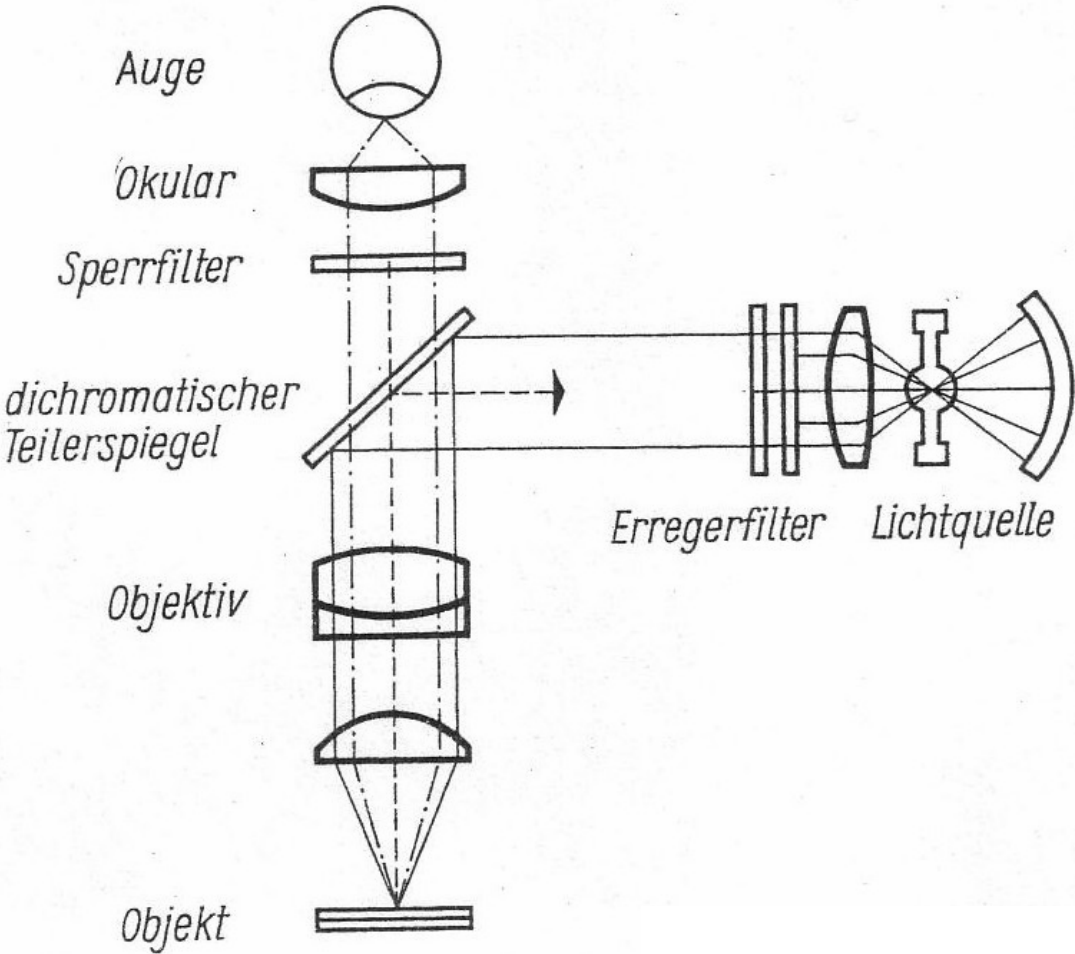


### 3. Fluoreszenzmikroskopie

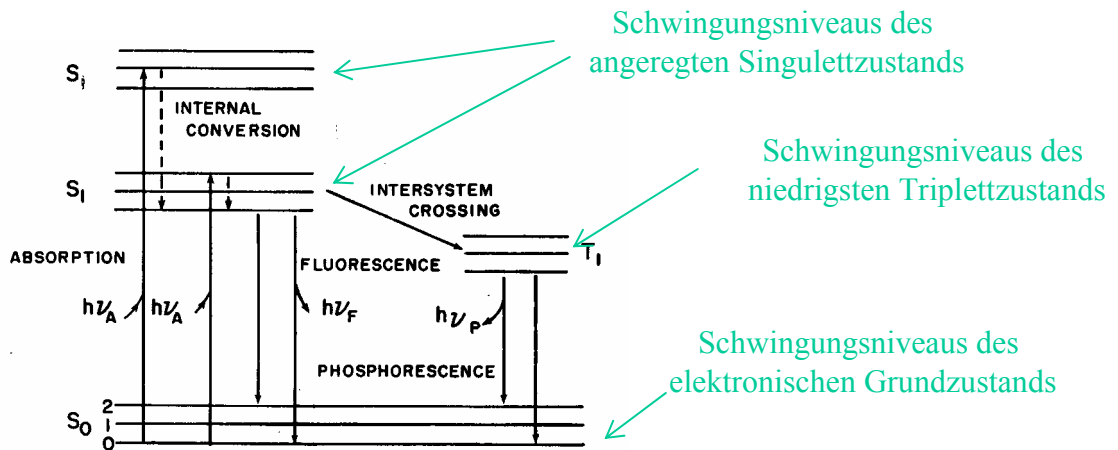
Die Fluoreszenzmikroskopie ist heutzutage die in der Biologie meistgenutzte mikroskopische Technik („Brot- und Butter-Mikroskopie“ für jeden Biologen).

**Idee:** Man macht ausgewählte Makromoleküle (z. B. bestimmte Proteine) in einer Probe (z. B. in einer Zelle) dadurch sichtbar, dass man an diese ausgewählten Moleküle durch eine hochspezifische chemische Reaktion (z. B. durch eine Antigen-Antikörper-Reaktion) einen Fluoreszenzfarbstoff anheftet. Die intensive Fluoreszenzstrahlung hebt die markierten Moleküle gegenüber ihrer Umgebung in der Probe hervor. Ohne Markierung wären diese Moleküle im Mikroskop unauffällig gewesen.

# Auflicht-Hellfeld-Anregung bei Fluoreszenzmikroskopie



# Jablonski-Diagramm (s. Vorlesung FS1)



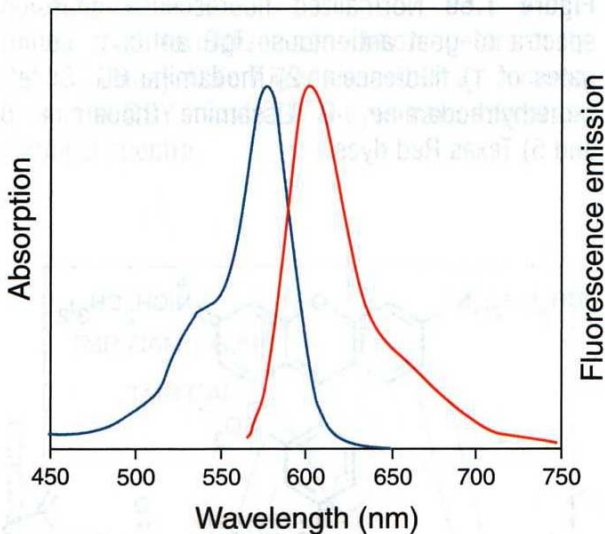
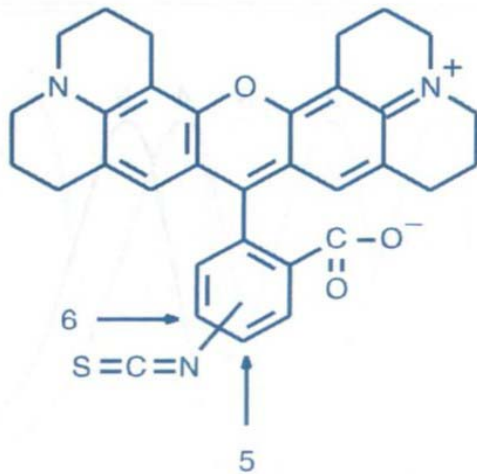
## Fluoreszenzlabel und Fluoreszenzspektren

Zahlreiche Fluoreszenzfarbstoffe sind kommerziell erhältlich:

S. z.B. **Handbook of Fluorescent Probes and Research Products**, (Molecular Probes)

Ein Beispiel für einen Fluoreszenzmarker ist Carboxy-X-Rhodamin, der zur Markierung verschiedener Oligonukleotide und in der DNA-Sequenzierung angewendet wird.

# Strukturformel von **X-491-X-Rhodamin-5-(und 6)-isothiocyanat** (XRITC).



Fluoreszenz-Absorptions-  
und Emissionsspektrum  
von  
**5-Carboxy-X-Rhodamin**  
(5-ROX, C-6124)  
in pH 7.0 Puffer.

In jüngster Zeit kommen **Quantendots** als Fluorophore mit maßgeschneiderten F-Eigenschaften zur Anwendung.

-spezifische Peptide wie z. B. Phalloidin, das selektiv an polymerisiertes Aktin bindet und es dabei noch stabilisiert. Die Bindung an monomeres Aktin ist vernachlässigbar. Phalloidin gelabelt (konjugiert) mit verschiedenen Fluoreszenzfarbstoffen kann käuflich erworben werden. In jüngster Zeit können derartige spezifische Peptide für hochselektive Ankopplung an ein ausgewähltes Protein synthetisiert (designed) werden.

- GFP, (Green Fluorescent Protein, s. Vorlesung FS1 ). Das Gen des GFP kann an verschiedene andere Gene gekoppelt werden und die dann in der Zelle transkribierten chimären Proteine fluoreszieren auf natürliche Weise und scheinen trotz der Kopplung des natürlichen Proteins mit dem GFP in ihrer Funktion nicht beeinflusst zu sein.

Die **Wahl der Filter und Spiegel** im F-Mikroskop erfolgt entsprechend dem zu beobachtenden F-Label, um maximale Sichtbarkeit zu erhalten. Insbesondere muss das Anregungslicht deutlich vom Fluoreszenzlicht getrennt werden.

**Probleme** bei der Anwendung der F-Mikroskopie können zum einen eine störende

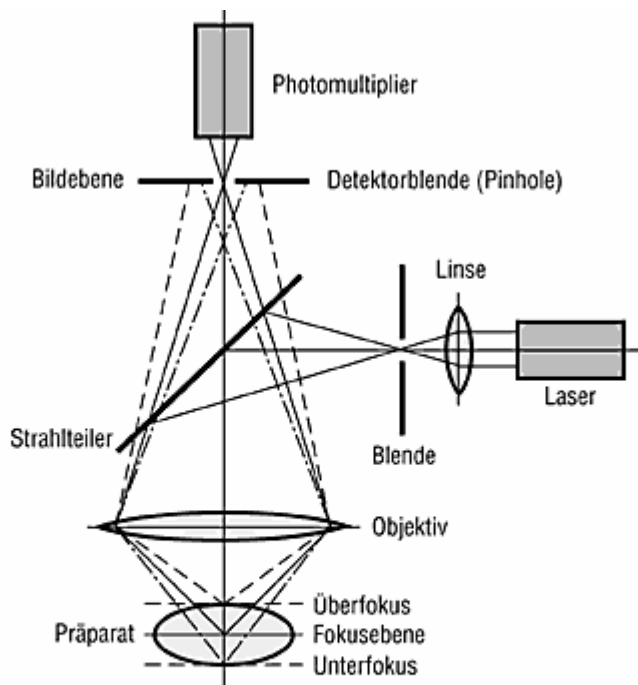
*Hintergrundfluoreszenz*, zum anderen eine Ausbleichung der Fluoreszenz bei ihrer Anregung (*Photobleaching*) sein.

Unerwünschte Hintergrundfluoreszenzen treten z. B. durch intrinsische Fluorophore (z. B. Tryptophan), durch unspezifische Bindung der eingebrachten Fluoreszenzfarbstoffe an sonstige Zellbestandteile, oder durch fluoreszierende Label außerhalb der Fokalebene des Objektivs auf. Dies alles verschlechtert die Bildqualität (Kontrast) und sollte nach Möglichkeit verhindert werden.

**Multiphoton-Fluoreszenzanregung** kann verwendet werden zur Unterdrückung unerwünschter Fluoreszenzen: Als Anregungslicht benutzt man eine (Laser-)Wellenlänge etwa der doppelten (bzw. dreifachen) Wellenlänge wie im direkten Anregungswellenlängenintervall des anzuregenden Fluorophors.

Die Anregung erfolgt über leistungsstarke Lichtimpulse (Impulslaser) so, dass während der Impulse durch nichtlineare Effekte in der Probe die doppelte bzw. dreifache Anregungsfrequenz erzeugt und die Fluorophore selektiv angeregt werden, wobei aber die mittlere Lichtleistung schwach genug bleibt, um keine Schäden in der Probe anzurichten.

Mittels **Konfokaler Fluoreszenzmikroskopie** können die unerwünschten Fluoreszenzen außerhalb der Fokalebene des Objektivs eliminiert werden.



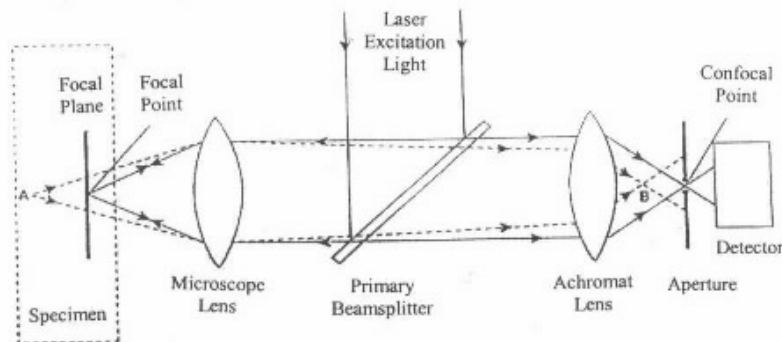
Strahlengang  
im konfokalen  
F-Mikroskop  
(*W. Jahn, [www.mpibpc.gwdg.de](http://www.mpibpc.gwdg.de)*)

Das aufgeweitete Laserlicht wird durch eine Linse in die Beleuchtungslochblende fokussiert, die vom Objektiv in die Probe abgebildet wird. Das von dort emittierte Fluoreszenzlicht wird vom Objektiv in die Detektorblende (Pinhole) fokussiert und von einem Lichtdetektor (Photomultiplier, PM) in ein der Intensität entsprechendes elektrisches Signal umgewandelt. Mit dieser ‚konfokalen‘ Anordnung kann durch Scannen des Laserstrahls die Probe in lateraler Richtung und durch Fokussierung auf unterschiedliche Probentiefen die Probe dreidimensional abgerastert werden, da jedesmal nur das Fluoreszenzlicht aus dem Fokus registriert wird. Der Öffnungsdurchmesser der beiden Blenden und die numerische Apertur des Objektivs bestimmen das laterale und axiale Auflösungsvermögen des konfokalen Mikroskops.



*Zahlenwerte:* Für ein 40 µm dickes Präparat und bei einer Schnittdicke von 1 µm enthält eine dreidimensionale Abbildung des Objekts 40 Schichten. Bei 1k × 1k Pixel pro Schicht und Farbe fällt eine Datenmenge von  $1k \times 1k \times 40 \times 3 = 120$  Mbyte zur Darstellung eines farbigen 3d-Bildes des Objekts an. Man braucht daher für die konfokale Mikroskopie geeignete Laser, präzise Scanner und leistungsfähige Rechner.

Das Prinzip der 3d-Bilderzeugung im konfokalen Mikroskop ist in der folgenden Abbildung dargestellt:



# Photobleaching

Durch Lichteinstrahlung hoher Intensität können u.a. Sauerstoffmoleküle vom normalen Triplettzustand in den hochreaktiven Singulettzustand überführt werden, der die Fluoreszenz vieler Farbstoffe irreversibel löscht. Dies wird in der **FRAP**-Technik (**F**luorescence **R**ecovery **A**fter **P**hotobleaching) ausgenutzt, um z. B. laterale Diffusionskoeffizienten in Membranen zu bestimmen. Dabei werden durch kurze intensive Laserbestrahlung eines kleinen Ausschnitts (spot) der Probe alle sich in dem kleinen Beleuchtungsfleck der Probe befindlichen Fluorophore ausgebleicht und danach beobachtet, wie aus dem umliegenden Gebiet die nichtgebleichten fluoreszierenden Moleküle in den Fleck hineindiffundieren. Bei der quantitativen Auswertung der Daten ist Vorsicht geboten, da durch das Bleichen u. a. irreversible Schäden in der Probe erzeugt wurden.

In der **F-Mikroskopie** ist das Ausbleichen hinderlich, man setzt Antibleich-Mischungen zur Unterdrückung des Ausbleichens ein, die die reaktiven Radikale chemisch binden, bevor sie mit den Fluorophoren reagieren.

# **Kopplung** der Fluorophore mit den

Targetmolekülen:

- **direkte chemische Anbindung des Fluorophors** an eine am Targetmolekül vorhandene reaktive Gruppe (z. B. Aminogruppe  $\text{NH}_2$ ). Oft ist diese Anbindung zu wenig spezifisch für die Targetmoleküle.

- Verwendung eines **fluoreszenzgelabelten Antikörpers**, der mit dem Targetmolekül einen Antigen-Antikörper-Komplex bildet.

*Polyklonale Antikörper* werden durch Injektion der zu markierenden Proteine (Antigene) in geeignete Säugetiere (Kaninchen, Ziege, Mäuse...) aus deren Blutserum gewonnen. Da diese Antikörper von verschiedenen B-Lymphozyten des gespritzten Säugetiers erzeugt wurden, besitzen sie unterschiedliche Andockstellen an das Targetmolekül (Antigen).

Größere Spezifität der Antigen-Antikörper-Komplexbildung erreicht man mit *Monoklonalen Antikörpern*, die aus Zellkulturen erhalten werden können und die nur einen Typ von Andockstelle besitzen.

# Bemerkungen

- Bei der Probenpräparation für die F-Mikroskopie muss darauf geachtet werden, dass die strukturelle Organisation der zu untersuchenden Objekte (Zellen) nicht durch die Färbebehandlung zerstört wird.

Oft werden die Zellen vor der Färbung **fixiert**, d. h. durch Hinzufügen einer Chemikalie (z. B.

Formaldehyd) werden die chemischen Bestandteile der Zelle weitgehend so quervernetzt, dass die Struktur der Zelle quasi eingefroren (fixiert) wird.

Der nach der Fixierung eingebrachte Farbstoff bindet dann an die fixierten Targetmoleküle.

-Wenn die Farbstoffmoleküle in das Zellinnere eindringen sollen, muss die natürliche Barriere Zellmembran überwunden werden. Oft erfordert dies eine Auflösung (Solubilisierung) der Membran, gewöhnlich mit Detergenzien (Tensiden), z. B. mit Triton X100 oder SDS.

-Viele Fluoreszenzsonden reagieren sensitiv auf ihre Umgebung (pH,  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration, Ionenstärke) und können daher als Sensor für diese betreffenden Eigenschaften verwendet werden.

# Bindungsstudien

Der Förster'sche Fluoreszenz-Resonanz-Energietransfer (**FRET**, s. Vorlesung FS2) kann in der F-Mikroskopie verwendet werden, um Bindungen zwischen unterschiedlichen Molekülen zu untersuchen. Wenn der Abstand zwischen Donor- und Akzeptor-Fluorophor größer ist als 5 nm erfolgt praktisch kein Förstertransfer mehr und eine Bindung kann ausgeschlossen werden.

## 4. Instrumentierung

### Objektive

*Planachromate* sind achromatisch

korrigiert und liefern ein ebenes Zwischenbild

Bei *Apochromaten* wird mit Hilfe von verschiedenen Glasarten mit speziellem Dispersionsverlauf und vor allem durch Flusspat erreicht, dass die Bildorte für drei Farben (und damit praktisch für alle sichtbaren Farben) übereinstimmen.

# Lichtquellen

**Quecksilber-Höchstdrucklampen** sind die in der F-Mikroskopie standardmäßig eingesetzten Lichtquellen. Besonders die intensivsten Hg-Linien 365 nm (nahes UV), 405 nm (Violett), 436 nm (Blau) und 546 nm (Grün) sind in der F-Mikroskopie als Anregungsstrahlung von Interesse.

**Halogen- und Xenon-Lampen**, sowie **Laser** kommen ebenfalls zum Einsatz

# Detektoren

- Gekühlte **CCD-Chips** sind heute z. T. empfindlicher als PM
- Hohe **Zeitauflösung** erfordert hohe **Lichtempfindlichkeit** des Detektors

# 5. Einzelmolekülmikroskopie

**Idee:** Position und Bewegung von Objekten kleiner als die halbe Wellenlänge des Beobachtungslichts können im Lichtmikroskop detektiert werden.  
Abbildung des Beugungsscheibchens.