

STimulated Emission Depletion (STED) – Mikroskopie

“STED microscopy reveals that synaptotagmin
remains clustered after synaptic vesicle exocytosis”

Seminar:

“Physikalische Messtechniken
in der Biophysik“

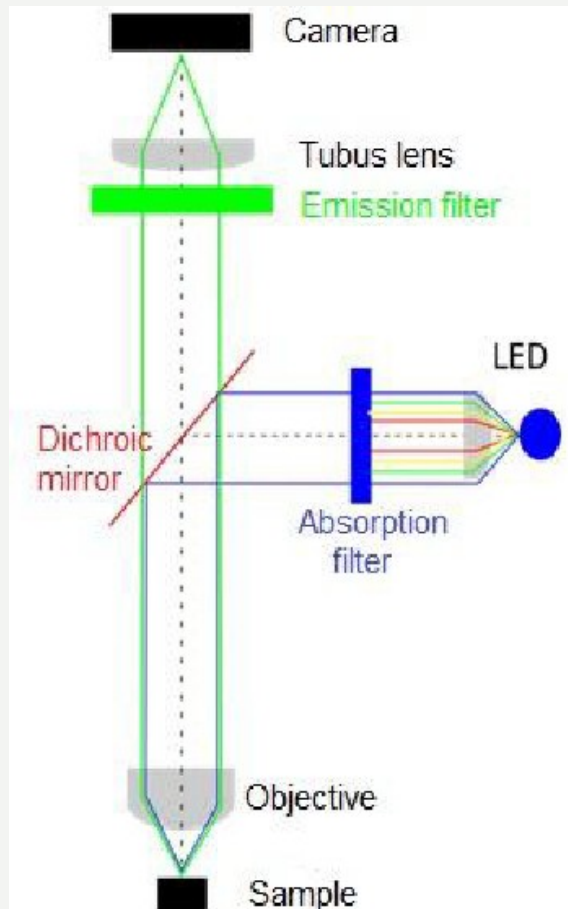
Gliederung

1. Warum ist die Methode nützlich?
2. Funktionsweise der Technik
3. Forschungsarbeit: “STED microscopy reveals that synaptotagmin remains clustered after synaptic vesicle exocytosis”
4. Anwendungsbeispiele
5. Fakten
6. Neueste Forschungsergebnisse
7. Ausblick
8. Andere vielversprechende Varianten
9. Quellen

1. Warum ist die Methode nützlich?

- Fluoreszenzmikroskopie als wichtigste bildgebende Methode in der biomedizinischen Grundlagenforschung
 - => nicht invasiver Zugang zum Zellinneren
 - => dynamische Prozesse innerhalb lebender Zellen
- Abbe 1873: Auflösung begrenzt durch Beugung des Lichtes: $\Delta d \approx \frac{\lambda}{2 n \sin \alpha}$
- Untersuchung von zellbiologischen Strukturen und Prozessen auf der Größenskala unter 200nm unerreichbar für Fluoreszenzmikroskopie
- Durchbruch in der Lichtmikroskopie:
Überwindung der beugungsbedingten Auflösungsgrenze durch STED

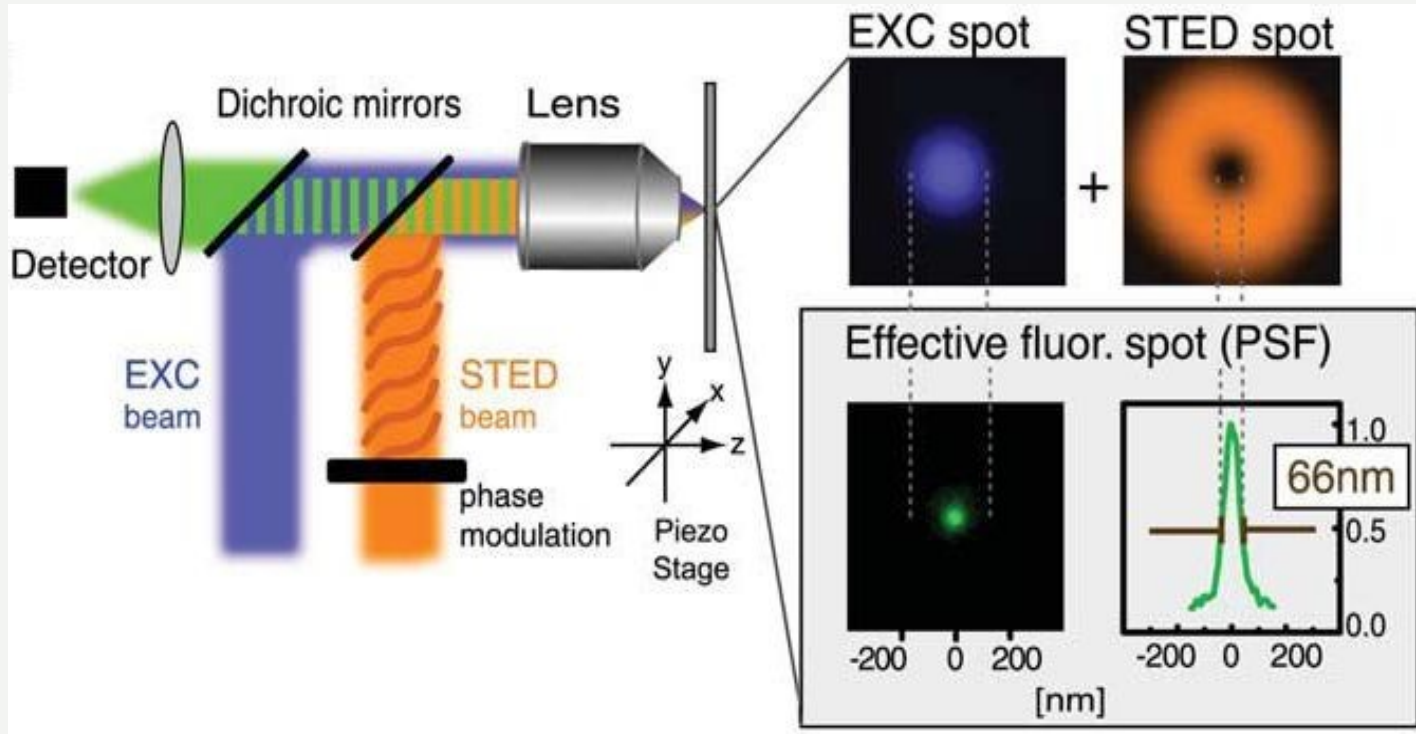
- Zur Erinnerung: Fluoreszenzmikroskop



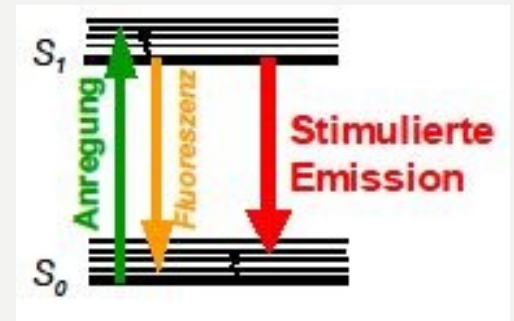
Quelle: [3]

Funktionsweise der Technik

Quelle: [1]



Energieschema eines Fluoreszenzmoleküls

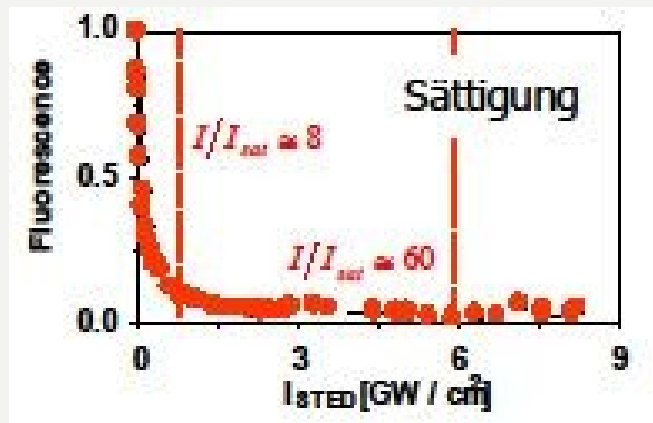


Quelle. [2]

- Erster Laserpuls zur Anregung der Fluoreszenzmoleküle
- Überlagerung mit doughnut-förmigem STED-Puls, der die angeregten Fluorophore durch stimulierte Emission bei einer höheren Wellenlänge wieder abregt

Funktionsweise der Technik

- Entscheidend für ist aber nicht das Abregen an sich, sondern dessen Sättigung
- Mit zunehmender Intensität I_{STED} des stimulierenden Lichts verringert sich die Fluoreszenz aus dem angeregten Zustand exponentiell



Quelle. [2]

- Übrigbleibendes Fluoreszenzsignal stammt fast ausschließlich aus der Nullstelle der STED/Licht-Intensitätsverteilung

- Auflösung bzw. Größe des Fluoreszenzspots:
$$\Delta d \approx \frac{\lambda}{2 n \sin \alpha \cdot \sqrt{1 + \frac{I}{I_{Sat}}}}$$

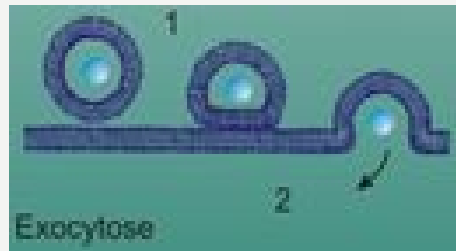
I : maximale fokale Intensität des STED-Pulses

I_{Sat} : Charakteristische Sättigungsintensität = Wert, bei der die Fluoreszenzwahrscheinlichkeit auf $\sim 1/e$ gesunken ist

- Für $I \rightarrow \infty$, $\Delta d \rightarrow 0 \Rightarrow$ fluoreszierende Scheibe wird mehr und mehr zu Punkt
- Auflösung hängt dadurch nicht mehr von der Beugungsgrenze ab, sondern allein von der Intensität des abregenden STED-Pulses.

Forschungsarbeit: “STED microscopy reveals that synaptotagmin remains clustered after synaptic vesicle exocytosis”

- Synaptotagmin-Proteine sind in Vesikeln an der Zellmembran lokalisiert, regeln die Freisetzung von Neurotransmittern
- “Vesicle Recycling“: Exozytose meist mit einer Endozytose verbunden



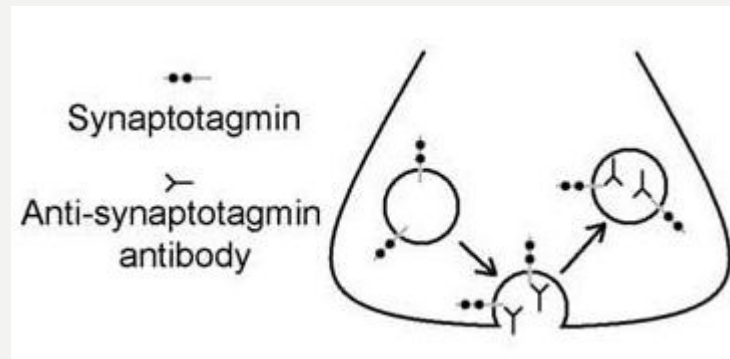
1: Innenraum
2: Außenraum

Quelle: [5]

- synaptische Vesikel zu klein für konventionelle Fluoreszenzmikroskopie (~ 40nm im Durchmesser)

Forschungsarbeit: “STED microscopy reveals that synaptotagmin remains clustered after synaptic vesicle exocytosis”

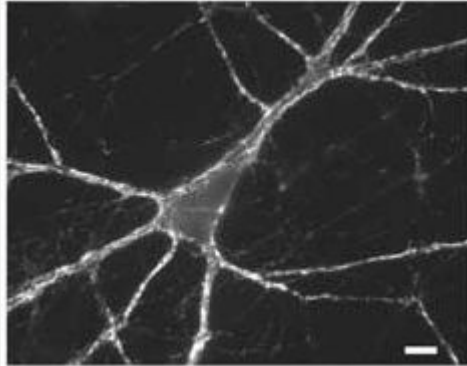
- Markierung der Synaptotagmin-Proteine:
 - während der Exozytose werden Proteine mit Antisynaptotagmin-Antikörpern versehen
 - Diese primären Antikörper werden wiederum mit Sekundärantikörpern gekoppelt, an die ein fluoreszierender Farbstoff gebunden ist
 - in der anschließenden Endozytose wieder im Bläschen eingeschlossen



Quelle: [1]

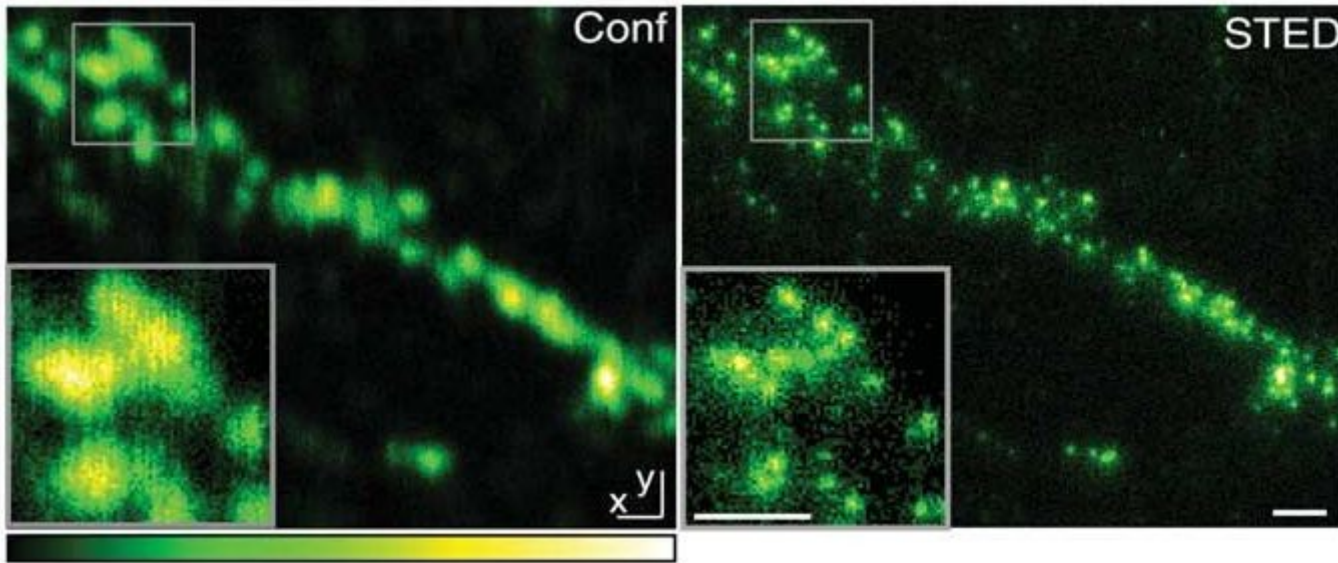
- Synaptotagmin bleibt in kleinen Clustern konzentriert nach der Exozytose statt sich über die Plasmamembran zu verteilen

Forschungsarbeit: “STED microscopy reveals that synaptotagmin remains clustered after synaptic vesicle exocytosis”



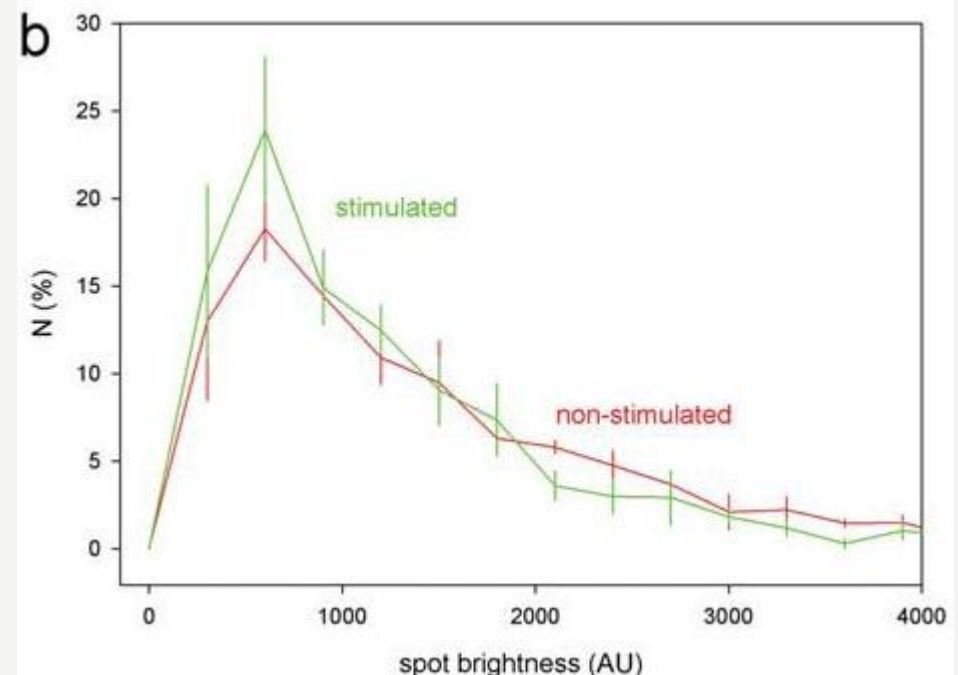
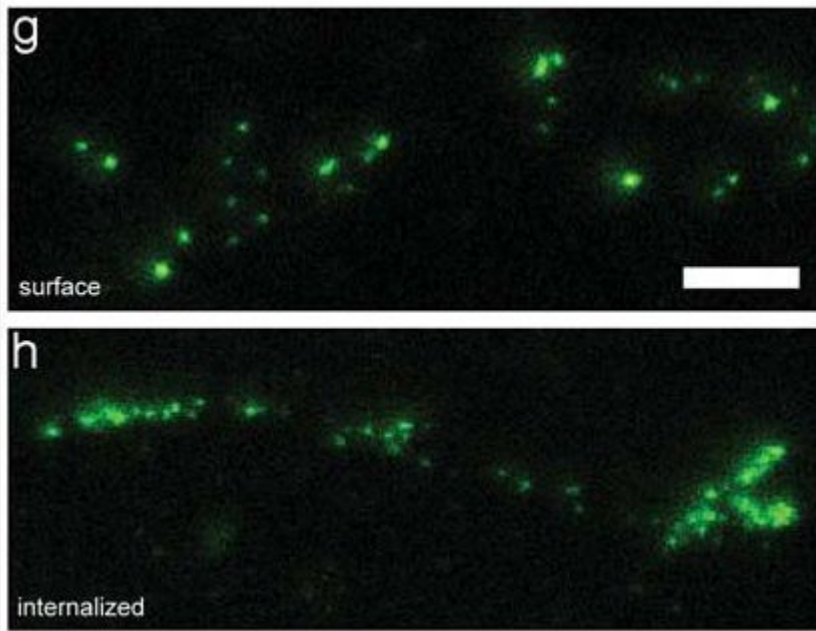
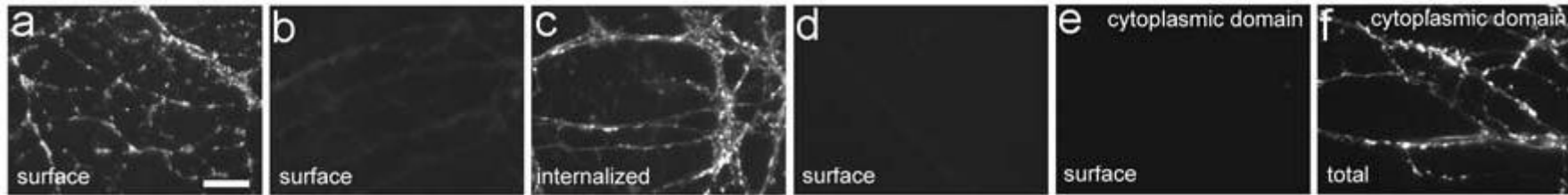
Typisches Bild einer Nervenzelle, gelabelt mit einem Antisynaptotagmin-Antikörper, sichtbar gemacht durch einen fluoreszenz-gelabelten Sekundärantikörper

Quelle: [1]



Vergleich von Konfokaler und enstreichender STED-Aufnahme einer gelabelten Probe

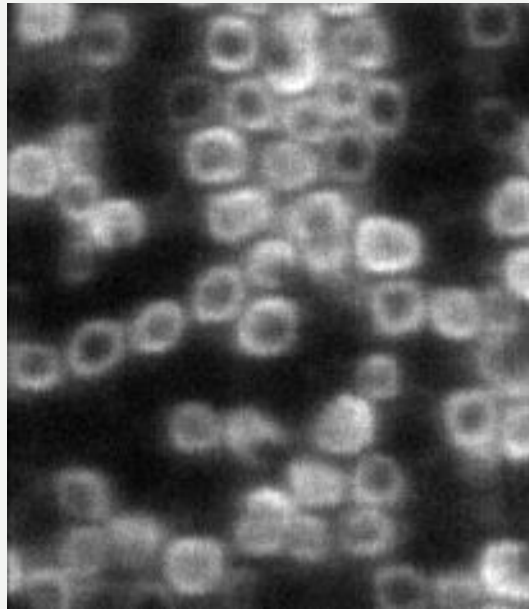
Forschungsarbeit: “STED microscopy reveals that synaptotagmin remains clustered after synaptic vesicle exocytosis”



Quelle: [1]

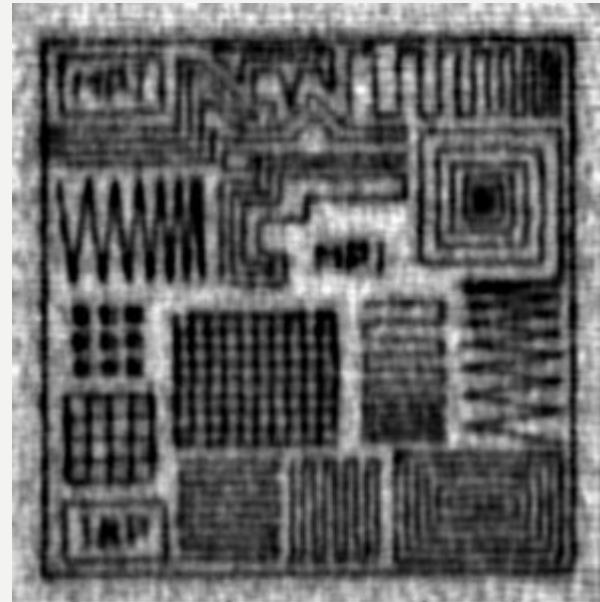
Anwendungsbeispiele

- Erforschung nanoskaliger Bestandteile der Zelle



Fluoreszenzgefärbte Poren einer porösen Membran

- bei künstlich nanostrukturierten Materialien



Mit einem Elektronenstrahl gefertigte Nanostrukturen in fluoreszenzgefärbtem PMMA

FILM 2008: Transport von Botenstoffen in lebenden Nervenzellen Quelle: [3]

Fakten

- STED bietet fast alle Vorteile eines konventionellen Fluoreszenzmikroskops
- Zusätzliche Schwierigkeiten bei der STED-Mikroskopie:
 - Mehrfarbiges Aufnehmen erschwert durch zwei separate Laser
 - Fluoreszenzmoleküle mit möglichst niedriger Abregungsschwelle erforderlich
- typischer Doughnut-förmiger STED-Strahl bietet keine höhere Auflösung entlang der optischen Achse → anderen Phasenmaske des STED-Strahls nötig
- maximale Geschwindigkeit ist bestimmt durch Aufnahme-Hardware und Leuchtkraft der Fluoreszenzprobe
- Kompromiss zwischen zeitlicher und räumlicher Auflösung bleibt bestehen

Neueste Forschungsergebnisse

- 2009: räumliche Auflösung von 5,8nm mit Diamantkristallen
- 2011: Bilder von Spinalnerven des Gehirns eines unversehrten Tieres
-> Potential für in-vivo Applikationen

Ausblick

- Der Fortschritt der hochauflösenden Methode hängt sehr von der Entwicklung von neuen Fluorophoren und Markierungsstrategien für sie ab
(Leuchtkraft, Stabilität, genetisches Ziel, Photoaktivierung, etc.)
- weitere Auflösungssteigerung durch Optimierung der Abbildungsparameter
→ noch schärfere Bildern der STED-Mikroskopie

Andere vielversprechende Varianten

RESOLFT-Konzept (*reversible saturable optical fluorescent transitions*):

- Transiente, optisch sättigbare Übergänge eines Fluoreszenzmoleküls in einen nichtfluoreszierenden Zustand
- Dem Konzept sind prinzipiell keine Auflösungsgrenzen gesetzt, weil man mit übersättigten reversiblen Überführungen und einer Nullstelle einen beliebig feinen Fluoreszenz-Spot schaffen kann
- Analog zur STED-Methode: *Ground State Depletion* Mikroskopie

Andere vielversprechende Varianten:

z.B. PALM, STORM

Quellen

[1] <http://www.nature.com/nature/journal/v440/n7086/full/nature04592.html>

[2] http://www3.mpibpc.mpg.de/groups/hell/PRESS_Detail_PRL_10.pdf

<http://www.journals.elsevier.com/experimental-neurology>

[3]

<http://www.weltderphysik.de/gebiete/stoffe/untersuchung-und-analyse/optische-mikroskopie/li>

[4] Braunsche Bewegung und Single Particle Tracking – Fortgeschrittenenpraktikum

[5] Wikipedia, Membrantransport

Danke für eure Aufmerksamkeit!