

# HOCHAUFGELÖSTE MIKROSKOPIE DER ZELLULÄREN PLASMAMEMBRAN

## AUTOREN



**Gerhard J. Schütz**  
Institut für Angewandte Physik  
Forschungsbereich Biophysik  
TU Wien



**Mario Brameshuber**  
Institut für Angewandte Physik  
Forschungsbereich Biophysik  
TU Wien

## KURZFASSUNG

Die zelluläre Plasmamembran ist eine molekular hochkomplexe, räumlich und zeitlich fein organisierte Struktur, die das Zellinnere vom Zelläußeren trennt. Mittels neuartiger optischer Mikroskopieverfahren können molekulare Abläufe auf der Zelloberfläche mit bisher ungeahnter räumlicher Auflösung erfasst werden.

## ABSTRACT

*The cellular plasma membrane is a highly complex, spatially and temporally precisely organized structure that separates the inside of the cell from its outside. Using innovative optical microscopy methods, molecular processes on the cell surface can be recorded now with previously unimagined spatial resolution.*

## 1. DIE PLASMAMEMBRAN IST MEHR ALS NUR EINE PASSIVE HÜLLE

Es ist schon faszinierend, wie das Wechselspiel aus unsichtbar Kleinem zu jenem führt, was wir als Leben wahrnehmen: Moleküle bewegen sich, kollidieren miteinander, verändern ihre Form, werden mit anderen Molekülen beladen und transportieren sie, assemblieren sich in komplexer Weise zu biologischen Zellen und diese wiederum zu vollständigen Organismen. Diese Wechselspiele und die Rollen der einzelnen Akteure zu verstehen, beschäftigt seit Jahren zahlreiche internationale Forschergruppen. Im Forschungsbereich Biophysik wird die zelluläre Plasmamembran studiert, also jene Hülle, welche das Innere einer Zelle von ihrem Äußeren trennt.

In der Plasmamembran halten sich zwei Arten von Molekülen auf: Lipide, also fettähnliche Substanzen, sowie Proteine, also Eiweißstoffe. Vereinfacht können wir sagen: Lipide sind für die Struktur der Membran verantwortlich, Proteine für die Funktion. Während wir im Groben recht gut über die Struktur der Plasmamembran und die Funktion der Proteine Bescheid wissen, gibt es im Detailwissen doch zahlrei-

che Lücken. Eine Vielzahl von experimentellen Hürden erschwert die genaue Untersuchung:

- Proteine und Lipide sind viel zu klein, um direkt mit mikroskopischen Methoden abgebildet werden zu können. Die Ausdehnung eines Proteinmoleküls ist etwa ein Hundertstel der Auflösungsgrenze von Lichtmikroskopie, ein Lipidmolekül entspricht nur mehr ca. einem Fünftel der Größe eines Proteins.
- Proteine sind verschieden. Selbst wenn wir an sich idente Moleküle betrachten, haben Proteine aufgrund verschiedener Umgebungsbedingungen, Modifizierungen oder Bindungen unterschiedliche Eigenschaften. In klassischen experimentellen Zugängen können nur die Mittelwerte der Messparameter bestimmt werden, nicht jedoch die statistische Verteilung selbst.
- Proteine arbeiten in der Regel unkorreliert. Es ist somit schwierig, dynamische Prozesse in ihrem Zeitverlauf zu studieren.

## 2. DIE BEOBACHTUNG EINZELNER MOLEKÜLE ERÖFFNET VIEL GENAUERE EINBLICKE IN DAS VERHALTEN BIOLOGISCHER KOMPONENTEN

In Forschungsbereich Biophysik haben wir aus diesen Gründen einen experimentellen Zugang gewählt, der auf der Untersuchung einzelner Moleküle beruht. Dabei machen wir uns zunutze, dass Proteine (oder auch Lipide) sehr selektiv mit Farbstoffen markiert werden können. Beleuchtet man solche Farbstoffe mit einem Laser, so senden sie rotverschobenes Licht aus, welches mit einer empfindlichen CCD-Kamera detektiert werden kann. Ein einzelnes Farbstoffmolekül ist dabei gar keine so schwache Lichtquelle: Man kann durchaus mit einigen Zehntausend Lichtteilchen – so genannten Photonen – rechnen, die pro Sekunde auf der Kamera auftreffen. Zum Vergleich: Unserem Auge reichen ca. tausend Photonen pro Sekunde, um am Nachthimmel lichtschwache Sterne gerade noch zu erkennen. Bereits in den Neunzigerjahren des letzten Jahrhunderts haben wir – gemeinsam mit anderen Arbeitsgruppen – gezeigt, dass die Signale einzelner Farbstoffe sogar ausreichen, um einzelne Biomoleküle über längere Zeit in ihrer Bewegung

zu beobachten; Zeitaufösungen im Bereich von Tausendstelsekunden sind keine Schwierigkeit. Damit steht eigentlich nichts mehr im Weg, wenn wir den Membranproteinen und -lipiden bei der Arbeit zusehen wollen, um auf diese Weise mehr über ihre Funktionen verstehen zu können.

Aber es geht noch besser: Das einzelmolekulare Experiment hilft uns auch, die räumliche Auflösung der mikroskopischen Abbildung deutlich zu erhöhen. Farbstoffmoleküle werden nach der Punkt-Bild-Funktion abgebildet, welche im Wesentlichen ein zentraler Lichtpunkt ist, dessen Helligkeit nach allen Seiten gleichförmig abnimmt. Die Ausdehnung dieses Flecks hängt nicht von der Art des Farbstoffmoleküls ab, sondern von der Qualität des Mikroskops: hochwertige Mikroskope erzeugen kleine Punkt-Bild-Funktionen, minderwertigere Mikroskope entsprechend größere. Die grundlegende Hürde war lange Zeit, dass selbst bei Verwendung von besten Mikroskopen die Punkt-Licht-Funktion eine Ausdehnung aufweist, welche im Bereich der Lichtwellenlänge liegt, also mehr als hundertmal größer als die zu untersuchenden Proteine und Lipide (Abb. 1a).

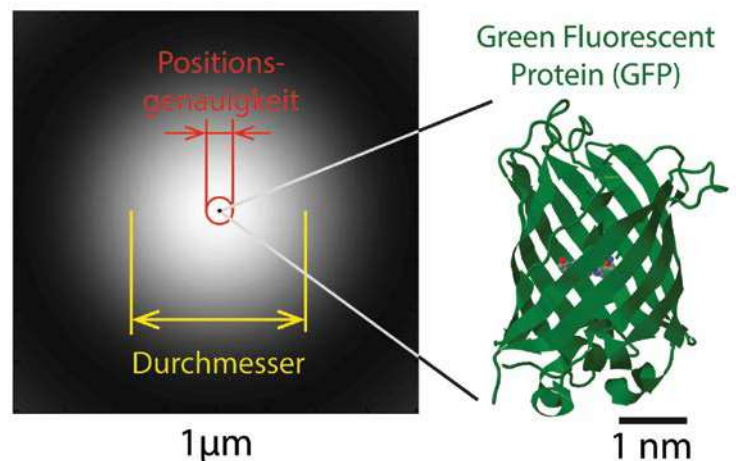


Abb. 1a

In der Einzelmolekül-Fluoreszenzmikroskopie werden Fluoreszenzfarbstoffe selektiv an die zu beobachtenden Moleküle gekoppelt, mit Laserlicht angeregt und mit Hilfe hochempfindlicher Kamerasysteme detektiert. Die Abbildung zeigt auf der rechten Seite die Struktur des Fluoreszenzmoleküls – in unserem Beispiel ein Green Fluorescent Protein (GFP) –, auf der linken Seite die Punkt-Bild-Funktion, welche einen hundertfach größeren Durchmesser aufweist. Während herkömmliche Mikroskopieverfahren durch den Durchmesser der Punkt-Bild-Funktion beschränkt sind, nutzen einzelmolekulare Verfahren die sehr präzise Positionsgenauigkeit aus.

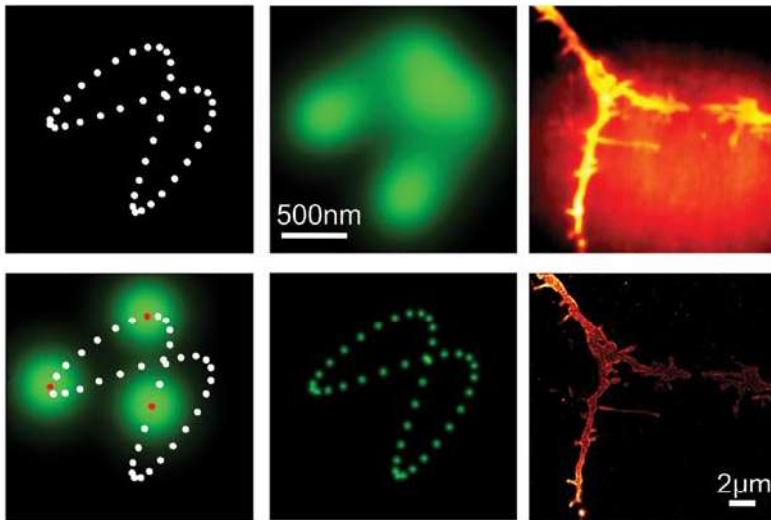


Abb. 1b

Prinzip der hochauflösenden Mikroskopie mittels blinkender Farbstoffmoleküle. In der oberen Reihe ist eine Struktur mit der Ausdehnung von einigen Hundert Nanometern zu sehen, bei der sich alle Farbstoffmoleküle im dunklen Zustand befinden (links). Würden alle Farbstoffe gleichzeitig leuchten – was bei herkömmlicher Fluoreszenzmikroskopie der Fall ist – so würden sich die einzelnen Punkt-Bild-Funktionen auf Grund ihrer Nähe zueinander so überlagern, dass die Details der Struktur verborgen blieben (mittleres Bild). Wenn hingegen nur sehr wenige Farbstoffmoleküle gleichzeitig im hellen Zustand vorliegen (untere Abbildung), können die einzelnen Positionen der Moleküle sehr genau berechnet werden. Wiederholt man derartige Aufnahmen oft genug, so sind auf jedem Bild andere Moleküle sichtbar; man kann somit die Positionen aller Farbstoffmoleküle berechnen und zu einem hochauflösenden Bild zusammenfügen (mittleres Bild). Ein Beispiel ist am rechten Abbildungsrand zu sehen: Die Plasmamembran von Neuronen wurde mittels einer blinkenden GFP-Mutante eingefärbt und mikroskopiert. Die obere Abbildung zeigt den Ausschnitt, wie er mittels herkömmlicher Fluoreszenzmikroskopie erscheint, die untere Abbildung die hochauflöste Variante.

Entscheidend ist nun, dass auch bei einer beliebig ausgedehnten Punkt-Bild-Funktion deren Lage sehr genau bestimmt werden kann: Man braucht nur den Schwerpunkt der Funktion zu finden. Dazu gibt es sehr leistungsstarke mathematische Algorithmen, die – je nach Signalstärke – die Position bis auf ein Hundertstel des Durchmessers der Punkt-Bild-Funktion bestimmen können (Abb. 1a).

Dazu sind 2 Bedingungen notwendig: Wir müssen sicherstellen, dass i) wirklich nur ein Molekül für den beobachteten Punkt verantwortlich ist, und ii) das nächste benachbarte Signal weit genug entfernt ist. Das erscheint zunächst schwierig, wissen wir doch, dass die meisten Proteine in sehr hoher Dichte auftreten. Der Trick besteht nun darin, nur einen geringen Bruchteil aller Proteine einer bestimmten Sorte – sagen wir, jedes tausendste – sichtbar zu machen; alle anderen bleiben in der mikroskopischen Abbildung dunkel. Dabei macht man es sich zunutze, dass Farbstoffmoleküle stochastisch zwischen dunklen und hellen Zuständen geschaltet werden können. So ist es möglich, die überwiegende Mehrzahl der Fluorophore zunächst auszuschalten, dann wenige Moleküle sukzessive einzuschalten, und die

Positionen zu bestimmen. Im Ganzen braucht man Zehntausende Bilder derselben Probe, um schlussendlich jedes Molekül zumindest einmal beobachtet zu haben. Mit modernen Kameras ist das jedoch kein Problem: Nach einer halben Minute ist der Film aufgenommen. Längere Zeit braucht es dann, die hunderttausenden Positionen mit hoher Genauigkeit zu bestimmen. Ist man damit fertig, hat man aber Erstaunliches erreicht: ein vollständiges Bild der Probe mit einer Auflösung, die nicht mehr durch die Wellenlänge des Lichtes limitiert ist (Abb. 1b).

Wir sehen, dass neue Herangehensweisen erstaunliche Optionen zur Verbesserung der mikroskopischen Untersuchung von biologischen Proben ermöglichen. Wenn man es geschickt anstellt, hilft die Probe beim Experiment mit: Durch ihr Leuchten und Blinken werden solche Abbildungsverfahren erst möglich. Man hat somit elegant umschifft, was ein Jahrhundert lang beinahe den Rang eines Dogmas hatte: das Auflösungslimit der Lichtmikroskopie. //