

3D molekulare Mikroskopie

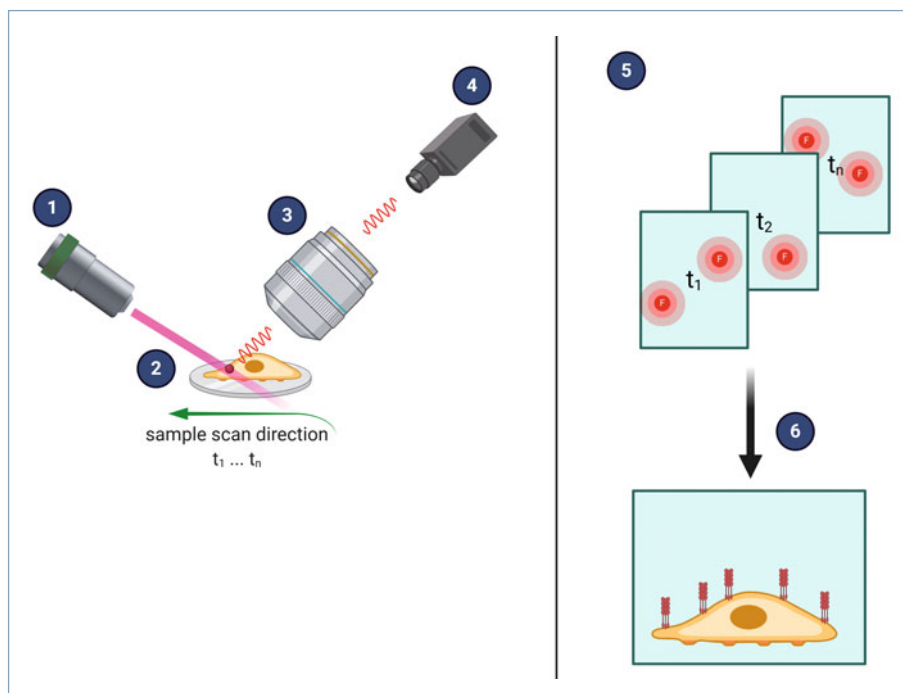
Hochaufgelöste Visualisierung einzelner Moleküle auf ganzen Zellen

JAN SCHLEGEL, MARKUS SAUER

LEHRSTUHL FÜR BIOTECHNOLOGIE UND BIOPHYSIK, BIOZENTRUM DER UNIVERSITÄT WÜRZBURG

Biological systems are dynamic and three-dimensional but many techniques allow only static and two-dimensional observation of cells. We used three-dimensional (3D) lattice light-sheet single-molecule localization microscopy (dSTORM) to investigate the complex interactions and distribution of single molecules in the plasma membrane of whole cells. Different receptor densities of the adhesion receptor CD56 at different parts of the cell highlight the importance and need of three-dimensional observation and analysis techniques.

DOI: 10.1007/s12268-020-1501-4
© Die Autoren 2020

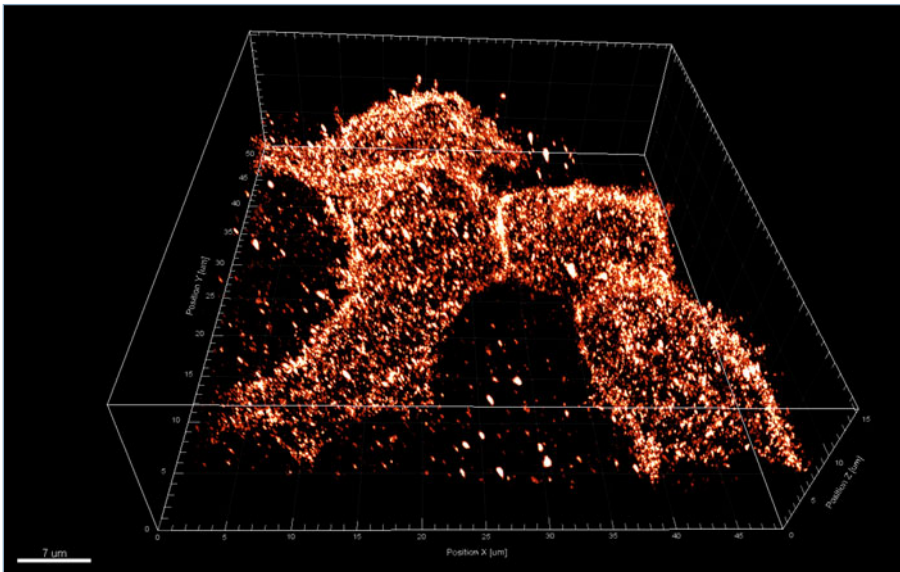


▲ **Abb. 1:** Workflow eines 3D-dSTORM-Experiments mittels Gitter-Lichtblatt-Beleuchtung. (1) Das Gitter-Lichtblatt (magenta) wird mithilfe eines Anregungsobjektivs auf die biologische Probe fokussiert. (2) Fluoreszenzmarkierte Zellen werden schrittweise durch das Gitter-Lichtblatt gefahren. (3) Fluoreszenzsignale einzelner Farbstoffe werden mithilfe eines Detektionsobjektivs eingesammelt. (4) Einzelmolekülsignale werden mithilfe einer sensitiven Kamera aufgenommen und abgespeichert. (5) Einzelbilder der verschiedenen Ebenen werden in Fitting-/Rekonstruktions-Software eingelesen und die Position einzelner Fluorophore mit Nanometer-Genauigkeit lokalisiert. (6) Abschließend werden die hochaufgelösten Bilder der verschiedenen Ebenen übereinander gelegt, wodurch die dreidimensionale Verteilung einzelner Rezeptoren untersucht werden kann. Graphik erstellt mit BioRender.com.

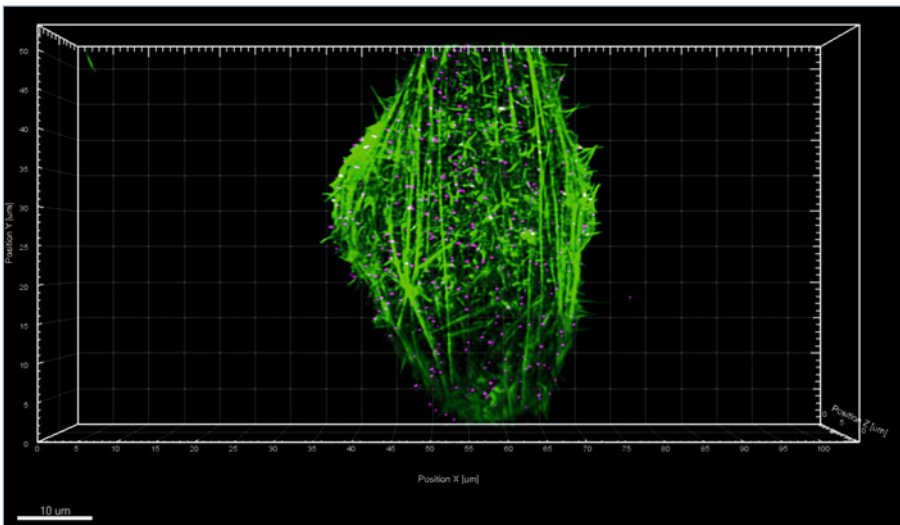
■ Die Zelle ist der Grundbaustein des Lebens auf unserer Erde. Sie ist nur wenige Mikrometer groß und dennoch in der Lage, auf vielfältige Signale und Umweltveränderungen zu reagieren und mit anderen Zellen zu kommunizieren. Eine Schlüsselrolle nehmen hierbei Rezeptoren ein, die in der äußeren Plasmamembran der Zelle verankert sind und seit Beginn des 20. Jahrhunderts intensiv erforscht werden [1]. Sie können mithilfe von Antikörpern oder fluoreszierenden Proteinen selektiv markiert und mikroskopisch untersucht werden [2]. Obwohl die Fluoreszenzmikroskopie die Lebenswissenschaften revolutioniert und zum Verständnis von vielen Krankheiten beigetragen hat, ist die Standard-Fluoreszenzmikroskopie in der räumlichen Auflösung und Empfindlichkeit begrenzt. Dies führte dazu, dass die Organisation einzelner Moleküle in der Plasmamembran von Zellen nicht oder nur auf der basalen – d. h. auf der mit der Deckglasoberfläche in Kontakt stehenden – Membran adhärenter Zellen mittels interner Totalreflektionsfluoreszenzmikroskopie (TIRFM) untersucht werden konnte [3].

Limitationen der Super-Resolution-Mikroskopie

Auf der einen Seite besteht eine Diskrepanz zwischen der von Ernst Abbe formulierten Auflösungsgrenze im Bereich von 200–300 Nanometern und der Größe von Proteinen im Bereich weniger Nanometer. Diese Lücke konnte durch die Entwicklung hochaufgelöster Mikroskopietechniken, der Super-Resolution-Mikroskopie-Methoden, z. B. der einzel-molekülempfindlichen *direct stochastic optical reconstruction microscopy* (dSTORM) geschlossen werden [2, 4]. dSTORM nutzt kommerziell erhältliche Fluoreszenzmarker, wie bspw. farbstoffmarkierte Antikörper, die in einem thiolhaltigen Schaltpuffer unter Laserbestrahlung an- und ausgeschaltet werden. Dieses „Blinken“ wird zur räumlichen Trennung und exakten Positionsbestimmung (Lokalisation) einzelner Fluoreszenzmarker und schließlich zur Rekonstruktion eines hochaufgelösten Bilds verwendet. Mithilfe



▲ **Abb. 2:** 3D-Gitter-Lichtblatt-*d*STORM-Bild einzelner CD56-Rezeptoren auf 293T-Zellen. Man erkennt klar die Anhäufung der Rezeptoren an Zell-Zell-Kontaktflächen.



▲ **Abb. 3:** Zwei-Farben-3D-Gitter-Lichtblatt-*d*STORM-Bild einzelner CD56-Rezeptoren (magenta) und des Aktin-Cytoskeletts (grün) einer adhären, fixierten 293T-Zelle.

der Technik sind Wissenschaftler in der Lage, einzelne Moleküle auf der Zelloberfläche zu zählen und mit einer nahezu molekularen Auflösung von etwa 20 Nanometern darzustellen. Die hochauflösenden, einzelmolekülempfindlichen Super-Resolution-Mikroskopie-Methoden sind jedoch gewöhnlich auf die Abbildung kleiner Bereiche der basalen Zellmembran mittels TIRFM beschränkt, wodurch wichtige Informationen über die molekulare Organisation der Plasmamembran verloren gehen. So konnte die Verteilung der Moleküle auf der dem Deckglas abgewandten Seite der Zelle und an Zell-Zell-

Kontaktstellen bisher nicht quantitativ erfasst werden.

Gitter-Lichtblattmikroskopie

Zur Abbildung größerer Volumina eignet sich die Lichtblattmikroskopie. Mithilfe der Lichtblattmikroskopie können ganze Zellen auch lebend in kurzer Zeit schonend untersucht werden. Bei der Lichtblattmikroskopie wird der Laserstrahl zur Beleuchtung der Probe fokussiert und in eine Ebene aufgefächert. Er bildet somit einen optischen Schnitt, der eine dünne Schicht in der Probe ausleuchtet. Das Fluoreszenzsignal wird von

einem in einem Winkel von 90° positionierten Objektiv gesammelt und auf einer Kamera abgebildet [5]. Eine moderne Weiterentwicklung, die Gitter-Lichtblattmikroskopie, nutzt optische Gitter für die Erzeugung sehr dünner und besonders schonender Lichtblätter [6]. Das biologische Präparat wird damit Ebene für Ebene abgescannt, wodurch ein dreidimensionales Bild entsteht (**Abb. 1**).

Dreidimensionale Rezeptorvisualisierung auf ganzen Zellen

Unsere Motivation war es, die Vorteile beider Techniken miteinander zu vereinen, um die molekulare Verteilung von Membranrezeptoren auf ganzen Zellen zu untersuchen. Hierbei fokussierten wir uns auf den Adhäsionsrezeptor CD56, der ein wichtiger Marker auf natürlichen Killerzellen ist und an der Erkennung des humanpathogenen Pilzes *Aspergillus fumigatus* beteiligt ist [7]. Erstaunlicherweise detektierten wir mittels 3D-Lichtblatt-*d*STORM weniger CD56-Moleküle auf der basalen, d. h. der in Kontakt mit dem Deckglas stehenden Membran als auf der oberen, apikalen, frei zugänglichen Membran (**Abb. 2**, [8]). Diese Ergebnisse wurden durch 3D-Lichtblatt-*d*STORM-Experimente mit den beiden Membranproteinen CD2 und CD45 bestätigt [8]. Die geringere Signaldichte auf der basalen Membran kann durch die schlechtere Zugänglichkeit der Rezeptoren auf der dem Deckglas zugewandten Seite adhärenter Zellen für Antikörper erklärt werden. Dies deutet darauf hin, dass die bisher mittels TIRFM bestimmten Rezeptordichten zu gering sind. Des Weiteren zeigen unsere Daten, dass sich CD56-Rezeptoren an Kontaktstellen zwischen zwei benachbarten Zellen ansammeln, was auf eine starke rezeptorvermittelte Interaktion der Zellen hindeutet. Schließlich eignet sich 3D-Lichtblatt-*d*STORM für die Visualisierung mehrerer Strukturen gleichzeitig auf ganzen Zellen. So können einzelne CD56-Rezeptoren im Kontext des gesamten Aktin-Cytoskeletts von Zellen in 3D mit nahezu molekularer Auflösung abgebildet werden (**Abb. 3**).

Zellen sind ständig in Bewegung

Meistens werden Zellen zur weiteren mikroskopischen Analyse chemisch fixiert. Hierbei handelt es sich jedoch um ein artifizielles System, welches der lebenden Zelle lediglich zum Zeitpunkt der Fixierung ähnelt. Um biologische Vorgänge besser zu verstehen, ist daher eine dreidimensionale Untersuchung von lebenden Zellen unabdingbar. Hier

Hier steht eine Anzeige.



erweist sich die einzelmolekülempfindliche Gitter-Lichtblattmikroskopie als sehr vorteilhaft, da die Zellen durch das feindosierte Anregungslicht kaum beeinflusst werden und das Abscannen ganzer Zellen sehr schnell erfolgt. Zum Beispiel kann so die Bewegung einzelner Rezeptoren in der Plasmamembran und einzelner intrazellulärer Vesikel über längere Zeiträume in 3D verfolgt und untersucht werden [8]. ■

Literatur

- [1] Armbruster B N, Roth B L (2005) Mining the receptorome. *J Biol Chem* 280:5129–5132
- [2] Sauer M, Heilemann M (2017) Single-molecule localization microscopy in eukaryotes. *Chem Rev* 117:7478–7509
- [3] Rosy J, Owen D M, Williamson D J et al. (2013) Conformational states of the kinase Lck regulate clustering in early T cell signaling. *Nat Immun* 14:82–89
- [4] Heilemann M, van de Linde S, Schüttelz M et al. (2008) Subdiffraction-resolution fluorescence imaging with conventional fluorescent probes. *Angew Chem Int Ed Engl* 47:6172–6176
- [5] Huisken J, Swoger J, Del Bene F et al. (2004) Optical sectioning deep inside live embryos by selective plane illumination microscopy. *Science* 305:1007–1009
- [6] Chen BC, Legant WR, Wang K et al. (2014) Lattice light-sheet microscopy: Imaging molecules to embryos at high spatiotemporal resolution. *Science* 346:1257998
- [7] Ziegler S, Weiss E, Schmitt AL et al. (2017) CD56 is a pathogen recognition receptor on human natural killer cells. *Sci Reports* 7:6138

[8] Wäldchen F, Schlegel J, Götz R et al. (2020) Whole-cell imaging of plasma membrane receptors by 3D lattice light-sheet dSTORM. *Nat Commun* 11:887

Funding note: Open Access funding enabled and organized by Projekt DEAL.
Open Access: Dieser Artikel wird unter der Creative Commons Namensnennung 4.0 International Lizenz veröffentlicht, welche die Nutzung, Vervielfältigung, Bearbeitung, Verbreitung und Wiedergabe in jeglichem Medium und Format erlaubt, sofern Sie den/die ursprünglichen Autor(en) und die Quelle ordnungsgemäß nennen, einen Link zur Creative Commons Lizenz beifügen und angeben, ob Änderungen vorgenommen wurden. Die in diesem Artikel enthaltenen Bilder und sonstiges Drittmaterial unterliegen ebenfalls der genannten Creative Commons Lizenz, sofern sich aus der Abbildungslegende nichts anderes ergibt. Sofern das betreffende Material nicht unter der genannten Creative Commons Lizenz steht und die betreffende Handlung nicht nach gesetzlichen Vorschriften erlaubt ist, ist für die oben aufgeführten Weiterverwendungen des Materials die Einwilligung des jeweiligen Rechteinhabers einzuholen. Weitere Details zur Lizenz entnehmen Sie bitte der Lizenzinformation auf <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/deed.de>.

Korrespondenzadresse:

Prof. Dr. Markus Sauer
 Lehrstuhl für Biotechnologie und Biophysik am
 Biozentrum der Julius-Maximilians-Universität
 Würzburg
 Am Hubland
 D-97074 Würzburg
 m.sauer@uni-wuerzburg.de

AUTOREN



Jan Schlegel

Biologiestudium an der Universität Würzburg mit Forschungsaufenthalt am Max-Planck-Institut für Biophysik in Frankfurt a. M. 2016–2020 Promotion in der Graduate School of Life Sciences an der Universität Würzburg.



Markus Sauer

1985–1991 Chemiestudium an den Universitäten Karlsruhe, Saarbrücken und Heidelberg. 1991–1995 Promotion in Physikalischer Chemie der Universität Heidelberg. 2002 Habilitation. 2003–2009 Professor für Angewandte Laserspektroskopie und Laserphysik der Universität Bielefeld. Seit 2009 Professor für Biotechnologie und Biophysik am Biozentrum der Universität Würzburg.

Hier steht
eine Anzeige.

 Springer