

# STED-Mikroskopie

## Lebendzellbeobachtungen jenseits der Beugungsgrenze

Die ultra-hochauflösende Lichtmikroskopie hat den Lebenswissenschaften zu einem beachtlichen Sprung in ihrer Entwicklung verholfen. Noch vor wenigen Jahren war es für Biologen und Mediziner undenkbar, Strukturen kleiner als 100 nm aufzulösen oder gar dynamische Prozesse in lebenden Zellen zu beobachten. Die STED-Mikroskopie (STimulated Emission Depletion) ermöglicht der biomedizinischen Forschung heute neue Einblicke in die Welt jenseits der Beugungsgrenze. Auch wenn die Ultra-Hochauflösung auf komplexer optischer Technologie beruht, sind kommerziell erhältliche STED-Systeme ebenso leicht zu bedienen wie konventionelle, weit verbreitete Konfokalmikroskope. Dieser Artikel erläutert die Entwicklung der STED-Mikroskopie von der Idee bis zur neuesten Gerätegeneration für Lebendzelluntersuchungen.

### STED – das Prinzip

Über 120 Jahre lang schien Abbes Gesetz über die optische Beugungsgrenze unüberbrückbar und in Stein gemeißelt. Für die Lichtmikroskopie bedeutet dies in der Praxis, dass einzelne Punkte im sichtbaren

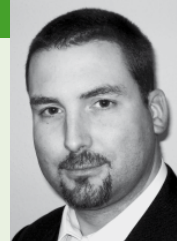
Spektralbereich nicht mehr getrennt darstellbar sind, wenn sie lateral weniger als 200 nm voneinander entfernt sind. Mit der STED-Mikroskopie (STimulated Emission Depletion) beschrieb Stefan Hell 1994 eine Methode, die lediglich mittels Photophysik und Optik Auflösungen deutlich jenseits dieser Beugungsgrenze erreicht [1] und somit Wissenschaftlern erlaubt, subzelluläre Strukturen im zweistelligen Nanometerbereich zu beobachten.

Den schematischen Aufbau eines STED-Mikroskops erläutert Abbildung 1. Die Basis eines STED-Systems bildet ein konventionelles Konfokal-Laser-Scanning-Mikroskop. Der Anregungsstrahl (grün) wird wie üblich auf einen Punkt fokussiert, dessen minimale Ausdehnung durch die Beugungsgrenze limitiert ist. Ein zweiter Laserstrahl (rot) überführt die angeregten Moleküle wieder in den Grundzustand. Dieser STED-Strahl wird über einen Phasen-Modulator so verändert, dass er in der Fokusebene eine Donut-Form aufweist. Durch Überlagerung des Anregungsmit dem STED-Fokus wird die Emission von Fluoreszenzlicht auf das Zentrum des Donuts beschränkt. Dieser verbleibende, effektive Fokuspunkt ist durch diesen optischen Trick erheblich verkleinert, und seine Ausdehnung liegt unterhalb der Beugungsgrenze. Die

### DER AUTOR

#### JOCHEN J. SIEBER

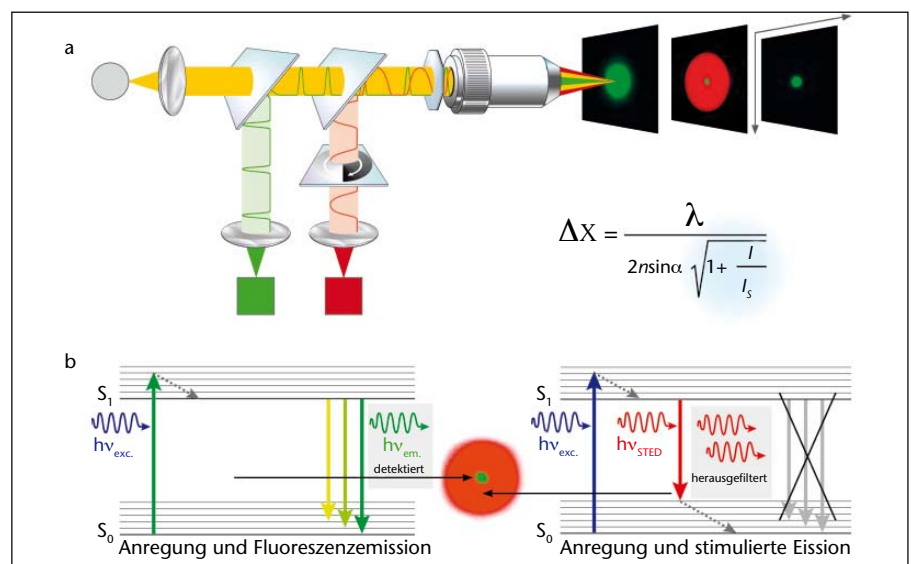
Jochen J. Sieber hat in Leipzig und Glasgow Biochemie studiert und in Göttingen am Max-Planck-Institut für Biophysikalische Chemie in der Abteilung Neurobiologie promoviert. Um mehr über die Dynamik der Plasmamembran zu erfahren, charakterisierte er exemplarisch den Syntaxin 1-Cluster. Die Zusammenarbeit mit Stefan Hell ermöglichte Sieber Größe, Anzahl und Dichte dieser Nanostruktur mit Hilfe der STED-Mikroskopie zu bestimmen. Seit 2007 arbeitet Sieber als Entwickler bei Leica Microsystems mit dem Schwerpunkt Ultra-Hochauflösung.



Dr. Jochen J. Sieber  
Leica Microsystems CMS GmbH, Mannheim

Anja Schué  
Communications & Corporate Identity  
Leica Microsystems GmbH  
35578 Wetzlar, Deutschland  
Tel.: +49 (0)6441-292201  
E-Mail: Anja.Schue@leica-microsystems.com  
Website: www.leica-microsystems.com

ABB. 1: Das Prinzip der STED-Mikroskopie. A: Schematischer Aufbau eines STED-Mikroskops, B: Die für die STED-Mikroskopie entscheidenden photophysikalischen Prozesse im Jablonski-Diagramm. Bei der STED-Mikroskopie ist die Auflösung nicht mehr beugungsbegrenzt. Der minimale Durchmesser des effektiven Fokuspunktes und die dadurch erreichte Auflösung sind nicht mehr ausschließlich durch die Wellenlänge  $\lambda$  und die numerische Apertur ( $n \sin \alpha$ ) des Objektivs begrenzt. Die Formel zeigt, dass die maximal erreichbare Auflösung durch die Farbstoffeigenschaften (der Parameter  $I_s$ ) und die Menge des verwendeten STED-Lichts ( $I$ ) bestimmt wird.



Probe kann somit analog zur konfokalen Laser-Scanning-Mikroskopie abgerastert werden, jedoch mit deutlich verbesserter lateraler Auflösung. Das Ergebnis ist ein Bild, das Strukturen im Nanobereich sichtbar macht.

Abbildung 1B veranschaulicht die für die STED-Mikroskopie entscheidenden photo-physikalischen Prozesse. Das Jablonski-Diagramm zeigt die verschiedenen Schwingungsniveaus eines Fluorophors im Grundzustand ( $S_0$ ) und im ersten angeregten Singulett-Zustand ( $S_1$ ). Anregungslicht einer bestimmten Wellenlänge (blau) überführt ein Molekül vom  $S_0$ -Zustand in den ersten angeregten Singulett-Zustand. Der Übergang zwischen den Schwingungsniveaus eines Zustands erfolgt strahlungslos durch innere Konversion. Die Rückkehr des angeregten Moleküls in den Grundzustand findet spontan unter Emission von Fluoreszenzlicht (grün) statt. Der Übergang in den Grundzustand kann auch durch Licht induziert werden (stimulierte Emission, rot dargestellt). STED-Mikroskope sind so aufgebaut, dass sie ausschließlich das Fluoreszenzlicht und kein Licht der Wellenlänge des STED-Lasers detektieren. Je nachdem, wo sich ein Fluorophor im Fokussvolumen befindet, ist entweder Fluoreszenz oder stimulierte Emission der dominierende photophysikalische Prozess.

Je stärker der STED-Laser ist, desto kleiner das Volumen, in dem Fluoreszenz möglich ist, und damit desto höher die Auflösung. Letztendlich bestimmen die Laserstärke und die photophysikalischen Eigenschaften des verwendeten Farbstoffs, welche maximale Auflösung mit einem STED-Mikroskop erreicht werden kann (vgl. Formel in Abbildung 1).

### Von der Idee zum Lebendzellexperiment

Sobald das Prinzip zum ersten Mal im Laborbau realisiert worden war, war die Erfolgsgeschichte der STED-Mikroskopie nicht mehr aufzuhalten. Immer mehr Forscher erkannten die neuen faszinierenden Möglichkeiten der neuen Technologie. Der Zeitstrahl in Abbildung 2 fasst die wichtigsten Meilensteine der ultra-hochauflösenden STED-Mikroskopie von der Idee bis zum Einsatz in Lebendzellstudien chronologisch zusammen.

Alles begann im Jahr 1994, als Stefan Hell die Grundlagen zur STED-Mikroskopie beschrieb [1]. Im Jahr 2000 wurde das erste biologische STED-Bild in einer Studie veröffentlicht [2]. 2006 folgten wissenschaftliche Arbeiten, in denen die STED-Mikroskopie zur Beantwortung biologischer Fragestellungen erfolgreich eingesetzt wurde [3, 4, 5, 6]. Seitdem hat die STED-Mikroskopie in vielen biologischen Anwendungen Einzug gehalten. 2006 konnte außerdem erstmals



ABB. 2: Meilensteine der STED-Mikroskopie. Die ultra-hochauflösende Mikroskopie ist längst nicht mehr nur eine Technologie für spezialisierte Labore, sondern sie wird heute schon routinemäßig in der biologischen Forschung eingesetzt. Kommerziell erhältliche STED-Systeme sind ebenso leicht zu bedienen wie konventionelle Konfokalmikroskope.

**DIE FIRMA**

**Leica Microsystems**  
Wetzlar

ist ein weltweit führender Entwickler und Hersteller von optischen High-Tech-Präzisionssystemen für die Darstellung, Analyse und Messung von Mikrostrukturen. In den Bereichen Lichtmikroskopie, konfokale Lasermikroskopie und Bildanalyse, Probenvorbereitung sowie Medizintechnik gehört Leica Microsystems zu den Marktführern. Leica Produkte werden in vielen Anwendungen in der Biowissenschaft, Biotechnologie, Medizin, Werkstoffwissenschaft und der industriellen Qualitätskontrolle eingesetzt.

[www.leica-microsystems.com](http://www.leica-microsystems.com)

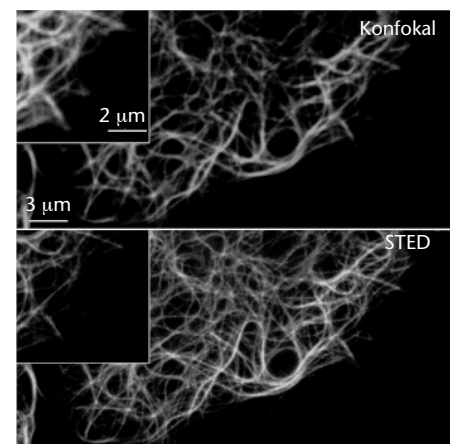


ABB. 3: Konfokal- und STED-Aufnahme von Mikrotubuli in lebenden Kyoto-Zellen mit Tubulin Tracker™ Green markiert.

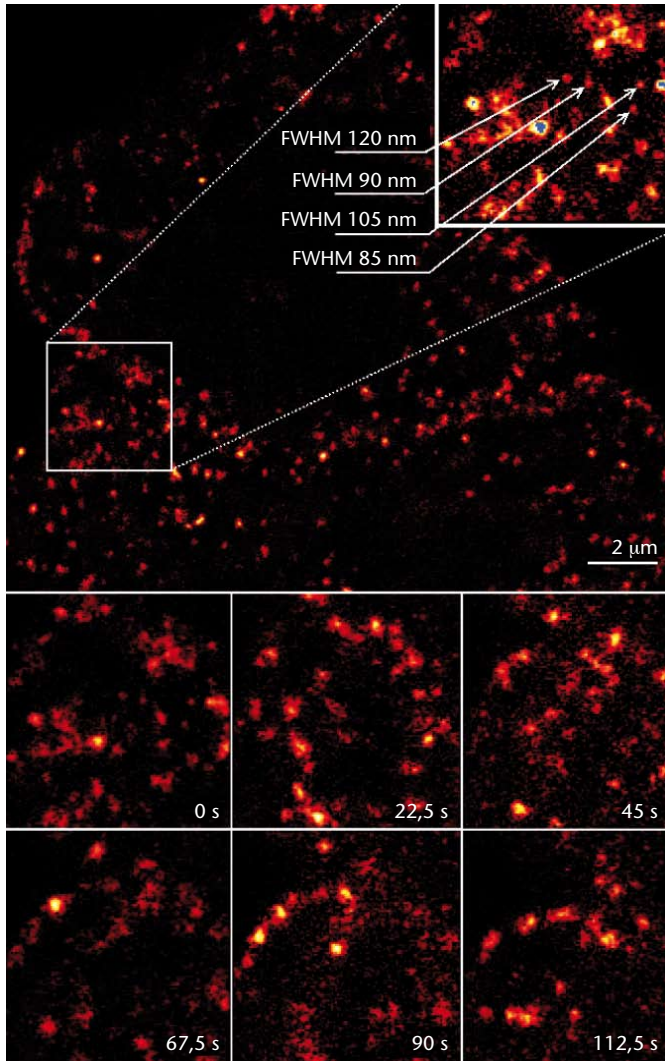
gezeigt werden, dass die STED-Mikroskopie auch ultra-hochauflösende Bilder von Strukturen liefern kann, die mit einem autofluoreszierenden Protein (FP) markiert sind [7]. Später wurden neben autofluoreszierenden Proteinen auch andere genetisch kodierte Marker für die hochauflösende STED-Mikroskopie in lebenden Zellen eingesetzt [8, 9].

Mit dem Leica TCS STED kam 2007 das erste kommerzielle STED-System auf den Markt. In diesem Gerät ist die STED-Mikroskopie im tiefroten Spektralbereich realisiert. 2008 wurden erstmals STED-Videos mit 28 Bildern/s und 62 nm Auflösung von Vesikelbewegungen in Neuronen aufgezeichnet [10] und die ersten STED-mikroskopischen Lebendzelluntersuchungen mit autofluoreszierenden Proteinen (FPs) veröffentlicht [11, 12]. Mit dem Leica TCS STED CW hat Leica Microsystems 2009 sein STED-Portfolio um ein weiteres System erweitert. Das STED CW (Continuous Wave) erschließt den grün-gelben Spektralbereich für die Ultra-Hochauflö-

sung. Es kann für eine Vielzahl biologischer Experimente bis hin zu Lebendzellstudien eingesetzt werden, da es das Arbeiten mit Standardfarbstoffen wie Alexa 488, FITC und Oregon Green 488 sowie den Einsatz gelb fluoreszierender Proteine wie EYFP, Citrin und Venus erlaubt. Die in diesem Gerät realisierte Variante der STED-Mikroskopie verwendet sowohl für die Anregung als auch für die stimulierte Emission Dauerstrichlaser statt gepulste Laser. Diese Technik wurde erstmals 2007 beschrieben [13].

### Die Markierungsmethoden

Eine der Stärken fluoreszenzmikroskopischer Methoden ist die Möglichkeit, die zu untersuchenden Zellstrukturen gezielt sichtbar zu machen. Geeignete Fluorophore an die gewünschte Stelle in den Zellen zu bringen ist daher einer der entscheidenden Punkte für die Lebendzell-STED-Mikroskopie. Einige spezielle Anwendungen nutzen mit Farbstoff konjugierte Antikörper bzw. Antikörperfragmente, um Strukturen in lebenden Zellen zu markieren. Ein Beispiel ist die Aufzeichnung



◀ **ABB. 4: STED-Aufnahmen der Vesikel-Bewegung in lebenden PC12-Zellen. Die Auflösung erlaubt, die reale Halbwertsbreite (Full Width Half Maximum, FWHM) der mit dem autofluoreszierenden Protein Venus markierten Large Dense Core Vesicles (LDCVs) im Bild zu messen. Die unteren beiden Zeilen zeigen Ausschnittvergrößerungen für jedes fünfte Bild der Zeitreihe (4,5 s je Bild).**

der Vesikel-Dynamik in Nervenzellen [10]. Auch sind einige Substanzen zur direkten Färbung von Zellstrukturen wie z. B. Tubulin Tracker™ Green (Invitrogen) kommerziell erhältlich (siehe auch Abb. 3).

Meist setzen Biologen jedoch auf genetisch kodierte Marker zur Visualisierung biologischer Vorgänge in lebenden Zellen. Dabei werden die Zellen üblicherweise genetisch so manipuliert, dass sie ein Fusionsprotein aus dem zu untersuchenden Protein und dem Marker herstellen. Die bekanntesten Vertreter der genetisch kodierten Marker sind die autofluoreszierenden Proteine. Für ultra-hochauflösende Experimente mit dem STED CW in lebenden Zellen sind die im gelben Spektralbereich fluoreszierenden Proteine EYFP [11], Citrin [12] und Venus aufgrund ihrer Photostabilität besonders geeignet. Mit dieser Technik kann beispielsweise die reale Größenverteilung von mit Venus-markierten Large Dense Core Vesicles (LDCVs) in lebenden Zellen ermittelt (Abb. 4) und die Dynamik der Vesikel untersucht werden. Mit Hilfe der STED-Mikroskopie und dem im roten

Wellenlängenbereich fluoreszierenden Protein E2-Crimson (Emissionsmaximum bei 646 nm) konnte auch die Bewegung des endoplasmatischen Retikulums in lebenden Zellen beobachtet werden [14].

Neben den autofluoreszierenden Proteinen gibt es noch eine Reihe weiterer genetisch kodierter Marker, von denen einige bereits bei STED-Experimenten eingesetzt wurden. Sich selbst markierende Protein-Tags sind nicht autofluoreszierend. Sie sind jedoch in der Lage, spezifische Bindungen einzugehen – eine Eigenschaft, die eingesetzt wird, um Proteine selektiv sichtbar zu machen. Im Fall des SNAP-Tags, das auf dem Enzym O<sup>6</sup>-Alkylguanin-DNA-Alkyltransferase basiert, reagieren spezielle Substrate (Benzyl-Purin- und Benzyl-Pyrimidin-Derivate) mit dem Protein-Tag und werden so kovalent an dieses Tag gebunden. Ist das Substrat mit einem organischen Farbstoff konjugiert, kann die fluoreszenzmikroskopische Untersuchung beginnen, sobald der Substrat-Überschuss durch Waschen entfernt wurde. Diese Methode ist gegenüber der Markierung mit autofluoreszierenden

Proteinen sehr flexibel einsetzbar. Ein SNAP-Tag-Fusionsprotein kann in den verschiedensten Farben dargestellt werden, da prinzipiell jeder organische Farbstoff an das Substrat gebunden werden kann. Membrangängige Substrat-Farbstoff-Konjugate sind kommerziell erhältlich (NEB) und wurden bereits für STED-mikroskopische Untersuchungen lebender Zellen eingesetzt [9].

Die Markierung von Proteinen über die Fusion mit einem Fluorogen-aktivierenden Protein-TAG (FAP) ist eine neue Technik, die 2008 publiziert wurde [15]. Das FAP-Tag selbst ist nicht fluoreszierend, kann jedoch ein spezielles Farbstoffmolekül (Fluorogen) nicht-kovalent binden, das in diesem Zustand zur Fluoreszenz angeregt werden kann. Überschüssiges, nicht gebundenes Fluorogen zeigt keine Fluoreszenz, es muss also nicht ausgewaschen werden. Der nicht-kovalente Charakter der Bindung des Fluorogens mit dem FAP-Tag ist eine weitere Eigenschaft, die speziell für Lebendzellbeobachtungen über längere Zeiträume interessant ist. Das durch Laserlicht gebleichte Fluorogen kann durch ungebleichtes ersetzt werden, wodurch mehr Aufnahmen möglich sind. Abbildung 5 zeigt ein Anwendungsbeispiel mit STED-Bildern von Rezeptoren an der Zelloberfläche. Auch FAP-markiertes, intrazelluläres Aktin wurde bereits mit auf Malachitgrün basierenden Fluorogenen in lebenden Zellen dargestellt [8].

Neben den hier erwähnten gibt es noch eine Fülle weiterer genetisch kodierter Marker für Lebendzellbeobachtungen. Dazu gehören unter anderem das FIAsh und ReAsh nicht-kovalent bindende Tetracyclin-Motiv (Invitrogen) sowie das dem SNAP-Tag (NEB) ähnliche Halo-Tag (Promega). Auf diesem Gebiet sind viele Forschungsarbeiten im Gange. So werden nicht nur neue autofluoreszierende Proteine mit optimierten Eigenschaften entwickelt, sondern auch Färbetechniken und organische Farbstoffe für den Einsatz in lebenden Zellen optimiert.

## Großes Zukunftspotenzial

Im letzten Jahrzehnt hat die ultra-hochauflösende Fluoreszenzmikroskopie Einzug in die Biologie gehalten. Immer mehr Forscher wollen mehr sehen, als die beugungslimitierte konventionelle Lichtmikroskopie auflösen kann. Um die Prozesse des Lebens bis ins kleinste Detail zu verstehen, ist es unerlässlich, die kleinen biologischen Einheiten in der Zelle aufzulösen und zu beobachten, wie sie sich bewegen und interagieren. Diese Strukturen sind meist erheblich kleiner als 100 nm – eine Auflösung, die die STED-Mikroskopie liefern kann. Die STED-Technologie ist heute aufgrund der einzigartigen Kombination aus Ultra-Hochauflösung mit hoher Bildaufnah-

megeschwindigkeit und der Möglichkeit, optische Schnitte zu erzeugen, die Methode der Wahl für die Beobachtung dynamischer subzellulärer Strukturen. Da der Farbstoff direkten Einfluss auf die erreichbare Auflösung hat, werden zukünftig optimierte Farbstoffe und Markierungsmethoden einen entscheidenden Einfluss auf die Leistungsfähigkeit der STED-Mikroskope haben. Auch von der sich schnell entwickelnden Lasertechnologie wird die STED-Mikroskopie sicherlich profitieren. Die Pionierarbeiten sind geleistet.

Ultra-hochauflösende Mikroskopie bleibt nicht länger nur spezialisierten Laboren vorbehalten, sondern sie wird heute schon routinemäßig in der biologischen Forschung eingesetzt. Die ersten Lebendzellstudien sind publiziert. Spannend bleibt, welche Antworten Biologen und Mediziner in den nächsten Jahren auf bisher ungelöste Fragen finden; Antworten, die helfen, die Entstehung von Krankheiten besser zu verstehen und die auf Experimenten jenseits der Beugungsgrenze beruhen.

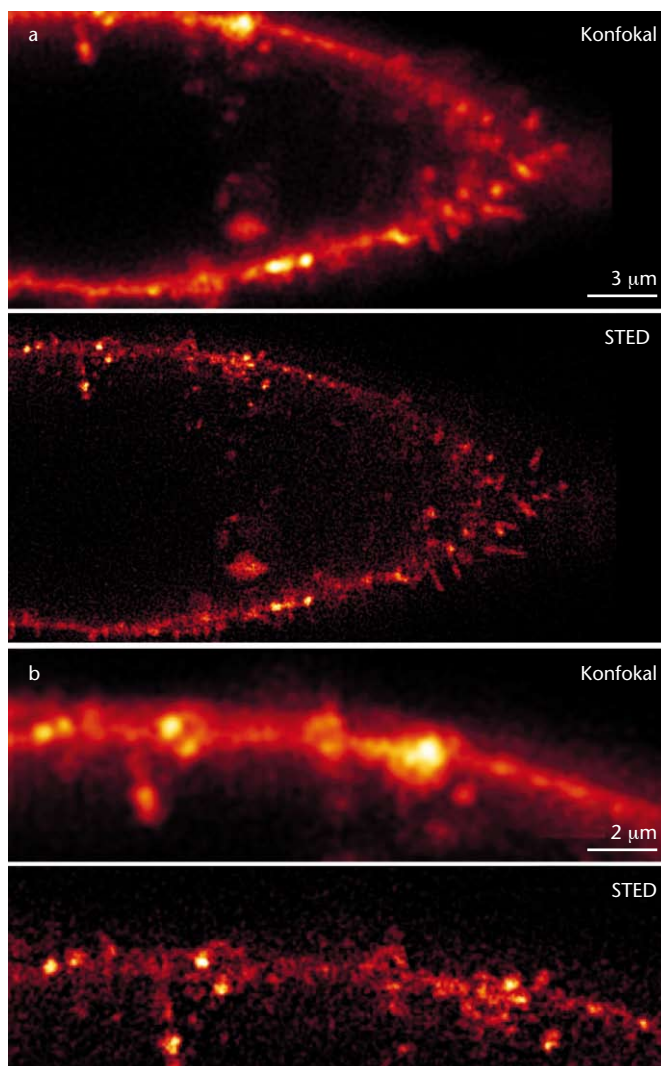
## Danksagung

Ich danke James Fitzpatrick und Marcel Bruchez vom Molecular Biosensor and Imaging Center der Carnegie Mellon University (Pittsburgh) für die gute Zusammenarbeit bei der Evaluierung der Fluorogen-aktivierenden Proteine als genetisch kodierte Marker für die Lebendzell-STED Mikroskopie sowie Katrin Willig und Birka Hein von der Abteilung NanoBiophotonik (Stefan Hell) des Max-Planck-Instituts für Biophysikalische Chemie in Göttingen für die intensive und fruchtbare Kooperation im Rahmen des BMBF-Projekts „Nanolive“.



## Referenzen

- [1] Hell, S. W. and J. Wichmann (1994). „Breaking the diffraction resolution limit by stimulated emission.“ *Opt. Lett.* 19(11): 780–782.
- [2] Klar, T. A., S. Jakobs, M. Dyba, A. Egnér and S. W. Hell (2000). „Fluorescence microscopy with diffraction resolution limit broken by stimulated emission.“ *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97(15): 8206–8210.
- [3] Sieber, J. J., K. I. Willig, R. Heintzmann, S. W. Hell, T. Lang (2006): „The SNARE-motif is essential for the formation of syntaxin clusters in the plasma membrane“. *Biophys. J.* 90: 2843–2851.
- [4] Willig, K. I., S. O. Rizzoli, V. Westphal, R. Jahn, S. W. Hell (2006): „STED microscopy reveals that synaptotagmin remains clustered after synaptic vesicle exocytosis“. *Nature* 440 (7086): 935–939.
- [5] Kittel, R. J., C. Wichmann, T. M. Rasse, W. Fouquet, M. Schmidt, A. Schmid, D. A. Wagh, C. Pawlu, R. R. Kellner, K. I. Willig, S. W. Hell, E. Buchner, M. Heckmann, S. J. Sigrist (2006):



► **ABB. 5:** FAP-markiertes ADRB2-Protein ( $\beta$ 2-adrenergic receptor) in lebenden NIH 3T3-Zellen als Konfokal- und STED-Bild (A) sowie als vergrößerte Teilausschnitte (B).

- „Bruchpilot promotes active zone assembly,  $\text{Ca}^{2+}$ -channel clustering, and vesicle release“. *Science* 312: 1051–1054.
- [6] Fitzner, D., A. Schneider, A. Kippert, W. Möbius, K. I. Willig, S. W. Hell, G. Bunt, K. Gaus, M. Simons (2006): „Myelin basic protein-dependent plasma membrane reorganization in the formation of myelin“. *EMBO J.* 25, 5037–5048.
- [7] Willig K.I., Kellner R.R., Medda R., Hein B., Jakobs S., Hell S.W. Nanoscale resolution in GFP-based microscopy. *Nat Methods.* 2006 Sep;3(9):721–3
- [8] James A. J. Fitzpatrick, Qi Yan, Jochen J. Sieber, Marcus Dyba, Ulf Schwarz, Chris Szent-Gyorgyi, Carol A. Woolford, Peter B. Berget, Alan S. Waggoner and Marcel P. Bruchez STED Nanoscopy in Living Cells Using Fluorogen Activating Proteins *Bioconjugate Chem.*, 2009, 20 (10), pp 1843–1847
- [9] Hein B., K. I. Willig, C. A. Wurm, V. Westphal, S. Jakobs, S. W. Hell (2010): „Stimulated Emission Depletion Nanoscopy of Living Cells Using SNAP-Tag Fusion Proteins“. *Biophys. J.* 98, 158–163.
- [10] Westphal, V., S. O. Rizzoli, M. A. Lauterbach, D. Kamin, R. Jahn, S. W. Hell (2008): „Video-Rate Far-Field Optical Nanoscopy Dissects Synaptic Vesicle Movement“. *Science* 320, 246–249.
- [11] Nägerl, U. V., K. I. Willig, B. Hein, S. W. Hell, T. Bonhoeffer (2008): „Live-cell imaging of dendritic spines by STED microscopy“. *PNAS* 105 (48), 18982–18987.
- [12] Hein, B., K. I. Willig, S. W. Hell (2008): „Stimulated emission depletion (STED) nanoscopy of a fluorescent protein-labeled organelle inside a living cell“. *PNAS* 105 (38), 14271–14276.
- [13] Willig, K. I., B. Harke, R. Medda, S. W. Hell (2007): „STED microscopy with continuous wave beams“. *Nature Meth.* 4 (11), 915–918.
- [14] Strack R.L., Hein B., Bhattacharyya D., Hell S.W., Keenan R.J., Glick B.S.: A rapidly maturing far-red derivative of DsRed-Express2 for whole-cell labeling. *Biochemistry.* 2009 Sep 8;48(35):8279-81. Erratum in: *Biochemistry.* 2009 Oct 13;48(40):9704.
- [15] Szent-Gyorgyi C., Schmidt B.F., Creeger Y., Fisher G.W., Zakek K.L., Adler S., Fitzpatrick J.A., Woolford C.A., Yan Q., Vasilev K.V., Berget P.B., Bruchez M.P., Jarvik J.W., Waggoner A.: Fluorogen-activating single-chain antibodies for imaging cell surface proteins. *Nat Biotechnol.* 2008 Feb;26(2):235–40. Epub 2007 Dec 23. Erratum in: *Nat Biotechnol.* 2008 Apr;26(4):470.