

Live Cell Imaging

Ausarbeitung für das Seminar *Cell Visualization* (SS '12) von Agatha Walla

Bevor das Live Cell Imaging etabliert wurde, gaben die Analyse fixierter Zellen und biochemische Studien Aufschluss über grundlegende Prinzipien in der Zellbiologie. Um molekulare und zelluläre physiologische Abläufe erkennen zu können, waren diese Methoden nicht hinreichend. Der Grund hierfür ist die Dynamik in Zellen, deren Komponenten nicht steif sind, denn erst die Organisation und Dynamik von Makromolekülen gibt Aufschluss über ihre Funktion. Geeignete Methoden für diese Problematik bietet das Live Cell Imaging.

Der revolutionierende Schritt zur Etablierung der Methoden des Live Cell Imaging war die Entdeckung und Optimierung von fluoreszierenden Proteinen und die fortschreitende Entwicklung der Mikroskopie. Fluoreszenzproteine bieten die Möglichkeit mit anderen Proteinen Genspezifisch fusioniert zu werden und damit die räumliche und zeitliche Veränderung des untersuchten Proteins aufzuklären (Abb. 1).



Abbildung 1: Design eines Genkonstrukts zur Proteinlokalisierung. Die Gensequenz des zu untersuchenden Proteins wird gefolgt von der Gensequenz eines Reporterproteins (hier GFP). Das Stoppcodon des untersuchten Proteins muss hierbei entfernt werden, sodass GFP direkt an das Protein gekoppelt wird. Zur Induktion der Expression dieses Konstruktes wird ein Promotor benötigt.

Ein großes Problem bei der Benutzung von Fluoreszenzproteinen ist die Eigenfluoreszenz der Zellen, die sogenannte 'Autofluoreszenz' oder 'Primärfluoreszenz'. Dieses Phänomen stört vor allem die Betrachtung von Pflanzenzellen, die eine starke rote Autofluoreszenz des Chlorophylls aufweisen. Chlorophyll ist aus einem Porphyrin Ring mit zahlreichen Doppelbindungen aufgebaut und zeigt bei Anregung mit grünem Licht eine starke rote Fluoreszenz. Um diesem Hintergrundsignal zu entgehen werden Fluoreszenzproteine des Live Cell Imaging optimiert und deren Anregungsbereich verringert (Abb. 2).

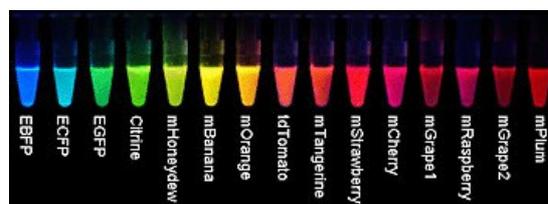


Abbildung 2: Palette von fluoreszierenden Proteinen unterschiedlicher Farben, die entweder aus GFP oder RFP (red fluorescent protein) entwickelt wurden.

Das Einbringen von bestimmten Fluorophoren über Genfusionen kann Aufschluss über die Proteinlokalisierung, die Interaktion zwischen zwei Proteinen und die Diffusion innerhalb der Zelle des Proteins geben:

- Eine Interaktion von zwei Proteinen wird häufig durch eine FRET (Förster Resonance Energy Transfer) Messung ermittelt. Hierbei wird ein Protein mit einem Donor-Fluorophor gekoppelt, das andere mit einem Akzeptor-Fluorophor. Das besondere an beiden Fluorophoren ist, dass der Donor bei einer Wellenlänge angeregt wird, die keine Auswirkung auf den Akzeptor hat. Die Emission des Donors entspricht aber wiederum dem Anregungsbereich des Akzeptors, der durch diesen Energietransfer ein Signal geben kann (Abbildung 3A). Das Signal einer FRET Messung ist sehr spezifisch, da der Energietransfer erst ab einer räumlichen Distanz von 10 nm und weniger stattfinden kann und damit für eine tatsächliche Interaktion der gekoppelten Proteine spricht.
- Die Bewegung von Molekülen innerhalb einer Zelle aufzuklären, ist eine der bedeutendsten Aufgaben des Live Cell Imaging. Hierfür werden photoinduzierbare Fluorophore genutzt, wie

z.B. Dronpa. Mit Dronpa ist es möglich, reversibles Photoswitching anzuwenden. Dronpa wird bei einer Wellenlänge von 405 nm aktiviert, also detektierbar, und mittels einer Wellenlänge von 488 nm wieder deaktiviert. Die Induzierbarkeit wird häufig genutzt für 2 verschiedene Ansätze zur Untersuchung der Diffusion von Proteinen: FRAP (Fluorescence Recovery after Photobleaching) und FLIP (Fluorescence Loss in Photobleaching). Bei FRAP Messungen liegt die gesamte Zelle photoaktiviert vor. Es wird ein Teil der Zelle ausgewählt (z.B. in einem bestimmten Kompartiment), welcher mittels eines genauen kurzen Lichtstrahls einer Wellenlänge von 488 nm ausgeschaltet wird. Daraufhin wird in zeitlichem Abstand verfolgt, wie die ausgeschaltete Bereich von dem umliegenden Protein mit aktivierten Dronpa wieder gefüllt wird. Dies ermöglicht eine einfache Berechnung der Diffusionsgeschwindigkeit des Proteins von Interesse. Eine FLIP Messung beruht auf einem ähnlichen Prinzip wie die FRAP Messung. Zunächst wird die untersuchte Zelle einem Prebleach unterzogen, das bedeutet einer ganzheitlichen Aktivierung von Dronpa mit Licht einer Wellenlänge von 405 nm. Nach dem Prebleach wird ein bestimmter Bereich der Zelle kontinuierlich mit Licht einer Wellenlänge von 488 nm bestrahlt. Dies hat zur Folge, dass in diesem Bereich Dronpa vollständig deaktiviert wird. Um Aufschluss über die Diffusionsgeschwindigkeit des Proteins von Interesse zu gewinnen, wird das Fluoreszenzsignal in der gesamten Zelle über die Zeit betrachtet. Durch die Diffusion verliert die Gesamtheit der Zelle an aktivierten Fluoreszenzprotein, das in einem Punkt durchgehend deaktiviert wird. Gemessen über die Zeit lässt sich wiederum die Diffusionsgeschwindigkeit berechnen. Spezifischer lässt sich sogar die Diffusion aus einem bestimmten Kompartiment in der Zelle bestimmen, indem dieses Kompartiment speziell Dronpa-deaktiviert wird.

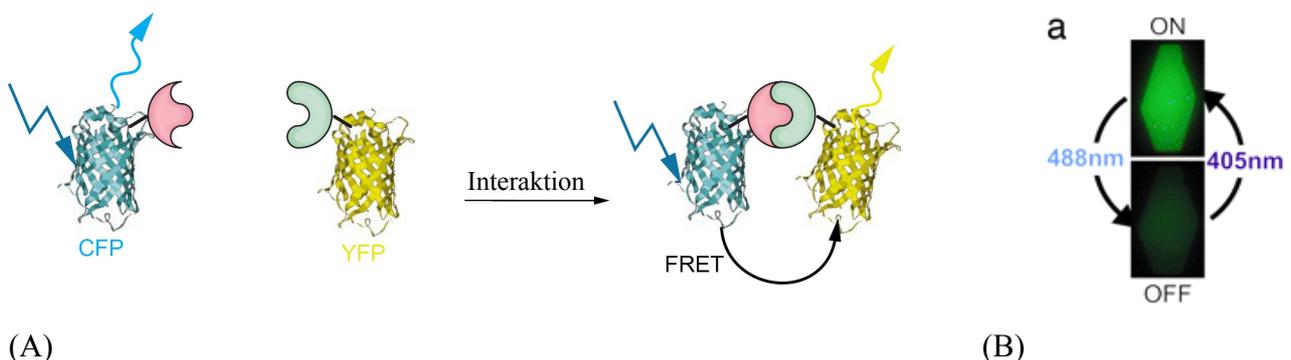


Abbildung 3: Nachweis von Proteininteraktion und -diffusion durch Live Cell Imaging Methoden. (A) Prinzip der FRET-Messung. (B) Reversibles Photoswitching von Dronpa.

Die aufgezählten Methoden des Live Cell Imaging stellen jedoch nicht die gesamte Bandbreite der Techniken in diesem Gebiet dar. Durch die fortschreitende Forschung und Entwicklung verbesserter Mikroskopietechniken wird die Betrachtung von Zellen *in vivo* mit ihrer Dynamik zur grundlegenden Charakterisierung.

Quellen:

- Stephens & Allan, „**Light Microscopy Techniques for Live Cell Imaging**“, 2003, Science 300 (5616): 82-86
- Sekar & Periasamy, „**Fluorescence resonance energy transfer (FRET) microscopy imaging of live cell protein localizations**“, 2003, JCB vol. 160 no. 5 629-633
- Hofkens et al., „**Reversible single-molecule photoswitching in the GFP-like fluorescent protein Dronpa**“, 2005, PNAS vol. 102 no. 27 9511-9516