

## ST 12 Biophysikalische Nanoskopie

Zeit: Mittwoch 10:00–12:10

Raum: D

**Hauptvortrag**

ST 12.1 Mi 10:00 D

**Laseroptical Nanoscopy: New Tools for Single Cell Analysis** — ●CHRISTOPH CREMER — Kirchhoff-Institut für Physik Universität Heidelberg, Im Neuenheimer Feld 227, D-69120 Heidelberg

For analytical pathology, a serious problem for the extension of \*large scale\* and \*mesoscale\* fluorescence image analyses of cellular structures to cellular nanostructures is the light microscopical resolution conventionally limited to about 200 nm laterally and 600 nm axially. In recent years, various laseroptical \*nanoscopy\* approaches to overcome this impasse have been developed. In this overview, optical principles and application examples will be presented for: (1)Improvement of optical resolution by confocal laser scanning 4Pi-microscopy (limit of the present device at Kirchhoff-Institute about 100 nm axially using 2-Photon infrared excitation) and application to the analysis of membrane complexes and DNA replication factories. (2) Improvement of size resolution by Spatially Modulated Illumination (SMI) Microscopy (resolution of axial object extension down to few tens of nm using 1-Photon visible range laser excitation) and its application to the nanosizing of fluorescence labelled membrane complexes; of replication and transcription factories; and of specific gene domains. (3) Improvement of topological resolution by Spectral Precision Distance Microscopy of multispectrally labelled targets (3D distance resolution of few tens of nm) and its application in the analysis of specific gene domains.

ST 12.2 Mi 10:30 D

**Computer modelling of nuclear structure allows accurate estimations of chromosome aberration frequencies** — ●GREGOR KRETH — Kirchhoff Institut für Physik

The spatial organization of the genome in the interphase nucleus has far reaching consequences for radiation biophysics. For example, the existence of chromosome territories (CTs) and their spatial distribution in the human cell nucleus is expected to pose serious constraints on the induction of specific chromosome aberrations by ionizing radiation. E.g. various experiments revealed a non-random arrangement of CTs in human lymphocyte cell nuclei. Such a clearly non random organization of nuclear genome "macro" structure has raised the question to what extent this organization favors specific interchange aberration frequencies. The spatial proximity of certain CTs or even of clusters of CTs has to increase the respective exchange yields significantly in comparison to a random association of CTs. Computer simulations of nuclear genome structure based on experimentally known general features allow to predict chromosome aberration yields induced by ionizing radiation. As an example, in this report computer simulated arrangements of CTs in human cell nuclei models ("1-Mbp Spherical Chromatin Domain Model") were assumed to calculate interchange frequencies between all heterologous CT pairs. For the positioning of CTs in the virtual nuclear volume, both a statistical and a gene density correlated arrangement was assumed. Under the assumption of an initial repair rate, the calculated absolute aberration frequencies were found to be in good agreement with an experimental study of Arsuaga et al. 2004.

ST 12.3 Mi 10:40 D

**Fokussierte Fluoreszenzmarkierung von Genomregionen für die Mikroskopie** — ●MICHAEL HAUSMANN<sup>1</sup>, JUTTA SCHWARZFINSTERLE<sup>1</sup>, STEFAN STEIN<sup>1</sup>, EBERHARD SCHMITT<sup>2</sup> und CHRISTOPH CREMER<sup>1</sup> — <sup>1</sup>Kirchhoff-Institut für Physik, Universität Heidelberg, Im Neuenheimer Feld 227, 69120 Heidelberg — <sup>2</sup>Fritz-Lipmann-Institut, Beutenbergstr. 11, 07745 Jena

Für eine detaillierte Untersuchung der Strahlenwirkung ist es von Bedeutung, gezielt Genomregionen mikroskopisch zu analysieren, die als besonders strahlenempfindlich gelten oder die kausal mit der Entstehung von Tumoren korrelieren. Eine etablierte Fluoreszenzmarkierungsmethode solcher Genomregionen in Zellkernen stellt die Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH) dar. Aufgrund molekularbiologischer Bedingungen bei der Herstellung markieren DNA FISH-Sonden allerdings nicht immer die gewünschte Markierungsstelle exakt oder vollständig deckungsgleich. Die kombinatorische Oligonukleotidmarkierung löst dieses Problem. Durch eine theoretische Bestimmung von kolokalisierenden Nanomarkern in der Humangenomdatenbank ist es möglich, ein auf ein Chromatintarget fokussiertes Sondenset zu konfigurieren, das anschließend in Form von DNA- oder PNA-Sequenzen synthetisiert wird. Am Beispiel der abl und bcr Bruchpunktregionen wird diese neue Markierungstechnolo-

gie im Zusammenhang mit Anwendungen in der Fluoreszenzmikroskopie vorgestellt. Durch die hohe Flexibilität des Verfahrens geht das Anwendungspotential aber weit über die vorgestellten Beispiele hinaus.

ST 12.4 Mi 10:50 D

**In-vivo Analysen nuklearer Nanostrukturen mittels hochauflösender Nanoskopie** — ●JÜRGEN REYMANN<sup>1</sup>, DAVID BADDELEY<sup>1</sup>, CHRISTIAN CARL<sup>1</sup>, WERNER STADTER<sup>2</sup>, MARIETTE VAN DE CORPUT<sup>3</sup>, FRANK GROSVELD<sup>3</sup>, CHRISTOPH CREMER<sup>1</sup> und UDO BIRK<sup>1</sup> — <sup>1</sup>Kirchhoff Institut für Physik, Universität Heidelberg — <sup>2</sup>Universität für angewandte Wissenschaften, Hamburg — <sup>3</sup>Department of Cell Biology and Genetics, EMC Rotterdam

Das Spatially Modulated Illumination (SMI) -Mikroskop ist ein Weitfeld Fluoreszenz Mikroskop mit strukturierter Beleuchtung, bei dem zwei sich entgegengesetzt fortpflanzende Laserstrahlen, zu konstruktiver Interferenz gebracht werden und ein stehendes Wellenfeld ausbilden. Dieses lichtoptische Analyseverfahren für biologische Objekte erlaubt Größenbestimmungen in molekularen Dimensionen von einigen zehn Nanometern, die über die konventionelle lichtoptische Auflösungsgrenze hinausgehen. Quantitative Studien von nuklearen Nanostrukturen wie Protein-Komplexe, oder der Kompaktierung und Topologie von Gen-Sequenzen werden damit erheblich verbessert. Durch die Erweiterung des SMI-Mikroskops zur Realisierung von in-vivo Messungen, d.h. der Analyse von lebenden Zellen mit einem vertikalen Aufbau des SMI (dem sogenannten Vertico-SMI), können die Vorteile der SMI-Technologie auf vitale biologische Nanostrukturen erweitert werden. Hier stellen wir die Erweiterung der SMI-Technologie zur Realisierung von in-vivo Messungen durch das Vertico-SMI vor. Als zentralem Bestandteil wird dabei auf erste Kalibrationsmessungen und die Vorbereitung des Systems zum in-vivo Betrieb eingegangen.

ST 12.5 Mi 11:30 D

**SMI-Mikroskopie mit einem Objektiv** — ●HANS MATHÉE<sup>1</sup>, DAVID BADDELEY<sup>1</sup>, CHRISTOPH WOTZLAW<sup>2</sup>, CHRISTOPH CREMER<sup>1</sup> und UDO BIRK<sup>1</sup> — <sup>1</sup>Kirchhoff-Institut für Physik, Universität Heidelberg, INF 227, 69115 Heidelberg — <sup>2</sup>Institut für Physiologie, Universität Duisburg-Essen, Hufelandstraße 55, 45122 Essen

Das SMI-(Spatially Modulated Illumination) Mikroskop ist ein Weitfeld-Fluoreszenzmikroskop mit einer axialen räumlich modulierten Beleuchtung. Diese macht Strukturinformation von fluoreszierenden Objekten zugänglich, die Größen unterhalb der klassischen Auflösungsgrenze eines Fluoreszenzmikroskops (etwa 200nm lateral und 450nm axial) besitzen und dadurch als beugungsbegrenzte Punkte abgebildet werden. Der Anwendungsbereich dieser Methode liegt derzeit vor allem in der Analyse von fluoreszenzmarkierten biologischen Nanostrukturen im Innern von Zellen.

Bisher verwendete man für die Erzeugung der axial strukturierten Beleuchtung zwei interferierende, gegenläufige Laserstrahlen, die in zwei gegenüber stehende Objektive eingekoppelt wurden. In einem neuen, kompakteren Aufbau wurde dies durch die Verwendung eines Spiegels an Stelle des zweiten Objektivs wesentlich vereinfacht. Vorgestellt werden das Potenzial dieser Methode für die Untersuchung kleinster biologischer Objekte, ein Vergleich zwischen beiden SMI-Mikroskop Aufbauten, sowie Nanostrukturuntersuchung des transkriptionalen Aktivitätszustandes einzelner, spezifisch fluoreszenzmarkierter Genregionen in menschlichen Zellkernen.

ST 12.6 Mi 11:40 D

**Model based parameter estimation for high resolution optical microscopy** — ●DAVID BADDELEY, HANS MATHÉE, ELVIRA STEINWAND, CLAUDIA BATRAM, CHRISTOPH CREMER, and UDO BIRK — Kirchhoff Institute für Physik, Universität Heidelberg

Novel methods of light microscopy such as 4Pi and Spatially Illuminated Illumination (SMI) microscopy provide us with information on a size scale significantly below that offered by conventional optical microscopy. In some cases (for instance the 2Photon 4Pi variants) high resolution imaging is possible after mathematical reconstruction, but in SMI microscopy and the one-photon 4Pi variants the Optical Transfer Function (OTF) lacks the continuous support required for unambiguous image reconstruction. The same can be true for 2Photon 4Pi microscopy in cases of imperfect alignment. In such cases a model based approach allows us to evaluate the data without the need for deconvolution. Model

based approaches also offer better (sub-resolution) accuracy and reliability than image based methods, as shown in a measurement repeatability of approx 2nm in our SMI distance measurements. We present an automated, model based, approach to the analysis of SMI, 4Pi, and conventional confocal images along with various examples of its application.

ST 12.7 Mi 11:50 D

**TIRF und 4Pi-Mikroskopie-Analyse der Membranverteilung kardialer Kir2.x Kanäle** — •ROMAN AMBERGER<sup>1</sup>, ELVIRA STEINWAND<sup>1</sup>, EDGAR ZITRON<sup>2</sup>, CHRISTIAN CARL<sup>1</sup>, SONJA LÜCK<sup>2</sup>, CLAUDIA KIESECKER<sup>2</sup>, EBERHARD SCHOLZ<sup>2</sup>, DIERK THOMAS<sup>2</sup>, SVEN KATHÖFER<sup>2</sup>, CLEMENS STOCKKLAUSNER<sup>3</sup>, JOHANN KIEHN<sup>2</sup>, RÜDIGER BECKER<sup>2</sup>, HUGO KATUS<sup>2</sup>, CHRISTOPH KARLE<sup>2</sup>, CHRISTOPH CREMER<sup>1</sup> und UDO BIRK<sup>1</sup> — <sup>1</sup>Kirchhoff-Institut für Physik, Universität Heidelberg — <sup>2</sup>Innere Medizin III (Kardiologie), Medizinische Universitätsklinik Heidelberg — <sup>3</sup>Pädiatrische Onkologie, Universitätskinderklinik Heidelberg

Bei Herzrhythmusstörungen nimmt die Kir 2.x Familie der Kaliumkanäle eine zentrale Rolle ein. Cluster dieser Kanäle und ihre Anordnung auf der Zellmembran können mit hoch auflösender optischer Fluoreszenzmikroskopie untersucht, und durch spezielle Markierung in Unterfamilien getrennt detektiert werden. Die von uns angewandten Techniken der 4Pi Mikroskopie und Total Internal Reflection Fluorescence (TIRF) Mikroskopie bieten eine extrem hohe optische axiale Auflösung. Um die ohnehin schon hohe Auflösung von TIRF auch lateral zu erhöhen, wird ein stehendes Wellenfeld erzeugt, welches eine optische Auflösung von etwa 100nm ermöglicht. Mit unseren Messungen konnten wir erstmals mit Methoden der Weitfelddetektion und 4Pi Mikroskopie die Clusterbildung der Kanäle zeigen. Im Moment führen wir multispektrale Messungen an mit GFP-Varianten markierten Kanälen durch, um gemeinsame Unterkanaleinheiten nachzuweisen.

ST 12.8 Mi 12:00 D

**Radiation induced DNA fragmentation - AFM study.** — •KATARZYNA PSONKA<sup>1,2</sup>, GISELA TAUCHER-SCHOLZ<sup>2</sup>, and EWA GUDOWSKA-NOWAK<sup>1,2</sup> — <sup>1</sup>Jagiellonian University, Institute of Physics, Cracow, Poland — <sup>2</sup>Gesellschaft für Schwerionenforschung, Darmstadt, Germany

Ionizing radiation produces a plethora of lesions in DNA including strand breaks (single or double) and alteration to bases. Double-strand breaks (DSBs) leading to DNA fragmentation are considered to be the most critical lesions resulting in cell killing, cancerogenesis or mutations. We have used Atomic Force Microscopy (AFM) to visualize the DNA fragmentation induced by heavy ions (high LET radiation) and to compare it to the fragmentation pattern obtained after X-rays (low LET radiation). Plasmid DNA was irradiated in vitro with X-rays and 3.9 MeV/u Ni ions within a dose range 0-3000 Gy. Afterwards, the samples were analyzed using AFM, which allowed the detection and length measurement of individual fragments with a nanometer resolution. Recording of the length of the induced fragments allowed to distinguish between molecules broken by a single DSB or by multiple DSBs. The fragment length distributions were derived for different doses and different radiation qualities. Our results show an influence of radiation quality on DSB production. Enhanced induction of short fragments after high LET radiation corresponds to the locally correlated induction of DSB within individual particle tracks.