konfokalen Laser-Scanning-Mikroskops (CLSM). Mit einem fokussierten Laserstrahl wird die Probe Punkt für Punkt rasterförmig abgesucht. Dabei wird die Auflösung der Aufnahme von der Größe des beleuchteten Punkts – der PSF – bestimmt. Durch Manipulation der PSF erlaubt STED-Mikroskopie eine Umgehung der Beugungsgrenze. Man macht sich hierfür die Möglichkeit zu Nutze, Fluorophore reversibel vom angeregten Hell- (S_1) in den dunklen Grundzustand (S_0) überführen zu können (Hell SW, Wichmann J 1994).

Bei der STED-Mikroskopie wird die Probe mit zwei synchronisierten Lasern bestrahlt: dem Impuls des Anregungslasers folgt unmittelbar der Impuls des niedriger frequenten sogenannten Depletionslasers, auch STED-Strahl genannt. Der Depletionslaser bringt zuvor angeregte Fluoreszenzmoleküle mittels Stimulierter Emission² zurück in den Grundzustand S_0 . Der Impuls des Depletionslasers erfolgt noch bevor angeregte Farbstoffmoleküle beginnen spontan zu fluoreszieren. Mittels Phasenmodulator wird der STED-Strahl derart modifiziert, dass dieser in seinem Zentrum die Intensität Null hat, während die Intensität nach Außen hin exponentiell ansteigt. Der Depletionslaser hat also die Form eines Doughnuts. In der Folge ist es nur denjenigen Farbstoffmolekülen möglich zu fluoreszieren, die sich in

²**Stimulierte Emission:** *Durch Stimulierte Emission ist es möglich, spontane Fluoreszenz eines angeregten Farbstoffmoleküls zu verhindern. Hierzu wird ein angeregtes Fluorophor mit Licht einer höheren Wellenlänge als der des Fluoreszenzlichts bestrahlt. Das Farbstoffteilchen reagiert mit der sofortigen Emission eines Photons von exakt derselben Wellenlänge. Dadurch gelangt es wieder in den energieärmeren Grundzustand. Es ist also nicht mehr angeregt, spontane Fluoreszenz ist folglich nicht mehr möglich. Die Wellenlänge des durch Stimulation emittierten Photons ist größer als die des spontanen Fluoreszenzlichts. Das Licht durch Stimulierte Emission kann daher mittels Farbfilter vom Fluoreszenzlicht getrennt werden.*

der Mitte des Depletionslasers befinden. Die Fluorophore im peripheren Bereich des STED-Strahls werden sofort zurück in den Dunkelzustand überführt. Durch geeignete Farbfilter wird das spontane Fluoreszenzlicht von dem Licht durch Stimulierte Emission getrennt, sodass nur ein stark verkleinerter Rest des ursprünglich angeregten Bereichs detektiert wird. Dies kommt einer Verkleinerung der PSF gleich, welche das Beugungslimit deutlich überschreiten kann. Die effektive Größe der PSF entspricht der des zentralen Intensitätsminimums des Depletionslasers (Klar TA et al. 2000).

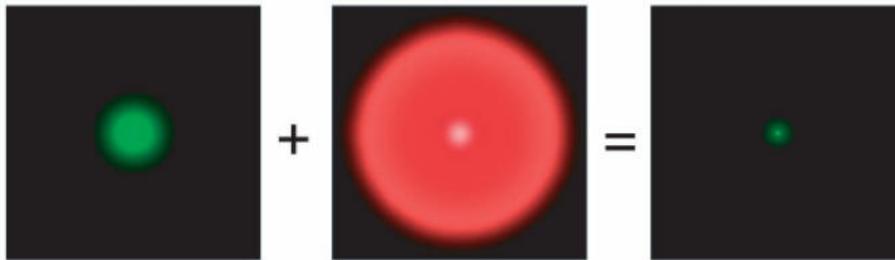


Abbildung 11: STED-Prinzip. Links: normale PSF. Mitte: Doughnut-Form des STED-Strahls. Rechts: Resultierende PSF. Aus Galbraith JA & Galbraith CG 2011

Das Ausmaß des zentralen Intensitätsminimums - und somit der effektiven PSF - hängt wiederum von der Intensität des STED-Strahls ab. Bei hohen Intensitäten reicht die Energie auch schon in den direkt ans zentrale Null angrenzenden Bereichen aus, um angeregte Fluorophore in den Grundzustand zu überführen. Je höher also die gewählte Intensität des Depletionslasers, desto kleiner ist die PSF und desto höher die erzielte Auflösung (Harke B et al. 2008).

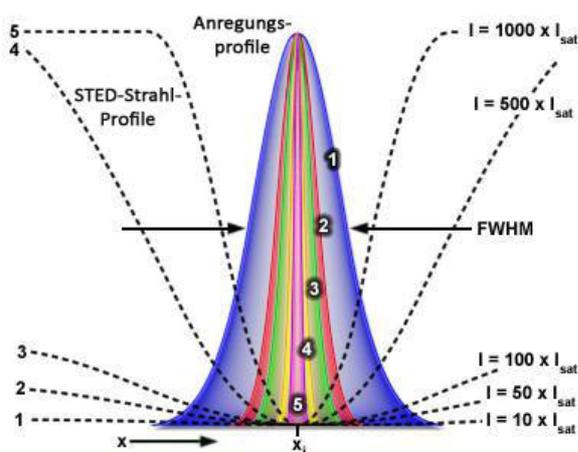


Abbildung 12: Abhängigkeit der effektiven PSF von der Intensität des STED-Strahls (I). Die Sättigungsintensität (I_{sat}) ist der Wert, bei dem 50% der Fluorophore in S_0 überführt werden. Nach <http://zeiss-campus.magnet.fsu.edu/articles/superresolution/introduction.html>

Zwar können tatsächlich sehr hohe Intensitäten bis in den Bereich einiger Hundert Milliwatt eingesetzt werden. Jedoch ist die Intensitätssteigerung limitiert, da die Farbstoffmoleküle bei zu hellem STED-Strahl dauerhaft ausbleichen und nicht mehr zurück in einen angeregten fluoreszierenden Zustand

gebracht werden können. Darüber hinaus müssen bei zu hohen Intensitäten artifizielle Veränderungen der Probe befürchtet werden.

Durch Verengung der PSF mittels STED-Strahl gelingt es laterale Auflösungen von ca. 50 nm in biologischen Proben zu erreichen (Moneron G et al. 2010, Schröder J et al. 2008). In nichtbiologischen Experimenten waren vereinzelt sogar deutlich kleinere Werte möglich (Rittweger E et al. 2009).

Den wichtigsten Vorteil der STED-Mikroskopie stellt ihre im Vergleich zu anderen hochauflösenden Techniken hohe Geschwindigkeit der Datenerfassung dar. Das hochaufgelöste Bild entsteht direkt während des Scannens, ein nachträgliches Prozessieren der Daten ist, im Gegensatz zu beispielsweise SIM, dSTORM oder PALM, nicht notwendig. Der Arbeitsgruppe um Stefan Hell gelangen bereits Aufnahmen mit bis zu 200 Bildern in der Sekunde, womit STED-Mikroskopie für die Untersuchung einer Vielzahl lebendiger Proben geeignet scheint. Derart hohe Bildraten sind jedoch nur bei einem sehr kleinen Bildfeld von wenigen Quadratmikrometern möglich (Lauterbach MA et al. 2010).

Als Nachteil der STED-Mikroskopie ist insbesondere die Schwierigkeit beim Aufnehmen mehrerer Farbkanäle zu nennen. Zwar sind Mehrfarbenaufnahmen möglich (Meyer L et al. 2008), jedoch werden für jeden Farbstoff zwei Laserwellenlängen benötigt, sodass Mehrfarbenbilder mit deutlich mehr Aufwand verbunden sind als dies bei anderen Methoden der Fall ist. Auch die bereits angesprochenen, aus hohen Laserintensitäten resultierenden Probleme, wie dauerhaftes Bleichen oder artifizielle Beeinflussung biologischer Proben, müssen beachtet werden.

1.1.8 Interne Totalreflexionsfluoreszenzmikroskopie (TIRFM)

Die Interne Totalreflexionsfluoreszenzmikroskopie (TIRFM) als älteste hochauflösende Mikroskopietechnik wurde bereits 1981 von Daniel Axelrod beschrieben. Es handelt sich um ein Verfahren zur Limitierung der Eindringtiefe des Anregungslasers in die Probe. Hierzu wird ein Beleuchtungsfeld an der Grenzfläche von Deckglas und Zelle erzeugt, dessen Intensität mit zunehmender Entfernung exponentiell abfällt. So können membrannahe Strukturen und Prozesse bei minimalem Hintergrundrauschen betrachtet und Fluoreszenzmikroskopie unterhalb der eigentlichen Auflösungsgrenze in z-Richtung durchgeführt werden (Axelrod D 1981).

TIRFM basiert auf der physikalischen Eigenschaft des Lichts unter bestimmten Bedingungen zu brechen. Lichtbrechung tritt dann auf, wenn ein geneigter Lichtstrahl von einem Medium mit dem Brechungsindex n_1 in ein zweites Medium mit dem Brechungsindex n_2 übertritt. Ist hierbei n_2 kleiner als n_1 , so wird das Licht vom Lot weg gebrochen. Diese Bedingung ist bei der Mikroskopie von Zellen

auf Deckgläsern erfüllt, da Glas typischerweise einen Brechungsindex von 1,52 hat und für Zytosol der Brechungsindex von Wasser, also 1,33, angenommen werden kann.

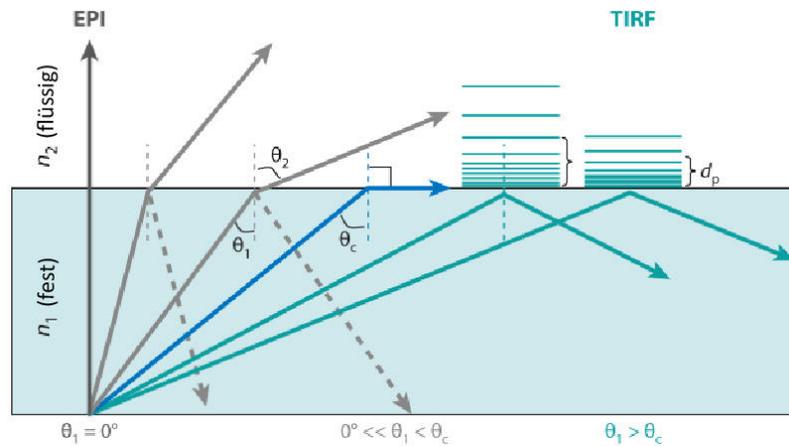


Abbildung 13: Mit zunehmender Neigung des einfallenden Lichtstrahls (θ_1) erhöht sich der Brechungswinkel θ_2 solange, bis der kritische Winkel θ_c erreicht ist. Hier wird das Licht parallel zur Grenzfläche gebrochen. Wird θ_c überwunden kommt es zur Totalreflexion. Ein mit zunehmender Entfernung exponentiell schwächer werdendes Beleuchtungsfeld mit der Eindringtiefe d_p bildet sich aus. Aus Toomre D & Bewersdorf J 2010

Die Stärke der Brechung, d.h. der Brechungswinkel, hängt neben dem Einfallswinkel von den Brechungsindices der beiden Medien ab, wie aus dem Snellius'schen Gesetz hervorgeht:

$$n_1 \cdot \sin \theta_1 = n_2 \cdot \sin \theta_2 \quad (\theta_1 = \text{Einfallswinkel}; \theta_2 = \text{Ausfallswinkel})$$

Bei sukzessiver Erhöhung des Einfallswinkels wird irgendwann ein Zustand erreicht, in welchem der Lichtstrahl genau parallel zur Grenzfläche der beiden Medien gebrochen wird. Man spricht vom kritischen Winkel θ_c . Die Größe des kritischen Winkels wird durch das Verhältnis der Brechungsindices bestimmt:

$$\theta_c = \sin^{-1} (n_2 / n_1)$$

Bei Einfallswinkeln oberhalb des kritischen Winkels tritt Totalreflexion auf. Hierbei handelt es sich jedoch nicht um eine 100%ige Reflexion des Lichts. Tatsächlich bildet sich eine evaneszente Welle aus, d.h. ein Beleuchtungsbereich, dessen Intensität exponentiell mit der Entfernung zur Grenzfläche abnimmt. Als ungefähre Richtwert für die Eindringtiefe d_p des anregenden Lichtstrahls gilt $< 150 \text{ nm}$. Die Eindringtiefe ist definiert als Abstand zur Grenzfläche, bei dem die Lichtenergie auf 37% des ursprünglichen Werts abgefallen ist. Der exakte Wert kann mit folgender Formel berechnet werden (Axelrod D et al. 1984):

$$d_p = \frac{\lambda}{4\pi \sqrt{n_1^2 \sin^2 \theta_1 - n_2^2}}$$

(λ : verwendete Wellenlänge; θ : verwendeter Winkel im Bogenmaß, wobei $\theta > \theta_c$)

Aus der Formel wird ersichtlich, dass die Eindringtiefe direkt von den Brechungsindices der verschiedenen Medien abhängig ist. Die Verwendung spezieller Deckgläser mit besonders hohem Brechungsindex, sogenannter HI-Deckgläser (*engl. high index*, $n = 1,662$), erlaubt aus diesem Grund eine günstige Beeinflussung der Eindringtiefe hin zu niedrigeren Werten. Auch kurzwelliges Laserlicht und das Einstellen von flachen Einfallswinkeln reduziert die Eindringtiefe. Bis zu welchem Maße der Einfallswinkel abgeflacht werden kann, wird durch die numerische Apertur des Objektivs bestimmt. Der für diese Arbeit verwendete Mikroskop-Prototyp verfügt über ein Objektiv mit einer extrem hochnumerischen Apertur von 1,57. In Abbildung 14 sind die Eindringtiefen für typische Wellenlängen unter Standardbedingungen dargestellt. Das Abbesche Auflösungslimit wird deutlich überschritten.

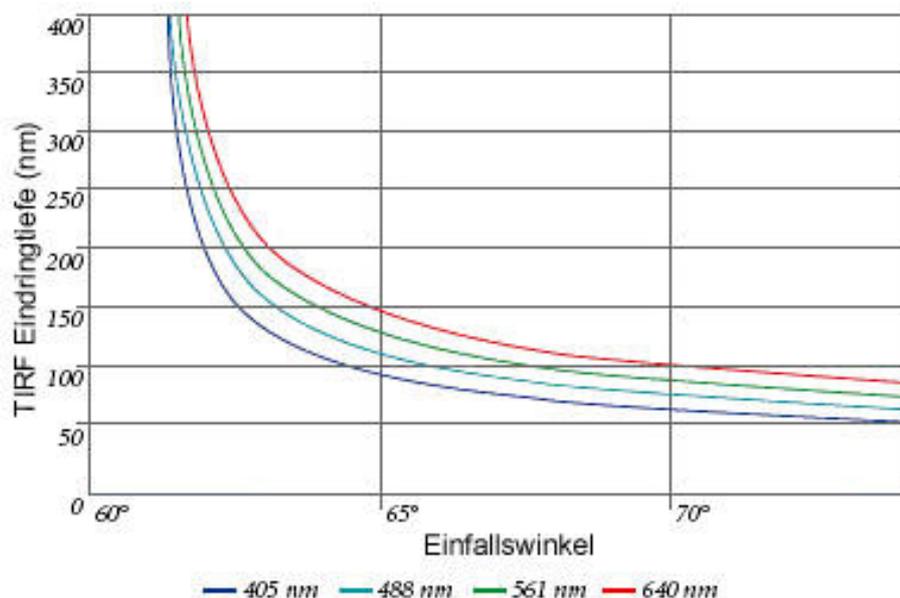


Abbildung 14: Eindringtiefe für verschiedene Einfallswinkel und Wellenlängen mit einem Standarddeckglas ($n = 1,523$) und Zytosol ($n = 1,33$) als Medien. Nach der Zeiss-Broschüre „Laser TIRF 3“, zu finden auf www.zeiss.de

Im Rahmen dieser Arbeit wurden die hochauflösenden Mikroskopieverfahren dSTORM und PALM mit TIRFM kombiniert. Zwar sind dSTORM bzw. PALM nicht zwangsläufig auf die Kombination mit TIRFM angewiesen. Jedoch stellt TIRFM die zurzeit einfachste und effektivste Möglichkeit dar, die Auflösung in z-Richtung zu verbessern, da dSTORM und PALM nur laterale Auflösungsvorteile im Vergleich zu herkömmlicher Lichtmikroskopie aufweisen. Die Kombination mit TIRFM beschränkt den Einsatz von lokalisationsmikroskopischen Verfahren auf oberflächennahe Strukturen.

1.1.9 Einzelmolekül-Lokalisationsmikroskopie

Die hochauflösenden Techniken PALM, STORM und dSTORM werden unter dem Begriff der Einzelmolekül-Lokalisationsmikroskopie zusammengefasst. Ihr gemeinsames Prinzip ist die sequenzielle Positionsbestimmung einzelner Fluorophore mit hoher Präzision. Im Gegensatz zur konventionellen Fluoreszenzmikroskopie werden nie alle Farbstoffmoleküle gleichzeitig, sondern immer nur kleine, zufällige Teilmengen zeitlich getrennt betrachtet. Nach und nach werden die Koordinaten verschiedener Farbstoffmoleküle nanometergenau bestimmt, bis schließlich genügend Fluorophore lokalisiert sind, um die errechneten Punkte zu einem vollständigen Gesamtbild überlagern zu können. Die Auflösung des aus den Koordinatenpunkten rekonstruierten Bildes kann das Beugungslimit bei Weitem überschreiten. Somit können Details sichtbar gemacht werden, welche im konventionellen Epifluoreszenzbild nicht zu erkennen sind. Aufgrund der „gepunkteten“ Darstellung wird die Einzelmolekül-Lokalisationsmikroskopie in Anlehnung an den aus der Kunst bekannten Stil auch als Pointillismus bezeichnet (Scherer NF 2006).

Wesentliche Voraussetzung für die Verwirklichung der hochauflösenden Einzelmolekül-Lokalisationsmikroskopie war die Erkenntnis, dass die Position eines einzelnen Farbstoffmoleküls sehr genau aus dessen beugungslimitiertem Abbild bestimmt werden kann. Hierzu wird die Photonenverteilung des Abbilds, also die Punktspreizfunktion, analysiert. An das Intensitätsprofil wird eine Gaußkurve angenähert, deren Gipfel der wahrscheinlichen Position des Moleküls entspricht. Die Breite der Kurve lässt sich mathematisch in Abhängigkeit von der Anzahl der detektierten Photonen (N) reduzieren. Dabei kann die Position umso genauer lokalisiert werden, je mehr Photonen detektiert wurden. Bei vernachlässigbarem Hintergrundrauschen kann die Lokalisationspräzision ($\delta_{x,y}$) mit der Gleichung

$$\delta_{x,y} \approx s / \sqrt{N}$$

ungefähr bestimmt werden. Die Variable s entspricht der ursprünglichen Größe der PSF. Beachtet man das Hintergrundrauschen (b) als Störgröße sowie die Pixelmaße der Kamera (q) wird die genannte Formel zu

$$\delta_{x,y} = \sqrt{[(s^2 / N) + (q^2 / 12N) + (8\pi s^4 b^2) / (q^2 N^2)]}$$

erweitert (Thompson RE et al. 2002). Für eine optimale Lokalisationspräzision benötigt man folglich möglichst helle, kontrastreiche Farbstoffe. Diese weisen einen hohen Extinktionskoeffizienten und eine effiziente Quantenausbeute auf. Letzteres ist ebenfalls eine gewünschte Eigenschaft der Kamerasysteme, da die Anzahl der detektierten Photonen durch solche mit hoher Quantenausbeute, wie z.B. EMCCD-Kameras, maximiert werden kann. Eine Verbesserung des Kontrastes kann darüber

hinaus durch die Reduktion des Hintergrundrauschens erreicht werden. Dies lässt sich sehr elegant durch die Kombination der pointillistischen Verfahren mit TIRF-Mikroskopie bewerkstelligen (Fernández-Suárez M & Ting AY 2008).

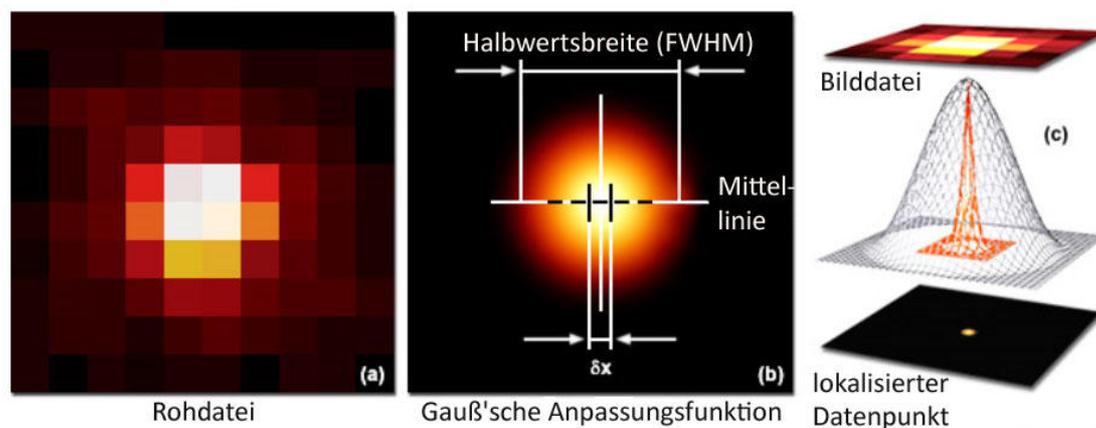


Abbildung 15: Positionsbestimmung eines Farbstoffmoleküls anhand des beugungslimitierten Abbilds. Das Intensitätsprofil wird als Gaußkurve dargestellt. Ihr Schwerpunkt entspricht der wahrscheinlichen Lokalisation des Fluorophors.

Nach <http://zeiss-campus.magnet.fsu.edu/articles/superresolution/palm/practicalaspects.html>

Einzelne Farbstoffmoleküle können auf diese Weise mit einer Präzision von bis zu wenigen Nanometern lokalisiert werden (Yildiz A et al. 2003). In der fertigen Rekonstruktion erscheinen die lokalisierten Moleküle als verkleinerte gaußsche Intensitätsverteilungen. Größe und Helligkeit verhalten sich proportional zur Lokalisationspräzision, d.h. je genauer die Position eines Moleküls ermittelt werden konnte, desto kleiner und heller erscheint seine Fläche im rekonstruierten Bild.

Vorraussetzung für die beschriebene Lokalisationsbestimmung ist, dass immer nur ein einziges Farbstoffmolekül in einem auflösbaren Umkreis aufgenommen wird. Liegen zwei oder mehr Fluorophore näher zusammen, können die einzelnen Moleküle aufgrund von Beugung nicht unterschieden werden. Der individuelle Intensitätsschwerpunkt ist dann nicht mehr ermittelbar. In fluoreszenzmarkierten biologischen Proben liegt jedoch meist eine Vielzahl von gleichzeitig fluoreszierenden Farbstoffmolekülen in nicht auflösbarer Nähe vor.

Aus diesem Grund konnte die hochauflösende Einzelmolekül-Lokalisationsmikroskopie von biologischen Proben erst nach der Entdeckung realisiert werden, dass manche Farbstoffe unter bestimmten Bedingungen ihre Fluoreszenzeigenschaften ändern. Beispielsweise lassen sich photoschaltbare Farbstoffe durch Bestrahlen mit Laserlicht einer definierten Wellenlänge an- und abschalten, während photokonvertierbare Farbstoffe dazu gebracht werden können ihr Emissionsspektrum zu verschieben. Bei der Anwendung pointillistischer Verfahren werden die

Bedingungen so gewählt, dass jedes Fluorophor eine nur sehr geringe Wahrscheinlichkeit hat seine Fluoreszenzeigenschaften zu verändern. Hierdurch kann erreicht werden, dass immer nur ein zufälliger kleiner Bruchteil der Fluorophore in einem gesonderten, „aktivierten“ Fluoreszenzzustand vorliegt. Ist dieser Bruchteil so gering, dass zu jedem Zeitpunkt nur ein Farbstoffmolekül in einem auflösbaren Umkreis seine Fluoreszenzeigenschaften ändert, so ist es von den anderen, direkt angrenzenden und normalerweise nicht diskriminierbaren Fluorophoren unterscheidbar. Es kann nun abgebildet und präzise lokalisiert werden. Die positionsbestimmten Farbstoffe bleichen schließlich aus oder wechseln zurück in ihren vorherigen Fluoreszenzzustand bevor in einem nächsten Zyklus eine zufällige andere Teilmenge der Fluorophore aktiviert und lokalisiert wird. Diese Schritte werden viele Tausend Male wiederholt - so oft bis die genauen Positionen möglichst vieler Farbstoffmoleküle bestimmt worden sind und hieraus ein vollständiges Bild rekonstruiert werden kann.

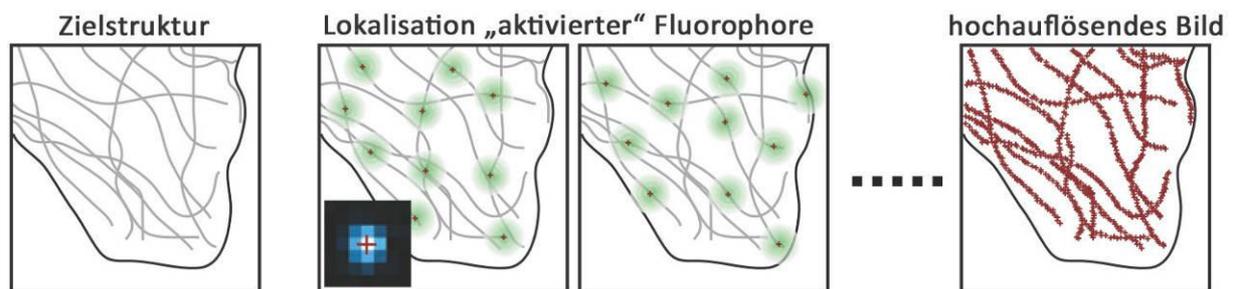


Abbildung 16: Prinzip der Einzelmolekül-Lokalisationsmikroskopie. Zu verschiedenen Zeitpunkten werden unterschiedliche Subpopulationen der Fluorophore aktiviert und lokalisiert. Schließlich werden die Koordinaten zu einer hochauflösenden Rekonstruktion überlagert. Nach Huang B et al. 2008a

In der Praxis ist es jedoch nicht möglich eine Rekonstruktion unter Einbeziehung eines jeden Farbstoffmoleküls der Probe zu erstellen. Einerseits werden nie alle Fluorophore der Probe lokalisiert. Dies liegt daran, dass nicht jedes einzelne Farbstoffmolekül im Laufe des Aufnahmevorgangs seine spektralen Eigenschaften ändert. So entziehen sich einige wenige Fluorophore der Detektion. Außerdem kommt es gelegentlich vor, dass doch mehrere Fluorophore zur selben Zeit in nichtauflösbarer Nähe aktiviert sind. Ihre Koordinaten können dann nicht bestimmt werden und sie müssen von der Rekonstruktion ausgeschlossen werden. Andererseits finden nie alle lokalisierten Fluorophore Beachtung, da es sinnvoll ist nur präzise ermittelte Fluorophore zu berücksichtigen, um eine möglichst hochauflösende Rekonstruktion der Probe zu erhalten. Durch die Installation eines Grenzwerts können nicht ausreichend genau positionsbestimmte Moleküle, z.B. alle mit einer Lokalisationsungenauigkeit von mehr als 20 nm, ausgeschlossen werden. Die Schwierigkeit ist es, einen optimalen Kompromiss aus Informationszugewinn durch hohe Lokalisationspräzision

und Informationsverlust durch Ausschluss von weniger genau lokalisierten Molekülen zu finden. Hierbei ist die entscheidende Frage, ab wann ein Bild als vollständig anzusehen ist. Zur objektiven Beantwortung bedient man sich des aus der Nachrichtentechnik stammenden Nyquist-Kriteriums. Es besagt, dass mindestens zwei Datenpunkte pro Auflösungseinheit zur fehlerfreien Rekonstruktion notwendig sind (Patterson G et al. 2010).

Im Folgenden werden die genannten pointillistischen Techniken vorgestellt. Die verschiedenen Verfahren unterscheiden sich in der Art der verwendeten Farbstoffe und der Weise, wie diese zu einem Ändern ihrer spektralen Eigenschaften gebracht, also „aktiviert“ werden.

1.1.9.1 Photoaktivierte Lokalisationsmikroskopie (PALM)

Im Jahr 2006 stellte die Arbeitsgruppe um Eric Betzig und Harald Hess erstmals das Verfahren der Photoaktivierten Lokalisationsmikroskopie (PALM) vor (Betzig E et al. 2006). Es basiert auf dem oben beschriebenen Prinzip der sequenziellen Positionsbestimmung kleiner Subpopulationen von Fluoreszenzmarkern. Für PALM-Experimente kommen fluoreszierende Proteine (FPs) zum Einsatz, welche von transfizierten Zellen exprimiert werden. Um für PALM geeignet zu sein, müssen die FPs dazu fähig sein, ihre spektralen Eigenschaften nach Bestrahlung mit Licht einer definierten Wellenlänge zu ändern. Diese Bedingung wird von drei Klassen von FPs erfüllt, den photoaktivierbaren (PA-FPs), den photoschaltbaren (PS-FPs) und den photokonvertierbaren FPs (PC-FPs).

Photoaktivierbare-FPs lassen sich irreversibel aktivieren. Werden sie mit violetterem oder UV-Licht bestrahlt („angeschaltet“), verlagert sich ihr Absorptionsmaximum hin zu größeren Wellenlängen. Sie können dann durch einen zweiten Laser zur Fluoreszenz angeregt werden. Das PA-GFP ist ein Beispiel dieser Proteinklasse. Es handelt sich um einen Abkömmling des Wildtyp-GFPs, bei welchem eine Aminosäure substituiert wurde. Nach seiner Photoaktivierung verschiebt sich das Absorptionsmaximum von 400 nm auf 504 nm. Wird die Probe z.B. mit einem 488-nm-Laser angeregt, geht die Photoaktivierung mit einer 100-fachen Steigerung der Fluoreszenz einher (Patterson GH & Lippincott-Schwartz J 2002).

Im Gegensatz zu den einfachen PA-FPs können Photoschaltbare-FPs reversibel aktiviert und deaktiviert werden. Am Beispiel des Proteins Dronpa, dem wohl bedeutendsten Vertreter dieser Klasse, lässt sich das Prinzip des Photoschaltens demonstrieren, siehe Abbildung 17. Dronpa kann mithilfe eines kurzwelligeren Lasers ($\lambda = 405 \text{ nm}$) vom dunklen, inaktiven in einen aktiven Zustand überführt werden. Die aktive Form lässt sich durch einen Laser der Wellenlänge 488 nm zur Fluoreszenz anregen (Absorptionsmaximum = 503 nm), deren Emissionsmaximum bei 518 nm liegt.

Gleichzeitig führt die Bestrahlung mit dem 488-nm-Laser dazu, dass Dronpa wieder in den dunklen, inaktiven Zustand wechselt. Erneute Exposition mit violetterm Licht reaktiviert Dronpa. Dies lässt sich

viele Hundert Male wiederholen, bevor ein endgültiges Ausbleichen auftritt (Habuchi S et al. 2005). Auf molekularer Ebene konnte beobachtet werden, dass beim Wechsel vom inaktiven in den aktiven Zustand eine Deprotonierung erfolgt. Umgekehrt kommt es bei der Inaktivierung der PS-FPs zu einer Protonierung. Es wird vermutet, dass hiermit cis-trans-Umlagerungen einhergehen, welche für das Photoschalten verantwortlich sind (Lukyanov KA et al. 2005).

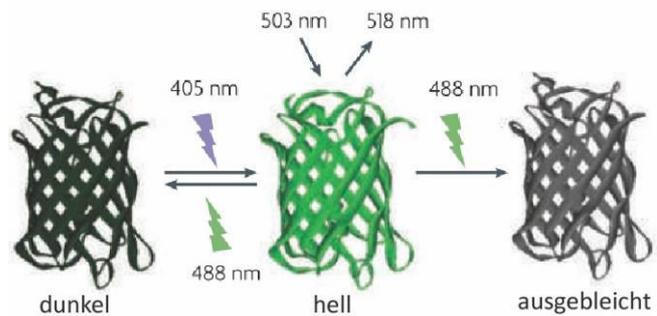


Abbildung 17: Photoschalten des Proteins Dronpa. Nach Fernández-Suárez M & Ting AY 2008

Die Photokonvertierbaren FPs unterscheiden sich von den beiden zuvor genannten Gruppen darin, dass sie nicht zwischen einem dunklen und einem hellen Zustand, sondern zwischen verschiedenen Emissionsspektren wechseln. Eines der am weitesten verbreiteten PC-FPs ist Eos, ein verhältnismäßig kontrastreiches Protein, siehe Abbildung 18. Im Grundzustand lässt es sich mittels 506-nm-Laser zu grüner Fluoreszenz anregen (Emissionsmaximum = 516 nm). Nach Aktivierung mit einem kurzwelligeren Laser ($\lambda = 405$ nm) verschieben sich sowohl Absorptions- als auch Emissionsmaxima in den Bereich von orange-rottem Licht (569 nm bzw. 581 nm).

Im Rahmen dieser Arbeit wurde eine aus zwei Einheiten zusammengesetzte Variante von Eos genutzt, das tandem dimer Eos (tdEos). Es zeichnet sich vor allem durch seine höhere Temperaturstabilität und geringere Aggregationsneigung aus (Nienhaus GU et al. 2005). Weitere bedeutsame PC-FPs sind z.B. Kaede und Dendra-2.

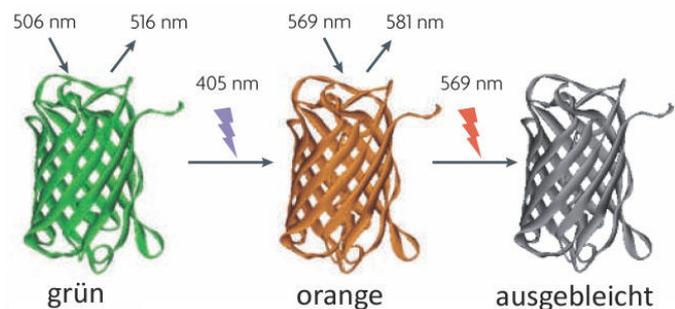


Abbildung 18: Photokonversion des Proteins Eos. Nach Fernández-Suárez M & Ting AY 2008

Die Verwendung von FPs weist einige wichtige Vorteile auf. So ist eine hochspezifische Markierung der Zielproteine möglich. Außerdem sind FPs deutlich kleiner als beispielsweise Antikörper, weshalb von einer genaueren Übereinstimmung von Fluoreszenzsignal und Position des Zielproteins ausgegangen werden kann. Darüber hinaus ist es prinzipiell möglich transfizierte Zellen lebend abzubilden. Dies kann unter weitestgehend physiologische Bedingungen geschehen, da zumindest die monomeren FPs zu keiner Funktionsstörung zellulärer Prozesse führen. Demgegenüber steht die Tatsache, dass selbst

die hellsten FPs deutlich weniger Photonen emittieren als synthetische Fluorophore. Folglich können FPs weniger präzise lokalisiert werden.

1.1.9.2 Stochastische Optische Rekonstruktionsmikroskopie (STORM)

Beinahe zeitgleich mit PALM wurde das sehr ähnliche Verfahren der Stochastischen Optischen Rekonstruktionsmikroskopie veröffentlicht (Rust MJ et al. 2006). Es unterscheidet sich im Wesentlichen darin, dass photoschaltbare synthetische Fluorophore statt FPs verwendet werden. Bei STORM werden Paare von synthetischen Fluorophoren als „Optische Schalter“ benutzt. Hiermit ist gemeint, dass die räumliche Nähe eines zweiten Fluorophors, die Reaktivierung des ersten erleichtert und so ein reversibles Photoschalten gestattet.

Das Verfahren wurde mit einem Paar aus den beiden Carbocyaninfarbstoffen Cy3 und Cy5, welche an fixierte DNA-Fragmente oder Antikörper gebunden waren, vorgestellt. Cy5 wird durch Exposition mit rotem Laserlicht einerseits zur Fluoreszenz angeregt und dient so als „Reporter“. Andererseits wird es durch das Rotlicht in einen stabilen, inaktiven Dunkelzustand überführt. Wird die inaktive Form von Cy5 mit einem grünen Laser bestrahlt, kehrt das Fluorophor wieder in seinen aktiven, fluoreszierenden Zustand zurück. Dieser Vorgang wird durch die Anwesenheit von Cy3 enorm erleichtert (Bates M et al. 2005), letzteres dient also als „Aktivator“. Neben der genannten wurden verschiedene weitere Kombinationen aus Aktivatoren, z.B. Alexa 405, und Reportern, wie beispielsweise Cy5.5 oder Cy7, erfolgreich eingesetzt (Bates M et al. 2007).

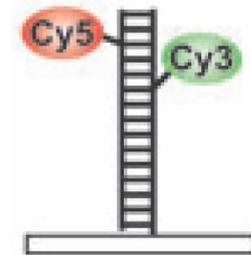


Abbildung 19: An DNA gekoppelter „Optischer Schalter“ aus Cy3 und Cy5.

Aus Rust MJ et al. 2006

1.1.9.3 direkte Stochastische Optische Rekonstruktionsmikroskopie (dSTORM)

Als vereinfachte Weiterentwicklung wurde im Jahr 2008 die direkte Stochastische Optische Rekonstruktionsmikroskopie (dSTORM) vorgestellt (Heilemann M et al. 2008). Im Unterschied zu STORM kommt dSTORM mit einzelnen Farbstoffen aus, welche ohne einen Aktivator reversibel aktiviert und deaktiviert werden können. Das Verfahren wurde zuerst mit den Carbocyaninfarbstoffen Cy5 und Alexa 647 durchgeführt, welche durch kurzwelliges Laserlicht reaktiviert werden konnten. Später wurden weitere Farbstoffe aus den Klassen der Rhodamine, z.B. Alexa 488 oder 532, und Oxazine, z.B. ATTO 655, erfolgreich eingesetzt (Heilemann M et al. 2009a).

1.1.9.4 Photoschalten synthetischer Fluorophore

Schaltbare synthetische Farbstoffe wechseln während des Aufnahmevorgangs reversibel zwischen einem fluoreszierenden „An“- und einem nichtfluoreszierenden „Aus“-Zustand. Dem „An“-Zustand entspricht die wiederholte Anregung ins S_1 -Niveau mit jeweils anschließender Rückkehr unter Fluoreszenzemission in den Grundzustand S_0 . In den „Aus“-Zustand gelangen Farbstoffe durch *intersystem crossing* vom S_1 - in den dunklen Triplett-Zustand (T). Die Geschwindigkeitsrate (k_{ISC}), mit welcher das *intersystem crossing* stattfindet, wird durch die Energie des Anregungslasers bestimmt (Heilemann M et al. 2009a). Die Rückkehr vom T- in den S_0 -Zustand kann auf verschiedene Weise erfolgen, siehe auch Kapitel 1.1.1.1. Der beschriebene Zyklus aus vorübergehender Dunkelheit und nachfolgender Fluoreszenz manifestiert sich als „Blinken“ des Farbstoffmoleküls.

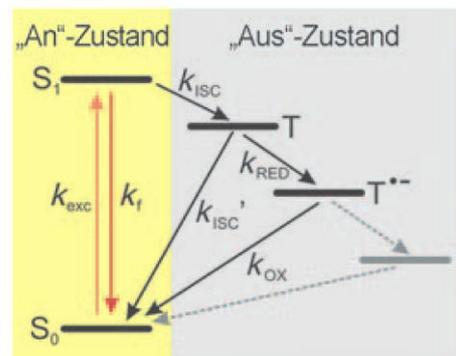


Abbildung 20: Erweitertes Jablonski-Schema.

Aus Heilemann M et al. 2009a

Wie bereits erläutert, darf zu jedem Aufnahmezeitpunkt nur ein geringer Bruchteil der Farbstoffmoleküle fluoreszieren. Um den Großteil der Fluorophore in einem dunklen Zustand halten zu können, muss also die Lebensdauer des „Aus“-Zustands deutlich länger als die des „An“-Zustands sein. Unter Standardbedingungen ist dies jedoch nicht der Fall; Triplett-Zustände haben lediglich eine Lebensdauer im Bereich von einigen Mikrosekunden (Beaumont PC et al. 1997). Langlebige „Aus“-Zustände können durch Zugabe einer Thiolverbindung (R-SH) zur Pufferlösung, in welcher die Probe abgebildet wird, geschaffen werden. Thiolationen ($R-S^-$) fungieren als Reduktionsmittel und reagieren bei physiologischen pH-Werten spezifisch mit sich im Triplett-Zustand befindenden Molekülen (T) zu Farbstoff-Radikalanionen ($T\cdot^-$) und Thiylradikalen ($R-S\cdot$). Die Farbstoff-Radikalanionen können anschließend direkt oxidiert werden, oder aber zu stabilen, nicht-fluoreszierenden Folgeprodukten reagieren. Auch diese können oxidiert werden. In beiden Fällen führt die Oxidation über einen Elektronentransfer zu einer Rückkehr in den Grundzustand S_0 , von wo aus die Moleküle erneut zur Fluoreszenz angeregt werden können (Heilemann M et al. 2009a). Da der Oxidationsschritt jedoch sehr ineffektiv ist, resultiert eine Verlängerung der Lebenszeit dunkler „Aus“-Zustände auf bis zu mehrere Hundert Millisekunden (van de Linde S et al. 2009).

Es konnte gezeigt werden, dass sich verschiedene Thiolverbindungen, wie z.B. β -Mercaptoethylamin, Dithiothreitol, aber auch das intrazellulär vorkommende Glutathion, in Konzentrationen von 10 bis 100 mM als Reduktionsmittel eignen. Für diese Arbeit wurde stets β -Mercaptoethylamin verwendet. Im Falle von Farbstoffen aus den Klassen der Rhodamine und

Oxazine fungiert molekularer Sauerstoff als Oxidationsmittel (Heilemann M et al. 2009a). Dagegen wird für Carbocyaninfarbstoffe stets auf die notwendige Abwesenheit von Sauerstoff, welcher sich enzymatisch aus der Pufferlösung entfernen lässt, hingewiesen (Heilemann M et al. 2005).

In dem beschriebenen Redox-Puffersystem lässt sich das „An- und Abschalten“ der Fluorophore gut steuern. Liegt genügend Reduktionsmittel vor, steigt die Abschaltgeschwindigkeit linear mit der Intensität des Anregungslasers, da dieser die Wahrscheinlichkeit für ein *intersystem crossing* von S_1 nach T erhöht. Außerdem kann über die Konzentration des Reduktionsmittels Einfluss auf das Reaktionsgleichgewicht genommen werden. Der pH-Wert der Pufferlösung ist ein weiterer, wichtiger Parameter. Je weniger H^+ -Ionen vorhanden sind, desto größer ist der Anteil des Thiolats ($R-S^-$), welches für die Reduktion der Farbstoffmoleküle im Triplettzustand verantwortlich ist (Heilemann et al. 2009a). Die Anschaltgeschwindigkeit lässt sich über das Hinzuschalten eines kurzwelligen Lasers mit einer Wellenlänge von beispielsweise 405 nm steigern. Dieser liefert die notwendige Energie für die Umkehr des Elektronenspins und somit für die Rückkehr in den Grundzustand.

1.2 Einleitung: Biologischer Teil

Die hochauflösende Einzelmolekül-Lokalisationsmikroskopie wurde anhand von Komponenten des Zytoskeletts – den Mikrotubuli und Aktinfilamenten – in HeLa-Zellen etabliert. dSTORM wurde anschließend für die Abbildung weiterer Zelltypen eingesetzt: neben bovinen Chromaffinzellen wurden humane und murine zytotoxische T-Zellen untersucht. Die folgenden Abschnitte sollen über die genannten Zellen und Strukturen informieren. Da der technische Aspekt im Vordergrund dieser Arbeit stand, handelt es sich lediglich um eine kurze Basisinformation.

1.2.1 HeLa-Zellen

Bei HeLa-Zellen handelt es sich um eine weit verbreitete, humane Dauerzelllinie. Die Epithelzellen wurden aus dem Zervixkarzinom der US-Amerikanerin Henrietta Lacks, die bereits im Jahre 1951 an ihrer Krebserkrankung verstarb, gewonnen. Von einer hochaggressive Variante dieses Tumors stammend, proliferieren HeLa-Zellen besonders schnell. Ihre Verfügbarkeit wird zusätzlich durch eine hohe Telomeraseaktivität gesteigert, welche die maximale Anzahl an Zellteilungen deutlich erhöht (Ivanković M et al. 2007). Die flächig wachsenden Zellen weisen darüber hinaus den Vorteil einer hohen Widerstandsfähigkeit gegenüber äußeren Einflüssen auf. Der genannten Vorteile wegen, gehören HeLa-Zellen zu den am besten erforschten Zellen überhaupt.

Große Bekanntheit erlangte die Zelllinie vor allem, weil es mithilfe von HeLa-Zellen gelang einen Impfstoff gegen Polio zu entwickeln (Salk JE et al. 1954).

1.2.2 Bovine Chromaffinzellen

Chromaffinzellen sind Zellen des Nebennierenmarks. Ihre Aufgabe ist es, in Stresssituationen die Katecholamine Adrenalin und Noradrenalin in den Blutkreislauf zu sezernieren, um so eine hauptsächlich kardiovaskuläre Anpassungsreaktion hervorzurufen. Unter Ruhebedingungen werden die Katecholamine zusammen mit verschiedenen Kofaktoren, wie z.B. Neuropeptid Y, in Form von LDCVs (*engl. large dense-core vesicles*) im Zytoplasma der Chromaffinzellen gespeichert.

Da das Nebennierenmark ausschließlich präganglionär durch Äste der Nervi splanchnici innerviert wird, handelt es sich funktionell um ein sympathisches Ganglion. Embryologisch entstammt das

Nebennierenmark der Neuralleiste und ist somit ektodermaler Herkunft (Schünke M et al. 2005). Da der Vorgang der Transmitterausschüttung große Ähnlichkeiten zu dem in echten synaptischen Zellen aufweist, eignen sich Chromaffinzellen gut als Modellsystem für die Erforschung der Exozytose (Burgoyne RD & Morgan A 1998).

1.2.3 Zytotoxische T-Zellen

T-Zellen sind Teil des zellulären Immunsystems. Innerhalb der Gruppe der T-Zellen werden die zytotoxischen T-Zellen (T_c) den T-Helferzellen (T_H) gegenübergestellt. T_H -Zellen kommt die Aufgabe zu andere Zellen zur Bekämpfung extrazellulärer Erreger zu stimulieren. Dagegen dienen T_c -Zellen der Abwehr von intrazellulären Krankheitserregern, vor allem Viren, und Tumorzellen durch Abtöten der krankhaften Zelle. Auf ihrer Oberfläche tragen T_c -Zellen den Korezeptor CD-8 (*engl. cluster of differentiation*). Dieser interagiert mit MHC-I-Molekülen (*engl. major histocompatibility complex*), welche auf der Plasmamembran aller kernhaltigen Körperzellen vorkommen. Über MHC-I-Moleküle werden Fragmente zelleigener Proteine präsentiert. Viral oder tumurös veränderte Proteine können so durch CD-8-positive Zellen erkannt werden. In der Folge sezerniert die T_c -Zelle gespeicherte Vesikel, welche unter anderem Perforine und Granzyme beinhalten. Ausgeschüttete Perforine bilden Poren in der Plasmamembran der Zielzelle. Durch einströmende Flüssigkeit schwillt die Zelle an. Außerdem fließen extrazelluläre Kalziumionen ins Zellinnere, was eine Apoptose auslösen kann. Gleichzeitig gelangen die von der T_c -Zelle sezernierten Granzyme durch die Perforinporen in die Zielzelle. Dort induzieren sie die Apoptose durch Spaltung von Caspasen (Horn F et al. 2005).

1.2.4 Mikrotubuli

Das Mikrotubulsystem ist ein Bestandteil des Zytoskeletts. Mikrotubuli sind lange, hohle Proteinzylinder mit einem Durchmesser von 25 nm. Sie bestehen aus den globulären Untereinheiten α - und β -Tubulin, welche sich nichtkovalent zu Dimeren zusammenlagern. Die Dimere sind wiederum zu langen Ketten, den Protofilamenten, verknüpft. Ein kompletter Mikrotubulus besteht schließlich aus 13, zu einem Rohr angeordneten Protofilamenten. Der Auf- und Abbau eines Mikrotubulus kann mit hoher Geschwindigkeit erfolgen, was dem System eine große Dynamik verleiht. In der Zelle werden die Mikrotubuli vom Zentrosom, auch MTOC (*engl. microtubule organizing centre*) genannt, organisiert. Es handelt sich hierbei um eine zellkernnahe Struktur, die sogenannte Keimbildungsstellen aufweist. Die Keimbildungsstellen sind Ringe aus γ -Tubulin. Sie stellen den Ausgangspunkt für das Wachstum der Mikrotubuli dar (Alberts B et al. 2005).

Die Funktionen des Mikrotubulsystems in der Zelle sind vielseitig. Da es sich um polare Strukturen handelt, kann es mithilfe von Motorproteinen, wie z.B. Dynein und Kinesin, zur gerichteten Bewegung entlang der Filamente kommen. Einerseits können hierdurch in Zilien und Flagellen enthaltene Mikrotubuli gegeneinander bewegt werden, wodurch die Motilität bestimmter Zellen sichergestellt wird. Andererseits wird ein gerichteter Transport von Zellbestandteilen, wie Organellen und Vesikeln, entlang eines Mikrotubulus ermöglicht. Außerdem bilden Mikrotubuli im Rahmen der Zellteilung die Mitosespindel aus und dienen so der gleichmäßigen Aufteilung der Chromosomen auf die Tochterzellen. Pathophysiologisch sind Mikrotubuli und mit ihnen assoziierte Proteine in der Entstehung neurodegenerativer Erkrankungen, wie z.B. Morbus Alzheimer, von großer Bedeutung.

1.2.5 Aktinfilamente

Wie Mikrotubuli zählen auch Aktinfilamente zum Zytoskelett eukaryotischer Zellen. Mit einem Durchmesser von nur 7 nm stellen sie dessen dünnsten Bestandteil dar. Globuläre Aktinproteine (G-Aktin) lagern sich zu langen, verdrehten Filamenten (F-Aktin) zusammen, wobei nur ungefähr die Hälfte des in der Zelle vorkommenden Aktins in filamentöser Form vorliegt. Die Filamente sind meist in Bündeln oder komplexen Netzwerken organisiert, die das gesamte Zytosol durchspannen und im Zusammenspiel mit anderen Proteinen vielfältige Aufgaben erfüllen.

So sind Aktinfilamente zentraler Bestandteil kontraktile Strukturen. Beispielsweise verschieben sich Aktin- und Myosinfilamente bei der Muskelkontraktion auf ein Kalziumsignal hin gegeneinander. Auch der kontraktile Ring, der die Zellteilung besiegelt, besteht aus Aktinfilamenten. Darüber hinaus kommen sie in kleinen kontraktile Bündeln vor. Deren Anspannung ist Bestandteil einer „Kriechbewegung“ bestimmter Zelltypen, wie z.B. Fibroblasten. Hierzu trägt zusätzlich eine gerichtete Aktinpolymerisierung bei, in deren Rahmen es zur Ausbildung von blatt- und fingerförmigen Ausstülpungen, den Lamelli- und Filopodien, kommt. All dies unterstreicht die Bedeutung des Aktinzytoskeletts für die zelluläre Motilität. Neben Kontraktilität und Motilität sind Aktinfilamente zudem für die mechanische Stabilität einer Zelle mitverantwortlich. Direkt unterhalb der Plasmamembran findet sich eine Schicht besonders dicht verknüpfter Aktinfilamente, der Aktinkortex. Dieser bestimmt die Form der Zelle und verankert membranöse Proteine, wie Rezeptoren und Ionenkanäle (Alberts B et al. 2005, Horn F et al. 2005). Auch spielen Aktinzytoskelett und -kortex eine wichtige Rolle im Zusammenhang mit vesikulären Transport und Exozytose in sekretorischen Zellen (Trifaró JM et al. 2008).

1.3 Fragestellung

Im Labor der Arbeitsgruppe von Professor Rettig im Physiologischen Institut der Universität des Saarlandes, Homburg, stand der Prototyp eines Mikroskops der Firma Carl Zeiss zur Verfügung. Neben SIM konnten mit diesem auch PALM und dSTORM betrieben werden. Während das Gerät bereits für SIM-Aufnahmen genutzt wurde, gab es zu PALM und dSTORM noch keinerlei Erfahrungen.

Für meine Arbeit galt es folgende Fragestellungen zu behandeln:

- 1) Wie können PALM und dSTORM zur Anwendung gebracht werden?
- 2) Können die Techniken durch einen Auflösungsgewinn im Vergleich zu konventioneller Mikroskopie und vor allem zu SIM validiert werden?
- 3) Wie stellt sich die Struktur des Mikrotubulsystems in der immunologischen Synapse von zytotoxischen T-Lymphozyten hochauflösend dar?
- 4) Wie sind Syntaxin-Cluster in der Zellmembran von Chromaffinzellen und zytotoxischen T-Lymphozyten verteilt und zeigt sich in der hochauflösenden Aufnahme eine Kollokalisierung mit sekretorischen Vesikeln?

2. Material und Methodik

2.1 Material

2.1.1 Substanzen

Substanz	Firma
Agarose	Carl Roth GmbH
BSA (bovines Serumalbumin)	Sigma
Cysteamin bzw. β -Mercaptoethylamin	Sigma
EDTA	Sigma
Ethidiumbromid	Invitrogen
FCS (fetales Kälberserum)	Invitrogen
Formaldehyde 16%	Polysciences
D(+)-Glucose-Monohydrat	Merck
Glutamin	Sigma
Glutaraldehyd	Electron Microscopie Sciences
Glycerol	Carl Roth GmbH
Glycin	Carl Roth GmbH
Goldbeads (\varnothing 100 nm)	BBinternational
Interleukin-2 (IL2) Recombinant Human	Invitrogen
Interleukin-2 (IL2) Recombinant Mouse	Invitrogen
Isopropanol	Carl Roth GmbH
ITS-X	Invitrogen
Mowiol	Calbiochem
NGS (neutrales Ziegen Serum)	PANBiotech
Nucleofactor solution	Lonza
Polyornithin	Sigma
Penicillin-Streptomycin, flüssig	Invitrogen
Salpetersäure 69%	Merck
TetraSpecks (\varnothing 100 nm)	Invitrogen
Triton X-100	Carl Roth GmbH
Trypanblau	Sigma

2.1.2 Enzyme

Enzym	Firma
BshT1	Fermentas
Catalase	Sigma
Glucoseoxidase	Sigma
Kollagenase	Sigma

NotI	Biolabs
SAP (alkalische Phosphatase)	Biolabs
T4-Ligase	Fermentas
Trypsin (TrypLE Express)	Invitrogen

2.1.3 Antikörper und Peptidfarbstoffe

Antikörper/Farbstoff	Firma
Hamster anti-Maus CD28-Antikörper	BD Biosciences
Hamster anti-Maus CD3-Antikörper	BD Biosciences
HPC-1, anti-Syntaxin-1, Mausenzites	Richard Jahn
Kaninchen anti-humaner/-Maus Syntaxin-11N-Antikörper	Mahantappa Halimani
Kaninchen, polyklonaler anti- α -Tubulin-Antikörper	Abcam
Maus anti-humaner CD3-Antikörper	Cell sciences
Maus anti-humaner CD28-Antikörper	BD Biosciences
Maus anti-humaner Perforin-Antikörper, konjugiert mit Alexa Fluor® 647	BioLegend
Phalloidin Alexa Fluor® 488	Invitrogen
Phalloidin Alexa Fluor® 647	Invitrogen
Ziege anti-kaninchen IgG Alexa Fluor® 488	Invitrogen
Ziege anti-kaninchen IgG Alexa Fluor® 568	Invitrogen
Ziege anti-kaninchen IgG Alexa Fluor® 647	Invitrogen

2.1.4 Medien, Puffer und sonstige Lösungen

Medium / Puffer / Lösung	Firma
AIMV-Medium	Invitrogen
DMEM	Invitrogen
DPBS	Invitrogen
RPMI-Medium	Invitrogen
Tris	Carl Roth GmbH

Medium / Puffer / Lösung	Bestandteile
4%ige PFA-Lösung (40 ml)	10 ml 16%iges PFA (eine Ampulle); 8 ml 5xPBS; 22 ml destilliertes Wasser In 1,5 ml Eppendorfgefäße aliquottieren und bei -21° C aufbewahren
5xPBS	58 mM Na ₂ HPO ₄ ; 17 mM NaH ₂ PO ₄ ; 83 mM NaCl pH = 7,4; 328 mOsm
Blockierungspuffer (bovine Chromaffinzellen)	0,25% Triton X-100 + 5% NGS in DPBS
Blockierungspuffer (HeLa-Zellen und murine zytotoxische T-Zellen)	0,1% Triton X-100 + 2% BSA in DPBS
Chromaffinzellmedium	für eine 6-Kammer-Platte: 20 ml DMEM; 400 μ l ITS-X; 80 μ l Pen./Strep.
Erythrozytenlysepuffer	155 mM NH ₄ Cl (0,829 g in 100 ml H ₂ O); 10 mM KHCO ₃ (0,1 g

	in 100 ml H ₂ O); 0,1 mM EDTA (0,0038 g in 100 ml H ₂ O); pH = 7,3
Locke's Lösung	154 mM NaCl; 5,6 mM KCl; 0,85 mM NaH ₂ PO ₄ x H ₂ O; 2,15 mM Na ₂ HPO ₄ x H ₂ O; 10 mM Glukose pH = 7,4; 312 mOsm
Mounting-Medium	2,4 g Mowiol; 6 g Glycerol; 6 ml destilliertes Wasser 2 h bei RT auf Magnetrührer, dann 12 ml Tris-Puffer (0,2 M; pH = 8,5) hinzufügen Über Nacht bei 53° C auf Magnetrührer inkubieren
Permeabilisierungslösung	DPBS + 0,1% Triton X-100

2.1.5 Geräte, Deckgläser und Zellkultur-Platten

Gerät / Platte	Firma
6-Kammer-Platte	BD Falcon
24-Kammer-Platte	BD Falcon
Deckgläser (Ø 12 mm, n = 1,523)	Kindler
Deckgläser (Ø 25 mm, n = 1,523)	Hecht
HI-Deckgläser (n = 1,662)	Zeiss
Neon transfection system (Transfektionsgerät)	Invitrogen
Nucleofector II (Transfektionsgerät)	Lonza
Zellsieb (Ø 70 µm)	BD Biosciences

2.1.6 Mikroskop-Prototyp

Gerät / Komponente	Firma
EMCCD Kamera iXon EM+885	Andor
Immersol 518F (n = 1,518)	Zeiss
Immersol HI 1,66 (n = 1,661) Labormuster	Zeiss
Inkubator XL LSM 710 S1	Zeiss
Laserlinie 405 nm, 50 mW	Zeiss
Laserlinie 488 nm, 100 mW für LSM Live	Zeiss
Laserlinie 561 nm, 40 mW für LSM Live	Zeiss
Laserlinie 635 nm, 30 mW	Zeiss
Objektiv "Plan-Apochromat" 63x / 1,40 NA Oil DIC M27	Zeiss
Objektiv α "Plan-Fluar" 100x / 1,45 NA Oil M27	Zeiss
Objektiv "Plan-Apochromat" 100x / 1,57 NA HI Oil DIC	Zeiss
X-Cite 120 XL FL Beleuchtungssystem	Lumen Dynamics
Z-Axis Piezo Stage P-737.1SL	Zeiss

2.1.7 Auswertprogramme

Programm	Firma
ImageJ, Version 1.43	Wayne Rasband, National Institutes of Health, USA
Zen 2009, Version 5.5.0.188 (online PC)	Zeiss
Zen 2010, Version 6.3.0.11 (offline PC)	Zeiss

2.2 Methodik

2.2.1 Molekularbiologische Methoden

Im Rahmen dieser Arbeit wurde das Verfahren PALM anhand von Experimenten mit transfizierten HeLa-Zellen erprobt. Mit Paxillin-tdEos (freundlicherweise von Dr. Ulf Matti bereitgestellt) stand ein Konstrukt zur Verfügung, welches für ein photokonvertierbares fluoreszierendes Protein kodierte. Nach der erfolgreichen Testung war es das Ziel Aktinfilamente mit tdEos zu markieren. Hierzu wurde eine Klonierung durchgeführt, bei welcher tdEos mit dem Markerprotein Lifeact fusioniert wurde. Lifeact zeichnet sich vor allen Dingen durch die Möglichkeit zur Untersuchung des Aktinzytoskeletts an lebendigen Zellen aus (Riedl J et al. 2008).

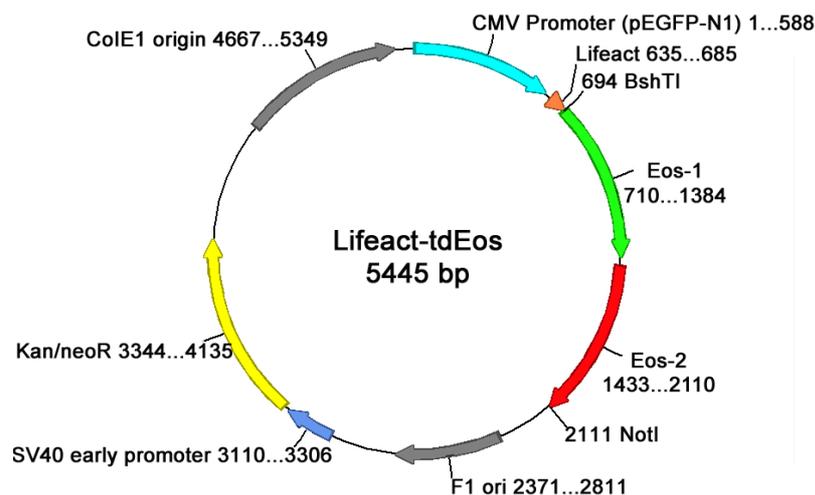


Abbildung 21: Plasmidkonstrukt Lifeact-tdEos. Es sind zusätzlich die Sequenzabschnitte für die Antibiotikaresistenz gegen Kanamycin und die Schnittstellen der eingesetzten Restriktionsenzyme dargestellt. Weiterhin sind Replikationsursprünge sowie die CMV-Promotorsequenz eingezeichnet.

2.2.1.1 Restriktionsspaltung

Um gezielt DNA-Fragmente auszuschneiden kommen Restriktionsenzyme zum Einsatz. Diese Endonukleasen hydrolysieren die Bindung von Phosphatgruppe und Desoxyribose im Zuckerphosphatrückgrad von DNA-Strängen. Die Spaltung erfolgt dabei an enzymespezifischen Sequenzen. Für die Produktion des Konstrukts aus Lifeact und tdEos diente Lifeact-GFP als Vektor. GFP wurde durch ein tdEos-Insert ersetzt, welches zuvor aus dem bereits vorhandenen Konstrukt Paxillin-tdEos ausgeschnitten worden war.

Lifeact-GFP	Paxillin-tdEos
1 µl DNA (ca. 3 µg)	2,5 µl DNA (ca. 3 µg)
5 µl Puffer O ⁺	5 µl Puffer O ⁺
2 µl <i>Bsh</i> TI	2 µl <i>Bsh</i> TI
2 µl <i>Not</i> I	2 µl <i>Not</i> I
40 µl H ₂ O dest.	38,5 µl H ₂ O dest.
Total = 50 µl	Total = 50 µl

Die verwendeten Restriktionsenzyme *Bsh*TI und *Not*I führen sogenannte Überhangsspaltungen durch, d.h. es erfolgt ein versetzter Schnitt der beiden DNA-Stränge. Um eine Spaltung möglichst aller Plasmide zu erreichen, wurden die Lösungen zwei Stunden lang bei 37° C inkubiert.

2.2.1.2 Dephosphorylierung des Vektors

Zur Vermeidung einer Religation der linearisierten Vektor-DNA wurde der Vektorlösung 1 µl alkalische Phosphatase (SAP) hinzugefügt. Diese entfernt 5'-Phosphatgruppen an den Schnitträndern des Vektors, sodass keine Rezirkulation mehr möglich ist. Nach einer einstündigen Inkubation bei 37° C wurde die SAP inaktiviert. Hierzu erfolgte ein 15-minütiger Hitzeschock bei 75° C.

2.2.1.3 Gelelektrophorese und -extraktion

Um die gewonnenen DNA-Spaltprodukte von Vektor und Insert anhand ihrer Größe zu identifizieren und aufzutrennen, wurde eine Gelelektrophorese durchgeführt. Diese erfolgte 45 Minuten lang in 1%igem Agarosegel bei 80 V. Die DNA-Banden wurden anschließend unter UV-Beleuchtung mithilfe eines Skalpell aus dem Gel geschnitten und in Eppendorf-Gefäße überführt.

Die Gelextraktion wurde mithilfe der Qiagen „Quick-Spin-Säulen“ gemäß den Herstellerangaben durchgeführt. Als Erstes wurden die ausgeschnittenen Gelbanden vollständig aufgelöst. Dies geschah mittels QG-Puffer, von welchem das Dreifache des Gelvolumens zugefügt wurde. Nach zehn Minuten Inkubation bei 50° C konnte die Lösung aus DNA und flüssigem Gel in die Qiagen-Säulen überführt werden. Während die hochgesalzte DNA am Säulenmaterial haften blieb, konnte das flüssige Gel mittels Zentrifugation von der DNA entfernt und verworfen werden. Zum Waschen der DNA wurde mit Ethanol versetzter PE-Puffer auf die Säule gegeben und eine weitere Zentrifugation durchgeführt. Um die DNA schließlich zu lösen, wurde „Eluierungspuffer“ (EB-Puffer) hinzugefügt. Durch erneute Zentrifugation konnte die aufgereinigte DNA in einem Eppendorf-Gefäß aufgefangen werden. Die

Konzentrationsbestimmung erfolgte durch Gelelektrophorese und Vergleich mit einem Marker mit bekannter DNA-Konzentration der Einzelbanden.

2.2.1.4 Ligation

Zur Verknüpfung der DNA-Stränge wurde die T4-DNA-Ligase eingesetzt. Diese katalysiert die Entstehung einer Esterbindung zwischen einem 5'-Phosphatrest und einer 3'-Hydroxylgruppe. Als Ligationskontrolle wurde ein zusätzlicher Ansatz ohne Insert hergestellt. Die Lösungen wurden über Nacht bei 16° C inkubiert.

Lifeact + tdEos	Ligationskontrolle
1 µl Vektor (ca. 20 µg)	1 µl Vektor (ca. 20 µg)
5 µl Insert (5 ng/µl)	kein Insert
2 µl T4-Puffer	2 µl T4-Puffer
2 µl T4-Ligase	2 µl T4-Ligase
10 µl H ₂ O dest.	15 µl H ₂ O dest.
Total = 20 µl	Total = 20 µl

2.2.1.5 Transformation

Die hergestellte Plasmid-DNA wurde nun in kompetente Zellen transformiert. Hierbei handelt es sich um speziell behandelte Escherichia-coli-Bakterien, welche bei -80° C aufbewahrt und für die Transformation fünf bis zehn Minuten lang auf Eis aufgetaut werden. Die Plasmid-DNA wurde zu 100 µl kompetenter Zellen gegeben und 30 Minuten auf Eis inkubiert. Es folgten ein fünfminütiger Hitzeschock bei 37° C und weitere zehn Minuten auf Eis. Anschließend wurde der Ansatz vom Eis genommen, mit 300 µl LB-Puffer versetzt und 30 Minuten lang im Schüttelinkubator (ca. 500 rpm) aufbewahrt. Die transformierten Zellen wurden schließlich mit einem sterilen Drigalskispatel auf einer mit dem Antibiotikum Kanamycin versetzten Agarplatte ausplattiert und über Nacht bei 37° C im Inkubator aufbewahrt. Da nur die transformierten Zellen resistent gegenüber dem Antibiotikum waren, wuchsen ausschließlich sie zu Kolonien heran.

2.2.1.6 Plasmidisolation

Um eine große Menge der Plasmid-DNA zu gewinnen, wurde das Verfahren der Maxipräparation nach Angabe des „Plasmid Purification Handbook“ von Qiagen (3. Edition, 2005) angewandt. Im Rahmen dieses Verfahrens werden transformierte Bakterienzellen alkalisch lysiert und die Plasmid-DNA mithilfe von Anionen-Austauscherharzen gebunden. Verschiedene Puffer und Enzyme

gewährleisten das Ausfallen von genomischer DNA, Proteinen und anderen unerwünschten Molekülen sowie die Spaltung von RNA-Strängen. Die aufgereinigte Plasmid-DNA wird mit einer Hochsalzlösung eluiert und schließlich mittels Isopropanol gefällt.

Mithilfe einer Pipettenspitze wurden 250 ml LB-Medium mit Bakterienzellen einer Kolonie angeimpft. Die Bakterien konnten über Nacht im Schüttelinkubator bei 37° C proliferieren und wurden am nächsten Tag geerntet. Hierzu wurde die Suspension aus Zellen und Medium in mehrere 50-ml-Falcongefäße überführt. Durch achtminütige Zentrifugation mit 8000 rpm bei 4° C und Entfernung des Überstands wurden die Bakterienzellen separiert. Als Nächstes wurde das Zellpellet mit 10 ml des mit RNase A [100 µg/ml] versetzten P1-Puffers resuspendiert. Danach wurden 10 ml des P2-Puffers zugegeben und die Lösung durch wiederholtes Invertieren gründlich gemischt. Während der anschließenden Inkubation für fünf Minuten bei Raumtemperatur erfolgte die Lyse der Zellen, RNA wurde gespalten und Proteine, Chromosomen und Plasmide denaturiert. Es folgten die Zugabe von 10 ml gekühlten P3-Puffers (4° C), erneutes Mischen und eine 20-minütige Inkubation auf Eis, was zum Ausfallen von SDS und zur Renaturierung der Plasmid-DNA führte. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden Präzipitat und plasmidhaltige Lösung mithilfe eines Spritzenfilters getrennt. Letztere wurde auf die zuvor mit 10 ml QBT-Puffer equilibrierte Anionenaustauschersäule gegeben. Der Durchlauf wurde abgewartet, bevor die Säule zweimal mit 30 ml QC-Puffer gespült wird. Die an die Säule gebundene Plasmid-DNA wurde mit 15 ml QF-Puffer eluiert und in einem 50-ml-Falcongefäß gesammelt. Um die DNA auszufällen, wurde Isopropanol in einem Volumen von 10,5 ml hinzugefügt und die Lösung 30 Minuten lang mit 5000 rpm bei 4° C zentrifugiert. Nachdem der Überstand verworfen worden war, wurde das DNA-Pellet mit 70% Ethanol gewaschen und nochmals für 10 Minuten bei 5000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde erneut verworfen, das Pellet wurde ca. 5 Minuten antrocknen gelassen, schließlich in 100 µl TE-Puffer resuspendiert und bei -21° C aufbewahrt.

Die Konzentrationsbestimmung der gewonnenen DNA erfolgte mithilfe eines Vergleichs der Bandenintensität mit einem standardisierten Marker in 1%igem Agarosegel unter UV-Beleuchtung.

2.2.2 Kultur der HeLa-Zellen

Die HeLa-Zellen wurden in DME-Medium (10% FCS, 1% Penicillin/Streptomycin) im Inkubator bei 37,1° C, 5% CO₂ und 95% Luftfeuchtigkeit kultiviert. Für Experimente wurden die Zellen drei Minuten lang mit TrypLE Express behandelt und durch Klopfen und Abspülen vom Boden der Kulturflasche gelöst. Nach dem Zählen in einer Neubauer-Zählkammer wurden typischerweise 15 x 10⁴ Zellen auf Deckgläser in einer 6-Kammer-Platte pipettiert. Deckgläser und 6-Kammer-Platte wurden zuvor

mindestens 20 Minuten lang mit UV-Licht bestrahlt. Nach Zugabe der Zellen wurde die 6-Kammer-Platte für mindestens 24 bis maximal 72 Stunden im Inkubator bei 37,1° C, 5% CO₂ und 95% Luftfeuchtigkeit gelagert, bevor mit Experimenten begonnen wurde. Nach dieser Zeit waren die Zellen fest an der Oberfläche der Deckgläser angewachsen und eine ausreichende Zelldichte durch Proliferation erreicht. Für fluoreszenzmikroskopische Experimente stellte sich eine Zelldichte von ca. 75% der Deckglasoberfläche als günstig heraus.

2.2.3 Präparation und Kultur boviner Chromaffinzellen

Die Chromaffinzellen wurden aus von einem Schlachthof bezogenen Rindernebennieren gewonnen. Als Erstes wurden die Nebennieren von Fett und Bindegewebe befreit. Zum anschließenden Spülen der Organe wurde reichlich Locke's-Lösung durch einen venösen Gefäßstumpf gespritzt. Die Nebennieren wurden dann ca. 5 Minuten lang in Locke's-Lösung gebadet, bevor der vorangegangene Spülschritt zwei- bis dreimal wiederholt wurde. Zum Verdau der Organe wurde Locke's-Lösung mit Kollagenase versetzt (129,5 U/ml) und die Lösung in die Nebennieren injiziert. Um einen gleichmäßigen Verdau zu gewährleisten, wurden die Organe nach ca. zehn bis zwölf Minuten – abhängig von ihrer Größe – auf die andere Seite gewendet. Der Verdau wurde nach insgesamt ca. 20 bis 25 Minuten durch Spülen mit 10% FCS enthaltender Locke's-Lösung gestoppt. Nachdem die Nebennieren aufgeschnitten worden waren, wurde das Mark von der Rinde getrennt. Das mit einer Schere zerkleinerte Mark wurde nun zusammen mit Locke's-Lösung + 10% FCS in ein Falcon-Gefäß überführt und bei 700 rpm zentrifugiert. Um die Chromaffinzellen von anderen Gewebsbestandteilen zu trennen, wurde das Pellet mit einem Zellsieb gefiltert. Zur weiteren Reinigung erfolgten mehrere Zentrifugationen mit Absaugung des Überstands und Resuspension. Schließlich wurden die Zellen gezählt, auf 3 x 10⁵ Zellen/ml verdünnt und auf Deckgläser in 6-Kammer-Platten ausplattiert. Nach 15 Minuten im Inkubator bei 37° C und 12% CO₂ wurden 3 ml Chromaffinzellmedium pro Kammer zu den Zellen gegeben. Die Chromaffinzellen konnten nun bis zum Beginn der Experimente im Inkubator aufbewahrt werden.

2.2.4 Präparation und Kultur muriner zytotoxischer T-Zellen

Die CD8-positiven T-Zellen wurden aus den Milzen von Mäusen gewonnen. Hierzu wurden die Mäuse nach CO₂-Betäubung durch zervikale Dislokation getötet und die Milzen entnommen. Nach grober Entfernung des Fetts wurden die Milzen mit einer Spritze zerkleinert und das homogenisierte Gewebe mittels BD-Rundfilter (Ø 70 µm) gefiltert. Die abfiltrierte Zellsuspension wurde mit einem

Erythrozytenlysepuffer behandelt und in RPMI-Medium gelagert. Zur Isolation der CD8-positiven T-Zellen aus der Gesamtheit der Milzzellen wurde das Kit „Dynabeads® FlowComp Mouse CD8“ von Invitrogen verwendet und den Angaben des Herstellers entsprechend verfahren. Es handelte sich hierbei um eine magnetische Positivisolation. Als Erstes wurden die CD8-positiven T-Zellen mit einem aus Ratten gewonnen CD8-Antikörper markiert. Die antikörpermarkierten Zellen konnten von den nun zugefügten, magnetischen Dynabeads erkannt und gebunden werden, sodass der gewünschte Zelltyp magnetisch markiert war. Durch Positionierung des das Zellgemisch beinhaltenden Falcon-Gefäßes (15 ml) in einem Magnethalter wurden die CD8-positiven T-Zellen vom Rest separiert. Abschließend wurden Dynabeads und CD8-Antikörper durch Zugabe des sogenannten „Release Buffers“ wieder von den T-Zellen gelöst. Um die Zellsuspension von den nun wieder ungebundenen Dynabeads zu befreien, wurde das Falcon-Gefäß erneut in den Magnethalter platziert. Während die Dynabeads an der dem Magneten zugewandten Seite des Gefäßes hafteten, konnte die Zellsuspension in ein anderes Gefäß überführt werden.

Die gewonnenen naiven T-Zellen wurden mit „Dynabeads Mouse T-Activator CD3/CD28“ der Firma Invitrogen stimuliert. Die Beads wurden in einem Bead-zu-Zell-Verhältnis von 1:1 zu den Zellen gegeben. Zusätzlich wurden 50 U/ml rekombinantes Interleukin-2 zugefügt. Nach drei Tagen im Inkubator bei 37° C und 5% CO₂ konnten die Beads mithilfe des Magnethalters entfernt und die Zellen für Experimente verwendet werden.

2.2.5 Präparation und Kultur humaner zytotoxischer T-Zellen

Naive CD8-positiv T-Zellen wurden aus dem Blut gesunder Spender gewonnen. Hierzu wurde das Verfahren der magnetischen Negativisolation mithilfe des Kits „Dynabeads® Untouched Human CD8 T Cells“ von Invitrogen den Angaben des Herstellers folgend durchgeführt. Das Prinzip beruht auf der Zugabe eines mitgelieferten Gemischs aus verschiedenen Antikörpern, welche an alle nicht-CD8-positiven Zellen binden. Die im nächsten Schritt zugegebenen magnetischen Dynabeads binden wiederum an die Antikörper. Mithilfe eines Magnetständers können die nun magnetisch markierten Zellen von den nichtmarkierten CD8-positiven T-Zellen getrennt werden. Die isolierten CD8-positiven T-Zellen wurden in vorgewärmtem AIMV-Medium, welches mit 10% FCS versetzt worden war, resuspendiert.

Um die naiven CD8-positiven T-Zellen zu stimulieren wurden „Dynabeads® Human T-Expander CD3/CD28“ von Invitrogen eingesetzt. Die Beads wurden in einem Verhältnis von 1:1 zu den Zellen gegeben. Nach drei Tagen im Inkubator bei 37° C und 5% CO₂ konnten die Beads mithilfe des Magnethalters entfernt und die Zellen für Experimente verwendet werden.

2.2.6 Transfektion boviner Chromaffinzellen

Die Transfektion boviner Chromaffinzellen erfolgte durch Elektroporation mit dem „Neon transfection system“ des Herstellers Invitrogen. Pro Kammer wurden 100 000 Zellen verwendet. Die entsprechende Zellzahl wurde in ein 1,5 ml Eppendorfgefäß überführt und vier Minuten bei maximal 1000 rpm zentrifugiert. Nach Abnahme des Überstands und Resuspension mit 700 µl DPBS erfolgte eine weitere Zentrifugation bei gleichen Bedingungen. Der erneuten Abnahme des Überstands schloss sich die sofortige Zugabe weniger Mikroliter des im mitgelieferten Kit enthaltenen Resuspensionspuffers an. Im nächsten Schritt wurde die DNA zugegeben, im Falle des pmax-Konstrukts NPY-mCherry [3 µg/µl] in einer Menge von 0,25 µg pro Kammer. Mit Resuspensionspuffer wurde auf 10 µl aufgefüllt. Das Elektroporationsröhrchen wurde mit 3 ml „Electrolytic Buffer“ befüllt. Die gesamte Zell-Puffer-DNA-Lösung wurde mit der Elektroporationspipette aufgenommen und im Elektroporationsröhrchen positioniert. Die Elektroporation erfolgte durch einen 30 ms dauernden Puls mit einer Spannung von 1100 V. Anschließend wurde der Pipetteninhalt in 1 ml antibiotikafreies Zellmedium gegeben, ausplattiert und im Inkubator bei 37° C und 12% CO₂ aufbewahrt. Nach 15 Minuten erfolgte die Zugabe weiterer 3 ml des Mediums, welches vier Stunden später durch ein Zellmedium mit Antibiotika (Penicillin/Streptomycin) ausgetauscht wurde.

2.2.7 Transfektion der HeLa-Zellen

Die Transfektion von HeLa-Zellen erfolgte ebenfalls durch Elektroporation durch das „Neon transfection system“. Es wurde dabei wie oben beschrieben vorgegangen. Pro Kammer wurden 0,5 µg Plasmid-DNA eingesetzt. Die Elektroporation erfolgte durch zwei Pulse mit einer Dauer von je 35 ms und einer Spannung von 1005 V.

2.2.8 Transfektion muriner zytotoxischer T-Zellen

Murine zytotoxische T-Zellen wurden durch Elektroporation mit dem „Nucleofector II transfection system“ von Lonza und dem dazugehörigen „Mouse T Cell Kit“ transfiziert. Vorbereitend wurde das im Kit enthaltene Medium (100 ml) mit 1 ml Glutamin (200 mM), 5% FCS und 1 ml „Component A“ versetzt und bei 4° C gelagert. Unmittelbar vor der Elektroporation wurden hiervon 2 ml entnommen und 20 µl „Component B“ hinzugefügt. Das nun fertig zubereitete Medium wurde in die Kammer einer 24-Kammer-Platte gegeben und 30 Minuten lang im Inkubator bei 37° C und 5% CO₂ belassen. Weiterhin wurde die „Nucleofector Solution“ (2,25 ml) durch Zugabe von 0,5 ml „Nucleofector

Solution Supplement“ fertiggestellt. Während die verbliebene „Nucleofector Solution“ bei 4° C aufbewahrt werden konnte, wurde das benötigte Volumen auf Raumtemperatur erwärmt, bevor mit der Elektroporation begonnen wurde. Für eine Elektroporation wurden zwischen 2 und 2,5 Millionen T-Zellen verwendet. Durch 6-minütige Zentrifugation bei 700 rpm und Absaugen des Überstands wurden die Zellen vom Zellmedium befreit. Nach einem Waschschrift mit DPBS und erneuter Zentrifugation und Entfernung des Überstands wurde das verbliebene Pellet mit 100 µl „Nucleofector Solution“ resuspendiert. Anschließend wurden 4 µg Plasmid-DNA zugegeben. Die vorsichtig vermischte Lösung aus DNA und Zellen wurde nun in die Transfektionsküvette pipettiert. Nach Installation dieser im Transfektionsgerät wurde die Elektroporation mit dem Programm „X-001 CD8+mTC“ durchgeführt. Es folgte die unverzügliche Zugabe von 500 µl des vorgewärmten Zellmediums in die Küvette und die Überführung des gesamten Küvetteninhalts in die mit Medium gefüllte Kammer der Zellkulturplatte. Die elektroporierten Zellen wurden im Inkubator bei 37° C und 5% CO₂ gelagert. Eine Stunde nach der Elektroporation wurden 8 µl (25 U/µl) Interleukin-2 zu den Zellen gegeben. Die Fixierung erfolgte nach weiteren drei bis sieben Stunden.

2.2.9 Beschichtung der Deckgläser

Für Versuche mit humanen und murinen T-Zellen wurden die Deckgläser vor Zugabe der Zellen mit je 50 µl Polyornithin in einer Konzentration von 0,1 mg/ml beschichtet. Die Einwirkzeit betrug 30 Minuten, das restliche Polyornithin wurde abgesaugt. Die Deckgläser wurden nun mit je 30 µl eines Antikörpergemischs beschichtet, welches die T-Zellen zur Ausbildung einer immunologischen Synapse stimulierte. Pro Deckglas bestand das Gemisch aus 0,9 µl CD3-Antikörper [1 mg/ml], 2,7 µl CD28-Antikörper [1 mg/ml] und 26,4 µl DPBS. Nach einer Inkubationszeit von zwei Stunden bei 37° C und 5% CO₂ wurden 100 000 bis 150 000 Zellen auf die Deckgläser gegeben. Mit der Fixierung der T-Zellen wurde nach 30 Minuten im Inkubator begonnen.

Für Versuche mit HeLa- und Chromaffinzellen wurden unbeschichtete Deckgläser verwendet.

2.2.10 Fixierung der Zellen

Um eine möglichst vollständige Erhaltung der Zellstruktur sicherzustellen und jedwede Bewegung der Zellen während des Mikroskopierens auszuschließen, wurden die Zellen mit 4%igem Paraformaldehyd (PFA) fixiert. PFA ist ein vernetzendes Fixativ (*engl. cross-linking fixativ*), welches kovalente Bindungen mit Proteinketten eingeht und auf diese Weise die Diffusion von

Zellbestandteilen verhindert. Für Experimente befanden sich die Zellen auf Deckgläsern in 6-Kammer-Platten. Vor Beginn der Fixierung wurden die Zellen mit ca. 2 ml phosphatgepufferter Salzlösung (PBS) gewaschen. Hierzu wurde das Zellmedium möglichst vollständig entfernt und sofort durch PBS ersetzt. Nach fünf Minuten wurde die Waschlösung wieder abgenommen und direkt 4%ige PFA-Lösung auf die Deckgläser in den Kammern pipettiert. Für große Deckgläser (\varnothing 25 mm) wurde ein Volumen von 1 ml auf die Zellen gegeben, für kleine (\varnothing 12 mm) waren ca. 200 μ l PFA ausreichend. Nach einer Inkubationszeit von 15 Minuten bei Raumtemperatur wurde das Fixativ abpipettiert und eine Lösung aus 0,1 M Glycin in PBS auf die Zellen gegeben. Bei der Herstellung dieser Lösung war insbesondere auf die oft zu hohe Osmolarität zu achten und diese gegebenenfalls durch Zugabe von destilliertem Wasser auf ca. 300 mOsm einzustellen. Nach drei Minuten wurde die Fixierung durch Entfernen der Glycinlösung und zwei weitere Waschschriffe mit PBS abgeschlossen, wobei schließlich das PBS nicht mehr abpipettiert wurde. Die fixierten Zellen wurden bis zu drei Tage im Kühlschrank bei 4° C aufbewahrt.

2.2.11 Verwendete Färbeverfahren

Für Immunfluoreszenzfärbungen wurden Zellen verwendet, welche am selben Tag oder maximal drei Tage zuvor fixiert worden waren. Als Vorbereitung auf die Färbung wurden die Zellen einer Permeabilisierung und anschließenden „Blockierung“ unterzogen: Zu Beginn wurde das PBS, in welchem die Zellen gelagert waren, aus den Kammern der Zellkultur-Platte entfernt und durch die Triton-X-100-haltige Permeabilisierungslösung ersetzt. Triton X-100 führt zu einem leichten Anschwellen der Zellen, was in einer gesteigerten Permeabilität der Zellmembranen für die zur Färbung verwendeten Antikörper und Peptide resultiert. Nach 20 Minuten wurde die Permeabilisierung durch den entsprechenden Blockierungspuffer gestoppt, welcher ebenfalls 20 Minuten lang auf den Zellen belassen wurde. Anschließend konnte mit der Färbung der Zellen begonnen werden.

Zum Einsparen der zur Färbung verwendeten Antikörper und Peptide hat sich folgende Vorgehensweise bewährt: die verdünnte Antikörper- bzw. Peptidlösung wurde zu je 75 μ l pro großem bzw. 30 μ l pro kleinem Deckglas auf einen flach ausgebreiteten Parafilm getropft. Die Deckgläser mit den Zellen wurden anschließend vorsichtig mit einer Pinzette aus den Kammern herausgeholt und mit der Zellseite auf jeweils einen Tropfen gelegt. So konnte ein suffizienter und gleichmäßiger Kontakt von Färbelösung und Zellen bei geringem Volumen erreicht werden. Im Anschluss wurden die Deckgläser wieder mit der Zellseite nach oben in die mit Wasch- bzw. Pufferlösung gefüllten Kammern gelegt.

Die Färbungen wurden immer mit sechs Waschschrinen von je 10 Minuten Dauer abgeschlossen. Erst wurden die Zellen dreimal mit Permeabilisierungslösung, dann dreimal mit PBS gewaschen. Die gefärbten Zellen wurden entweder direkt mit Mounting-Medium eingedeckelt oder in PBS belassen. In beiden Fällen wurden die Zellen lichtgeschützt, z.B. in Alufolie verpackt, im Kühlschrank bei 4° C aufbewahrt.

2.2.11.1 Aktin-Färbung

Zur Färbung von Aktinfilamenten wurde Phalloidin, ein Toxin des Grünen Knollenblätterpilzes, verwendet. Es handelt sich um ein bityklisches Heptapeptid, welches mit hoher Affinität an filamentöses Aktin (F-Aktin) bindet und dessen Depolymerisation in monomeres Aktin (G-Aktin) verhindert. Zur Färbung wurde eine Lösung aus Blockierungspuffer und 2,5% (v/v) Phalloidin hergestellt, mit welcher die Zellen mindestens 25 Minuten lang behandelt wurden. Es hat sich gezeigt, dass fluoreszenzmarkiertes Phalloidin auch dann effizient Aktinfilamente färbt, wenn es einer Antikörperlösung zugesetzt wird. So konnten bei der Kofärbung von Mikrotubuli und Aktinfilamenten gleichwertige Ergebnisse erzielt werden, wenn Phalloidin der Lösung aus primärem Antikörper gegen α -Tubulin und Blockierungspuffer hinzugefügt wurde. Es stand sowohl mit Alexa Fluor 488 als auch mit Alexa Fluor 647 markiertes Phalloidin zur Verfügung

2.2.11.2 Mikrotubuli-Färbung

Um Mikrotubuli darzustellen wurde das Verfahren der indirekten Immunfluoreszenz durchgeführt. Als primärer Antikörper wurde ein polyklonaler Kaninchen-Antikörper verwendet, welcher hochspezifisch an α -Tubulin bindet. Dieser lag in einer Konzentration von 0,3 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ vor, wurde in einem Verhältnis von 1:500 im entsprechenden Blockierungspuffer verdünnt und für 90 Minuten auf die Zellen gegeben. Es schlossen sich drei Waschschrine mit Permeabilisierungslösung an, um nichtgebundene Antikörper zu entfernen. Als Sekundärantikörper wurden Anti-Kaninchen IgG-Antikörper einer Ziege eingesetzt, deren Konzentration 2 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ betrug. Nach einer Verdünnung von 1:2000 in Blockierungspuffer wurden die Zellen 45 Minuten lang mit der Sekundärantikörperlösung behandelt, wobei auf eine möglichst geringe Lichtexposition geachtet wurde, um ein Ausbleichen der Farbstoffmoleküle zu vermeiden. Die für diese Arbeit eingesetzten Sekundärantikörper waren mit den Farbstoffen Alexa Fluor 488, 568 oder 647 markiert. Das Vorgehen, d.h. Inkubationszeiten und Verdünnungen, war stets identisch.

2.2.11.3 Syntaxin-1-Färbung

Syntaxin-1-Färbungen wurden in bovinen Chromaffinzellen durchgeführt. Hierzu wurde ein aus Mausaszites gewonnener Primärantikörper (HPC-1 '99) verwendet, welcher von Herrn Prof. Reinhard Jahn (Universität Göttingen) zur Verfügung gestellt worden war. Der Antikörper wurde 1:1000 in Blockierungspuffer verdünnt. Nach einer Inkubationszeit von 90 Minuten und drei Waschschritten mit Permeabilisierungslösung wurden Anti-Maus IgG-Antikörper einer Ziege als Sekundärantikörper benutzt. Es lagen an verschiedene Farbstoffe konjugierte Sekundärantikörper in einer Konzentration von 2 µg/µl vor, welche in einem Verhältnis von 1:2000 in Blockierungspuffer verdünnt wurden. Mit diesen wurden die Zellen 45 Minuten lang behandelt.

2.2.11.4 Syntaxin-11-Färbung

In humanen zytotoxischen T-Zellen wurde Syntaxin-11 mithilfe eines von Mahantappa Halimani produzierten und freundlicherweise zur Verfügung gestellten Antikörpers markiert. Dieser lag in einer Konzentration von 0,33 µg/µl vor und wurde in einem Verhältnis von 1:100 in Blockierungspuffer verdünnt. Nach 90-minütiger Inkubation und drei Waschschritten folgte die Zugabe des Sekundärantikörpers. Es handelte sich hierbei um den Anti-Kaninchen IgG-Antikörper einer Ziege, welcher mit dem Farbstoff Alexa 488 konjugiert war und 1:2000 in Blockierungspuffer verdünnt worden war. Die Inkubationszeit betrug 45 Minuten.

2.2.11.5 Perforin-Färbung

Neben Syntaxin-11 wurde Perforin in humanen zytotoxischen T-Zellen angefärbt. Hierzu wurde das Verfahren der direkten Immunfluoreszenz durchgeführt. Der aus Mäusen gewonnene Antikörper gegen humanes Perforin war mit dem Farbstoff Alexa 647 markiert. Er wurde 1:100 in Blockierungslösung verdünnt. Die Einwirkzeit betrug 90 Minuten.

2.2.12 Herstellung von „Photo-Switching-“ und „Oxygen-Scavenger-Buffer“

Für dSTORM-Aufnahmen mit Rhodamin- und Oxazinfarbstoffen muss das Zellmedium entfernt und durch eine spezielle Pufferlösung, den „Photo-Switching-Buffer“, ersetzt werden. Bei diesem handelt es sich um PBS, welches mit einem thiolhaltigen Reduktionsmittel versetzt wurde. Für diese Arbeit wurde stets β-Mercaptoethylamin verwendet. Eine Konzentration von 100 mM hat sich als günstig

herausgestellt. Nach gründlichem Mischen wurde der pH-Wert der Lösung ermittelt. Dieser sollte zwischen 7,4 und 8 liegen und wurde gegebenenfalls eingestellt.

Für die Abbildung von Carbocyaninfarbstoffen wird die Verwendung von sogenanntem „Oxygen-Scavenger-Buffer“ empfohlen (Heilemann M et al. 2009b, Aitken CE et al. 2008). Die Pufferlösung ähnelt der oben beschriebenen, ist jedoch enzymatisch von Sauerstoff befreit. Dies erfolgt über das Hinzufügen von 0,5 mg/ml Glucoseoxidase, 40 µg/ml Catalase und 10% (w/v) Glukose. Als praktisch stellte es sich heraus Glukose und β -Mercaptoethylamin in 200 ml DPBS zu lösen, die Lösung nach dem Sterilfiltrieren in 10-ml-Falcongefäße zu aliquotieren und bei -20° C einzufrieren. Unmittelbar vor dem Mikroskopieren konnte ein Gefäß aufgetaut werden und die Zugabe der beiden Enzyme erfolgen. Auch der pH-Wert des „Oxygen-Scavenger-Buffers“ wurde vor der Verwendung überprüft und gegebenenfalls angepasst.

Zu Beginn der Arbeit wurde „Oxygen-Scavenger-Buffer“ für Aufnahmen des Farbstoffs Alexa Fluor 647 verwendet. Später erfolgte die Abbildung aller verwendeten Farbstoffe, inklusive Alexa Fluor 647, meist ohne enzymatische Entfernung des Sauerstoffs in einfachem „Photo-Switching-Buffer“. PALM-Aufnahmen wurden in gewöhnlichem Zellmedium durchgeführt.

2.2.13 Driftausgleich und Positionsangleichung bei Mehrkanalaufnahmen

Während des mehrere Minuten dauernden Aufnahmevorgangs für ein dSTORM- bzw. PALM-Bild kann es zu einem Drift sowohl in lateraler als auch in axialer Richtung kommen. Als Ursachen kommen beispielsweise Materialausdehnung durch Erwärmung oder eine Instabilität des Mikroskopisches in Frage. Da es sich um Mikroskopie im Nanometerbereich handelt, sind selbst kleinste, für herkömmliche Lichtmikroskopie irrelevante Verschiebungen signifikant und bedürfen eines Ausgleichs. Dieser kann mithilfe von sogenannten Fiducials erfolgen. Hierbei handelt es sich um fluoreszierende Partikel, welche als Orientierungspunkte dienen. Besonders empfehlenswert ist die Verwendung von Fiducials für Mehrkanalaufnahmen. Die Positionsangleichung der verschiedenen Farbkanäle erfolgt gegebenenfalls manuell. Wenn mindestens ein identischer Fiducial in beiden Bildern als Orientierungshilfe zur Verfügung steht, kann sie einfach und präzise durchgeführt werden. Um Verzerrungen und Rotationen ausgleichen zu können, sollten idealerweise drei Fiducials im Bildausschnitt sichtbar sein.

Mithilfe der Verrechnungssoftware (Zen 2010) konnte Lateraldrift nachträglich automatisch ausgeglichen werden, sofern Fiducials verwendet und korrekt als solche erkannt worden waren. Verschiebungen in z-Richtung mussten dagegen bereits während des Aufnahmevorgangs manuell

ausgeglichen werden. Damit Fiducials korrekt durch die Zen-Software erkannt werden konnten, war es notwendig, dass sie für mindestens 90% der Aufnahmedauer mit einer gewissen Intensität leuchteten. Zu Beginn der Arbeit wurde die Verwendung von Goldbeads (\varnothing 100 nm) erprobt. Diese verklumpten jedoch häufig und waren außerdem oft zu dunkel um dauerhaft identifiziert werden zu können. Als praktischer erwies sich der Gebrauch von TetraSpecks (\varnothing 100 nm). Diese wurden aufgrund ihrer stärkeren Helligkeit besser durch die Software erkannt und zeigten darüber hinaus eine geringere Neigung zu verklumpen. Die Tetraspecks wurden in einem Verhältnis von 1:1000 in destilliertem Wasser verdünnt. Pro Deckglas (\varnothing 25 mm) wurde ein Volumen von 75 μ l verwendet. Die Suspension wurde auf noch leere Deckgläser aufgetragen und konnte über Nacht bei Raumtemperatur eintrocknen. Bei Temperaturen von über 37° C bestand die Gefahr des Einschmelzens der TetraSpecks.

2.2.14 Aufnahme von dSTORM- und PALM-Rohdaten

Bevor dSTORM- oder PALM-Aufnahmen gemacht werden konnten, mussten erst einige Vorbereitungsschritte erfolgen. So wurde die EMCCD-Kamera auf -60° C gekühlt, die Kamera-Baseline auf -200 eingestellt und die Kameraverstärkung bis zum Gain-Wert 300 durch Anklicken des „Get-Info-Knopfes“ freigeschaltet. Das passende Objektiv musste ausgewählt und mit entsprechendem Immersionsöl beschichtet werden. Für Proben auf normalen Deckgläsern wurde das α "Plan-Fluar" 100x / 1,45 NA zusammen mit Immersol 518F verwendet. Befanden sich die Proben auf HI-Deckgläsern kam das Objektiv "Plan-Apochromat" 100x / 1,57 NA mit Immersol HI 1,66 zum Einsatz. Nichteingedeckelte Deckgläser wurden vorsichtig in den Schraubhalter eingespannt. Für dSTORM-Aufnahmen erfolgte die unmittelbare Zugabe von „Photo-Switching-“ oder „Oxygen-Scavenger-Buffer“, siehe Abschnitt 2.2.11. Die Fokusebene konnte entweder im Durchlichtmodus oder mithilfe der X-Cite-Beleuchtung eingestellt werden. Das Aktivieren der benötigten Laser schloss die Vorbereitungen ab.

Die Suche nach geeignetem Probenmaterial und das Einstellen eines passenden TIRF-Winkels durch sukzessive Neigung des Strahlenganges erfolgten bei möglichst geringen Laserintensitäten, gepaart mit hohen Gain-Werten. War die Probe mit synthetischen Fluorophoren gefärbt, so wurde der ausgewählte Bereich in einem nächsten Schritt durch starke Intensitätserhöhung des Anregungslasers „ausgebleicht“. Ein „Blinken“ der Fluorophore stellte sich entweder von selbst ein oder konnte durch Hinzuschalten des 405-nm-Lasers hervorgerufen bzw. verstärkt werden. Für dSTORM-Aufnahmen waren in der Regel Intensitäten von weniger als 5% des 405-nm-Lasers ausreichend, in seltenen Ausnahmefällen waren bis zu 20% für ein suffizientes Blinken nach

mehreren Minuten nötig. Sollte dagegen eine PALM-Aufnahme gemacht und tdEos abgebildet werden, so wurde die Probe nicht ausgebleicht. Stattdessen wurden der 561-nm-Laser aktiviert und das passende Filterset ausgewählt. Durch Hinzuschalten des 405-nm-Lasers wurde die Photokonversion der tdEos-Proteine gestartet. Diese reagierten extrem empfindlich auf den kurzwelligen Laser, welcher deshalb auf lediglich 1% Leistung eingestellt und durch einen zusätzlichen Filter zur Feinregulation, den „405 Attenuator“, abgeschwächt wurde.

Sobald ein Zustand erreicht worden war, in welchem nur wenige, d.h. individuell identifizierbare Fluorophore aufblinkten, wurden die Intensität des Anregungslasers und die Kameraverstärkung so eingestellt, dass die Signale möglichst hell, jedoch ohne Pixelsaturierung angezeigt wurden. Anschließend konnte die Aufnahme gestartet werden. Während des mehrere Minuten dauernden Aufnahmevorgangs konnte das Blinkverhalten durch Manipulation der Anregungs- und Aktivierungslaserintensitäten beeinflusst werden. Die Kameraverstärkung musste auf dem zuvor eingestellten Wert verbleiben, da der Gain-Wert in die Berechnung der Koordinaten des Fluorophors mit einging. Beendet wurde die Aufnahme der Rohdaten entweder nach gänzlichem Ausbleichen der Probe oder nach ca. 20 000 Einzelbildern. In vielen Fällen waren allerdings auch deutlich weniger Einzelbilder für eine zufriedenstellende Rekonstruktion ausreichend.

2.2.15 Verarbeitung der Rohdaten

Die Verarbeitung der Rohdaten wurde am leistungsstärkeren Offline-PC mit der Software „Zen 2010“ (Version 6.3.0.11) durchgeführt. Damit der aufgenommene Film korrekt verrechnet werden konnte, musste die manuelle Eingabe des Gain-Wertes im Makro „CameraCalibrationChange“ erfolgen. Weiterhin war das Konfigurieren verschiedener Verarbeitungsparameter notwendig.

Die Optionen „Fit Gauss 2D“ und „Fix PSF width“ wurden stets aktiviert. Sie sorgen dafür, dass unter Berücksichtigung von Wellenlänge, Objektiv usw. eine theoretische PSF errechnet wird. Auf der Basis des errechneten Wertes nähert das Programm dann eine zweidimensionale Gaußkurve an die tatsächlich gemessenen PSFs der Rohdatei an. Die Einstellung „PSF-width“ wurde an die tatsächlich sichtbaren Ausmaße des Fluorophorabbildes der Rohdatei angepasst, wobei sich Werte zwischen 100 und 150 nm als empfehlenswert herausgestellt haben. Moleküle, deren PSF-Breite das Doppelte des eingestellten Werts überschreitet, werden von der Rekonstruktion ausgeschlossen. Mit welcher Fläche ein Signal „ausgeschnitten“ wird, lässt sich über die „PSF width correction“ steuern. Die Option hat jedoch kaum Einfluss auf das finale Bild und wurde stets auf den Wert 1 herabgesetzt. Als wesentlich bedeutsamer erwies sich der „Noise level“. Über diesen Parameter lässt sich festlegen, ab welcher Helligkeit die Software ein Pixel als Signal und nicht mehr als Hintergrundrauschen

erkennen soll. Die besten Ergebnisse wurden mit recht niedrigen Werten von unter 5 erzielt. So wurden zwar häufig falsche, jedoch gleichzeitig möglichst viele echte Signale erkannt. Die Artefakte konnten zum größten Teil in der anschließenden „Post-Prozessierung“ herausgefiltert werden. Die Gruppierungsfunktion wurde, genau wie die Driftkorrektur, immer aktiviert. Mit dem Wert „On Time“ lässt sich ein Grenzwert für die maximale Zahl an aufeinander folgenden Einzelbildern festlegen, in welchen ein Molekül aktiviert sein darf, bevor es von der Rekonstruktion ausgeschlossen wird. Die Option ist insbesondere bei Verwendung von Fiducials bedeutsam. Die Option „Off-Gap“ ist nur für reversibel aktivierbare Farbstoffe relevant. Sie bestimmt die Höchstzahl an Einzelbildern, die ein bereits aktiviert gewesenes Fluorophor „dunkel“ sein darf, bevor es bei erneuten Wechsel in den hellen Zustand als neues Molekül erkannt wird. Als „On Time“ haben sich Werte von 10 bis 50, als „Off-Gap“ der Wert 10 bewährt.

2.2.16 Nachträgliche Bildoptimierung

Zur nachträglichen Bildoptimierung standen zahlreiche Optionen zur Verfügung. Von großer Bedeutung war das Einstellen eines Grenzwertes für die Lokalisationspräzision. Der Grenzwert bestimmt wie präzise ein Signal mindestens lokalisiert worden sein muss, um in der hochauflösenden Rekonstruktion berücksichtigt zu werden. Zu ungenau positionsbestimmte Signale erscheinen nicht im finalen Bild. Dabei sollte der Wert so klein wie möglich gewählt werden, um eine möglichst hohe Auflösung zu erzielen, jedoch so hoch wie nötig sein, um eine vollständige Rekonstruktion zu erhalten, siehe auch Kapitel 1.1.9. Selbiges gilt für das Einstellen der Mindestanzahl an detektierten Photonen, welche nötig sind, damit ein Signal angezeigt wird. Bewährt haben sich Werte zwischen 20 und 35 nm für die Lokalisationspräzision und 100 bis 500 Photonen. Ein homogeneres, weniger gepunktetes Erscheinungsbild konnte durch die Aktivierung der Renderingfunktion erzielt werden. Sie bewirkt, dass alle in der Rekonstruktion berücksichtigten Signale mit der Größe des eingestellten Grenzwertes für die Lokalisationspräzision dargestellt werden. Um einen Auflösungs- und somit Informationsverlust zu vermeiden, wurde die Funktion jedoch oftmals nicht genutzt. In Einzelfällen, insbesondere bei geringer Signaldichte, erwies sich das Rendern jedoch als durchaus empfehlenswert. Neben den genannten Parametern konnten Helligkeit, Kontrast und der Gamma-Wert angepasst werden. Während die Helligkeit in der Regel auf ihrem Standardwert belassen wurde, musste insbesondere der Kontrast mit Werten von bis zu 96 stark erhöht werden. Eine Abdunklung artifizieller Hintergrundsignale konnte durch Erhöhung des Gamma-Wertes auf bis zu 1,5 erreicht werden, wobei dies meist nicht notwendig war.

2.2.17 Reinigung der HI-Deckgläser

Für PALM und dSTORM verwendete „High-Index“ (HI)-Deckgläser sind extrem teuer und sollten deshalb gereinigt und wiederverwendet werden. Zu beachten ist, dass einige zur Reinigung herkömmlicher Deckgläser verwendete Substanzen nicht für HI-Deckgläser geeignet sind. So greift beispielsweise Flusssäure die Oberfläche der HI-Deckgläser an, wodurch diese trübe werden und nicht mehr für hochauflösende Mikroskopie geeignet sind (Shroff H et al. 2008a, Support Protocol 1).

Als guter Kompromiss aus Aufwand und Reinheitsgrad hat es sich herausgestellt, die Deckgläser unmittelbar nach der Verwendung in destilliertem Wasser zu sammeln. Hierdurch platzen die Zellen auf den Deckgläsern und es erfolgt ein erster Waschschrift. Die gesammelten Deckgläser wurden über Nacht mit Trypsin (TrypLE Express) behandelt, um Zellreste von der Oberfläche zu lösen. Anschließend wurden die Deckgläser für einen Tag in ein Bad aus konzentrierter Salpetersäure (30%) gegeben. Hierzu empfahl sich die Verwendung eines Deckglasständers. Abschließend wurden die Deckgläser mehrmals mit großen Mengen an destilliertem Wasser gespült und getrocknet.

3. Ergebnisse

3.1 Etablierung von PALM und dSTORM

Zur Etablierung von PALM und dSTORM wurden zytoskelettäre Strukturen in fluoreszenzmarkierten HeLa-Zellen untersucht. HeLa-Zellen eigneten sich hierzu aus verschiedenen Gründen. So handelt es sich um eine sehr robuste, d.h. gegenüber äußeren Einflüssen unsensible Zelllinie. Zudem zeigen HeLa-Zellen ein besonders schnelles Proliferations- und Wachstumsverhalten, weshalb sie leicht verfügbar sind. Darüber hinaus weisen sie ein sehr flächiges Wachstum auf. Durch die flache Form wird nur wenig Streulicht von außerhalb der Fokusebene verursacht, was für die mikroskopische Abbildung vorteilhaft ist. Nicht zuletzt sind HeLa-Zellen sehr gut erforscht und besitzen ein deutlich ausgeprägtes Zytoskelett.

Das Zytoskelett wird unter anderem von Mikrotubuli und Aktinfilamenten gebildet. Beides sind gut zu erkennende Zellkomponenten, welche sich deutlich von anderen Strukturen abgrenzen lassen. Mit einem Durchmesser von 25 nm unterschreiten Mikrotubuli das Abbesche Auflösungslimit klar. Nochmals kleinere Ausmaße weisen Aktinfilamente mit einer Breite von lediglich 7 nm auf. Von Vorteil ist zudem, dass sowohl Mikrotubuli als auch Aktinfilamente in wechselnden Abständen zueinander verlaufen. An besonders „dichten“ Stellen können die Vorzüge hochauflösender Mikroskopie eindrücklich aufgezeigt werden. Die beiden Bestandteile des Zytoskeletts wurden auch deshalb als ideale Teststrukturen erachtet, weil bereits einige entsprechende PALM und dSTORM-Abbildungen, beispielsweise von Heilemann M et al. (2008), veröffentlicht worden waren. Ein Vergleich war somit leicht möglich. Auch handelt es sich um aus der Elektronenmikroskopie bekannte Strukturen.

Es muss zudem betont werden, dass dem Zytoskelett eine entscheidende Bedeutung im Rahmen von intrazellulärem Transport, aber auch von Sekretionsvorgängen zugeschrieben wird. Da die Erforschung der Exozytose einen der Schwerpunkte der AG Prof. Rettig bildet, war die hochauflösende Untersuchung des Zytoskeletts auch unter einem medizinisch-biologischen Gesichtspunkt von großem Interesse.

3.1.1 PALM-Aufnahme von Aktinfilamenten einer HeLa-Zelle

Um das Verfahren PALM zu erproben und zu etablieren wurde eine Variante des Proteinfarbstoffs Eos eingesetzt. Bei Eos handelt sich um ein recht helles, photokonvertierbares fluoreszierendes Protein. Nach Bestrahlung mit einem kurzwelligen Laser ($\lambda = 405 \text{ nm}$) verschiebt es sein Emissionsspektrum von grüner zu orange-roter Fluoreszenz, siehe Kapitel 1.1.9.1. Da die monomere Form nur bis ungefähr 30° C stabil exprimiert wird, wurde für diese Arbeit eine Fusion aus zwei Eos-Einheiten, das tandem-dimer (td) Eos, verwendet. tdEos weist eine deutlich höhere Temperaturstabilität auf (Nienhaus GU et al. 2005) und wurde bereits in verschiedenen Arbeiten erfolgreich für PALM eingesetzt (Betzig E et al. 2006, Shroff H et al. 2007).

In der Arbeitsgruppe stand das Konstrukt tdEos-Paxillin zur Verfügung. Paxillin ist ein mit fokalen Adhäsionskomplexen assoziiertes Protein. Es dient als Andockstelle für viele weitere Proteine und ist unter anderem an der Regulation von Zellmotilität und -spreitung beteiligt (Schaller MD 2001). Um erste Untersuchungen zum „Fluoreszenzverhalten“ des Proteinfarbstoffs durchzuführen, wurde die Plasmid-DNA in HeLa-Zellen transfiziert. Beim Mikroskopieren zeigte sich unter Anregung mit dem 488-nm-Laser eine sehr helle und gegenüber Ausbleichen stabile Färbung. Wurde die Probe mit dem 561-nm-Laser beleuchtet, so war keine Fluoreszenz festzustellen. Ein unkontrolliertes Konvertieren von tdEos-Molekülen konnte somit ausgeschlossen werden. Nach dem Hinzuschalten des 405-nm-Lasers offenbarte sich eine extreme Empfindlichkeit des Proteinfarbstoffs diesem gegenüber. Bereits bei minimaler Intensität des kurzwelligen Aktivierungslasers wechselten beinahe alle tdEos-Moleküle innerhalb von wenigen Sekunden ihr Emissionsspektrum. Eine individuelle Abbildung und Lokalisation der Emitter war demnach nicht möglich. Mithilfe des „405 Attenuators“, einem zusätzlichen Filter zur Feinregulation, ließ sich die Energie des Aktivierungslasers weiter abschwächen. Letztlich konnte der Anteil der gleichzeitig orange fluoreszierenden Moleküle drastisch reduziert und eine gute Steuerbarkeit des Konvertierungsverhaltens erreicht werden. Während des Mikroskopierens befanden sich die Zellen in gewöhnlichem DPBS-Medium, da es – im Gegensatz zu dSTORM – für PALM-Aufnahmen nicht nötig ist das Zellmedium durch spezielle Pufferlösungen zu ersetzen.

Nachdem Eignung und Eigenschaften von tdEos erfolgreich getestet worden waren, sollte das fluoreszierende Protein zur Färbung von Aktinfilamenten genutzt werden. tdEos wurde hierzu mit dem Markerprotein Lifeact fusioniert, siehe Kapitel 2.2.1.

Abbildung 22 zeigt eine mit dem Konstrukt tdEos-Lifeact transfizierte HeLa-Zelle, die ca. drei Tage nach Elektroporation fixiert worden war. Verglichen mit der konventionellen TIRF-Aufnahme (b) werden die Aktinstrukturen in der PALM-Rekonstruktion (c) sichtbar feiner und exakter abgebildet.

Weiterhin lässt sich die typische, „gepunktete“ Darstellung pointillistischer Aufnahmen erkennen. Noch deutlicher sichtbar wird diese in der Vergrößerung der Struktur am linken oberen Zellrand im Rahmen der Profilmessung (e). Um den Auflösungsgewinn zu quantifizieren, wurde die Verteilung der Lokalisationspräzision in Form eines Histogramms graphisch dargestellt (d). Hieraus geht hervor, dass die aufgenommenen Signale mit einem Mittelwert von knapp 20 nm sehr genau positionsbestimmt werden konnten. Die Messung des Intensitätsprofils (e) bestätigt mit einer Halbwertsbreite von 69 nm eine deutliche Unterschreitung der konventionellen optischen Auflösungsgrenze.

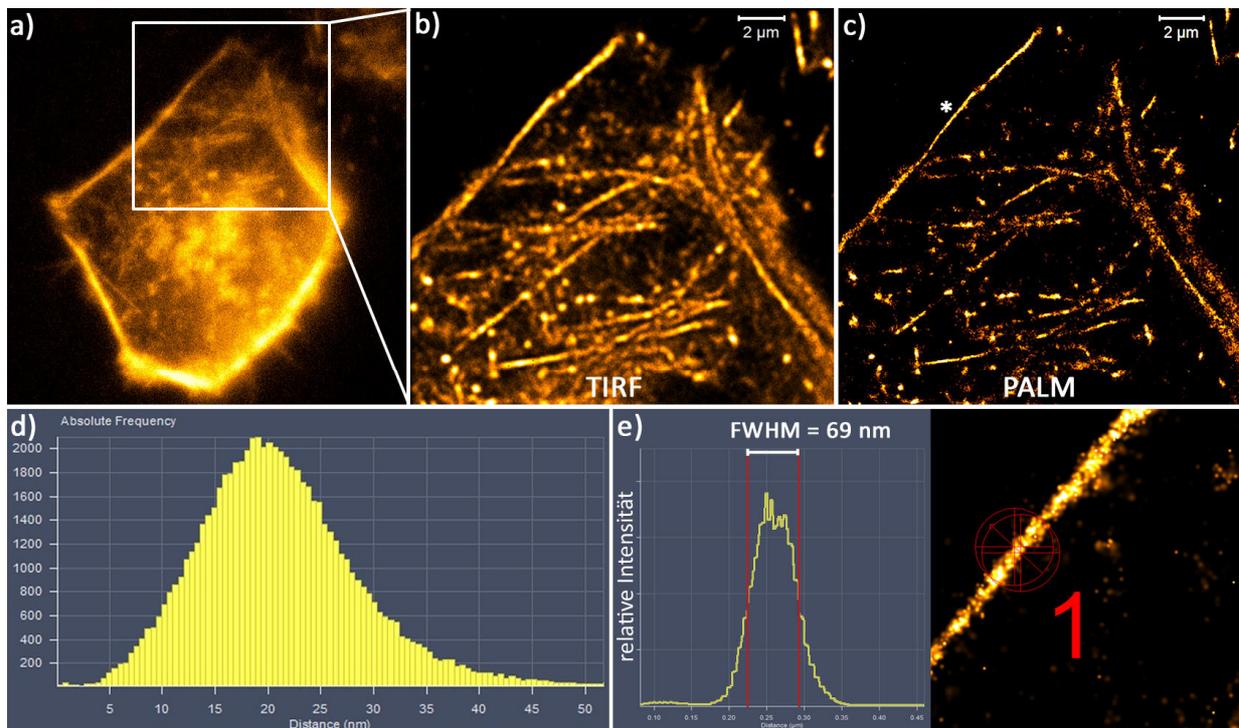


Abbildung 22: a) Übersichtsaufnahme einer mit dem Konstrukt tdEos-Lifeact transfizierten HeLa-Zelle, angeregt mit einem 488-nm-Laser. b) Ausschnittsvergrößerung aus a) im TIRF-Modus. c) Korrespondierende PALM-Rekonstruktion aus ca. 8000 Einzelbildern. d) Verteilung der Lokalisationspräzision. e) Profilmessung der in c) markierten Struktur.

3.1.2 dSTORM-Aufnahmen von Aktinfilamenten in HeLa-Zellen

dSTORM wurde mit verschiedenen synthetischen Farbstoffen getestet. So wurden die beiden Rhodaminfarbstoffe Alexa 488 und Alexa 568 sowie der Carbocyaninfarbstoff Alexa 647 eingesetzt. Unter Anwendung von dSTORM wurde die hochauflösende Abbildung von Aktinfilamenten in HeLa-Zellen wiederholt. Um Aktin zu markieren, wurden die Zellen mit Phalloidin, an welches verschiedene Farbstoffe konjugiert waren, behandelt.

In Abbildung 23 (a) sind mehrere, dicht beieinander liegende HeLa-Zellen zu sehen, welche mit Phalloidin-Alexa 488 gefärbt wurden. Das Absorptionsmaximum dieses Farbstoffs liegt bei 496 nm, das Emissionsmaximum bei 519 nm (Endesfelder U et al. 2011). Es handelte sich um eine eingedeckelte Probe; das Mounting-Medium war mit 100 mM β -Mercaptoethylamin (MEA) versetzt worden.

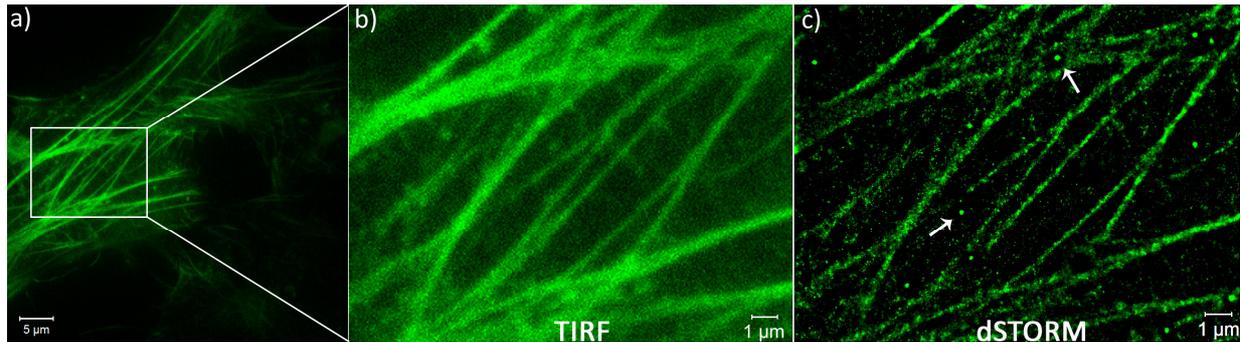


Abbildung 23: **a)** Übersichtsaufnahme von mehreren, mit Phalloidin-Alexa 488 gefärbten HeLa-Zellen. Die Zellen waren fixiert und in mit 100 mM MEA versetztem Mounting-Medium eingebettet. **b)** Ausschnittsvergrößerung aus a) im TIRF-Modus. **c)** Korrespondierende dSTORM-Rekonstruktion aus 18 000 Einzelbildern. Die Pfeile zeigen auf zur Driftkorrektur verwendete TetraSpecks.

Deutlich zu erkennen sind strangförmige, sich über die gesamte Breite der Zellen spannende Filamentbündel, sogenannte Stressfasern. Hierbei handelt es sich um Bündel aus zehn bis 30 einzelnen Aktinfilamenten, die von verschiedenen Hilfsproteinen, wie z.B. von α -Aktinin, zusammengehalten werden (Cramer LP et al. 1997). Die Stressfasern sind an fokalen Adhäsionskomplexen verankert und zur Kontraktion fähig. Ihre genaue Rolle ist noch immer umstritten (Pellegrin S & Mellor H 2007). Um einen direkten Vergleich zu ermöglichen, ist eine Ausschnittsvergrößerung sowohl im TIRF-Modus (b) als auch als dSTORM-Rekonstruktion (c) abgebildet. Ein stark schwankender Kaliberdurchmesser der verschiedenen Faserbündel lässt sich in beiden Abbildungen unschwer erkennen. Bei nur flüchtiger Betrachtung ist der Qualitätsgewinn durch dSTORM nicht direkt offensichtlich. Achtet man jedoch auf besonders dicht gepackte Stellen, beispielsweise am unteren Rand in der linken Bildhälfte, so lässt sich eindeutig ein Informationszugewinn feststellen. Bei genauer Betrachtung der dSTORM-Aufnahme fallen zudem die mit Pfeilen markierten runden, sehr hellen und von einem dunklen Hof umgebenen Strukturen auf. Hierbei handelt es sich um zur Driftkorrektur eingesetzte TetraSpecks. Diese konnten nicht vollständig von der Zen-Software herausgefiltert werden, da ihr Signal die Kamera saturierte und so keine absolut korrekte Erkennung stattfand. Die gemessenen Halbwertsbreiten der eher dünnen Strukturen in der Bildmitte liegen zwischen 40 nm und 70 nm.

Ein ähnliches Experiment wurde mit Phalloidin-Alexa 647 durchgeführt. Die in Abbildung 24 gezeigte HeLa-Zelle war jedoch nicht in Mounting-Medium eingebettet, sondern wurde in „Photo-Switching-Buffer“ mikroskopiert. Dieser Umstand ist insofern bemerkenswert, als dass ein dauerhaftes und gut steuerbares „Blinken“ des Carbocyaninfarbstoffs Alexa 647 ohne die enzymatische Entfernung von Sauerstoff erreicht werden konnte. Das Absorptionsmaximum dieses Farbstoffs liegt bei 650 nm, das Emissionsmaximum bei 665 nm (Endesfelder U et al. 2011).

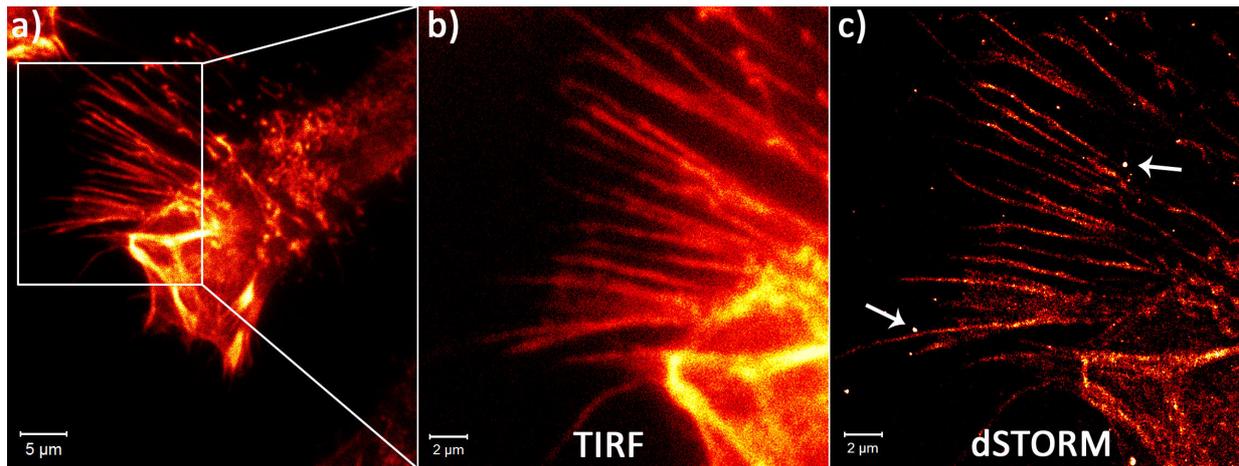


Abbildung 24: *a)* Übersichtsaufnahme einer mit Phalloidin-Alexa 647 gefärbten HeLa-Zelle. *b)* Ausschnittsvergrößerung aus *a)* im TIRF-Modus. *c)* Korrespondierende dSTORM-Rekonstruktion aus 25 000 Einzelbildern. Während des Mikroskopierens befand sich die fixierte Zelle in „Photo-Switching-Buffer“. Die Pfeile weisen auf Fiducials hin.

Die aufgenommene Zelle weist zahlreiche, annähernd parallel ausgerichtet Ausstülpungen, sogenannte Filopodien, auf, ein Phänomen, das häufig im Rahmen von Experimenten mit HeLa-Zellen beobachtet wurde. Im Vergleich zum konventionellen TIRF-Bild (b) sind die Fortsätze in der dSTORM-Aufnahme (c) deutlich besser aufgelöst. Im Bereich des eigentlichen Zellsomas lassen sich zwar mehr Details, jedoch keine individuellen Aktinfilamente erkennen. Weiterhin sind auch in dieser dSTORM-Rekonstruktion Fiducials als helle Punkte sichtbar und mit Pfeilen markiert. Da im Vergleich zur dSTORM-Aufnahme in Abbildung 23 erheblich weniger Laserenergie notwendig war, saturierten die Signale der Fiducials hier weniger stark. Als Folge dessen fehlen die in Abbildung 23 sichtbaren dunklen Höfe um die Orientierungspunkte.

3.1.3 dSTORM-Aufnahmen von Mikrotubuli in HeLa-Zellen

Neben Aktinfilamenten wurden Mikrotubuli in HeLa-Zellen gefärbt und als Teststruktur zur Etablierung von dSTORM herangezogen.

Abbildung 25 zeigt das mittels indirekter Immunfluoreszenz angefarbte Mikrotubulisystem einer fixierten HeLa-Zelle. Die Aufnahme wurde in „Photo-Switching-Buffer“ durchgeführt. Als Farbstoff kam Alexa 488 zum Einsatz. Der Rhodaminfarbstoff eignet sich folglich sowohl in wässriger Pufferlösung als auch in Einbett-Medium (siehe Abbildung 23) für die Einzelmolekül-Lokalisationsmikroskopie.

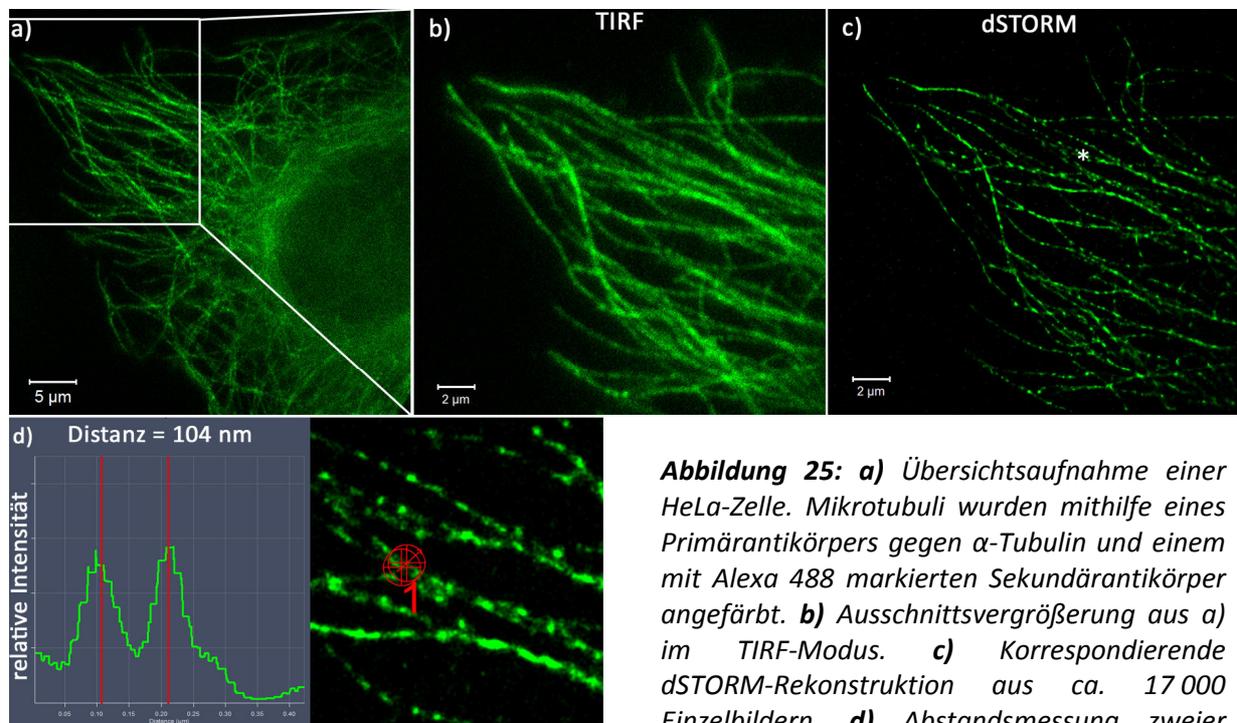


Abbildung 25: **a)** Übersichtsaufnahme einer HeLa-Zelle. Mikrotubuli wurden mithilfe eines Primärantikörpers gegen α -Tubulin und einem mit Alexa 488 markierten Sekundärantikörper angefärbt. **b)** Ausschnittsvergrößerung aus **a)** im TIRF-Modus. **c)** Korrespondierende dSTORM-Rekonstruktion aus ca. 17 000 Einzelbildern. **d)** Abstandsmessung zweier Filamente. Diese sind durch den Stern in **c)** markiert. Die Aufnahme fand in „Photo-Switching-Buffer“ statt.

In der hochauflösenden Rekonstruktion [c) und d)] lässt sich deutlich erkennen, dass oftmals mehrere Mikrotubuli in enger Nachbarschaft und scheinbar „umschlungen“ verlaufen. Dagegen können die individuellen Filamente im konventionellen TIRF-Bild häufig nicht voneinander unterschieden werden und erscheinen als eine einzige, breite Struktur. Der Auflösungsgewinn durch dSTORM wird durch diese vergleichende Betrachtung praktisch veranschaulicht. Quantitativ lässt sich der Informationszugewinn durch die Abstandsmessung zweier eng beieinander liegender Filamente (d) bestätigen. Diese ergibt eine Distanz von lediglich 104 nm. Einzelne Mikrotubulifilamente weisen Halbwertsbreiten von ungefähr 80 nm auf.

Eine weitere dSTORM-Aufnahme des Mikrotubulsystems einer HeLa-Zelle ist in Abbildung 26 zu sehen. Im Unterschied zur vorherigen Aufnahme war der Sekundärantikörper jedoch an den Farbstoff Alexa 568 konjugiert. Dieser weist ein Absorptionsmaximum von 573 nm auf; seine maximale Emission liegt bei einer Wellenlänge von 603 nm (Endesfelder U et al. 2011).

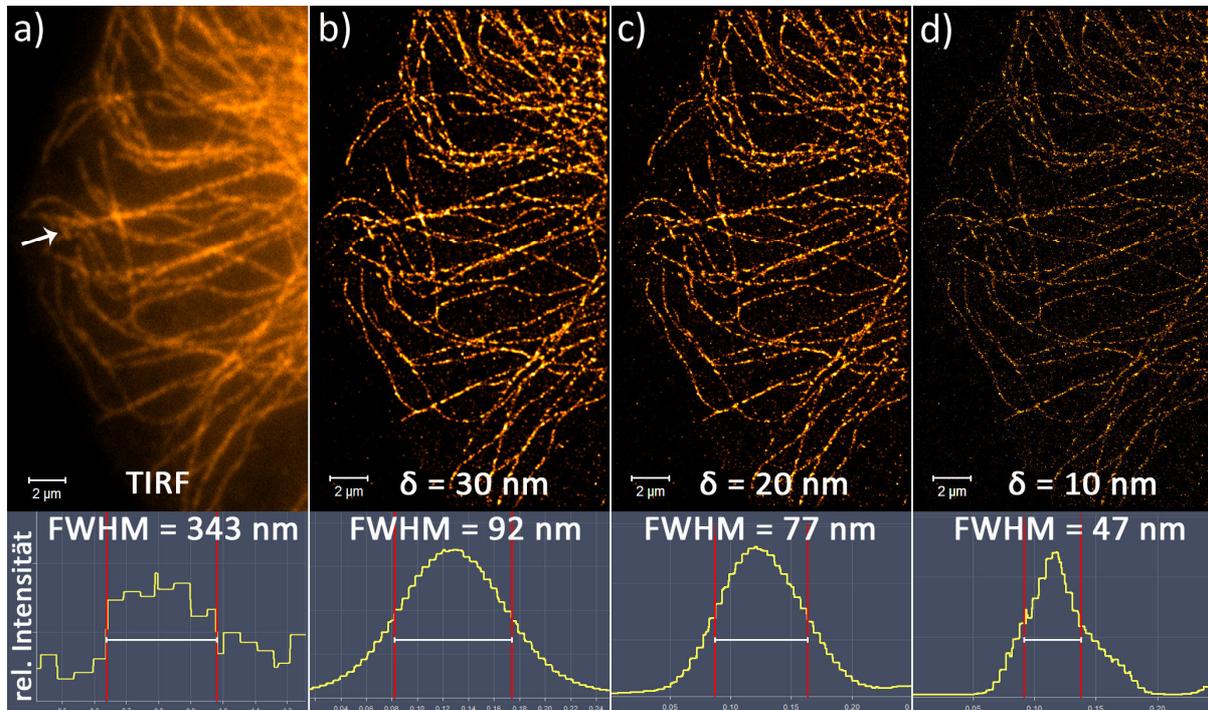


Abbildung 26: Mikrotubulsystem einer HeLa-Zelle, angefärbt mithilfe eines Primärantikörpers gegen α -Tubulin und eines mit Alexa 568 markierten Sekundärantikörpers. **a)** TIRF-Aufnahme. **b), c)** und **d)** Korrespondierende dSTORM-Rekonstruktionen aus 25 000 Einzelbildern mit unterschiedlichen Lokalisationspräzisionsminima (δ). Die Probe war in mit 100 mM MEA versetztem Mounting-Medium eingedeckelt. Unter den mikroskopischen Aufnahmen befinden sich die Intensitätsprofile des immer gleichen Filaments, welches in **a)** durch einen Pfeil markiert ist.

Die abgebildete Serie zeigt drei unterschiedliche dSTORM-Rekonstruktionen [b), c) und d)]. Zum Vergleich ist zusätzlich die TIRF-Aufnahme (a) gezeigt. Alle dSTORM-Bilder wurden aus den gleichen Rohdaten, jedoch mit verschiedenen Verrechnungsparametern erstellt. Konkret handelt es sich um die minimale Präzision (δ), mit welcher ein Signal mindestens lokalisiert worden sein muss, damit es Berücksichtigung für die Rekonstruktion findet. Bei einem relativ hohen Grenzwert von 30 nm (b) erscheinen die Mikrotubuli sehr kontrastreich, zugleich aber auch recht grob aufgelöst. Werden niedrigere Grenzwerte gewählt [c) und d)], so resultiert dies in einer immer feineren, d.h. höher aufgelösten Darstellung der Strukturen, da ungenau ermittelte Signale wegfallen. Zur quantitativen Bestätigung wurde das Intensitätsprofil der in a) markierten Struktur mit verschiedenen Einstellungen analysiert. Bei einem Grenzwert von 30 nm weist das Filament eine Halbwertsbreite

von 92 nm auf (b). Durch schrittweise Reduktion des Grenzwertes um jeweils 10 nm fällt die Halbwertsbreite über 72 nm (c) auf schließlich nur noch 47 nm (d). Wie klar zu erkennen ist, geht mit der extrem hohen Auflösung jedoch zum einen ein Verlust an Kontrast einher. Zum anderen wirken die Filamente zunehmend unvollständig, d.h. die gepunktete Art der Darstellung tritt immer deutlicher zum Vorschein.

Wie Abbildung 27 belegt, ist die hochauflösende Darstellung von Mikrotubuli auch mithilfe des Carbocyaninfarbstoffs Alexa 647 möglich. Insbesondere bei starker Vergrößerung [d) und e)] ist der Informationsgewinn durch dSTORM offensichtlich: Während sich in der TIRF-Ausschnittsvergrößerung nur wenige Filamente klar erkennbar und mit sicher nachvollziehbarem Verlauf darstellen, können mithilfe der dSTORM-Rekonstruktion wesentlich genauere Aussagen zur Morphologie getroffen werden. Mehr noch, sogar scheinbar „klar“ in TIRF erkennbare Filamente, wie etwa die zweite Struktur von rechts in b), erweisen sich in der hochauflösenden Aufnahme (c) als zwei umschlungene Mikrotubuli. Wie auch in den meisten anderen Abbildungen, weisen die Filamente in dieser Abbildung Halbwertsbreiten von typischerweise 50 bis 60 nm auf.

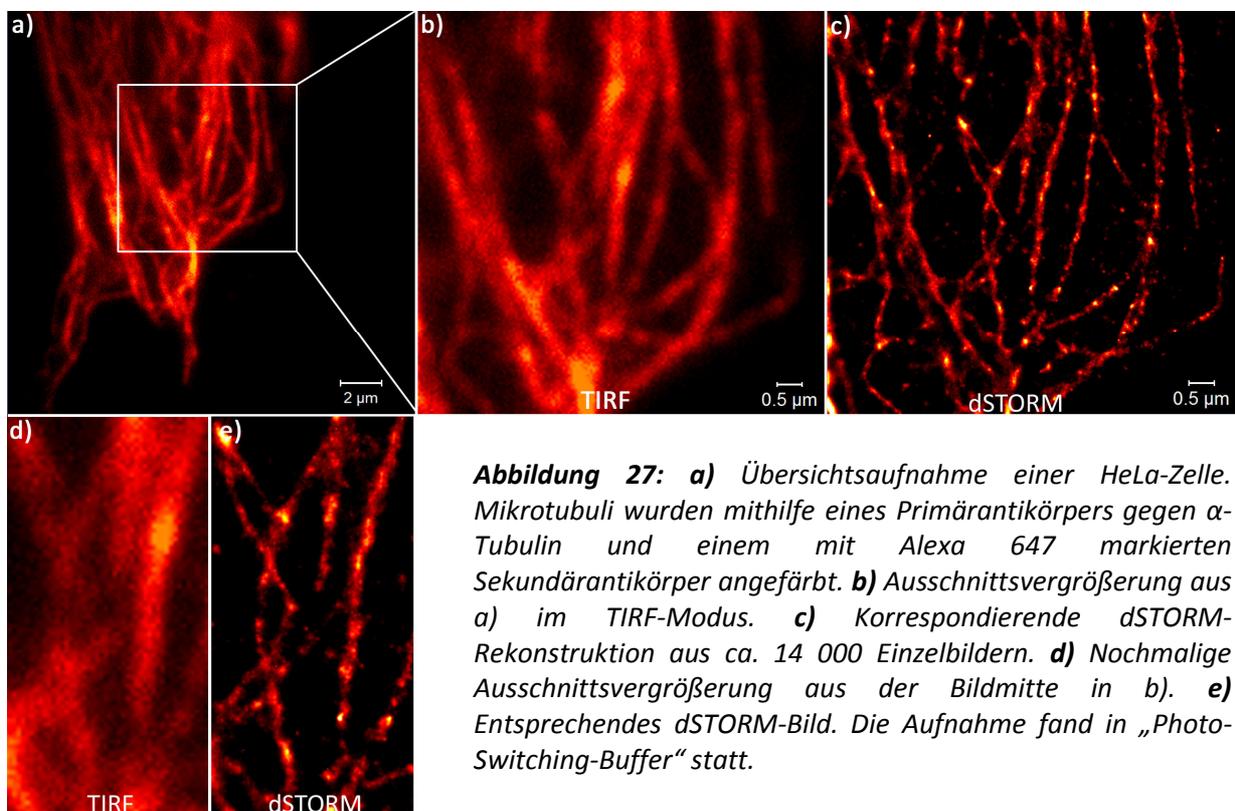


Abbildung 27: *a)* Übersichtsaufnahme einer HeLa-Zelle. Mikrotubuli wurden mithilfe eines Primärantikörpers gegen α -Tubulin und einem mit Alexa 647 markierten Sekundärantikörper angefärbt. *b)* Ausschnittsvergrößerung aus *a)* im TIRF-Modus. *c)* Korrespondierende dSTORM-Rekonstruktion aus ca. 14 000 Einzelbildern. *d)* Nochmalige Ausschnittsvergrößerung aus der Bildmitte in *b)*. *e)* Entsprechendes dSTORM-Bild. Die Aufnahme fand in „Photo-Switching-Buffer“ statt.

3.2 Anwendung an anderen Zelltypen und -strukturen

3.2.1 Mikrotubuli in murinen zytotoxischen T-Zellen

Nachdem die Methode erfolgreich an HeLa-Zellen getestet worden war, wurde dSTORM für die hochauflösende Abbildung von Strukturen in anderen Zelltypen angewandt. Abbildung 28 zeigt das Tubulin-Zytoskelett einer zytotoxischen Maus-T-Zelle. Die Zelle wurde durch Beschichtung des Deckglases mit einem Gemisch aus anti-CD3- und anti-CD28-Antikörpern zur Ausbildung einer immunologischen Synapse stimuliert, siehe Kapitel 2.2.9. Dieses Verfahren ermöglicht es dem Betrachter durch die Synapse, „in die Zelle hinein“ zu schauen.

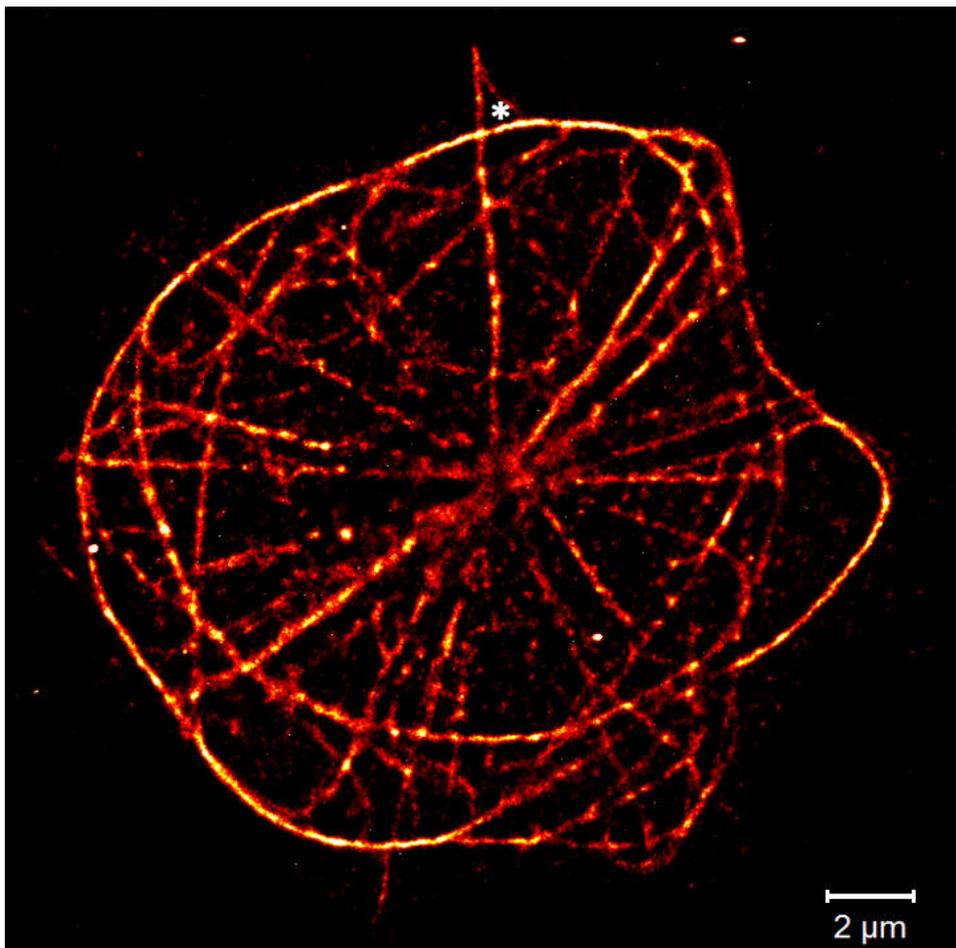


Abbildung 28: Mikrotubulisystem einer zytotoxischen Maus-T-Zelle, angefärbt mithilfe eines Primärantikörpers gegen α -Tubulin und eines mit Alexa 647 markierten Sekundärantikörpers. Das Deckglas war mit anti-CD3- und anti-CD28-Antikörpern beschichtet worden, bevor die Zellen ausplattiert wurden. Für die dSTORM-Rekonstruktion wurden ca. 6000 Einzelbilder aufgenommen. Das Filament unterhalb der Markierung weist eine Halbwertsbreite von 53 nm auf.

Das Mikrotubulisystem spielt eine entscheidende Rolle in der Sekretionstätigkeit von zytotoxischen T-Zellen. So konnten Stinchcombe JC et al. (2006) zeigen, dass sich das MTOC aktivierter T-Zellen zur zentralen Region der immunologischen Synapse, dem c-SMAC (*engl. central supramolecular activation cluster*), bewegt und lytische Granula dann retrograd von der Peripherie zum Zentrosom und somit zur Synapse transportiert werden. Das hier durchgeführte Experiment sollte die erstmalige hochauflösende Beschreibung des Tubulin-Zytoskeletts einer zytotoxischen T-Zelle aus Perspektive der Zielzelle ermöglichen.

Beim Betrachten der Aufnahme lässt sich der gemeinsame Ursprung der Mikrotubuli, das MTOC, im zentralen Bildbereich gut erkennen. Die vom MTOC entspringenden Filamente sind größtenteils radiär angeordnet und breiten sich nach peripher hin aus. Zusätzlich formen die Mikrotubuli mehrere ringartige Strukturen in den äußeren Bereichen der Zelle. Es fällt auf, dass die Ringe im Vergleich zu vielen zentralen Mikrotubuli recht breit erscheinen. Darüber hinaus werden sie von verschiedenen dünnen Filamenten gespeist. Beide Umstände deuten darauf hin, dass es sich bei den Ringstrukturen um Bündel aus mehreren Einzelfilamenten handelt. Die in die Ringe mündenden Filamente bilden oftmals Schleifen aus und scheinen mit mehreren radiären Fasern in Verbindung zu stehen. Interessant ist zudem, dass nicht alle Mikrotubuli in die Ringstrukturen einfließen. Manche der sich radiär ausbreitenden Filamente ragen stattdessen über das äußere Ringniveau hinaus. Die in der Literatur beschriebene Polarisation des MTOCs ist deutlich zu erkennen: Da die Eindringtiefe des Anregungslasers auf maximal 150 nm beschränkt ist, muss sich das MTOC folglich in unmittelbarer Nähe zur immunologischen Synapse befinden.

In mehreren Wiederholungen des Experiments offenbarte sich eine sehr heterogene Morphologie des Mikrotubulisystems zytotoxischer T-Zellen. So zeigt Abbildung 29 den gleichen Zelltyp unter identischen Bedingungen. Zwar lassen sich auch hier radiär angeordnete Filamente erkennen, jedoch fehlen die oben beschriebenen Ringstrukturen fast gänzlich. Auffällig ist lediglich die geradlinige, ca. 30° zur Horizontalen geneigt verlaufende Struktur am rechten oberen Zellrand. Betrachtet man die Aufnahme genau, so fallen auch die anderen in Abbildung 29 b) grün hervorgehobenen Strukturen auf. Es lässt sich der bogenförmige Verlauf eines Mikrotubulus erahnen, der eine gewisse Ähnlichkeit zu den Ringen in Abbildung 28 darstellt. Auch lässt sich in diesem Bereich eine angedeutete Filamentschleife, die in die geradlinige Struktur mündet, erkennen. Deutlich von der vorherigen unterscheidet sich die hier abgebildete Zelle hinsichtlich ihrer Größe. Während die in Abbildung 28 gezeigte immunologische Synapse einen Durchmesser von ungefähr 19 µm aufweist, ist diese mit ca. 10 µm nur etwa halb so groß.

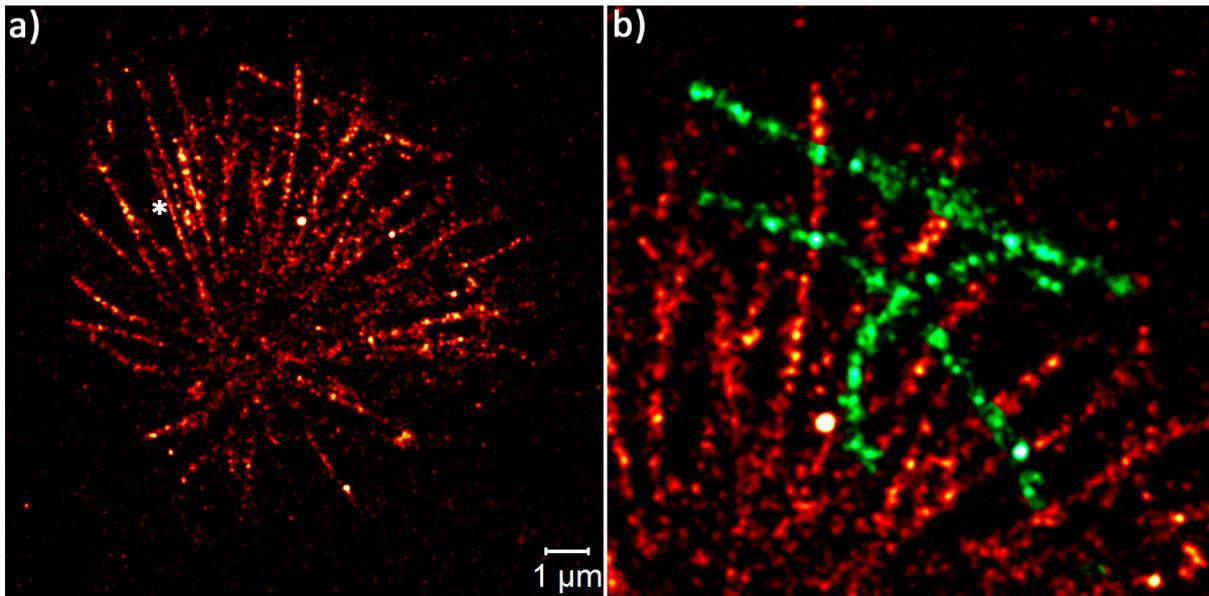


Abbildung 29: **a)** Mikrotubulisystem einer zytotoxischen Maus-T-Zelle, angefärbt mithilfe eines Primärantikörpers gegen α -Tubulin und eines mit Alexa 647 markierten Sekundärantikörpers. Das Deckglas war mit anti-CD3- und anti-CD28-Antikörpern beschichtet worden, bevor die Zellen ausplattiert wurden. Für die dSTORM-Rekonstruktion wurden ca. 9100 Einzelbilder aufgenommen. Die Halbwertsbreite des markierten Filaments beträgt 58 nm. **b)** Ausschnittsvergrößerung aus dem rechten oberen Bereich in a). Die im Text näher beschriebenen Strukturen wurden manuell grün hervorgehoben.

Der gemeinsame Ursprung der Mikrotubuli ist in Abbildung 29 nicht klar erkennbar. Dieser Umstand deutet auf eine größere Entfernung des MTOCs zur Synapse hin. Es könnte sich folglich um eine frühe Phase der Synapsenbildung handeln, in der die Polarisation des Zentrosoms noch nicht abgeschlossen ist. Mit dieser Hypothese sind auch die im Vergleich zur Zelle in Abbildung 28 deutlich geringere Größe sowie die nur spärlich sichtbaren Ring- und Schleifenstrukturen in Einklang zu bringen. Unklar ist, ob sich letztere noch nicht ausgebildet haben, oder ob sie außerhalb der TIRF-Ebene liegen.

3.2.2 Vesikel und Syntaxin-1 in einer bovinen Chromaffinzelle

In einem nächsten Schritt wurden nicht mehr einzelne Strukturen des Zytoskeletts, sondern verschiedene andere Zellbestandteile in unterschiedlichen Zelltypen abgebildet. Von den bisher gezeigten unterscheiden sich die folgenden dSTORM-Abbildungen auch darin, dass je zwei Strukturen gefärbt und aufgenommen wurden.

Abbildung 30 zeigt die mittels indirekter Immunfluoreszenz angefärbten Syntaxin-1-Moleküle einer bovinen Chromaffinzelle (grün). Durch Transfektion mit dem Konstrukt NPY-mCherry wurden

zusätzlich Vesikel – hier rot dargestellt – markiert. Mit dem Experiment sollte das Verteilungsmuster von Syntaxin-1 in der Plasmamembran hochauflösend untersucht und eine Kollokalisierung desselben mit sekretorischen Vesikeln überprüft werden.

Syntaxin gehört zur Gruppe der SNARE-Proteine (*engl. soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor attachment protein receptor*). Diese sind an der Fusion von Membranen beteiligt. Im Rahmen der Exozytose interagieren SNARE-Proteine auf der Oberfläche von Vesikeln (v-SNAREs) mit solchen, die in der äußeren Zellmembran verankert sind (t-SNAREs) unter Bildung des SNARE-Komplexes. Hierdurch gelangen Vesikel- und Plasmamembran in unmittelbare Nachbarschaft zueinander. Die Nähe ist Voraussetzung für die auf ein Kalziumsignal hin erfolgende Fusion der Membranen (Becherer U & Rettig J 2006). Syntaxin-1 ist eine in Neuronen und Chromaffinzellen exprimierte Isoform eines solchen t-SNAREs. Dem Protein kommt außerdem eine zusätzliche, dem Genannten vorangehende Aufgabe zu. Durch Bindung an Synaptotagmin-1, ein in die Vesikelmembran verankertes Protein, findet ein erster, loser Kontakt von sekretorischen Vesikeln mit der Plasmamembran statt – das „Docking“ (de Wit H et al. 2009).

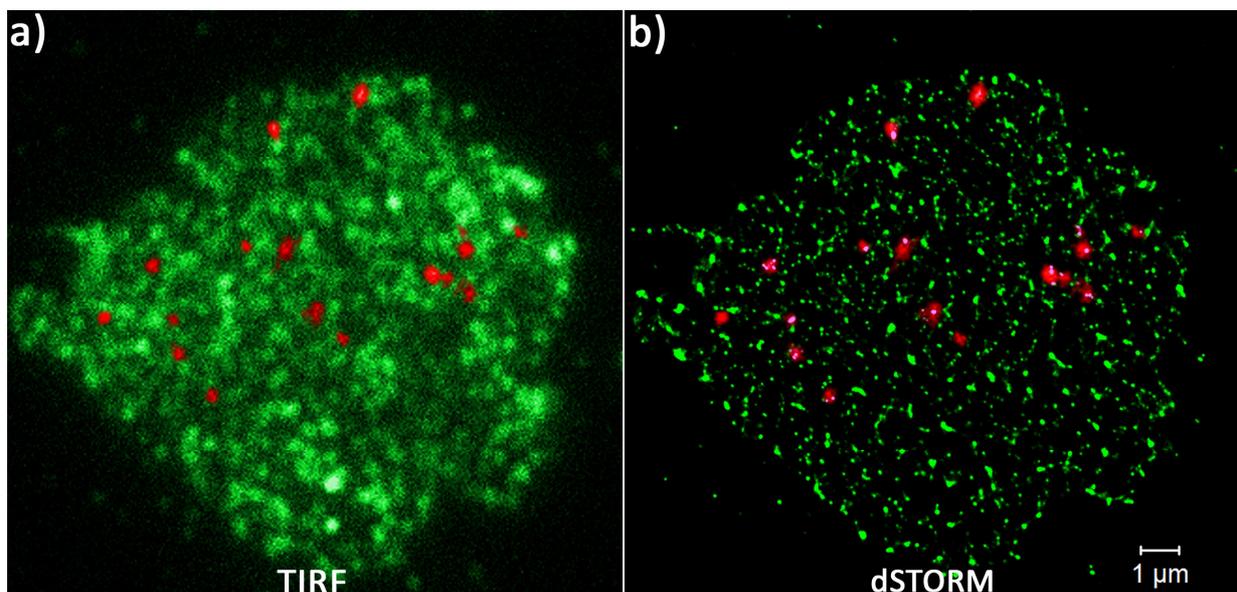


Abbildung 30: Doppelfärbung einer bovinen Chromaffinzelle. Um Vesikel darzustellen, war die Zelle mit dem Konstrukt NPY-mCherry transfiziert worden (rot). In grün abgebildet sind Syntaxin-1-Moleküle, die mittels indirekter Immunfluoreszenz und einem mit Alexa 647 markierten Sekundärantikörper angefärbt wurden. **a)** TIRF-Modus. **b)** dSTORM-Aufnahme von Syntaxin-1 aus ca. 13 500 Einzelbildern. Die Vesikel sind auf beiden Seiten im TIRF-Modus abgebildet. In **b)** wurden Überlappungen beider Farbkanäle manuell pink gekennzeichnet.

Die abgebildeten Aufnahmen zeigen eine clusterartige Anordnung der Syntaxin-1-Moleküle. Hierbei fallen deutliche Größenunterschiede zwischen den einzelnen Clustern auf, die in der dSTORM-

Aufnahme fortbestehen bzw. teilweise sogar deutlicher zum Vorschein kommen. Die Vesikel finden sich hauptsächlich in der oberen Hälfte. In b) sind Überlappungen beider Farbkanäle pink dargestellt, sodass die meisten der LDCVs folglich eine Kolo-kalisation mit Syntaxin-1 aufzuweisen scheinen. An dieser Stelle sei jedoch explizit darauf hingewiesen, dass die Vesikel auch in b) konventionell im TIRF-Modus aufgenommen wurden. Drei der sekretorischen Granula befinden sich genau zwischen den Syntaxin-Clustern. Bei diesen könnte es sich um noch nicht gedockte Vesikel aus dem Depot-Pool handeln. Dagegen haben die mit Syntaxin-1 kolokalisierten Granula den „Docking-Schritt“ vermutlich bereits durchlaufen.

Abbildung 31 zeigt die Größenverteilung der Cluster im rechten oberen Quadranten der dSTORM-Aufnahme. Die 261 Syntaxin-1-Cluster weisen einen medianen Maximaldurchmesser von 73 nm auf.

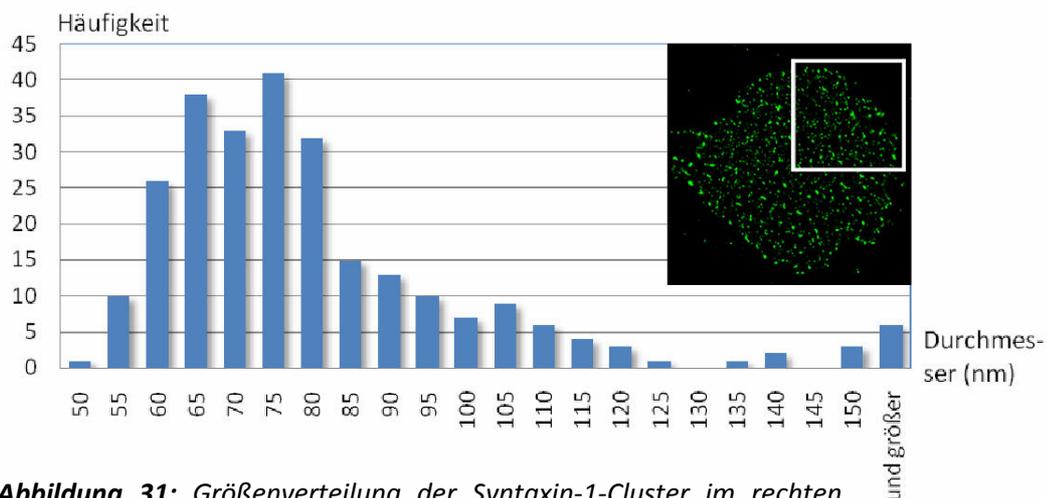


Abbildung 31: Größenverteilung der Syntaxin-1-Cluster im rechten oberen Quadranten ($n = 261$). Gemessen wurden die Halbwertsbreiten der Maximaldurchmesser der Cluster. Der Medianwert beträgt 73 nm, der Durchschnittswert 79 nm.

Das Histogramm bestätigt die bereits beim Betrachten der dSTORM-Aufnahme aufgefallenen Größenunterschiede der Cluster. Bemerkenswert sind unter anderem der flache Abfall der Kurve in Richtung höherer Werte sowie die große Anzahl an „Ausreißern“. Beides könnte darauf hindeuten, dass es sich bei den „größeren“ tatsächlich um mehrere kleine Cluster handelt, die so dicht stehen, dass sie auch mit dSTORM nicht mehr auflösbar sind. Zwei weitere Umstände erhärten diesen Verdacht: Erstens offenbart das höhere Auflösungsvermögen von dSTORM, dass die Anzahl der Cluster erheblich höher ausfällt, als dies beim Betrachten der TIRF-Aufnahme erscheint. Durch eine weitere Auflösungssteigerung könnten also eventuell noch mehr Cluster zum Vorschein kommen. Zweitens weist die Analyse des Intensitätsprofils einiger „größerer“ Cluster auf mehrere Subgruppen

hin. So sind in Abbildung 32 zwar drei Peaks zu erkennen. Gemäß dem Rayleigh-Kriterium lassen sich jedoch nur zwei Signale sicher auflösen, siehe Kapitel 1.1.4.

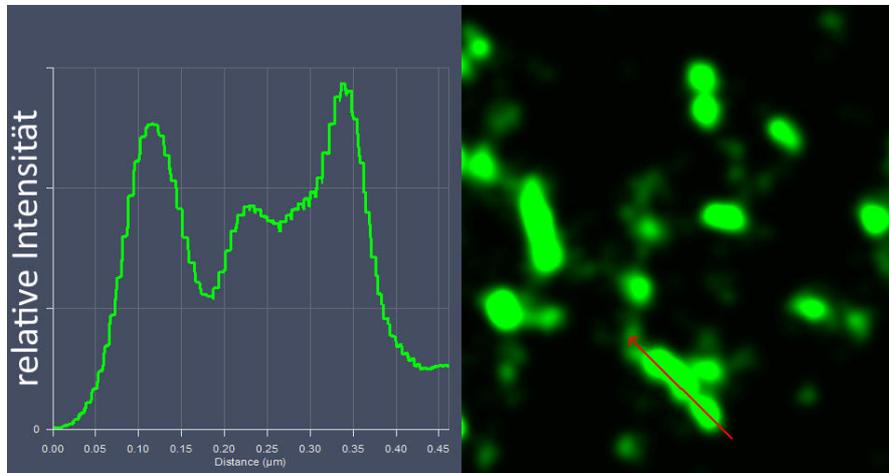


Abbildung 32: Nicht sicher auflösbare Syntaxin-1-Cluster. Das Intensitätsprofil der dSTORM-Aufnahme zeigt drei Peaks. Der mittlere ist jedoch nicht hoch genug, um vom rechten Gipfel entsprechend des Rayleigh-Kriteriums unterschieden werden zu können.

3.2.3 Vesikel und Syntaxin-11 in einer humanen zytotoxischen T-Zelle

In Abbildung 33 ist eine humane zytotoxische T-Zelle zu sehen. Auch diese wurde auf die bei den murinen T-Lymphozyten beschriebene Weise zur Ausbildung einer immunologischen Synapse stimuliert. In rot dargestellt sind Vesikel, die mittels direkter Immunfluoreszenz mit einem an Alexa 647 konjugierten Antikörper gegen Perforin markiert worden waren. Die grünen Strukturen sind Syntaxin-11-Moleküle. Sie wurden mit einem an Alexa 488 gebundenen Antikörper gefärbt.

Das dargestellte Syntaxin-11 ist ein in Zellen des Immunsystems vorkommendes Protein der Syntaxinfamilie (Offenhäuser C et al. 2011). In immunologischen Synapsen ist es vermutlich Bestandteil des SNARE-Komplexes für lytische Granula (de Saint Basile G et al. 2010). Die exakte Funktionsweise von Syntaxin-11 ist nach wie vor ungeklärt und dem Protein werden weitere Aufgaben zugerechnet. Um neue Hinweise hierauf zu gewinnen, wurden im folgenden Experiment die Verteilung in der Plasmamembran und der Bezug des SNARE-Proteins zu sekretorischen Vesikeln hochauflösend untersucht.

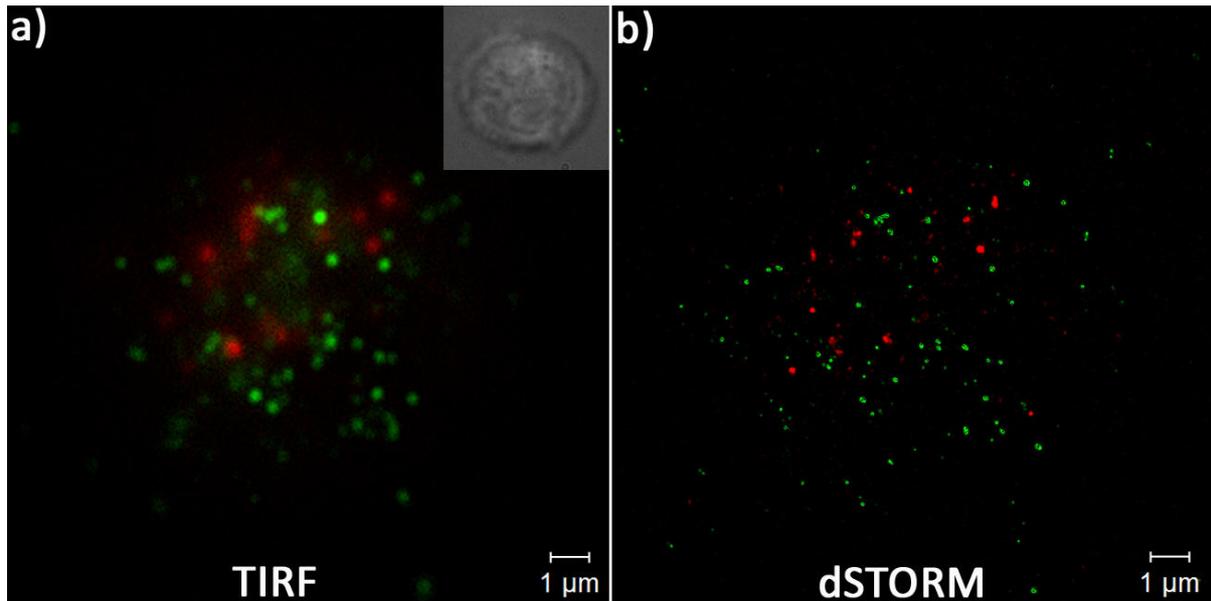


Abbildung 33: Doppelfärbung einer humanen zytotoxischen T-Zelle. Mithilfe eines an Alexa 647 konjugierten Antikörpers wurde Perforin angefärbt (rot). Außerdem wurden Syntaxin-11-Moleküle mit einem von Mahantappa Halimani produzierten Primärantikörper und einem mit Alexa 488 markierten Sekundärantikörper dargestellt (grün). Bevor die Zellen ausplattiert wurden, war das Deckglas mit anti-CD3- und anti-CD28-Antikörpern beschichtet worden. **a)** TIRF-Modus. Zusätzlich ist die Durchlichtaufnahme der Zelle eingefügt. **b)** Entsprechende dSTORM-Rekonstruktion. Für beide dSTORM-Farbkanäle wurden ca. 7000 Einzelbilder aufgenommen.

Auf eine quantitative Auswertung der in Abbildung 33 gefärbten Syntaxin-11-Cluster wurde verzichtet. Die Gründe hierfür werden im Diskussionsteil ausführlich erläutert, siehe Kapitel 4.1. Qualitativ kann aber sicher festgestellt werden, dass die Syntaxin-11-Cluster ohne erkennbare Systematik angeordnet sind. Zwar befinden sich einige Syntaxin-11-Strukturen nahe an Vesikeln. Der Abstand zwischen SNARE-Protein und Vesikel beträgt jedoch immer mindestens 150 nm. Im Vergleich zu den Syntaxin-1-Clustern der bovinen Chromaffinzelle fällt die stark reduzierte Dichte der Syntaxin-11-Moleküle auf.

Die rot gefärbten Strukturen erscheinen im TIRF-Bild größtenteils sehr verschwommen. In der dSTORM-Aufnahme (b) werden die entsprechenden Strukturen zwar klarer abgebildet, jedoch sind auch hier viele ungeordnete Signale um die vermeintlichen Vesikel zu erkennen. Es könnte sich hierbei beispielsweise um bereits ausgeschüttete Perforin-Moleküle handeln.

4. Diskussion

4.1 Möglichkeiten und Einschränkungen der Einzelmolekül-Lokalisationsmikroskopie

Im Rahmen dieser Arbeit gelang es, zwei Verfahren der Einzelmolekül-Lokalisationsmikroskopie erfolgreich zu etablieren. Mit PALM und dSTORM konnten Farbstoffmoleküle von markierten Strukturen individuell aufgenommen und extrem genau lokalisiert werden. Hierbei wurden die Koordinaten der Emitter typischerweise mit einer Präzision von ca. 15 bis 25 nm bestimmt. Die hohe Lokalisationspräzision führte zu einem deutlich gesteigerten Auflösungsvermögen, sodass das optische Beugungslimit konventioneller Fluoreszenzmikroskopie leicht überwunden werden konnte. Die gemessenen Halbwertsbreiten lagen nicht nur weit jenseits der Abbeschen Auflösungsgrenze, sondern ergaben auch eine klare Überlegenheit der Einzelmolekül-Lokalisationsmikroskopie gegenüber SIM: Aktin- und Mikrotubulifilamente wiesen in den meisten Abbildung Halbwertsbreiten von 50 bis 60 nm auf, Syntaxin-1-Cluster maßen im Durchmesser meist um die 75 nm. In fast allen Fällen führte die verbesserte Auflösung auch zu einem realen, wissenschaftlich verwertbaren Informationszugewinn. So konnten in der dSTORM-Rekonstruktion beispielsweise deutlich mehr Syntaxin-1-Cluster identifiziert werden als im TIRF-Modus (Abbildung 30), oder zwei umschlungene Mikrotubuli erkannt werden, wo zuvor nur eine „einzelne“ Struktur sichtbar war (z.B. in Abbildung 27). Mit PALM und dSTORM stehen nun also zwei Verfahren zur Verfügung, die Fluoreszenzmikroskopie in bisher der Elektronenmikroskopie vorbehaltenen Auflösungsbereichen erlauben. Dabei bieten sie die Vorteile einer einfacheren und schnelleren Anwendung sowie einer hochspezifischen und selektiven Färbung.

Zwar wurden für diese Arbeit vor allem Bestandteile des Zytoskeletts und verschiedene Syntaxin-Isoformen hochauflösend abgebildet. Grundsätzlich eignet sich die Einzelmolekül-Lokalisationsmikroskopie jedoch für alle Zellstrukturen. Aufgrund der Kombination mit TIRF stellt die Nähe zur Plasmamembran die einzige Voraussetzung dar. Um Bestandteile aus dem Inneren der Zelle abzubilden, könnte auf fixierte, eingebettete Dünnschnitte zurückgegriffen werden. In diesem Fall kämen ausschließlich PALM-Experimente in Frage, da für PALM – im Gegensatz zu dSTORM – keine spezielle Pufferlösung nötig ist. Dünnschnitte erlaubten zudem einen direkten Vergleich von

hochauflösenden fluoreszenzmikroskopischen mit elektronenmikroskopischen Aufnahmen, wie er etwa von Betzig E et al. (2006), oder Watanabe S und Kollegen (2011) durchgeführt wurde.

Für dSTORM wurde eine Reihe von verschiedenen Fluorophoren erfolgreich eingesetzt. Die Farbstoffe Alexa 488, 568 und 647 decken große Teile des sichtbaren Spektrums ab und lassen sich leicht durch die verschiedenen Filtersätze des Mikroskops voneinander trennen. Entgegen der in der Literatur zu findenden Hinweise (z.B. Heilemann M et al. 2009b), stellte es sich heraus, dass auch der Carbocyaninfarbstoff Alexa 647 ohne eine enzymatische Sauerstoffentfernung ein geeignetes Blinkverhalten zeigt, d.h. alle genannten synthetischen Farbstoffe konnten im gleichen Puffer abgebildet werden. Somit ist eine Vielzahl an Kombinationen denkbar. Die beiden Rhodaminfarbstoffe eignen sich zudem auch in mit Reduktionsmittel versehenem Eindeckmedium für dSTORM, was einen besonders flexiblen Einsatz gestattet.

Problemlos ist die kombinierte Abbildung eines von transfizierten Zellen exprimierten Proteinfarbstoffs und eines an Trägermoleküle konjugierten synthetischen Fluorophors möglich. Auf diese Weise konnten Mehrkanalbilder mit einem hochauflösenden dSTORM- und einem normalauflösenden TIRF-Kanal aufgenommen werden. Durch Verwendung eines für PALM geeigneten Proteinfarbstoffs, z.B. tdEos, sollte dSTORM auch leicht mit PALM kombinierbar sein. Aus diesem Grund empfiehlt es sich für zukünftige Experimente Konstrukte mit einem solchen Farbstoff herzustellen. Warum diese Möglichkeit einer reinen Zweikanal dSTORM-Aufnahme vorzuziehen ist, wird am Ende dieses Kapitels erläutert.

Die Einzelmolekül-Lokalisationsmikroskopie bietet zweifelsohne zahlreiche neue Möglichkeiten zur hochauflösenden und spezifischen Abbildung von Zellstrukturen. Allerdings existieren (noch) einige Schwierigkeiten und Einschränkungen. Sie sind Gegenstand der folgenden Abschnitte.

Zu einer eingeschränkten Anwendbarkeit führt die bereits erwähnte Kombination mit TIRF. Eine gewisse Notwendigkeit hierfür ergibt sich aus der Tatsache, dass durch TIRF das Hintergrundrauschen einfach und effizient reduziert und vor allem die axiale Auflösung drastisch verbessert wird. Zwar ist es prinzipiell möglich Einzelmolekül-Lokalisationsmikroskopie im Epifluoreszenzmodus zu betreiben, jedoch wäre eine extrem asymmetrische PSF mit lateralen Ausmaßen von 15 bis 25 nm bei einer Tiefe von ca. 500 nm die Folge; eine Interpretation der Aufnahme würde so enorm erschwert werden. Im TIRF-Modus werden nur die ersten 70 bis 150 nm – je nach eingestelltem Winkel – jenseits des Deckglases beleuchtet. Folglich können nur solche Strukturen abgebildet werden, die sich in diesem Bereich, d.h. in unmittelbarer Nähe zur Plasmamembran, befinden. Tiefer liegende Bestandteile aus dem Inneren der Zelle eignen sich also nicht ohne Weiteres für die Abbildung mit

PALM bzw. dSTORM. Das Problem könnte durch die bereits angesprochene Anfertigung von Dünnschnitten umgangen werden. Eine alternative Lösung wäre z.B. der Einsatz von auf Astigmatismus basierender 3D-Technik, die in Kapitel 4.3.2 besprochen werden wird.

Ein großer Zeitaufwand gehört ebenfalls zu den Nachteilen der Einzelmolekül-Lokalisationsmikroskopie. Die Akquisitionszeit für ein PALM- bzw. dSTORM-Bild beträgt typischerweise mehrere Minuten, da für jede Rekonstruktion Rohdaten im Umfang von vielen Tausenden von Einzelbildern aufgenommen werden müssen. Zwar ist die Anwendung pointillistischer Verfahren im Vergleich zur Elektronenmikroskopie einfach und schnell, PALM und dSTORM sind jedoch deutlich zeitintensiver als konventionelle Fluoreszenzmikroskopie oder SIM. Die lange Aufnahmedauer hat eine bedeutende Einschränkung zur Folge: Es muss für gewöhnlich auf fixierte Zellen zurückgegriffen werden, da selbst geringe Zellbewegung zum kompletten Verlust der Auflösungsverbesserung führen würde. Live-Cell-Imaging kann zwar mit PALM betrieben werden, jedoch nur dann, wenn es sich um adhärente, ortsständige Zellen handelt und extrem langsam ablaufende Prozesse abgebildet werden. Die Einzelmolekül-Lokalisationsmikroskopie an lebenden Zellen wird Gegenstand des Kapitels 4.3.3 sein. Die lange Akquisitionszeit ist auch Ursache eines weiteren, jedoch beherrschbaren Problems, nämlich der hohen Anfälligkeit gegenüber Drift und mechanischer Erschütterung. Trotz der Verwendung von Fiducials zur Driftkorrektur und eines vom Boden entkoppelten Tisches gilt es in der Praxis das Mikroskop während des Aufnahmevorgangs nicht zu berühren und jedwede Erschütterungen zu vermeiden.

Nicht zu unterschätzen ist die Komplexität der manuellen Steuerung der Rohdaten-Aufnahme. Zur Beantwortung wichtiger Fragen können oft keine exakten Zeiten oder Zahlenwerte angegeben werden. Nach welcher „Ausbleichzeit“ etwa soll die Aufnahme gestartet, wann soll sie wieder beendet werden? Welche Laserintensitäten sollten gewählt und wie sollten diese während der Aufnahme angepasst werden? Wie in Kapitel 2.2.14 geschehen, lassen sich lediglich Situationen beschreiben, die den idealen Zeitpunkt bzw. -raum darstellen und grobe Empfehlungen zur Laserkonfiguration geben. Die Anwendung der Einzelmolekül-Lokalisationsmikroskopie ist also nur eingeschränkt objektivierbar. Dass kaum nach einem starren Schema vorgefahren werden kann, unterstreicht beispielsweise folgender Umstand: Die Beleuchtungszeit, nach welcher ein suffizientes „Blinken“ eintritt, variiert bei gleichen Intensitäten und demselben Farbstoff in einem Bereich von wenigen Sekunden bis hin zu einigen Minuten und kann unmöglich vorhergesagt werden. Genauso wenig kann im Vorfeld eine Aussage darüber getroffen werden, wie lange ein „Blinken“ anhält, bevor die Probe dauerhaft ausbleicht. PALM und dSTORM unterliegen also zwangsläufig einer gewissen Subjektivität. Zur optimalen Durchführung ist folglich ein erhebliches Maß an Erfahrung notwendig.

Eine weitere Schwierigkeit stellt das Anfertigen von mehrfarbigen, hochauflösenden Aufnahmen dar. Sollen zwei Kanäle mit PALM bzw. dSTORM abgebildet werden, so empfiehlt es sich im Allgemeinen mit demjenigen im Bereich größerer Wellenlängen zu beginnen, da langwelliges Licht weniger energiereich als kurzwelliges ist. Bei einem Vorgehen in umgekehrter Reihenfolge wird der Farbstoff mit langwelligerem Anregungsspektrum bereits während der Aufnahme des kurzwelligeren sichtbar ausgebleicht. Da die Proben für PALM und dSTORM über mehrere Minuten mit dem Anregungslaser bei extrem hohen Intensitäten bestrahlt werden, lässt sich dieser unerwünschte Effekt nie gänzlich verhindern. Verstärkt wird das Problem zusätzlich durch die Tatsache, dass auf einen kurzwelligen Aktivierungslaser (405 nm) zurückgegriffen werden muss, um dunkle Radikale wieder in einen fluoreszierenden Zustand zu überführen bzw. eine Photokonversion zu erreichen. Der 405-nm-Laser ist außerordentlich energiereich und regt auch bei relativ geringen Intensitäten viele verschiedene Farbstoffe an. Aufgrund von entsprechenden Filtersätzen werden die Signale der „falschen“ Emitter zwar nicht aufgenommen. Jedoch trägt der Aktivierungslaser mit dazu bei, dass viele Farbstoffmoleküle bereits dauerhaft ausgebleicht sind, bevor sie eigentlich abgebildet werden sollen. Hieraus ergibt sich die Konsequenz, dass es sinnvoll sein kann gegebenenfalls vom allgemeinen Schema abzuweichen und denjenigen Farbstoff zuerst abzubilden, der bei geringerer Intensität des Aktivierungslasers ein ausreichendes Blinkverhalten zeigt. Für Zwei-Kanal-dSTORM mit Alexa-Farbstoffen ist diese Feststellung relativ unwichtig, da alle ähnliche Intensitäten benötigen. Bedeutsam ist dies allerdings insofern, als dass der Proteinfarbstoff tdEos nur einer extrem geringen Intensität des 405-nm-Lasers zur Photokonversion bedarf, siehe Kapitel 2.2.14. Durch die Abbildung des fluoreszierenden Proteins und die anschließende Aufnahme des evtl. langwelligeren synthetischen Fluorophors kann folglich ein vorzeitiges Ausbleichen eines Farbstoffs vermieden werden. Die Aufnahme von mehrfarbigen, hochauflösenden Bildern sollte also durch die Kombination eines PALM- und eines dSTORM-Kanals deutlich erleichtert werden. Dass dieser Ansatz einer reinen dSTORM-Lösung vorzuziehen ist, machen die vielen Kompromisse deutlich, die für die in dieser Arbeit gezeigte Zwei-Kanal-dSTORM-Aufnahme (Abbildung 33) eingegangen werden mussten: Zum einen konnten mit je 7000 Einzelbildern für beide Kanäle nur relativ wenige Einzelbilder aufgenommen werden. Zum anderen wurde zugunsten geringerer Intensitäten von Aktivierungs- und Anregungslaser bewusst auf eine Maximierung der Blinkfrequenz verzichtet. Für die Rekonstruktion stand also nur eine vergleichsweise geringe Zahl an Emittersignalen zur Verfügung. Aufgrund dessen ist eine ausreichende Signaldichte nicht sicher gewährleistet und es musste auf eine quantitative Analyse der Aufnahme, wie z.B. eine Vermessung der Cluster, verzichtet werden.

4.2 Technische Weiterentwicklungen

Die intensiv betriebene technische Weiterentwicklung der Einzelmolekül-Lokalisationsmikroskopie hat im Wesentlichen drei Schwerpunkte: die weitere Steigerung des Auflösungsvermögens, die Etablierung von 3D-Techniken sowie das Ermöglichen von hochauflösender Bildgebung lebendiger Zellen. Im Folgenden soll ein Überblick über den Stand der Technik, neue Möglichkeiten und weiter bestehende Einschränkungen gegeben werden.

4.2.1 Verbesserung des Auflösungsvermögens

Die Bemühungen das Auflösungsvermögen weiter zu steigern zielen zum einen auf eine verbesserte Lokalisationspräzision, zum anderen auf die Entwicklung innovativer Färbeverfahren ab. Wie in diesem Kapitel erläutert wird, sind beide Ansätze sinnvoll. Um ein bestmögliches Auflösungsvermögen zu erreichen, ist jedoch eine Kombination anzustreben.

Die Lokalisationspräzision korreliert mit der Anzahl detektierter Photonen (siehe Kapitel 1.1.9), sodass die Suche nach helleren Farbstoffen im Blickpunkt der Forschung steht. Während Proteinfarbstoffe oft relativ dunkel sind, weisen viele synthetische Farbstoffe eine höhere Quantenausbeute und einen höheren Extinktionskoeffizienten auf (Fernández-Suárez M & Ting AY 2008). Im Vergleich zu PALM hat dSTORM also den Vorteil einer genaueren Signallokalisierung. Dem gegenüber steht der Nachteil, dass für dSTORM oft große Trägermoleküle für die Fluorophore, z.B. Antikörper, benötigt werden. Die Einzelmolekül-Lokalisationsmikroskopie ist bereits jetzt in Auflösungsbereiche vorgedrungen, in denen die Größe eines Antikörpers durchaus relevant ist. Dieser Umstand ist von immenser Bedeutung, wie das folgende Beispiel unterstreicht: Die Fluorophore eines mittels indirekter Immunfluoreszenz markierten Mikrotubulus haben im Querschnitt eine maximale Distanz von ungefähr 50 nm. Dieser Abstand ergibt sich aus dem Durchmesser von 25 nm des Filaments selbst und der Größe der Antikörper, von denen jeder zu einer Verbreiterung der Struktur um ca. 6 bis 7 nm führt. Da auf beiden Seiten je ein Primär- und ein Sekundärantikörper binden, kommen zum Filamentdurchmesser nochmals ca. 25 nm hinzu. Auch wenn die genannten Zahlen nur als grobe Anhaltspunkte dienen sollen, wird deutlich, dass mit auf Antikörperfärbungen basierendem dSTORM also eine vom Auflösungsvermögen unabhängige, strukturbedingte Grenze erreicht wird. Werden dagegen die mit einem Durchmesser von ca. 2,5 nm deutlich kleineren Proteinfarbstoffe verwendet (Patterson G et al. 2010), wie dies bei PALM der Fall

ist, so weist die markierte Zielstruktur viel näher am Physiologischen liegende Ausmaße auf. Dass zurzeit dennoch mit dSTORM geringfügig bessere Auflösungen erzielt werden, liegt vor allem an den helleren synthetischen Farbstoffen und der damit einhergehenden besseren Lokalisationspräzision. Hieraus ergibt sich der klare Hinweis darauf, dass PALM immens von der Entdeckung hellerer Proteinfarbstoffe profitieren würde. Tatsächlich gelang es in jüngerer Zeit neue Proteinfarbstoffe, wie z.B. mEos2, das in seiner aktivierten, roten Form heller als andere Varianten des Proteins ist, zu produzieren (McKinney SA et al. 2009). Zusätzlich weist mEos2 den Vorteil der Monomerität auf, was der Bildung von Proteinaggregaten entgegenwirkt. Weitere Forschung in diesem Bereich bleibt dennoch nach wie vor notwendig. Hierbei sollte das Augenmerk auch auf der Erkundung neuer photoschaltbarer FPs liegen. Durch reversibles Schalten können gegebenenfalls mehrere aktive Phasen für die Berechnung der Koordinaten eines einzelnen Moleküls genutzt werden.

Dass die Verbesserung der Lokalisationspräzision auch für dSTORM anzustreben ist, beweist die Fortsetzung des obigen Beispiels: Werden die 50 nm voneinander entfernt liegenden Fluorophore mit einer Präzision von 20 nm lokalisiert, so befinden sich die berechneten Koordinaten im ungünstigsten Fall auf beiden Seiten 10 nm von der tatsächlichen Position entfernt. Hieraus ergibt sich eine maximale berechnete Fluorophordistanz (d_{bmax}) von 70 nm. Verdoppelte man nun die Lokalisationsgenauigkeit, z.B. durch Verwendung deutlich hellerer Fluorophore, so betrüge d_{bmax} nur noch 60 nm. Große Bedeutung in diesem Zusammenhang könnte die Entdeckung von photoschaltbaren, manganbeschichteten Quantum Dots haben (Irvine SE et al. 2008). Quantum Dots sind winzige Halbleiter-Nanokristalle, die viele Eigenschaften eines idealen Fluorophors erfüllen: Sie sind extrem hell, können leicht angeregt werden, haben ein eng definiertes Emissionsspektrum und eine geringe Größe im Bereich von wenigen Nanometern (Michalet X et al. 2005). Noch ist jedoch die Markierung der Zielstruktur mit Quantum Dots problematisch, sodass meist auf Antikörper oder andere Trägerproteine zurückgegriffen werden muss (Patterson GH et al. 2010).

Wie bereits eingangs erwähnt, kann ein maximales Auflösungsvermögen nur durch die Kombination von hoher Lokalisationspräzision und großer Nähe des Emitters zur Zielstruktur erreicht werden. Ein hochinteressanter Ansatz, der die Vorteile von PALM und dSTORM verbindet, ist die Nutzung von Hybridsystemen. Hierbei handelt es sich um die Fusion des zellulären Zielproteins mit einem Erkennungspeptid oder -protein, das dazu in der Lage ist ein Farbstoffteilchen zu rekrutieren (Fernández-Suárez M & Ting AY 2008). Erkennungsproteine erlauben ein spezifischeres Markieren als Erkennungspeptide, führen aber aufgrund ihrer größeren Ausmaße eher zu einer Störung der zellulären Funktion. Um eine hochspezifische Färbung bei geringer Zellbeeinflussung zu erreichen, kann auf enzymvermittelte Ligation von Erkennungspeptid und Farbstoff zurückgegriffen werden (Henriques R et al. 2011). Auf diese Weise gelang die Markierung mit synthetischen Fluorophoren

(Fernández-Suárez M et al. 2007), aber auch mit Quantum Dots (Howarth M et al. 2005). Der Verzicht auf Antikörper und andere große Trägermoleküle führt nicht nur zu kleineren Strukturen, sondern auch zu einer gesteigerten Markierungsdichte. Das Nyquist-Kriterium (siehe Kapitel 1.1.9) bleibt somit länger erfüllt (Shroff H et al. 2008b). Die gegenwärtige Rolle von Hybridsystemen in der Einzelmolekül-Lokalisationsmikroskopie und einige praktische Beispiele werden in Kapitel 4.3.3 besprochen.

4.2.2 3D-Techniken

Ein Manko der Einzelmolekül-Lokalisationsmikroskopie ist das Fehlen von dreidimensionalen Rauminformationen. Mit den in dieser Arbeit angewandten Techniken ist es nicht möglich zu bestimmen, an welcher Position sich ein Signal entlang der z-Achse befindet. Um den Bereich auf ca. 100 bis 150 nm einzuschränken, müssen PALM und dSTORM mit TIRF-Mikroskopie kombiniert werden. Ein weiterer Schwerpunkt der technischen Weiterentwicklung liegt also, neben einer Verbesserung des lateralen Auflösungsvermögens, in der Etablierung von 3D-Techniken. Hierzu gibt es bereits verschiedene Ansätze.

Die bisher besten Ergebnisse konnten mit einem hochkomplexen Verfahren namens iPALM (*engl. interferometric PALM*) erzielt werden. Die Methode basiert auf der simultanen Detektion eines aktivierten Fluorophors mit zwei gegenüberliegenden Objektiven. Die beiden Strahlengänge werden mithilfe von Spiegeln rekombiniert und in einen 3-Weg-Strahlenteiler geleitet, wo es zur Interferenz kommt. Das resultierende Interferenzmuster hängt vom Wegverhältnis beider Strahlengänge ab, welches seinerseits direkt durch die axiale Position des Emitters bestimmt wird. Um diese möglichst präzise zu lokalisieren, werden die Abbilder von drei EMCCD-Kameras aufgenommen. Durch die Analyse der relativen Amplituden in den drei Aufzeichnungen konnten Farbstoffmoleküle mit einer axialen Präzision von ca. 10 nm lokalisiert werden (Shtengel G et al. 2008).

Wesentlich praktikabler scheint ein Verfahren, das auf der Nutzung von Astigmatismus beruht. Durch Einbringung einer zylindrischen Linse in den Strahlengang verformt sich das Abbild eines Fluorophors in Abhängigkeit von dessen z-Position. Je weiter entfernt sich das angeregte Farbstoffmolekül von der Fokusebene befindet, desto stärker nimmt sein Abbild eine ellipsoide Form an. Ob sich das Fluorophor proximal oder distal der Fokusebene befindet, kann aus der Ausrichtung der Ellipse geschlossen werden. Mit dem beschriebenen Verfahren konnten hochauflösende 3D-Aufnahmen mit einer axialen Auflösung von ca. 60 nm erreicht werden (Huang B et al. 2008a, Jones SA et al. 2011). Zwar ist die Astigmatismus-Methode weniger leistungsfähig als iPALM. Dennoch scheint dieser Ansatz aufgrund des erheblich geringeren Aufwands der vielversprechendere zu sein.

Eine alternative Methode zur Gewinnung von Koordinaten entlang der z-Achse ist das gezielte Defokussieren des Objekts. Liegt dieses außerhalb der Fokusebene, so verändert sich die Form des Abbilds: erst wird die PSF breiter, dann werden weitere Beugungsordnungen in Form von Ringen sichtbar. Werden nun zwei Bilder eines Emitters aufgenommen, eines oberhalb, das andere unterhalb der Fokusebene, so kann aus dem Verhältnis der PSFs auf die axiale Position geschlossen werden. Auf diese Art verschlechtert sich die laterale Lokalisationspräzision zwar leicht, jedoch können axiale Rauminformationen mit einer Genauigkeit von ca. 75 nm gewonnen werden (Juette MF et al. 2008).

Auf eine künftig verbreitete Nutzung von 3D-Technik ist zu hoffen, da diese neben der zusätzlichen dritten Rauminformation einen weiteren, entscheidenden Vorteil aufweist: die bisher notwendige Kombination mit TIRF erübrigt sich. Dies macht die Bildgebung nicht nur komfortabler, sondern erlaubt eine Untersuchung von Zellstrukturen außerhalb der Grenzfläche von Plasmamembran und Deckglas sowie die Abbildung eines deutlich tieferen Bereichs. Dieser bleibt dennoch bei allen bisher veröffentlichten Ansätzen eingeschränkt. Im Falle von iPALM muss die Probe flach – maximal 1 μm dick – sein, da sie von zwei gegenüber liegenden Objektiven aufgenommen wird (Patterson GH et al. 2010). Die Eindringtiefe der Astigmatismus-Methode ist auf ca. 0,6 μm beschränkt, weil sich das Signalabbild mit zunehmendem Abstand zur Fokusebene immer weiter verbreitert und somit die Lokalisationspräzision in lateraler Richtung kompromittiert wird (Huang B et al. 2008a). Auch durch Defokussieren kann hochauflösende, dreidimensionale Bildgebung nur mit einer Tiefe von weniger als 1 μm durchgeführt werden (Juette MF et a. 2008). Um dennoch tiefere Bereiche abzubilden, kann auf das getrennte Mikroskopieren verschiedener Schichten und das anschließende Zusammenfügen der Aufnahmen zurückgegriffen werden (Huang B et al. 2008b).

4.2.3 Live-Cell-Imaging

Ein entscheidender Vorteil der Fluoreszenzmikroskopie gegenüber der Elektronenmikroskopie ist die Möglichkeit zur Abbildung lebendiger Zellen. Um hochauflösendes Live-Cell-Imaging mittels Einzelmolekül-Lokalisationsmikroskopie sinnvoll betreiben zu können, müssen verschiedene Voraussetzungen erfüllt sein:

- Die Zielstrukturen müssen markierbar sein, ohne dass eine Permeabilisierung der Membranen erfolgen muss.
- Die eingesetzten Farbstoffe bzw. Färbeverfahren dürfen nicht zytotoxisch sein.
- Die Bildgebung muss in möglichst physiologischer Lösung erfolgen.

- Es muss auf hohe Laserintensitäten verzichtet werden können.
- Der Aufnahmeprozess sollte schnell, idealerweise im Millisekundenbereich, vonstatten gehen, um dynamische Prozesse lebendiger Zellen abbilden zu können.

Klassisches dSTORM erfüllt die meisten der oben genannten Bedingungen nicht und ist somit nur eingeschränkt für Live-Cell-Imaging geeignet. Durch bestimmte Modifikationen lassen sich die Einsatzmöglichkeiten aber erweitern. So findet das Mikroskopieren bisher typischerweise in für lebendige Zellen ungeeigneten Puffern statt. Diese enthalten das Reduktionsmittel β -Mercaptoethylamin und sind im Falle von Carbocyaninfarbstoffen enzymatisch von Sauerstoff befreit, siehe Kapitel 1.1.9.4. Es konnte jedoch gezeigt werden, dass das intrazellulär vorkommende Glutathion als alternatives Reduktionsmittel fungieren und ein zuverlässiges Blinkverhalten synthetischer Fluorophore sicherstellen kann (van de Linde S et al. 2008). Im Rahmen der vorliegenden Arbeit konnte zudem festgestellt werden, dass der Carbocyaninfarbstoff Alexa 647 auch ohne Sauerstoffentfernung ein reversibles Blinken zeigt. Weitaus problematischer für die Anwendung an lebenden Zellen ist der Umstand, dass Antikörper nicht membrangängig sind. Um intrazelluläre Strukturen mit Antikörpern zu markieren, ist eine Permeabilisierung der Zellmembran unumgänglich, was nur an fixierten Zellen möglich ist. Für die Färbung von Strukturen auf der Zelloberfläche können Antikörper dagegen sehr wohl eingesetzt werden. Auch Phalloidin zur Markierung von Aktin kommt an lebenden Zellen nicht als Alternative in Frage, da es sich um einen hochtoxischen Giftstoff handelt.

Im Gegensatz zu dSTORM erfüllt PALM viele der beschriebenen Prämissen. Die von transfizierten Zellen selbst exprimierten Proteinfarbstoffe machen eine Permeabilisierung der Zellmembran überflüssig und können in herkömmlichem, sauerstoffhaltigem Zellmedium zum Blinken gebracht und abgebildet werden. Auch führen (monomere) Proteinfarbstoffe – sofern keine Überexpression stattfindet – in der Regel zu keiner starken Beeinflussung der Zellfunktion. PALM scheint also eher für die Mikroskopie an lebenden Zellen geeignet. Tatsächlich konnten bereits vor einiger Zeit verschiedene entsprechende Experimente durchgeführt werden (Shroff H et al. 2008b, Biteen JS et al. 2008).

In jüngster Zeit gelang es jedoch auch mit dSTORM lebendige Zellen abzubilden. Hierzu wurden die bereits im Kapitel 4.3.1 erwähnten Hybridsysteme eingesetzt. Eines der für dSTORM erfolgreich genutzten Hybridsysteme basiert auf der Reaktion des Antibiotikums Trimethoprim (TMP) mit der Dihydrofolatreduktase des Bakteriums *Escherichia coli* (eDHFR): Im ersten Schritt werden Zellen mit einem Plasmid transfiziert, welches für das mit eDHFR markierte Zielprotein kodiert. Der zweite Schritt besteht aus der Zugabe des an ein synthetisches Fluorophor konjugierten TMPs. TMP ist membrangängig, bindet kovalent an die eDHFR und führt so zu einer hochspezifischen,

antikörperfreien Markierung des Zielproteins mit einem kleinen Farbstoffmolekül. Mit dieser Methode konnte das Histonprotein H2B hochauflösend in lebenden Zellen abgebildet werden (Wombacher R et al. 2010). Auf ähnliche Weise funktionieren SNAP-Tags, die ebenfalls ein für dSTORM bedeutsames Hybridsystem darstellen. Das Verfahren macht sich die Reaktion des Enzyms O⁶-Alkylguanin-DNA-Alkyltransferase (AGT) mit Abkömmlingen des O⁶-Benzylguanins zu Nutze. Die Zellen werden derart transfiziert, dass sie eine Fusion aus Zielprotein und dem Enzym AGT exprimieren. Wird nun Substrat, an welches einen Farbstoff konjugierter wurde, hinzugefügt, so findet eine Übertragung des Fluorophors statt: es bindet irreversibel an das Enzym (Keppler A et al. 2003). Das SNAP-Tag-Verfahren konnte ebenfalls zur Untersuchung des Histonproteins H2B (Klein T et al. 2011), aber auch zur Abbildung sogenannter „Clathrin-Coated Pits“ (Jones SA et al. 2011) mit dSTORM eingesetzt werden.

Die größte Schwachstelle des pointillistischen Live-Cell-Imagings ist die im Vergleich zur konventionellen Mikroskopie stark reduzierte zeitliche Auflösung. Mit Live-PALM konnten Einzelbilder mit Zeitabständen von mindestens 20 s (Fu G et al. 2010) zu mehrminütigen „Filmen“ zusammengefügt werden. Oftmals waren die Bildraten noch deutlich niedriger (Izeddin I et al. 2011). Live-STORM erlaubt dagegen Bildraten im einstelligen Sekundenbereich, allerdings nur über einen sehr kurzen Zeitraum (Jones SA et al. 2011). Die geringe Bildrate ist dem Prinzip von PALM und dSTORM geschuldet: das hochauflösende Bild ist eine Rekonstruktion aus vielen Tausenden von Einzelbildern, deren Aufnahme eine gewisse Zeit benötigt. Um eine hochaufgelöste Bilderserie, also eine Art „Film“ aufzuzeichnen, müssen die aufgenommenen Rohdaten in definierten Abständen, z.B. alle 1000 Bilder, verrechnet werden. Je mehr Einzelbilder in eine dSTORM- bzw. PALM-Rekonstruktion eingehen, desto „vollständiger“ wird die Struktur abgebildet und desto höher liegt die Auflösungsgrenze, bis zu welcher das Nyquist-Kriterium noch erfüllt ist. Der Gewinn an räumlicher muss also durch den Verlust von zeitlicher Auflösung erkaufte werden. Hier gilt es einen individuell auf die Fragestellung zugeschnittenen Kompromiss zu finden. Optimiert werden kann die zeitliche Auflösung, indem der Anteil der Farbstoffmoleküle gesteigert wird, die sich zum selben Zeitpunkt im aktivierten Zustand befinden. So sind für die gleiche Anzahl von Emittersignalen weniger Einzelbilder nötig. Es gilt jedoch zu bedenken, dass die Intensität des kurzwelligen Aktivierungslasers nicht zu stark erhöht werden darf. Eine zu große Energie würde womöglich die Zellfunktion beeinflussen und zudem Autofluoreszenz verursachen. Auch muss eine individuelle Auflösbarkeit der Emitter stets gewährleistet bleiben. Die benötigte Aufnahmedauer kann also nur in begrenztem Maße reduziert werden. Das Problem der geringen Bildrate wird – prinzipbedingt – immer bestehen bleiben, könnte aber in Zukunft durch die Entdeckung von Farbstoffen mit kürzeren An-Aus-Phasen entschärft werden. Hybridsysteme, die eine Färbung lebendiger Zellen mit

synthetischen Fluorophoren, vielleicht sogar mit Quantum Dots erlauben, werden hier sicherlich eine Schlüsselrolle spielen.

Im Angesicht der derzeit rasanten Weiterentwicklung der Einzelmolekül-Lokalisationsmikroskopie sind Fortschritte auch im Bereich der Mikroskopie an lebenden Zellen zu erwarten. Ob pointillistisches Live-Cell-Imaging mit Geschwindigkeiten von unter einem Bild pro Sekunde und über einen größeren Zeitraum möglich sein wird, kann nicht zuverlässig vorhergesagt werden. Dass PALM und dSTORM bei vielen Fragestellungen auch für die Mikroskopie an lebenden Zellen wertvolle Instrumente sein können, darf jedoch als sicher gelten.

Die beschriebenen technischen Weiterentwicklungen unterstreichen deutlich das enorme Potential der Einzelmolekül-Lokalisationsmikroskopie. PALM und dSTORM weisen – wie jede andere Technik auch – einige Nachteile auf. Sie werden nicht die alleinigen, heilbringenden Verfahren sein, die alle alternativen Techniken der hochauflösenden Mikroskopie verdrängen können. Es ist jedoch davon auszugehen, dass die Einzelmolekül-Lokalisationsmikroskopie bereits in naher Zukunft einen hohen Stellenwert als wichtiges Forschungswerkzeug erlangen wird. Mit dem für diese Arbeit verwendeten Prototyp können bereits jetzt hochauflösende Bildinformationen gewonnen werden, die die Lücke zwischen konventioneller Fluoreszenz- und Elektronenmikroskopie schließen. Das Potential und die zahlreichen Möglichkeiten sollten nun durch den sinnvollen Einsatz von PALM und dSTORM genutzt werden.

4.3 Syntaxin-1: Wie groß sind die Cluster wirklich?

Mithilfe von beugungslimitierten Mikroskopieverfahren wurden Syntaxin-1-Cluster mit einem Durchmesser von ca. 300 bis 400 nm abgebildet. Ihre „reale“ Größe wurde auf ca. 200 nm taxiert (Lang T et al. 2001, Lopez I et al. 2007). Sieber JJ et al. (2007) behaupteten dagegen, es handle sich tatsächlich um deutlich kleinere Werte und ermittelten anhand von STED-Aufnahmen einen Medianwert von 68 nm als Clusterdurchmesser. Mit auf gänzlich anderem Prinzip basierender Technik wurde mit der vorliegenden Arbeit ein sehr ähnlicher Wert gemessen: die Syntaxin-1-Cluster einer bovinen Chromaffinzelle wiesen in der dSTORM-Rekonstruktion einen medianen Maximaldurchmesser von 73 nm auf (Abbildung 31).

In der Analyse der Größenverteilung offenbarten sich deutliche Unterschiede zwischen den einzelnen Clustern, wobei die meisten (65%) im Bereich zwischen 60 und 85 nm lagen. Für die dSTORM-Rekonstruktion wurden nur solche Signale berücksichtigt, die mit einer Präzision von mindestens 20 nm positionsbestimmt werden konnten. Aus diesem Grund handelt es sich höchstwahrscheinlich um reale Größenunterschiede und nicht um das Korrelat verschiedener Lokalisationspräzisionen.

Wie in Kapitel 3.2.2 erläutert, ist davon auszugehen, dass sich viele der „großen“ Cluster bei noch besserem Auflösungsvermögen als mehrere kleine, dicht beieinander liegende offenbaren würden. In diesem Fall würde sich also vermutlich die Spannweite der Größenverteilung reduzieren und der Häufigkeitsgipfel in Abbildung 31 noch höher werden. Dennoch kann bereits mit der in dieser Arbeit erreichten Auflösung sicher festgestellt werden, dass die gefärbten Syntaxin-1-Cluster einen Durchmesser von meist ca. 70 nm aufweisen. Dass diese Aussage korrekt und legitim ist, lässt sich aus dem Histogramm schließen, da die Kurve auch in Richtung kleinerer Werte abfällt. Wäre die Auflösung in der dSTORM-Rekonstruktion limitierend, so würde man einen Häufigkeitsgipfel ganz links auf der x-Achse mit Abbruch der Kurve erwarten.

Beachtet werden muss jedoch, dass es sich um Messungen an mit Antikörpern markierten Strukturen handelt. Insofern übertrifft der hier angegebene Medianwert von 73 nm den tatsächlichen Durchmesser von Syntaxin-1-Clustern. Unter Berücksichtigung der Antikörpergröße kann von einem realen Wert von ca. 50 bis 60 nm ausgegangen werden.

4.4 Syntaxin-11: Ein „klassisches“ t-SNARE?

Syntaxin-11 ist von besonderer klinischer Bedeutung, da die Dysfunktion des Proteins in einer Degranulationsstörung von Natürlichen-Killer- und zytotoxischen T-Zellen resultiert (Bryceson YT et al. 2007). In der Folge kommt es zum schweren Krankheitsbild der Familiären Hämophagozytischen Lymphohistiozytose Typ 4 (FHL4). Diese ist durch Fieber, massive Hepatosplenomegalie und eine Zytopenie gekennzeichnet. Unbehandelt tödlich, ist eine kurative Therapie derzeit nur mittels Stammzelltransplantation möglich (Henter JI et al. 2006).

De Saint Basile G et al. (2010) postulieren, Syntaxin-11 sei Bestandteil des SNARE-Komplexes und interagiere vermutlich mit VAMP-7 oder -8 (*engl. vesicle-associated membrane protein*) und SNAP-23 (*engl. synaptosomal-associated protein*). Bereits gezeigt werden konnte, dass Syntaxin-11 auch an das t-SNARE Vti1b sowie an das Regulatorprotein Munc18-2 bindet (Dressel R et al. 2010).

Von anderen t-SNAREs unterscheidet sich Syntaxin-11 unter anderem darin, dass es über keine transmembranäre Domäne verfügt (Prekeris R et al. 2000). Zwar reichert sich Syntaxin-11 in der immunologischen Synapse an, im Gegensatz zu vielen anderen Isoformen scheint es jedoch nicht mit lytischen Granula kolokalisiert zu sein (Pattu V et al. 2011). Mit dieser Arbeit konnte erstmals mit hochauflösender Einzelmolekül-Lokalisationsmikroskopie nachgewiesen werden, dass Syntaxin-11-Cluster und Vesikel nicht kolokalisiert sind. Stattdessen beträgt der Abstand zwischen den beiden Strukturen mindestens 150 nm, siehe Kapitel 3.2.3.

Für die fehlende Kolokalisation können zwei Erklärungsmodelle herangezogen werden. Zum einen wäre es möglich, dass kein direkter, funktioneller Zusammenhang zwischen Syntaxin-11 und Vesikeln an der Plasmamembran besteht. In diesem Fall wäre Syntaxin-11 für die Endstrecke der Exozytose lytischer Granula nicht bedeutsam und folglich kein klassisches t-SNARE, was der Hypothese von De Saint Basile et al. widerspräche. Da es bei Fehlfunktion des Proteins zur Degranulationsstörung in den entsprechenden Zellen und zur Ausprägung der FHL4 kommt, muss Syntaxin-11 zwar eine entscheidende Rolle für die Exozytose spielen. Es könnte sich jedoch um Aufgaben handeln, die der eigentlichen Fusion von Vesikel- und Plasmamembran vorausgehen. Hinweise auf Funktionen in frühen Schritten des Exozytosevorgangs ergeben sich aus dem Umstand, dass Syntaxin-11 an verschiedenen Kompartimenten, beispielsweise an späten Endosomen oder am trans-Golgi-Netzwerk, in relevanter Menge nachweisen werden konnte (Valdez AC et al. 1999). Hierzu passt es, dass auch in der hochauflösenden dSTORM-Aufnahme (Abbildung 33) eine im Vergleich zu den

Syntaxin-1-Clustern der bovinen Chromaffinzelle (Abbildung 30) stark reduzierte Cluster-Dichte in der Plasmamembran beobachtet wurde.

Ein alternatives Erklärungsmodell könnte ein für nur sehr kurze Zeit bestehender räumlicher und funktioneller Zusammenhang zwischen Syntaxin-11 und lytischen Granula an der Plasmamembran sein. Im Gegensatz zu Chromaffinzellen scheint es in zytotoxischen T-Zellen keine größeren Pools an gedockten bzw. gepimten Vesikeln an der Plasmamembran zu geben (Becherer U et al. 2012). Es wäre also möglich, dass die abgebildeten Vesikel zum Zeitpunkt der Fixierung nicht gedockt waren. Zu einem anderen Zeitpunkt, unmittelbar vor der Exozytose, könnten die Granula durchaus mit Syntaxin-11 interagieren und eine Kolokalisation zeigen. Zur Überprüfung dieser Hypothese wäre beispielsweise eine Wiederholung des Experiments mit Fixierung zu unterschiedlichen Zeitpunkten denkbar.

5. Literaturverzeichnis

1. Abbe E (1983) Beiträge zur Theorie des Mikroskops und der mikroskopischen Wahrnehmung. *Archiv Mikroskopische Anatomie* 9:413–468
2. Aitken CE, Marshall RA, Puglisi JD (2008) An Oxygen Scavenging System for Improvement of Dye Stability in Single-Molecule Fluorescence Experiments. *Biophysical Journal* 94:1826-1835
3. Alberts B, Bray D, Hopkin K, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P (2005) *Lehrbuch der Molekularen Zellbiologie*. 3. ed. Wiley-VCH, Weinheim
4. Axelrod D (1981) Cell-Substrate Contacts Illuminated by Total Internal Reflection Fluorescence. *Journal of Cell Biology* 89:141-145
5. Bates M, Blosser TR, Zhuang X (2005) Short-Range Spectroscopic Ruler Based on a Single-Molecule Optical Switch. *Phys. Rev. Lett.* 94:108101
6. Bates M, Huang B, Dempsey GT, Zhuang X (2007) Multicolor Super-Resolution Imaging with Photo-Switchable Fluorescent Probes. *Science* 317:1749-1753
7. Beaumont PC, Johnson DG, Parsons BJ (1997) Excited state and free radical properties of rhodamine dyes in aqueous solution: A laser flash photolysis and pulse radiolysis study. *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry* 107:175-183
8. Becherer U, Rettig J (2006) Vesicle pools, docking, priming, and release. *Cell Tissue Res* 326:393-407
9. Becherer U, Medart MR, Schirra C, Krause E, Stevens D, Rettig J (2012) Regulated exocytosis in chromaffin cells and cytotoxic T lymphocytes: How similar are they? *Cell Calcium*
10. Betzig E, Patterson G, Sougrat R, Lindwasser OW, Olenych S, Bonifacino JS, Davidson MW, Lippincott-Schwartz J, Hess HF (2006) Imaging Intracellular Fluorescent Proteins at Nonanometer Resolution. *Science* 313:1642-1645
11. Biteen JS, Thompson MA, Tselentis NK, Bowman GR, Shapiro L, et al. (2008) Super-resolution imaging in live *Caulobacter crescentus* cells using photoswitch-able EYFP. *Nat Meth* 5: 947–949
12. Bryceson YT, Rudd E, Zheng C, Edner J, et al. (2007) Defective cytotoxic lymphocyte degranulation in syntaxin-11-deficient familial hemophagocytic lymphohistiocytosis 4 (FHL4) patients. *Blood*. 110:1906-1915
13. Burgoyne RD, Morgan A (1998) Analysis of regulated exocytosis in adrenal chromaffin cells: insights into NSF/SNAP/SNARE function. *Bioessays* 20:328–335
14. Carlton PM (2008) Three-dimensional structured illumination microscopy and its application to chromosome structure. *Chromosome Research* 16:351-365
15. Cramer LP, Siebert M, Mitchison TJ (1997) Identification of novel graded polarity actin filament bundles in locomoting heart fibroblasts: implications for the generation of motile force. *J. Cell. Biol* 136:1287-1305

16. Dempsey GT, Bates M, Kowtoniuk WE, Liu DR, Tsien RY, Zhuang X (2009) Photoswitching Mechanism of Cyanine Dyes. *J. A. Chem. Soc.* 131:18192-18193
17. Demtröder W (2009) *Experimentalphysik 2: Elektrizität und Optik.* 5. ed. Springer, Berlin, Heidelberg
18. Dressel R, Elsner L, Novota P, Kanwar N, Fischer von Mollard G (2010) The Exocytosis of Lytic Granules Is Impaired in Vti1b- or Vamp8-Deficient CTL Leading to a Reduced Cytotoxic Activity following Antigen-Specific Activation. *J. Immunol.* 185:1005-1014
19. Endesfelder U, Malkusch S, Flottmann B, Mondry J, Liguzinski P, Verveer PJ, Heilemann M (2011) Chemically Induced Photoswitching of Fluorescent Probes – A General Concept for Super-Resolution Microscopy. *Molecules* 16:3106-3118
20. Fernández-Suárez M, Baruah H, Martínez-Hernández L, Xie KT, Baskin JM, Bertozzi CR, Ting AY (2007) Redirecting lipoic acid ligase for cell surface protein labeling with small-molecule probes. *Nature Biotech.* 25:1483–1487
21. Fernández-Suárez M, Ting AY (2008) Fluorescent probes for super-resolution imaging in living cells. *Nature Reviews* 9:929-943
22. Fu G, Huang T, Buss J, Coltharp C, Hensel Z, Xiao J (2010) In vivo structure of the E. coli FtsZ-ring revealed by photoactivated localization microscopy (PALM). *PLoS One* 5:e12682
23. Galbraith JA, Galbraith CG (2011) Super-resolution microscopy for nanosensing. *Nanomedicine and Nanotechnology* 3:247-255
24. Gustafsson MGL (2000) Surpassing the lateral resolution limit by a factor of two using structured illumination microscopy. *Journal of Microscopy* 198:82-87
25. Habuchi S, Ando R, Dedecker P, Verheijen W, Mizuno H, Miyawaki A, Hofkens J (2005) Reversible single-molecule photoswitching in the GFP-like fluorescent protein Dronpa. *Proc. Natl. Acad. Sci USA* 102:9511-9516
26. Harke B, Keller J, Ullal CK, Westphal V, Schönle A, Hell SW (2008) Resolution scaling in STED microscopy. *Optics Express* 16:4154–62
27. Heilemann M, Margeat E, Kasper R, Sauer M, Tinnefeld P (2005) Carbocyanine Dyes as Efficient Reversible Single-Molecule Optical Switch. *J. Am. Chem. Soc.* 127:3801-3806
28. Heilemann M, van de Linde S, Schüttelpelz M, Kasper R, Seefeldt B, Mukherjee A, Tinnefeld P, Sauer M (2008) Subdiffraction-Resolution Fluorescence Imaging with Conventional Fluorescent Probes. *Angew. Chem. Int. Ed.* 47:6172-6176
29. Heilemann M, van de Linde S, Mukherjee A, Sauer M (2009a) Super-Resolution Imaging with Small Organic Fluorophores. *Angew. Chem. Int. Ed.* 48:6903-6908
30. Heilemann M, Dedecker P, Hofkens J, Sauer M (2009b) Photoswitches: Key molecules for subdiffraction-resolution fluorescence imaging and molecular quantification. *Laser & Photon. Rev.* 3:180-202
31. Hell SW, Wichmann J (1994) Breaking the diffraction resolution limit by stimulated emission: stimulated-emission-depletion fluorescence microscopy. *Optics Letters* 19:780–82
32. Henriques R, Griffiths C, Rego EH, Mlanga MM (2011) PALM and STORM: Unlocking Live-Cell Super-Resolution. *Biopolymers* 95:322-331

33. Henter JI, Horne A, Arico M, et al. (2006) HLH-2004: Diagnostic and therapeutic guidelines for hemophagocytic lymphohistiocytosis. *Pediatr Blood Cancer*. 48:124-131
34. Horn F, Moc I, Schneider N, Grillhösl C, Berghold S, Lindemeier G (2005) *Biochemie des Menschen*. 3. ed. Thieme, Stuttgart, New York
35. Howarth M, Takao K, Hayashi Y, Ting AY (2005) Targeting quantum dots to surface proteins in living cells with biotin ligase. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 102:7583–7588
36. Huang B, Wang W, Bates M, Zhuang X (2008a) Three-Dimensional Super-Resolution Imaging by Stochastic Optical Reconstruction Microscopy. *Science* 319:810-813
37. Huang B, Jones SA, Brandenburg B, Zhuang X (2008b) Whole-cell 3D STORM reveals interactions between cellular structures with nanometer-scale resolution. *Nat. Methods* 5:1047-1052
38. Huang B, Bates M, Zhuang X (2009) Super-Resolution Fluorescence Microscopy. *Annu. Rev. Biochem.* 78:993-1016
39. Irvine SE, Staudt T, Rittweger E, Engelhardt J, Hell SW (2008) Direct light-driven modulation of luminescence from Mn-doped ZnSe quantum dots. *Angew. Chem. Int. Ed.* 47:2685-2688
40. Ivanković M, Ćukušić A, Gotić I, Škrobot N, Matijašić M, Polančec D, Rubelj I (2007) Telomerase activity in HeLa cervical carcinoma cell line proliferation. *Biogerontology* 8:163-172
41. Izeddin I, Specht CG, Lelek M, Darzacq X, Triller A, Zimmer C, Dahan M (2011) Super-resolution dynamic imaging of dendritic spines using a low-affinity photoconvertible actin probe. *PLoS One* 6:e15611
42. Juette MF, Gould TJ, Lessard MD, Mlodzianoski MJ, Nagpure BS, et al. (2008) Three-dimensional sub-100 nm resolution fluorescence microscopy of thick samples. *Nat. Methods* 5:527–29
43. Jones SA, Shim SH, He J, Zhuang X (2011) Fast, three-dimensional super-resolution imaging of live cells. *Nat. methods* 8:499-505
44. Keppler A, Gendrezig S, Gronemeyer T, Pick H, Vogel H, Johnsson K (2003) A general method for the covalent labeling of fusion proteins with small molecules in vivo. *Nat. Biotechnol.* 21:86-89
45. Klar TA, Jakobs S, Dyba M, Egnér A, Hell SW (2000) Fluorescence microscopy with diffraction resolution barrier broken by stimulated emission. *PNAS* 97:8206-8210
46. Klein T, Löschberger A, Proppert S, Wolter S, van de Linde S, Sauer M (2011) Live-cell dSTORM with SNAP-tag fusion proteins. *Nat. Methods* 8:7-9
47. Köhler G, Milstein C (1975) Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature* 256:495-497
48. Lang T, Bruns D, Wenzel D, Riedel D, Holroyd P, Thiele C, Jahn R (2001) SNAREs are concentrated in cholesterol-dependent clusters that define docking and fusion sites for exocytosis. *EMBO J.* 20:2202-2213
49. Latscha HP, Kazmaier U, Klein HA (2008) *Organische Chemie: Chemie-Basiswissen II*. 6. ed. Springer, Berlin, Heidelberg, New York

50. Lauterbach MA, Ullal CK, Westphal V, Hell SW (2010) Dynamic imaging of colloidal-crystal nanostructures at 200 frames per second. *Langmuir* 26:14400–14404
51. Lichtmann JW, Conchello J (2005) Fluorescence microscopy. *Nature Methods* 12:910-919
52. van de Linde S, Kasper R, Heilemann M, Sauer M (2008) Photoswitching microscopy with standard fluorophors. *Appl. Phys. B.* 93:725-731
53. van de Linde S, Endesfelder U, Mukherjee A, Schüttpelz M, Wiebusch G, Wolter S, Heilemann M, Sauer M (2009) Multicolor photoswitching microscopy for subdiffraction-resolution fluorescence imaging. *Photochem. Photobiol. Sci.* 8:465-469
54. Lopez I, Giner D, Ruiz-Nuo A, Fuentealba J, Viniegra S, Garcia AG, Davletov B, Gutiérrez LM (2007) Tight coupling of the t-SNARE and calcium channel microdomains in adrenomedullary slices and not in cultured chromaffin cells. *Cell Calcium* 41:547-558
55. Lukyanov KA, Chudakov DM, Lukyanov S, Verkhusha VV (2005) Photoactivatable fluorescent proteins. *Nature Rev. Mol. Cell Biol.* 6:885-891
56. McKinney SA, Murphy CS, Hazelwood KL, Davidson MW, Looger LL (2009) A bright and photostable photoconvertible fluorescent protein. *Nat. Methods* 6:131-133
57. Meyer L, Wildanger D, Medda R, Punge A, Rizzoli SO, Donnert G, Hell SW (2008) Dual-color STED microscopy at 30-nm focal-plane resolution. *Small* 4:1095–1100
58. Michalet X, Pinaud FF, Bentolila LA, Tsay JM, Doose S, Li JJ, Sundaresan G, Wu AM, Gambhir SS, Weiss S (2005) Quantum dots for live cells, in vivo imaging, and diagnosis. *Science* 307:538-544
59. Moneron G, Medda R, Hein B, Giske A, Westphal V, Hell SW (2010) Fast STED microscopy with continuous wave fiber lasers. *Optics Express* 18:1302-1309
60. Nienhaus GU, Nienhaus K, Holzle A, Ivanchenko S, Renzi F, et al. (2005) Photoconvertible Fluorescent Protein EosFP: Biophysical Properties and Cell Biology Applications. *Photochem. Photobiol.* 82:351-358
61. Offenhäuser C, Lei N, Roy S, Collins BM, Stow JL, Murray RZ (2011) Syntaxin 11 Binds Vti1b and Regulates Late Endosome to Lysosome Fusion in Macrophages. *Traffic* 12:762-773
62. Patterson GH, Lippincott-Schwartz J (2002) A Photoactivatable GFP for Selective Photolabeling of Proteins and Cells. *Science* 297:1873-1877
63. Patterson GH, Davidson M, Manley S, Lippincott-Schwartz J (2010) Superresolution Imaging using Single-Molecule Localization. *Annu. Rev. Phys. Chem.* 61:345-367
64. Pattu V, Qu B, Schwarz EC, Strauß B, Weins L, Bhat SS, Halimani M, Marshall M, Rettig J, Hoth M (2011) SNARE protein expression and localization in human cytotoxic T lymphocytes. *Eur. J. Immunol.* 42:1-6
65. Pellegrin S, Mellor H (2007) Actin stress fibres. *Journal of Cell Science* 120:3491-3499
66. Prekeris R, Klumperman J, Scheller RH (2000) Syntaxin 11 is an atypical SNARE abundant in the immune system. *Eur. J. Cell Biol.* 79: 771–780
67. Rayleigh JWS (1896) *Philos. Mag.* 42:167

68. Riedl J, Crevenna AH, Kessenbrock K, Yu JH, Neukirchen D, Bista M, Bradke F, Jenne D, Holak TA, Sixt M, Wedlich-Soldner R (2008) Lifeact: a versatile marker to visualize F-actin. *Nat. Methods* 5:605-607
69. Rittweger E, Han KY, Irvine SE, Eggeling C, Hell SW (2009) STED microscopy reveals crystal colour centres with nanometric resolution. *Nature Photonics* 3:144-147
70. Rust MJ, Bates M, Zhuang X (2006) Sub-diffraction-limit imaging by stochastic optical reconstruction microscopy (STORM). *Nat. Methods* 3:793-796
71. de Saint Basile G, Ménasché G, Fischer A (2010) Molecular mechanisms of biogenesis and exocytosis of cytotoxic granules. *Nature Reviews Immunology* 10:568-579
72. Salk JE, Bazeley PL, Bennett BL, Krech U, Lewis LJ, Ward EN, Youngner JS (1954) Studies in human subjects on active immunization against poliomyelitis. *J Public Health Nations Health* 44:994-1009
73. Schaller MD (2001) Paxillin: a focal adhesion-associated adaptor protein. *Oncogene* 20:6459-6472
74. Scherer NF (2006) Pointillist microscopy. *Nature Nanotechnology* 1:19-20
75. Schröder J, Benink H, Dyba M, Los GV (2009) In vivo labeling method using a genetic construct for nanoscale resolution microscopy. *Biophys. J.* 96:L1-3
76. Schünke M, Schulte E, Schumacher U (2005) Prometheus. Hals und Innere Organe. Thieme, Stuttgart
77. Shroff H, Galbraith CG, Galbraith JA, White H, Gillette J, Olenych S, Davidson MW, Betzig E (2007) Dual-color superresolution imaging of genetically expressed probes within individual adhesion complexes. *PNAS* 104:20308-20313
78. Shroff H, White H, Betzig E (2008a) Photoactivated Localization Microscopy (PALM) of Adhesion Complexes. *Curr. Protoc. Cell Biol.* 41:4.21.1-4.21.27
79. Shroff H, Galbraith CG, Galbraith JA, Betzig E (2008b) Live-cell photoactivated localization microscopy of nanoscale adhesion dynamics. *Nature Methods* 5:417-423
80. Shtengel G, Galbraith JA, Galbraith CG, Lippincott-Schwartz J, Gillette JM, Manley S, Sougrat R, Waterman CM, Kanchanawong P, Davidson MW, Fetter RD, Hess HF (2008) Interferometric fluorescent super-resolution microscopy resolves 3D cellular ultrastructure. *PNAS* 106:3125-3130
81. Sieber JJ, Willig KI, Kutzner C, Gerding-Reimers C, Harke B, Donnert G, Rammner B, Eggeling C, Hell SW, Grubmüller H, Lang T (2007) Anatomy and Dynamics of a Supramolecular Membrane Protein Cluster. *Science* 317:1072-1076
82. Stinchcombe JC, Majorovits E, Bossi G, Fuller S, Griffiths GM (2006) Centrosome polarization delivers secretory granules to the immunological synapse. *Nature* 443:462-465
83. Thompson RE, Larson DR, Webb WW (2002) Precise Nanometer Localization Analysis for Individual Fluorescent Probes. *Biophys. J.* 82:2775-27783
84. Toomre D, Bewersdorf J (2010) A New Wave of Cellular Imaging. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 26:285-314

85. Trifaró JM, Gasman S, Gutiérrez LM (2008) Cytoskeletal control of vesicle transport and exocytosis in chromaffin cells. *Acta Physiol* 192:165-172
86. Valdez AC, Cabaniols JP, Brown MJ, Roche PA (1999) Syntaxin 11 is associated with SNAP-23 on late endosomes and the trans-Golgi network. *J. Cell Sci.* 112:845–854
87. Watanabe S, Punge A, Hollopeter G, Willig KI, Hobson RJ, Davis MW, Hell SW, Jorgensen EM (2011) Protein localization in electron micrographs using fluorescence nanoscopy. *Nat. Methods* 8:80-84
88. Weisshart K, Krampert G, Novikau Y, Kempe M (2010) Strukturierte Beleuchtung in der Hochauflösungsmikroskopie. *Optik & Photonik* 1:40-45
89. de Wit H, Walter AM, Milocevic I, Gulyás-Kovács A, Riedel D, Sørensen JB, Verhage M (2009) Synaptotagmin-1 Docks Secretory Vesicles to Syntaxin-1/SNAP-25 Acceptor Complexes. *Cell* 138:935-946
90. Wombacher R, Heidbreder M, van de Linde S, Sheetz MP, Heilemann M, Cornish VW, Sauer M (2010) Live-cell super-resolution imaging with trimethoprim conjugates. *Nat. Methods* 7:717-719
91. Yildiz A, Forkey JN, McKinney SA, Ha T, Goldman YE, Selvin PR (2003) Myosin V Walks Hand-Over-Hand: Single Fluorophore Imaging with 1.5-nm Localization. *Science* 300:2061-2065

6. Publikationen

Ute Becherer, Moritz R. Medart, Claudia Schirra, Elmar Krause, David Stevens, Jens Rettig
Regulated exocytosis in chromaffin cells and cytotoxic T lymphocytes: How similar are they?
Cell Calcium, 2012, Akzeptierter Artikel

7. Danksagung

An erster Stelle gebührt mein Dank Herrn Professor Dr. Jens Rettig. Weil er mich nach zahlreichen – von mir gewünschten – Gesprächen in seine Arbeitsgruppe aufgenommen und sein Vertrauen in mich gesetzt hat, war das Anfertigen dieser Dissertation überhaupt erst möglich. Ich bedanke mich auch für die stets durchdachten Ratschläge und die unkomplizierte Hilfe, mit welcher er mich über die gesamte Dauer meiner Arbeit unterstützte.

Ich danke auch meinem Betreuer, Herrn Privatdozent Dr. Elmar Krause, recht herzlich. Durch jederzeit einholbaren fachmännischen Rat, durch gute Ideen und konstruktive Kritik hat er entscheidenden Anteil am Zustandekommen dieser Promotionsarbeit.

Weiterhin möchte ich mich bei Mahantappa Halimani bedanken. Er ist mir stets mit bewundernswerter Hilfsbereitschaft begegnet und zu einem wahren Freund geworden. Ebenfalls als große Hilfe und wichtige Unterstützung haben sich Dr. Varsha Pattu und Sandra Hugo erwiesen. Auch Lisa Weins, die mich sehr geduldig die ersten Schritte der wissenschaftlichen Laborarbeit lehrte, verdient ein herzliches Dankeschön. Wertvolle Tipps habe ich von Dr. Ulf Matti, Dr. Claudia Schirra, Monika Dudenhöffer-Pfeifer, Dr. Misty Marshall, Dr. Ute Becherer, Dr. David Stevens, Dr. Mathias Pasche und Quynh Nguyen erhalten. Ich möchte mich darüber hinaus bei Manuela Schneider, Kathrin Sandmeier, Anja Ludes, Reiko Trautmann, Carolin Bick und Bernadette Schwarz herzlich bedanken. Ohne ihre zuverlässige Hilfe wäre diese Arbeit kaum zu realisieren gewesen.

Mein größter Dank jedoch gilt meiner wunderbaren Familie. Ihrer bedingungslosen Unterstützung, ihres Vertrauens in mich und ihrer Liebe wegen, ist sie mein größtes Glück. Unerschütterlichen Rückhalt habe ich auch von Christina Drieß, die mir eine phantastische Gefährtin ist, erfahren. Vielen Dank.

8. Curriculum Vitae

Persönliche Daten

Moritz Ruben Medart

Geburtsdatum: 14.03.1987

Geburtsort: Speyer

Adresse: Pasteurstraße 12, 76829 Landau

Schulische Ausbildung

09/1993 - 07/1997 Grundschule Rhodt

09/1997 - 03/2006 Otto-Hahn-Gymnasium, Landau i.d. Pfalz

Abschluss: Abitur (Note 1,7), Auszeichnung durch die Deutsch-Französische Gesellschaft Landau

Studium

seit 10/2006 Studium der Humanmedizin an der Medizinischen Fakultät des Saarlandes, Homburg

09/2008 1. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung (Note 2,0)

09/2008 – 08/2009 Studium an der Universidade de Coimbra, Portugal

seit 09/2009 weiteres Studium der Humanmedizin in Homburg

seit 03/2010 Tätigkeit in der Arbeitsgruppe Prof. Rettig des Physiologischen Instituts im Rahmen der Dissertation

09/2011 Deutschlandstipendium der Firma JenLab GmbH und des Bundesbildungsministeriums

Landau, den 15.06.2012