

Verfolgung einzelner Biomoleküle jenseits der optischen Auflösungsgrenze

Tracking Single Biomolecules beyond the Optical Resolution

Zdeněk Petrášek

Auf Fluoreszenz basierende Einzelmolekülmethoden erlauben es, hochdynamische biomolekulare Wechselwirkungen mit extrem hoher Empfindlichkeit zu quantifizieren. Die schnelle Kinetik frei diffundierender Moleküle in Lösung kann mit der Fluoreszenzkorrelationsspektroskopie untersucht werden. Langsame oder immobilisierte Moleküle können dagegen direkt abgebildet und verfolgt werden, und zwar mit einer Raumauflösung, die die klassische optische Grenze weit überschreitet. Diese präzise Lokalisierung individueller Moleküle dient als Grundlage der neuartigen Superresolution-Mikroskopie, einer Methode, die eine Auflösung von bis zu 20 Nanometer erlaubt.

Fluoreszenztechnologie wird, unter Verwendung von Autofluoreszenz oder künstlicher Farbstoffmarkierung, seit Jahrzehnten als hochempfindliche Methode zur Detektion von Molekülen und zur Untersuchung von deren Wechselwirkungen mit ihrer unmittelbaren Umgebung eingesetzt. Die Empfindlichkeit der Fluoreszenzparameter (Spektrum, Lebensdauer oder Fluoreszenzpolarisation) hat zu einer Vielzahl von Anwendungen in biologischen und chemischen Wissenschaften geführt. Der Fortschritt in der Lichtdetektionstechnologie hat es letztendlich ermöglicht, die Fluoreszenz von einzelnen Molekülen zu detektieren, was zur Entwicklung mehrerer Einzelmolekülverfahren geführt hat.

Fluoreszenzkorrelationsspektroskopie

Fluoreszenzkorrelationsspektroskopie (FCS) ist eines der ersten Verfahren, das auf der Detektion des Signals einzelner Moleküle basiert. Dabei wird die Fluoreszenz eines winzigen Volumens gemessen, durch das zu jedem Zeitpunkt nur wenige Moleküle schnell diffundieren (Abbildung 1). Die statistische Analyse der Fluktuationen der Fluoreszenz liefert Informationen über die Konzentration und Diffusionsgeschwindigkeit der Moleküle, deren Wechselwirkungen, chemische Reaktionen usw. Obwohl während einer Messung über viele >

Single molecule fluorescence techniques allow quantification of biomolecular interactions and dynamics with extremely high sensitivity. The fast kinetics of molecules freely diffusing in solution can be investigated by Fluorescence Correlation Spectroscopy. Slowly moving or immobilized molecules can be directly imaged and tracked with spatial resolution far exceeding the classical optical limit. This precise localization of individual molecules forms the basis of superresolution microscopy, a technique that can be used to visualize details on the scale of tens of nanometers.

Fluorescence technology, using either native fluorescence of the investigated molecules or labeling them with a fluorescent marker, has been employed for decades as a very sensitive method to detect the presence of molecules and to study their interactions with other molecules or with their microenvironment. The sensitivity of fluorescence parameters, such as the emission spectrum, lifetime or anisotropy, to molecular interactions has led to a wide range of applications in chemical and biological sciences. The advances in light detection technology have ultimately made it possible to detect fluorescence from individual molecules, resulting in a range of "single molecule" techniques.

Fluorescence Correlation Spectroscopy

Fluorescence Correlation Spectroscopy (FCS) is one of the early techniques based on the detection of a signal from single molecules. It measures the fluctuations of fluorescence in a tiny femtoliter volume within a liquid sample containing on average only a few fast diffusing molecules (Figure 1). Statistical analysis of these fluctuations can yield information about the concentration and the diffusion properties of the fluorescent molecules, their interactions and chemical reactions, etc. Although the measurement represents an average over many molecules, FCS is regarded as a single molecule >

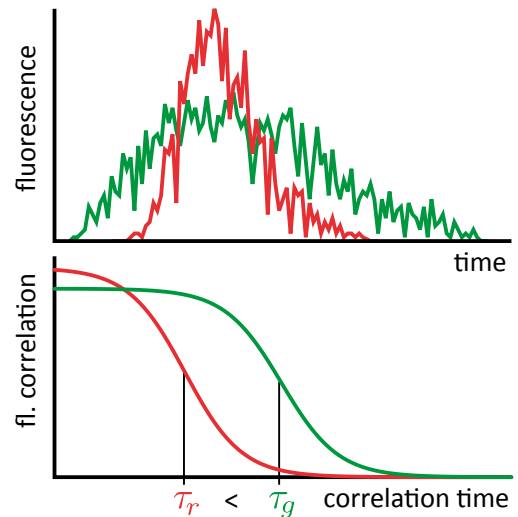
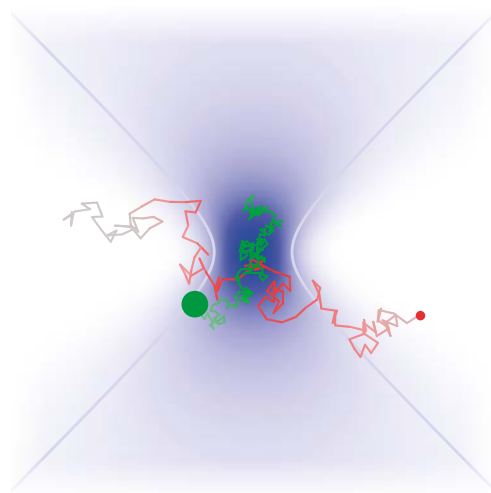


Zdeněk Petrášek arbeitet am Institut für Biotechnologie und Bioprozesstechnik. Seine Forschungsinteressen liegen in der optischen Spektroskopie und Mikroskopie und ihren Anwendungen in Biowissenschaften und Biotechnologie.

Zdeněk Petrášek works at the Institute of Biotechnology and Biochemical Engineering. His research interests are optical spectroscopy and microscopy and their applications in biosciences and biotechnology.

Abbildung 1:
**Fluoreszenzkorrelations-
 spektroskopie:** Ein fluoreszierendes
 Molekül, das durch den Objektivfo-
 kus diffundiert, generiert einen Licht-
 puls. Die Dauer des Lichtpulses wird
 von der Geschwindigkeit des
 Moleküls bestimmt, die wiederum
 von der Größe des Moleküls abhängt.

Figure 1:
*Fluorescence Correlation
 Spectroscopy: A fluorescent molecule
 diffusing through the objective focus
 generates a burst of light. The
 duration of this burst depends on the
 molecule's speed, which in turn
 reflects the size of the molecule.*



© Zdeněk Peřášek

Moleküle gemittelt wird, wird FCS als Einzelmolekülverfahren betrachtet, da es ein starkes Signal von individuellen Molekülen voraussetzt. Das Verfahren benötigt nur extrem kleine Probevolumina, was seine Anwendung in mikrofluidischen Reaktoren und sogar in lebenden Zellen ermöglicht. Zu den Anwendungen zählen die Detektion von Bindungs- und Dissoziationsreaktionen und die Untersuchung von schnellen Konformationsänderungen der Biomoleküle.

method, as it requires a sufficiently high signal from individual molecules. The technique operates with extremely small sample volumes, allowing its application in microfluidic chemical reactors or even in living cells. Applications include the detection of binding interactions and the investigation of the fast conformational fluctuations of biomolecules.

Einzelmoleküllokalisierung und -verfolgung

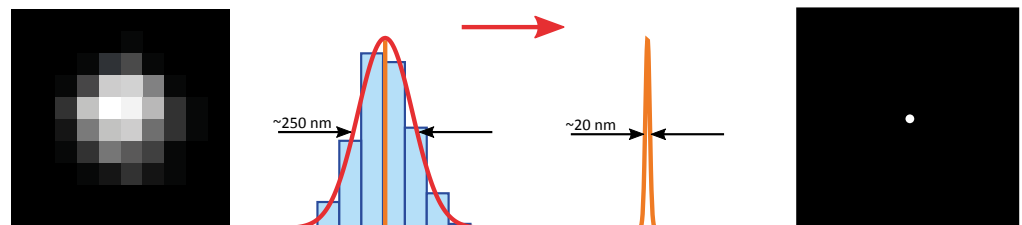
Die in letzter Zeit entwickelten hochempfindlichen EMCCD-Kameras („electron multiplying charge-coupled devices“) erlauben es, unbewegliche oder sich langsam bewegende Moleküle direkt abzubilden. Auf dem Bild erscheint ein Molekül als sogenannte Punktspreizfunktion („point spread function“, PSF), die aufgrund der optischen Auflösungsgrenze aber viel größer als das Molekül selbst ist. Die Position des Zentrums der PSF, und deshalb auch des Moleküls, kann jedoch mit einer bis zu zehnmal höheren Präzision bestimmt werden (Abbildung 2). Auf diese Weise kann eine Raumauflösung im Bereich von 20 nm erreicht

Molecular localization and tracking

Immobile or slowly moving fluorescent molecules can be directly imaged with the recently developed high signal-to-noise EMCCD cameras. Due to the limits of optical resolution, an image of a molecule (“point spread function”, PSF) is much larger than the molecule itself. However, the position of the center of the image, indicating the location of the molecule, can be determined with up to 10 times higher precision (Figure 2). In this way, the spatial resolution on the order of 20 nm, comparable to the sizes of large protein complexes, can be achieved. The possibility of localizing single molecules with precision far beyond the classical optical resolution limit has led to the expansion of two related fields: single molecule tracking and superresolution microscopy.

Abbildung 2:
Lokalisierung: Obwohl die Größe der
 PSF (d. h. des Bildes eines Moleküls)
 durch die optische Auflösung auf
 wenige hundert Nanometer begrenzt
 ist, kann das Zentrum der PSF, wo sich
 das Molekül befindet, mit zehnmals
 höherer Auflösung bestimmt werden.

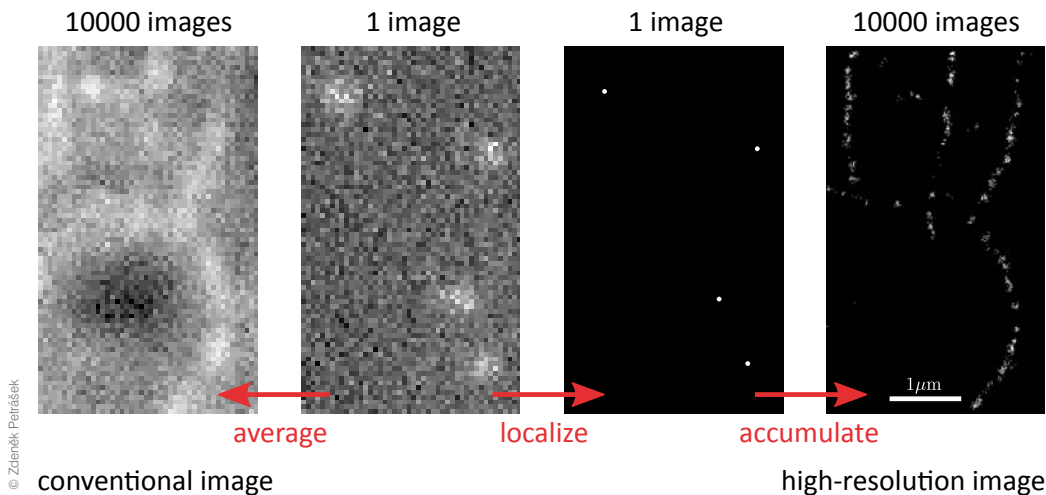
Figure 2:
*Localization: Although the size of the
 image of a single molecule (PSF
 width) is limited by the optical
 resolution to a few hundred
 nanometer, the position of the center
 of this image, where the molecule is
 located, can be calculated with a
 resolution about ten times higher.*



© Zdeněk Peřášek

werden. Diese Möglichkeit, einzelne Moleküle mit einer Präzision zu lokalisieren, die die klassische optische Auflösungsgrenze weit überschreitet, hat zu einer rasanten Entwicklung zweier Forschungsrichtungen geführt: der Einzelmolekülverfolgung und der supraauflösenden Mikroskopie.

The motion of molecules, either random or guided by other structures, can be followed by localizing their images in subsequent camera frames and connecting these into a trajectory. In this way, the stepping movement of the molecular motors myosin and kinesin along their respective filaments, or

**Abbildung 3:**

Superauflösung: Durch vielfaches Abbilden und Lokalisierung jeweils weniger Moleküle wird ein hochauflösendes Bild konstruiert.

Figure 3:

Superresolution: Repeated imaging and localization of a small number of molecules at a time allows the build-up of a high resolution image.

Die Bewegung der Moleküle kann durch ihre Lokalisierung in einer Reihe von Bildern und durch die Verbindung der aufeinanderfolgenden Positionen in eine Trajektorie verfolgt werden. So wurden z. B. die schrittweise Bewegung der Motorproteine Myosin und Kinesin entlang der entsprechenden Filamente oder die Diffusion der Proteine in Zellmembranen verfolgt. Eine vielversprechende biotechnologische Anwendung ist die Verfolgung von individuellen Enzymen auf unlöslichem Substrat, was eine Quantifizierung der enzymatischen Prozessivität und der Wechselwirkungen mit dem Substrat ermöglichen sollte.

Superauflösende Mikroskopie

Die Lokalisierung individueller Moleküle ist das Prinzip eines suprauflösenden Mikroskopieverfahrens, das im letzten Jahr mit dem Nobelpreis für Chemie gewürdigt wurde. Die Auflösung eines konventionellen Bildes ist durch die Breite der PSF bestimmt. Wenn die Moleküle aber erst lokalisiert werden, wie in dem Verfolgungsverfahren, und das Bild der Probe aus den Positionen der individuellen Moleküle rekonstruiert wird, kann die tatsächliche räumliche Auflösung um mehr als ein 10-Faches erhöht werden. Um eine möglichst genaue Lokalisierung zu erzielen, werden zu jedem Zeitpunkt nur wenige Moleküle chemisch oder photophysikalisch „eingeschaltet“, und nach ihrer Aufnahme wieder „ausgeschaltet“. Durch vielfache Wiederholung dieses Prozesses wird am Ende ein hochauflösendes Bild aus den Positionen der individuellen Moleküle aufgebaut. Dieses Verfahren hat großes Potenzial für ein breites Spektrum von Anwendungen, z. B. der Visualisierung der Verteilung von Enzymen auf einem unlöslichen Substrat, der Verfolgung des prozessiven Abbaus vom Substrat durch das Enzym, Bestimmung der Bindungs- und Dissoziationskonstanten oder der Quantifizierung der enzymatischen Aktivität mittels fluorogener Substrate. ■

the diffusion of proteins in cell membranes, have been tracked. A promising biotechnological application is the tracking of individual enzyme molecules along their solid substrate, allowing the quantification of their processivity and other enzyme-substrate interactions.

Superresolution microscopy

Localization of individual molecules is the principle of one type of superresolution microscopy techniques that was acknowledged by the Nobel Prize in chemistry last year. The resolution of an image is limited by the size of the images of the fluorescent molecules (the PSF width) used to label the sample. If the molecules are however localized as in the tracking technique, and the image of the sample is constructed from the position of these molecules, the resolution can be increased by a factor of more than ten. Reliable localization is achieved by chemically or photophysically “switching on” only a small fraction of fluorescent molecules at a time, and switching them “off” again after they are imaged and localized. By repeating this process many times, the final image is built up from the positions of a large number of localized molecules. This technique has a great potential for a wide range of applications, for example, the visualization of the distribution of enzyme binding sites on a solid substrate, monitoring of the processive action of the enzyme, the determination of binding and detachment rates, or the quantification of the enzyme activity by using fluorogenic substrate. ■