

Neue Einblicke in den biologischen Mikrokosmos

Innovative Ansätze in der Mikroskopie erlauben die Beobachtung intrazellulärer Prozesse und Strukturen

Simone Baltrusch, Stefan Lochbrunner

Im Kompetenzzentrum "Mikroskopie und Spektroskopie" des Departments werden unter anderem neue Techniken entwickelt, um unser Verständnis von biologischen Prozessen voranzubringen. Zwei aktuelle Ansätze seien kurz erläutert. Beim ersten setzen wir Fluorophore ein, um die Interaktion zwischen Biomolekülen in der lebenden Zelle sichtbar zu machen. Im zweiten wird eine neue Quelle für besonders kurzwelliges Licht im fernen ultravioletten bis hin zum weichen Röntgenbereich aufgebaut. Diese soll zukünftig auch in der Mikroskopie eingesetzt werden, um die räumliche Auflösung so zu erhöhen, dass sich der Zellaufbau und die Organellen im Inneren der Zelle, wie der Zellkern und die Mitochondrien, direkt darstellen lassen.

Fluoreszenzbasierte Methoden

Moleküle wechselwirken untereinander und mit ihrer Umgebung. Solche Vorgänge sind in biologischen wie in artifiziellen Systemen vielfach Grundlage von Reaktionskaskaden und spiegeln die Eigenschaften eines Moleküls wider. Nachweisbar sind diese Wechselwirkungen mittels Fluoreszenz, wobei je nach Fragestellung und Natur des Moleküls entweder deren eigene Fluoreszenz genutzt werden kann oder eine gezielte Markierung mit einem Fluorophor zum Einsatz kommt. Der Anwendungsbereich fluoreszenzbasierter Methoden ist vielfältig und ermöglicht z.B. in den Materialwissenschaften die Analyse von Solarzellen, in der Medizin die Abgrenzung eines Tumors vom gesunden Gewebe und in der Biochemie den Nachweis von Protein-Protein Wechselwirkungen. Kommen zwei Proteine, die jeweils mit einem Fluorophor markiert sind, in räumliche Nähe, dann beeinflussen sie sich gegenseitig. In der Biologie nutzt man vielfach Abkömmlinge des Green Fluorescence Protein (GFP), welches 1992 aus der Qualle *Aequorea Victoria* isoliert wurde und deren Expression in Säugetierzellen möglich ist. Überlappt sich das Emissionsspektrum des einen Fluorophors mit dem Anregungsspektrum des anderen Fluorophors, ist ein Fluorescence Reso-

nance Energy Transfer (FRET) zwischen beiden möglich; allerdings nur dann, wenn sie sich in einem Abstand von lediglich etwa 10 nm zueinander befinden. So zeigt das Cyan Fluorescence Protein (CFP) nach Anregung ein Emissionsspektrum von 450-600 nm und überlappt damit das Anregungsspektrum des Yellow Fluorescence Protein (YFP), welches bei 480-550 nm liegt. Kommt es zum FRET, klingt das Emissionsspektrum des CFP deutlich schneller ab, da die Energie auf das YFP übertragen wird. Dies kann besonders empfindlich mittels der Methode Fluorescence Lifetime Imaging Microscopy (FLIM) detektiert werden (Abbildung 1).

Das Enzym Glucokinase (GK) spielt eine zentrale Rolle im Glukosestoffwechsel der Leber. Es phosphoryliert die Glukose, das heißt, es wird eine Phosphatgruppe angehängt, und schleust sie damit in den Stoffwechsel des Organs ein. Die Glucokinase vermittelt damit auf molekularer Ebene die Anpassung unseres Organismus an den Wechsel aus Nahrungszufuhr und Nahrungskarenz. Bei Nahrungszufuhr und einem hohen Angebot an Glukose ist sie aktiv und verhindert damit, dass die Blutglukosekonzentration ansteigt. Bei Nahrungskarenz ist sie inaktiv und verhindert den gefährlichen Abfall der Blutglukosekonzentration. In der Zelle ändert sich in Abhängigkeit von der Glukosekonzentration nun nicht nur sehr schnell die Aktivität des Enzyms, sondern es kommt zu einer Wechselwirkung der Glucokinase mit dem Glucokinase Regulatory Protein (GKRP). Damit wird die Glucokinase gehemmt. Dies scheint aber noch nicht ausreichend zu sein, um die Aktivität der Glucokinase zu reduzieren. Durch das Glucokinase Regulatory Protein wird die Glucokinase vom Zytosol, in dem der Glukosestoffwechsel stattfindet, in den Zellkern transportiert. Wir haben die Glucokinase mit dem Cyan Fluorescence Protein und das Glucokinase Regulatory Protein mit dem Yellow Fluorescence Protein markiert und konnten durch FLIM zeigen, dass die Wechselwirkung beider Moleküle im Zellkern deutlich stärker als im Zytosol ist (Abbildung 2).

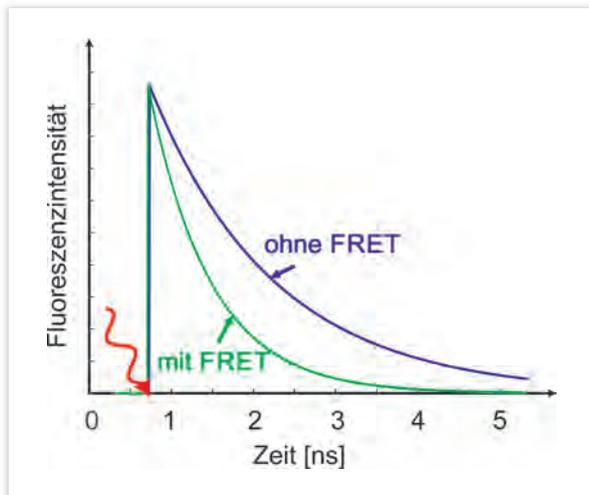


Abbildung 1: Nachweis von Fluorescence Resonance Energy Transfer (FRET) durch Lebensdauermessungen (Fluorescence Lifetime Imaging Microscopy, FLIM). Nach Anregung (rot) eines Fluorophors beginnt dieser, Licht zu emittieren. Befindet sich kein Partner für den Energietransfer in räumlicher Nähe, tritt kein FRET auf und die Fluoreszenz klingt relativ langsam ab (blau). Befindet sich ein Fluorophor in räumlicher Nähe, ist die Fluoreszenzlebensdauer verkürzt (grün). FLIM stellt damit eine sehr sensitive Methode zum Nachweis einer Protein-Protein Wechselwirkung dar. Wir nutzen sie daher, um die Interaktion zwischen dem Enzym Glucokinase und dem Glucokinase Regulatory Protein zu studieren.

Erzeugung von kurzwelligem Licht mittels intensiven Laserpulsen

Bei der Wechselwirkung eines intensiven Lichtfeldes mit Materie entsteht hochenergetisches Licht mit Photonenenergien, die einem Vielfachen der ursprünglich verwendeten Photonenenergie entsprechen. Im Kompetenzzentrum wird dieser Effekt genutzt, um zum einen neue Spektralbereiche zu erschließen und zum anderen spektroskopische Untersuchungen durchzuführen. Werden intensive ultrakurze Laserpulse fokussiert, entstehen extrem kräftige elektromagnetische Felder, die Elektronen von einem Atom ablösen können. Diese werden anschließend durch das elektrische Feld der Pulse stark beschleunigt und erhalten eine hohe kinetische Energie. Nach ungefähr einer optischen Schwingung stoßen die Elektronen mit den zurückgebliebenen Atomrümpfen wieder zusammen und die aufgenommene kinetische Energie wird als energiereiche elektromagnetische Strahlung abgegeben. Aufgrund der Periodizität des treibenden Laserfeldes und der geschilderten Prozesse entsteht die Strahlung in Form hoher Harmonischer der Trägerfrequenz der eingestrahlten Laserpulse. Die hohen Harmonischen umfassen einen

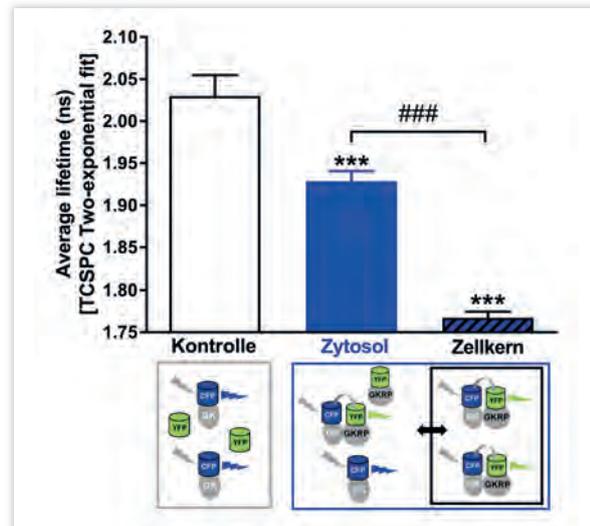


Abbildung 2: Fluorescence Lifetime Imaging Microscopy (FLIM) an der lebenden Zelle. Im dargestellten Beispiel wurde die Interaktion zwischen der Glucokinase (GK) und dem Glucokinase Regulatory Protein (GKRP) untersucht. Hierzu erfolgte die Markierung der GK mit dem Cyan Fluorescence Protein (CFP) und des GKRP mit dem Yellow Fluorescence Protein (YFP). Interagierende GK-GKRP Proteine befinden sich (wie schematisch dargestellt) in räumlicher Nähe, die zum Fluorescence resonance Energy Transfer (FRET) zwischen CFP und YFP führt und damit die Fluoreszenzlebenszeit des CFP (dargestellt im Graphen als Average lifetime kalkuliert durch exponentielle Anpassung des Time-Correlated Single Photon Counting) verkürzt. Wie wir zeigen konnten, ist die Interaktion im Zellkern signifikant (###) stärker als im Zytosol der Zelle (Kaminski et al., BBA Molecular Cell Research, 2014). Das Mitführen einer Kontrolle, bei der nur das YFP verwendet wird, ist notwendig, um den Einfluss der Eigenfluoreszenz von zellulären Molekülen auf FLIM zu berücksichtigen und nachzuweisen, dass ein Effekt sich davon signifikant (***) unterscheidet.

Spektralbereich vom Ultravioletten bis hin zum weichen Röntgenbereich. Die kurzwellige Strahlung hat laserartige Eigenschaften und bildet ein gut definiertes Lichtbündel mit hoher Kohärenz, welches für Abbildungsanwendungen besonders geeignet ist.

Das gleiche Prinzip lässt sich auch auf Festkörper anwenden. Allerdings besteht ein wesentlicher Unterschied zu einem atomaren Gas, da das Elektron im Festkörper vom elektromagnetischen Feld nicht frei gesetzt wird, sondern in einem zwar energetisch hohen, aber immer noch gebundenen Zustand gebracht wird. Bei der Rekombination in den Grundzustand tragen das Elektron und die dabei ausgesandten hohen Harmonischen Informationen über diesen Zwischenzustand. Indem deren Spektrum analysiert

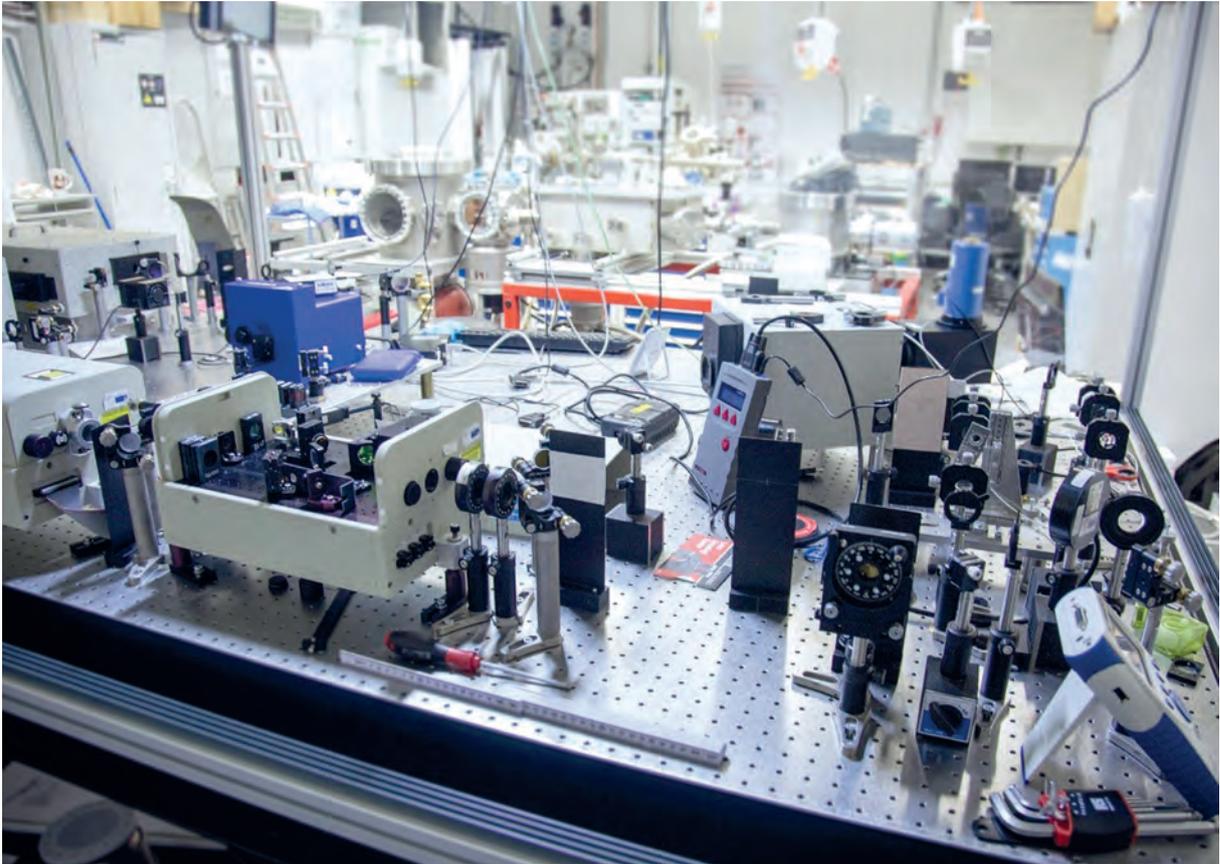


Abbildung 3: Experimenteller Aufbau zur Spektroskopie der hohen Harmonischen, die in Festkörpern erzeugt werden.

- wird, können wir Rückschlüsse über die Entstehungsmechanismen der hohen Harmonischen ziehen und die Wechselwirkung zwischen intensiven Laserfeldern und Festkörpern studieren.

Kurzwelliges Licht für eine hohe Auflösung

Bei optischen Abbildungen ist die Auflösung ohne besondere Maßnahmen auf etwa die halbe Wellenlänge des verwendeten Lichtes beschränkt und Strukturen, die kleiner sind, können nicht mehr unterschieden werden. Man spricht hierbei auch vom Abbe-Limit. Dementsprechend werden unterschiedliche Ansätze verfolgt, um diese Grenze zu überschreiten und eine hohe Auflösung zu erzielen. Der Einsatz von kurzwelligem Licht ist vielversprechend, bringt aber auch einige Herausforderungen mit sich. Unter anderem gibt es dafür keine Abbildungsoptiken, die für einen kompakten Mikroskopaufbau geeignet sind. Um dies zu umgehen, wird im Kompetenzzentrum „Mikroskopie und Spektroskopie“ ein Verfahren entwickelt, mit dem anhand eines Beugungsbildes die Gestalt eines bestrahlten Objektes rekonstruiert werden kann. Dies führt zu einer

deutlichen Vereinfachung des optischen Aufbaus. Die Bestrahlung des zu untersuchenden Objekts erfolgt mit einem Lichtbündel und das durch Abschattungs- und Beugungserscheinungen veränderte Bündel wird mit einer CCD-Kamera einige zehn Zentimeter hinter dem Objekt aufgenommen. Aufgrund der simplen Anordnung ist dieser Zugang bestens für besonders kurzwellige Strahlung geeignet und äußerst flexibel. Die Herausforderung besteht nun darin, aus dem aufgenommenen Beugungsbild auf das Objekt zurückzuschließen. Da ein direktes Zurückrechnen nicht möglich ist, muss ein iteratives Verfahren angewendet werden. Man nimmt für das Objekt zunächst eine willkürliche Form an und berechnet das Beugungsbild. Dann erfolgt der Vergleich mit dem gemessenen Beugungsbild. Schrittweise wird die angenommene Form nun variiert, bis sich eine gute Übereinstimmung zwischen dem berechneten und dem gemessenen Beugungsbild ergibt. Das Verfahren und seine Leistungsfähigkeit konnten anhand von Beugungsexperimenten im nahen ultravioletten Spektralbereich bereits erfolgreich demonstriert werden. Nun muss die Kombination mit den hohen Harmonischen gelingen, um das Ziel einer hohen Auflösung bei der Mikroskopie zu erreichen.