

Hochauflösende Mikroskopie

Christoph Hamers, Frank van den Boom, Rudolph Reimer, Dennis Eggert, Rolf T. Borlinghaus

2.1 Einleitung – 44

2.1.1 Super-Resolution-Mikroskopie – 44

2.2 Strukturierte Beleuchtung – SIM – 45

2.3 Stochastische optische Rekonstruktionsmikroskopie (STORM) – 47

2.3.1 Das STORM-Prinzip – 48

2.3.2 Farbstoffe für STORM: – 49

2.3.3 Mehrfarben-STORM – 51

2.3.4 3D-STORM – 52

2.3.5 Lebendzell-STORM – 52

2.3.6 Direkte stochastische optische Rekonstruktionsmikroskopie (dSTORM) – 54

2.4 GSDIM: Depletion des Grundzustandes – 55

2.4.1 Fluoreszenzzustände – 55

2.4.2 Verarmung des Grundzustandes – 56

2.4.3 3D-GSDIM – 57

2.5 STED – Stimulierte Emissions-Depletion – 57

2.5.1 Stimulierte Emission – 57

2.5.2 Rastermikroskopie – 57

2.5.3 Toroide Fokusformen – 58

2.5.4 Die Überschreitung der Auflösungsgrenze – 58

2.5.5 Lebendzell-STED-Mikroskopie – 58

2.5.6 3D-STED – 59

2.5.7 Präparationshinweise – 60

2.6 Literatur – 61

2.1 Einleitung

Um biologische Feinstrukturen im Größenbereich von unter 200 nm mit höchster Auflösung zu untersuchen, waren Wissenschaftler lange Zeit allein auf das Elektronenmikroskop angewiesen. Sie mussten dabei aber den Nachteil in Kauf nehmen, ausschließlich schwarz-weiße Bilder zu erhalten und nur fixiertes und speziell präpariertes Probenmaterial verwenden zu können. Die Nutzung von Lichtmikroskopen für diese Untersuchung schloss sich von vornherein aus, da die von *Ernst Abbe* erstmals 1873 errechnete laterale Auflösungsgrenze von 200 nm nicht unterschritten werden konnte und nach wie vor für alle optischen Geräte gilt (► Kap. 1).

Der Wunsch, einzelne Zellkompartimente eventuell sogar im lebenden Zustand mit dem Lichtmikroskop hochaufgelöst und farbig markiert darstellen zu können, schien unerreichbar zu sein, bis der Versuch unternommen wurde, diese Auflösungsgrenze durch Entwicklung neuer revolutionärer Super-Resolution-Mikroskopietechniken zu überwinden.

2.1.1 Super-Resolution-Mikroskopie

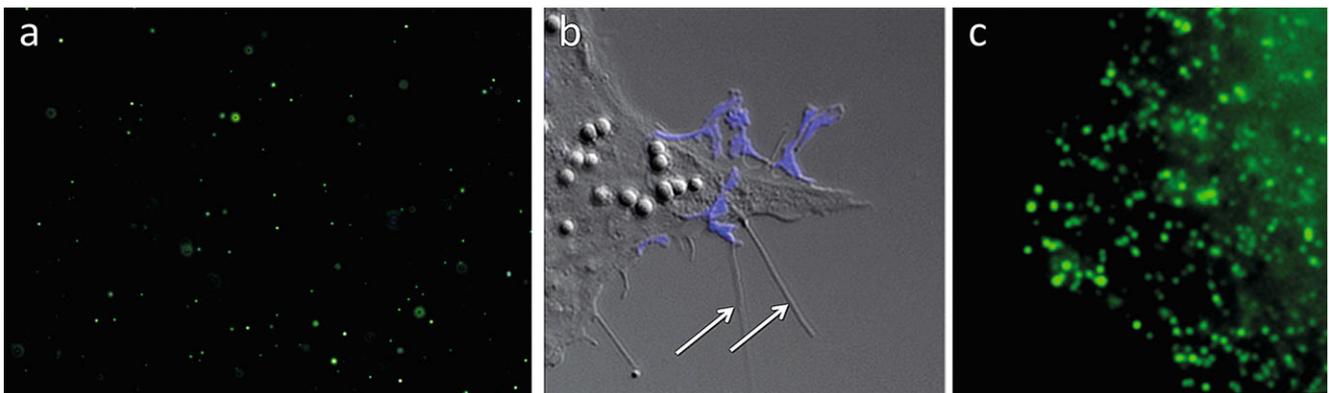
Der Begriff Super-Resolution-Mikroskopie fasst eine ganze Palette diverser mikroskopischer Techniken zusammen, welche die Auflösung von Objekten unterhalb des Beugungslimits von 200 nm erlauben. Ein essentieller Punkt in diesem Zusammenhang ist die Unterscheidung zwischen der Darstellungs- und der Auflösungsgrenze. Prinzipiell lassen sich Objekte unterhalb von 200 nm mit Hilfe „konventioneller“ optischer Methoden zwar darstellen, aber nicht mehr auflösen. So ist es z. B. möglich, einzelne 10 nm große Gold-Nanopartikel in einer kolloidalen Lösung mittels Dunkelfeldmikroskopie darzustellen (■ Abb. 2.1a). Mit Hilfe der sog. Differential-Interferenzkontrast-Mikroskopie (DIC, ► Kap. 1) lassen sich ebenfalls Nanostrukturen darstellen (■ Abb. 2.1b). So wurden in den 1980-er Jahren mit Hilfe von DIC bahnbrechende Entdeckungen im Bereich der Motorproteine gemacht, da es mit Video-verstärkter DIC-Mikroskopie

möglich wurde, makromolekulare Komplexe in Bewegung aufzunehmen. Die Einzelmolekül-Fluoreszenzmikroskopie ermöglicht mit Hilfe besonders empfindlicher EMCCD-Kameras die Darstellung von einzelnen Fluorochromen (■ Abb. 2.1c). All diese Methoden erlauben zwar die Darstellung von Objekten unterhalb von 200 nm, nicht aber deren Auflösung bzw. Differenzierung (► Kap. 1).

Der Begriff der Super-Resolution-Mikroskopie erscheint in der Literatur erstmals im Zusammenhang mit der sogenannten Nahfeldmikroskopie (Nassenstein 1970). Das Nahfeldmikroskop wird im Folgenden am Beispiel eines Aperturmikroskops erläutert (Ash und Nichols 1972). Zentrales Element eines optischen Rasternahfeldmikroskops (*scanning nearfield optical microscope*, SNOM bzw. NSOM) ist eine spitz zulaufende Glasfaser, die Aperturspitze. Diese wird an der Verjüngung bis auf die Austrittsöffnung mit Silber bzw. Aluminium bedampft. Die dabei entstehende 20-100 nm große Apertur wird benutzt, um das Licht im optischen Nahfeld in einer Höhe von wenigen Nanometern (weit unterhalb der Wellenlänge des Lichtes) über die Probe zu rastern. Das Signal wird mit Hilfe einer Optik mit angeschlossenem Photomultiplier aufgezeichnet. Durch die Abbildung im optischen Nahfeld umgeht man das klassische, durch (Fraunhofer-) Beugung vorgegebene Abbe-Auflösungslimit. Neben der Bauweise mit Aperturspitze existieren mittlerweile eine ganze Reihe von anders aufgebauten optischen Rasternahfeldmikroskopen, die eine Auflösungsverbesserung um den Faktor 10 verglichen mit konventioneller (Fernfeld-) Mikroskopie erzielen.

Als einen speziellen Fall der optischen Nahfeldmikroskopie lässt sich auch die totale interne Reflexions-Fluoreszenzmikroskopie (TIRFM) einordnen.

Wenn Licht in einem kritischen Winkel auf eine Grenzfläche zweier Medien unterschiedlicher Brechungsindizes trifft (Bragg-Winkel), wird dieses Licht totalreflektiert. Trifft ein Laserstrahl zur Anregung von Fluoreszenz in einem Winkel oberhalb dieses kritischen Winkels θ (■ Abb. 2.2a) bei Verwendung eines Objektivs mit hoher numerischer Apertur ($NA \geq 1,45$) auf eine Grenzfläche (z. B. Glas / wässriges Medium), dringt jedoch



■ **Abb. 2.1** a) 10 nm-Goldpartikel im Dunkelfeld-Mikroskop. b) Mycoplasmen (DNA-Färbung blau, überlagert) und Filopodien (Pfeile) mit einer Dicke von etwa 100 nm. c) Einzelne Fluorochrome im Fluoreszenzmikroskop (beugungsbegrenzt), aufgenommen mit einer EMCCD-Kamera.

noch etwas Anregungslicht etwa 80 bis 200 nm tief in das sich unter dem Glas befindende Medium ein und breitet sich in Form einer evaneszenten (abklingenden) Welle aus. Die Lichtintensität nimmt dabei in Abhängigkeit von der Eindringtiefe ab. Die sich in diesem Bereich befindenden Fluorochrome werden zur Fluoreszenz angeregt und emittieren ihrerseits Licht (■ Abb. 2.2). Da dieses Emissionslicht nur aus dem 80–200 nm tiefen, deckglasnahen Bereich der Probe stammt, ist der durch TIRF Mikroskopie erzeugte optische Schnitt deutlich dünner als ein konfokaler optischer Schnitt. Im Weiteren ist auch das Signal-zu-Rausch Verhältnis erheblich besser, da die zum Rauschen eines Bildes beitragende Hintergrundfluoreszenz entfällt.

Streng genommen ist TIRFM aber keine Super-Resolution-Technik, auch wenn sie in der Literatur oft als solche aufgeführt wird, da sich mit ihrer Hilfe keine zwei Punkte unterhalb der Beugungsgrenze auflösen lassen.

Im Gegensatz zur optischen Nahfeldmikroskopie ist die Super-Resolution-Mikroskopie im optischen Fernfeld relativ neu. Anfang der 1990-er Jahre wurde erstmals gezeigt, dass das Abbe-Limit auch mit Hilfe von Fluoreszenzmikroskopie mit konventionellen Objektiven durchbrochen werden kann (Hell und Stelzer 1992). Bei dem sog. 4Pi-Mikroskop wurden zur Abbildung zwei gegenüberstehende Objektive verwendet, was stark vereinfacht ausgedrückt, die numerische Apertur des Systems und somit die Auflösung erhöht. Ein 4Pi-Mikroskop weist eine Axialauflösung von etwa 80-150 nm auf. Da aufgrund des optischen Aufbaus die Präparation, die Justage des Mikroskops und die Datenaufbereitung sehr anspruchsvoll sind, konnte das 4Pi-System keine große Verbreitung in der biomedizinischen Forschung erlangen.

In den 1990ern und 2000ern Jahren wurden drei fundamental neuartige Prinzipien für Super-Resolution-Mikroskopie entwickelt und realisiert, welche im Folgenden detailliert erläutert werden:

1. Super-Resolution-Mikroskopie mit Hilfe von strukturierter Beleuchtung (SIM) (► Kap. 2.2)
2. Lokalisationsmikroskopie am Beispiel der Stochastischen Optischen Rekonstruktionsmikroskopie (STORM) (► Kap. 2.3) und der Einzelmolekülrückkehr nach Ver-

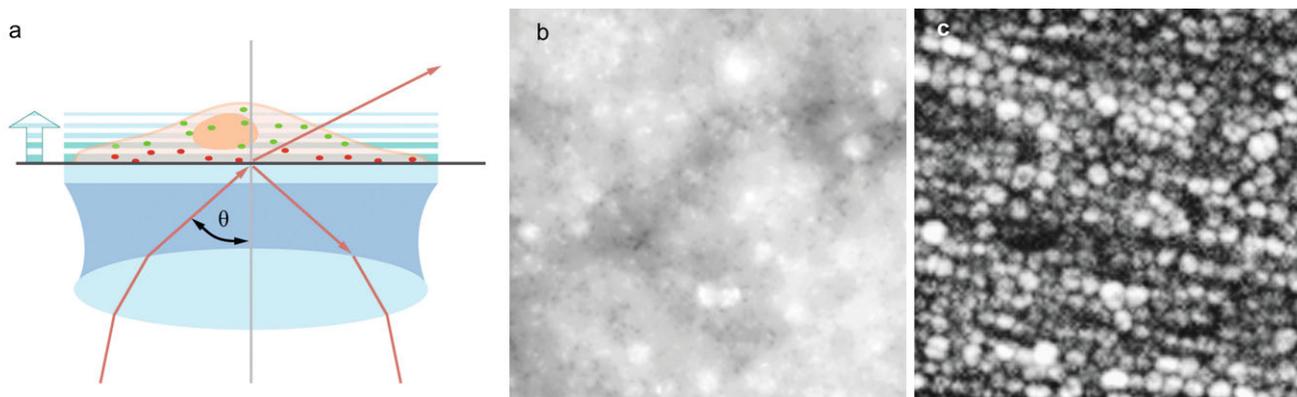
armung des Grundzustandes (*ground state depletion microscopy followed by individual molecule return*, GSDIM) (► Kap. 2.4). Die Unterscheidung der Techniken erfolgt anhand der Art der verwendeten Fluorochrome und des physikalischen Hintergrundes ihres Blinkens. Die Geräteart wird daher und aus Lizenzgründen von den Herstellern unterschiedlich bezeichnet.

3. Stimulierte Emissions-Depletions Mikroskopie (STED) (► Kap. 2.5)

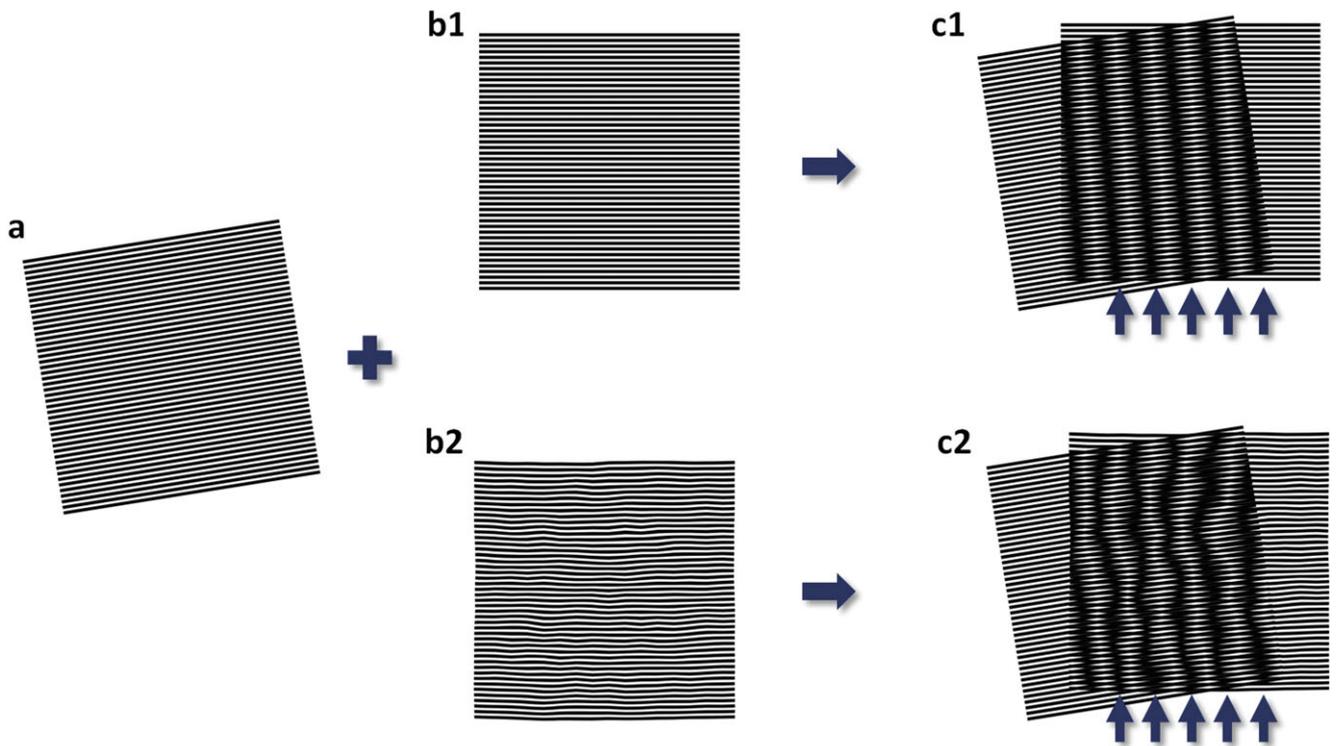
2.2 Strukturierte Beleuchtung – SIM

Die Super-Resolution-Fluoreszenzmikroskopie mit Hilfe von strukturierter Beleuchtung (SIM: *Structured Illumination Microscopy*) wurde im Wesentlichen zu Beginn der 2000er Jahre entwickelt (Gustafsson 2000). SIM macht sich den Moiré-Effekt zunutze, einen Interferenzeffekt, der bei der Überlagerung zweier Strukturen auftritt. In den kommerziell erhältlichen laserbasierten SIM-Systemen wird die Abbildung eines Gitters, welches auf die entsprechende Anregungswellenlänge und das entsprechende Objektiv präzise abgestimmt ist, in die Fokusebene projiziert. Die Detektion des Interferenz-(Moiré-)Bildes der Überlagerung des bekannten Gittermusters und der unbekannt Struktur in der zugrundeliegenden Probe mit einem empfindlichen Kamerasystem (EMCCD) erlaubt Rückschlüsse auf die zugrundeliegende fluoreszenzmarkierte Struktur der Probe (■ Abb. 2.3). Im Gegensatz zu herkömmlicher Fluoreszenzmikroskopie offenbart die Detektion des Moiré-Musters kleinere Strukturen in der zugrundeliegenden Probe, die jenseits der theoretischen Beugungsgrenze liegen und mit beugungsbegrenzter Lichtmikroskopie nicht aufzulösen sind.

Die Berechnung der ursprünglichen Struktur aus dem detektierten Interferenzbild erfolgt im Fourier-Raum, indem ein ortsaufgelöstes Bild durch eine mathematische Fourier-Transformation in ein frequenz aufgelöstes (räumliche Frequenzen) Bild umgewandelt wird. In diesem Fourierbild wird deutlich (■ Abb. 2.4), dass die Detektion eines Interferenzbildes aus der



■ Abb. 2.2 a) TIRFM Schema, b) Mit GFP markierter *Staphylococcus aureus*-Biofilm im Weitfeld-Fluoreszenzmikroskop, c) zugehöriges TIRF-Mikroskopiebild.



■ **Abb. 2.3** Die Überlagerungen zweier feiner, hochfrequenter Raster (a) und (b) ergeben tieffrequente Moiré-Muster (c, Pfeile). Diese tieffrequenten Muster werden durch die hohen Frequenzen moduliert. So ergibt die Überlagerung zweier geradliniger Raster (a und b1) auch geradlinige Moiré-Muster (c1). Wenn eine Überlagerungskomponente z. B. unregelmäßig gewellt ist (b2), verändern sich die Moiré-Muster entsprechend (c2). Ist, wie bei der SIM-Mikroskopie, die Komponente (a) bekannt, kann man aus den tieferen Frequenzen des aufgenommenen Bildes (c) die hohen Frequenzen (feinere Details) der Probe mathematisch berechnen.

überlagerten Gitterstruktur und der zugrundeliegenden Probe höhere räumliche Frequenzen (d. h. kleinere räumliche Strukturen) aufweist als ein herkömmliches Fluoreszenzbild ohne Überlagerung der Gitterstruktur (Gustafsson 2000). Diese kleineren Strukturen liegen deutlich außerhalb der theoretisch mit Hilfe von Lichtmikroskopie auflösbaren Beugungsgrenze und somit erlaubt diese Technologie hochauflösende Mikroskopie mit höherer räumlicher Auflösung als beugungsbegrenzte Lichtmikroskope.

Im Frequenzbereich der räumlichen Auflösung lässt sich eine Erhöhung der Auflösung jenseits der Beugungsgrenze durch eine Überlagerung von verschiedenen räumlichen Frequenzen verdeutlichen, wenn man sich ein Beispiel aus der Akustik vergegenwärtigt. Auch hier können Schallwellen als Frequenzen dargestellt werden. Sehr hohe Frequenzen wie z. B. der Ruf einer Fledermaus >20 000 Hz können vom menschlichen Ohr (Detektor – analog zum lichtmikroskopischen Objektiv) nicht mehr wahrgenommen werden. Die Überlagerung der hohen Frequenz der Fledermaus mit einer anderen hohen Frequenz (z. B. Hundepfeife), die das menschliche Ohr soeben noch wahrnehmen kann, führt zu Interferenzphänomenen mit niedrigerer Frequenz. Diese niedrigere Frequenz kann nun vom menschlichen Ohr wahrgenommen werden. Ebenso führt die Überlagerung einer räumlich durch das Lichtmikroskop nicht darstellbaren Struktur mit einer genau abgestimmten Gitter-

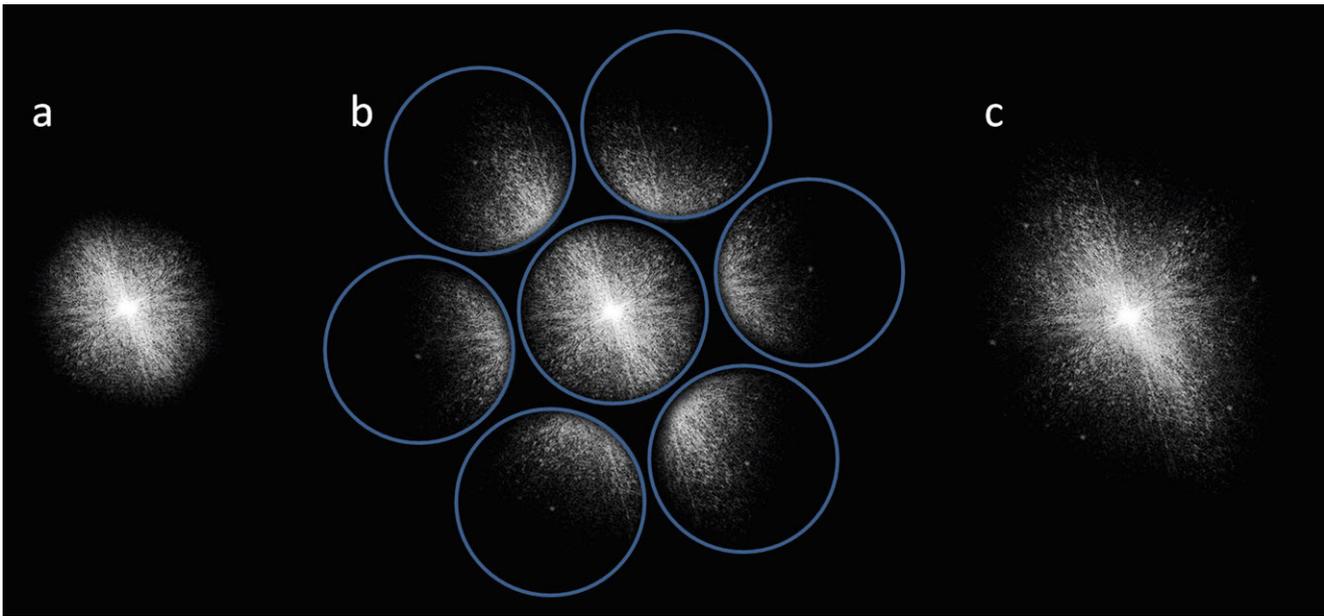
struktur zu einem detektierbaren Interferenzmuster, welches Rückschlüsse auf die ursprüngliche Struktur zulässt.

Für die Aufnahme eines zweidimensionalen SIM-Bildes werden 9 Bilder aufgenommen. Zunächst wird das Gitter in 3 Positionen über das Sichtfeld verschoben. In jeder dieser Positionen wird das Gitter darüber hinaus in 3 verschiedenen Orientierungen positioniert (■ Abb. 2.4)

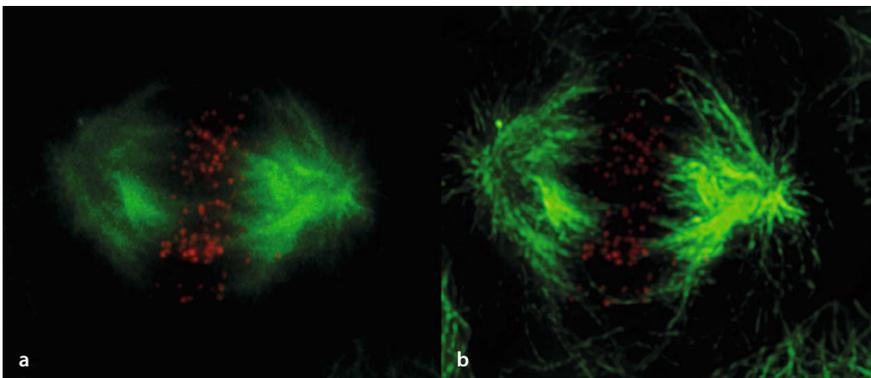
Die Rekonstruktion eines Superresolution-SIM-Bildes aus diesen 9 detektierten Interferenzbildern liefert Auflösungen, die ungefähr eine doppelt so hohe laterale Auflösung wie herkömmliche Weitfeldbilder liefern. Theoretisch sind je nach Anregungswellenlänge laterale Auflösungen von 85-90 nm möglich (■ Abb. 2.5).

Des Weiteren ist SIM auch im TIRF-Modus möglich, bei dem die Fluoreszenzanregung (und somit auch die Abbildung der Gitterstruktur) nur im evaneszenten Feld des an der Deckglasoberfläche totalreflektierten Anregungslasers erfolgt und somit die Auflösung von deckglasnahen Strukturen mit Superresolution und einem sehr guten Kontrast mit wenig Hintergrundfluoreszenz erlaubt.

Im 3D-SIM-Modus wird die Gitterstruktur nicht nur zweidimensional in die Fokusebene projiziert, sondern zusätzlich setzt sich die überlagerte Gitterstruktur durch Interferenzen in der dritten Dimension noch räumlich tiefer in die Probe fort. In diesem Modus müssen 15 statt 9 Bilder aufgenommen werden



■ **Abb. 2.4** Entstehung eines SIM Bildes im Fourier-Raum. a) Beugungsbegrenztes Bild. b) Erweiterung des Frequenzspektrums durch Interferenzbilder. c) Finales, aus allen Bildern in (b) zusammengesetztes SIM-Bild im Fourier-Raum. Die Auflösung wird verdoppelt.



■ **Abb. 2.5** a) Mitose im Weitfeld-Fluoreszenzmikroskop, b) Mitose im SIM.

(Schermelleh et al. 2008) und Proben mit einer Dicke von bis zu 20 μm können beobachtet werden. 3D SIM liefert zusätzlich zu der verdoppelten lateralen Auflösung auch eine Verdoppelung der axialen Auflösung gegenüber einem beugungsbegrenzten Lichtmikroskop von bis zu 250 nm.

Vorteile der SIM-Mikroskopie sind die Verwendung von herkömmlichen Fluoreszenzmarkern oder gängigen fluoreszierenden Proteinen, insofern sie zu den vorhandenen Laserwellenlängen und den darauf abgestimmten Gittern der strukturierten Beleuchtung passen. Des Weiteren erlaubt die relativ hohe Geschwindigkeit einer SIM-Aufnahme (ca. 500 ms pro Bild im 2D-SIM-Modus) die Erfassung dynamischer Prozesse in lebenden Zellen.

Die Rekonstruktion und Berechnung des Super-Resolution-Bildes erfolgt in der Regel nach der eigentlichen Bildaufnahme.

SIM eignet sich für Proben von bis zu 20 μm Dicke. Wichtig ist, dass die zugrundeliegende Struktur (Zellen, Gewebe,

Markierung etc.) eine fokussierte Abbildung und Detektion des Gitterbildes erlaubt. Besondere Voraussetzungen für ein gutes hochaufgelöstes SIM-Bild sind neben der optimalen Systemkalibrierung, die Verwendung von hochwertigen Deckgläsern und große Sorgfalt bei der Reinigung der optischen Komponenten.

2.3 Stochastische optische Rekonstruktionsmikroskopie (STORM)

Die stochastische optische Rekonstruktionsmikroskopie (STORM) ist ein fluoreszenzmikroskopisches Verfahren, welches eine zehnfache Auflösungsverbesserung gegenüber der von Ernst Abbe definierten optischen Auflösungsgrenze ermöglicht (■ Abb. 2.6). Es ist ein stochastisches Verfahren, bei dem die Auflösungsverbesserung mit Hilfe mathematischer Methoden erreicht wird. STORM gehört zur Gruppe der Einzelmolekül-

Abb. 2.6 Die Auflösungsverbesserung von STORM gegenüber konventioneller (auflösungsbegrenzter) Fluoreszenzmikroskopie **a)** Epifluoreszenzmikroskopiebild von Tubulin-Filamenten in humanen Fibroblasten markiert mit dem STORM-Paar Alexa647/Alexa405. **b)** STORM-Bild derselben Region. Es ist eine deutliche Auflösungsverbesserung erkennbar.

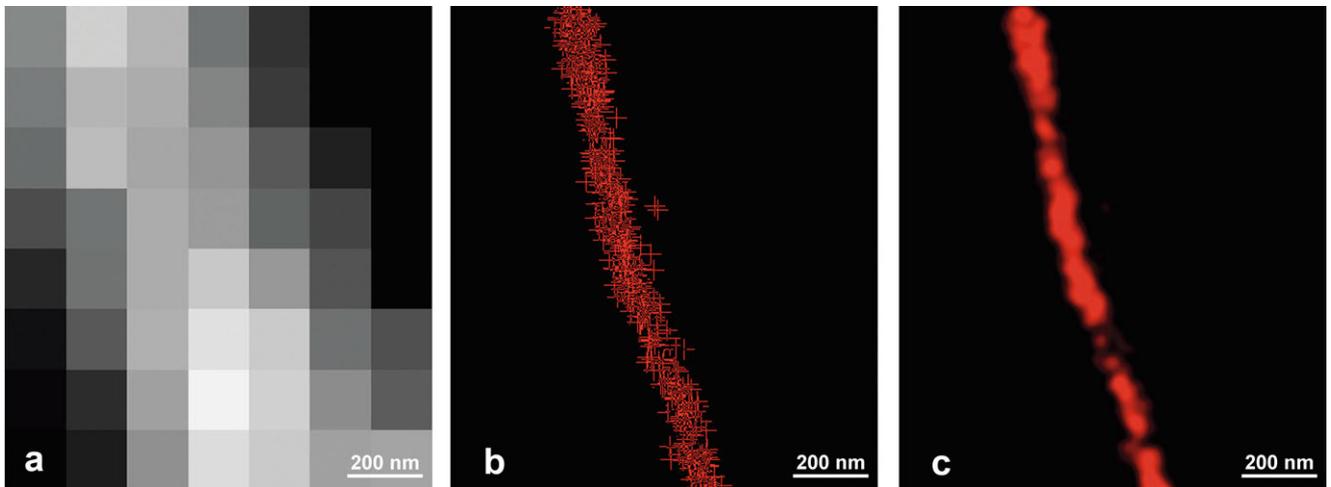
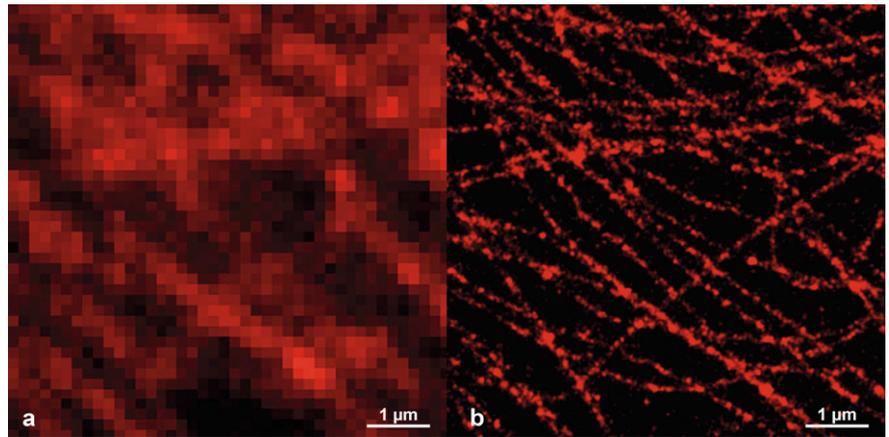


Abb. 2.7 Verschiedene Darstellungsformen von STORM Bildern am Beispiel eines stark vergrößerten Tubulinfilaments. **a)** Kamerasignal des auflösungsbegrenzten Fluoreszenzbildes. **b)** STORM Bild, bei dem jede Fluorochrom-Position als Kreuz visualisiert ist. **c)** STORM Bild bei der jede Fluorochrom-Position als Kreis visualisiert ist. Gauss-Radius 15 nm. Keine einzelnen Kreise sind erkennbar, die Struktur erscheint glatter.

lokalisationsmikroskopie und ist damit vom Funktionsprinzip verwandt mit GSDIM und PALM.

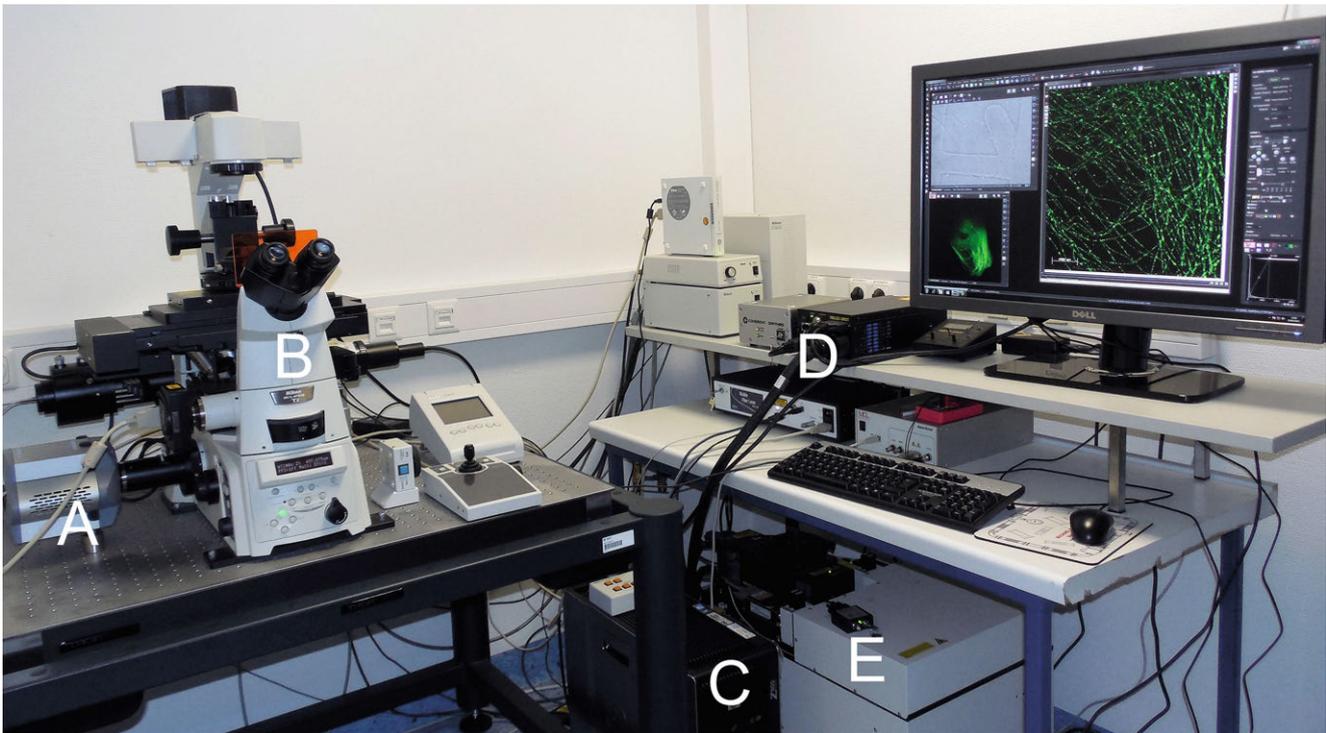
2.3.1 Das STORM-Prinzip

Fluoreszenzsignale von punktförmigen Objekten unterhalb der Auflösungsgrenze, wie sie z. B. von einzelnen Fluorochrommolekülen erzeugt werden, lassen sich mathematisch durch ihre *Point Spread Function* (PSF) beschreiben. Die Auflösungsverbesserung bei STORM basiert darauf, dass sich das Zentrum dieser PSF mathematisch sehr genau berechnen lässt. Dieses Zentrum entspricht dem Ursprungs-Ort des fluoreszierenden Objekts.

Die Präzision der Ortsbestimmung ist theoretisch unbegrenzt und hängt von der Helligkeit des Signals, also von der Anzahl der detektierten Photonen, ab. Je heller die verwendete

Fluorochrome, desto genauer ist die Positionsbestimmung. Typischerweise liegt sie im Bereich von Nanometern.

Damit die Ortsbestimmung von einzelnen Fluorochrommolekülen möglichst präzise ist, dürfen die Signale von benachbarten Fluorochromen nicht überlappen, sodass jede PSF nur dem Signal von einem einzelnen Fluorochrommolekül entspricht. Dieses wird dadurch erreicht, dass man die Fluorochrome in einen Zustand versetzt, in dem sie nicht alle gleichzeitig fluoreszieren. Die Fluorochrome müssen also zwischen zwei unterscheidbaren Zuständen wechseln, einem fluoreszierenden „an“-Zustand und einem nicht fluoreszierenden „aus“-Zustand. Für eine STORM-Aufnahme befindet sich dann zu jedem Zeitpunkt ein Großteil (>99 %) der Fluorochrome im „aus“-Zustand. Nimmt man mit dem Mikroskop eine Zeitserie mit 5 000 oder mehr Einzelbildern auf, sollte jedes Fluorochrom mindestens einmal im „an“-Zustand erfasst worden sein. In der Zeitserie sieht es so aus als würden die Fluorochrome blinken.



■ **Abb. 2.8** Aufbau eines STORM Super-Resolution-Mikroskops (Nikon N-STORM) A) EMCCD-Kamera zur Detektion von Einzelmolekülfluoreszenz. B) voll motorisiertes Mikroskop. C) Computer zur Mikroskopsteuerung, Bildberechnung und Bildanalyse. D) Netzteile für leistungsstarke Laser. E) Laserbox mit *Acousto Optical Tunable Filter* (AOTF).

Um aus der Zeitserie ein STORM-Bild zu erhalten, wird mittels einer Computer-Software die Position der Fluorochrome für jedes Einzelbild bestimmt. Die Summe aller Positionen liefert das finale superaufgelöste Bild mit einer lateralen Auflösung von bis zu 20 nm. Dieses finale Bild wird in der Regel erst in einem separaten Schritt nach der Aufnahme der Zeitserie erstellt.

Geeignete Software ermöglicht auch die Erstellung eines Live-STORM-Bildes während der Aufnahme der Zeitserie, mit etwas verringerter Auflösung als bei dem finalen STORM-Bild.

Ein STORM-Bild besteht aus den Positions-Koordinaten der einzelnen Fluorochrome. Es gibt verschiedene Möglichkeiten, ein STORM-Bild zu visualisieren. Am gebräuchlichsten ist es, jede Fluorochrom-Position als Kreis darzustellen. Auf die Kreise wird ein Gauss-Filter angewendet, so dass ihre Intensität zum Rand hin abnimmt. Der Gauss-Radius wird so gewählt, dass er im Bereich der Lokalisationsgenauigkeit der einzelnen Fluorochrome liegt, wodurch die Darstellung des Bildes geglättet wird.

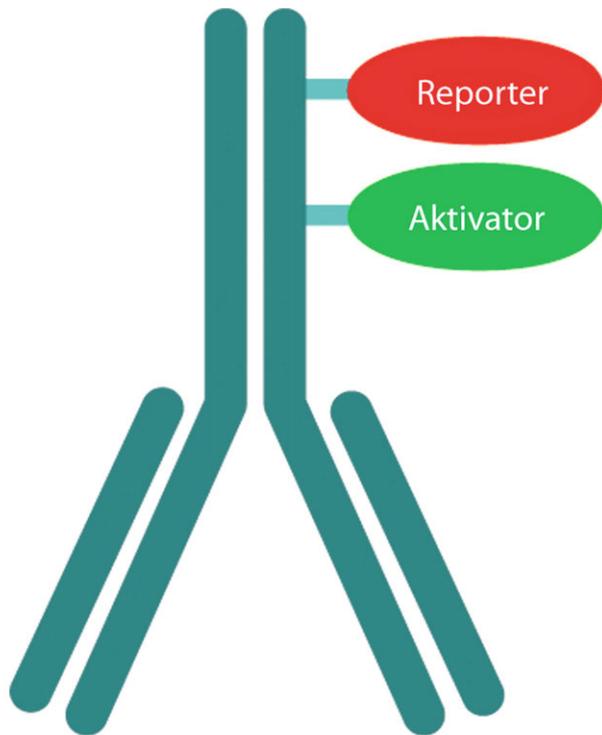
Eine weitere Möglichkeit STORM-Bilder zu visualisieren, besteht darin, jede Fluorochrom-Position als Kreuz darzustellen. Dabei ist jede Fluorochrom-Position gut erkennbar, jedoch wirkt diese binäre Darstellung auf den Betrachter unkonventionell.

In ■ Abbildung 2.7 sind die verschiedenen Möglichkeiten der Visualisierung von STORM-Bildern gezeigt.

Ein STORM-Mikroskop basiert auf einem TIRF-Mikroskop, ausgestattet mit starken Lasern (>100 mW Ausgangsleistung) als Lichtquellen und einer empfindlichen EMCCD-Kamera für die Detektion von Einzelmolekülfluoreszenz. Bei einem STORM-Mikroskop ist zusätzlich der Strahlengang so optimiert, dass der Teil der Probe, der für die STORM-Aufnahme genutzt wird, mit möglichst hoher Lichtintensität beleuchtet wird. Eine STORM-Aufnahme kann in TIRF- oder Weitfeldbeleuchtung durchgeführt werden. In ■ Abbildung 2.8 ist ein STORM-Mikroskop mit seinen Komponenten zu sehen.

2.3.2 Farbstoffe für STORM

Die Farbstoffe für STORM setzen sich aus einem Paar von zwei verschiedenen Fluorochromen zusammen. Ein Fluorochrom, welches sich mit rotem Laserlicht anregen lässt und im nahen Infrarot fluoresziert, dient als sog. Reporter. Als Reporter werden Alexa647 oder der strukturell analoge Farbstoff Cy5 verwendet. Ein zweites Fluorochrom, welches sich mit kurzwelligerem Licht anregen lässt, dient als Aktivator. Typische Farbstoffe, die sich als Aktivator verwenden lassen, sind Cy3, Cy2, Alexa488 und Alexa405. Sowohl das Aktivator-Fluorochrom als auch das Reporter-Fluorochrom müssen an dasselbe Molekül gebunden sein, welches eine zelluläre Zielstruktur bindet, meist an einen Antikörper (siehe ■ Abb. 2.9).



■ **Abb. 2.9** Schematische Darstellung eines Farbstoffs für STORM. Jeweils ein Reporterfluorochrom und ein Aktivatorfluorochrom sind an denselben Antikörper gebunden.

Bei einer STORM-Aufnahme werden zunächst die Reporter-Fluorochrome durch einen starken Lichtpuls mit einem roten Laser in den dunklen „aus“-Zustand versetzt.

Durch Anregung des Aktivators mit geeignetem Laserlicht wird ein geringer Anteil des an den gleichen Antikörper gebundenen Reporterfluorochroms aus dem dunklen „aus“ in den fluoreszierenden „an“-Zustand versetzt. Im „an“-Zustand werden dann die Reporterfluorochrome mit rotem Laserlicht angeregt und ihre Fluoreszenzsignale mit der EMCCD-Kamera detektiert. Dabei werden sie wieder in den „aus“-Zustand versetzt.

Dieser Zyklus aus Aktivierung und Auslesen des Signals des Reporterfluorochroms wird mehrere Tausend Mal wiederholt. In ■ Abbildung 2.10a ist der Ablauf einer STORM-Aufnahme schematisch dargestellt.

Die Reaktion vom „aus“ in den „an“ Zustand kann auch spontan geschehen. Sie ist jedoch sehr langsam, was die Aufnahmezeit enorm verlängern würde. Durch Anregung des Aktivators wird diese Reaktion stark beschleunigt, sodass eine STORM-Aufnahme meist nur wenige Minuten dauert.

Eine STORM-Färbung wird wie eine konventionelle immunocytochemische Färbung durchgeführt. Um der höheren Auflösung gerecht zu werden, muss die Konzentration des primären Antikörpers so gewählt werden, dass eine sehr dichte Markierung der Zielstruktur erhalten wird.

STORM-Aufnahmen werden meist in 8-Well-Kammern mit Glasboden (0,17 mm Dicke) durchgeführt. Es wird ein spe-

■ **Tab. 2.1** STORM-Puffer

Pufferzusammensetzung	Bemerkungen
50 mM Tris (pH 8.0), 10 mM NaCl, 0,5 mg ml ⁻¹ Glucoseoxidase, 40 µg ml ⁻¹ Katalase, 10 % (w/v) Glucose, β-Mercaptoethanolamin [MEA] (10 mM bis 100 mM) (Ref. 1)	Frisch ansetzen aus: 1) 50 mM Tris pH 8 mit 10 % (w/v) Glucose (bei 4°C lagern) 2) Enzymlösung (20-fach konzentriert, bei -20°C lagern): 10 mg ml ⁻¹ Glucoseoxidase, 0,8 mg ml ⁻¹ in 50 mM Tris pH 8.0 + 50 % Glycerin 3) 1 M MEA pH 8 etwa (2 Wochen stabil bei 4°C)
50 mM Tris (pH 8.0), 10 mM NaCl, 0,5 mg ml ⁻¹ Glucoseoxidase, 40 µg ml ⁻¹ Katalase, 10 % (w/v) Glucose, 143 mM β-Mercaptoethanol (Ref. 1)	Frisch ansetzen aus: 1) 50 mM Tris pH 8 mit 10 % (w/v) Glucose 2) Enzymlösung (20-fach konzentriert, bei -20°C lagern): 10 mg ml ⁻¹ Glucoseoxidase, 0,8 mg ml ⁻¹ in 50 mM Tris pH 8.0 + 50 % Glycerin 3) 14,3 M β-Mercaptoethanol (bei 4°C lagern)
PBS (pH 7.4), 100 mM MEA (Ref. 2)	Frisch ansetzen, ggf. das PBS entgasen
Leibowitz medium pH 7.2, 0,5 mg ml ⁻¹ Glucoseoxidase, 40 µg ml ⁻¹ Katalase, 10 % (w/v) Glucose, 1 mM Ascorbinsäure (Ref. 3)	Für Lebendzell-STORM. Medium vorwärmen. Puffer frisch ansetzen.
PBS (pH 7.4) 0,5 mg ml ⁻¹ Glucoseoxidase, 40 µg ml ⁻¹ Katalase, 10 % (w/v) Glucose, Ascorbinsäure (25 µM – 500 µM), Methylviologen (25 µM – 500 µM) (Ref. 4)	Bei Ascorbinsäurekonzentrationen höher als 100 µM sollte durch Zugabe einer kleinen Menge einer 1 M Dinatriumhydrogenphosphat (Na ₂ HPO ₄)–Lösung der pH-Wert konstant gehalten werden.
Mowiol + MEA (50 µM – 200 µM)	Frisch ansetzen aus – Mowiol – MEA 2 M Stammlösung in H ₂ O (einige Wochen bei 4°C stabil) Sehr gut mischen.

Referenzen: 1) Dempsey et al. 2011, 2) Heilemann et al. 2009, 3) Benke & Manley 2012, 4) Vogelsang et al. 2009

zieller Aufnahmebuffer benötigt, der dafür sorgt, dass die Fluorochrome mehrmals reversibel blinken, bevor sie irreversibel bleichen. Dieser Aufnahmebuffer enthält Moleküle mit freien Thiolgruppen (-SH), meist β-Mercaptoethanolamin (MEA) und ein Enzymsystem, welches Sauerstoff aus dem Puffer entfernt. Da das Enzymsystem sein Substrat Glucose verbraucht, ist der Puffer nur kurz haltbar. Aus diesem Grund muss er frisch angesetzt und erst direkt vor der Aufnahme auf die Probe gegeben werden. Wenn das Blinken nachlässt, also die Fluorochrome rasch anfangen zu bleichen, muss der Puffer gewechselt werden. In ■ Tabelle 2.1 sind verschiedene gebräuchliche Puffer für STORM aufgeführt.

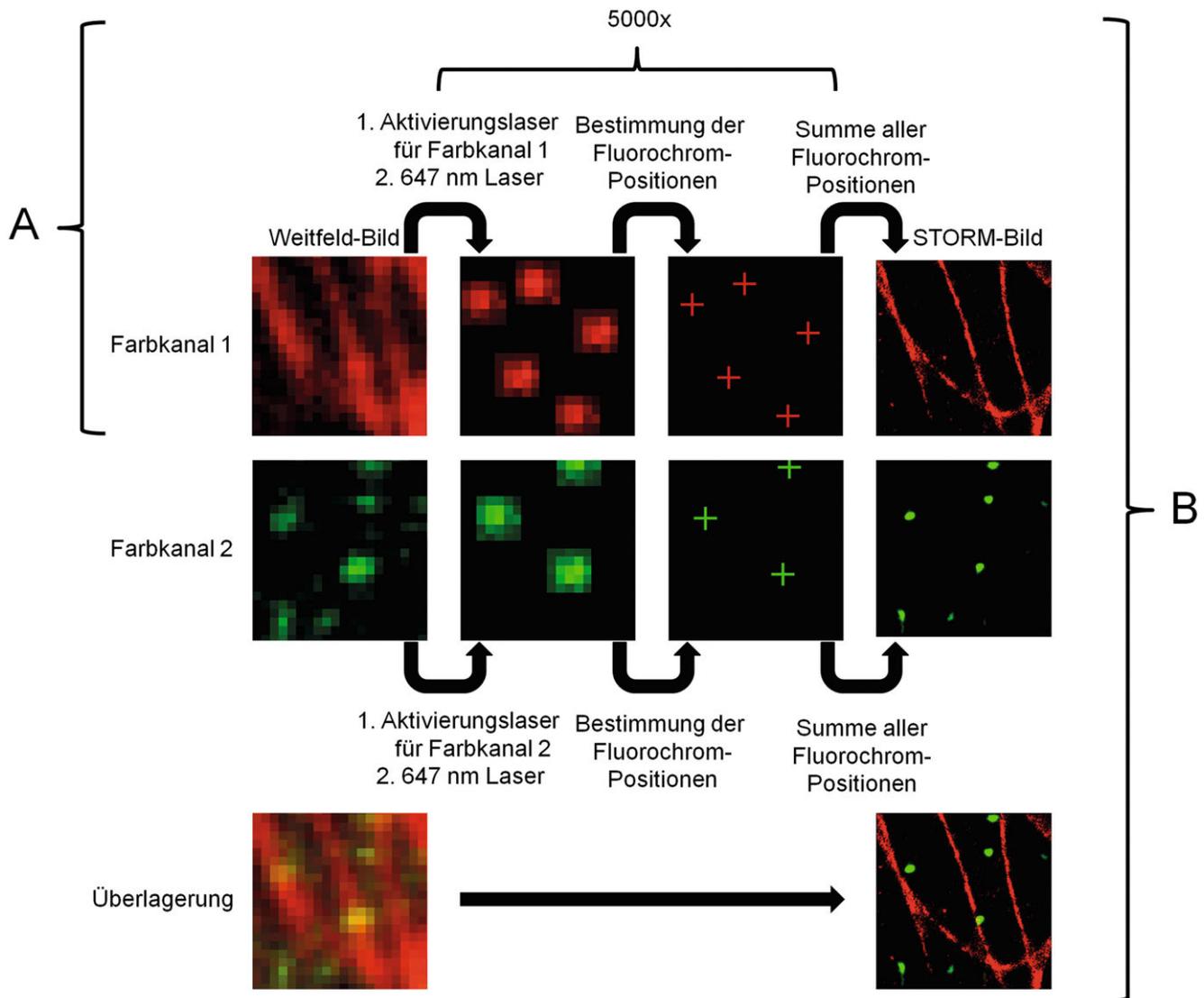


Abb. 2.10 Das Prinzip von STORM. a) Durch einen starken roten Laser und einen speziellen Bildaufnahmepuffer werden die Reporterfluorochrome in einen reversiblen „aus“-Zustand versetzt. Mit einem kurzwelligeren Aktivierungslaser werden dann die Aktivatorfluorochrome angeregt. Dadurch werden die an die gleichen Antikörper gebundenen Reporterfluorochrome aktiviert. Die Intensität des Aktivierungslasers wird so gewählt, dass nur ein geringer Teil aller Reporterfluorochrome aktiviert wird. Bei erneuter Beleuchtung mit dem roten Laser fluoreszieren diese aktivierten Reporterfluorochrome kurz und gehen dann wieder in den „aus“-Zustand über. Ihre Fluoreszenzsignale werden mit einer EMCCD-Kamera detektiert. Dieser Vorgang wird mehrere Tausend Mal wiederholt. Die Fluoreszenzsignale stammen von einzelnen Fluorochromen. Deren Positionen lassen sich mit geeigneter Software sehr genau bestimmen. Dieses wird für jedes Einzelbild durchgeführt. Die Summe aller Positionen liefert das supraaufgelöste STORM Bild. b) Bei einer Zweifarben-STORM Aufnahme werden abwechselnd zwei unterschiedliche Aktivierungslaser verwendet, so dass nur Fluorochrompaare, die das passende Aktivatorfluorochrom haben, aktiviert werden. Für jeden einzelnen Farbkanal ist das Prinzip gleich dem einer Einfarben-STORM-Aufnahme. Probe: Alpha Tubulin gefärbt mit Alexa647/Alexa405 (Farbkanal 1, rot) und Beta-Catenin gefärbt mit Alexa647/Alexa568 (Farbkanal 2, grün) in primären humanen Fibroblasten.

2.3.3 Mehrfarben-STORM

Beim Mehrfarben-STORM werden für die verschiedenen Farbkanaäle unterschiedlich farbige Aktivator-Fluorochrome verwendet (z. B. Alexa405, Cy2 und Cy3 für eine Dreifarben-Aufnahme). Das Reporter-Fluorochrom ist für alle Farbkanaäle gleich, nämlich Alexa647 bzw. Cy5. Bei der Aufnahme werden abwechselnd die verschiedenen Aktivator-Fluorochrome mit geeignetem Laserlicht angeregt. Es werden dadurch idealer-

weise nur die Reporter-Fluorochrome in den „an“-Zustand versetzt, die an einen Antikörper mit dem entsprechenden Aktivator-Fluorochrom gebunden sind. Für alle Farbkanaäle wird die Fluoreszenz von Alexa647 bzw. Cy5 als Signal detektiert. Die Farbtrennung erfolgt ausschließlich über die verschiedenen Aktivatorfluorochrome. Dies hat den Vorteil, dass keine chromatische Aberration auftritt. Die chromatische Aberration der verwendeten Objektive ist zwar korrigiert, jedoch nur für den Auflösungsbereich eines konventionellen Fluoreszenzmi-

kroskops, nicht für den eines Super-Resolution-Mikroskops. Das Prinzip von Mehrfarben-STORM ist in [Abbildung 2.10b](#) schematisch dargestellt.

2.3.4 3D-STORM

STORM kann auch in der dritten Dimension eine zehnfache Auflösungsverbesserung erzielen. Im Gegensatz zu anderen mikroskopischen Techniken, wie der konfokalen Laserscanning-Mikroskopie, muss die Probe bzw. das Objektiv dazu nicht bewegt werden. Dadurch ist die Aufnahmezeit für eine 2D- und für eine 3D-STORM-Aufnahme genau gleich.

Für ein 3D-STORM-Bild wird eine zylindrische Linse in den Strahlengang eingebracht. Diese Linse sorgt dafür, dass die PSF nur exakt in der Fokusebene rund ist. Oberhalb der Fokusebene ist sie horizontal verzerrt, unterhalb der Fokusebene ist sie vertikal verzerrt ([Abb. 2.11a](#)). Mit Hilfe einer Kalibrierungskurve lässt sich aus dieser Verzerrung die dreidimensi-

onale Position der Moleküle errechnen. Der axial erfassbare Bereich beträgt etwa $1\ \mu\text{m}$, wobei eine Auflösung von bis zu $50\ \text{nm}$ erreicht werden kann ([Abb. 2.11b](#)).

2.3.5 Lebendzell-STORM

Meist werden fixierte Präparate für STORM verwendet. STORM kann jedoch auch bei lebenden Zellen verwendet werden, sodass man ein zeitaufgelöstes Superresolution-Bild bekommt. Die Markierung der Zielstruktur erfolgt in diesem Fall nicht über Antikörper. Wie bei der Markierung über Reporterproteine ([Kap. 22](#)) erfolgt der erste Schritt der Markierung auf Genebene. In den Zielzellen müssen Fusionsproteine vom Zielprotein mit einem sog. *Tag* (engl. Etikett)-Protein exprimiert werden. Diese *Tag*-Proteine binden spezifische Substrate. Diese Substrate lassen sich an Fluorochrome koppeln. Der zweite Schritt der Markierung ist die Zugabe dieser substratgekoppelten Fluorochrome zu den Zellen. Im Gegensatz zu Antikörpern

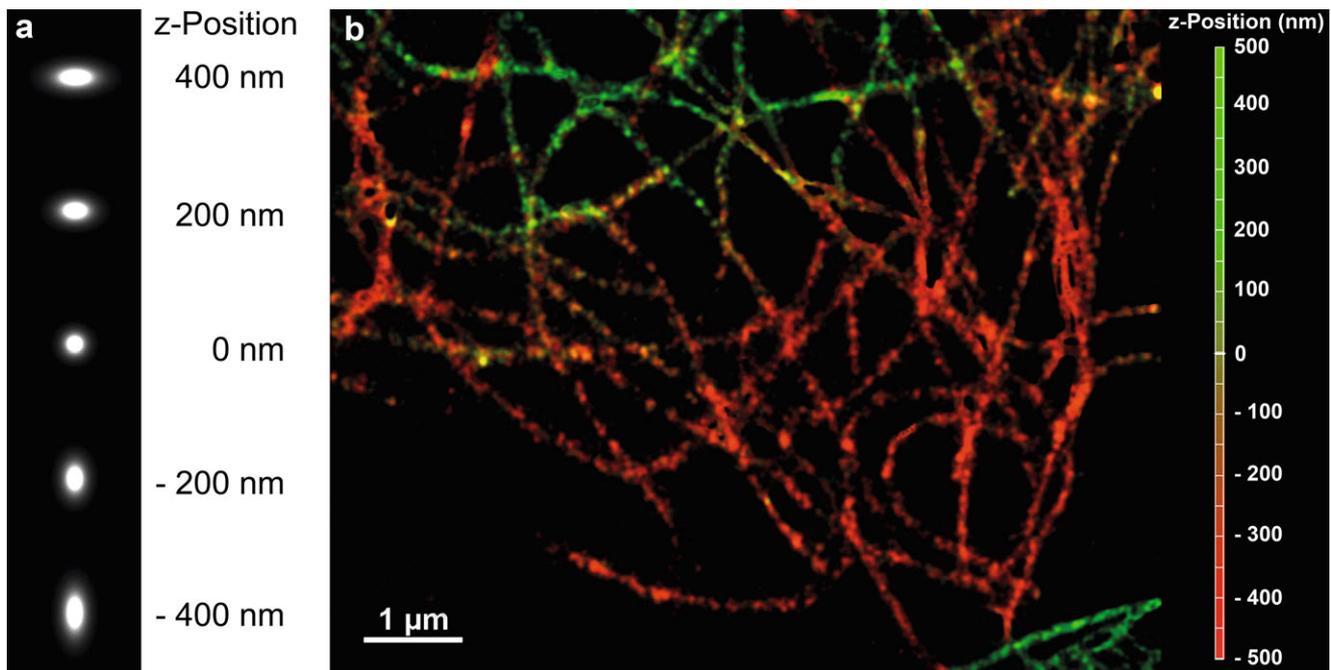


Abb. 2.11 3D-STORM. a) Verzeichnung der PSF abhängig von seiner dreidimensionalen Position. Aus dieser positionsabhängigen Verzerrung lässt sich die dreidimensionale Position des Fluorochroms sehr genau bestimmen. b) Beispiel für eine 3D-STORM-Aufnahme. Tubulin-Filamente in A549-Zellen wurden dazu mit dem STORM Farbstoffpaar Cy5/Cy2 markiert. Die dreidimensionale Position ist über eine Farbkodierung wiedergegeben.

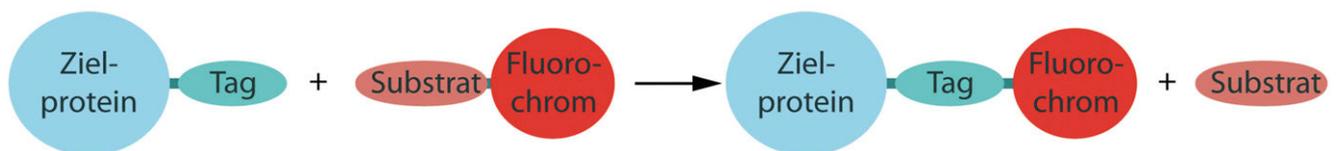


Abb. 2.12 Markierung von Proteinen für Lebendzell-STORM. Über gentechnische Methoden wird von dem Zielprotein ein Fusionsprotein mit einem sogenannten *Tag* (engl. Etikett)-Protein erstellt und exprimiert. Das Fluorochrom wird an ein Substrat gekoppelt, welches von diesem *Tag*-Protein spezifisch erkannt und gebunden wird. Gibt man diese substratgekoppelten Fluorochrome zu lebenden Zellen, wird das Zielprotein mit dem Fluorochrom markiert, wobei meist das Substrat abgespalten wird.

können diese substratgekoppelten Fluorochrome in lebende Zellen eindringen und dort an die mit einem *Tag* markierten Zielstrukturen binden. Meist kommt es dabei zur Ausbildung einer kovalenten Bindung, bei der das Substrat freigesetzt wird. Auf diese Art lassen sich lebende Zellen spezifisch mit organischen Fluorochromen markieren (Abb. 2.12). Viele kommerzielle Systeme sind verfügbar (*SNAP-Tag*, *HaloTag* etc.).

Für Lebendzell-STORM wird eine Zeiterie von mehreren Minuten aufgenommen. Dabei sollten möglichst viele Bilder pro

Sekunde erzeugt werden. Der begrenzende Faktor hierbei ist die Aufnahmegeschwindigkeit der Mikroskopkamera. Nimmt man einen kleineren Bereich auf (z. B. 32×32 Kamerapixel) ist die maximale Aufnahmegeschwindigkeit deutlich höher als bei einem größeren Bereich (z. B. 256×256 Kamerapixel). Aus diesem Grund wird bei Lebendzell-STORM-Aufnahmen der Aufnahmebereich meistens klein gewählt. Für die Berechnung der Fluorochrompositionen wird die Zeiterie dann in verschiedene Abschnitte unterteilt (z. B. 0s–30s, 30s–60s, 60s–90s etc.). Für jeden

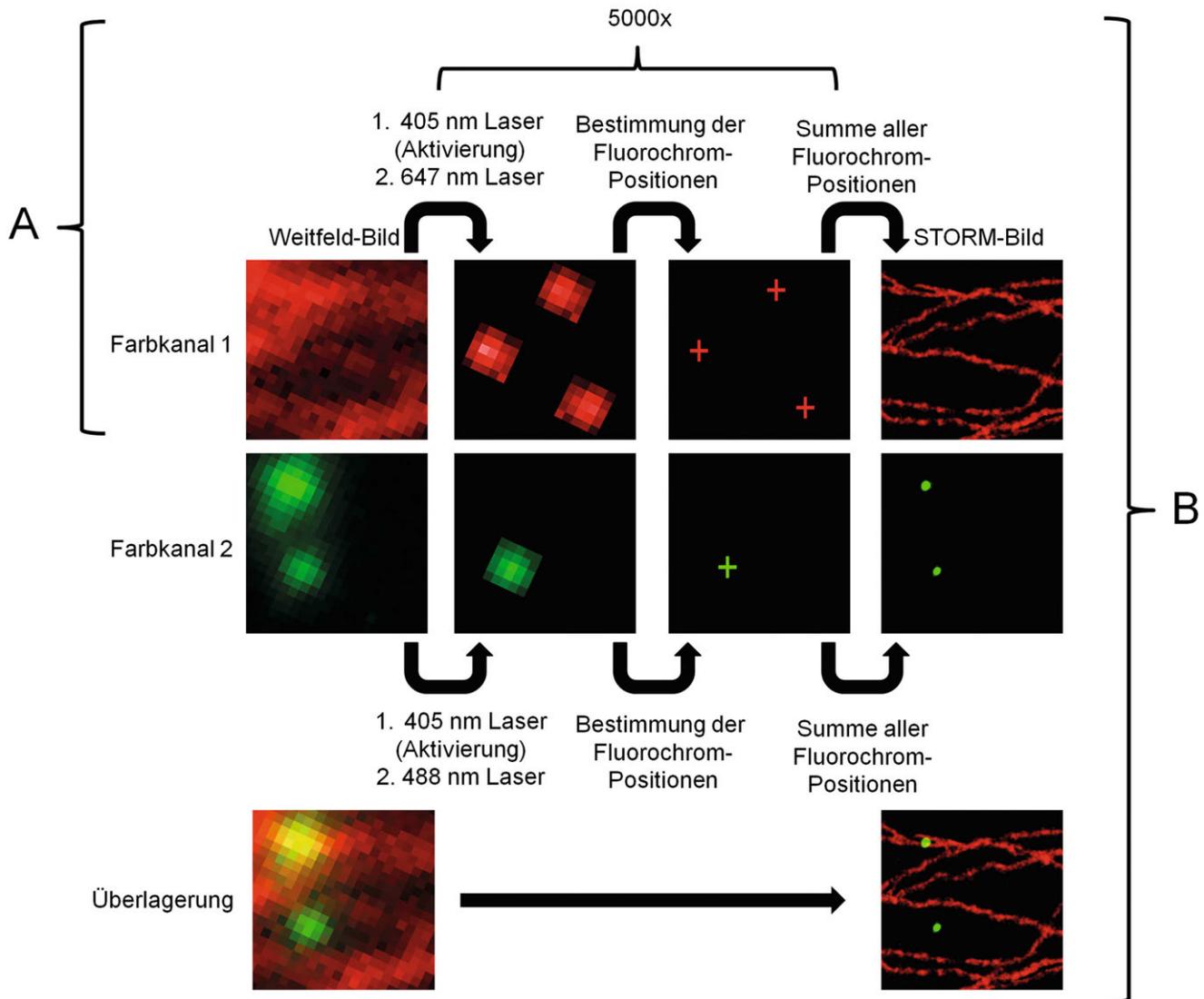


Abb. 2.13 Das Prinzip von dSTORM. **a)** Durch einen starken Laser (hier ein 647 nm Laser) und einen speziellen Bildaufnahmepuffer werden die Fluorochrome in einen reversiblen „aus“-Zustand versetzt. Mit einem 405 nm Laser wird ein geringer Teil von ihnen aktiviert. Bei erneuter Beleuchtung mit dem 647 nm Laser fluoreszieren diese aktivierten Reporterfluorochrome kurz und gehen dann wieder in den „aus“-Zustand über. Ihre Fluoreszenzsignale werden mit einer EMCCD-Kamera detektiert. Dieser Vorgang wird mehrere Tausend Mal wiederholt. Die Fluoreszenzsignale stammen von einzelnen Fluorochromen. Deren Positionen lassen sich mit geeigneter Software sehr genau bestimmen. Dieses wird für jedes Einzelbild durchgeführt. Die Summe aller Positionen liefert das superaufgelöste dSTORM Bild. **b)** Bei einer Zweifarben-dSTORM Aufnahme werden Fluorochrome verwendet, deren Anregungsspektren sich möglichst nicht überschneiden. Die verschiedenfarbigen Fluorochrome werden dann alternierend über Laserlicht angeregt, welches zu ihrem Anregungsspektrum passt (hier 647 nm Laserlicht für Farbkanal 1 und 488 nm Laserlicht für Farbkanal 2). Die Detektion der Fluoreszenzsignale erfolgt über denselben Mikroskopfilter mit derselben Kamera. Die Farbzurteilung erfolgt über das anregende Laserlicht. Zur Aktivierung wird jeweils 405 nm Laserlicht verwendet. Für jeden einzelnen Farbkanal ist das Prinzip gleich wie bei einer Einfarben-dSTORM-Aufnahme. Probe: Primäre humane Fibroblasten infiziert mit humanen Cytomegalieviren. Alpha Tubulin gefärbt mit Alexa647 (Farbkanal 1, rot) virales Protein pp65 gefärbt mit Alexa488 (Farbkanal 2, grün).

dieser Abschnitte wird ein STORM-Bild erstellt. Somit erhält man STORM-Bilder von verschiedenen Zeitintervallen. Dabei muss immer ein Kompromiss zwischen der räumlichen und der zeitlichen Auflösung eingegangen werden. Je länger man die zeitlichen Abschnitte wählt, desto besser ist die räumliche Auflösung, aber desto schlechter ist die zeitliche Auflösung und umgekehrt.

Der STORM Aufnahmebuffer kann sich auf die Vitalität der Zellen negativ auswirken. Einige organische Fluorochrome wie ATTO655 oder ATTO680 können ohne einen solchen Puffer für Lebendzell-STORM verwendet werden. Bei ihnen genügt das zelluläre Milieu, um das Blinken zu ermöglichen. Bei diesen Fluorochromen wird kein Aktivatorfluorochrom benötigt. Die STORM-Aufnahmen erfolgen dann nach dem Prinzip der direkte stochastische optische Rekonstruktionsmikroskopie (dSTORM siehe 2.3.6.).

2.3.6 Direkte stochastische optische Rekonstruktionsmikroskopie (dSTORM)

Eine spezielle Variante der stochastischen optischen Rekonstruktionsmikroskopie (STORM) ist die direkte stochastische optische Rekonstruktionsmikroskopie (dSTORM). Diese basiert auf denselben Prinzipien wie STORM, dem Versetzen eines Großteils der Fluorochrome in einen zeitweiligen nicht fluoreszierenden dunklen „aus“-Zustand und die genaue mathematische Ortsbestimmung von den wenigen zeitgleich fluoreszierenden Molekülen mittels Computersoftware.

Der wesentliche Unterschied zu STORM ist die Art der verwendeten Fluorochrom. Während man bei STORM immer ein Fluorochrom-Paar bestehend aus Aktivator und Reporter verwendet, wird bei dSTORM auf den Aktivator verzichtet. Es werden also konventionelle Fluorochrome verwendet, die auch bei anderen Fluoreszenzmikroskopischen Markierungstechniken zum Einsatz kommen.

Für dSTORM werden die gleichen Pufferbedingungen wie für STORM verwendet (Tab. 2.1). Unter diesen Pufferbedingungen und der Verwendung von starken Lasern als Lichtquellen lassen sich viele organische Fluorochrome (meist Cyanin- oder Rhodamin-Farbstoffe) zeitweilig in einen nicht fluoreszierenden dunklen „aus“-Zustand versetzen. Aus diesem können sie spontan ohne Aktivierung zurück in den fluoreszierenden Zustand reagieren. Da diese Reaktion meist zu langsam für dSTORM Aufnahmen ist, wird hier genau wie bei STORM ein Aktivierungslaser verwendet, der die Rückreaktion vom nicht fluoreszierenden „aus“-Zustand in den fluoreszierenden „an“-Zustand beschleunigt. Im Gegensatz zu STORM ist dieser nicht auf ein spezielles Aktivator-Fluorochrom gerichtet. Stattdessen wird für die meisten dSTORM Farbstoffe 405 nm Laserlicht verwendet. Das Prinzip von dSTORM ist in Abbildung 2.13a dargestellt.

Einige Fluorochrome benötigen keinen speziellen Puffer für dSTORM Aufnahmen. Dazu gehören Cage-Farbstoffe, die erst nach Aktivierung durch violettes Licht (meist wird ein 405 nm oder ein UV-Laser verwendet) ihre gewünschte Fluoreszenz zeigen. Diese Farbstoffe zeigen kein Blinken, bei dem sie mehrfach an- und ausgehen, sondern können nur einmal von einem nicht fluoreszierenden in einen fluoreszierenden Zustand versetzt werden. Die Leistung des Aktivierungslasers wird so gewählt, dass immer nur eine kleine Fraktion aller Fluorochrome aktiviert wird. Mit Hilfe eines starken Lasers werden dann die aktivierten Fluorochrome angeregt und ihre Fluoreszenz detektiert. Durch die hohe Lichtintensität werden die aktivierten Fluorochrome gebleicht. Danach erfolgt die erneute Aktivierung einer kleinen Fraktion aller Fluorochrome durch violettes Laserlicht.

Weiterhin sind auch Farbstoffe verfügbar, die ein echtes Blinken ohne speziellen Aufnahmebuffer zeigen. Diese Fluorochrome wechseln dann mehrfach zwischen einem fluoreszierenden und einem nicht fluoreszierenden Zustand. Beispiele hierfür sind der organische Farbstoff Abberior Flip565 sowie

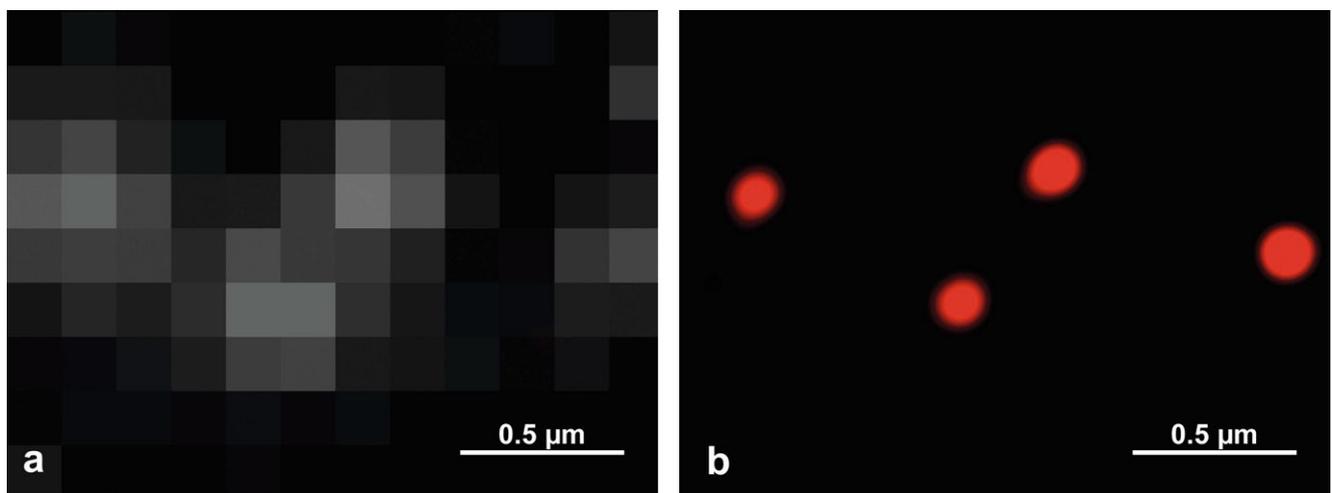


Abb. 2.14 dSTORM mit QuantumDot Nanokristallen. Das Glykoprotein B humaner Cytomegalieviren wurde mit QuantumDot Nanokristallen (QDot 655) markiert. a) Auflösungsbegrenztes Bild der Mikroskopkamera (Pixelgröße 160 nm). b) Dazugehöriges dSTORM-Bild. Die Größe der Viruspartikel, die etwa 160 nm bis 200 nm beträgt, lässt sich mit dSTORM richtig darstellen.

Tab. 2.2 Fluorochrome für dSTORM

Name	Anregungs-/Emissionsmaxima	Bemerkung
Alexa488	491 nm / 517 nm	
Rhodamine123	500 nm / 518 nm	
Dy505	500 nm / 525 nm	
Atto488	501 nm / 523 nm	
Cage500	501 nm / 524 nm	Funktioniert ohne STORM-Puffer. Kein MEA oder β -Mercaptoethanol verwenden.
Pico Green	502 nm / 522 nm	Interkalator, auch für Lebendzell-STORM geeignet
Qdot525	< 300 nm / 525 nm	Funktioniert ohne STORM-Puffer.
SNAP-Cell 505-Star	504 nm / 532 nm	Für Lebendzell-STORM
Atto520	516 nm / 538 nm	
Cage532	518 nm / 548 nm	Funktioniert ohne STORM-Puffer. Kein MEA oder β -Mercaptoethanol verwenden.
Rhodamine6G	526 nm / 556 nm	
Alexa532	532 nm / 552 nm	
Atto532	532 nm / 553 nm	
Dy530	535 nm / 556 nm	
Cy3	550 nm / 570 nm	
Cage552	552 nm / 574 nm	Funktioniert ohne STORM-Puffer. Kein MEA oder β -Mercaptoethanol verwenden.
SNAP-Cell TMR-Star	554 nm / 580 nm	Für Lebendzell-STORM
Flip565	558 nm / 283 nm	Funktioniert ohne STORM-Puffer. Kein MEA oder β -Mercaptoethanol verwenden.
Cy3B	559 nm / 570 nm	
ATTO565	563 nm / 592 nm	
Cy3.5	581 nm / 596 nm	
Qdot605	< 300 nm / 603 nm	Funktioniert ohne STORM-Puffer.
Cage590	586 nm / 607 nm	Funktioniert ohne STORM-Puffer. Kein MEA oder β -Mercaptoethanol verwenden.
ATTO590	594 nm / 624 nm	
Cage635	630 nm / 648 nm	Funktioniert ohne STORM-Puffer. Kein MEA oder β -Mercaptoethanol verwenden.
Qdot655	< 300 nm / 654 nm	Funktioniert ohne STORM-Puffer.
Alexa-Fluor647	649 nm / 670 nm	
Cy5	649 nm / 670 nm	
Dy654	654 nm / 675 nm	
ATTO655	663 nm / 684 nm	
TMP-ATTO655	663 nm / 684 nm	Für Lebendzell-STORM
ATTO680	680 nm / 700 nm	
ATTO700	700 nm / 719 nm	
Atto740	740 nm / 764 nm	
Cy7	747 nm / 776 nm	
Alexa750	749 nm / 775 nm	
DyLight750	752 nm / 778 nm	

Referenzen: 1) Dempsey et al. 2011, 2) van de Linde 2011, 3) Benke & Manley 2012

fluoreszierende Nanokristalle, die sogenannten QuantumDots (Abb. 2.14).

In Tabelle 2.2 ist eine Liste von Fluorochromen zu finden, die sich für dSTORM verwenden lassen.

2.3.6.1 Mehrfarben-dSTORM

Bei dSTORM werden für eine Mehrfarbenaufnahme Fluorochrome verwendet, deren Anregungsspektren sich möglichst nicht überschneiden. Die verschiedenfarbigen Fluorochrome werden dann alternierend über Laserlicht angeregt, welches zu ihrem Anregungsspektrum passt. Das Ein- und Ausschalten der Laserlinien erfolgt über einen AOTF. Die Detektion der Fluoreszenzsignale erfolgt über denselben Mikroskopfilter mit derselben Kamera. Die Farbzurordnung erfolgt über das anregende Laserlicht: 488 nm Laserlicht regt hauptsächlich grüne Fluorochrome an (z. B. Alexa 488, Atto488), 647 nm Laserlicht regt hauptsächlich infrarote Fluorochrome an (z. B. Alexa647, Cy5). Eventuell auftretender „Crosstalk“, also die ungewollte Anregung von zwei verschiedenfarbigen Fluorochromen mit demselben Anregungslicht, lässt sich mittels geeigneter Software korrigieren.

Bei Mehrfarbenaufnahmen müssen für jeden Farbkanal eigene Parameter für die Berechnung der Fluorochrom-Positionen eingestellt werden, da die unterschiedlichen Fluorochrome unterschiedliche Intensitäten haben können.

Für eine Mehrfarben-dSTORM Aufnahme in 3D muss für jedes Fluorochrom eine eigene 3D-Kalibrierungskurve verwendet werden. Zusätzlich muss die chromatische Aberration in der dritten Dimension korrigiert werden. Diese kann mit Hilfe von fluoreszierenden Kügelchen (*Beads*), die zur Probe gegeben werden, durchgeführt werden.

2.4 GSDIM: Depletion des Grundzustandes

Voraussetzung zur Erzeugung von Bildern durch Lokalisation einzelner Ereignisse ist, dass die Ereignisse selten genug vorkommen, damit sie sicher zu trennen sind. Das GSDIM-Verfahren (*Ground State Depletion followed by Individual single Molecule return*) verwendet den Fluoreszenzmolekülen inhärente Eigenschaften, um diese Verteilung sicher zu stellen. Das vereinfacht sowohl den apparativen Aufbau und eröffnet Super-Auflösung für viele kommerzielle Fluoreszenzfarbstoffe. Hinzu kommt, dass die Regeneration selbsttätig abläuft, also keine zusätzlichen Mittel nötig sind, um die einzelnen Fluoreszenzemitter an- oder abzuschalten. Somit handelt es sich um ein asynchrones Verfahren, was in der Regel zu kürzeren Bildaufbauzeiten führt.

2.4.1 Fluoreszenzzustände

Um das Konzept zu verstehen, wie man mit einer Abreicherung des Grundzustandes in der Fluoreszenz einzelne Moleküle zur Lokalisation sichtbar machen kann, soll hier nochmals kurz

auf die Energiezustände und den Fluoreszenzprozess eingegangen werden. Ein zur Fluoreszenz befähigtes System – meist wird es sich dabei um organische chemische Moleküle handeln – kann bei geeigneter Struktur des Elektronensystems Energiequanten absorbieren. Für den Fall der Fluoreszenz interessiert uns die Absorption von Lichtquanten (Photonen). Bei einem solchen Absorptionsvorgang verschwindet das anregende Photon, und das elektronische System wird von einem niedrigen Zustand – unter normalen Bedingungen dem Grundzustand – in einen höher angeregten Zustand überführt. In der Regel ist der angeregte Zustand der sogenannte Singulett S1 Zustand. Die genaue Herkunft dieser Bezeichnung stammt aus der Quantentheorie und soll hier nicht näher beleuchtet werden. Nach einer gewissen Zeit wird dieser angeregte Zustand spontan wieder zerfallen. Dabei wird ein weiteres Photon ausgesandt – die Fluoreszenz-Emission, und das System befindet sich anschließend wieder im Grundzustand. Da während des angeregten Zustandes schon ein kleiner Teil der Energie als Wärme verloren geht, ist das emittierte Photon von niedrigerer Energie als das anregende. Sichtbar wird das durch die Verschiebung der Farben von kürzerwelligen (blauerem) zu längerwelligen (röterem) Photonen. Diese Verschiebung ist als „Stokes-Shift“ bekannt und ermöglicht die Trennung von Anregung und Emission, ist also ein zentrales Phänomen bei Fluoreszenzmessungen.

Der Prozess der Absorption und Emission kann sehr oft wiederholt werden. Üblicherweise kann man bei der Belichtung eines einzelnen Moleküls mehrere Tausend Fluoreszenzphotonen erzeugen. Bei den allermeisten Fluorochromen tritt nach einer gewissen Zahl von solchen Fluoreszenz-Zyklen ein anderes Phänomen auf: Aus dem angeregten Zustand kehrt das System nicht unter Aussendung eines Lichtquants in den Grundzustand zurück, sondern gelangt in einen Dunkelzustand. Es gibt unterschiedliche reversible Dunkelzustände, die aber prinzipiell alle für dieses Verfahren verwendet werden können, am bekanntesten ist der sogenannte „Triplet-Zustand“. Die Wahrscheinlichkeit für einen Übergang in einen solchen Dunkelzustand ist durch quantenmechanische Parameter bestimmt und damit ein zufälliges Ereignis, etwa wie der radioaktive Zerfall. Ob ein Molekül also gleich bei der ersten Anre-

gung in einen Dunkelzustand übergeht, oder erst nach 100 000 Fluoreszenzanregungen, lässt sich nicht vorhersagen. Aber die mittlere Zahl von Fluoreszenzemissionen vor einem solchen Übergang charakterisiert den Fluoreszenzfarbstoff.

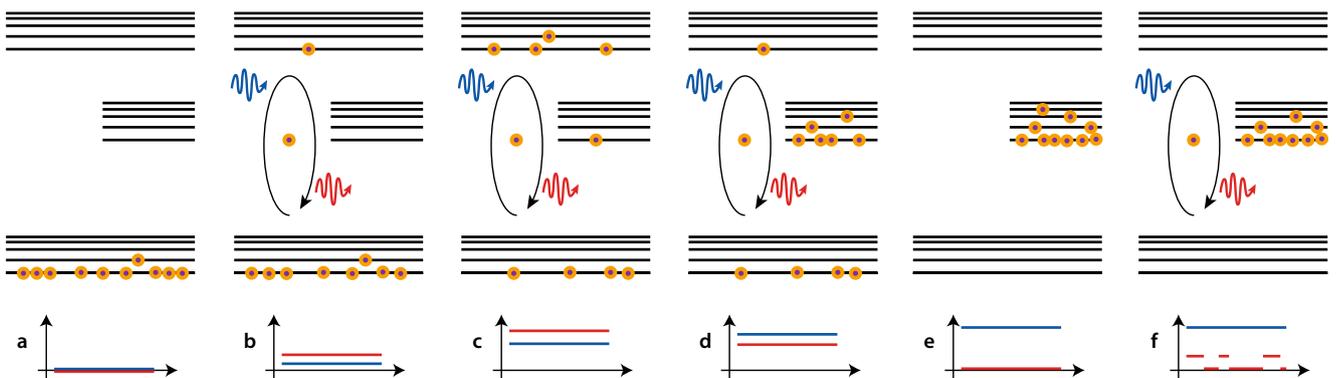
Im Gegensatz zu den angeregten Zuständen, die nur wenige Nanosekunden lang andauern, sind Dunkelzustände oft deutlich langlebig, typischerweise im Bereich von Millisekunden. Während dieser Zeit kann kein Anregungsphoton absorbiert und kein Fluoreszenzphoton emittiert werden. Dennoch ist das Molekül nicht zerstört, sondern kehrt nach einiger Zeit wieder in den Grundzustand zurück – von wo aus es wieder wie neu für den Fluoreszenzprozess zur Verfügung steht. Im Grunde schaltet das Molekül also stochastisch selbsttätig ein und aus (weshalb eine weitere Lichtquelle für die Aktivierung nicht nötig ist).

2.4.2 Verarmung des Grundzustandes

In Abhängigkeit von der Beleuchtungsintensität kann man nun unterschiedliche Verhaltensweisen eines Ensembles von Fluoreszenzmolekülen beobachten. Bei ganz geringer Intensität werden nur wenige Moleküle des Ensembles gelegentlich ein Lichtquant absorbieren und Fluoreszenz emittieren. Da alle Moleküle angeschaltet sind, lässt sich bei überlappenden Punktverwaschungsfunktionen (PSF) nichts über die Struktur unterhalb der Beugungsbegrenzung aussagen. Ein beugungsbegrenztes Bild lässt sich nur über sehr lange Integration erzeugen. Die Wahrscheinlichkeit, dass Moleküle im Dunkelzustand sind, ist verschwindend gering. (■ Abb. 2.15a)

Erhöht man die Beleuchtungsstärke, dann nimmt auch die Fluoreszenz zu, und man kann ohne lange Mittelungen direkt Fluoreszenzbilder erzeugen. (■ Abb. 2.15b und c) Diese sind beugungsbegrenzt.

Bei weiterer Erhöhung der Intensität wird die Emission wieder abnehmen. Das rührt daher, dass nun immer mehr Moleküle in den Dunkelzustand übergehen. Diese Moleküle stehen also für die Zeit im Dunkelzustand nicht zur Verfügung, und obwohl die Beleuchtung stärker wird, nimmt die messbare Fluoreszenz weiter ab. (■ Abb. 2.15d)



■ Abb. 2.15 Zum Prinzip der Verarmung des Grundzustandes und Einzelmolekül-Rückkehr. Einzelheiten siehe Text.

Wird eine bestimmte Beleuchtungsstärke überschritten, kann man alle Moleküle in den Dunkelzustand überführen. (■ Abb. 2.15e) Dann ist das Bild völlig schwarz. Hier hat man nun das ganze Ensemble aus dem Grundzustand in den Dunkelzustand überführt – und damit den Grundzustand geräumt (*depleted*). Unter dieser Bedingung kommt es – wie oben beschrieben, nur nach vergleichsweise langer Zeit zu einer Rückkehr in den Grundzustand. Dieser Übergang ist von der Beleuchtung unabhängig. Ein solches Molekül steht dann also eine gewisse Zeit lang (bis es wieder in den Dunkelzustand übergeht) für Fluoreszenz zur Verfügung (■ Abb. 2.15f). Man sieht dann die Emission eines einzelnen Moleküls vor einem dunkeln Hintergrund. Da das Molekül einige tausend Photonen vor dem nächsten Dunkelereignis erzeugen kann, wird im aufgezeichneten Bild ein gut definiertes Beugungsbild eines einzelnen Moleküls sichtbar. Dieses Beugungsbild steht zur Lokalisierung nach der Methode wie (oben) beschrieben zur Verfügung.

2.4.3 3D-GSDIM

Wie in den anderen Verfahren, kann man auch hier dreidimensionale Informationen extrahieren, indem eine zylindrische Linse eingesetzt wird, die einen kontrollierten Astigmatismus erzeugt. Aus der Orientierung des Astigmatismus kann man auf die axiale Position des Emitters zurückrechnen (► Kap. 2.3.4)

2.5 STED – Stimulierte Emissions-Depletion

Das erste Verfahren, mit dem zumindest theoretisch die optische Auflösungsgrenze beliebig unterschritten werden kann, ist als STED (*Stimulated Emission Depletion*) bekannt geworden ist. Dabei werden Eigenschaften des Materials (hier: der Fluoreszenzmoleküle) ausgenutzt – nachdem die optischen Möglichkeiten erschöpft waren. Die physikalischen Gesetze des durch optische Linsen fokussierten Lichtes bleiben dabei freilich unangetastet. In der Tat werden sie sogar in zweifacher Weise ausgenutzt.

2.5.1 Stimulierte Emission

Licht kann mit Materie prinzipiell auf dreierlei Weise interagieren. Ein Lichtquantum kann absorbiert werden, wobei das absorbierende Molekül in einen höheren Anregungszustand übergeht – das ist das Phänomen der Anregung. Von diesem angeregten Zustand kann das Molekül seine Energie wieder in Form von Licht abgeben. Wenn durch einen inneren Prozess schon ein kleiner Teil der Energie als Wärme verloren gegangen ist, handelt es sich um das Phänomen der Fluoreszenz-Emission – wobei das Licht der Emission in den roten Spektralbereich verschoben ist. Beide Wechselwirkungen begründen das Phänomen der Fluoreszenz. Eine dritte Wechselwirkung tritt

auf, wenn das bereits angeregte Molekül nochmals von einem Lichtquant angestoßen wird, diesmal aber mit einer langen Wellenlänge, aus dem Emissions-Spektrum des Moleküls. In diesem Falle wirkt das zweite Lichtteilchen wie ein Auslöser, der die angespannte Energiesituation im angeregten Molekül zusammenfallen lässt, etwa so, wie eine kleine Berührung eine Mausefalle zuschnappen lässt. Dabei wird das auslösende Lichtteilchen unverändert wieder freigesetzt, dazu gleichzeitig ein zweites Lichtteilchen, das exakt dieselben Eigenschaften wie das auslösende Quantum hat. Die Emission wird also durch einen Stimulus von außen induziert, weshalb man von stimulierter Emission spricht. Da – ausgehend von einem induzierendem – nun zwei Lichtteilchen mit derselben Farbe, Richtung und Polarisation austreten, spricht man auch von Lichtverstärkung. Dieses Phänomen ist das zentrale Konzept von Lasern.

2.5.2 Rastermikroskopie

Wie bei der konfokalen Mikroskopie kann man, anstatt das gesamte Feld gleichzeitig auszuleuchten, auch einen möglichst kleinen Punkt beleuchten. Diesen Punkt muss man, um ein zweidimensionales Bild zu erhalten, mittels schneller Spiegelsysteme über das Bildfeld bewegen – in gleicher Weise etwa wie in Röntgenröhren oder Raster-Elektronenmikroskopen. Das gängige STED Verfahren benutzt eine solche Rastermethode, und darum werden STED-Systeme in eleganter Weise aus konfokalen Mikroskopen abgeleitet. Dabei ist das Ziel, den Beleuchtungspunkt zur Anregung der Fluoreszenz möglichst klein zu machen. Der kleinste Durchmesser eines Beleuchtungspunktes wird durch die physikalischen Gesetze der Wellenoptik vorgegeben (► Kap. 1). Einerseits wirkt die Farbe auf den Durchmesser; er wird umso kleiner, je kürzer die Wellenlänge des Anregungslichtes ist (blauer Teil des Spektrums). Ebenso kann man mit größerer numerischer Apertur des Mikroskopobjektivs den Fleck verkleinern. Da aber die numerische Apertur nicht beliebig groß und die Wellenlänge nicht beliebig kurz werden kann, gibt es eine physikalische Schranke: das beugungsbegrenzte Beleuchtungs-Scheibchen. Tatsächlich handelt es sich dabei um ein komplex strukturiertes Muster (■ Abb. 1.5), wir können aber hier mit hinreichender Güte von einem kleinen Scheibchen sprechen.

Machen wir in Gedanken eine Momentaufnahme des Beleuchtungsvorganges. Das Anregungslicht erzeugt in dem beleuchteten Fleck eine größere Anzahl angeregter Moleküle. Die Anzahl hängt von den physikalischen Eigenschaften der Moleküle und von der Intensität des Beleuchtungslichts ab. Wenn nichts weiter geschieht, werden die angeregten Moleküle nach und nach ihre Energie wieder abgeben und dabei Fluoreszenzphotonen aussenden. Diese können wir mit den Detektoren des Rastermikroskops nachweisen. Ganz offensichtlich kommen die emittierten Photonen aus der gesamten angeregten (beugungsbegrenzten) Fläche. Die Feinheit, mit der wir Strukturen im Präparat nachweisen können, hängt von der Größe dieser Fläche ab. Die Größe des Flecks ist auflösungsbestimmend. Je

feiner der Fleck, desto besser die Auflösung. Ebenso, wie man mit einer feinen Nadel kleinere Details als mit einem groben Spatel erspüren kann. Während des Rastervorganges tastet also die beugungsbegrenzte Lichtnadel das Präparat ab.

2.5.3 Toroide Fokusformen

Das oben beschriebene beugungsbegrenzte Scheibchen kann man nur erzeugen, wenn das Licht homogen und ungestört in das Objektiv eintritt. Wird ein Teil des Lichtes aufgehalten (physikalisch: phasenverschoben), etwa indem es durch eine zusätzliche Strecke Glas hindurchtreten muss, wird die Form des Fokusscheibchens verändert. Normalerweise führt dies zu unerwünschten Abbildungsfehlern und Auflösungsverlusten. Es ist nun möglich, durch geeignete optische Elemente, sogenannte Phasenplatten, eine große Anzahl ganz verschiedener, aber genau definierter Fokusformen zu erzeugen. Auf Details dieses interessanten optischen Aspektes kann hier nicht eingegangen werden. Die für das STED-Verfahren interessante Fokusform ist ein Ring. Mittels einer geeigneten Phasenplatte kann tatsächlich ein (beugungsbegrenzter) Lichtring in der Fokusebene erzeugt werden. Die Mitte dieses Rings ist ein Punkt, der theoretisch völlig dunkel und unbeleuchtet bleibt. Der mittlere Durchmesser dieses Ringes hängt wieder von der Farbe, also der Wellenlänge des verwendeten Lichtes und der numerischen Apertur des Mikroskopobjektivs ab. Von der unbeleuchteten Mitte zum Durchmesser hin nimmt die Intensität in berechenbarer Weise zu.

2.5.4 Die Überschreitung der Auflösungsgrenze

Wie lässt sich nun mit den oben beschriebenen Komponenten ein System erzeugen, das eine Auflösung liefert, die höher ist als die Beugungsbegrenzung? Dazu muss die Lichtnadel kleiner gemacht werden, in diesem Falle also die Fläche der angeregten Moleküle. Dies kann man erreichen, indem man die Anregung löscht, bevor die Moleküle ein Fluoreszenzphoton abgeben konnten. Weil man den Radius der kreisförmigen Fläche verkleinern möchte, ist dies mit einem ringförmigen Fokus möglich, wenn die Farbe des Lichtes die oben beschriebene stimulierte Emission erlaubt. Also wird die Auflösung erfolgreich verbessert, wenn nach (bzw. schon zeitgleich mit der Anregung) das Anregungsscheibchen mit einem Ring überlagert wird, der die stimulierte Emission auslöst. Dieser kombinierte Fokus, das Anregungsscheibchen und der STED-Ring, werden simultan über die Probe bewegt, indem die Strahlen vor der Einkoppelung in die Raster Spiegel präzise überlagert werden. Diese Herausforderung wurde von Entwicklungsingenieuren meisterlich gelöst: eine automatische Justagevorrichtung entlastet den Benutzer von jeglicher Sorge um die Strahlkontrolle.

Ebenso, wie das Anregungsscheibchen in Wahrheit ein komplexes Muster vorstellt, aber sehr gut durch eine einfache Kreis-

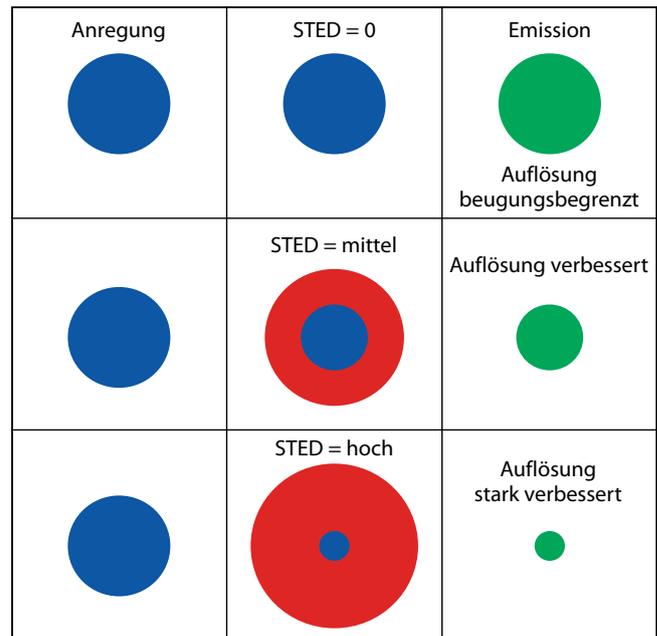


Abb. 2.16 Das Zusammenwirken der Strahlen im STED Mikroskop. Blau: das beugungsbegrenzte Anregungsscheibchen. Rot: der beugungsbegrenzte STED-Ring, dessen Dicke von der Intensität des STED-Strahls abhängt. Grün: die verkleinerte Fläche, aus der Fluoreszenzemission nachgewiesen wird: je intensiver der STED-Strahl, desto kleiner das Emissionsscheibchen und damit desto höher die Auflösung.

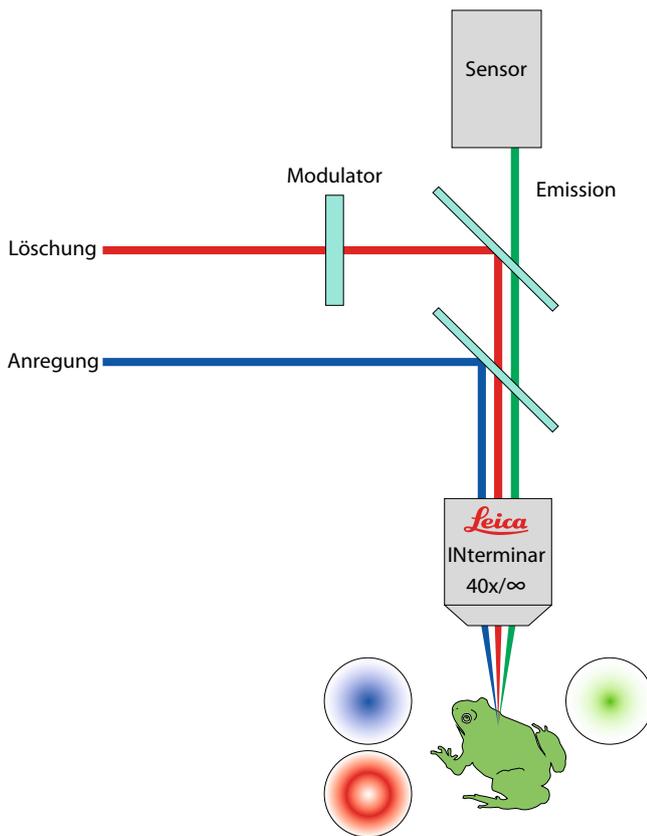
scheibe angenähert werden kann, lässt sich auch das komplex strukturierte Muster des STED-Strahls durch einen einfachen Ring mit einem mittleren Durchmesser und einer Dicke beschreiben. Der Durchmesser hängt nur von der Wellenlänge und der numerischen Apertur ab, die Dicke aber von der Intensität des STED-Lichtes. Je höher die Intensität, desto dicker wird der Ring, und desto kleiner das verbleibende innere Scheibchen. Theoretisch kann also durch genügend hohe Intensität des Lichtes, das die stimulierte Emission bewirkt, die verbleibende Fläche auf einen dimensionslosen Punkt reduziert werden. Das STED Verfahren ist damit inhärent von unbegrenzter Auflösung.

2.5.5 Lebendzell-STED-Mikroskopie

STED-Bilder entstehen durch unmittelbare Reduktion der fluoreszierenden Probenfläche. Man braucht also ein Feld nur einmal abzutasten und hat dann sofort ein Bild mit der gewünschten Auflösung. Vielfache Aufnahmen von partikulären Bildern, wie das bei anderen Superresolution-Verfahren, insbesondere in der Lokalisationsmikroskopie nötig ist, müssen nicht erstellt werden. Auch muss das Bild nicht erst mathematisch erzeugt werden, sondern entsteht sofort, sozusagen mit Lichtgeschwindigkeit. Neben gewöhnlichen fixierten Präparaten ist STED daher als echtes Superresolution-Verfahren auch für lebende Präparate, etwa Zellkulturen, Gewebeschnitte, Biopsien oder sogar lebende Säugetiere, geeignet.

Was benötigt wird, sind fluoreszierende Präparate. Die meisten gängigen Fluorochrome können verwendet werden, für Lebendzell-Aufnahmen werden fluoreszierende Proteine eingesetzt, oder andere Präparationen verwendet (z. B. Halo-Tag usf.). Eine ganze Reihe von binären Kombinationen von Flu-

oreszenzmarkern lassen sich mit derselben STED-Wellenlänge aufnehmen – gegebenenfalls bei gleichzeitiger Fluoreszenz-anregung mit verschiedenen Anregungsfarben. So sind auch zweifach-Färbungen mit gesicherter Kollokalisierung in höchster Auflösung möglich.

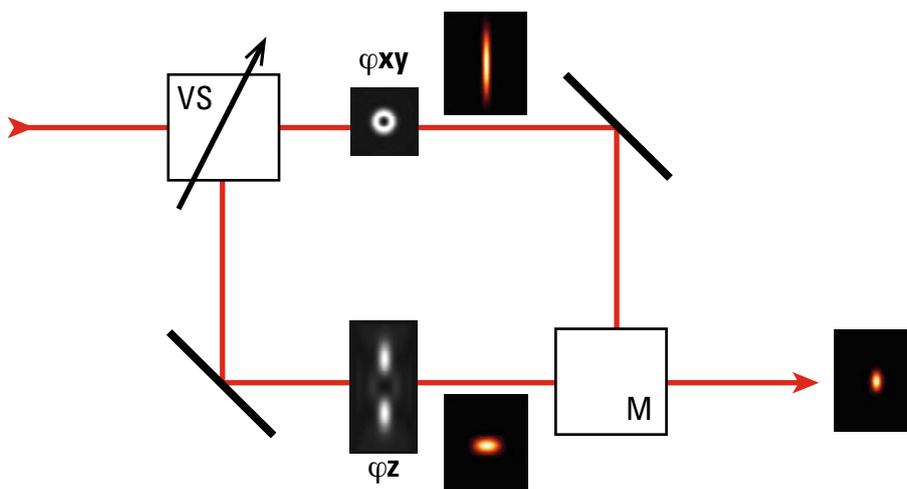


■ **Abb. 2.17** In einem STED-Mikroskop wird das Präparat mit zwei ko-axialen Strahlen beleuchtet: die Fluoreszenz-Anregung mit beugungsbegrenzter PSF aus einem Punkt, also dem Airy-Muster (hier in blau) und die STED-Löschung mit einer beugungsbegrenzten toroiden PSF (rot). Die Emission stammt aus einem Areal, das beliebig viel kleiner als die angeregte Fläche ist (grün).

2.5.6 3D-STED

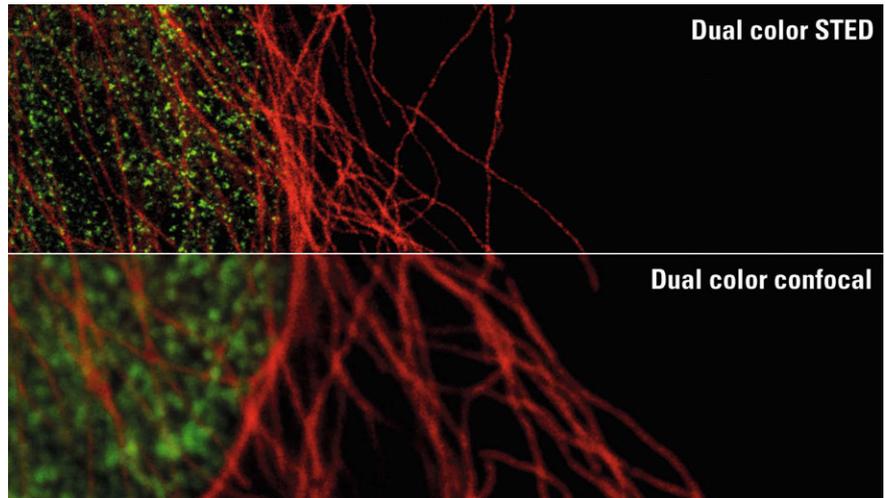
Das Ziel aller dieser Entwicklungen ist die unbegrenzte Auflösung sowohl axial als auch radial, ohne Einschränkungen der Feldgröße und des Arbeitsabstandes. Das STED-Verfahren erlaubt frei in das Präparat hineinzufokussieren (was bei TIRF nicht möglich ist), hat aber – in der Version für laterale Super-Auflösung – zunächst keine verbesserte Auflösung in der Tiefe. Ein ähnlicher Ansatz für unbegrenzte Auflösung in der z-Richtung lässt sich mit entsprechend geformten Phasenmodulatoren erzeugen, allerdings auf Kosten der lateralen Auflösung. Zur Lösung dieser Herausforderung wurde schließlich ein Modul entwickelt, das beide Verfahren harmonisch verknüpft. Der Strahl zur Löschung wird durch einen regelbaren Teiler in zwei Strahlen aufgespalten. Im ersten Teilstrahl führt man eine Vortex-Phasenmaske ein (das ist das Optimum für laterale Auflösungsverbesserung). Der andere Teilstrahl wird mit einer Phasenmaske versehen, die ideal für axiale Auflösungsverbesserung ist. Anschließend werden beide Strahlen wieder vereinigt, und man erhält eine Intensitätsverteilung, die einem hohlen Berliner Pfannkuchen ähnelt. Diese Struktur löscht nun angeregte Zustände in allen Richtungen um das Zentrum herum, wobei das Zentrum selbst freilich ausgespart bleibt. Durch den regelbaren Teiler kann man das Verhalten in xy- bzw. z-Richtung steuern und etwa für isomorphe Auflösung optimieren. Oder für kleinstes Volumen, oder für beste laterale oder axiale Auflösung. Das ursprüngliche Ziel, beugungsunbegrenzte Auflösung in allen Richtungen, bei freier Wahl der Tiefenschärfe, ist damit Wirklichkeit geworden.

Handelsübliche Geräte bieten zurzeit Auflösungen bestätigt unter 50 nm. Das ist vier- bis fünfmal besser als die beugungs-



■ **Abb. 2.18** Komposit-Strahlengang zur Erzeugung isomorpher Punktverwaschungsfunktionen von beliebiger Kleinheit. Licht zur Löschung der angeregten Zustände wird in zwei Teile aufgespalten. Die Teilung ist kontinuierlich regelbar (VS). Im oberen Teil wird ein Donut-Fokus (ϕ_{xy}) erzeugt, mit dem die laterale Auflösung beeinflusst wird. Ein Profil der PSF ist neben dem Strahl angedeutet. Im zweiten Teil wird ein z-Depletion-Fokus (ϕ_z) erzeugt, der die axiale Auflösung verbessert. Die Strahlen werden gemischt (M) und führen z. B. zu einer isotropen Emission.

Abb. 2.19 Oben eine Aufnahme mit gSTED und unten eine konfokale Aufnahme. Histone 3 in grün und Mikrotubuli in rot. HeLa Zellen angefärbt mit Chromeo 505 und BD HorizonV55. Obwohl die konfokale Aufnahme schon eine drastische Verbesserung zu einem gewöhnlichen Weitfeld-Fluoreszenzbild (ohne Abbildung) darstellt, ist der Gewinn durch STED enorm. Feine Strukturen werden erst hier sichtbar.



begrenzte Auflösung. Laborversionen unter Verwendung ausgefeilter Fluoreszenzmitter berichten Auflösungen von unter 3 nm mit einer Positionierungsgenauigkeit von 0,1 nm – was für eine Kombination von STED mit der Lokalisationsmikroskopie interessant wird. Da ständig neue Farbstoffe getestet und für die Verwendung gut befunden werden, lohnt es sich, die aktuellen Einsatzmöglichkeiten bei Leica Microsystems in Mannheim nachzufragen:

<http://www.leica-microsystems.com/products/confocal-microscopes/>

Die STED Mikroskopie ist erst wenige Jahre alt. Sicher werden in der nahen Zukunft noch spannende Neuerungen und Verbesserungen zu erwarten sein. Aktuell ist eine neue Variante verfügbar geworden: *gated*-STED. Dieses Verfahren kombiniert die oben beschriebene Auflösungsverbesserung mit der Auswahl von Fluoreszenzanregungen mit langer Lebensdauer. Ohne auf die Details einzugehen, sei hier angemerkt, dass lange Lebensdauern bevorzugt im Inneren der durch STED verkleinerten Anregungsscheibe vorkommen. Deshalb kann man durch Auswahl dieser Emissionen die „Lichtnadel“ weiter verkleinern.

2.5.7 Präparationshinweise

- Standard-Fluoreszenzfärbefahren sollen sorgfältig ausgeführt werden – höhere Auflösung erfordert hohe Qualität des Präparats
- Es muss sichergestellt werden, dass das Präparat nicht bei der Wellenlänge des STED-Lichts absorbiert
- Es sind vom Hersteller zugelassene STED-Objektive zu verwenden
- Die verwendeten Farbstoffe sollen an der Stelle der Depletion keine Absorption aufweisen.

Anleitung A2.1

Antikörperfärbung für STED

Alle Schritte der Färbeprozedur haben einen Einfluss auf das mikroskopische Ergebnis. Hier wird die Färbung am Beispiel von kultivierten Zellen erläutert – als Leitfaden für das eigene Färbeprotokoll, das für die STED Experimente verwendet werden soll.

Material:

- Phosphatpuffer (PBS), pH 7,4
- 2 % Paraformaldehyd (PFA) in PBS
- 0.1 % Triton X-100 in PBS
- Rinderserumalbumin (BSA)

Durchführung:

1. mit PBS 3x spülen
2. mit 2% PFA in PBS für 15 min fixieren
3. mit PBS 3x spülen
4. mit PBS 3x 5 min waschen
5. für 10 min mit 0,1 % Triton in PBS permeabilisieren
6. 3x spülen mit PBS
7. Blockieren mit 2% BSA in PBS für 1 Stunde
8. Inkubation mit dem primären Antikörper für 1 Stunde
9. mit PBS für 5 min 3x waschen
10. Inkubation mit dem sekundären Antikörper für 1 Stunde
11. 3x waschen mit PBS für 5 min
12. auf Objektträger aufziehen und abdecken
13. Lagerung bei 4° C

Genauere Beschreibungen und Erläuterungen für die einzelnen Schritte sind zu finden unter:

<http://www.leica-microsystems.com/science-lab/quick-guide-to-sted-sample-preparation/>

2.6 Literatur

- Ash EA, Nicholls G (1972) Super-resolution aperture scanning microscope. *Nature* 237: 510–513
- Bates M, Huang B, Dempsey GT, Zhuang X (2007) Multicolor super-resolution imaging with photo switchable fluorescent probes. *Science* 317: 1749–1753
- Benke A, Manley S (2012) Live-cell dSTORM of cellular DNA based on direct DNA labeling. *ChemBioChem* 13 (2): 298–301
- Berning S, Willig KI, Steffens H, Gregor C, Herholt A, Rossner MJ, Hell SW (2012) Nanoscopy in a living mouse brain. *Science* 335 (3): 551
- Dempsey GT, Vaughan J, Chen K, Bates M, Zhuang X (2011) Evaluation of fluorophores for optimal performance in localization-based superresolution imaging. *Nat. Methods* 8: 1027–1036
- Gustafsson MGL (2000). Surpassing the lateral resolution limit by a factor of two using structured illumination microscopy. *J. Microsc.* 198: 82–87.
- Hell SW, Stelzer EHK (1992) Fundamental improvement of resolution with a 4Pi-confocal fluorescence microscope using two-photon excitation. *Opt. Commun.* 93: 277–282.
- Hell SW, Wichmann J (1994) Breaking the diffraction resolution limit by stimulated emission: stimulated-emission-depletion fluorescence microscopy. *Opt. Lett.* 19 (11): 780–782
- Heilemann M, van de Linde S, Mukherjee A, Sauer M (2009) Super-resolution imaging with small organic fluorophores. *Angew. Chem. Int. Ed.* 48: 6903–6908
- Heilemann M, van de Linde S, Schuttpelz M, Kasper R, Seefeldt B, Mukherjee A, Tinnefeld P, Sauer M (2008) Subdiffraction-resolution fluorescence imaging with conventional fluorescent probes. *Angew. Chem. Int. Ed.* 47: 6172–6176.
- Huang B, Wang W, Bates M, Zhuang X (2008) Three-dimensional superresolution imaging by stochastic optical reconstruction microscopy. *Science* 319: 810–813
- Jones S, Shim SH, He J, Zhuang X (2011) Fast, three-dimensional super-resolution imaging of live cells. *Nat. Methods* 8: 499–505
- Klein T, Löschberger A, Proppert S, Wolter S, van de Linde S, Sauer M (2011) Live-cell dSTORM with SNAP-tag fusion proteins. *Nat. Methods* 8: 7–9
- Nassenstein H (1970) Superresolution by diffraction of subwaves. *Opt. Comm.* 2: 231–234
- Rust MJ, Bates M, Zhuang X (2006) Sub-diffraction-limit imaging by stochastic optical reconstruction microscopy (STORM). *Nat. Methods* 3: 793–795
- Schermelleh L, Carlton PM, Haase S, Shao L, Winoto L, Kner P, Burke B, Cardoso MC, Agard DA, Gustafsson MGL, Leonhardt H and Sedat JW (2008). Subdiffraction multicolor imaging of the nuclear periphery with 3D structured illumination microscopy. *Science* 320: 1332–1336.
- van de Linde S, Heilemann M, Sauer M (2012) Live-cell super-resolution imaging with synthetic fluorophores. *Annu. Rev. Phys. Chem.* 63: 519–540
- van de Linde S, Löschberger A, Klein T, Heidbreder M, Wolter S, Heilemann M, Sauer M (2011) Direct stochastic optical reconstruction microscopy with standard fluorescent probes. *Nat. Protoc.* 6 (7): 991–1009
- Vicidomini G, Moneron G, Han KY, Westphal V, Ta H, Reuss M, Engelhardt J, Eggeling C, Hell SW (2011) Sharper low-power STED nanoscopy by time gating. *Nat. Methods* 8: 571–573
- Vogelsang J, Cordes T, Forthmann C, Steinhauer C, Tinnefeld P (2009) Controlling the fluorescence of ordinary oxazine dyes for single-molecule switching and superresolution microscopy. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 106 (20): 8107–8112
- Wildanger D, Patton BR, Schill H, Marseglia L, Hadden JP, Knauer S, Schönle A, Rarity JG, O'Brien JL, Hell SW, Smith JM (2012) Solid immersion facilitates fluorescence microscopy with nanometer resolution and sub-ångström emitter localization. *Adv. Mater.* 24: OP309–OP313
- Wombacher R, Heidbreder M, van de Linde S, Sheetz MP, Heilemann M, Cornish VW, Sauer M (2010) Live-cell super-resolution imaging with trime-thoprim conjugates. *Nat. Methods* 7: 717–719



<http://www.springer.com/978-3-642-55189-5>

Romeis - Mikroskopische Technik

Mulisch, M.; Welsch, U. (Hrsg.)

2015, XVIII, 603 S. 100 Abb. in Farbe., Hardcover

ISBN: 978-3-642-55189-5