

30.03.12

US-Patent erteilt für GFP Super Resolution Lokalisations-Mikroskopie

"Das erteilte US-Patent für den Einsatz von herkömmlichen fluoreszierenden Farbstoffen ist ein starkes Alleinstellungsmerkmal für unsere Super Resolution Mikroskopie. Das Patent stellt einen erheblichen Marktvorteil im Vergleich zu verwandten Methoden dar. Diese arbeiten mit speziellen, aufwendig designten photoschalt- oder photoaktivierbaren fluoreszierenden Farbstoffen oder benötigen für die Zellen schädliche Bedingungen", so Dr. Andrea Nestl, Innovationsmanagerin des Technologie-Lizenz-Büros (TLB) und verantwortlich für Patentstrategie, Marketing und Kommerzialisierung dieses Patentportfolios. "Diese Patenterteilung stellte eine bemerkenswerte Wertsteigerung unseres Patentportfolios dar, welches 2D und 3D Super Resolution Mikroskopie in Form der Lokalisationsmikroskopie und der strukturierten Beleuchtung mit molekularbiologischen Anwendungen kombiniert."

Grundlegend für die SPDMphymod-Technologie (physically modifiable fluorophores) ist das Phänomen der blinkenden Moleküle. Die fluoreszierenden Moleküle geben Licht gleicher spektraler Frequenz ab, jedoch mit verschiedener spektraler Signatur, bedingt durch ihre charakteristischen Blink-Eigenschaften. Herkömmliche, gut etablierte und kostengünstige Fluoreszenzfarbstoffe wie natürlich vorkommendes GFP, dessen Derivate RFP, YFP sowie Alexa, Atto, Cy2 und Cy3 Farbstoffe, können somit ohne weitere Modifikation verwendet werden. Ein weiterer praktischer Vorteil für den Laboralltag ergibt sich durch die Verwendung von Standard-Einbettungsmitteln für Präparate oder durch das Arbeiten unter den physiologischen Bedingungen der lebenden Zelle. Zwei oder drei herkömmliche Farbstoffe können so nanoskopisch im Co-Lokalisations-Modus erfasst werden, entweder als Fluoreszenz-Fusionsproteine, als fluoreszenz-markierte Antikörper oder als Kombinationen davon.

Millionen weltweit bereits vorhandener biologischer Proben, können nun endlich auch auf Einzelmolekülebene untersucht werden. Dies erfolgt ohne zusätzlichen technischen Aufwand, denn die Proben werden genauso wie bei einer Untersuchung mit einem gewöhnlichen konfokalen Fluoreszenz- oder Epifluoreszenzmikroskop behandelt.

Mit dem Wissen, dass dies die Super Resolution Lichtmikroskopie revolutionieren wird, reichte Prof. Cremer die SPDMphymod-Technologie am 19. März 2008 zur Patentanmeldung ein. Die Veröffentlichungen der wissenschaftlichen Ergebnisse folgten im Mai 2008 (Reymann et al.*) und im September 2008 (Lemmer et al.**).

Seitdem hat das Cremer-Labor stetig neue biologische Anwendungen zur SPDMphymod-Technologie durchgeführt und publiziert und konnte somit die Relevanz dieser Schlüsseltechnologie für die molekularbiologische Forschung

Pressekontakt

Annette Siller, M.A.

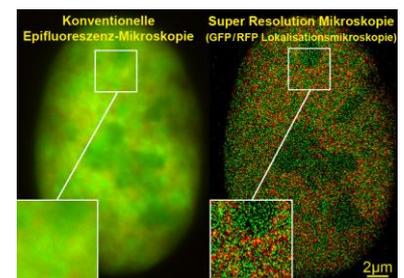
Technologie-Lizenz-Büro (TLB)

Ettlinger Straße 25

76137 Karlsruhe | Germany

Telefon +49 721-79004-0

asiller@tlb.de | www.tlb.de



GFP / RFP Zweifarben-Lokalisationsmikroskopie SPDMphymod / Super Resolution Mikroskopie im Zellkern einer Knochenzelle. Genaue Zählung der Einzelmoleküle: 70.000 RFP-H2A Histonmoleküle und 50.000 GFP-Snf2H Chromatin Remodeling Proteine (Blickfeld von $470 \mu\text{m}^2$, optische Tiefe von 600 nm, jeder Punkt repräsentiert ein einzelnes Molekül, Gesamtzahl 120.000).

unter Beweis stellen: von nanoskopischen Untersuchungen des Zellkerns bis hin molekularen Studien von Zellkernmembranen, zytoplasmatischen Strukturen, klinisch wichtigen Zellmembranrezeptoren und der Analyse von Zellverbindingssystemen (Cremer et al. J. Biotechnology 2011 6; Kaufmann et al PLoSOne 2012***).

Durch die Verwendung sichtbaren Laserlichts können nicht nur große Zellbereiche zweidimensional untersucht werden, sondern auch Zellkomplexe mit einer räumlichen Auflösung jeden Details bis in den Bereich von wenigen Nanometern in 2D oder einigen zehn nm im 3D-Modus. Die 2D-Auflösung erfolgt bis zu einer Dichte von $2,8 \cdot 10.000/\mu\text{m}^2$ innerhalb einer Fläche von bis zu $5.000 \mu\text{m}^2$.

<http://www.slideshare.net/Nestl/super-resolution-microscopy-christoph-cremer>

Hat der Einsatz des natürlich vorkommenden GFP (grün fluoreszierenden Proteins aus Quallen) und seiner Derivate bereits die Möglichkeiten der zellbiologischen Untersuchungen revolutioniert, so beginnt in Kombination mit der Super Resolution Mikroskopie eine neue Ära der biomolekularen Forschung. Martin Chalfie, Osamu Shimomura, und Roger Y. Tsien wurden 2008 mit dem Nobelpreis für Chemie für ihre Entdeckung, Entwicklung und Einsatz in der Molekularbiologie des grün fluoreszierenden Proteins ausgezeichnet.

Das US-Patent für SPDMphymod basiert auf der SPDM (Spectral Precision Distance Microscopy) Patent-Familie, der ersten beschriebenen Weitfeld basierten Lokalisierungs-Mikroskopie-Technik (seit Mitte der 1990er Jahre), welche eine effektive optische Auflösung erreicht, die um ein Vielfaches besser ist als die konventionelle optischen Auflösung. Christoph Cremer hat bereits 1971 die theoretischen Berechnungen für den Bau des 4Pi Super Resolution Mikroskops zum Patent angemeldet und damit die seit 140 Jahren anerkannte Lehrmeinung, der sogenannten Abbeschen Beugungsgrenze, überwunden.

Die zukunftsweisende SPDMphymod Technologie beruht auf einem einfachen technischen Aufbau und bietet den zusätzlichen Vorteil, dass eine einzige Laserwellenlänge geeigneter Intensität für das Nanoimaging von Molekülen ausreicht – im Unterschied zu anderen Lokalisationsmikroskopie-Technologien, welche typischerweise zwei Laserwellenlängen in Verbindung mit speziellen photo-schaltbaren oder photo-aktivierbaren Molekülen und / oder eine bestimmte chemische Umgebung benötigen.

Es ist entscheidend für SPDMphymod, dass durch die Lichtenregung ein einzelnes Molekül zunächst in einen sehr langlebigen reversiblen dunklen Zustand fällt (mit einer Halbwertszeit von mehreren Sekunden bis Minuten, also um Größenordnungen länger als die typischen Grundzustand-Triplett-Übergänge), von dem aus es in einen fluoreszierenden Zustand zurückkehrt.

Dabei emittiert es viele Tausende von Photonen innerhalb mehrerer Zehntel Millisekunden, bevor es in einen sehr langlebigen sogenannten irreversiblen dunklen Zustand zurückfällt.

„Es ist ein bedeutender Marktvorteil, dass es so vielfältige Einsatzmöglichkeiten für dieses Patent gibt“, so Dr. Andrea Nestl, die im Auftrag der Universität Heidelberg die Strategien zur Patentierung und Vermarktung entwickelt. Das Patent-Portfolio für die 2D und 3D Super Resolution Mikroskopie in Form der Lokalisationsmikroskopie und der strukturierten Beleuchtung wird in Kombination mit molekularbiologischen Anwendungen in der Zukunft eine wichtige Rolle in der pharmazeutischen, zellbiologischen, medizinischen und biophysikalischen Forschung spielen, das heißt, überall dort, wo molekulares Nanoimaging auf zellulärer Ebene erforderlich ist. So können verborgene Proteine oder Nukleinsäuren eines pharmakologisch aktiven 3D-Molekül-Komplex sichtbar gemacht werden, ohne den Komplex selbst zu zerstören. <http://idw-online.de/pages/de/news457531>

Christoph Cremer ist Professor am Kirchhoff Institut für Physik und am Institut für Pharmazie und Molekulare Biotechnologie (IPMB), beides an der Universität Heidelberg. Seit 2011 ist er zudem Gruppenleiter im Bereich der Super Resolution Mikroskopie am Institut für Molekulare Biologie gGmbH (IMB) in Mainz. Darüber hinaus ist er wissenschaftliches Mitglied des US-amerikanischen Jackson Laboratories in Bar Harbor / Maine. Cremer vertritt die Universität Heidelberg beim Deutschen Hochschulverband (DHV) und ist seit vielen Jahren Mitglied im Senat, dem wichtigsten Entscheidungsgremium der Universität Heidelberg; 2006 bis 2009 war er dessen zweiter Sprecher.

Literatur

*J. Reymann, D. Baddeley, P. Lemmer, W. Stadter, T. Jegou, K. Rippe, C. Cremer, U. Birk (2008) High precision structural analysis of subnuclear complexes in fixed and live cells via Spatially Modulated Illumination (SMI) microscopy. *Chromosome Research* 16: 367 –382.

**P. Lemmer, M.Gunkel, D.Baddeley, R. Kaufmann, A. Urich, Y. Weiland, J.Reymann, P. Müller, M. Hausmann, C. Cremer (2008) SPDM – Light Microscopy with Single Molecule Resolution at the Nanoscale. *Applied Physics B* 93: 1-12.

***Kaufmann R, Piontek J, Grüll F, Kirchgessner M, Rossa J, Wolburg H, Blasig IE and Cremer C (2012). Visualization and quantitative analysis of reconstituted tight junctions using localization microscopy. *PLoS One*, 7, e31128.

Manuel Gunkel, Fabian Erdel, Karsten Rippe, Paul Lemmer, Rainer Kaufmann, Christoph Hörmann, Roman Amberger and Christoph Cremer (2009): Dual color localization microscopy of cellular nanostructures. In: *Biotechnology Journal* 4, 927-938.

