

Geklärte Gewebeproben für die optische Anatomie**

Dmytro A. Yushchenko und Carsten Schultz*

Fluoreszenzbildgebung · Gewebeklärung ·
Lichtstreuung · Mikroskopie

Detaillierte Beschreibungen von Organismen, Organen oder Gewebestrukturen sind die Grundlage jedes tieferen Verständnisses biologischer Funktion. Die bedeutendsten anatomischen Bildgebungsverfahren sind Positronenemissionstomographie (PET), Kernresonanztomographie (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).^[1]

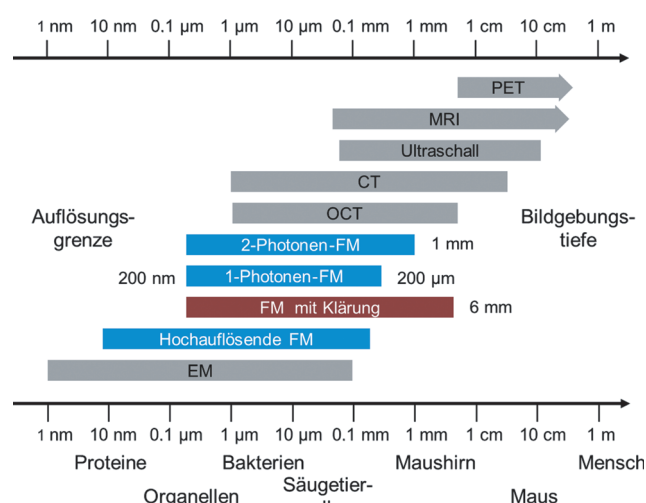


Abbildung 1. Vergleich verschiedener Bildgebungstechniken: PET: Positronenemissionstomographie, MRI: Kernresonanztomographie, CT: Computertomographie, OCT: optische Kohärenztomographie, FM: Fluoreszenzmikroskopie, EM: Elektronenmikroskopie.

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.^[2] Auf subzellulärer Ebene ermöglichen hochauflösende Fluoreszenzmikroskopietechniken, die theoretische, von Abbe beschriebene Auflösungsgrenze zu überwinden und biologische Objekte fast mit molekularer Auflösung abzubilden.^[3] 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.^[2a] Daher ist für 3D-Bilder von Organen und Organismen die Anfertigung von Gewebeschnitten und anschließende dreidimensionale Bildrekonstruktion notwendig.^[4] 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 Löschung des fluoreszierenden Reportermoleküls.^[5] Kürzlich wurden mehrere verbesserte Methoden zur Gewebeklärung entwickelt, die auf der Inkubation mit einem Immersionsmedium mit dem gleichen Brechungsindex wie dem des Objekts basieren.^[6–10] 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^[6] führt nur zu moderaten Transparenzverbesserungen, BABB (basierend auf einer Benzylalkohol/Benzylbenzoat-Mischung)^[7] verursacht einen signifikanten Intensitätsverlust fluoreszierender Proteine, Scale^[8] verwendet Harnstoff und SeeDB^[9] Fructose mit Thioglycerin, was diese Methoden unvereinbar mit Antikörpermakierungen macht. Ferner verändern alle Methoden außer SeeDB^[9] 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 (Transregio 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.

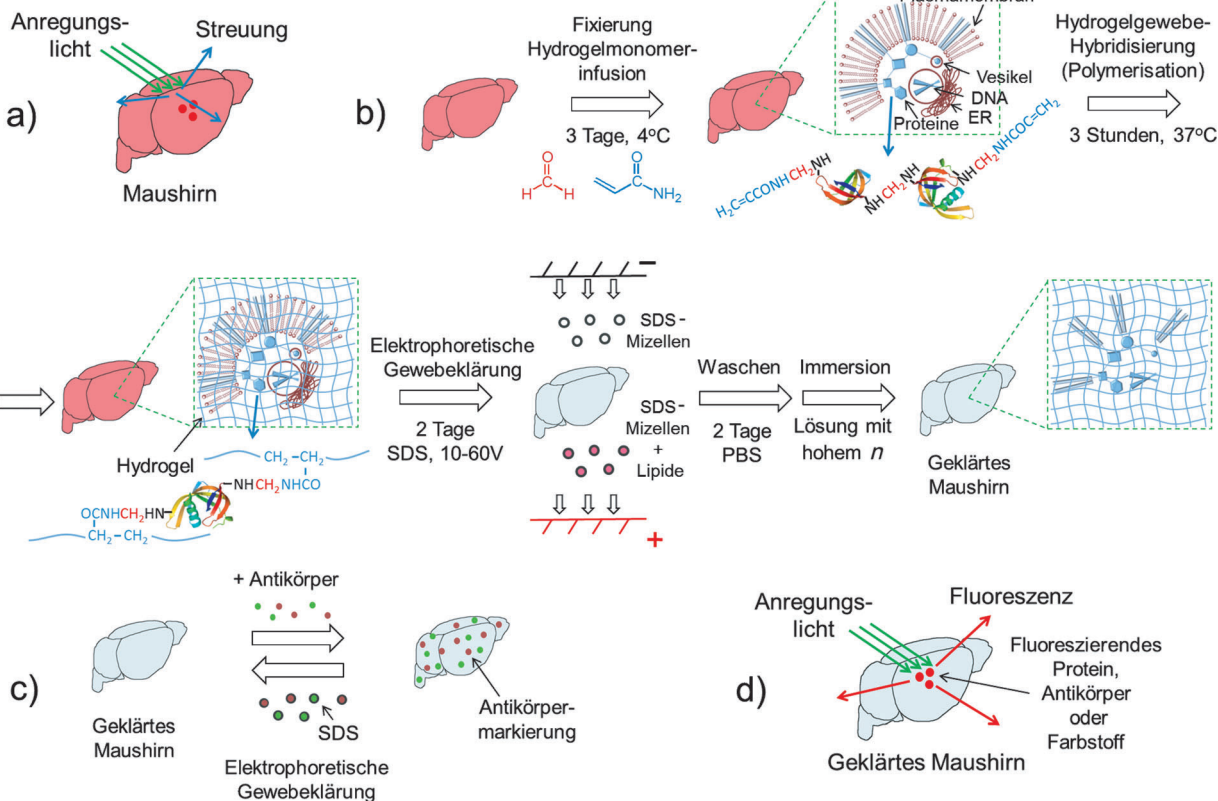


Abbildung 2. a) Lichtstreuung in biologischem Gewebe. b) Arbeitsgänge der Gewebeklärung durch CLARITY (n : Brechungsindex). c) Reversibles Färben von geklärtem Gewebe durch Antikörper. d) Tiefe Lichteindringung und Fluoreszenzanregung in geklärtem Gewebe.

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
Immunfärbeverträglichkeit	ja (viele Durchgänge)	nein	nein	ja	ja	ja
Gewebedeformation	nein	nein	Expansion	Schrumpfen	Schrumpfen	Schrumpfen
Zeitbedarf der Gewebeklärung	8 Tage	3 Tage	Tage bis Monate	3 Tage	Stunden	Stunden
Zusammensetzung	Polyacrylamid-Hydrogel	Fructose, Thioglycerin	Harnstoff	BnOH, PhCOOBn	nicht relevant	Xylol, Chloroform
Lit.	[10]	[9]	[8]	[7]	[6]	[5]

Ein konzeptionell erweitertes Verfahren zur Gewebeklä-
rung wurde vor kurzem von Deisseroth und Mitarbeitern in
Nature publiziert.^[10] Die Autoren erhöhten die Transparenz
von biologischem Gewebe durch Entfernen der Lipidmem-
branen. Um alle nicht-lipophilen Moleküle, vor allem Pro-
teine und Polynukleotide, in ihrer originalen Position zu be-
lassen, wurde molekulares Verknüpfen durch Fixierung ge-
folgt 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 CARITY genannt. Die Extraktion aller nicht-ver-
knüpften Lipide wurde durch die Verwendung einer Elek-
trophorese erzielt – ein intelligenter Weg, die Aufklärungszeit
zu verkürzen. Daher kann die Lokalisierung z.B. von fluo-
reszierenden 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 Hydrogernetzes einzuleiten.

Im nächsten Schritt wurden die Lipide entfernt. Da ungerichtete Wanderung selbst kleiner Moleküle in großen Objekten sehr langsam vonstatten geht, wurde Natriumdocylsulfat (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 Thyl1-Promotors experimentiert. 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 Gewebeklärunstechniken (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). Gewebepreparationen 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 Gewebebanken 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 Arbeitstiefe 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.^[10] Das Problem könnte weiter reduziert werden, wenn Lichtfeldilluminationmikroskopie und möglicherweise ein rotierendes Specimen^[11] oder mehrere Objektive^[12] eingesetzt werden. Dies würde die zulässige Probengröße mindestens verdoppeln, die Aufnahmezeit verkürzen und die auftretende Photobleichung reduzieren.^[13]

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.^[14]

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.^[15]


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. CLARITY 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. Saghaei, 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. Ziegler, *Nat. Methods* 2007, 4, 331–336.
- [8] H. Hama, H. Kurokawa, H. Kawano, R. Ando, T. Shimogori, H. Noda, K. Fukami, A. Sakai-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. Zalocusky, J. Mattis, A. K. Denisin, S. Pak, H. Bernstein, C. Ramakrishnan, L. Grose, V. Gradinaru, K. Deisseroth, *Nature* 2013, 497, 332–337.
- [11] J. Huiskens, J. Swoger, F. Del Bene, J. Wittbrodt, E. H. Stelzer, *Science* 2004, 305, 1007–1009.

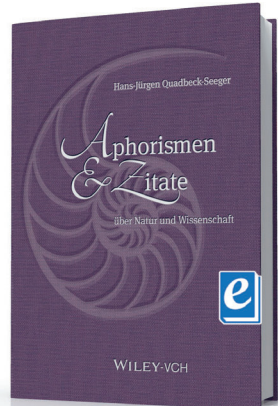
- [12] U. Krzic, S. Gunther, T. E. Saunders, S. J. Streichan, L. Hufnagel, *Nat. Methods* **2012**, 9, 730–733.
- [13] P. J. Keller, H. U. Dodt, *Curr. Opin. Neurobiol.* **2012**, 22, 138–143.
- [14] G. M. Gaietta, T. J. Deerinck, M. H. Ellisman, *Cold Spring Harb. Protoc.* **2011**, pdb prot5548.
- [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. Bogoy, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2013**, 17, 118–126.



Neugierig?

Sachbücher von WILEY-VCH

 Jetzt auch als E-Books unter:
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 verschiedenste Themenbereiche ermöglicht es, stets den gerade passenden Sinnspruch – für den Tag oder für den Vortrag – zu finden. Mit hochwertigem Leineneinband!

„... Ein Vergnügen für jeden, der Dinge gerne mit wenigen Worten auf den Punkt bringt.“
 Aus einer Buchbesprechung in *DIE WELT*

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

WILEY-VCH

www.wiley-vch.de/sachbuch Irrtum und Preisänderungen vorbehalten. Stand der Daten: August 2013

56484101306_bu