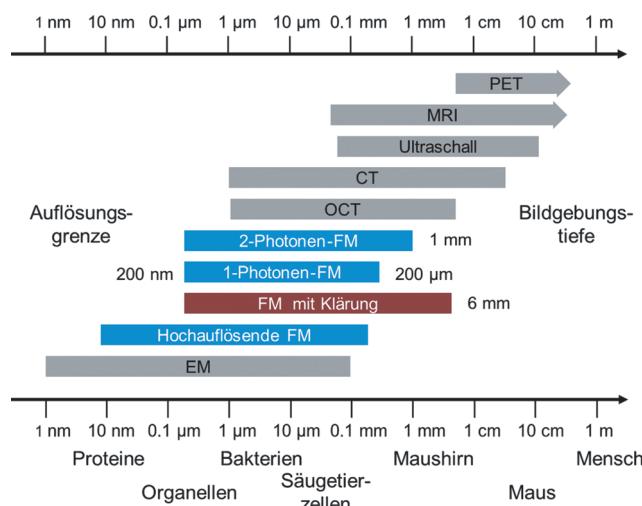


# Geklärte Gewebeproben für die optische Anatomie\*\*

Dmytro A. Yushchenko und Carsten Schultz\*

Fluoreszenzbildgebung · Gewebeklärung ·  
Lichtstreuung · Mikroskopie

**D**etaillierte Beschreibungen von Organismen, Organen oder Gewebestrukturen sind die Grundlage jedes tieferen Verständnisses biologischer Funktion. Die bedeutendsten anatomischen Bildgebungsverfahren sind Positronenemissionstomographie (PET), Kernresonanzbildgebung (MRI), Ultraschall und Computertomographie (CT). Diese Methoden ermöglichen die 3D-Bildgebung ganzer Organismen. Allerdings war bisher die Auflösung nicht ausreichend, um einzelne Zellen unterscheiden zu können (Abbildung 1).<sup>[1]</sup>



**Abbildung 1.** Vergleich verschiedener Bildgebungstechniken: PET: Positronenemissionstomographie, MRI: Kernresonanzbildgebung, CT: Computertomographie, OCT: optische Kohärenztomographie, FM: Fluoreszenzmikroskopie, EM: Elektronenmikroskopie.

Eine Möglichkeit, subzelluläre Auflösung zu erzielen, sind Fluoreszenz-basierte Bildgebungsverfahren. Aufgrund der hohen Empfindlichkeit und des großen verfügbaren spektralen Bereichs ist die Fluoreszenzmikroskopie heute als es-

sentielle Methode in der Zellbiologie etabliert.<sup>[2]</sup> Auf subzellulärer Ebene ermöglichen hochauflösende Fluoreszenzmikroskopietechniken, die theoretische, von Abbe beschriebene Auflösungsgrenze zu überwinden und biologische Objekte fast mit molekularer Auflösung abzubilden.<sup>[3]</sup> Allerdings ist die Fluoreszenzmikroskopie, im Unterschied zu tomographischen Techniken, durch die niedrige Lichtpenetrationstiefe von nur etwa 0.2 mm (1 mm bei 2-Photonen-Anregung) (Abbildung 1) beschränkt.<sup>[2a]</sup> Daher ist für 3D-Bilder von Organen und Organismen die Anfertigung von Gewebeschnitten und anschließende dreidimensionale Bildrekonstruktion notwendig.<sup>[4]</sup> Es wäre allerdings höchst wünschenswert, intaktes Gewebe und ganze Organismen mit einem buchstäblich ganzheitlicheren Ansatz abzubilden, der die sehr schwierige Ausrichtung einzelner Schnitte vermeidet. Photonen verhalten sich ziemlich „ungehörig“, wenn sie Gewebe durchdringen. Dies liegt an der außerordentlichen Heterogenität in Bezug auf ihre Lichtbrechung. Jeder Übergang von einer lipophilen Membran zum wässrigen Cytosol bedeutet eine Änderung des Brechungsindex und erzeugt Lichtstreuung. Dies ist bei einzelnen Zellen kein Problem, addiert sich in Gewebe aber rasch auf und limitiert die Arbeitstiefe in der Fluoreszenzmikroskopie (Abbildung 2a).

Die Lösung des Problems liegt in der Eliminierung der Diffraktionsgrenzen. Eine Herangehensweise ist es, das Gewebe durch Dehydratisierung und Lipidextraktion mit organischen Lösungsmitteln aufzuklären. Nachteile dieses in der Histologie verwendeten Ansatzes sind jedoch die erheblichen strukturellen Veränderungen des Objekts sowie die Lösung des fluoreszierenden Reportermoleküls.<sup>[5]</sup> Kürzlich wurden mehrere verbesserte Methoden zur Gewebeklärung entwickelt, die auf der Inkubation mit einem Immersionsmedium mit dem gleichen Brechungsindex wie dem des Objekts basieren.<sup>[6-10]</sup> Die auf diesem Weg generierten, signifikant transparenteren Präparate erlaubten unter anderem fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen eines Maushirns mit subzellulärer Auflösung und einer bisher nicht erreichten Eindringtiefe von 2 mm. Jede dieser Methoden hat jedoch ihre Limitationen (Tabelle 1): FocusClear<sup>[6]</sup> führt nur zu moderaten Transparenzverbesserungen, BABB (basierend auf einer Benzylalkohol/Benzylbenzoat-Mischung)<sup>[7]</sup> verursacht einen signifikanten Intensitätsverlust fluoreszierender Proteine, Scale<sup>[8]</sup> verwendet Harnstoff und SeeDB<sup>[9]</sup> Fructose mit Thioglycerin, was diese Methoden unvereinbar mit Antikörpermarkierungen macht. Ferner verändern alle Methoden außer SeeDB<sup>[9]</sup> die Probendimensionen.

[\*] Dr. D. A. Yushchenko, Priv.-Doz. Dr. C. Schultz

Cell Biology & Biophysics Unit  
European Molecular Biology Laboratory  
Meyerhofstraße 1, 69117 Heidelberg (Deutschland)  
E-Mail: schultz@embl.de

[\*\*] Der AK Schultz erhält Unterstützung vom EMBL, der DFG (Trans-regio 83, SPP1623), der Helmholtz-Gemeinschaft (LungSysII), dem Deutschen Zentrum für Lungenforschung (DZL) und der EU (Integrated Project LIVIMODE, ITN Sphingonet). Wir danken Dr. Lars Hufnagel für hilfreiche Diskussionen und eine kritischen Durchsicht des Manuskripts.

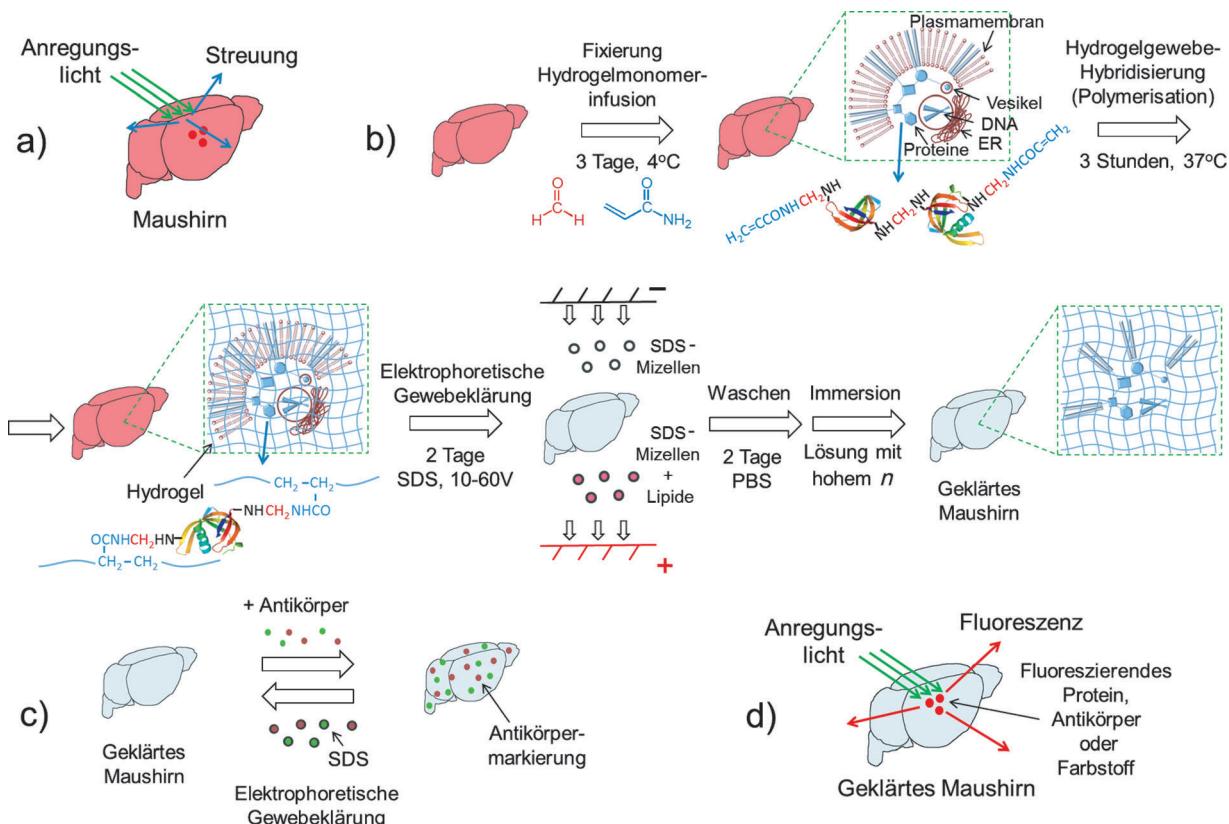


Abbildung 2. a) Lichtstreuung in biologischem Gewebe. b) Arbeitsgänge der Gewebeklärung durch CLARITY ( $n$ : Brechungsindex). c) Reversibles Färben von geklärtem Gewebe durch Antikörper. d) Tiefe Lichteindringung und Fluoreszenzanregung in geklärtem Gewebe.

Tabelle 1: Vergleich von Gewebeklärungstechniken.

Methode →	CLARITY	SeeDB	Scale	BABB	FocusClear	Organische Lösungsmittel
Transparenz	hoch	hoch	hoch	hoch	moderat	moderat
Erhaltung der Fluoreszenz	gut	gut	gut	niedrig	gut	niedrig
Immunfarbeverträglichkeit	ja (viele Durchgänge)	nein	nein	ja	ja	ja
Gewebedeformation	nein	nein	Expansion	Schrumpfen	Schrumpfen	Schrumpfen
Zeitbedarf der Gewebeklärung	8 Tage	3 Tage	Tags bis Monate	3 Tage	Stunden	Stunden
Zusammensetzung	Polyacrylamid-Hydrogel	Fructose, Thioglycerin	Harnstoff	BnOH, PhCOOBn	nicht relevant	Xylool, Chloroform
Lit.	[10]	[9]	[8]	[7]	[6]	[5]

Ein konzeptionell erweitertes Verfahren zur Gewebeklärung wurde vor kurzem von Deisseroth und Mitarbeitern in *Nature* publiziert.<sup>[10]</sup> Die Autoren erhöhten die Transparenz von biologischem Gewebe durch Entfernen der Lipidmembranen. Um alle nicht-lipophilen Moleküle, vor allem Proteine und Polynukleotide, in ihrer originalen Position zu belassen, wurde molekulares Verknüpfen durch Fixierung gefolgt von einer Acrylamid-Copolymerisation durchgeführt. Dies generierte ein nanoporöses Hydrogel, das hinsichtlich seines Brechungsindex ziemlich homogen ist und selbst große Gewebestücke transparent werden lässt. Daher wurde die Methode CLARITY genannt. Die Extraktion aller nicht-verknüpften Lipide wurde durch die Verwendung einer Elektrophorese erzielt – ein intelligenter Weg, die Aufklärungszeit zu verkürzen. Daher kann die Lokalisierung z. B. von fluoreszierenden Proteinen nun sehr präzise tief im Gewebe be-

stimmt werden. Weiterhin ist die Durchlässigkeit des Hydrogels ausreichend, um fluoreszierende Antikörper zur selektiven Färbung von Zellen und Proteinen verwenden zu können. Hinter der Technik steckt im Prinzip eine anspruchslose Chemie (Abbildung 2b). Zunächst wurde das Gewebe mit einer Mischung aus Paraformaldehyd (PFA) und Acrylamid bei 4°C behandelt. Dies führt zur Kreuzvernetzung unter Einführung von Acrylamid in alle Gewebeelemente. Dann wurde die Temperatur auf 37°C erhöht, um die Polymerisation des Acrylamids und die Bildung des Hydrogelnetzes einzuleiten.

Im nächsten Schritt wurden die Lipide entfernt. Da ungerichtete Wanderung selbst kleiner Moleküle in großen Objekten sehr langsam vonstatten geht, wurde Natriumdecdysulfat (SDS) verwendet und ein elektrisches Feld angelegt, um so die Lipidmoleküle buchstäblich aus dem Hydrogel

zu ziehen. Nach dem Auswaschen des SDS mit Phosphatpuffer aus dem Hydrogel-Gewebe-Hybrid wurde wegen der heterogenen Verteilung von Proteinen und Nucleinsäurekomplexen immer noch Lichtstreuung beobachtet. Daher wurde das Gewebe abschließend mit einer 85%igen Glycerinlösung (FocusClear) mit ausreichend hohem Brechungsindex behandelt.

Die Autoren haben die entwickelte Methode eingesetzt, um Fluoreszenzbildgebung am intakten Maushirn durchzuführen. Es wurde eine drei Monate alte Maus untersucht, die in einem Teil ihrer Neuronen eYFP unter der Kontrolle des Thy1-Promotors exprimiert. Die Autoren bildeten das gesamte Hirn mit zellulärer Auflösung mittels 1-Photonen-Mikroskopie und vernachlässigbarem Auflösungsverlust selbst in einer Tiefe von mehreren Millimetern ab. Die Abbildungstiefe war nun nicht mehr durch die Lichtstreuung, sondern nur noch durch den Arbeitsabstand des Objektivs (3.6 mm) limitiert. Daher waren beidseitige Aufnahmen für die Abbildung des gesamten Hirns (ca. 6 mm) erforderlich. Es ist wichtig anzumerken, dass CLARITY keine Gewebedeformierung und räumliche Umorientierung zur Folge hat, wie an membranständigen Proteinen, Dendritenfortsätzen und synaptischen Puncta gezeigt werden konnte. Dies beseitigte den größten Nachteil anderer Gewebeklärungstechniken (Tabelle 1).

Die Autoren zeigten weiterhin, dass CLARITY einen äußerst geringen Proteinverlust bewirkt, während das präparierte Gewebe vergleichsweise durchlässig für molekulare Sonden wie Antikörper ist (Abbildung 2c). Gewebeanalysen des gesamten Mausgehirns mittels Immunfärbung sind nun möglich (Abbildung 2d). Ferner zeigten die Autoren, dass CLARITY auch für Präparate verwendet werden kann, die viele Jahre in Formalin aufbewahrt wurden. Dies schließt menschliche Gewebeproben aus Kliniken und Gewebekörpern ein und eröffnet neue Anwendungen in der Medizin. Die sukzessive Verwendung von mehreren Antikörpern ist möglich, da diese denaturiert und in einem SDS-Waschschritt entfernt werden können. So können Mehrfachfärbungen und Multiparameteranalysen des Gewebes durchgeführt werden (Abbildung 2c). Unter den Zielepitopen können selbst Neurotransmitter detektiert werden, da bei CLARITY auch kleine Moleküle erhalten werden.

Wie erwähnt, ist die Bildgebungstiefe durch die Arbeitsstiefe des Mikroskopobjektivs begrenzt. Typische Objektive mit hoher Apertur erreichen maximal 3–4 mm, obwohl kürzlich eine Ausnahme mit einem Arbeitsabstand von 8 mm vorgestellt wurde.<sup>[10]</sup> Das Problem könnte weiter reduziert werden, wenn Lichtfeldilluminationsmikroskopie und möglicherweise ein rotierender Specimen<sup>[11]</sup> oder mehrere Objektive<sup>[12]</sup> eingesetzt werden. Dies würde die zulässige Probengröße mindestens verdoppeln, die Aufnahmezeit verkürzen und die auftretende Photobleichung reduzieren.<sup>[13]</sup>

Auch eine Kombination mit der Elektronenmikroskopie (EM) wird von den Autoren diskutiert. Das erscheint zunächst sehr attraktiv, doch lässt die Erfahrung aus der korrelativen Mikroskopie vermuten, dass die Aufgabe, die sehr großen und komplexen CLARITY-Bilder mit den winzigen EM-relevanten Ausschnitten zu überlagern, eine Herausforderung darstellen wird. Eine Lösung könnten bisher nicht

existente genetisch kodierte Metallkomplexe sein, die an das Zielmolekül angebracht werden. Eine weitere Alternative sind lokale photochemische Reaktionen, die Farbstoffe ablagern.<sup>[14]</sup>

Alle diese invasiven Methoden, inklusive CLARITY, zielen darauf ab, Momentaufnahmen des intakten Gewebes zu geben. Dynamische Prozesse mit diesen Methoden zu verfolgen, wird schwierig. Ein Weg hin zu mehr funktionellen (vs strukturellen) Experimenten könnte die Verwendung von „Gedächtnissonden“ sein. In Zukunft könnten diese Proben dem lebenden Tier verabreicht werden. Im Tier ändern sich die optischen Eigenschaften irreversibel (oder nicht). Zum Beispiel könnten Neuronen, die innerhalb eines Zeitintervalls aktiviert wurden, von solchen unterschieden werden, die still blieben. Dies könnte durch aktivitätsbasierte Sonden oder geeignete fluorogene Enzymsubstrate, die irreversibel gespalten werden, realisiert werden.<sup>[15]</sup>

Es wird interessant sein zu sehen, wie gut die Methode in Zukunft akzeptiert werden wird. Der Zeitbedarf der Experimente wird eine Größenordnung größer sein als wir es gewohnt sind, und auch die notwendige Datenanalyse wird signifikant aufwändiger. Selbstverständlich ist der Erkenntnisgewinn den Aufwand wert. CLARIFY ist ein weiterer Schritt in die neue Ära von Experimenten mit hohem Dateninhalt und steht in einer Linie mit Techniken wie Deep-Sequencing, Kryo-EM-Tomographie oder superhochauflösender und Lichtfeldmikroskopie.

Eingegangen am 11. Juli 2013  
Online veröffentlicht am 3. September 2013

- [1] R. Weissleder, B. D. Ross, A. Rehemtulla, S. S. Gambhir, *Molecular Imaging: Principles and Practice*, Peoples Medical, Shelton, **2010**.
- [2] a) J. Pawley, *Handbook of Biological Confocal Microscopy*, Springer, Berlin, **2006**; b) D. S. Lidke, K. A. Lidke, *J. Cell Sci.* **2012**, *125*, 2571–2580.
- [3] a) M. Fernández-Suárez, A. Y. Ting, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2008**, *9*, 929–943; b) S. J. Sigrist, B. L. Sabatini, *Curr. Opin. Neurobiol.* **2012**, *22*, 86–93.
- [4] P. Osten, T. W. Margrie, *Nat. Methods* **2013**, *10*, 515–523.
- [5] a) J. D. Bancroft, *Theory and Practice of Histological Techniques*, Elsevier, Amsterdam, **2008**; b) K. Becker, N. Jahrling, S. Saghaifi, R. Weiler, H. U. Dodt, *PLoS One* **2012**, *7*, e33916.
- [6] a) A. S. Chiang, W. Y. Lin, H. P. Liu, M. A. Pszczolkowski, T. F. Fu, S. L. Chiu, G. L. Holbrook, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2002**, *99*, 37–42; b) Y. C. Liu, A. S. Chiang, *Methods* **2003**, *30*, 86–93.
- [7] H. U. Dodt, U. Leischner, A. Schierloh, N. Jahrling, C. P. Mauch, K. Deininger, J. M. Deussing, M. Eder, W. Zieglgansberger, K. Becker, *Nat. Methods* **2007**, *4*, 331–336.
- [8] H. Hama, H. Kurokawa, H. Kawano, R. Ando, T. Shimogori, H. Noda, K. Fukami, A. Sakaü-Sawano, A. Miyawaki, *Nat. Neurosci.* **2011**, *14*, 1481–1488.
- [9] M. T. Ke, S. Fujimoto, T. Imai, *Nat. Neurosci.* **2013**, DOI: 10.1038/nn.3447.
- [10] K. Chung, J. Wallace, S. Y. Kim, S. Kalyanasundaram, A. S. Andalman, T. J. Davidson, J. J. Mirzabekov, K. A. Zalocousky, J. Mattis, A. K. Denisin, S. Pak, H. Bernstein, C. Ramakrishnan, L. Grosenick, V. Gradinaru, K. Deisseroth, *Nature* **2013**, *497*, 332–337.
- [11] J. Huisken, J. Swoger, F. Del Bene, J. Wittbrodt, E. H. Stelzer, *Science* **2004**, *305*, 1007–1009.

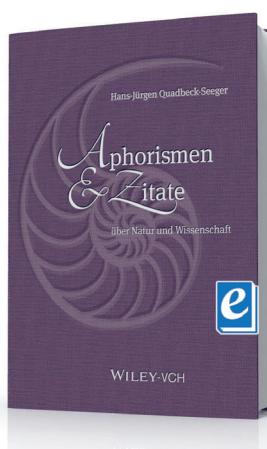
- [12] U. Krzic, S. Gunther, T. E. Saunders, S. J. Streichan, L. Hufnagel, *Nat. Methods* **2012**, *9*, 730–733.
- [13] P. J. Keller, H. U. Dodt, *Curr. Opin. Neurobiol.* **2012**, *22*, 138–143.
- [14] G. M. Gaietta, T. J. Deerinck, M. H. Ellisman, *Cold Spring Harb. Protoc.* **2011**, pdb prot5548.
- [15] a) A. Cobos-Correa, J. B. Trojanek, S. Diemer, M. A. Mall, C. Schultz, *Nat. Chem. Biol.* **2009**, *5*, 628–630; b) S. Gehrig, M. A. Mall, C. Schultz, *Angew. Chem.* **2012**, *124*, 6363–6366; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2012**, *51*, 6258–6261; c) J. Lee, M. Bogyo, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2013**, *17*, 118–126.



**Neugierig?**

**Sachbücher** von WILEY-VCH

Jetzt auch als E-Books unter: [www.wiley-vch.de/ebooks](http://www.wiley-vch.de/ebooks)



HANS-JÜRGEN  
QUADBECK-SEEGER

**Aphorismen  
und Zitate  
über Natur und  
Wissenschaft**

ISBN: 978-3-527-33613-5  
2013 340 S. mit 200 farbigen  
Abbildungen. Gebunden  
€ 24,90

Gewohnt inspirierend, witzig und zum Nachdenken anregend beschreibt Hans-Jürgen Quadbeck-Seeger nichts weniger als das Leben in all seinen (naturwissenschaftlichen) Facetten. Die Sammlung an Aphorismen von Literaten, Wissenschaftlern und berühmten Staatsmännern reicht dabei von A wie Konrad Adenauer bis Z wie Konrad Zuse. Die Untergliederung in verschiedene Themenbereiche ermöglicht es, stets den gerade passenden Sinspruch – für den Tag oder für den Vortrag – zu finden. Mit hochwertigem Leineneinband!

„.... Ein Vergnügen für jeden, der Dirge gerne mit wenigen Worten auf den Punkt bringt.“

Aus einer Buchbesprechung in DIE WELT

56484101306\_bu

Wiley-VCH • Postfach 10 11 61  
D-69451 Weinheim

Tel. +49 (0) 62 01-606-400  
Fax +49 (0) 62 01-606-184  
E-Mail: [service@wiley-vch.de](mailto:service@wiley-vch.de)

**WILEY-VCH**

[www.wiley-vch.de/sachbuch](http://www.wiley-vch.de/sachbuch)

Irrtum und Preisänderungen vorbehalten. Stand der Daten: August 2013