

Olympus cell[^]R – Ein Imaging System für die biomedizinische Forschung

Joachim Ubl

Olympus Biosystems GmbH, D-Planegg

Zusammenfassung

Die moderne Zellbiologie bedient sich verschiedener Methoden, um die Funktionsweise der Zelle zu erforschen. Ein tieferes Verständnis der zellulären Maschinerie ermöglicht es, physiologische bzw. pathophysiologische Zusammenhänge besser zu verstehen. Zelluläre Prozesse sind dynamisch, deswegen ist es notwendig, die physiologische Funktion und Wirkungsweise von Biomolekülen bzw. die Interaktion der Biomoleküle zu untersuchen. Diese Untersuchungen müssen an lebenden Zellen unter physiologisch relevanten Konditionen durchgeführt werden.

Für diese neue Herausforderung entwickelte Olympus die cell Familie, *analySIS[^]B*, *analySIS[^]D*, *cell[^]M* und *cell[^]R*, eine Familie von „Imaging“ Systemen für alle Fluoreszenzmikroskopischen Anwendungen im Bereich der zellulären, molekularen Biologie, eingebettet in eine benutzerfreundliche Softwareumgebung. *analySIS[^]B* ist die Einsteigerplattform, während *cell[^]R* das komplexeste System darstellt und die enormen Anforderungen an die Durchführung von Echtzeitexperimenten erfüllt. Analog einer echten Familie, ähneln sich die Familienmitglieder in ihrem Erscheinungsbild. Sie alle haben dasselbe „look & feel“ und sind gegenseitig aufrüst- bzw. erweiterbar.

Keywords: live cell imaging, fluorescence microscopy, FRET, TIRFM, spectral unmixing

1 Einleitung

In den letzten Jahren wurden viele Genprodukte durch die Sequenzierung kompletter Genome erfolgreich katalogisiert, sowie Protein-Expressionsmuster in unterschiedlichen Geweben unter verschiedenen Bedingungen identifiziert. Eine vordringliche Aufgabe der biomedizinischen Forschung ist es nun, die Funktionsweise der Genprodukte (Proteine) und deren Zusammenspiel untereinander und mit anderen Biomolekülen (Nukleinsäuren, Kohlenhydra-

ten, Lipiden) aufzuklären, um zu verstehen, wie das Genom die Funktionsweise von Zellen bestimmt, wie durch das Zusammenspiel von Zellen ein Organismus funktioniert und wie zelluläre Fehlfunktionen Krankheiten verursachen. Zelluläre Prozesse sind dynamisch, deswegen sind Methoden notwendig, die es ermöglichen, diese dynamischen Prozesse zu beobachten und zu untersuchen. Eine dieser Methoden ist die moderne Lichtmikroskopie und im Speziellen die Fluoreszenzmikroskopie. Die Markierung spezifischer zellulärer

Strukturen bzw. Moleküle durch Farbstoffe, die direkt mit den Strukturen interagieren, oder indirekt durch an Antikörper-gekoppelte Farbstoffe ist seit langem ein wichtiger Bestandteil zellbiologischer Untersuchungen. Der Nachteil dieser Methoden ist es, dass sie im Allgemeinen nur an fixierten Zellen durchgeführt werden können. Diese Bilder stellen somit nur Momentaufnahmen der dynamischen zellulären Prozesse dar. Jedoch gab es in den letzten Jahren eine rasante Entwicklung im Bereich der Mikroskopie. Durch die tech-

Summary: Olympus cell[^]R – imaging station for life science

Modern cell biology makes use of a variety of methods to investigate how cells function. A better knowledge on the cellular machinery opens the door for a better understanding of physiological and pathophysiological interactions. Cellular processes are dynamic; therefore it is necessary to investigate the physiological function and the mode of action of biomolecules, as well as the interaction of biomolecules. Such experiments have to be performed on living cells under physiologically relevant conditions.

Taking up this challenge, Olympus developed the cell family – *analySIS[^]B*, *analySIS[^]D*, *cell[^]M* and *cell[^]R* – a family of imaging stations with user-friendly software environments for all fluorescence microscopy applications in the field of cell and molecular biology. *analySIS[^]B* is the basic platform while *cell[^]R* is the most extensive system, meeting the most demanding requirements for experiments in real time. Just like a real-life family, the members of this product family resemble one another in appearance. They all have the same “look & feel” and the packages are mutually upgradeable.

nische Verbesserung digitaler bildgebender Verfahren in der Mikroskopie, gepaart mit der Entwicklung neuer Fluoreszenzfarbstoffe bzw. fluoreszierender Proteine, ist es nun möglich, dynamische Prozesse in lebenden Zellen in Echtzeit zu untersuchen (Miyawaki, et al., 2003). Es ist jedoch ungenügend, nur die zeitlichen Änderungen eines Fluoreszenzsignals in einer optischen Ebene aufzuzeichnen, um die zellulären Zusammenhänge zu entschlüsseln (Gerlich und Ellenberg, 2003). Vielmehr ist es notwendig, dreidimensionale Bilder von z.T. mehrfach gefärbten Zellen in Kultur unter physiologischen Bedingungen über die Zeit aufzunehmen und sowohl qualitativ als auch quantitativ zu analysieren. Die Durchführung solcher komplexer Experimente ist nur mit Hilfe moderner Mikroskope und der entsprechenden Hard- und Software für die Aufnahme, Speicherung und Analyse der Bilder möglich.

Life Cell Imaging Systeme eröffnen die Möglichkeit dynamische zelluläre Prozesse in der Zellkultur unter Verzicht auf Tierexperimente zu studieren und neue Erkenntnisse über die Vielfalt der Organisationsprinzipien der Zelle zu gewinnen.

2 Die Olympus cell^Familie – Eine Produktfamilie für die digitale Weitfeld-Mikroskopie

Die Olympus cell^Familie umfasst momentan vier verschiedene Systeme für die mikroskopische Bildverarbeitung,

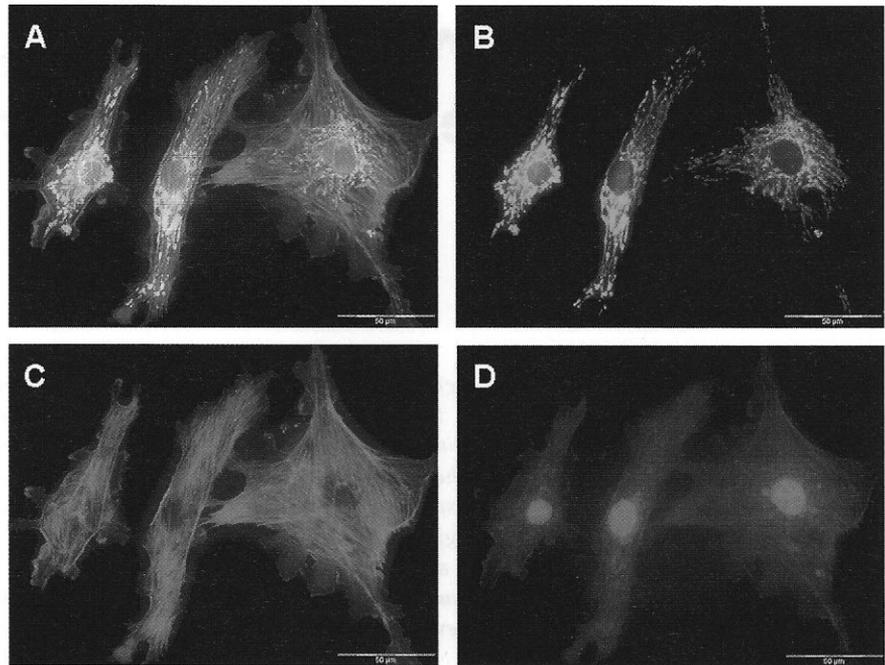


Abb 1: Histochemie – Mehrfach gefärbte Endothelzellen

Die Abbildung zeigt mehrfach gefärbte Endothelzellen (A). Die Zellen wurden mit einem für Mitochondrien spezifischen Farbstoff (MitoTracker® Red CMXRos) markiert (B) und dann fixiert, permeabilisiert und mit BODIPY® FL phalloidin spezifisch für F-Aktin (C) und DAPI für die Zellkerne (D) markiert. Die Probe stammt von der Fa. Molecular Probes, FluoCells® prepared slide #1.

analysis^B, analysis^D, cell^M and cell^R. Warum verschiedene Imaging Systeme? Der Einsatzbereich von Mikroskopen reicht von einfachen morphologischen, diagnostischen Untersuchungen, z.B. in der Pathologie, bis hin zu sehr komplexen Untersuchungen an lebenden Zellen in der biomedizinischen Grundla-

genforschung. D.h. auch die technischen Anforderungen für die entsprechenden Anwendungen variieren in ihrer Komplexität. Um dies zu verdeutlichen, sollen im Folgenden verschiedene Applikationen und die daraus resultierenden spezifischen technischen Anforderungen aufgezeigt werden.

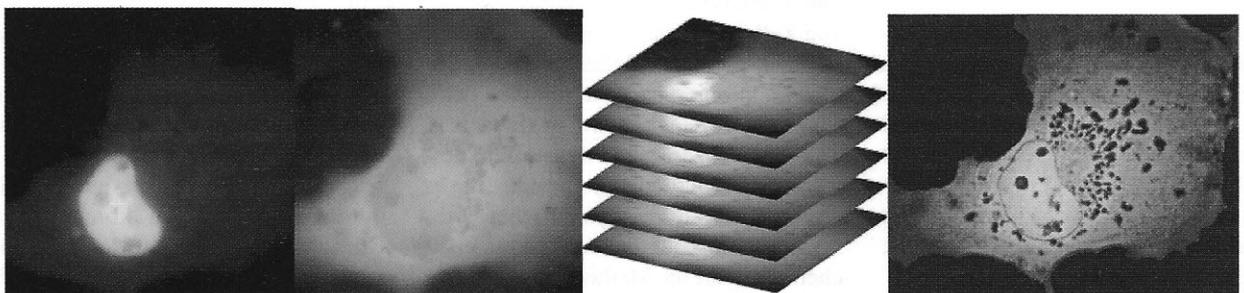


Abb. 2: Histochemie – Dreidimensionale Bildaufnahme

Die Abbildung zeigt COS-1 Zellen transfiziert mit pEYFP-GRP und pECFP GK-L58R/N204Y. Von links nach rechts dargestellt sind die YFP Markierung, die CFP Markierung, Mehrfarbenbildstapel, Mehrfarbenbild nach Dekonvolution. Die Bilder wurden freundlicherweise von Simone Baltrusch / Sigurd Lenzen, Institut für klinische Biochemie, Medizinische Hochschule Hannover zur Verfügung gestellt.

2.1 Histochemie

Die Histochemie ist eine Standardmethode im Bereich der Histologie und Pathologie. Für diagnostische Untersuchungen werden hierbei fixierte und angefärbte Zellen bzw. Gewebeprobe im Durchlicht mit verschiedenen Kontrastverfahren oder im Fluoreszenzmodus untersucht. Um vergleichbare Ergebnisse für die Diagnose zu erhalten, sind die verwendeten Methoden häufig standardisiert. Um das Arbeiten in der Routine zu vereinfachen, werden häufig motorisierte Mikroskope eingesetzt. Für diesen Einsatzbereich sollte das System nicht nur in der Lage sein, Bilder aufzunehmen, zu analysieren und zu archivieren, sondern auch die motorisierten Komponenten des Mikroskops in die Bildaufnahme zu integrieren, um vordefinierte Mikroskopeinstellungen für die entsprechende Beobachtungsmethode verwenden zu können.

2.2 Immunhistochemie

Immunhistochemische Methoden sind ein weitverbreitetes Werkzeug sowohl in der Grundlagenforschung, als auch in der Diagnostik. Durch die Verwendung von spezifischen Antikörper können die zellulären Strukturen bzw. Biomoleküle von Interesse spezifisch markiert werden. Die so markierten Strukturen können durch eine anschließende Farb-reaktion oder einen zweiten fluoreszenzmarkierten Antikörper sichtbar gemacht werden. Durch die unterschiedliche Fluoreszenzmarkierung unterschiedlicher Strukturen lässt sich deren Lokalisation in einer Zelle untersuchen. Für eine solche Anwendung muss ein Imaging System neben den einzelnen Bildern auch Mehrfarbenbilder aufnehmen können, d.h. die für den verwendeten Fluoreszenzfarbstoff entsprechenden Filtereinstellungen zur Aufnahme des entsprechenden Farbkanals vornehmen. Auch steigen die Anforderungen zur Darstellung (Darstellung der einzelnen Farbkanäle, plus des Überlagerungsbildes) und Auswertung der Bilddaten (z.B. Co-Lokalisation) für diese Anwendungen (Abb. 1). Biologisches Material ist nicht zwei- sondern dreidimensional. Um ein dreidimensionales Bild von der Zelle zu bekommen, müssen die markierten Strukturen nicht nur in einer Ebene,

sondern zusätzlich in verschiedenen Fokus(z)-ebenen, untersucht werden. Durch die Verwendung von motorisierten Mikroskopen können mit Hilfe der Imaging Software verschiedene Fokusebenen (z-Stapel) aufgenommen und entsprechend analysiert werden (Abb. 2).

2.3 Life cell imaging

Die bisher beschriebenen Methoden zeigen jedoch nur Momentaufnahmen zellulärer Prozesse. Physiologische Vorgänge sind dynamisch. D.h. man ist nicht nur an räumlichen Interaktionen von Strukturen, Biomolekülen und physiologisch relevanten Ionen, wie z.B. Kalzium, oder Protonen, interessiert, sondern auch an der zeitlichen Änderung dieser physiologischen Wechselwirkungen. Hierfür nun müssen Bilder (Einzel- oder Mehrfarbenbilder), in einer Z-Ebene oder auch als ganzer Z-Stapel, nacheinander zu verschiedenen Zeitpunkten aufgenommen werden. Die Zeitskala kann dabei von Stunden, wie etwa bei Differenzierungsprozessen oder Zellmigrationsstudien, über Minuten, wie etwa bei der Mitose (Abb. 3), bis in den Millisekundenbereich, wie etwa bei Änderungen der Kalziumkonzentration während der Muskelkontraktionen, variieren. Und somit sind wir beim sogenannten „Life Cell Imaging“ angelangt, bei dem dynamische Prozesse an lebenden Zellen in Kultur mit Hilfe mikroskopischer Methoden untersucht werden können. Beim „Life Cell Imaging“ werden somit nicht mehr nur zweidimensionale, sondern mehrdimensionale Bilder aufgenommen.

Fasst man das Beschriebene zusammen, wird deutlich, dass in Abhängigkeit von den Anwendungen die Anforderungen, die an ein Imaging System gestellt werden, sehr unterschiedlich sind. So variieren je nach Anwendung die Dimensionen der aufgenommenen Bilder von einfachen Bildern bis zu dreidimensionalen Mehrfarbenbildern, die zusätzlich zu unterschiedlichen definierten Zeitpunkten aufgenommen werden (Abb. 4). Dabei hängt die Zeitskala von der Geschwindigkeit der zu untersuchenden zellulären Vorgänge ab. Auch die Anforderungen an die Genauigkeit der experimentellen Abläufe ist für jede Anwendung unterschiedlich. Nicht zuletzt ist auch die Komplexität der Experimente

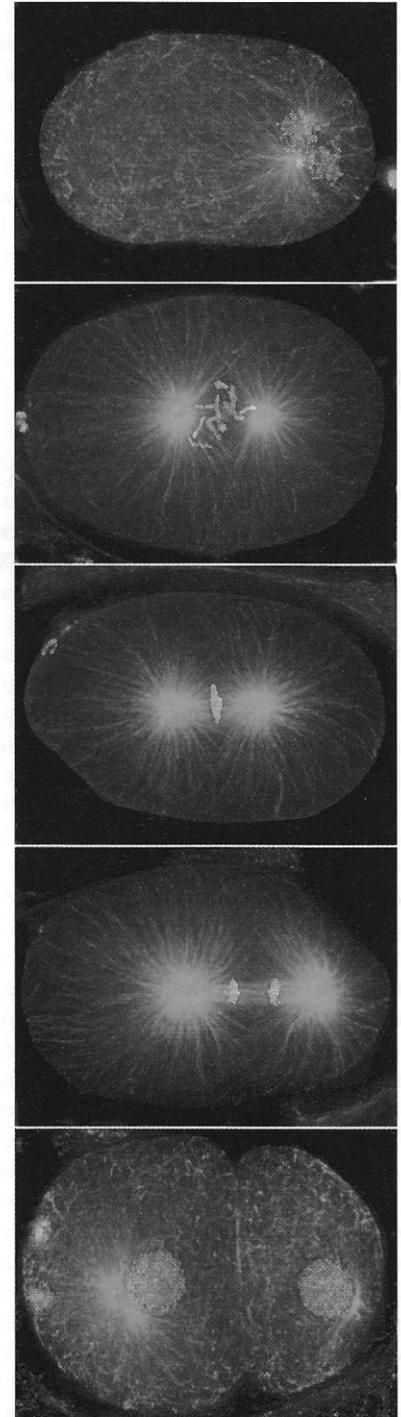


Abb. 3: Zellteilung

Die Bildfolge zeigt verschiedene Stadien der Zellteilung in *C. elegans* Embryo. Die DNA ist in Blau dargestellt (DAPI-Färbung) und die Mikrotubuli in Rot. Die Bilder wurden freundlicherweise von Karen Oegema aus dem Labor von Tony Hyman, MPR-CBG, Dresden zur Verfügung gestellt.

unterschiedlich. So muss z.B. bei Untersuchungen zur Signaltransduktion die Bildaufnahme mit der Stimulation der Zelle, sei es durch Zugabe von Pharmaka oder durch elektrische Stimulation, synchronisiert werden können. Im Allgemeinen kann man sagen, dass mit Zunahme der Komplexität der Anwendungen auch die Anforderungen an die Arbeitsplattform steigen.

3 Olympus cell[^]R – Imaging Plattform für Life Cell Imaging

cell[^]R ist eine modulare „Imaging“-Plattform für ein breites Spektrum biomedizinischer Applikationen mit den Olympus Mikroskopen der IX und BX Serie, die das Herzstück eines solchen Systems bilden (Abb. 5). Das cell[^]R System wurde konzipiert, um den Arbeitsablauf der verschiedenen Komponenten eines solchen Systems optimal aufeinander abzustimmen. Welches sind die speziellen Anforderungen an eine Imaging Plattform für Lebendzellbeobachtungen? Eine Grundvoraussetzung ist eine optimale Belichtung der Zellen sowohl hinsichtlich der Dauer der Belichtung, d.h. idealerweise nur für die Dauer der Bildakquisition, als auch der Intensität des Lichtes. Ziel sollte es sein, die Zelle nur solange und so stark zu belichten, um ein gutes Fluoreszenzsignal zu erhalten. So wird vermieden, dass durch übermäßige Belichtung der Farbstoff ausbleicht und phototoxische, zellschädigende Produkte entstehen können. Ferner muss zur Aufnahme von Mehrfarbenbildern ein schneller Wechsel der Anregungswellenlänge gewährleistet sein. Aus diesem Grund wurde ein Beleuchtungssystem (MT-20) entwickelt, das nicht nur eine Lichtquelle darstellt, sondern auch speziell für schnelle Wechsel der Anregungswellenlänge und der schnellen Änderung der Lichtintensität konzipiert ist. Durch einen integrierten schnellen Shutter (< 1ms Verschlusszeit) kann die Belichtung der Probe effizient und schnell reguliert werden. Somit erfüllt dieses Beleuchtungssystem die Voraussetzungen zur Durchführung von Experimenten in Echtzeit unter Verwendung von hochsensitiven Digitalkameras.

Das Beleuchtungssystem ist vom Mikroskop getrennt, um mechanische (Erschütterungen z.B. durch die Filtrerradbewegung) und thermische Störungen während der Bildaufnahme zu verhindern. Die Einkopplung ins Mikroskop erfolgt über einen Quarzlichtleiter via eines optimal auf die Optik des Mikroskops abgestimmten Kondensors. Um eine gleichmäßige und gute Ausleuchtung der Probe zu gewährleisten, wurde die Einkopplung als kritische Beleuchtung gestaltet. Ferner wird die Probe nur ent-

sprechend der Größe des CCD Kamera Chips ausgeleuchtet. Dadurch wird nur der für die Bildakquisition relevante Bereich belichtet und der Rest der Probe geschont.

Für die Aufnahme von dreidimensionalen Bildern ist eine exakte Positionierung der Fokusebene notwendig. Für den Fall, daß zusätzlich zeitliche Änderungen untersucht werden sollen, muss die Positionierung auch reproduzierbar sein. Im Falle eines motorisierten Mikroskops kann dies durch den integrierten motori-

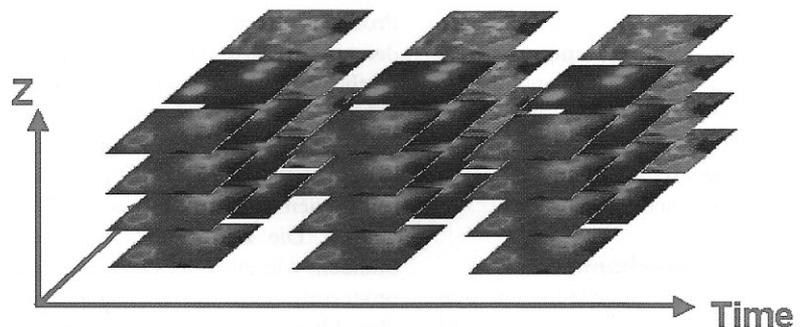


Abb. 4: Technische Abstraktion einer mehrdimensionalen Bildaufnahme

Symbolisch dargestellt ist eine mehrdimensionale Bildaufnahme einer mehrfach gefärbten Probe, in verschiedenen Fokusebenen (Z) und zu verschiedenen definierten Zeitpunkten (Time).

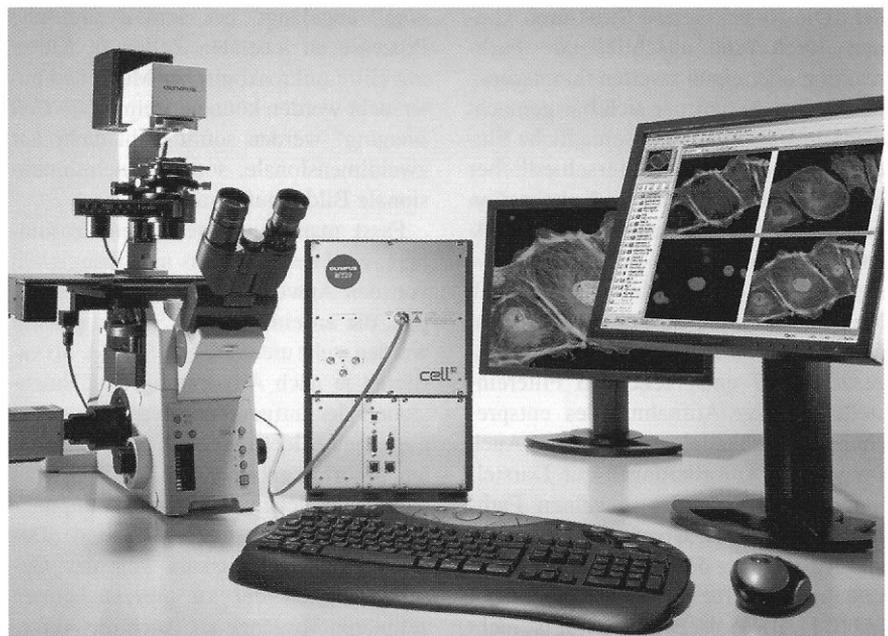


Abb. 5: cell[^]R System

Die Abbildung zeigt den Aufbau eines cell[^]R Systems, mit Mikroskop, der Beleuchtungseinheit (MT-20), der Fasereinkopplung ins Mikroskop und der Imaging-PC Monitore (der PC selbst ist nicht dargestellt).

sierten Fokustrieb erfolgen. Bei nicht-motorisierten Mikroskopen kann hierfür ein piezoelektrischen Nanopositionierer (PIFOC®) verwendet werden, der zwischen Objektiv und Objektivrevolver geschraubt wird und mit hoher Reproduzierbarkeit das Objektiv über eine Gesamtlänge von 100 µm mit einer minimalen Schrittgröße von 0.01 µm bewegen kann.

Aus den bisher beschriebenen Aufgaben wird eine weitere kritische Anforderung an ein Imaging System deutlich. Die verschiedenen Hardwarekomponenten müssen optimal aufeinander abgestimmt sein, um solch komplexe Aufgaben lösen zu können. Beim cell^{AR} System ist die komplette Hardware, einschließlich externer Geräte durch einen extrem präzisen Echtzeitcontroller synchronisiert. Dies gewährleistet die größtmögliche zeitliche Genauigkeit. Diese hohe zeitliche Synchronisation der Bildaufnahme, zusammen mit der optimalen Ausleuchtung der Proben, ist eine Grundvoraussetzung für quantitative Fluoreszenzmessungen.

Die Schnittstelle zwischen der Ansteuerung der verschiedenen Systemkomponenten und dem Experimentator stellt die Software dar. Die cell^{AR} Software ist eine leistungsstarke und umfassende Plattform, die eine intuitive und benutzerfreundliche graphische Oberfläche beinhaltet. Bei der Entwicklung wurde besonders darauf geachtet, selbst komplexe Experimente auf eine effiziente und bequeme Art zu generieren.

Im Folgenden sollen einige Anwendungen der modernen Fluoreszenzmikroskopie dargestellt werden.

3.1 Fluoreszenz-basierte Messung der intrazellulären Ca^{2+} Konzentration – Ca^{2+} Imaging

Untersuchungen zur Dynamik der intrazellulären Ca^{2+} Konzentration ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) sind ein wichtiger Teil der biowissenschaftlichen Forschung. Die Änderungen der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ spielt eine zentrale Rolle sowohl bei physiologischen als auch bei pathophysiologischen Prozessen. Durch Stimulation der Zelle ändert sich die $[\text{Ca}^{2+}]_i$ im Zytoplasma bzw. in Zellorganellen (Endoplasmatisches Reticulum, Mitochondrien) in charakteristischer

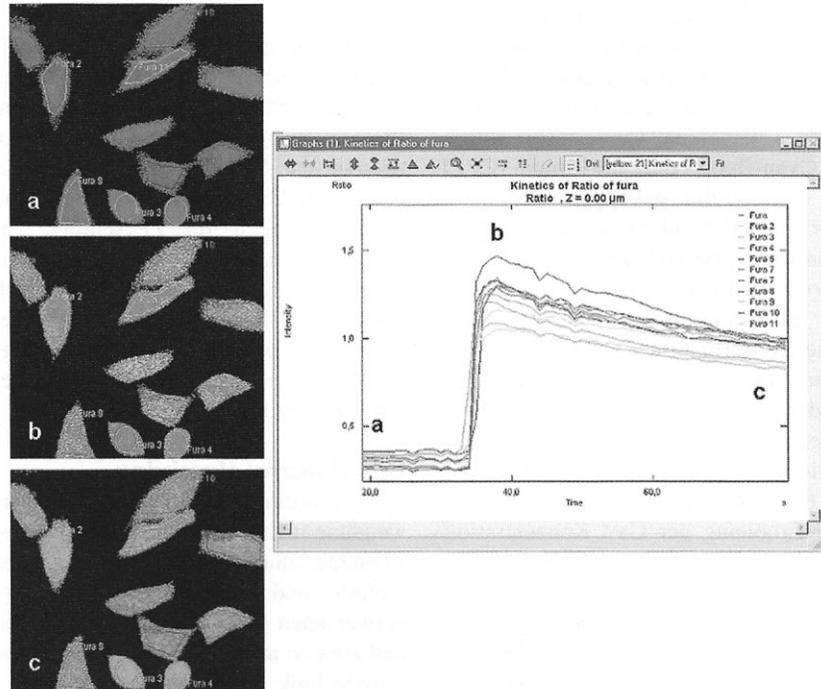


Abb. 6: Ca^{2+} Messung mit dem Indikatorfarbstoff Fura-2

HeLa Zellen wurden mit Fura-2 beladen. Die Abbildung zeigt das Verhältnis der Fluoreszenzintensitäten gemessen bei 340 nm/380 nm. Die Darstellung erfolgt in Form einer sog. „Look-up-table“ bei der Intensitätswerte einer bestimmten Farbe zugeordnet sind, wobei blau geringen und rot hohen Intensitäten (= Maß für die intrazelluläre $[\text{Ca}^{2+}]_i$) entsprechen. a, b, und c zeigen Ratio-Bilder, die zu den entsprechenden in der Graphik gekennzeichneten Zeitpunkten aufgenommen wurden. Die Graphik zeigt die Änderung der Ratio (340 nm/380 nm) über die Zeit in den gekennzeichneten Regionen (sog. ROIs = *regions of interest*).

Weise. Dabei bestimmt die Art und Weise der zeitlichen und räumlichen Änderungen der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ die induzierte Zellantwort (Berridge et al., 2000). Wie können diese Änderungen gemessen werden? Einen Überblick über aktuell verwendete Ca^{2+} Sensoren bietet der Übersichtsartikel von Rudolf et al. (2003). Im Folgenden wird nur auf zwei Ca^{2+} Indikatoren, nämlich Fura-2 und „Chameleon“ (ein Protein-basierter Indikator), eingegangen, weil diese auch die technischen Anforderungen an ein Imaging System für diese Art der Messungen verdeutlichen. Fura-2 ist ein sogenannter ratiometrischer Fluoreszenzindikator. In Abhängigkeit von der Ca^{2+} Konzentration ändert sich die Intensität des emittierten Lichts von Fura2 bei Anregung mit 340 nm und 380 nm in der Art, dass mit Zunahme der Ca^{2+} Konzentration die Intensität bei 340 nm zunimmt und bei 380 nm abnimmt. Die

Ca^{2+} Konzentration wird als Änderung des Verhältnisses der Fluoreszenzintensitäten 340nm/380nm gemessen. Der Vorteil dieser ratiometrischen Methode liegt darin, dass durch Messung des Verhältnisses der Fluoreszenzintensitäten die Messgröße von der Farbstoffkonzentration unabhängig wird (Abb. 6) Diese Methode setzt jedoch voraus, dass zwischen den zwei Anregungswellenlängen schnell gewechselt werden kann und die Bilddaten zu exakt definierten Zeitpunkten aufgenommen werden. Der Protein-basierte Ca^{2+} Sensor „Chameleon“ nutzt eine physikalische Eigenheit zweier Fluorochrome mit überlappenden Spektren aus. Überlappen sich das Emissionsspektrum eines Farbstoffes mit dem Excitationsspektrum des anderen, so kann nach Anregung des Farbstoffes mit der kürzeren Wellenlänge bei einer engen räumlichen Nachbarschaft die Energie auf den zweiten Farbstoff

übertragen werden, wodurch dieser angeregt wird. Dieses Phänomen wird als *Fluorescence Resonance Energy Transfer* (FRET) bezeichnet (Abb. 7). Im Falle des „Chameleon“ Ca^{2+} Sensors wurde das Cyan-fluoreszierende Protein (CFP) mit Calmodulin gekoppelt und dann über eine Verbindungssequenz an das Grün-fluoreszierende Protein (GFP) gekoppelt (Rudolf et al., 2003). Bindet Ca^{2+} an Calmodulin, so ändert dieses seine Konformation. Durch das Design dieses Fusionsproteins induziert die Bindung von Ca^{2+} eine Konformationsänderung, die CFP und GFP in eine räumliche Nachbarschaft bringt und somit ein FRET-Signal induziert. Somit kann eine Erhöhung der Ca^{2+} Konzentration durch die Abnahme der CFP Fluoreszenz und der Zunahme von FRET (gemessen als GFP-Fluoreszenz nach CFP Anregung) gemessen werden. Ein Vorteil von Protein-basierten Ca^{2+} Sensoren liegt darin, dass mit Hilfe der Methoden der modernen Zellbiologie diese Proteine noch mit spezifischen „Tags“ versehen werden können, wodurch dieses nur in den entsprechenden Zellorganellen, z.B. Mitochondrien, Endoplasmatisches Reticulum, exprimiert werden, um spezifisch die Änderungen der Ca^{2+} Konzentration in diesen zu messen.

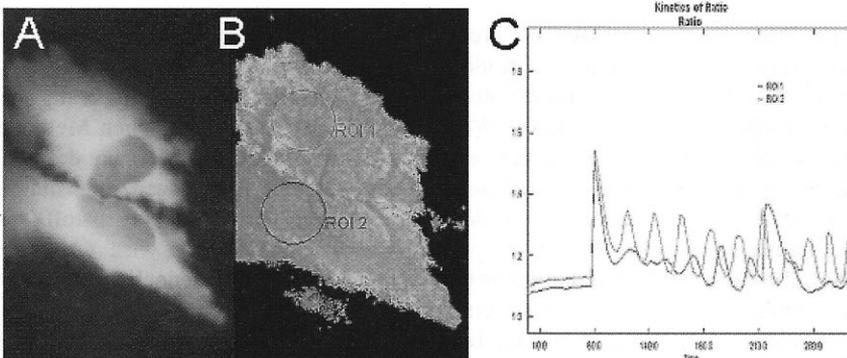


Abb. 7: FRET-basierte Ca^{2+} Messung

HeLa Zellen wurden mit dem Ca^{2+} -Indikatorprotein „CFP/YFP Chameleon“ transfiziert und mit Histamin stimuliert. (A) Die Messung der intrazellulären $[\text{Ca}^{2+}]_i$ erfolgt durch Anregung des CFP und Messung der CFP und YFP Fluoreszenz. Die CFP/YFP Emission wurde mit einem Dual-View™ Micro-Imager aufgenommen. Durch Bindung von Ca^{2+} an das Protein und der dadurch induzierten Konformationsänderung wird FRET induziert. Zur Quantifizierung wird das Verhältnis der CFP (kein FRET) und YFP (FRET) Fluoreszenz gemessen. (B) Farbcodierte Darstellung des Intensitätsverhältnisses der CFP/YFP Fluoreszenz (= CFP/YFP Ratio). (C) Kinetik der Änderung der CFP/YFP Ratio in den markierten ROIs durch Änderung der intrazellulären $[\text{Ca}^{2+}]_i$. Die Bilder wurden freundlicherweise von Hideaki Mizuno and Atsushi Miyawaki, Brain Science Institute, RIKEN, Wako, Saitama, Japan zur Verfügung gestellt.

Aufgrund der Eigenschaft, dass FRET nur bei unmittelbarer Nachbarschaft zweier Fluorochrome stattfindet, eignet sich diese Methode besonders gut, um Protein-Protein Wechselwirkungen zu untersuchen. Weitere Anwendungen mit einer „Life Cell Imaging“ Plattform sind Untersuchungen zur Zellteilung, zur Zellmigration, wie z.B. bei der Wundheilung oder der Metastasenbildung. Auch können die dynamischen Prozesse der Exo- bzw. Endozytose mit den beteiligten Strukturen an der lebenden Zelle beobachtet werden.

3.2 Spectral Unmixing

Ein weitverbreitetes Problem bei der Verwendung mehrerer Farbstoffe ist das sogenannte „durchbluten“. D.h. die Anregungs- und Emissionsspektren der verwendeten Farbstoffe überlagern sich und können auch mit Hilfe der neuesten Filtertechnik nicht sauber voneinander getrennt werden (Abb. 8). Ein Beispiel hierfür sind die in der Zellbiologie häufig verwendeten fluoreszierenden Proteine GFP und YFP. Die Konsequenz ist, dass jeder Farbkanal auch Information des jeweils anderen Kanals enthält, was zu Fehlinterpretationen führen kann. Mit Hilfe des „Spectral Unmixing“ Moduls der cell^R Software kann jedoch dieser

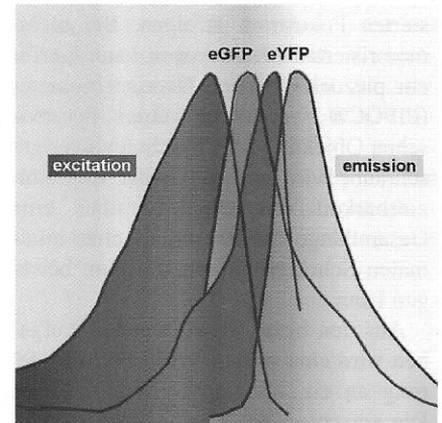


Abb. 8: GFP und YFP Excitations- und Emissionsspektren

Die Abbildung zeigt die Überlagerung der Exzitations- und Emissionsspektren der fluoreszierenden Proteine GFP und YFP.

Fehler korrigiert werden. Wie funktioniert diese Methode? Wie bereits erwähnt; liegt das Problem in der Überlappung der Anregungs- und Emissionsspektren der verwendeten Farbstoffe. D.h. in jedem Farbkanal ist ein gewisser Anteil von der anderen „falschen“ Farbe. Um diesen Falschanteil herauszurechnen und dem richtigen Kanal zuzuordnen, muss das System zuerst für die verwendete Farbstoff- und Filterkombination kalibriert werden. Hierzu wird das Präparat zuerst nur mit dem einen Farbstoff markiert und dann die Fluoreszenzintensität in beiden Farbkanälen gemessen. Dasselbe muss mit dem zweiten Farbstoff durchgeführt werden. Dadurch kann der relative Anteil der jeweils „falschen“ Fluoreszenz für die Farbkanäle berechnet werden. Da es sich um einen relativen Anteil handelt, kann mit Hilfe dieser Kalibrierdaten der Falschfarbanteil aus der mehrfach gefärbten Probe herausgerechnet und dem richtigen Kanal zugeordnet werden (Abb. 9).

3.3 Dekonvolution

Die Möglichkeit die Fokusebene mit einer hohen Genauigkeit zu bestimmen, ermöglicht Aufnahmen in mehrere z-Ebenen. Ein Problem in der Fluoreszenzmikroskopie stellt das sogenannte „Out-Of-Focus“ Licht dar, welches das Fluoreszenzbild vor allem bei dickeren Proben unscharf („blur“) oder verschmiert aussehen lässt. Das störende

Streulicht lässt sich jedoch mit Hilfe mathematischer Algorithmen korrigieren („*Deblurring*“). Diese Algorithmen basieren auf dem Konzept einer dreidimensionalen „*Point spread function*“ (PSF)“. Diese „*Point spread function*“ geht von einer unendlich kleinen punktförmigen Lichtquelle aus. Da das abbildende System eines Mikroskops nur einen Teil des Lichts, das von diesem Punkt emittiert, einsammelt, kann es das Licht nicht in ein perfektes Abbild dieses Punkts fokussieren. Dadurch erscheint der Punkt als ein dreidimensionales Diffraktionsmuster. D.h. die PSF ist formal definiert als ein dreidimensionales Diffraktionsmuster, generiert durch eine ideale punktförmige Lichtquelle. Die PSF hängt stark von den optischen Eigenschaften der abbildenden optischen Systeme ab. Die mathematischen Algorithmen, die zur Dekonvolution verwendet werden, basieren ebenfalls auf der PSF. Hierbei wird allerdings nicht das Abbild in einer einzelnen Fokusebene berücksichtigt, sondern die Bilder aus mehreren Fokusebenen (z-Stapel) miteinander verrechnet. Dabei wird nicht nur das *Out-of-Focus* Licht in der aktuellen Ebene herausgerechnet, sondern auch der entsprechenden Ebene ober- und unterhalb dieser Ebene zugerechnet. Mit Hilfe dieser Methode lassen sich die einzelnen z-Ebenen sauber darstellen und ermöglichen die Erstellung

einer exakten 3D Abbildung der untersuchten Strukturen (siehe Abb. 2). Das cell[^]R Software Paket enthält ein einfaches Modul zur Dekonvolution. Die Daten können aber auch mit den speziellen Dekonvolutions- und 3D-Rekonstruktionsprogrammen, Autoquant[®] bzw. Imaris[®], weiterverarbeitet und analysiert werden.

3.4 TIRFM – Total Internal Reflection Fluoreszenzmikroskopie

Eine relativ neue Anwendung in der Fluoreszenzmikroskopie, die sich besonders für die Untersuchung von Membranprozessen eignet, ist die „*Total Internal Reflection Fluoreszenzmikroskopie*“ (TIRFM). Was ist TIRFM? Im Folgenden soll das Prinzip der TIRFM nur skizziert dargestellt werden. Für den interessierten Leser sei hier auf die folgende Internetadresse (<http://www.olympusmicro.com/primer/>) verwiesen; darauf sind ausführliche Informationen, z.T. auch mit interaktiven Java Tutorials, zu Theorie und Praxis der TIRFM und zu anderen Mikroskopie Themen zu finden. Willebrord Snell hat 1621 folgende Gesetzmäßigkeit gefunden: Gelangt ein Lichtstrahl beim Übergang von einem Medium mit Brechungsindex (n_1) in ein Medium mit niedrigerem Brechungsindex (n_2), gibt es einen kritischen Winkel

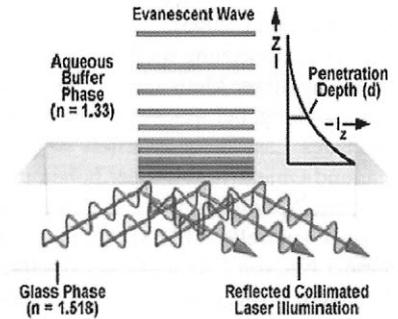


Abb. 10: Prinzip der Totalreflexion

Die Abbildung zeigt schematisch die Entstehung der sog. „evaneszenten“ Welle aufgrund einer Totalreflexion des Lichtstrahls beim Übergang zwischen zwei Medien mit einem unterschiedlichen Brechungsindex.

(α), bei dem das Licht total reflektiert wird: $\alpha = \sin^{-1}(n_2/n_1)$; $n_1 > n_2$.

Ein solcher Übergang von einem Medium mit hohem zu einem Medium mit niedrigerem Brechungsindex ist z.B. der Übergang vom Glasträger der Probe ($n=1,518$) in die wässrige Pufferlösung, in der die Zellen kultiviert werden ($n=1,33$). Durch die Totalreflexion des Lichts entsteht im wässrigen Medium eine sogenannte evaneszente Welle (Abb. 10). Diese evaneszente Welle hat nur eine Eindringtiefe von wenigen hundert Nanometern in das wässrige Medium. Nimmt man nun Laserlicht einer bestimmten Wellenlänge und strahlt es mit dem kritischen Winkel auf ein Deckglas, wird eine evaneszente Welle ausgelöst. Aufgrund der geringen Eindringtiefe, werden auch nur Fluorochrome in diesem Bereich angeregt. Weiter von der Grenzfläche Glas/Kulturmedium entfernte Farbmoleküle können nicht angeregt werden und sind somit auch nicht fluoreszierend. Dadurch wird eine hohe Auflösung in der z-Achse (ca. 100nm) erreicht (Abb. 11). Somit lassen sich Membranvorgänge, z.B. Vesikelfusion, Membran-Zytoskelett-Interaktionen, mit einer hohen Z-Auflösung untersuchen (Toomre und Manstein, 2003). Diese Methode ermöglicht auch die Detektion von einzelnen Molekülen und somit einen direkten Weg mit einer hohen räumlichen und zeitlichen Auflösung, biologische Prozesse in lebenden Zellen auf der

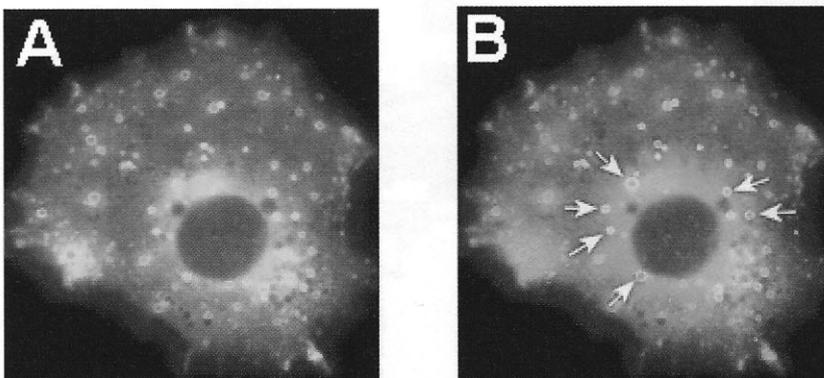


Abb. 9: Spectral Unmixing

Zellen mit GFP-markierten Vesikel- und YFP-markierten Membranproteinen. Die YFP Fluoreszenz ist zur Verdeutlichung in Rot dargestellt. (A) zeigt das Originalbild, aufgenommen mit einem GFP/YFP Filtersatz. In diesem Bild lassen sich keine eindeutigen Aussagen zur Kolokalisation von Vesikel- und Membranproteinen treffen. (B) zeigt GFP und YFP Fluoreszenz nach „*Spectral Unmixing*“. Nach dem *Unmixing* lassen sich Kolokalisationen der markierten Proteine deutlich als gelbe Ringe darstellen (Pfeile). Die Bilder wurden freundlicherweise von Yasushi Okada, Dept. of Cell Biology & Anatomy, Graduate School of Medicine, University of Tokyo, Japan, zu Verfügung gestellt.

Einzelmolekülebene zu untersuchen (Sako und Yanagida, 2003).

Grundvoraussetzung für die technische Umsetzung dieser Methode sind eine Lasereinkopplung, bei welcher der Einfallswinkel des Laserlichtes variiert werden kann, und Objektive mit einer hohen numerischen Apertur ($NA > 1,4$). Olympus hat zwei spezielle TIRFM Ölobjektive mit einer NA von 1,45 und einer 60- und 100-fachen Vergrößerung auf dem Markt. Für das cell[^]R Imaging System wurde eine spezielle TIRF-Lösung entwickelt. Dabei hat der Experimentator die Wahl zwischen einer Einlinien-, Zweiliniens- oder Dreiliniens-TIRF Einkopplung in Kombination mit der Epifluoreszenzeinkopplung. Durch diese Lösung kann für jede Laserlinie der TIRF-Winkel individuell eingestellt werden. Durch die Verwendung von schnellen Shuttern (Verschlusszeiten von $< 1\text{ms}$), die über die cell[^]R Software defi-

niert werden können, kann schnell zwischen den einzelnen Laserlinien und der Weitfeld-Konfiguration hin und her gewechselt werden (Abb. 12).

3.5 Klimatisierung bei Langzeitstudien

Studien z.B. zur Zellmigration oder zur Zelldifferenzierung können mehrere Stunden oder sogar Tage benötigen. Ein Problem bei solchen Studien ist, dass empfindliche Zellen außerhalb des Brutschanks nur für kurze Zeit vital sind. Um solche wichtige Fragestellungen dennoch untersuchen zu können, wurde für inverse Mikroskope der Olympus IX2 Serie eine Klimakammer, der cell[^]cubator, entwickelt (Abb. 13). Mit Hilfe dieses am Mikroskopstativ angebrachten cell[^]cubator können die Temperatur (Umgebungstemperatur bis 42°C), die relative Feuchte (Umgebungsfeuchte bis zu 100% relative Feuchte) und der CO_2

Gehalt (Umgebung bis 10%) reguliert werden. Dadurch werden nun auch Langzeitstudien möglich.

4 Diskussion

Die Entwicklung neuer Fluoreszenzfarbstoffe und die Entdeckung fluoreszierender Proteine zur spezifischen Markierung von Biomolekülen eröffnet der biomedizinischen Forschung neue Möglichkeiten, zelluläre Prozesse zu untersuchen. Insbesondere die Varianten fluoreszierender Proteine ermöglichen es, sowohl die Expression und Dynamik von Proteinen, als auch deren Interaktion mit anderen Biomolekülen im Detail zu studieren. Zusammen mit technischen Weiterentwicklungen in der Mikroskopie und der digitalen Bildaufnahme/-verarbeitung erhält der Forscher ein Werkzeug in die Hand, mit dem er an lebenden Zellen

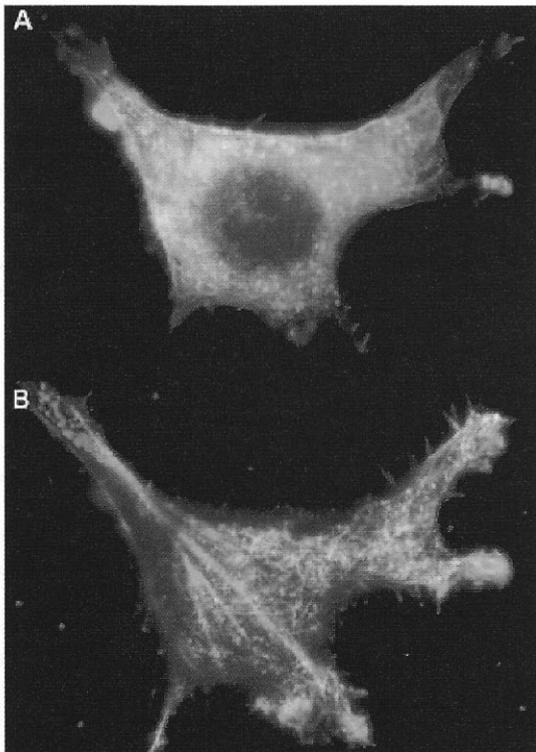


Abb. 11: TIRF-Mikroskopie

Aufnahme derselben Zelle im Epifluoreszenz- (Weitfeld) Modus (A) und im TIRF Modus (B). Die Zellen sind mit Alexa405 (Blau) spezifisch für SHC-Domänen, FITC (Grün) spezifisch für Tubulin und Phalloidin (Rot) spezifisch für Aktin markiert. Die Bilder wurden freundlicherweise von M. Faretta, European Institute of Oncology (IEOIFOM), Milano, Italy, zur Verfügung gestellt.

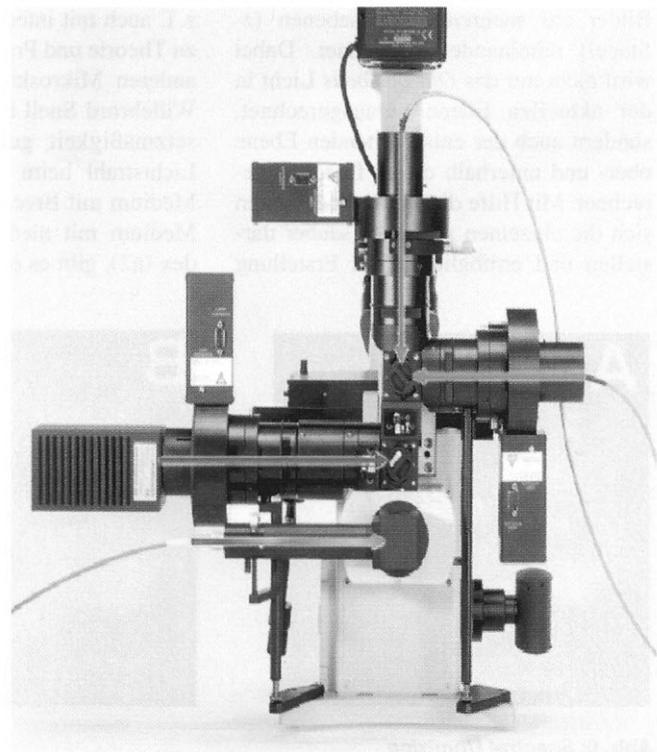


Abb. 12: Olympus Mehrlinien TIRF-Kondensator

Die Abbildung zeigt den Aufbau eines Olympus Mehrlinien TIRF-Systems. Der blaue Laser ist direkt gekoppelt, während der Grüne und der Rote Laser jeweils fasergekoppelt sind. Der Pfeil mit den Spektralfarben repräsentiert die Einkopplung der MT-20 für Epifluoreszenz-Modus.

physiologische und pathophysiologische Zusammenhänge untersuchen kann. Mit Hilfe der Fluoreszenzmikroskopie konnten in den letzten Jahren die molekularen Strukturen und deren Zusammenspiel bei der Regulation der $[Ca^{2+}]_i$ aufgeklärt werden. Dabei konnte gezeigt werden, dass die Art der zeitlichen und räumlichen Änderung der $[Ca^{2+}]_i$ für die resultierende physiologische Zellantwort essentiell ist (Berridge et al.; 2000, Rudolf et al., 2003)).

Um diese neuen Möglichkeiten optimal nutzen zu können, entwickelte Olympus zusammen mit Olympus Biosystems und Soft Imaging Systems eine Familie von Imaging Systemen. Die Systeme wurden konzipiert, um die ganze Palette von mikroskopischen Anwendungen, von der histo-, pathologischen Routine bis hin zu *Life Cell Imaging* Anwendungen, abzudecken. Da es sich bei den cell* Systemen um eine Familie handelt, können diese durch Aufrüsten auf geänderte Anforderungen angepasst werden. Der Systemgedanke beinhaltet, dass die einzelnen Hardware- und Softwarekomponenten optimal aufeinander abgestimmt sind. Ferner wurde ein großes Augenmerk auf die Benutzerfreundlichkeit gelegt, um selbst komplexeste Anwendungen mit einem geringen zeitlichen Aufwand für die Einarbeitung durchführen zu können. Die hohe Synchronisation der Hardwarekomponenten, durch die Integration eines Echtzeitkontrollers in den Imaging-PC, macht cell^R zu einem Imaging System für Lebendzell-Untersuchungen. Cell^R besitzt alle Voraussetzungen, um reproduzierbare qualitative und quantitative Fluoreszenzmessungen an lebenden Zellen durchzuführen. Durch die Weiterentwicklung der Software, z.B. Modul für FRET Analysen, und entsprechender Hardware-Module, wie z.B. den cell^cubator oder die Lasereinkopplung für TIRFM, eignet sich das cell^R System für nahezu alle Anwendungen in der modernen Mikroskopie.

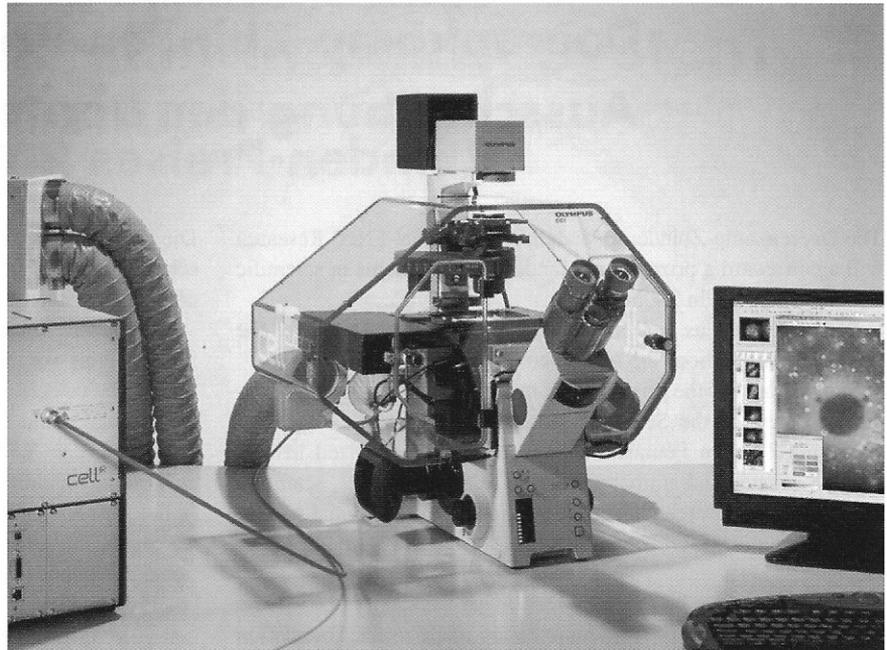


Abb. 13: cell^cubator – eine Inkubationshaube für das Mikroskop

Die Abbildung zeigt den Aufbau des cell^cubators an einem inversen Mikroskopstativ. Der cell^cubator ermöglicht es, die Zellen unter optimalen Umgebungsbedingungen für Langzeitaufnahmen zu halten.

Literaturverzeichnis

- Berridge, M.J., Lipp, P. and Bootman, M.D. (2000). The versatility and universality of calcium signalling. *Nature Rev. Mol. Cell Biol.* 1, 11-21.
- Gerlich, D. and Ellenberg, J. (2003). 4D imaging to assay complex dynamics in live specimens. *Nature Cell Biol.* 5, S14-S19.
- Miyawaki, A., Sawano, A. and Kogure, T. (2003). Lighting up cells: labelling proteins with fluorophores. *Nature Cell Biol.* 5, S1-S7.
- Rudolf, R., Mongilli, M., Rizzuto, R. and Pozan, T. (2003). Looking forward to seeing calcium. *Nature Rev. Mol. Cell Biol.* 4, 579-586.
- Sako, Y. and Yanagida, T. (2003). Single-molecule visualization in cell biology. *Nature Rev. Mol. Cell Biol.* 4, SS1-SS5.

- Toomre, D. and Manstein, D.J. (2001). Lighting up the cell surface with evanescent wave microscopy. *Trends Cell Biol.* 11, 298-303.

Korrespondenzadresse

Dr. Joachim Ubl
Olympus Biosystems GmbH
Robert-Koch-Str. 9
D-82152 Planegg
Germany

Abkürzungen

- FRET: Fluorescence Energy Transfer
TIRFM: Total Internal Reflection Fluorescence Microscopy
 $[Ca^{2+}]_i$: intrazelluläre Kalziumkonzentration
CFP: Cyan fluoreszierendes Protein
GFP: Grün fluoreszierendes Protein
YFP: Gelb fluoreszierendes Protein