

Im Focus: STED-Mikroskop

Im Anatomischen Institut der CAU Kiel wurde ein besonders hochauflösendes Fluoreszenzmikroskop installiert.

Dr. Eileen Dahlke und Prof. Dr. Franziska Theilig, Anatomisches Institut, CAU Kiel

Das Anatomische Institut der Christian-Albrechts-Universität besitzt als erste Einrichtung im Norden ein neues hochauflösendes Fluoreszenzmikroskop der Firma Abberior Instruments. Mit Unterstützung vom Land Schleswig-Holstein und der Deutschen Forschungsgemeinschaft (DFG) bereichert das 1 Mio. € teure Mikroskop die Forschung am Institut. Das neuartige Mikroskop ist in der Lage, besonders kleine Strukturen in der Zelle aufzulösen. Dabei erreicht es eine Auflösung von bis zu 30 nm. Bisher wurden für solche Strukturauflösungen Elektronenmikroskope verwendet, die allerdings keine (flexible) Proteinspezifität aufweisen.

Wie erreicht das Mikroskop eine derart hohe Auflösung?

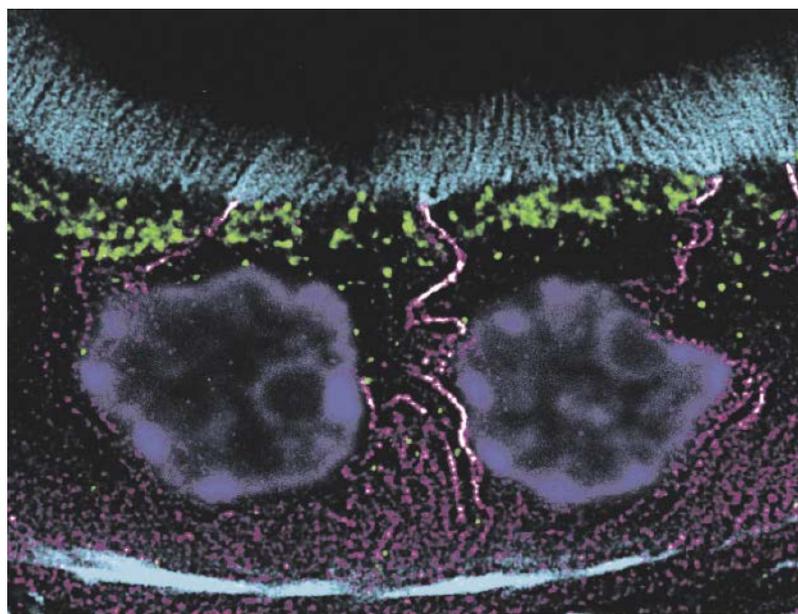
Durch die Verwendung der STED (stimulated emission depletion)-Methode ist es möglich, fluoreszierende Moleküle als separate Strukturen zu erkennen, die mindestens 30 nm voneinander entfernt liegen. Ein konventionelles Konfokalmikroskop erreicht eine Auflösung von bis zu 200 nm. Die hohe Auflösung der STED-Mikroskope wird durch folgendes Prinzip erreicht: Der erste Laser regt ein Fluorochrom an, was daraufhin ein Fluoreszenzsignal emittiert – so wie bei der konventionellen Konfokalmikroskopie. Hinzu kommt ein zweiter Laser einer bestimmten Wellenlänge, der Licht in Form eines Donuts aussendet. Das Licht in Donutform legt sich über das erste Fluoreszenzsignal und löscht das Signal an den Stellen der Überlagerung aus (depletion). Das verbleibende Signal liegt im Zentrum des Donuts und ist somit deutlich kleiner als das Ausgangssignal. Dabei hängt die Größe des resultierenden Signals unter anderem von der Leistung des Depletionslasers ab. Die STED-Methode wurde im Jahr 2014 sogar mit dem Nobelpreis für Chemie ausgezeichnet. Einer der Köpfe dahinter ist der Physiker Stefan W. Hell,



Dr. Eileen Dahlke



Prof. Dr. Franziska Theilig



Epithelzellen aus dem ersten Teil des Röhrchensystems der Niere (proximaler Tubulus). Die immunhistochemische Färbung markiert die Aktinfilamente im Bürstensaum (cyan, oben im Bild) und in der Basalmembran (unten im Bild), die Endozytosevesikel (grün), die seitliche und untere Zellgrenze mit ihren Einfaltungen (magenta) sowie die Zellkerne (blau).

Foto: Prof. Dr. Theilig, Anatomisches Institut der CAU zu Kiel.

der ebenso einer der Gründer der Abberior group ist.

Optimierung für eigene Forschungsbedürfnisse

In enger Zusammenarbeit mit Abberior Instruments hat die Forschungsgruppe um Frau Prof. Dr. Franziska Theilig das STED-Mikroskop für die eigenen Bedürfnisse angepasst. Durch langjähriger Erfahrung mit Fluoreszenzbildern von immunhistologischen Nierenpräparaten war klar, dass genau diese Anwendung eine besondere Herausforderung darstellt. Vor allem in Gewebeschnitten ist es schwierig, eine gute Auflösung zu erreichen. Zum einen stellen Strukturen, die einige Hundert Nanometer

darunter oder darüber liegen, Schwierigkeiten in Form von hereinstrahlenden Fluoreszenzsignalen dar. Zum anderen sind die zellulären Strukturen im Gewebe sehr eng gepackt und allein dadurch bereits schwer voneinander zu unterscheiden und mikroskopisch aufzulösen. Dieses Problem wurde durch die Verwendung eines besonders leistungsstarken Depletionslasers verringert. Zusätzlich hat die Forschergruppe die Gewebeprozessierung und die immunhistologische Färbung in Nierenschnitten für ihre Anwendungen optimiert. Einen großen Beitrag zu klaren Fluoreszenzsignalen und weniger Streuartefakten brachte die Anwendung des sogenannten tissue clearings. Dabei wird dem Gewebe i.d.R. Wasser entzogen,

wodurch sich der Refraktionsindex verschiebt. Dieser entspricht dann in etwa dem des Eindeckmediums und des Immersionsöls für das Mikroskopobjektiv.

Welche Fragen lassen sich dadurch lösen?

Der Vorteil der hochauflösenden Fluoreszenzmikroskopie im Vergleich zur Elektronenmikroskopie ist zum einen die Schnelligkeit von der Probenentnahme bis zum Bild. So lässt sich beispielsweise die Schlitzmembran, ausgebildet zwischen den Fußfortsätzen der Podozyten im Glomerulum der Niere, strukturell darstellen und hinsichtlich ihrer Integrität beurteilen. Auch Veränderungen im Verlauf von Plasmamembranen lassen sich untersuchen. Hierbei kommt ein weiterer Vorteil der hochauflösenden Fluoreszenzmikroskopie zum Tragen. Es besteht die Möglichkeit, einen größeren Gewebeausschnitt und ganze Zellen zu untersuchen, was in diesem Ausmaß mit dem Elektronenmikroskop nicht möglich bzw. deutlich aufwendiger zu realisieren ist. Zusätzlich können in der Fluoreszenzmikroskopie mehrere interessante Strukturen gleichzeitig mit Antikörpern markiert werden. Dadurch lassen sich präzise Kollokalisationsanalysen realisieren. Interaktionen zwischen Proteinen bzw. zwei Strukturen quasi in vivo zu analysieren, bietet ein breites Spektrum an Einsatzmöglichkeiten – von der Grundlagenforschung bis hin zur translationalen Forschung. Für das Verstehen von Krankheitsprozessen wird es immer mehr von Bedeutung sein, sich nicht nur allein auf die Proteinexpression zu stützen, sondern auch die Interaktion mit anderen Proteinen/zellulären Strukturen im Auge zu behalten. Denn abhängig von ihrer Lokalisation innerhalb der Zelle unterscheiden sich Interaktionspartner und somit auch die Funktion einzelner Proteine. Somit wäre die hochauflösende Fluoreszenzmikroskopie ein perfekter Partner für die Entschlüsselung der Translokation von Zielproteinen. Möglicherweise wäre ein Einsatz in der weiterführenden Diagnostik denkbar. So sind Fehlverteilungen von bestimmten Faktoren mit Krankheiten wie Tumoren, neurodegenerativen und metabolischen Erkrankungen assoziiert. Möglicherweise ließen sich Modifizierungen der Histone, die die Transkription von umliegenden DNA-Abschnitten beeinflussen, ebenfalls mit dem STED-Mikroskop darstellen.

| www.anatomie.uni-kiel.de |