



REPUBLIK
ÖSTERREICH
Patentamt

(10) Nummer: **AT 410 718 B**

(12)

PATENTCHRIFT

(21) Anmeldenummer: A 1799/98
(22) Anmeldetag: 28.10.1998
(42) Beginn der Patentdauer: 15.11.2002
(45) Ausgabetag: 25.07.2003

(51) Int. Cl.⁷: **G01N 21/64**
G01N 21/76

(56) Entgegenhaltungen:
GB 2231958A US 5528046A US 4793705A

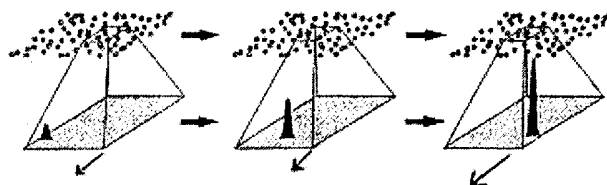
(73) Patentinhaber:
SCHINDLER HANSGEORG DR.
A-4040 LINZ, OBERÖSTERREICH (AT).
INNOVATIONS AGENTUR GESELLSCHAFT
M.B.H.
A-1020 WIEN (AT).

(54) VORRICHTUNG ZUR VISUALISIERUNG VON MOLEKÜLEN

AT 410 718 B

(57) Beschrieben wird eine Vorrichtung zur Visualisierung von Molekülen, von deren Bewegung und von Wechselwirkungen zwischen Molekülen und von molekularen Prozessen in einer Probe unter Verwendung der Single-Dye-Tracing" (SDT-)Methode, umfassend einen Objektträger mit der Probe, ein hochempfindliches Detektions- und Analysesystem, das eine Charged Coupled Device (CCD)-Kamera, welche einen Frameshift aufweist, und einen Laser umfasst, die dadurch gekennzeichnet ist, dass die Probe und/oder das Detektions- und Analysesystem beim Messprozess relativ zueinander kontinuierlich verschiebbar sind, und die Relativverschiebung zwischen Probe und Detektions- und Analysesystem durch eine Steuerungseinheit im Detektions- und Analysesystem steuerbar ist, welche Steuerungseinheit einen Prozessor umfasst und durch den Frameshift der CCD-Kamera direkt triggerbar ist.

FIG. 4



Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Visualisierung von Molekülen, von Wechselwirkungen zwischen Molekülen und von molekularen Prozessen in einer Probe unter Verwendung der Einzelfarbstoff-Markierungsmethode, sowie Vorrichtungen zur Durchführung derartiger Verfahren.

Das Ziel von hoch-sensitiven Detektionssystemen ist die Beobachtung auf dem Niveau einzelner Atome bzw. Moleküle. Dies wurde erstmals durch die Erfindung der "Scanning Probe" Mikroskopie-Methoden ermöglicht (EP 0 027 517-B1; Binnig et al., Phys. Rev. Lett. 56 (1986), Seiten 930-933; Drake et al., Science 243 (1989), Seiten 1586-1589). Aber auch mit optischen Methoden wurde die Detektion von einzelnen Molekülen ermöglicht. Die effektive Lichtumwandlung durch fluoreszente Moleküle ermöglichte auch die Detektion von einzelnen Fluorophoren in Flüssigkeiten durch konfokale Fluoreszenzmikroskopie sowie die Durchführung von einer hochauflösenden Spektroskopie von Einzelfarbstoff-("Single-Dye") Molekülen bei niedrigen Temperaturen.

Die erste wirkliche Abbildung von Einzelfarbstoff-Molekülen durch optische Mittel wurde durch optische Nahfeld-Scanning-Mikroskopie erreicht (Betzig et al., Science 262 (1993), 1422-1425). Mit diesem Verfahren wurde eine räumliche Auflösung von rund 14 nm erzielt, also weit unter der optischen Diffraktionsgrenze, diese Methode ist jedoch bei ihrer Anwendung auf unbewegliche Objekte beschränkt.

Weiters gelang es, einzelne Fluoreszenz-markierte Myosin-Moleküle auf immobilisierten Actinfilamenten durch konventionelle Mikroskopie und Beleuchtungszeiten von Sekunden darzustellen (Funatsu et al., Nature 374 (1995), Seiten 555-559). Die Methode ist auf Beobachtungen in unmittelbarer Nähe der Substratoberfläche (bis etwa 100 nm Abstand) beschränkt.

Um biologische Systeme allerdings in ihrer Ausdehnung und in ihrer natürlichen Funktion und ihrer physiologischen Wirkungsweise untersuchen zu können, ist die Visualisierung von einzelnen Fluorophoren in komplexen Systemen und in Bewegung erforderlich. Bislang wurde die Bewegung von Einzelfarbstoff-Molekülen lediglich für Fluoreszenz-markierte Lipide in einem künstlichen Lipidmembransystem dargestellt (Schmidt et al., PNAS 93 (1996), Seiten 2926-2929). Die hierbei verwendete Methodik wird im Allgemeinen als "Single-Dye-Tracing" oder "Single-Dye-Tracking" (SDT)-Methode bezeichnet, da es damit möglich ist, den Weg eines einzigen Fluoreszenz-markierten Moleküls exakt und (als einzelnes Molekül) stöchiometrisch zu verfolgen, ohne daß es für die Signalgebung einer Wechselwirkung (Verstärkung) mit anderen Komponenten bedarf (etwa durch Bindung, räumliches Nahverhältnis, etc.)

Die Detektion von Einzelfarbstoff-markierten Molekülen in zellulären Systemen, welche für ein Studium von Molekülen oder Wechselwirkungen zwischen Molekülen in lebenden Systemen erforderlich wäre, ist allerdings mit den beschriebenen Methoden nicht möglich. Dies liegt einerseits daran, daß lebende Zellen im Gegensatz zu ebenen (planaren) künstlichen Lipidmembranen dreidimensional sind und daher der Fachmann alleine schon bei der Fokussierung erhebliche Probleme erwartet hätte, andererseits daran, daß Zellen immer eine gewisse Eigenfluoreszenz aufweisen, die den eigentlichen Visualisierungsvorgang mittels Fluoreszenzmikroskopie behindern kann. Weiters wurde es auch bislang als unmöglich angesehen, eine Vielzahl an solchen zellulären Systemen mit einer geeigneten Detektions- und Analyse-methode derartig schnell zu analysieren, so daß sowohl die Auflösung im einzelemolekularen Bereich erhalten bleibt, als auch molekulare Bewegungen der zu detektierenden Moleküle verfolgt werden können.

Vor allem die pharmazeutische Industrie ist jedoch immer mehr an Methoden interessiert, mit denen ein Hochdurchsatz-Screening ("High-Throughput-Screening", HTS) von einer großen Zahl von möglichen Testmolekülen möglich ist. Gerade für HTS-Verfahren sind allerdings die bisher beschriebenen Verfahren zum SDT nicht geeignet.

Die Aufgabe der vorliegenden Erfindung liegt daher darin, die SDT-Methode derart zu verändern, daß damit ein Screening, insbesondere ein HTS, möglich wird.

Weiters soll ein SDT-Verfahren zur Verfügung gestellt werden, mit welchem molekulare Prozesse, vorzugsweise auch in zellulären Systemen, in ihrer realen Raum-Zeitdimension verfolgt werden können, wobei Informationen über Kollokalisierung von Molekülen sowie über Stöchiometrie molekularer Assoziate und Konformationen der Moleküle ebenfalls erhalten werden sollen.

Diese Aufgabe wird erfindungsgemäß gelöst durch eine Vorrichtung zur Visualisierung von Molekülen, von deren Bewegung und von Wechselwirkungen zwischen Molekülen und von molekularen Prozessen in einer Probe unter Verwendung der SDT-Methode, umfassend einen Objektträger mit der Probe, ein hochempfindliches Detektions- und Analysesystem, das eine "Charged Coupled

Device"(CCD)-Kamera, welche einen Frameshift aufweist, und einen Laser umfasst, dadurch gekennzeichnet, dass die Probe und/oder das Detektions- und Analysesystem beim Messprozess relativ zueinander kontinuierlich verschiebbar sind, und die Relativverschiebung zwischen Probe und Detektions- und Analysesystem durch eine Steuerungseinheit im Detektions- und Analysesystem steuerbar ist, welche Steuerungseinheit einen Prozessor umfasst und durch den Frameshift der CCD-Kamera direkt triggerbar ist.

Beim erfindungsgemäßen System können "gefärbte" Einzelmoleküle (z.B. Fluoreszenz-markierte Biomoleküle) einer Probe, insbesondere einer biologischen Probe, welche sich auf einem Objektträger befindet, durch das hochempfindliche Detektions- und Analysesystem auf ein Pixelarray der CCD-Kamera abgebildet werden, wobei die Probe und/oder das Detektions- und Analysesystem relativ zueinander kontinuierlich und konstant verschoben wird, wobei (für diese Relativverschiebung) der Frameshift der CCD-Kamera benutzt wird, so daß die Signale (z.B. die Fluoreszenzphotonen) jedes Einzelmoleküls, nach Konversion in Elektronen ("counts"), in den gleichen Pixeln gesammelt werden, so lange, bis das Einzelmolekül-Signal (Zahl der "counts") einen bestimmten Mindest-Signal/Rausch-Abstand (der die Signifikanz der Messung gewährleistet) übersteigt.

Mit der erfindungsgemäßen Vorrichtung ist ein entscheidender Fortschritt gegenüber den beschriebenen Methoden zur Detektion von einzelnen Molekülen in artifiziellen Lipidmembranen (Schmidt et al., Laser und Optoelektronik 29(1) (1997), Seiten 56-62) gelungen, indem das dort verwendete System mit der erfindungsgemäßen Vorrichtung bedingt durch den Verschiebungsprozeß auch als HTS-Verfahren betrieben werden kann und darüberhinaus einfach auf ganze biologische Zellen angewendet werden kann. Durch die Erweiterung des hochempfindlichen Detektions- und Analysesystems mit einem Scanning-System konnte überraschenderweise auf einfache Art (denn jede CCD-Kamera weist im Prinzip einen Frameshift (die Verschiebungs- bzw. Auslese-Geschwindigkeit von Linie zu Linie des Pixelarrays der Kamera) auf) mit maximierter Durchsatzrate eine konstante Einzelmolekül-Empfindlichkeit beibehalten werden, sowie Fluorophore an oder in ganzen Zellen in sehr kurzer Zeit (etwa in 120 ms) abgebildet werden.

Das erfindungsgemäße hochauflösende Detektions- und Analysesystem muß zur Abbildung der Probe auf dem Objektträger insofern geeignet sein, als es eine Pixelarray-Abbildung der Probe mit einer Lokalisation einzelner Moleküle von zumindest 50 bis 100 nm aufweisen muß. Dafür wird erfindungsgemäß eine Charged Coupled Device-Kamera (CCD-Kamera) verwendet, welche sich bislang schon insbesondere bei der Epifluoreszenz-Mikroskopie bewährt hat. Damit lassen sich problemlos Genauigkeiten der Lokalisation von unter 30 nm erreichen.

Bei der Datenaufnahme soll die Bewegung der Probe konstant und kontinuierlich durchgeführt werden, da ein abruptes Abstoppen oder eine starke Beschleunigung der Probe zu einer zusätzlichen Bewegung der in der Probe zu detektierenden Moleküle z.B. auf oder in den Zellen führen kann, was zu einer Verlängerung der Aufnahmezeiten (bedingt durch Relaxationsprozesse der Zelldynamik) um zumindest das 10-fache, die auch eine Zellantwort induzieren können, und damit zu einer Verfälschung der zu beobachtenden biologischen Prozesse führen könnte. Üblicherweise werden dafür Step-Motoren verwendet, die eine geglättete Bewegungsweise durch rasches Aufeinanderfolgen der Bewegungsschritte gewährleisten. "Konstant" und "kontinuierlich" bedeuten daher im Rahmen der vorliegenden Erfindung, daß während des Meßprozesses kein längeres Abstoppen der Probe (bzw. Messung im Ruhezustand) erfolgt, sondern die Probe (bzw. der Objektträger) ständig relativ zum Detektions- und Analysesystem bewegt wird.

Die Bewegung der Probe in x-y-Richtung wird direkt durch das Detektions- und Analysesystem gesteuert, wobei die Steuerung an die jeweiligen Eigenheiten des Detektions- und Analysesystems angepaßt werden kann. Da eine CCD-Kamera im Detektions- und Analysesystem verwendet wird, kann die Relativverschiebung durch den der CCD-Kamera eigenen Frameshift direkt getriggert werden. Bei Beleuchtung einer bestimmten Fläche auf dem Objektträger, die auf dem ganzen verwendeten Pixelarray abgebildet wird, wird die Probe kontinuierlich verschoben und gleichzeitig das Bild der Probe auf dem Pixelarray durch kontinuierlichen Frameshift line-by-line ebenfalls verschoben. Bei optimaler Abstimmung beider Geschwindigkeiten (relative Bewegungsgeschwindigkeit der Probe und Frameshift (Linienauslesegeschwindigkeit) der CCD-Kamera) wird die von einem markierten Molekül der Probe gesammelte Information während des Durchquerens des beleuchteten Bereiches von praktisch den gleichen Pixeln gesammelt. Optimalerweise ist die

Geschwindigkeit, mit der die Probe bewegt wird, gleich der Geschwindigkeit der CCD-Kamera, dividiert durch die Vergrößerung des Objektivs.

Erfindungsgemäß wird als Farbstoff vorwiegend Fluoreszenz-Farbstoff verwendet, die Visualisierung also unter Verwendung der Epifluoreszenzmikroskopie durchgeführt. Mit dieser Methode sind nach dem gegenwärtigen Stand die besten Auflösungen zu erzielen, es ist allerdings auch denkbar, das erfindungsgemäße Verfahren mit anderen Methoden durchzuführen (z.B. RAMAN-, Infrarot-, Lumineszenz- und Enhanced-RAMAN-Spektroskopie sowie Radioaktivität), wobei mit Lumineszenz oder Enhanced-RAMAN, vor allem mit Biolumineszenz, prinzipiell ähnliche Auflösungen wie mit der Fluoreszenz-Technologie erzielbar sind.

Als besonders gut geeignet hat sich erfindungsgemäß die Verwendung der 2-Photonen-Anregungs-Fluoreszenzmikroskopie (Sanchez et al., J.Phys.Chem. 101 (38) (1997), Seiten 7020-7023) im hochempfindlichen Detektions- und Analysesystem erwiesen, da mit dieser Methode auch das Problem der Eigenfluoreszenz von vielen Zellen effizient umgangen werden kann.

Weiters ist damit eine praktisch Hintergrund-freie Messung möglich, was auch die HTS-Analyse beschleunigen kann. Die 2Photonen-Anregungs-Fluoreszenz-Spektroskopie (oder allgemein die Multiphotonen-Anregung (Yu et al., Bioimaging 4 (1996), Seiten 198-207)) ist besonders geeignet zur dreidimensionalen Darstellung von Proben, wodurch ein weiterer Vorteil v.a. bei zellulären Systemen gegeben ist.

Bei der Ausführungsform mit Fluoreszenzspektroskopie umfaßt die erfindungsgemäße Vorrichtung vorzugsweise

- einen Laser als genau definierte Lichtquelle, sowie
- akustooptische Schalter mit hoher Spezifität, mit denen der Laserstrahl schnell (z.B. 10 - 20 nsec.) für definierte Zeit unterbrochen werden kann,
- einen Prozessor, der den Schalter z.B. über ein Pulsprogramm steuert,
- einen dichroitischen Spiegel (der z.B. das anregende Licht nach oben zur Probe reflektiert und das fluoreszente Licht von der Probe nach unten (zum Analysesystem) durchläßt,
- eine Reihe von geeigneten Filtern, die an sich aus herkömmlichen SDT-Vorrichtungen bekannt sind,
- eine bewegbare Probenhalterung (Objektträger), z.B. einen Prozessor-gesteuerten x-y-Drive (Step-Motor),
- eine CCD-Kamera, mit der die emittierten, durch den dichroitischen Spiegel durchtretenden Lichtquanten in Elektronen umgewandelt und in Pixeln gesammelt werden und
- einen Prozessor, der mit einem x-y-Drive (Step-Motor) die Bewegung der Probe (des Objektträgers) steuert, indem die Signale von der CCD-Kamera über eine interne Uhr zur Triggerung der Bewegung verwendet werden.

Es ist erfindungsgemäß auch möglich, verschiedene Molekülarten mit einem Farbstoff, vorzugsweise einem Fluoreszenz-Farbstoff, stöchiometrisch zu markieren, z.B. einen Rezeptor und einen Liganden, und beide mit der erfindungsgemäßen Vorrichtung zu verfolgen.

Es ist auch möglich, zumindest zwei verschiedene Molekülarten mit verschiedenen Fluoreszenz-Farbstoffen zu markieren, und der SDT-Analyse zu unterziehen, wobei zusätzlich zur jeweiligen Einzelfluoreszenz auch noch durch Ermittlung z.B. des Förster-Transfers zusätzliche Informationen gewonnen werden können (Mahajan et al., Nature Biotech. 16 (1998), Seiten 547-552). Es ist jedoch wesentlich hervorzuheben, daß mit dem Förster-Transfer alleine nur eine (zwar hochselektive) qualitative, jedoch keine quantitative Information möglich ist, da dieser Effekt stark vom Abstand der Fluorophore abhängig ist (mit $1/r^6$).

Wenn zelluläre Systeme erfindungsgemäß untersucht werden sollen, wird vorzugsweise von Zellen geringer Eigenfluoreszenz ausgegangen, wobei es verschiedene Zelltypen gibt, die von vornherein geringe Eigenfluoreszenz aufweisen (wie z.B. Mastzellen oder glatte Muskelzellen). Leider sind aber gerade Expressionszellen in der Regel stark fluoreszierend, weshalb diese oder andere Zell-Typen mit Eigenfluoreszenz durch die gewählten Zuchtbedingungen oder Probenaufbereitungen fluoreszenzarm so bereitgestellt werden müssen, daß die Eigenfluoreszenz unter ein bestimmtes, störendes Maß gedrückt wird. Bei Verwendung von 2-Photonen-Anregung der Fluoreszenz stellt sich dieses Problem, wie erwähnt, jedoch von vornherein nicht.

Durch die erfindungsgemäße Vorrichtung ist die Durchführung eines Visualisierungsverfahrens für einzelne, z.B. biologisch aktive Moleküle, als Hochdurchsatz-Screening von biologischen

Einheiten auf der Basis der Beobachtung von einzelnen Molekülen (Fluorophoren) möglich.

"Hochdurchsatz-Screening" (High Throughput Screening - HTS) beschreibt allgemein die Suche nach bestimmten "Einheiten" unter einer sehr großen Zahl ähnlicher "Einheiten" (beispielsweise in einer durch kombinatorische Chemie hergestellten Molekülbank und einer Teilmolekülbank). Diese Problematik stellt sich in vielen Zusammenhängen sowohl der biowissenschaftlichen Grundlagenforschung als auch industriellen Forschung und Entwicklung mit medizinisch-pharmazeutischer Ausrichtung. "Einheiten" können erfindungsgemäß biologische Zellen aber auch einzelne Moleküle oder Molekültypen sein, wobei Hochdurchsatz-Screening z.B. zur Detektion von selten vorkommenden Zellen mit einem bestimmten genetischen Defekt möglich ist. Neben solchen Fragestellungen in der Zellbiologie und Pathologie hat Hochdurchsatz-Screening einen großen Stellenwert in der Molekularbiologie. So kann die erfindungsgemäße Vorrichtung etwa zum Auffinden einzelner DNS- oder c-DNS-Moleküle in einer Probe mit vielen DNS-Molekülen verwendet werden. In der Biochemie ist die Abtrennung von Makromolekülen bestimmter Eigenschaften, z.B. bezüglich Ligandenbindung oder Phosphorylierungszustand in oder an Zellen, ein grundsätzliches Anliegen, welches erfindungsgemäß behandelt werden kann. Die Pharmaindustrie benötigt Hochdurchsatz-Screening sowohl zur Selektion bestimmter Wirkstoffe als auch zur Analyse ihrer Wirkung an biologischen Zellen. Was unter HTS-Verfahren fällt bzw. welche Materialien hierfür angewendet werden (z.B. durch kombinatorische Chemie hergestellte Molekül-Bibliotheken oder genomisch-kombinatorische Bibliotheken) sind jedem Fachmann auf diesem Gebiet geläufig (siehe z.B. "High Throughput Screening", John P. Devlin (Hrg.) Marcel Dekker Inc. (1997)).

Zur spezifischen Markierung bestimmter "Einheiten" werden erfindungsgemäß zumeist die natürlichen Prinzipien der strukturspezifischen molekularen Erkennung eingesetzt, etwa die Bindung von Antikörpern oder generell von Liganden an Rezeptormoleküle. Die erfindungsgemäß bevorzugte Verwendung von fluoreszierenden Liganden, etwa Antikörper mit gebundenen Fluoreszenzmolekülen, erlaubt eine zugleich empfindliche und selektive Detektion von Einheiten mit Rezeptoren für die Fluoreszenz-markierten Liganden. Alternativ zu fluoreszierenden Liganden können fluoreszierende Gruppen in Proteinsequenzen inseriert und co-exprimiert werden (z.B. das "green fluorescence protein" (GFP) oder Abwandlungen davon ("blue fluorescence protein"-BFP)).

Erfindungsgemäß ist unter Verwendung von Fluoreszenz ein Hochdurchsatz-Screening mit zugleich ultimativer Empfindlichkeit (also klarer Detektion der Fluoreszenz einzelner Fluoreszenzmarker) und hoher Durchsatzrate (also zumindest 10^6 (zelluläre) Einheiten pro Inch^2 pro Stunde) realisierbar. Chemische Einheiten (z. B. biologische Moleküle, wie Rezeptoragonisten oder -antagonisten) können problemlos mit einer Durchsatzrate von zumindest 10^{10} oder 10^{12} Einheiten pro Stunde pro Inch^2 untersucht werden.

Bei Verwendung von Zellen in einer HTS-Methode sind vor allem Mikrotiterplatten geeignet, mit welchen ein Arzneimittel-Screening an ganzen Zellen durchgeführt werden kann, indem z.B. die Zellen in die einzelnen Näpfchen, die die zu screenenden Substanzen enthalten, titriert werden (vgl. z.B. WO98/08092). Auch die Verwendung bzw. Vermessung von Biochips (Nature Biotech 16 (1998), 981-983) ist mit dem erfindungsgemäßen System möglich.

Werden mit dem erfindungsgemäßen HTS-Verfahren Substanzen als pharmazeutische Zielsubstanzen identifiziert und isoliert, die neu sind oder für die bislang noch keine pharmazeutische Wirkung nachgewiesen werden konnte, so betrifft die vorliegende Erfindung gemäß einem weiteren Aspekt ein Verfahren zur Herstellung einer pharmazeutischen Zusammensetzung, welches das Mischen der erfindungsgemäß identifizierten und isolierten Substanz mit einem pharmazeutisch akzeptablen Träger umfaßt.

Erfindungsgemäß gilt eine klare Detektion dann als gegeben, wenn der bestimmte Mindest-Signal/Rausch-Abstand für einzelne Moleküle über 3 vorzugsweise zwischen 10 und 40, insbesondere zwischen 20 und 30, liegt. Wenn der Signal/Rausch-Abstand unter einem Wert von etwa 2 bis 3 liegt, so kann der Informationsgehalt der erhaltenen Messung problematisch zu interpretieren sein.

Eine spezifische Variante des erfindungsgemäßen Verfahren stellt die Kombination mit der Flow-Cytometrie-Technologie dar, bei welcher die Zellen mittels eines Flow-Cytometers am Detektions- und Analysesystem vorbeibewegt werden. Im einfachsten Fall wird bei einer bevorzugten Variante der erfindungsgemäßen Vorrichtung eine Durchflußzelle mit dem Objektträger (oder als Objektträger selbst) vorgesehen.

Die erfindungsgemäße Vorrichtung eignet sich wie erwähnt besonders zur Analyse von Proben, welche biologische Zellen umfassen, wobei besonders HTS-Verfahren effizient mit der erfindungsgemäßen Vorrichtung durchgeführt werden können. Jedoch ist das Anwendungsspektrum der erfindungsgemäßen Vorrichtung auch auf zellfreie Systeme höchst effizient anwendbar.

Bei der erfindungsgemäßen Vorrichtung wird die kontinuierliche Relativverschiebung zwischen Probe und hochempfindlichem (hochauflösendem) Detektions- und Analysesystem bevorzugterweise durch das Detektions- und Analysesystem selbst, insbesondere von der CCD-Kamera, gesteuert.

Da die Fluoreszenzanalyse derzeit die besten Analysen ergibt, umfaßt die erfindungsgemäße Vorrichtung bevorzugterweise ein EPI-Fluoreszenzmikroskop. Weiters kann die Steuerung der kontinuierlichen Relativverschiebung über den Frameshift der CCD-Kamera getriggert werden, wobei die Steuerung direkt durch die CCD-Kamera oder aber parallel durch einen Synchronisationsmechanismus (z.B. ortskorreliert über Photodioden-Triggersignale unter Verwendung eines mitbewegten Lochstreifens, wie z.B. in Meyer et al., Biophys. J. 54 (1988), S. 983-993, beschrieben) erfolgen kann.

Eine bevorzugte Ausführungsform der vorliegenden Erfindung zeichnet sich daher dadurch aus, daß die Probenbewegung und der Frameshift der CCD-Kamera durch ortskorrelierte Signale an Hand der kontinuierlichen Probenbewegung miteinander synchronisiert werden, vorzugsweise unter Verwendung eines mit der Probe bewegten Lochstreifens und einer fixen Photodiode, die beim Passieren eines Loches ein Signal gibt.

Gemäß einem weiteren Aspekt betrifft die vorliegende Erfindung ein Verfahren zur Visualisierung von Molekülen, von Wechselwirkungen zwischen Molekülen und von molekularen Prozessen in einer Probe unter Verwendung der SDT-Methode unter Verwendung einer erfindungsgemäßen Vorrichtung.

Die Anwendungsgebiete für die vorliegende Erfindung sind praktisch unbegrenzt, bevorzugt sind aber die Pharmazie (vor allem das HTS von neuen chemischen Einheiten) sowie biochemische Fragestellungen, da durch die extrem hohe Empfindlichkeit der erfindungsgemäßen Methodik (1 einzelnes Molekül kann verfolgt werden) und die genaue Lokalisation (z.B. auf mindestens 30 nm genau) im Prinzip jedes einzelne Molekül oder Molekülassoziat, z.B. auf oder in Zellen detektiert und identifiziert (gegebenenfalls auch isoliert) werden kann. So ist die Bindung aller natürlicher Liganden an eine Zelle (Hormone, primäre Botenstoffe, etc.) oder Zell-Zell-Erkennungsmoleküle mit nmolarer Bindung analysierbar, auch hinsichtlich der exakten Bindungskinetik und Bindungskonformation, sowie hinsichtlich der Mobilität dieser Komponenten in der Zelle oder der Zellmembran (analog zu Schmidt et al., J. Phys. Chem. 99 (1995), Seiten 17662-17668 (für Molekülpositions- und -bewegungsbestimmung); Schütz et al., Biophys. J. 73 (1997), Seiten 1-8; Schmidt et al., Anal. Chem. 68 (1996), Seiten 4397-4401 (zu stöchiometrischen Bestimmungen); Schütz et al., Optics Lett. 22(9), Seiten 651-653 (bzgl. Konformationsänderungen).

Weiters eignet sich das erfindungsgemäße System besonders gut zur Untersuchung und Identifizierung bzw. Isolierung von (alternativen) Bindungspartnern in Rezeptor-Ligand oder Virus-Rezeptor-Systemen, wobei auch potentielle Agonisten/Antagonisten und deren Wirkung (z.B. die kompetitive Hemmung) genau untersucht werden kann. Dies ist insbesondere bei der Auffindung von neuen chemischen Einheiten (NCE) im Bereich des Arzneimittel-Screenings wesentlich.

Bei der Untersuchung ganzer Zellen kann die Focus-Ebene variiert werden, bei einer schnellen Variante wird ein Schnitt durch die Zelle (vorzugsweise durch die obere Zellhälfte; "unten" ist die dem Objektträger zugewendete Seite) untersucht. Damit ist es auch möglich, komplexe Prozesse in einer Zelle, wie Nukleopor-Transport, Pharmaka-Wirkung mit einem Target in der Zelle oder Sekundärreaktionen in der Zelle, auf einzelmolekularem Niveau zu untersuchen.

Gemäß einer bevorzugten Ausführungsform kann das erfindungsgemäße System auch zur Untersuchung von 3-dimensional (3D) ablaufenden Prozessen in einzelnen Zellen verwendet werden, etwa von Zellen, die in einem ersten erfindungsgemäßen Flächen-Scan vorselektiert wurden. Hierbei kann durch eine kontinuierliche Verschiebung der Fokusebene entlang der z-Achse, zusätzlich zu der erfindungsgemäßen Vorgangsweise (Probenverschiebung mit synchronisiertem Frameshift der CCD-Kamera) die dreidimensionale Anordnung von Fluoreszenz-markierten Molekülen bzw. Assoziaten an oder in der Zelle abgebildet werden, in Meßzeiten im Sekundenbereich oder sogar darunter, mit einer Ortsauflösung nahe am Diffraktions-Limit. Im Vergleich zu der

bislang einzigen anderen Methode, der Confocal Scanning Fluorescence Microscopy, CSFM (Handbook of Biological Confocal Microscopy, ed. James B. Pawley, second edition (1995), Plenum Press, New York und London), ist die dargestellte erfindungsgemäße oben genannte Methode 1. um einen Faktor 1000 schneller, da gleichzeitig die Information mit gleicher Auflösung von etwa 1000 Focusflächen gesammelt werden kann, wodurch 2. erstmalig die räumlich-zeitliche Anordnung von nicht-statischen Molekülen bzw. Assoziaten abgebildet werden kann, in Zeiten (z.B. 1 s), die klein genug sind, um Diffusionsprozesse, Energie-getriebene Bewegungsvorgänge oder metabolische Abläufe beobachten zu können.

In einer bevorzugten Ausführungsform ist daher die Fokussierungsebene des Detektions- und Analysesystems (insbesondere des Epifluoreszenzmikroskops) entlang der z-Richtung (also normal zur xy-Ebene, die durch die Probenfläche (den Objektträger) definiert ist) gegebenenfalls zusätzlich zur Relativbewegung zwischen Probe und Detektions- und Analysesystem verschiebbar.

Die Erfindung wird anhand der nachfolgenden Beispiele sowie der Zeichnungsfikuren näher erläutert, ohne jedoch darauf eingeschränkt zu sein.

Es zeigen:

Fig. 1: gebräuchliche Konfigurationen von Einheiten für Hochdurchsatz-Screening; der Stern steht für Fluoreszenzmarker, der spezifisch an gesuchte Einheiten (biologische Zellen, DNS, c-DNS, Makromoleküle, Proteine, etc.) gebunden wird. Fig. 1A zeigt Einheiten an Substrat; Fig. 1B Einheiten in "wells" und Fig. 1C Einheiten in Laminarfluss-Zellen.

Fig. 2: zeigt eine Möglichkeit der erfindungsgemäßen Vorrichtung, eine Zeit-aufgelöste Mikroskopie einzelner Fluoreszenzmoleküle, wobei der Stern wiederum ein Fluoreszenzmolekül darstellt. In der CCD-Kamera entsteht dann ein Bild einzelner Fluorophore (Beleuchtung 5ms; Signal/Rauschverhältnis ~30).

Fig. 3: zeigt die Relativbewegung der Probe mit Frameshift, also den Einsatz von Einzel-Fluorophor-Mikroskopie zum Screening. Die Pfeile bedeuten jeweils den "sampleshift" mit der Geschwindigkeit $v(\text{sample})=v(\text{CCD})/\text{Vergrößerung}$ (1) bzw. den CCD "frameshift" mit Geschwindigkeit $v(\text{CCD})$ (2). Die (kontinuierliche, raumfixe) Beleuchtung erfolgt entweder wie in Fig. 1 dargestellt, oder durch emaneszente Anregung bei Totalreflexion.

Fig. 4: zeigt das Screening von Einheiten auf Oberflächen oder in Multiwell-Platten, wobei die Bilder der gesuchten Einheit (*) dargestellt werden.

Fig. 5: zeigt das Screening in einer Laminarflusszelle, wobei das Bild der gesuchten Einheit (*) dargestellt wird.

Fig. 6: zeigt die Relation zwischen Screening-Zeit und Auflösung. Hierbei wird dies an Hand einer Einheit von 1 Inch x Inch-Fläche (z.B. 1 Million Zellen) mit Einzelfluorophor-Empfindlichkeit dargestellt. Dabei gilt für typische Charakteristika von CCD-Kameras (gekühlt mit flüssigem N_2): 1024 x 256 Pixel (25 x 25 μm) "lineshift"-Rate 10 KHz, Ausleserate 200 KHz, Ausleserauschen ~5 Counts pro Pixel, Dunkelrauschen ~0, bei einem Objektiv mit 63-facher Vergrößerung, einer beleuchteten Fläche = Fläche Pixelarray/63 x 63 = 400 μm x 100 μm ; Lichtintensität auf 500 Counts pro Fluorophor gehalten. Bei 4 sec Warten ist nach jedem diskreten Bild

$$> \Delta_{\text{warten}}^{\text{tot}} = 4 \text{ sec.} \cdot \frac{1 \text{ Inch}^2}{400 \times 100 \mu\text{m}^2} = 1040 \text{ min.}$$

Fig. 7: zeigt die Analyse von detektierten Einheiten durch Einzelfluorophor-Mikroskopie (siehe Fig. 1), entweder direkt nach Screening oder nach Transfer, in einer Analysezelle (Durchflusszelle neben Screeningzelle).

Fig. 8: zeigt den Einsatz von Donor-Akzeptor-Energietransfer für hochselektives Screening, wobei gilt: Anregung: nur Donorfluoreszenz; Sammlung: nur Akzeptorfluoreszenz.

Fig. 9: zeigt die Positionen von markierten Molekülen.

Fig. 10: zeigt die zeitliche Verfolgung von Molekülpositionen, wobei das Bild entweder immobil oder mobil (z.B. durch freie Diffusion oder Compartment-Diffusion) sein kann.

Fig. 11: zeigt die molekulare Assoziation, Co-Lokalisation, Stöchiometrie aus Signalquantelung, wobei im Bild die Fluoreszenzintensität pro Fluorophor (i_1) dargestellt ist.

Fig. 12: zeigt die Ligandenbindung, z.B. bei 0 von 2 (A), bei 1 von 2 (B) und bei 2 von 2 (C).

Fig. 13: zeigt die Konformationsänderung am Einzelmolekül an einer Zellmembran.

Fig. 14-18: zeigen die Detektion von einzelnen Lipidmolekülen in nativen Zellen.

Fig. 19: zeigt die Mikroskopie einzelner Lipidmoleküle mit 2-Photonen-Fluoreszenz-Anregung; und

5 Fig. 20: zeigt die dreidimensionale Aufnahme einer ausgewählten Einzelzelle mit Einzelfluorophor-Auflösung.

Beispiele:

10 **Beispiel 1:** Erfindungsgemäße Vorrichtung unter Verwendung der Fluoreszenzmikroskopie

Gebräuchliche Konfigurationen von Einheiten für Hochdurchsatz-Screening (HTS) sind in Fig. 1 dargestellt, die alle als Meßanordnungen im erfindungsgemäßen Verfahren zur Anwendung kommen. Übliche Molekülbanken, die durch kombinatorische Chemie hergestellt werden, sind auf kleinen (0,2 bis 0,4 mm) Polymerkügelchen aufgebaut, die jeweils eine einzige Molekülspezies tragen (siehe z.B. Devlin (1997), Seiten 147-274). Die Meßanordnung geht gemäß der oben beschriebenen Ausführungsform von einem herkömmlichen Fluoreszenzmikroskop (Fig. 2) aus, mit dem an einer Substratoberfläche in der beleuchteten Fläche ($\sim 100 \mu\text{m}^2$) anwesende Fluorophore einzeln detektiert und in ihrer Bewegung verfolgt werden konnten, mit einem Signal-zu-Rausch-Abstand von ~ 30 für einzelne Fluorophore (publiziert in Proc. Natl. Acad. Sci., USA (1996) 93: 2926-2929). Ein Zeiss-Mikroskop (Axiovert 135-TV) mit einem x 100-Objektiv (Neofluar; numerische Öffnung = 1,3, Zeiss) wurde verwendet. Für die Fluoreszenzanregung wurde das Laserlicht der 514 nm-Linie eines Argon⁺-Lasers (Innova 306, kohärent), welcher in TEM₀₀-Mode betrieben wurde, durch einen akustooptischen Modulator (1205C-1; Isomet) in den Epiport des Mikroskops gekoppelt. Eine $\lambda/4$ -Platte lieferte zirkular-polarisiertes Anregungslicht. Unter Verwendung einer defokussierenden Linse ($f = 100 \text{ mm}$) vor dem dichroischen Spiegel (515DRLEXT02; Omega) wurde das Gauß'sche Anregungsprofil auf $6,1 \pm 0,8 \mu\text{m}$ Gesamtweite bei halbem Maximum (full-width-at-half-maximum; FWHM) und $57 \pm 15 \text{ kW/cm}^2$ mittlere Anregungsintensität gesetzt. Die Beleuchtungszeit für jede Pixelarray-Abbildung war 5 ms. Nach long-pass-Filterung (570DF70 Omega und OG550-3 Schott) wurde die Fluoreszenz durch eine mit flüssigem Stickstoff gekühlte CCD-Kamera (AT200, 4 Counts/Pixel read-out noise; Photometrix), ausgestattet mit einem TH512B-Chip (512×512 Pixel, $27 \mu\text{m}^2$ Pixelgröße; Tektronix) detektiert. Die Punkttransferfunktion des Mikroskops wurde durch eine zweidimensionale Gauß'sche Intensitätsverteilung mit einer Weite von $0,42 \mu\text{m}$ FWHM, beschrieben wie durch Bestimmung von Bildern von 30 nm fluoreszenten Kügelchen (Molecular Probes) festgestellt wurde. Die beugungsbegrenzte Fläche betrug daher $0,14 \mu\text{m}^2$. Die Breite von Intensitätsprofilen für Einzelmoleküle war mit $0,48 \pm 0,08 \mu\text{m}$ FWHM größer als die Punkttransferfunktion des Mikroskops, wobei die zusätzliche Verbreiterung durch molekulare Diffusion verursacht wurde. Die CCD wurde als Speichermittel verwendet, wobei 12 aufeinanderfolgende Bilder von 40×40 Pixel genommen wurden, und durch CCD-Frameshift bis zu 140 Pixelarrays pro Sekunde aufgenommen werden konnten. Dieser Frameshift wird erfindungsgemäß zur kontinuierlichen Bewegung eines Objektträgers verwendet.

Gemäß der vorliegenden Erfindung kann dieses Meßprinzip auf biologische Proben mit fluoreszierenden Liganden in Konfigurationen zur Anwendung kommen, wie in Fig. 1 dargestellt. 45
Gemäß der erfindungsgemäßen apparativen Realisation wird ein Probenscreening ermöglicht, das mit maximierter Durchsatzrate eine konstante Einzelfluorophor-Empfindlichkeit aufweist. Die Grundidee ist nochmals in Fig. 3 erläutert. Bei konstanter Beleuchtung einer Fläche, die auf den ganzen verwendeten Pixelarray abgebildet wird, wird die Probe kontinuierlich verschoben und gleichzeitig das Bild der Probe auf dem Pixelarray durch kontinuierlichen "frame shift, line per line". 50
Bei möglichst genauer Abstimmung beider Geschwindigkeiten ($v(\text{sample}) = v(\text{CCD}) / \text{Vergrößerung des Objektivs}$) wird die von einem Fluorophor der Probe gesammelte Fluoreszenz während des Durchquerens des beleuchteten Bereichs von praktisch den gleichen Pixeln gesammelt.

Das kumulierende Bild eines Fluorophors bis zum Erreichen der Ausleseseite des Pixelarrays ist in Fig. 4 und 5 für Screeningkonfigurationen gemäß Fig. 1 skizziert. Die Optimierung der zahlreichen apparativen Variablen und Parameter ist für den Fachmann analog zu den bekannten 55

Verfahren möglich; das Verhältnis zwischen Auflösung und Meßzeit ist in Fig. 6 gezeigt: Für typische Charakteristika von erhältlichen CCD-Kameras, Lichtquellen und Objektiven wurde die Meßzeit für das Screening einer 1 Inch² großen Fläche berechnet, als Funktion der Auflösung. Grundsätzlich gibt es einen scharfen Bereich des optimalen Zusammenhangs zwischen Meßzeit und Auflösung, der in dem gewählten Beispiel im Bereich von Meßzeiten von 20 bis 90 min für 1 Inch²- (6,45 cm²) Probefläche liegt, bei einer Auflösung von 3 - 0,5 µm. Der Arbeitspunkt auf dieser Kurve wird durch "binning" (rechte Skala in Fig. 6) eingestellt. Hierbei wird die Information von benachbarten Pixeln zusammengezogen (etwa von $b \times b$ Pixeln), wodurch die Auflösung sinkt, bei steigender maximaler Geschwindigkeit v (frame shift) der CCD-Kamera und leicht ansteigender Empfindlichkeit. Letzteres basiert darauf, daß das Rauschen nur durch Ausleserauschen gegeben ist, und somit gleich groß ist für das Auslesen der Counts in einem einzelnen Pixel wie für das Auslesen der Counts in $b \times b$ Pixeln. Die Abbildungsqualität einzelner Fluorophore bleibt somit wesentlich während des Screenings erhalten (im Beispiel gemäß Fig. 6 werden 500 Counts pro Fluorophor gesammelt bei 5 Counts Ausleserauschen).

Durch die kontinuierliche Probenbewegung wird die Wartezeit minimiert, die bei diskontinuierlicher Probenbewegung notwendig ist, auf Grund entstehender Bewegung in der Probe bei Geschwindigkeitsänderungen. Lediglich nach Beendigung eines Linienscans muß die Probe zurückgeführt und um die Breite der beleuchteten Fläche verschoben werden, zur Aufnahme des nächsten Linienscans (im Beispiel in Fig. 6 wurden hierfür 5 s Wartezeit erlaubt).

Die erfindungsgemäße Kombination von ultimativer Empfindlichkeit und vergleichsweise sehr schnellem Probendurchsatz eröffnet neue Anwendungsbereiche. Mit einer Screeningzeit von ~30 min einer Probe typischer Größe ist ein Zeitbereich erreicht, der Screening unter i.A. konstanten Bedingungen der Proben erlaubt. Proben mit entsprechend geringer Lebensdauer können untersucht und die detektierten Einheiten weiterverwendet oder analysiert werden. Dies eröffnet desweiteren die Verwendung einer breiten Palette von Fluoreszenzliganden mit entsprechend schnellen Dissoziationsraten (etwa schwach bindene Antikörper). Die gleichzeitige Einzelfluorophor-Empfindlichkeit erweitert den Anwendungsbereich grundsätzlich auf Fragestellungen, in denen markierte Stellen pro gesuchter Einheit in geringer Zahl zu erwarten sind (bis zu einer einzigen Stelle, etwa beim Auffinden einer Mutation in einer DNS-Probe).

Erfindungsgemäß kann das beschriebene schnelle und empfindliche Screening noch mit hoher Selektivität und Spezifität verbunden werden, Hierzu wird selektive Anregung der Fluoreszenzmarker durch 2Photonen-Absorption eingesetzt, wodurch die gesammelte Fluoreszenz nahezu vollständig nur von den so angeregten Fluoreszenzmarkern in der Fokusfläche stammt. Bei einer weiteren Vorgangsweise werden zwei Fluoreszenz-markierte Liganden gleichzeitig eingesetzt, die beide an der Zielstruktur benachbarte Bindungsplätze haben. Dies kann z.B. ein natürlicher Ligand eines nur in der gesuchten Einheit vorkommenden Rezeptors sein zusammen mit einem Antikörper, der am Rezeptormolekül in der Nähe des Liganden bindet. So wie in Fig. 8 skizziert ist, wird bei selektiver Anregung eines der beiden Fluorophore (Donor) und Sammlung der Fluoreszenz (durch entsprechende optische Filter) nur des zweiten Fluorophors (Akzeptor) nur die durch Energietransfer von Donor zum Akzeptor entstandene Fluoreszenz detektiert. Hierzu müssen beide Fluorophore in unmittelbarer Nähe sein (≈ 8 nm Abstand). So werden spezifisch an Rezeptoren gebundene Ligandenpaare einzeln und höchst selektiv detektierbar (bei immer noch großem Signal/Rausch-Abstand). Neben der Erhöhung der Selektivität der Fluoreszenz durch Energietransfer kann die Spezifität des Signals durch Beleuchtung in Totalreflexion erhöht werden (siehe Fig. 3 unten). Hierdurch werden nur diejenigen Fluorophore angeregt, die sich im Bereich von etwa 100 nm von der Substratoberfläche befinden (exponentiell abklingende Lichtintensität). Die Detektionsempfindlichkeit erreicht ebenfalls die einzelner Fluorophore. Diese Art der Beleuchtung soll die Erfindung durch Ermöglichung der Anwendung des Hochdurchsatz-Screenings auf Einheiten (vorwiegend Zellen) mit starker Autofluoreszenz ergänzen.

Erfindungsgemäß erlaubt die gleiche Apparatur unmittelbar nach Detektion von gesuchten Einheiten durch Screening eine detaillierte Analyse dieser Einheiten. Diese kann entweder direkt in der "Screening"-Probe stattfinden oder nach der Überführung einer Einheit in eine Analysezelle. Fig. 7 zeigt dies am Beispiel einer biologischen Zelle.

Die Analysezelle erlaubt Einzelmolekül-Mikroskopie in einem Bereich der biologischen Zelle, der einer austauschbaren Pufferlösung und Wirkstoff frei zugänglich ist. Desweiteren wird die Zelle

am Substrat praktisch elektrisch dicht gebunden, so daß die hochempfindliche Fluoreszenzmikroskopie mit Elektrophysiologie verbunden werden kann, z.B. zur Beobachtung einzelner Ionenkanäle, elektrisch und optisch.

Die Figuren 9 - 13 skizzieren fünf grundlegende Informationen, die durch Einzelmolekül-Mikroskopie an transferierten Einheiten möglich werden. Hierbei wird "binning" angewendet, um die zeitliche und laterale Auflösung an die gewünschte Information anzupassen. Die Probe wird nicht bewegt und kurze (ms), periodisch wiederholte Beleuchtung wird verwendet. Dies gestattet für jede Beleuchtung die Positionen genügend weit entfernter einzelner Fluorophore zu detektieren (Fig. 9) und zeitlich zu verfolgen (Fig. 10). Damit wird entscheidbar, ob ein markierter Rezeptor mobil, begrenzt mobil oder immobil ist, frei diffundiert oder limitierte Diffusion zeigt oder selbst-assoziiert, ko-assoziiert mit anderen Komponenten oder transient geclustert ist. Auch die Verteilung über die (Zell-)Oberfläche kann sichtbar gemacht werden. Das hohe Signal und der große Rauschabstand S/N (etwa 150 Counts und $S/N = 30$ für 5 ms Beleuchtung) gestattet Zuordnungen beobachteter Signale zur Zahl co-lokalisierter Fluorophore. Damit eröffnen sich zahlreiche mechanistische Studien, die Assoziation, Co-Lokalisation und Stöchiometrie assoziierter Komponenten betreffen, in Fig. 11 für Dimerisierung einer Membrankomponente skizziert. Auch die Ligandenbindung wird einmolekular analysierbar (Fig. 12), einschließlich Stöchiometrie der Ligandenbindung, sowie allosterischer und kooperativer Effekte bei Ligandenbindung.

Spezielle Liganden (deren Fluorophor nach Bindung an den Rezeptor in eine fixe Richtung zeigt) können zur einmolekularen Detektion von Konformationsänderungen eingesetzt werden. Eine leichte Drehung des Fluorophors bei Strukturänderung des Rezeptors genügt zur Detektion der Konformationsänderung über die Intensitätsänderung seines Fluoreszenzsignals, so wie in Fig. 13 skizziert. Hierzu kommt sowohl linear polarisiertes Licht verschiedener Richtungen der Polarisation als auch zirkulär polarisiertes Licht zur Anwendung.

Die erfindungsgemäße kontinuierliche Aufnahme der Fluorophore in der Probe durch synchrone Bewegung der Probe und CCD-Frameshift (gemäß Fig. 3 bis 6) wird im Stand der Technik zum Einzelfluorophor Imaging weder beschrieben noch angedeutet, da dort eben nur statische Aufnahmen in unbewegten Proben gemacht wurden. Durch das erfindungsgemäße System wird aber zusätzlich zur ultimativen optischen Auflösung und Empfindlichkeit der zeitaufgelösten Detektion von Einzelmolekülen (z.B. Rezeptoren auf Zellen) eine beachtliche Screening-Geschwindigkeit ermöglicht, die zumindest 1000-mal schneller ist als bei Alternativverfahren der konfokalen Mikroskopie, bei gleichzeitiger Verfolgung eines Ensembles von Molekülen, das durch konfokale Mikroskopie nicht möglich ist.

Beispiel 2: Detektion von fluoreszenzmarkierten Lipidmolekülen in der Plasmamembran nativer glatter Muskelzellen

Methodik: glatte Muskelzelle, HASM: "human aorta smooth muscle, stable cell line of wild type", werden auf Deckglas wachsen gelassen und im PBS-Puffer mikroskopiert. Der Einbau von DMPE-Cy5 (Dimiristoyl-Phosphatidyl-ethanolamin mit Cy5 (von AMERSHAM) als Farbstoffmolekül gebunden) erfolgt über Lipid-Vesikel (POPC: Palmitoyl-Oleoyl-Phosphatidylcholine, von AVANTI). Jedes 1000ste Lipid in den Vesikeln war ein DMPE-Cy5 (im Mittel 10 DMPE-Cy5 pro Vesikel). Die Zugabe dieser Vesikel über die Durchflussszelle zu den HASM-Zellen im Mikroskop (50 µg/ml Vesikel, Inkubation für 10 min, dann herausgewaschen mit PBS-Puffer) führt zu einzeln in die Plasmamembran eingebauten DMPE-Cy5, über Vesikel-Zellmembran-Lipidaustausch. Dieser Prozeß der Abgabe eines DMPE-Cy5 an die Plasmamembran ist in Fig. 14 direkt zu sehen, wobei das Vesikel (mit ~10 DMPE-Cy5, siehe hohes Signal) entlang der Zellmembran schnell diffundiert und plötzlich ein DMPE-Cy5 von dem Vesikel in die Plasmamembran überwechselt (siehe kleines Signal in Fig. 14) und dort abgebildet werden kann (Fig. 15). Solch ein Austausch war bisher nicht beobachtbar auf Einzelmolekül-Ebene. Das Wesentliche ist jedoch, daß die Intensität von einem Fluorophor auch in der Zelle mit Eigenfluoreszenz noch klar aufgelöst ist. Im vorliegenden Beispiel (Fig. 14 - 18) wurde die Intensität des Laserlichtes (630 nm) soweit reduziert, daß der effektive Fluoreszenzbackground der Zelle nur etwa 5 % des Signals betrug ($S/B \sim 15$). Die Intensität kann jedoch jederzeit erhöht werden, so daß man sich durch die Eigenfluoreszenz der Zelle über die Stelle orientieren kann, an der man gerade mißt. Dieser Wert von $S/B \sim 15$ ist zu vergleichen mit

dem Grenzwert des Signal/Rausch-Verhältnisses von 25, der durch die Ausleseelektronik bei der verwendeten Intensität gegeben ist. Die Beleuchtungszeit war 5 ms. Zum besseren Verständnis der gezeigten Peaks: Die gezeigte Fläche enthält 40 x 40 Pixel, das entspricht einer Objektfläche von $\sim 10 \times 10 \mu\text{m}$ (jedes Pixel ist $27 \times 27 \mu\text{m}$, ein x 100 Objektiv wurde verwendet. Die HASM-Zelle ist etwa $100 \mu\text{m}$ lang, $15 - 20 \mu\text{m}$ breit und $5 - 10 \mu\text{m}$ hoch. Die Abbildung ist "diffraction-limited", d.h. jede Punktquelle wird als Gaußfleck abgebildet: mit dem Radius $\lambda/2 = 315 \text{ nm}$, das entspricht 1,2 Pixeln (50 % des Peaks auf 5 Pixeln). Im Peak waren im Mittel 152 cnts.

Routinemäßig wurden Sequenzen von bis zu 14 Bildern aufgenommen (z.B. 9 Aufnahmen gemäß Fig. 16), jeweils 5 ms Beleuchtung mit Dunkelpausen zwischen 10 bis 30 ms (also Meßzeiten von bis zu $\sim 0,5 \text{ sec}$). Diese ergeben Trajektorien für die Bewegung der markierten Lipide in der Plasmamembran (Fig. 17 zeigt die Trajektorie zu den Aufnahmen gemäß Fig. 16). Ausgewertet wurden ~ 100 solcher Trajektorien (schließt Messungen an drei verschiedenen Zellen und an verschiedenen Stellen der Zellen, aber immer an der Oberseite der Zellen, die unten am Deckglas adhärirt sind, ein. In der Meßzeit von $0,5 \text{ sec}$ wurde keine Konvektion oder sonstige Zellbewegung gesehen (bis auf wenige erratische Zellzuckungen). Das Ergebnis war beeindruckend: Die Auswertung der Trajektorien ist in Fig. 18 dargestellt: Das Quadrat des Abstands (MSD = "mean square displacement") zwischen beobachteten Molekülpositionen und Trajektorien ist aufgetragen gegen das entsprechende Zeitintervall Δt . Bei Brown'schen Diffusionsprozessen sollte das einen linearen Zusammenhang ergeben; $\text{MSD} = 4D_{\text{lat}} \cdot \Delta t$, wobei sich aus der Steigung $4D_{\text{lat}}$ die Diffusionskonstante D_{lat} für laterale Bewegung ergibt. Zunächst, für kleine Diffusionslängen, zeigt sich eine Diffusion mit $D_{\text{lat}} = 0,5 \mu\text{m}^2/\text{sec}$, ein typischer Wert für Lipiddiffusion in Zellmembranen (aus Ensemblemessungen über FRAP : fluorescence recovery after photobleaching). Für Längen von 240 nm und größer wird plötzlich eine langsamere effektive Diffusion beobachtet, D_{lat} ($\text{MSD} > 240 \text{ nm}$) = $0,14 \mu\text{m}^2/\text{sec}$. Dies und eine nähere Analyse der Trajektorien zeicht eindeutig, daß die Verzögerung durch eine Diffusionsbarriere (Reflexionskoeffizient von $0,75$; plausible: jeder 4. Stoß führt zur Überwindung der Barriere) entsteht, die Bereiche freier Diffusion abtrennt. Diese Barrieren müssen ein regelmäßiges Muster ergeben (sonst wäre der Knick in Fig. 18 nicht so scharf), und freie Bereiche mit effektiven Durchmessern von 240 nm abtrennen. Dies ist genau der Erwartungswert, der sich aus dem Spektrin-Membrangerüst ergibt (das für diese glatte Muskelzelle existiert, Spektrin 230), das vorwiegend ein quadratisches Gitterwerk mit 200 nm Länge formt, woraus sich eine mittlere Diffusionslänge von 226 nm errechnet. Fig. 18 enthält ein weiteres Datenset für LysoPE-Cy5 (also dem gleichen Molekül, aber nur mit einer Myristoyl-Kette) womit gezeigt wird, daß dieses Molekül in etwa gleich schnell diffundiert wie DMPE-Cy5, aber keinerlei Barriere spürt. Hiermit wird daher eine Methode zur Verfügung gestellt, um die Rolle des Membranskeletts bei der "compartment"-Bildung in der Membran (wichtig für viele Funktionen und nur sehr wenig charakterisiert auf Grund fehlender geeigneter Meßmethoden) für viele Zelltypen zu untersuchen. Diese Ergebnisse der gezeigten Versuche (das S/B-Verhältnis und S/N können noch um 2 bis 3-mal verbessert werden durch Einsatz von holographischen "Notch"-Filtern) waren daher als überraschend anzusehen. Damit wird prinzipiell gezeigt, daß jede Anwendung von SDT, auch wie bisher auf Modellsysteme, neue Zugänge eröffnet, einfach auf Grund der Tatsache, daß man Prozesse einmolekular und dynamisch sehen kann, die bislang nur über Ensemble-gemittelte Daten zugänglich waren. Dabei ist der vorliegende Nachweis wesentlich, daß sich auch an lebenden Zellen (zumindest an diesen glatten Muskelzellen) einzelne Fluorophore klar und zeitaufgelöst mikroskopieren lassen. Der Marker, Cy-5, kann auch an einem Liganden hängen mit gleichen Fluoreszenzeigenschaften. Der Frame-Proben-Shift reduziert diese Auflösung nur unwesentlich, er dient dem kontinuierlichen "screening" von ganzen Zellkulturen oder Zellen in Nanotiter-Platten, etc. Die Auflösung kann weiter verbessert werden durch 2-Photonen-Anregungs-Fluoreszenz-Mikroskopie. Fig. 19 zeigt die erste Realisation einer 2Photonen-Abbildung von zwei Phospholipiden (PE-) mit gebundenem TMR (Tetramethyl-Rhodamin) als Fluoreszenzmarker in einer Phospholipid (POPC)-Membran.

Beispiel 3: Simulation einer Echtzeitaufnahme der Verteilung von Einzelfluorophoren auf ganzen Zellen, der räumlich-zeitlichen Auflösung, der Positionsgenauigkeit und der Detektionssicherheit der Fluorophore

In Beispiel 2 war die Beobachtung der Einzellipid-Diffusion in der Plasmamembran der Zelle unter anderem dadurch möglich, daß die Ebene der Lipidbewegung (Membranfläche) genügend weit mit der Fokusebene (Schicht mit effektiver Dicke von $1,6\text{ }\mu\text{m}$) zur Deckung gebracht werden konnte, was durch Fokussierung auf den oberen Rand der Zelle realisiert wurde.

- 5 Zur Erfassung von Bewegungen in jede Richtung, auch quer zur Fokusfläche überall an oder in der Zelle, sowie nahezu Zeit-gleich für alle Fluoreszenz-markierten Moleküle, wird die erfindungsgemäße Probenbewegung und Frameshift in folgender Variante durchgeführt.

Methodik: Die Methodik und die Vorrichtung zur Bildaufnahme ist wie in Beispiel 2 mit zwei wesentlichen Unterschieden:

- 10 1.) Die Zelle wird mit konstanter Geschwindigkeit " $v(z)$ " in z-Richtung bewegt, so daß die Fokusschicht sich kontinuierlich mit " $v(z)$ " durch die ganze Zelle schiebt. Dies ist in Fig. 20A skizziert, mit der Fokusschicht in rot (effektive Dicke $1,6\text{ }\mu\text{m}$), einer Zelle in grün (etwa $8\text{ }\mu\text{m}$ hoch), mit einem Ensemble von zufällig verteilten gleichen Fluorophoren (schwarze Punkte).
- 15 2.) Eine CCD-Kamera mit folgenden Spezifikationen kommt zum Einsatz: mit großem, länglichem Pixelarray und besonders schnellem Frameshift (z.B. eine CCD-Kamera mit 2048×256 Pixeln, $7\text{ }\mu\text{s}$ Shiftzeit pro Linie, und $2\text{ }\mu\text{s}$ /Pixel Auslesezeit, Konversion von 0,8 Elektronen/rotem Photon, so wie sie von z.B. PHOTOMETRICS für Spektroskopie angeboten wird).

- 20 Im Ausführungsbeispiel (Fig. 20) werden 20 Bilder aufgenommen während das Passierens der Fokusschicht durch die ganze Zelle. Jedes Bild wird mit gleicher Beleuchtungszeit " $t(\text{ill})$ " auf der gleichen Teilfläche des Pixelarrays aufgenommen (graue Fläche in Fig. 20A mit 100×256 Pixeln), und dann durch Frameshift verschoben, wie in Fig. 20A für das erste und letzte Bild dargestellt.

- 25 Während der für den Frameshift benötigten Zeit " $t(\text{fs})$ ", $0,7\text{ ms}$ bei der oben spezifizierten Kamera, wird die Aufnahme unterbrochen (durch Unterbrechung der Beleuchtung oder Abdeckung der Kamera), nicht jedoch die Bewegung der Zelle.

- Die Geschwindigkeit " $v(z)$ " und die Beleuchtungszeit pro Bild " $t(\text{ill})$ " sind aufeinander abzustimmen nach der Beziehung $v(z) = dz/t(\text{ill})$, wobei " dz " die Verschiebung der Zelle pro Bildaufnahme ist, die im Ausführungsbeispiel gleich $0,4\text{ }\mu\text{m}$ gewählt ist, damit die 20 Aufnahmen die ganze Zelle von $8\text{ }\mu\text{m}$ Höhe gerade erfassen (siehe Fig. 20A).

- 30 Die Zeit " $t(\text{ill})$ " ist in Grenzen frei wählbar. Einerseits sollte " $t(\text{ill})$ " wesentlich größer sein als " $t(\text{fs})$ ", um den Informationsverlust: auf Grund der Beleuchtungspausen gering zu halten. Andererseits sollte die gesamte Aufnahmezeit $t(\text{ges}) = (t(\text{ill}) + t(\text{fs})) \times 20$ nicht zu groß sein (lange " $t(\text{ill})$ "-Zeiten sind vorteilhaft zur Ausmittlung unspezifischer Fluoreszenz), damit das Molekülenensemble der ganzen Zelle in nahezu Echtzeit abgebildet werden kann. Abbildung in Echtzeit ("real time imaging") erfordert, daß $t(\text{ges}) < t(\text{bew})$ ist, wobei " $t(\text{bew})$ " die Zeit ist, die die abgebildeten Moleküle benötigen, um sich über eine Länge zu bewegen, die der optischen Auflösung entspricht (etwa $0,5\text{ }\mu\text{m}$ in x- und y-Richtung und etwa $1,6\text{ }\mu\text{m}$ in z-Richtung). Für die Diffusion von typischen Membranproteinen oder von aktiv transportierten Komponenten liegt " $t(\text{bew})$ " zumeist unter etwa $0,6\text{ s}$. Für das Ausführungsbeispiel ergibt sich daraus ein Bereich von $5\text{ ms} < t(\text{ill}) < 30\text{ ms}$ für "real time imaging" der Fluorophore einer Zelle. Die gesamte Aufnahme dauert dann $0,1\text{ s} < t(\text{ges}) < 0,6\text{ s}$.

- Fig. 20B illustriert das berechnete Ergebnis von "real time imaging" von Fluorophoren an einer Zellmembran für $t(\text{ill}) = 5\text{ ms}$, wobei die in Beispiel 2 gemessenen Daten und Bedingungen für eine Einzelaufnahme zugrundegelegt wurden (6 counts/Pixel an Eigenfluoreszenz der Zelle, 152 count/Fluorophor für 5 ms Beleuchtung mit über die Fokustiefe gemittelter Intensität, laterale Auflösung von $0,5\text{ }\mu\text{m}$, und Fokustiefe von $1,6\text{ }\mu\text{m}$). Diese Daten legten alle Parameter für die Berechnung des 3D-Bildes für die oben beschriebene Methode fest, wobei als Zellform ein Rotationsellipsoid mit willkürlichen Abweichungen gewählt wurde (Fig. 20A zeigt die Vorderansicht der Zelle), und mit zufällig verteilten Fluorophoren an der Zellmembran (schwarze Punkte, insgesamt 45). Fig. 20B zeigt die Vorderansicht des 3D-Fluoreszenzbildes der Zelle und der Fluorophore, erzeugt durch volle Simulation der Abbildungsmethode (in der Simulation sendet jedes Fluorophor entsprechend der momentanen Beleuchtung durch die sich verschiebende Fokusschicht Fluoreszenzphotonen aus, die unter Berücksichtigung der Diffraktions-limitierten Abbildungsfunktion des Mikroskops in zufälliger Verteilung auf entsprechende Pixel abgebildet werden, nach entsprechender Konversion

zu Elektronen als "counts"). Der gewählte Farbcode zeigt grün für niedrige Zahl von "counts" (Eigenfluoreszenz der Zelle und "readout noise"), und gelb, hellrot bis dunkelrot für steigende Zahl von "counts". Der Farbcode ist so gewählt, daß der hellrote Bereich das Auflösungsvolumen in etwa reproduziert (durch die Sammelstatistik leicht verwaschenes Ellipsoid mit Durchmessern von in etwa 0,5 µm in der x-y-Ebene und 1,6 µm in z-Richtung), und daß der dunkelrote Kern die Genauigkeit der Positionierung einzelner Farbstoffe wiedergibt (in etwa 100 nm in der x-y-Ebene und 200 nm in z-Richtung). Der Datenverlust durch Dunkelzeiten während des Frameshifts konnte durch Interpolation zwischen den Intensitäten aufeinanderfolgender Bilder approximativ berücksichtigt werden, dadurch, daß im Mittel jeder Fluorophor in 4 Bildern vorkommt (Fokusschichtdicke = 1,6 µm = 4*dz, mit dz = Bild-zu-Bildverschiebung = 0,4 µm).

Die Simulation zeigt, daß 3D-Zellaufnahmen in "real time" und mit klarer Detektion der Fluoreszenz-markierten Moleküle mit der erfindungsgemäßen Methode möglich ist. Im Prinzip kann diese 3D-Aufnahme der Zelle mehrfach wiederholt werden nach jeweils einer Mindestzeit "t(lese)", die notwendig ist zum Auslesen des Pixelarrays (etwa 1 s bei der oben genannten Kamera). Die Zahl der Wiederholungen ist durch Ausbleichen der Fluorophore limitiert. Für die abgenommenen Bedingungen von Beispiel 2 ist zumindest eine 5-fache Wiederholung möglich ohne große Verluste durch Ausbleichen, und eine bis zu 15-fache bei Verwendung optischer Notchfilter. Im Prinzip kann die Methode nicht nur Fluorophore an Zellen abbilden, wie im Ausführungsbeispiel gezeigt, sondern auch Fluorophore in Zellen. Hierbei kann der Einsatz von 2-Photonenanregung vorteilhaft sein, zumindest für Studien an Zellen mit hoher oder nicht minimierter Autofluoreszenz.

Eine solche Sequenz von Echtzeit-3D-Aufnahmen von Molekülensembeln einer Zelle geht nicht nur weit über den Stand der Technik hinaus, sondern eröffnet qualitativ neue Zugänge zur Aufschlüsselung Zell-physiologischer Prozesse, etwa die Aufdeckung und Analyse von Komponenten-Organisation/Umorganisation als eine wesentliche Basis für die räumlich-zeitliche Regelung und Koordinierung zellulärer Vorgänge, oder die mechanistische Analyse von morphologischen Antworten der Zelle auf einen äußeren Reiz durch etwa einen Botenstoff oder durch einen pharmakologischen Wirkstoff, oder durch einen nach Beispiel 1 erfindungsgemäß identifizierten möglichen Wirkstoff.

PATENTANSPRÜCHE:

1. Vorrichtung zur Visualisierung von Molekülen, von deren Bewegung und von Wechselwirkungen zwischen Molekülen und von molekularen Prozessen in einer Probe unter Verwendung der "Single-Dye-Tracing" (SDT-)Methode, umfassend einen Objektträger mit der Probe, ein hochempfindliches Detektions- und Analysesystem, das eine Charged Coupled Device (CCD)-Kamera, welche einen Frameshift aufweist und einen Laser umfasst, dadurch gekennzeichnet, dass die Probe und/oder das Detektions- und Analysesystem beim Messprozess relativ zueinander kontinuierlich verschiebbar sind, und die Relativverschiebung zwischen Probe und Detektions- und Analysesystem durch eine Steuerungseinheit im Detektions- und Analysesystem steuerbar ist, welche Steuerungseinheit einen Prozessor umfasst und durch den Frameshift der CCD-Kamera direkt triggerbar ist.
2. Vorrichtung nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass eine durch kombinatorische Chemie hergestellte Molekülbank als Probe auf dem Objektträger fixiert ist.
3. Vorrichtung nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, dass der Objektträger als Durchflusszelle ausgebildet ist.
4. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, dass der Objektträger als x-y-Step-Motor ausgebildet ist.
5. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 1 bis 4, dadurch gekennzeichnet, dass die Fokussierungsebene entlang der z-Richtung zusätzlich zur Relativbewegung zwischen Probe und Detektions- und Analysesystem durch ein Piezoelement verschiebbar ist.
6. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 1 bis 5, dadurch gekennzeichnet, dass der Laser als 2-Photonen-Fluoreszenz-Anregungs-Laser ausgebildet ist.
7. Verfahren zur Visualisierung von Molekülen, von deren Bewegung und von Wechselwirkungen zwischen Molekülen und von molekularen Prozessen in einer Probe unter

- Verwendung einer Vorrichtung nach einem der Ansprüche 1 bis 6, dadurch gekennzeichnet, dass die zu untersuchende, auf dem Objektträger befindliche Probe durch die CCD-Kamera auf ein Pixelarray abgebildet wird, wobei die Probe und/oder das Detektions- und Analysesystem konstant und kontinuierlich relativ zueinander verschoben wird, wobei der Frameshift der CCD-Kamera benutzt wird, so dass die Signale jedes Einzelmoleküls in der Probe nach Konversion in Elektronen in den gleichen Pixeln gesammelt werden, so lange, bis das Einzelmolekülsignal einen bestimmten Mindest-Signal/Rausch-Abstand übersteigt.
8. Verfahren nach Anspruch 7, dadurch gekennzeichnet, dass die Bewegung der Probe entsprechend dem Frameshift der CCD-Kamera gesteuert wird.
 9. Verfahren nach Anspruch 7 oder 8, dadurch gekennzeichnet, dass verschiedene Molekülarten mit einem Fluoreszenz-Farbstoff markiert werden.
 10. Verfahren nach Anspruch 9, dadurch gekennzeichnet, dass zumindest zwei verschiedene Molekülarten mit verschiedenen Fluoreszenz-Farbstoffen Fluoreszenz-markiert werden.
 11. Verfahren nach einem der Ansprüche 7 bis 10, dadurch gekennzeichnet, dass die zu untersuchende Probe biologische Zellen, vorzugsweise Zellen mit geringer Eigenfluoreszenz, umfasst.
 12. Verfahren nach einem der Ansprüche 7 bis 11, dadurch gekennzeichnet, dass das Verfahren als Hochdurchsatz-Analyse durchgeführt wird.
 13. Verfahren nach einem der Ansprüche 7 bis 12, dadurch gekennzeichnet, dass die Wechselwirkung einer durch kombinatorische Chemie hergestellten Molekülbank mit biologischen Zellen untersucht wird.
 14. Verfahren nach einem der Ansprüche 7 bis 13, dadurch gekennzeichnet, dass mindestens 10^6 biologische Zellen oder mindestens 10^{10} Moleküle pro Inch^2 ($6,45 \text{ cm}^2$) pro Stunde analysiert werden.

HIEZU 18 BLATT ZEICHNUNGEN

FIG. 1

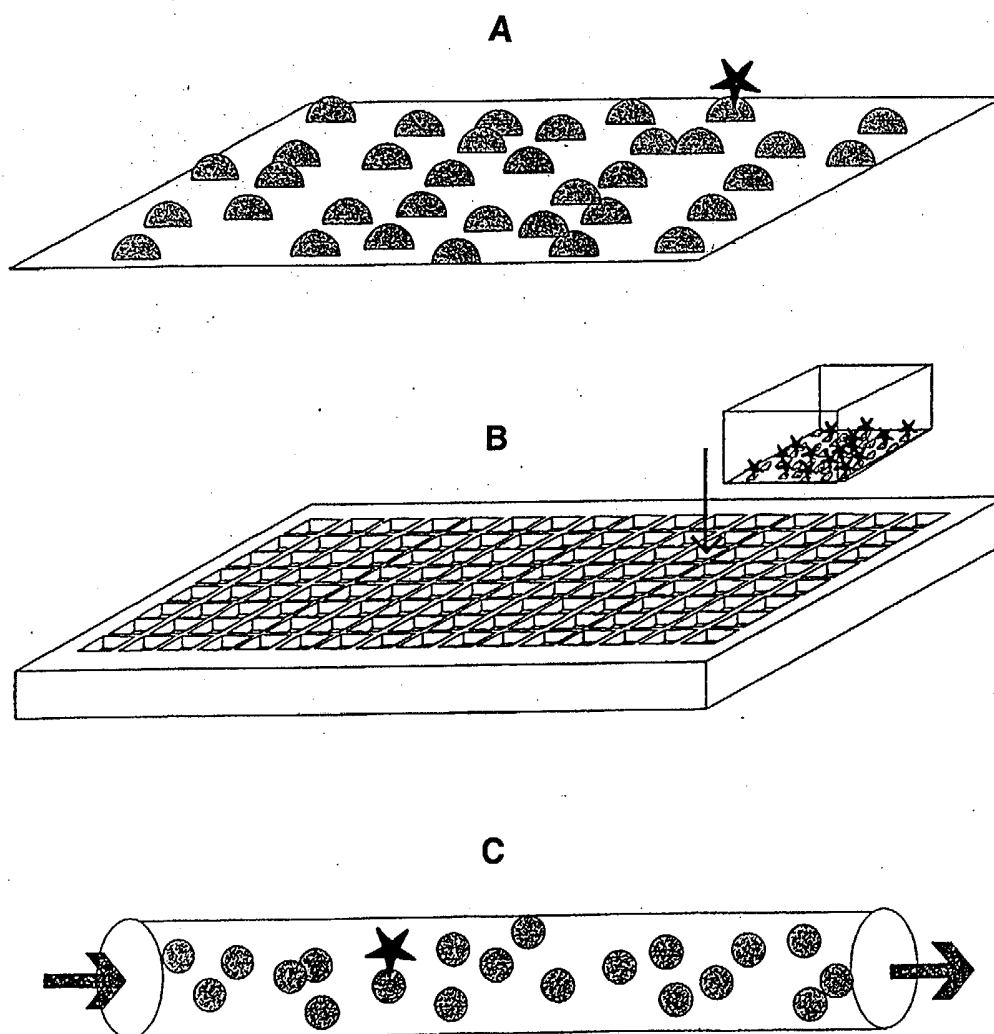


FIG. 2

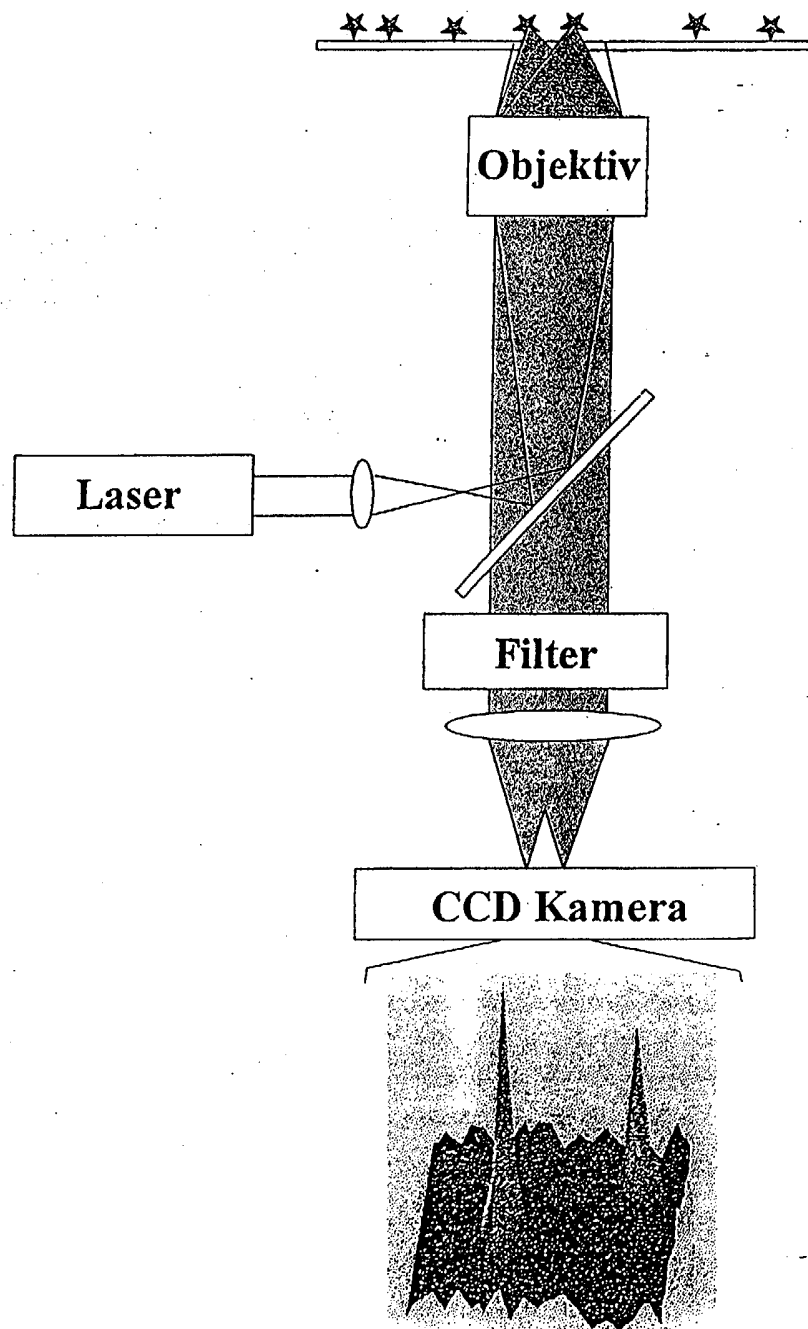


FIG. 3

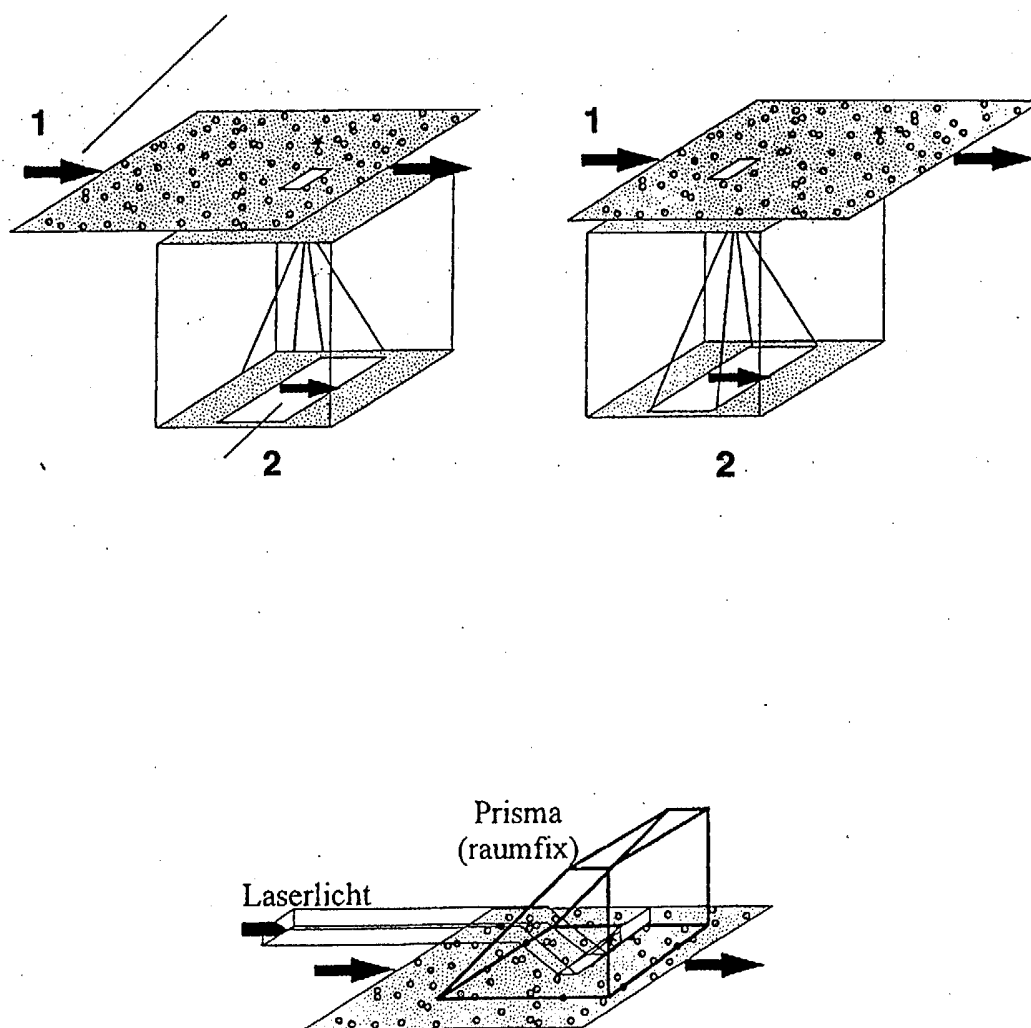


FIG. 4

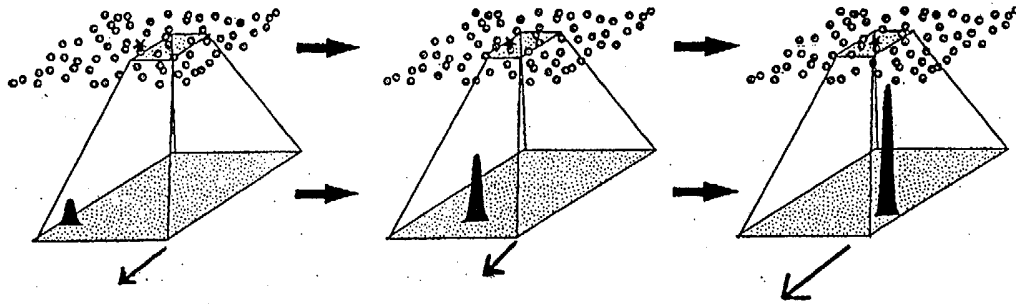


FIG. 5

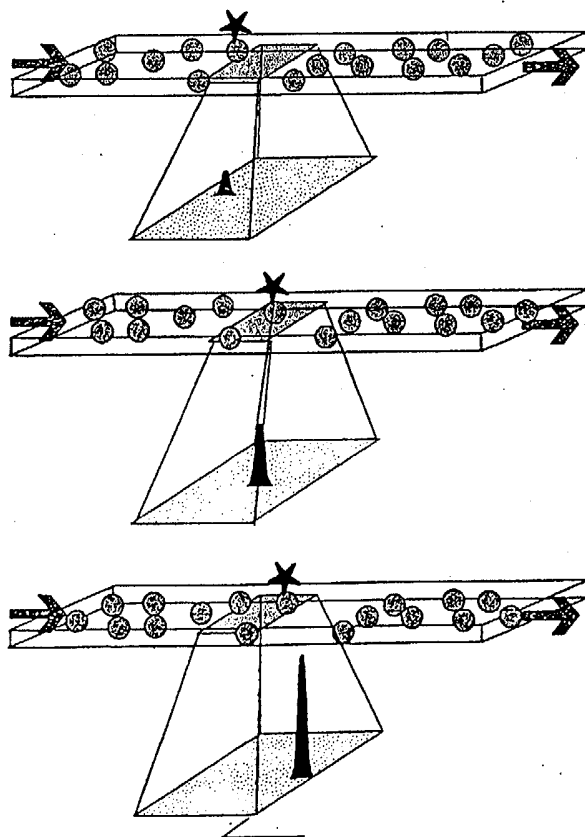


FIG. 6

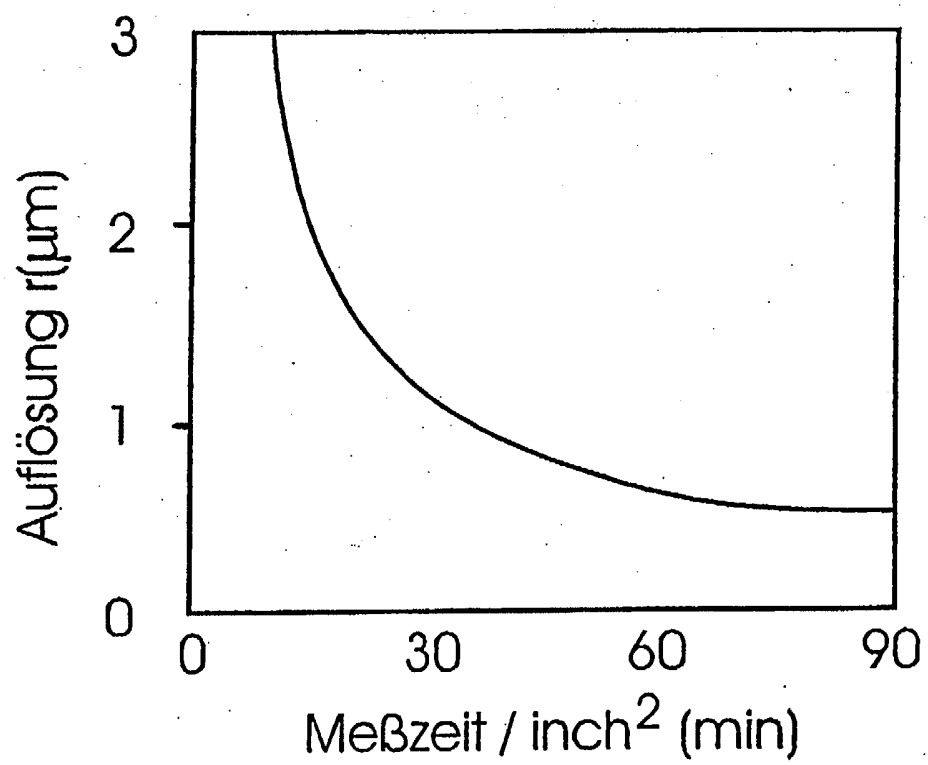


FIG. 7

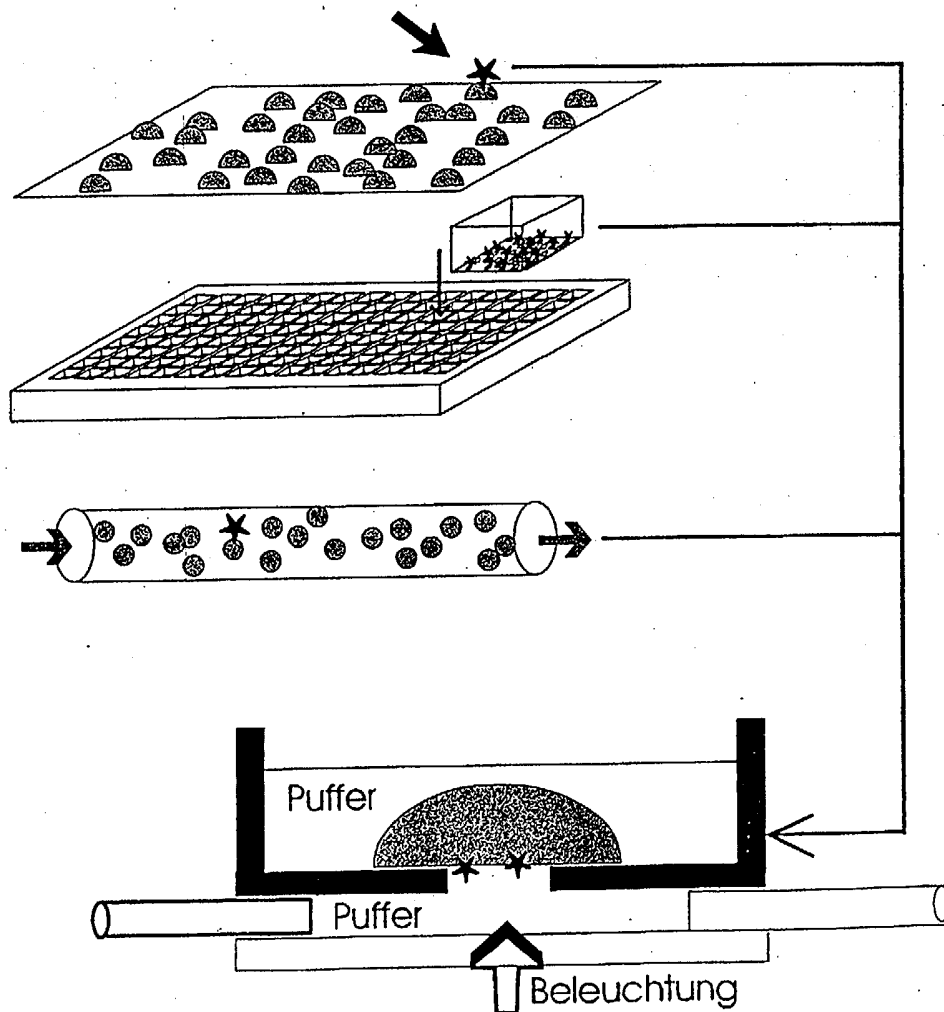


FIG. 8

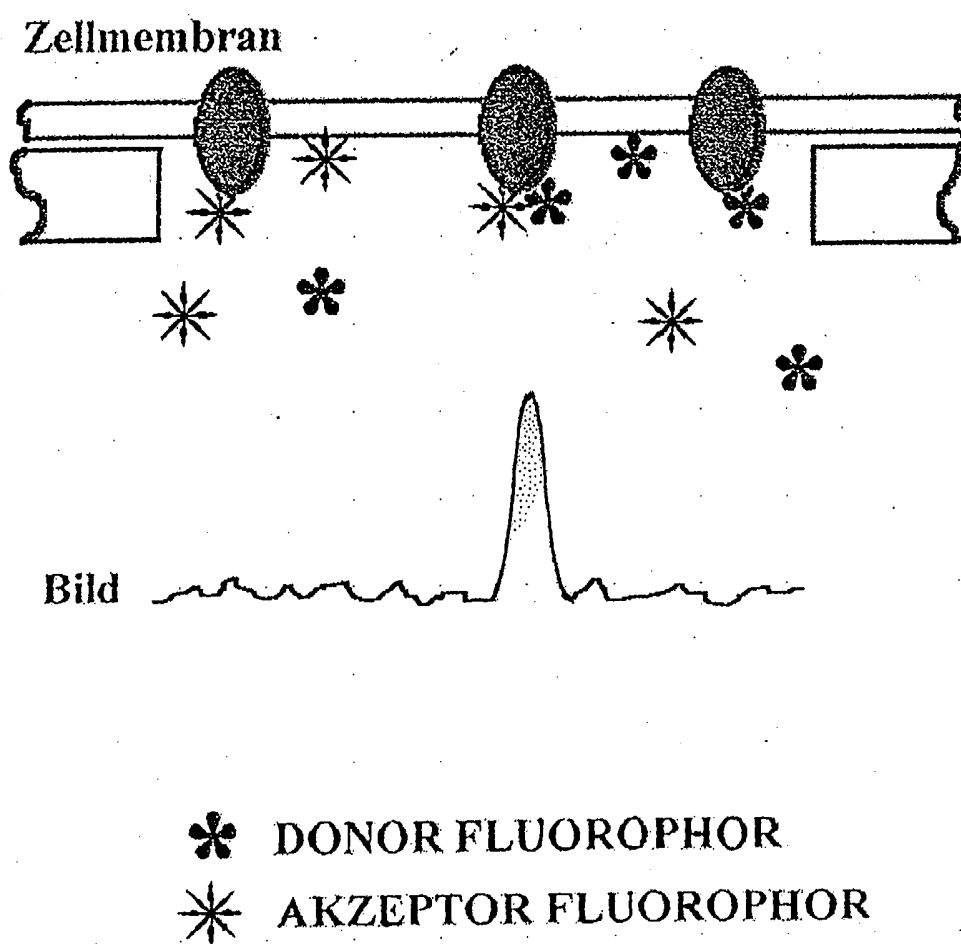


FIG. 9

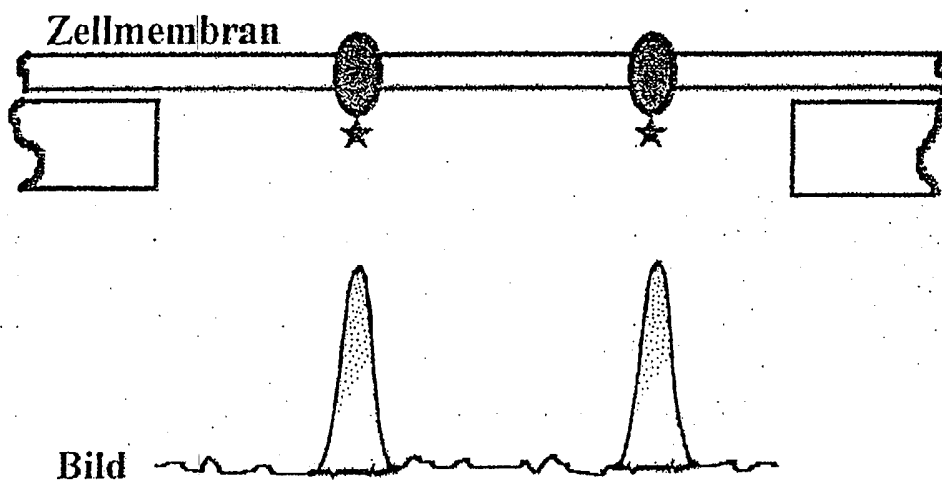


FIG. 10

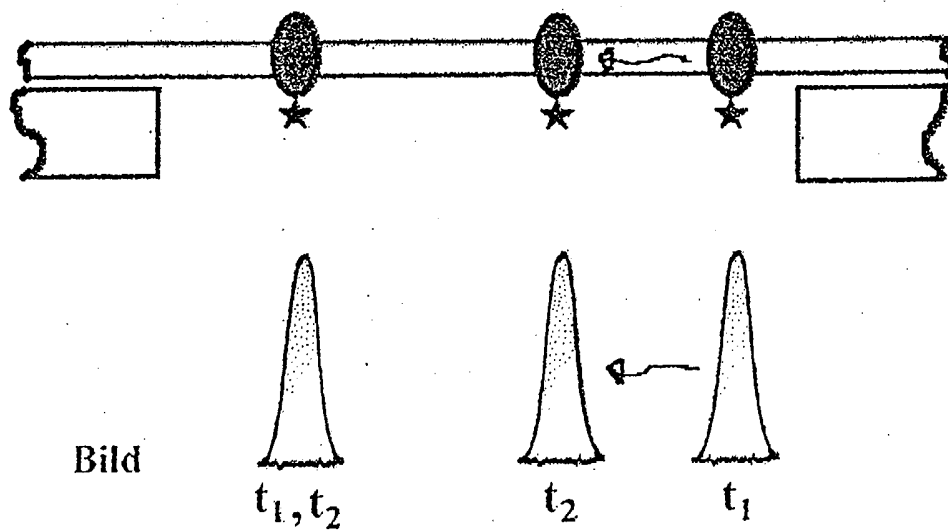


FIG. 11

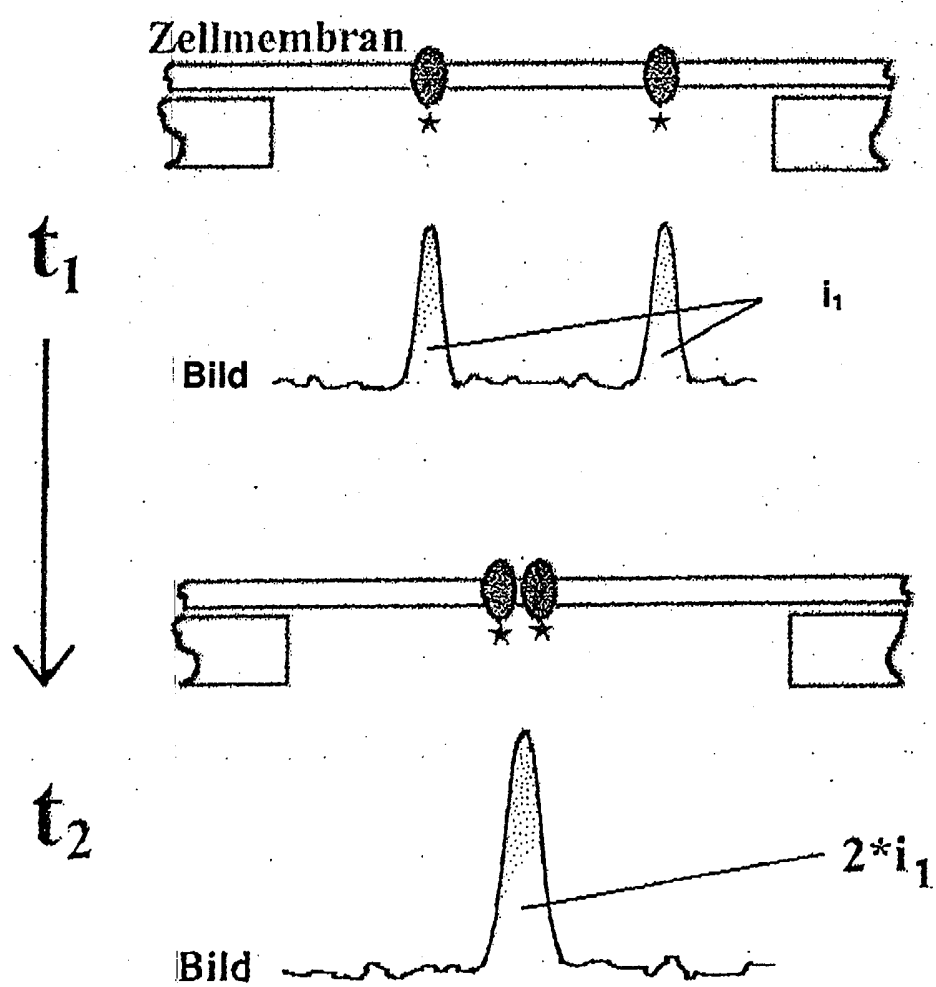


FIG. 12

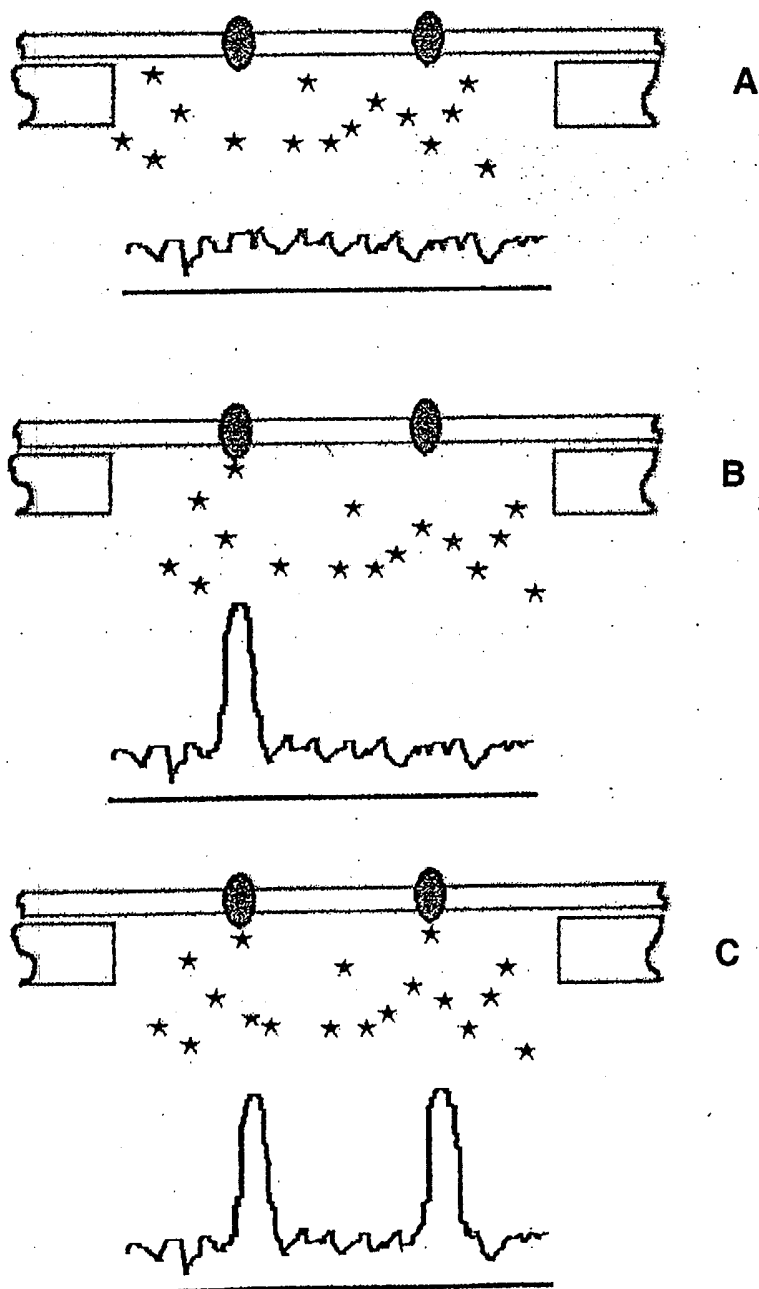


FIG. 13

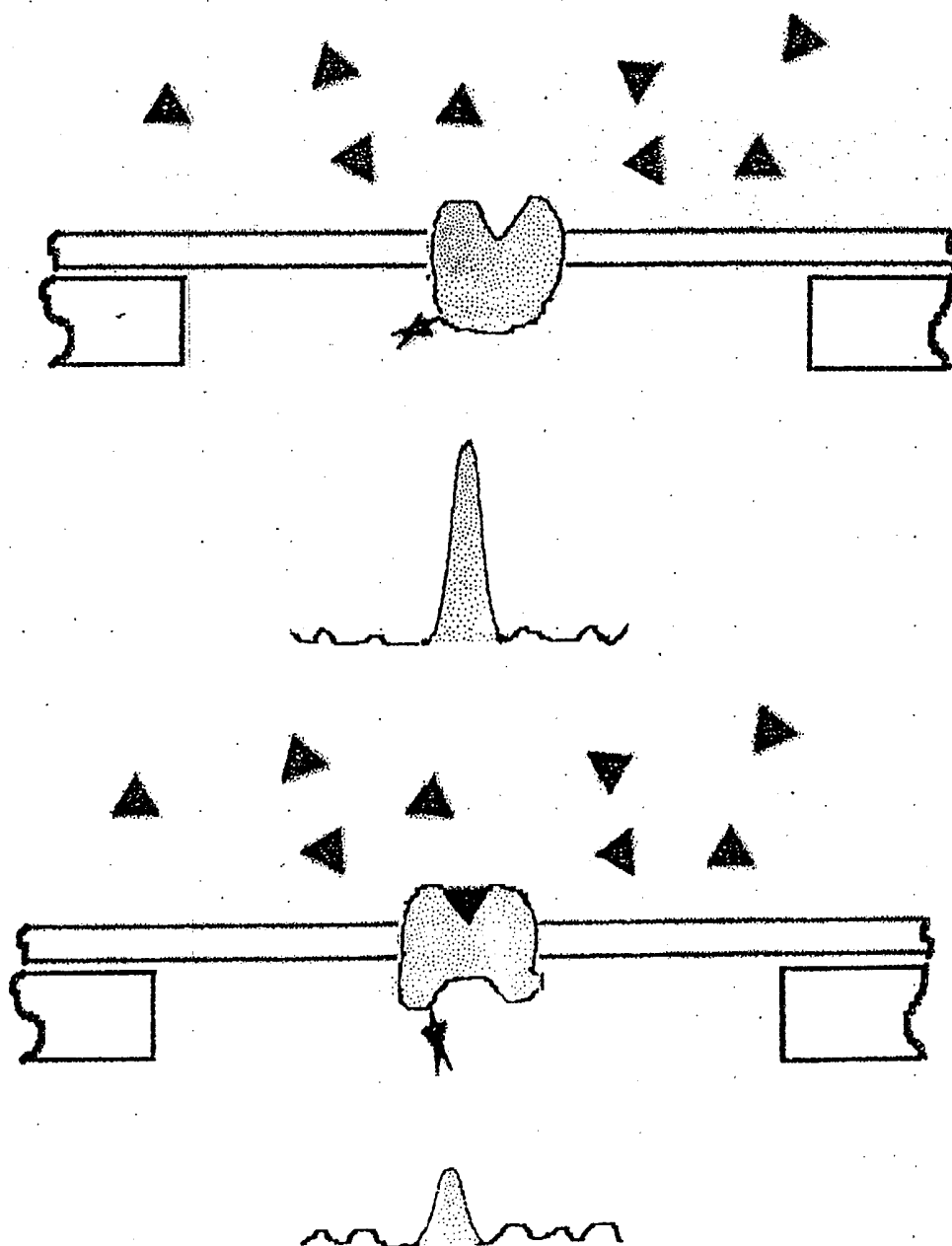


FIG. 14

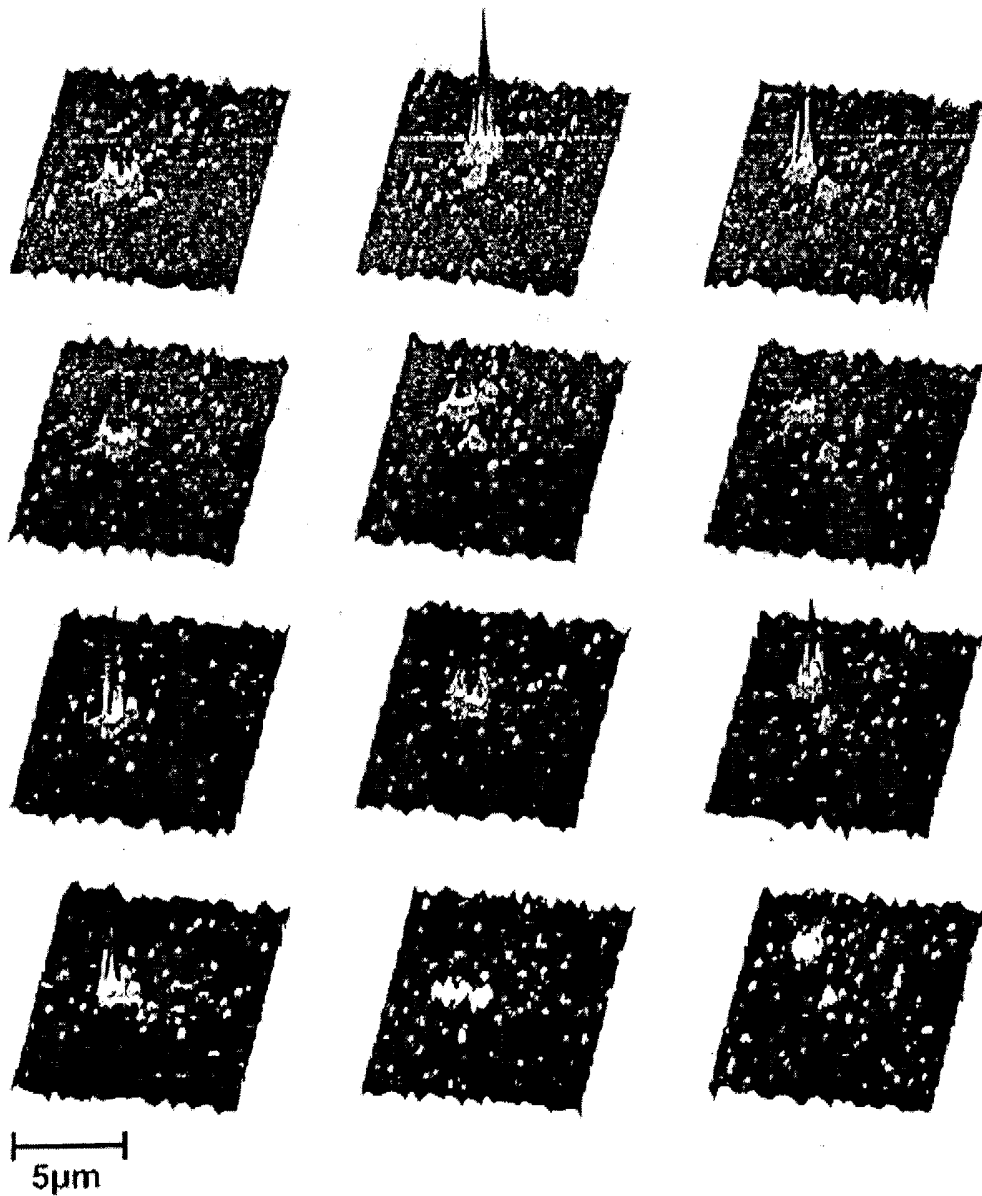


FIG. 15

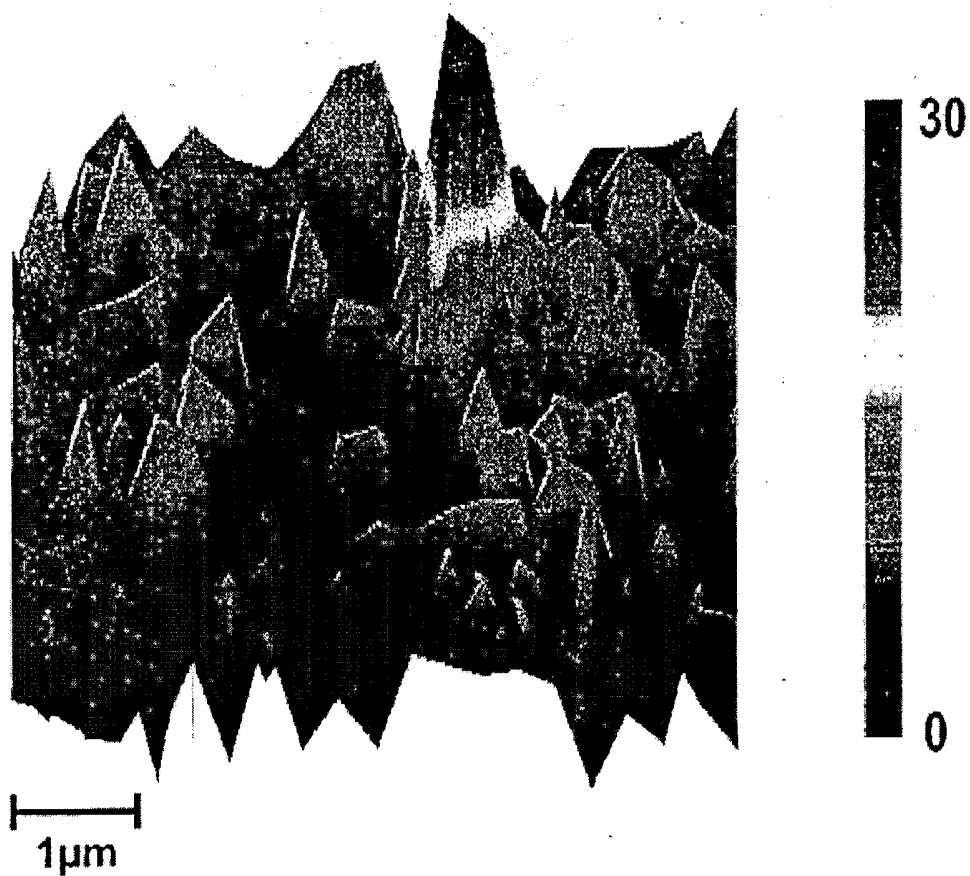


FIG. 16

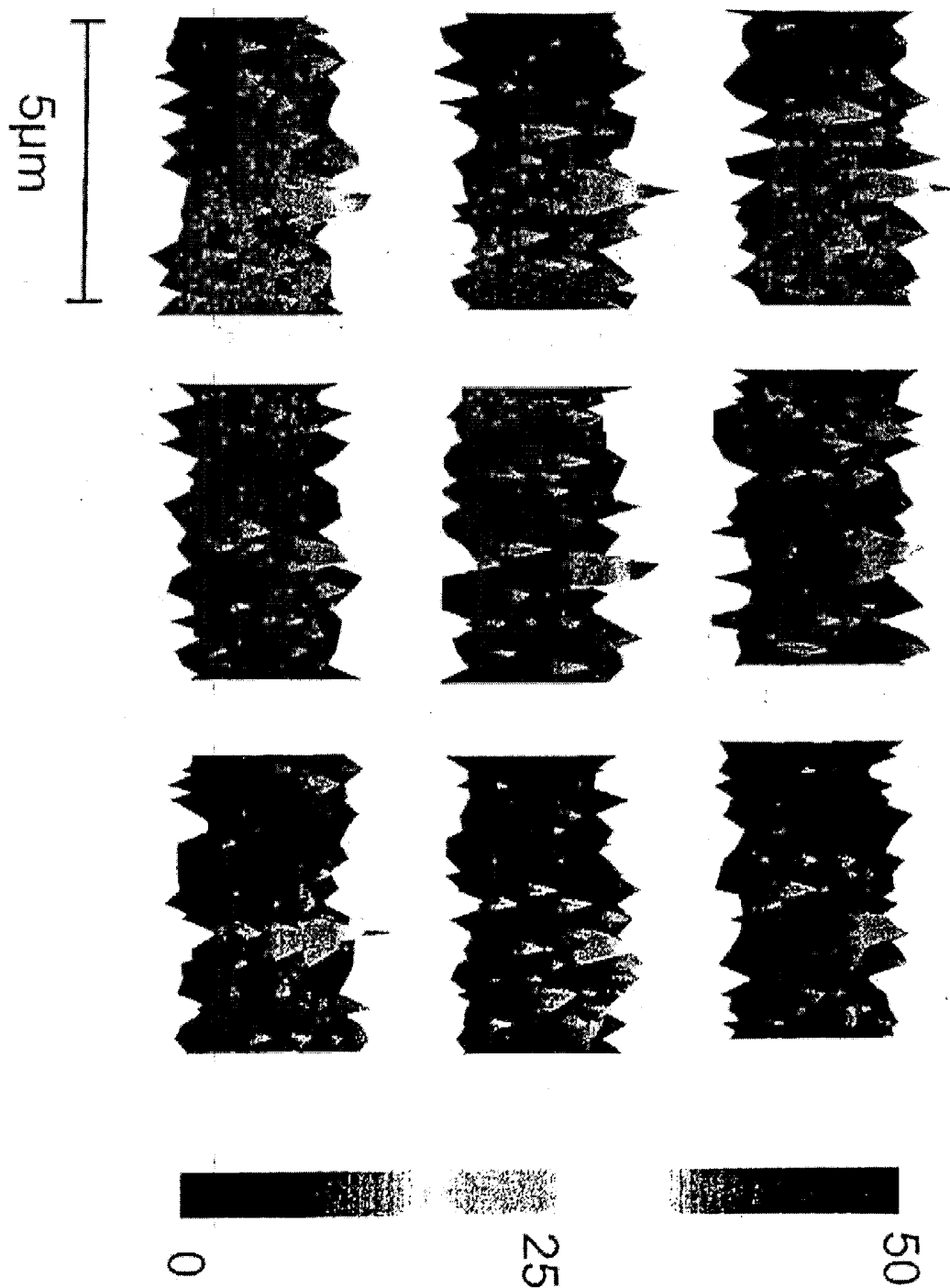


FIG. 17

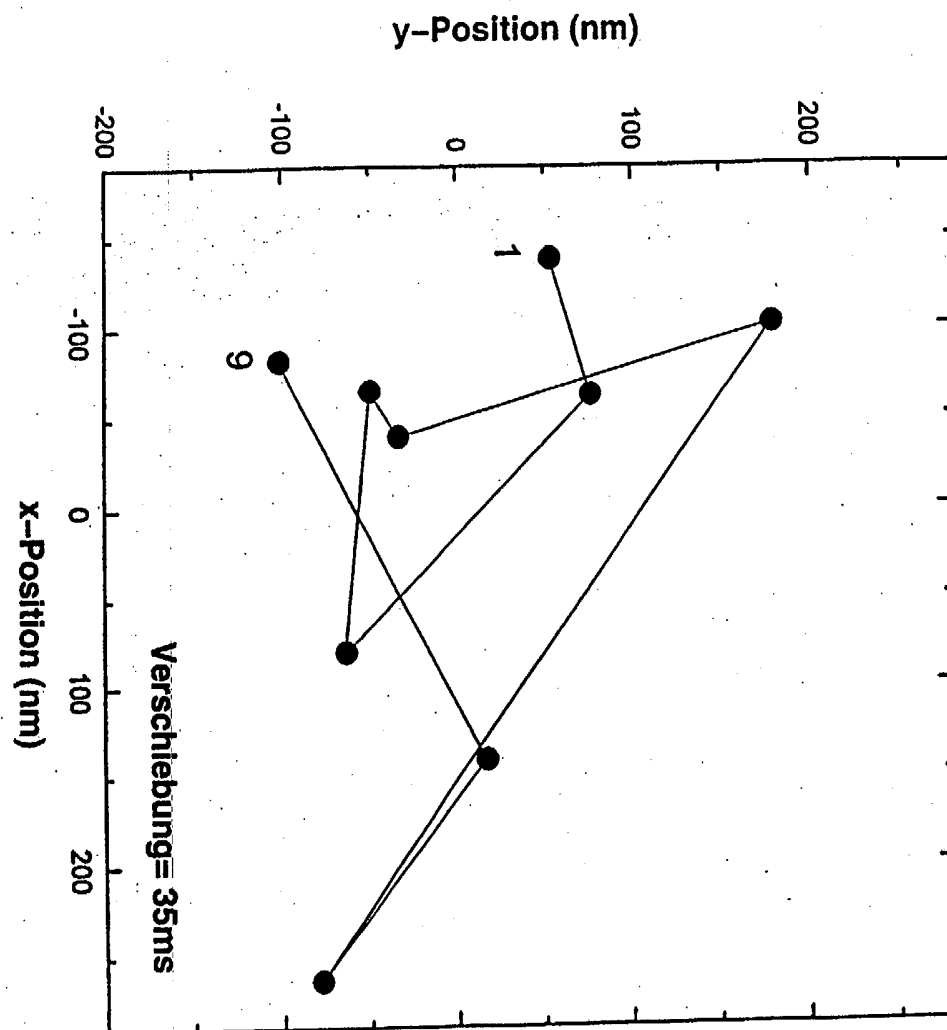


FIG. 18

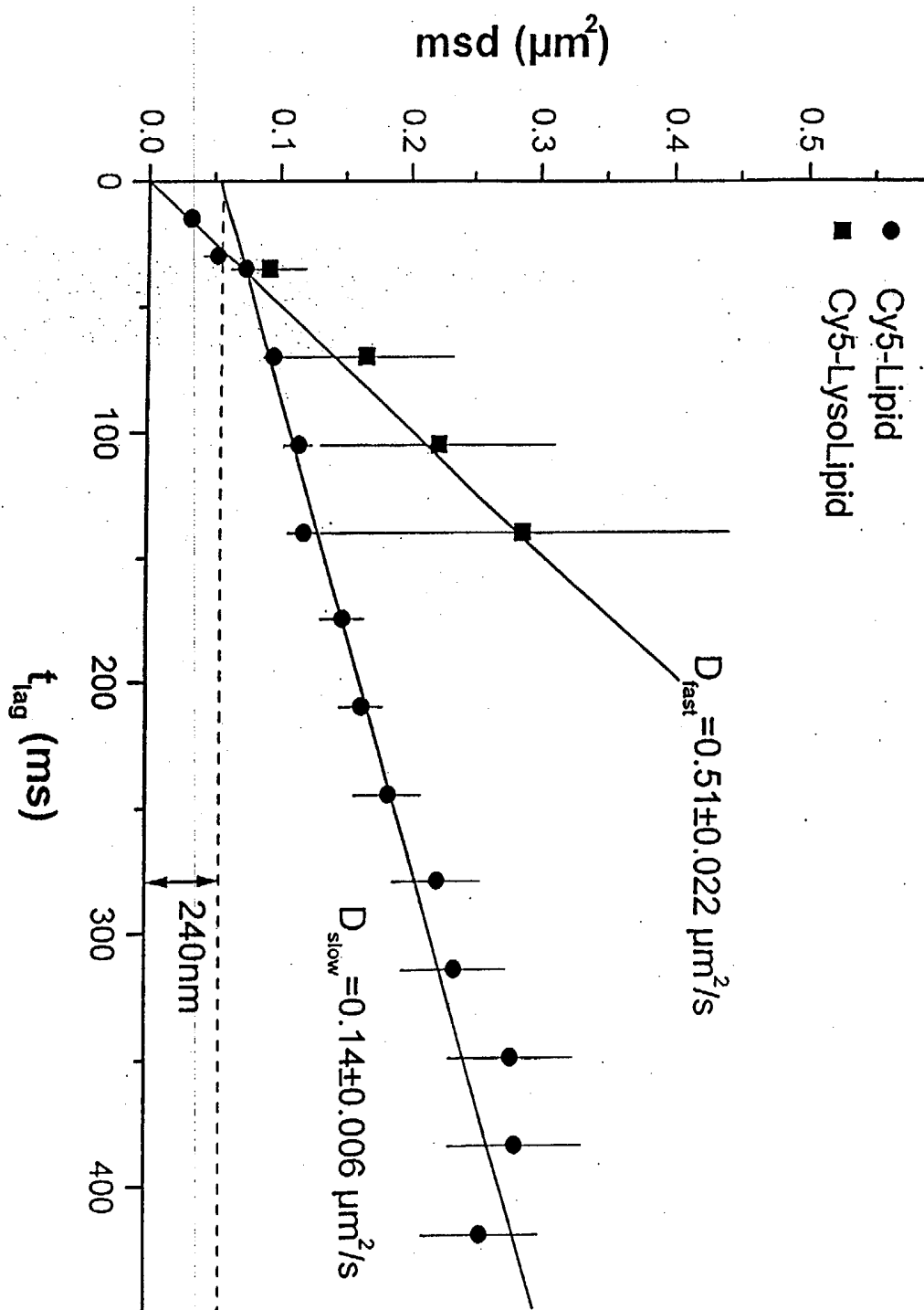


FIG. 19

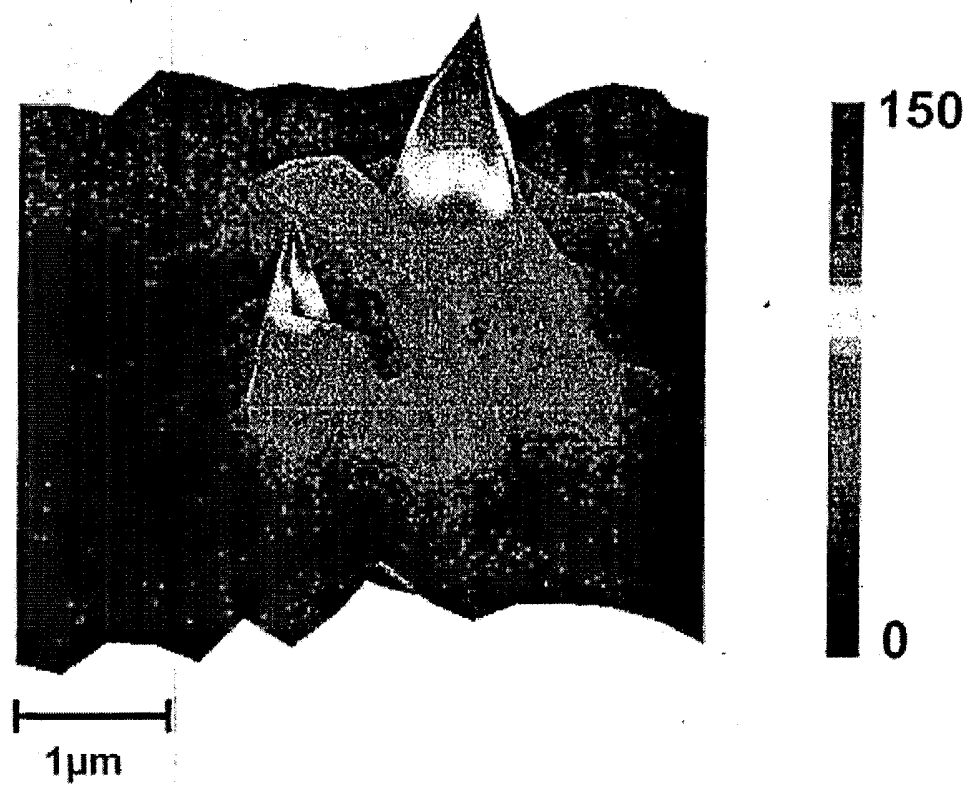


FIG. 20A

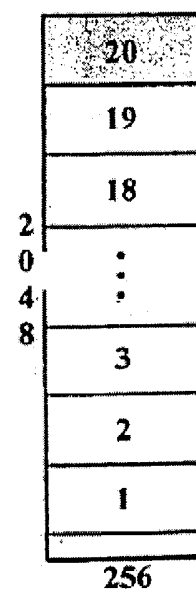
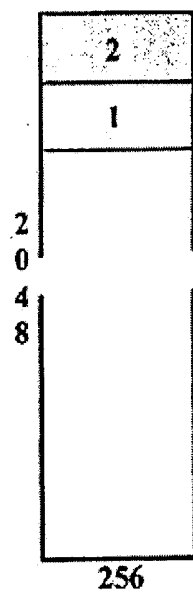
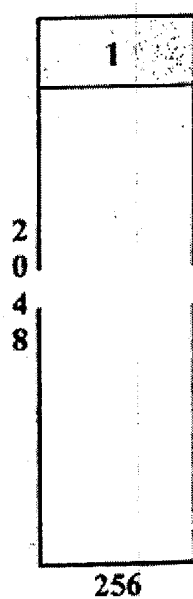
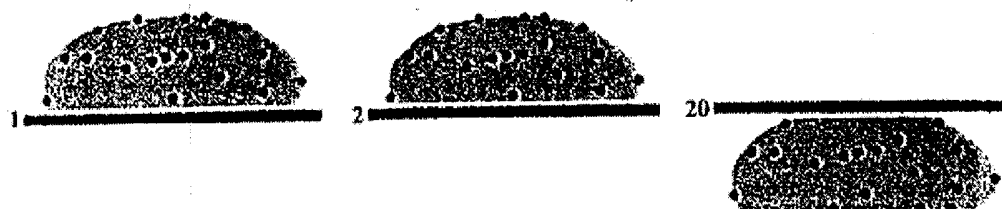


FIG. 20B

