

PALM

# Einzelmolekül-Lokalisationsmikroskopie mit mikrobiellen Proben

HELGE FEDDERSEN<sup>1</sup>, JAE YEN SHIN<sup>2</sup>, MARC BRAMKAMP<sup>1</sup>

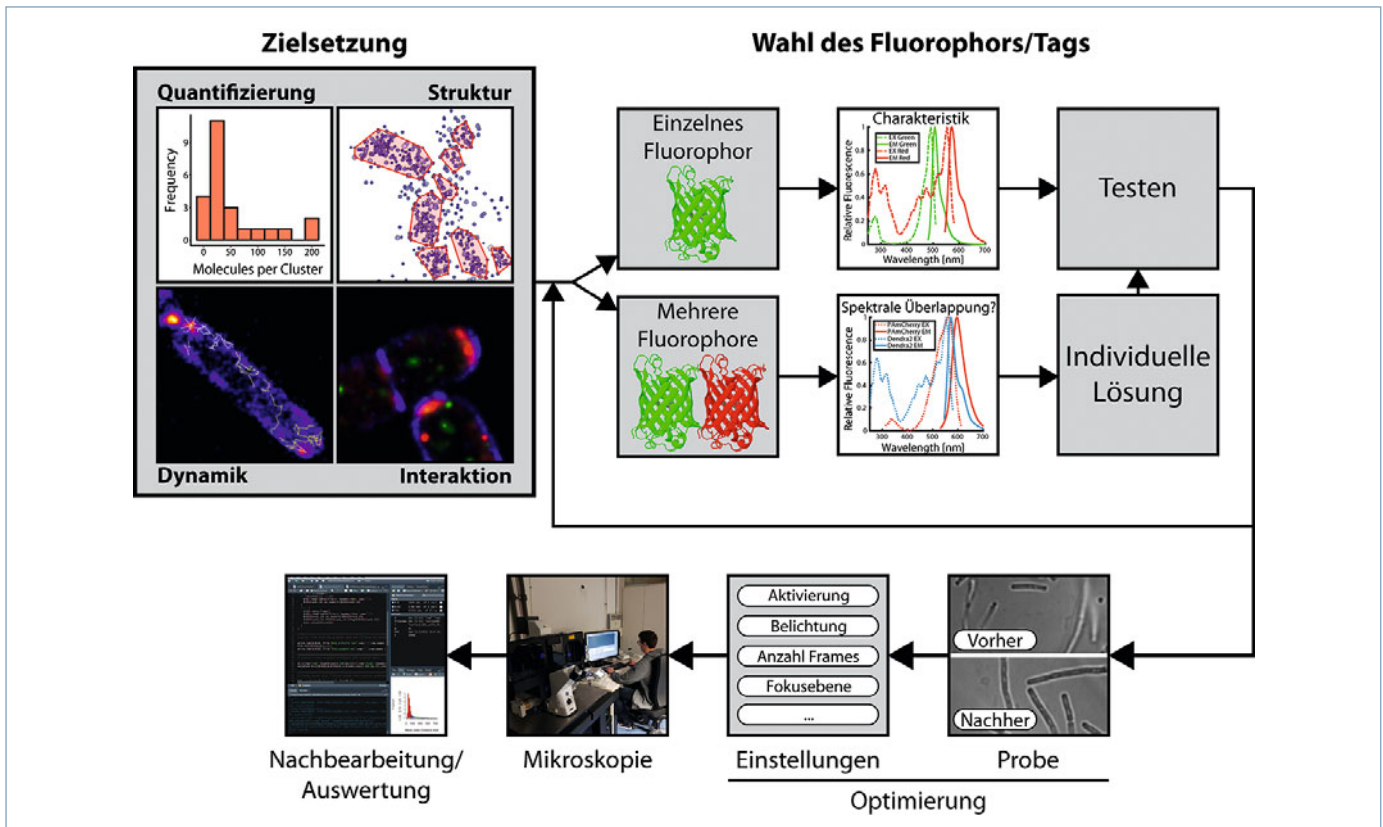
<sup>1</sup> FAKULTÄT BIOLOGIE, LMU MÜNCHEN

<sup>2</sup> MAX-PLANCK-INSTITUT FÜR BIOCHEMIE, PLANEGG-MARTINSRIED

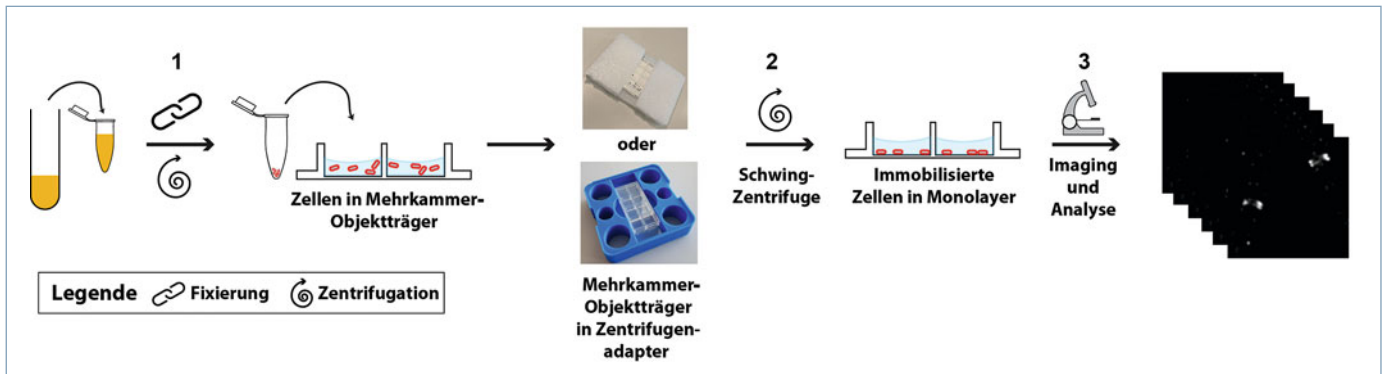
Super-resolution microscopy visualizes cellular components near their macromolecular scale (~ 20 nm) and allows one to access structural and functional information within cells. This microscopy has been particularly valuable to unveil new biological insights in the field of bacterial cell biology, where the tiny size of bacterial cells imposed long-standing challenges to visualize cellular components. Here, we report a workflow to image bacterial cellular components with photoactivated localization microscopy that involves experimental design, sample preparation, data acquisition and analysis.

DOI: 10.1007/s12268-019-1027-9  
© Springer-Verlag 2019

■ Bildgebende Verfahren liefern die überzeugendsten Daten zur Untersuchung von zellulären Strukturen und helfen dabei, deren Funktion im Detail aufzuklären. Höchstauflösende Mikroskopiemethoden erlauben die Visualisierung von intrazellulären Strukturen nahe der Makromolekülgrenze im Bereich einiger Nanometer [1]. Photoaktivierte Lokalisationsmikroskopie (PALM) ist eine von mehreren Techniken zur Höchstauflösung, mit deren Hilfe die Untersuchung der Organisation von Makromolekülen *in situ* mit einer zehnfach besseren räumlichen Auflösung erreicht werden kann als mit konventioneller Lichtmikroskopie [2, 3]. PALM umgeht die Auflösungsgrenze durch die Aktivierung einzelner Fluorophore, sodass deren Signale



▲ **Abb. 1:** Planung und Ausführung von Einzelmolekül-Lokalisationsmikroskopie-Experimenten. Für die Planung eines PALM-Experiments ist die gewünschte Zielsetzung maßgeblich für die nachfolgenden Arbeitsschritte. In den weiteren Schritten sollten sorgfältige Tests und Optimierungen durchgeführt werden, um ein aussagekräftiges Ergebnis zu erhalten.



▲ **Abb. 2:** Arbeitsschema zur Probenvorbereitung. Jeder Schritt der Probenvorbereitung (1–3) bedarf einer individuellen Optimierung, um beste PALM-Daten zu erhalten. (1) Nach der Zellernte und Fixierung werden die resuspendierten Zellen auf einen Mehrkammerobjektträger gegeben. (2) Durch Zentrifugation werden die Zellen am Boden der Kammer sedimentiert. Passende Adapter können im 3D-Drucker selbst erstellt werden. (3) Interne Totalreflexionsfluoreszenzmikroskopie (TIRF): Beleuchtung und Laserintensität müssen vor jedem Experiment angepasst werden.

(Punktspreizfunktionen, kurz PSF) sich nicht überlagern. Die Position des Fluorophors wird dann anhand der PSF mit Nanometerpräzision berechnet. Die stochastische Aktivierung von Fluoreszenzmolekülen wird durch die Nutzung von photokonvertierbaren (*photoswitchable*) Fluoreszenzproteinen (PA-FPs) erreicht. Die PA-FPs werden genetisch an die Zielproteine fusioniert, wodurch alle Proteine in der Zelle stabil mit dem Fluorophor markiert sind und so quantitative Studien ermöglicht werden. Neben der Nutzung von PALM zur Quantifizierung oder Visualisierung von Strukturen im Nanometerbereich, kann die Technik genutzt werden, um die Dynamik einzelner Moleküle in der Zelle zu messen. Durch die Einzelmolekülanregung können Moleküle über die Zeit in der Zelle verfolgt

werden (*single particle tracking*). Zudem kann PALM für die Mehrfarbenbildgebung zur Analyse von Proteininteraktionen genutzt werden, wenn PA-FPs mit geeigneten Spektren verwendet werden [4].

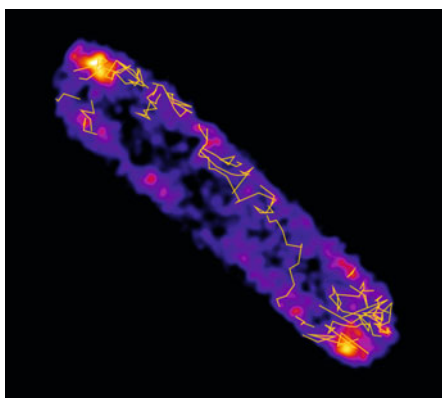
Die Implementierung von höchstauflösender Mikroskopie ist in der Praxis oft nicht trivial und bedarf einiger Expertise und individueller Optimierung bei der Probenvorbereitung und Analyse. Wir geben hier einige grundlegende Vorschläge, um die Herausforderungen von PALM zur Beobachtung von bakteriellen Zellstrukturen erfolgreich zu meistern.

### Planung des PALM-Experiments

Die wichtigste Phase eines Einzelmolekül-Lokalisationsmikroskopie-Experiments ist die

Planungsphase. Die Vielzahl der Techniken, die ein modernes PALM-System realisieren kann, hat komplett unterschiedliche Anforderungen an die benötigte Probe und Vorgehensweise (**Abb. 1**). Besonders prokaryotische Organismen stellen hierbei eine spezielle Herausforderung dar, weil Bestandteile der Zellwand oder Membran häufig autofluoreszent sind, was zu einer Überlagerung der Fluoreszenzspektren führen kann. Dies kann zwar recht einfach getestet werden, schränkt jedoch die Wahl des Fluorophors ein.

Zusätzlich muss überprüft werden, ob der gewählte Fluorophor wichtige Kriterien erfüllt. So muss die Faltung (und möglicherweise Membraninsertion) korrekt und in einem Zeitrahmen erfolgen, der mit dem markierten Protein und dem Organismus verein-



▲ **Abb. 3:** *Single-particle tracking* in *Bacillus subtilis*. Ein modernes PALM-System ermöglicht das Verfolgen einzelner Proteine in lebenden Zellen, hier Dendra2-MinD in *B. subtilis*. Aus den Ergebnissen können wertvolle Informationen gewonnen werden, wie z. B. die Identifikation verschiedener Proteinpopulationen und die jeweiligen Diffusionskonstanten, der Diffusionsmodus oder die Bindungsdynamik. Die Tracks einzelner MinD-Moleküle sind auf einen Zellumriss geplottet, der die Photonenausbeute des gesamten Experiments nach Gauß-Anpassung enthält (Farbgebung von blau nach weiß).

bar ist. Weitere wichtige Kriterien sind der Oligomerisierungscharakter (Monomer oder Oligomer) und die Photonenausbeute sowie die Langlebigkeit des Proteins. Speziell für quantitative Studien oder Clusteranalysen ist ein monomeres Protein zu bevorzugen. Gleichzeitig ist eine hohe Photonenausbeute und Langlebigkeit von Vorteil. Bei der bakteriellen Einzelmolekül-Lokalisationsmikroskopie haben sich die Fluoreszenzproteine Dendra2, mEOS3.2 und PamCherry aufgrund ihrer hervorragenden Eigenschaften durchgesetzt.

Sobald mehrere Fluorophore zum Einsatz kommen sollen, ist die Auswahl häufig limitiert. Da PALM-Fluorophore meist zuerst auf einer niedrigen Wellenlänge aktiviert/umgewandelt werden müssen, um anschließend in höherer Wellenlänge detektiert werden zu können, nutzt ein Fluorophor gleich zwei verfügbare Wellenlängen. So wird beispielsweise Dendra2 mit einem 405-nm-Laser von grüner zu roter Emission umgewandelt und anschließend mit einem 561-nm-Laser detektiert. Dies erfordert spezielle Planung, da eine Aktivierung oft mit geringerer Effizienz auch in höheren Wellenlängen stattfindet (z. B. 488 nm), wodurch ein zweiter Fluorophor nicht separat aktiviert werden kann. In diesen Fällen werden verschiedene Methoden angewendet: Es können photophysikalische Eigen-

schaften genutzt werden, um detektierte Signale der entsprechenden Population zuzuordnen, was jedoch ein gutes Signal und umfassende Vorarbeit zur Charakterisierung erfordert. Um dieses Problem zu umgehen, wurden Fluorophore entwickelt, die mit bestimmten Laserlinien effektiv aktiviert werden können. Eine weitere Möglichkeit ist das fluoreszierende Protein mNeonGreen, das auch in PALM mit einem 488-nm-Laser angeregt und detektiert werden kann, da ein Teil der Proteinpopulation inhärent blinkt und somit einzelne Ereignisse detektiert werden können. Auch hier muss mehr Aufwand in die Analyse investiert werden, da speziell dichte Strukturen durch überlappende Lokalisationen deutlich an Präzision verlieren können. Daher muss der größte Teil der mNeonGreen-Population im ersten Schritt durch Bleichen deaktiviert werden [5]. Ein großer Vorteil ist, dass mNeonGreen in der konventionellen Lichtmikroskopie weitverbreitet ist und bereits bestehende Konstrukte genutzt werden können.

### Probenvorbereitung bakterieller Proben für ein PALM-Experiment

Ein wichtiger Schritt zum erfolgreichen PALM-Experiment ist die Probenvorbereitung (**Abb. 2**). Dieser Teil sollte keine Artefakte an der Zielstruktur generieren und eine hohe Fluoreszenzausbeute bei geringem Hintergrund erlauben. Die Optimierung und Fehlersuche bzw. -behebung können dabei günstig und schnell an konventionellen Lichtmikroskopen durchgeführt werden. Wichtige Schritte der Probenvorbereitung beinhalten: (1) die Anzucht der Bakterien in Medium mit geringem Fluoreszenzhintergrund; (2) bei Bedarf die Fixierung der Probe mit Quervernetzungsreagenzien (Glutaraldehyd, Paraformaldehyd, Glyoxal), wobei die Konzentration des Reagens sowie die Temperatur und Dauer optimiert werden müssen; und (3) eine geeignete Bakteriendichte auf dem Objektträger. Eine gute Adhäsion der Zellen am Boden der Mehrkammerobjektträger erreicht man durch Zentrifugation in einem *swing-out*-Rotor [5] (**Abb. 2**).

### Imaging und Auswertung eines bakteriellen PALM-Experiments

Nach der Vorbereitung und Optimierung kann das eigentliche Experiment durchgeführt werden. Auch dieser Schritt sollte individuell angepasst werden, sowohl an die entsprechende Zielsetzung als auch den Organismus. Zuerst muss eine passende Fokusebene

gefunden werden, in der das zu untersuchende Protein am deutlichsten lokalisiert werden kann. Techniken wie die interne Totalreflexionsfluoreszenzmikroskopie (TIRF) oder *highly inclined and laminated optical sheet* (HILO) können hierbei helfen, den vom Laser angeregten Bereich auf eine dünnere Schicht zu beschränken, und so den Hintergrund reduzieren, sollte dieser in Epifluoreszenz ein Problem darstellen. Auch die Aufnahmegeschwindigkeit und Integrationszeit der Kamera spielt eine wichtige Rolle. Aufnahmen mit niedriger Geschwindigkeit und langen Integrationszeiten können nur immobile oder langsam diffundierende Populationen korrekt erfassen, während eine hohe Geschwindigkeit und kurze Integrationszeit vor allem zum Visualisieren schneller Proteinpopulationen geeignet sind (**Abb. 3**).

Geht es um das Erfassen von Strukturen in fixierten Zellen, so ist vor allem die Lokalisationspräzision entscheidend. Die Berechnung der korrekten Präzision ist sehr komplex, und es existieren verschiedene Ansätze, um diese akkurat zu berechnen. Grob vereinfacht hängt die Präzision vor allem von der gemessenen Helligkeit einer Lokalisation ab, weshalb helle Fluorophore oder Farbstoffe (und eine sensitive Kamera) von Vorteil sind.

Ein wichtiger Faktor für gute Präzision ist die Aktivierungsrate des Fluorophors. Sollten die markierten Proteine sehr abundant sein und/oder dicht beieinanderliegen, z. B. in Proteincustern, muss eine niedrige Aktivierungsrate gewählt werden. Denn nur wenn die Fluorophore wirklich einzeln und nacheinander aktiviert werden, können sie als einzelne Lokalisationen registriert werden. Dies wird durch die Intensität des Aktivierungslasers gesteuert, die nach und nach erhöht wird, um die gesamte Population zu erfassen und somit ein vollständiges Bild zu erhalten. Da eine Aufnahme in solchen Fällen sehr lange dauern kann (in Extremfällen mehrere Stunden), ist es unerlässlich, Referenzpunkte im Bildausschnitt zu haben, um den häufig auftretenden lateralen Drift der Proben nachträglich korrigieren zu können. Hierfür werden üblicherweise fluoreszierende Partikel (*fiducials*) oder Ähnliches verwendet.

Sind die Ergebnisse zufriedenstellend, folgt die Auswertung des Experiments. Hier können nur wenige generelle Aussagen getroffen werden, da fast jede Art von PALM-Experiment individuell ausgewertet werden sollte. Der erste Schritt ist jedoch sehr häufig das Filtern der Ergebnisse nach verschiedenen

Kriterien. So können Artefakte und ungenaue Lokalisationen anhand der Fluoreszenzcharakteristika entfernt werden, was zu einer besseren Gesamtauflösung führt. Bei Fluorophoren wie mNeonGreen kann dies helfen, um dicht beieinanderliegende Strukturen zu erkennen [5, 6]. Die Analyse nutzt vor allem Lokalisationstabellen, die Eigenschaften wie Koordinaten, Photonenzahl oder Präzision für jede einzelne Lokalisation des Experiments beinhalten. Für diese Arbeit werden häufig selbstgeschriebene oder angepasste Skripte/Software genutzt, um mit der immensen Datenmenge umzugehen.

Zusammenfassend wird deutlich, dass PALM-Experimente sorgfältig geplant werden müssen. In vielen Fällen ist die konventionelle Lichtmikroskopie daher ein deutlich einfacherer und schnellerer Weg zum Ziel. Erst wenn die Auflösung tatsächlich limitierend oder eine spezielle Technik erforderlich ist, sollte PALM verwendet werden. Dann jedoch stellt diese Form der Mikroskopie – mit der entsprechenden Sorgfalt und Voraussicht – ein sehr versatiles und aussagekräftiges Werkzeug dar.

### Danksagung

Die Autoren bedanken sich für finanzielle Unterstützung bei der Deutschen Forschungsgemeinschaft DFG (INST 86/1583-1 und TRR174). ■

### Literatur

- [1] Sigal YM, Zhou R, Zhuang X (2018) Visualizing and discovering cellular structures with super-resolution microscopy. *Science* 361:880–887
- [2] Betzig E, Patterson GH, Sougrat R et al. (2006) Imaging intracellular fluorescent proteins at nanometer resolution. *Science* 313:1642–1645
- [3] Hess ST, Girirajan TP, Mason MD (2006) Ultra-high resolution imaging by fluorescence photoactivation localization microscopy. *Biophys J* 91:4258–4272
- [4] Sahl SJ, Hell SW, Jakobs S (2017) Fluorescence nanoscopy in cell biology. *Nat Rev Mol Cell Biol* 18:685–701
- [5] Stockmar I, Feddersen H, Cramer K et al. (2018) Optimization of sample preparation and green color imaging using the mNeonGreen fluorescent protein in bacterial cells for photoactivated localization microscopy. *Sci Rep* 8:10137
- [6] Bach JN, Giacomelli G, Bramkamp M (2017) Sample preparation and choice of fluorophores for single and dual color photo-activated localization microscopy (PALM) with bacterial cells. *Methods Mol Biol* 1563:129–141

### Korrespondenzadressen:

Prof. Dr. Marc Bramkamp  
Fakultät Biologie  
Ludwig-Maximilians-Universität München  
Großhaderner Straße 2–4  
D-82152 Planegg-Martinsried  
Tel.: 089-218074611  
marc.bramkamp@lmu.de  
www.bacteriology.bio.lmu.de

Dr. Jae Y. Shin  
Max-Planck-Institut für Biochemie  
Am Klopferspitz 18  
D-82152 Planegg-Martinsried  
Tel.: 089-85783430  
jshin@biochem.mpg.de

### AUTOREN



#### Marc Bramkamp

1993–1998 Biologiestudium an der Universität Osnabrück. 1997–1998 Diplomarbeit am Helmholtz Zentrum für Infektionsforschung in Braunschweig. 1999–2003 Promotion in Osnabrück. 2004–2006 Postdoc an der University of Oxford, UK. 2006–2012 Gruppenleiter am Institut für Biochemie der Universität zu Köln. 2011 Habilitation für das Fach Biochemie an der Universität zu Köln. Seit 2012 Professor für Mikrobiologie an der LMU München. Ab August 2019 Professor für Biochemie und mikrobielle Zellbiologie an der Universität zu Kiel.



#### Jae Y. Shin

1995–1999 Biologiestudium an der Universität Asunción, Paraguay. 2000–2002 Masterstudium Science an der Universität Chile, Santiago de Chile; dort 2002–2007 Promotion. 2007–2012 Postdoc an der University of California, Berkeley, USA; dort 2012–2015 wissenschaftliche Mitarbeiterin. 2015–2016 Postdoc am Max-Planck-Institut für Biochemie, Martinsried. 2016–2017 Projektleiterin im Bereich Mikrobiologie an der LMU München. Seit 2017 Postdoc am Max-Planck-Institut für Biochemie, Martinsried.



#### Helge Feddersen

2009–2012 Bachelorstudium Angewandte Biologie, Hochschule Bonn-Rhein-Sieg. 2011–2012 Bachelorstudium Genetik und Immunologie, University of Aberdeen, Schottland. 2012–2014 Masterstudium Biologie, LMU München; dort seit 2015 Promotion in Mikrobiologie in der AG Bramkamp.