

Fremskridt inden for fluorescens mikroskopi

Fluorescens mikroskopi er et stærkt værktøj inden for biologisk forskning, og de seneste år har vist en hastig udvikling af teknikker og applikationer. Resultaterne er opnået ved nyt hardware såsom følsomme CCD kameraer og nye lasere, samt udvikling af applikationsorienteret software og integrering af disse nyskabelser til billedbehandlingssystemer for levende celler og konfokale laserscanningmikroskoper. Hard- og softwareforbedringer fulgtes af design af nye fluorescensprober og fluorescensmarkører

Af Heiko Gaethje, Olympus Life and Material Science Europa GmbH, Wendenstraße 14-18 20097 Hamburg, Germany

Sekvenseringen af hele genet var en milesten på vej til forståelsen af strukturer og funktioner for celler, væv, organer og organismer. Imidlertid afslører et proteins genetiske kode ikke dets funktion. For at kunne belyse dette er man nødt til at klonе gener og identificere udtryksmønstre og (sub-) cellulære lokationer for de tilsvarende proteiner, ved hjælp af teknikker

som immunofluorescens. Resultaterne er billeder af dynamiske processer.

For at kunne analysere molekulære funktioner under fysiologiske betingelser, måtte man udvikle andre metoder for at muliggøre opdagelse og sporing af specifikke proteiner. Derfor blev levende celle- og *in vivo* billedbehandlingsteknikker po-

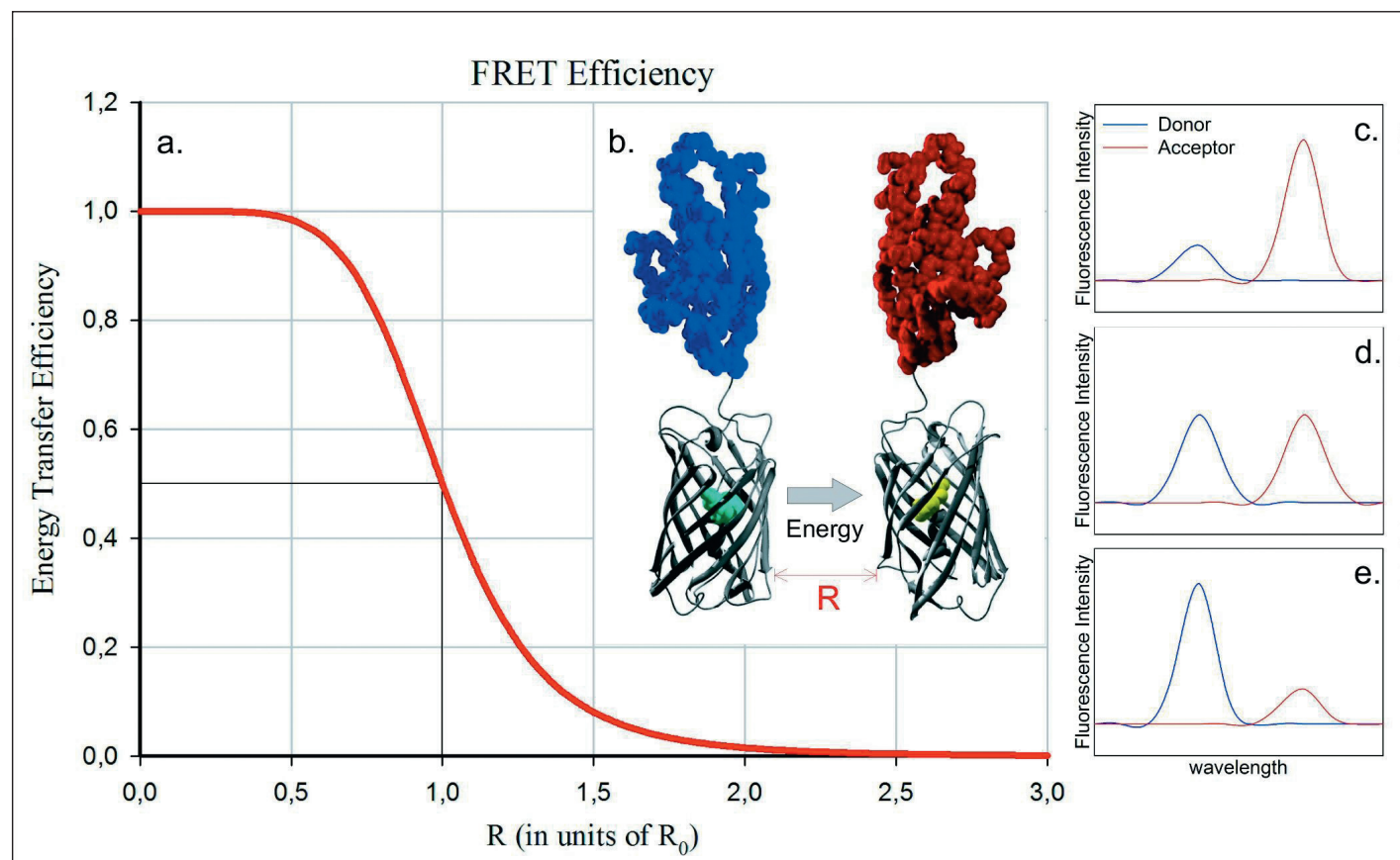


Fig. 1 FRET effektivitet varierer med den forskelligartede sjette styrke af donormodtager fluorofor afstand. Denne afhængighed resulterer i en hurtigt nedadgående kurve afbilledet i fig. 1a. Donor-modtager afstanden (fig. 1b skema over CFP/YFP donormodtagerpar smeltet sammen med aktuelle proteiner) er udtrykt i enheder i henhold til Foerster kritisk afstand (R_0), ved hvilken FRET raten svarer til donor de-eksiterings raten via fluorescensemissionen (markeret ved dropliner) Hvis donor og modtager er tæt på hinanden ($<10\text{nm}$) og belyst ved donor-eksiteringsbølglængde, dæmpes donoremissionen og den absorberede energi overføres til modtageren som udleder fluorescens lys ("sensitiseret emission", fig. 1c). Ved R_0 de-eksiteres halvdelen af donormolekylerne via FRET, den anden halvdel via fluorescensemission (fig. 1d). Hvis FRET ikke forekommer, måler man donoremissionsfluorescensen (fig. 1e).

pulære. Forskere omdanner nu levende celler, eller endda hele organismer, til reagensglas. De proteiner, der er af interesse, mærkes som regel med **Green Fluorescent Protein (GFP)** og dennes varianter.

Lokalisering af fluorescens i tid og rum

Mange cellefunktioner involverer bevægelser og interaktioner mellem individuelle molekyler, compartments eller årer inden for nm området. Den gennemsnitlige størrelse på proteiner ligger et sted imellem 3 og 30 nm, hvilket derfor ville være den ønskede opløsning til at lokalisere og spore enkelte GFP-mærkede proteinmolekyler præcist. Dette er en udfordring for lysmikroskopi på grund af de fysiske grænser for optisk opløsning. I henhold til Rayleigh-kriteriet forhindrer diffraktionsgrænsen skelnen af objekter som er mindre end ~180 nm fra hinanden.

Ønsket om høj spatial og temporal opløsning resulterer i en konfliktsituation som ligner en situation fra hverdagen: Man kan ikke være ekstremt hurtig og ekstremt præcis samtidig. Derfor er der ikke et enkelt lysmikroskop, der dækker alle opgaver. Specialiserede systemer og mikroskopopsætninger er blevet udviklet til eksempelvis de levende celle-billedbehandlingsapplikationer, som beskrives i de følgende afsnit:

At berøre grænserne

Konfokale og multifoton laserscanningssystemer når de fysiske grænser for optisk opløsning. Alligevel er konfokale laserscanningmikroskoper stadig det optiske udgangspunkt for kommercielt tilgængelige systemer med levende celler.

Mens de kun tilbyder moderat bedre opløsning sammenlignet med konventionelle opsætninger, er deres største fordel udelukkelsen af ude-af-fokus-lys ved et konfokalt »pinhole«. Dette forbedrer signal-til-støj ratioen i tykt prøvemateriale og dermed evnen til at opløse nærliggende signaler. Desuden åbner det mulighed for optisk opdeling og dermed for generationen af 3D billeder.

Multifoton laserscanningmikroskoper er det bedste valg til højopløsnings 3D billedbehandling fra dybt inde i levende prøver. De kommer endnu tættere på de teoretiske opløsningsgrænser, som dikteres af fysikkens love. Fluorofor energi og dermed emission begrænses til objektivet fokale plan. Et konfokalt hul er ikke nødvendigt, da der ikke genereres ude-af-fokus-lys, som ville sløre billedet. Lateral (x,y)- og aksial (z) opløsning når de teoretiske grænser. Brugen af pulserende infrarøde (IR)-lasere muliggør dyb vævsindtrængning og dermed billedbehandling af tykt prøvemateriale. Lavenergi IR-lyset har ydermere fordel af reduceret bleaching og fototoksitet, hvilket på forhånd udpeger denne type mikroskop til *in vivo* billede-behandling.

At rykke grænserne

Afstandsafhængige teknikker der beskrives i dette afsnit går uden om opløsnings-grænser på ~180 nm og går frem mod proteiners størrelsesområde:

Total Internal Reflection Fluorescence Microscopy (TIRFM) tilbyder ekstremt høj z-opløsning. TIRF er et optisk fænomen. Hvis lys vandrer igennem et optisk medie med højt brydningsindeks og rammer overgangen for et medie med lavere brydningsindeks i en vinkel som er større end den kritiske vinkel, undergår lyset i denne situation total intern reflektering. Under disse forhold kommer lyset stadig ind i mediet med lavt brydningsindeks som en elektromagnetisk bølge, kaldet »evanescent wave«. Dennes intensitet opløses eksponentielt med indtrængningsdybden. Den gennemsnitlige z-udvidelse er mindre end 200 nm afhængigt af lysets bølgelængde, den aktuelle vinkel og mediernes brydningsindeks.

Ved TIRFM eksiteres fluoroforer i prøven ved en max. afstand på ~50-100 nm fra dækglasset. Derfor er TIRFM ideel til observation af processer og strukturer på eller nær celleoverfladen. TIRF anvendes til undersøgelse af cellesubstratgrænser (fokale kontakter), exocytose, vesikel- og granula, membran morfologi og submembran cytoskeletale elementer. TIRF bruges bl.a. til at se på enkelte molekyler.

En typisk TIRF mikroskopopsætning består af et epi-fluorescens mikroskop kombineret med laserlyskilder, specielle TIRF-illuminatorer og højnumeriske objektiver.

Molekylære interaktioner

Fluorescence- (eller Foerster-) Resonance Energy Transfer (FRET) er en anden afstandsafhængig fysisk proces. Den energi, der absorberes af en donorfluorofor, overføres strålefrit til en modtagerfluorofor ved intermolekylær dipol-dipol sammenkobling. Som vist på fig. 1 er FRET ideel til undersøgelse af molekulære afstande, såvel som faste og dynamiske molekulære interaktioner inden for 1-10 nm.

I praksis opfanges FRET ved intensitetsmålinger af fluorescenceemission. Man udregner ratioen mellem den målte intensitet for den sensibiliserede modtageremission og intensiteten for donoremisjonen i FRET prøven (se fig. 1c, d, e) og i tilsvarende referenceprøver uden FRET.

Bredt anvendte donormodtagerpar er GFP og dennes afarter (se fig. 1b), da DNA rekombinationsteknikker giver mulighed for intracellulær ekspresion af de aktuelle molekyler der er direkte forbundet til disse markører.

FRET er med succes blevet anvendt til undersøgelse af proteinåbning/-lukning og proteiners tilpasningsændringer. Derudover er sammensætningen og den spatiale komposition af proteinkomplekser samt receptor/ligand interaktioner blevet fulgt ved brug af denne teknik. Det er muligt at studere membranflydeevne, distribution og transport af lipider og membranfusion. En anden almindelig applikation er membranpotentiale måling. Almindelig fluorescens belysning er normalt tilstrækkeligt. For at opnå billeder uden støj fra andre lag, anvendes laserscanning konfokal-FRET med lasere, hvilket giver den ekstra fordel af 3D billeder.

Tidssatte teknikker

To fluorescens mikroskopiteknikker har til formål at undersøge aktiv bevægelse eller spredning af intracellulære eller membranbundne molekyler over tid: **Fluorescence Loss In Photobleaching (FLIP)** og **Fluorescence Recovery After Photobleaching (FRAP)**.

Typisk bleges et specielt område af en cellemembran, som tidligere er mærket med fluorescensfarvestof, med et konfokalt laserscanningmikroskop, og tab eller gendannelse af fluorescens over tid registreres for at fastsætte den laterale membranfluiditet. Desuden er FLIP anvendeligt til bekræftelse af membranorganellers kontinuitet. Ved fortsat blegning af et lille, afgrænset organelområde, forsvinder fluorescensen fra det ikke-belyste område langsomt. Hvis der ikke bleges, kan fluoroforer spredes lateralt ind i den oplyste plet, indtil alle fluorescerende molekyler er opbrugt.

Konklusion

Moderne fluorescens billedbehandlingsteknikker dækker et bredt og stadigt voksende område af krævende applikationer. Avancerede mikroskoper og billedbehandlingssystemer udvikles til stadighed for at opfylde disse forskelligartede behov. Mikroskoperne bliver bedre og hurtigere og giver mulighed for at være applikationsplatforme for flere ting på samme tid.