

Mykologie

Superaufgelöste Mikroskopie: Pilze unter Beobachtung

SEBASTIAN SPUTH¹, SABINE PANZER¹, CHRISTIAN STIGLOHER², ULRICH TERPITZ¹

¹LEHRSTUHL FÜR BIOTECHNOLOGIE UND BIOPHYSIK, BIOZENTRUM, UNIVERSITÄT WÜRZBURG

²ZENTRALE ABTEILUNG FÜR MIKROSKOPIE, BIOZENTRUM, UNIVERSITÄT WÜRZBURG

The diffraction limit of light confines fluorescence imaging of sub-cellular structures in fungi. Different super-resolution methods are available for the analysis of fungi that we briefly discuss. We exploit the filamentous fungus *Fusarium fujikuroi* expressing a YFP-labeled membrane protein showing the benefit of correlative light- and electron microscopy (CLEM), that combines structured illumination microscopy (SIM) and scanning electron microscopy (SEM).

DOI: 10.1007/s12268-021-1592-6
© Die Autoren 2021

■ Um zellbiologische Vorgänge in Pilzen zu untersuchen, kennzeichnen Mykologen bestimmte subzelluläre Strukturen mit spezifischen Fluoreszenzfarbstoffen oder fluo-

reszierenden Proteinen wie dem gelb fluoreszierenden Protein (*yellow fluorescent protein*, YFP). Die fädigen Pilzzellen (Hyphen) sind meist sehr dünn und weisen Durchmesser zwischen zwei und drei Mikrometern auf. Bei der mikroskopischen Untersuchung der Hyphen stoßen Mykologen daher schnell auf ein Hindernis: das Abbe-Limit.

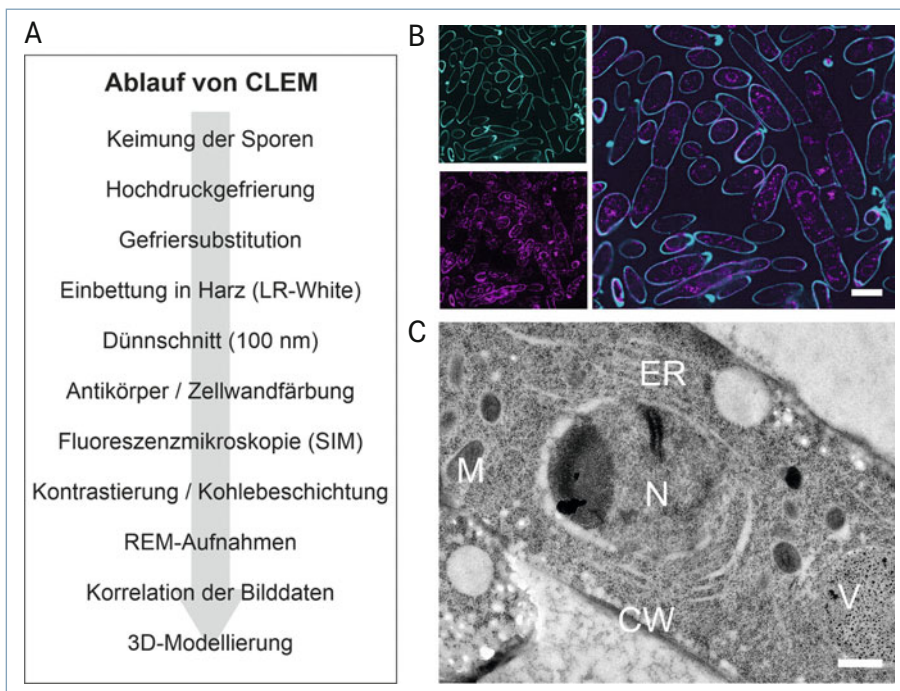
Die mikroskopische Auflösung von Pilzen ist begrenzt

Der Physiker und Optiker Ernst Abbe stellte im 19. Jahrhundert fest, dass aufgrund der Welleneigenschaften des Lichts keine noch so optimierte Optik fähig ist, Lichtstrahlen beliebig fein zu bündeln und dass die gebündelten Bereiche mindestens die Größe in etwa der halben Wellenlänge des eingesetzten Lichts haben. Anders ausgedrückt, können feine Details im mikroskopischen Untersuchungsobjekt nicht mehr getrennt dargestellt werden, wenn sie näher beieinanderliegen als ungefähr die halbe Wellenlänge des Lichts. Blaues Licht weist mit um die 400 Nanometer die kürzesten Wellenlängen innerhalb des sichtbaren Lichts auf. Damit liegt das Abbe-Limit je nach verwendeter Optik im Bereich von 150–200 Nanometern.

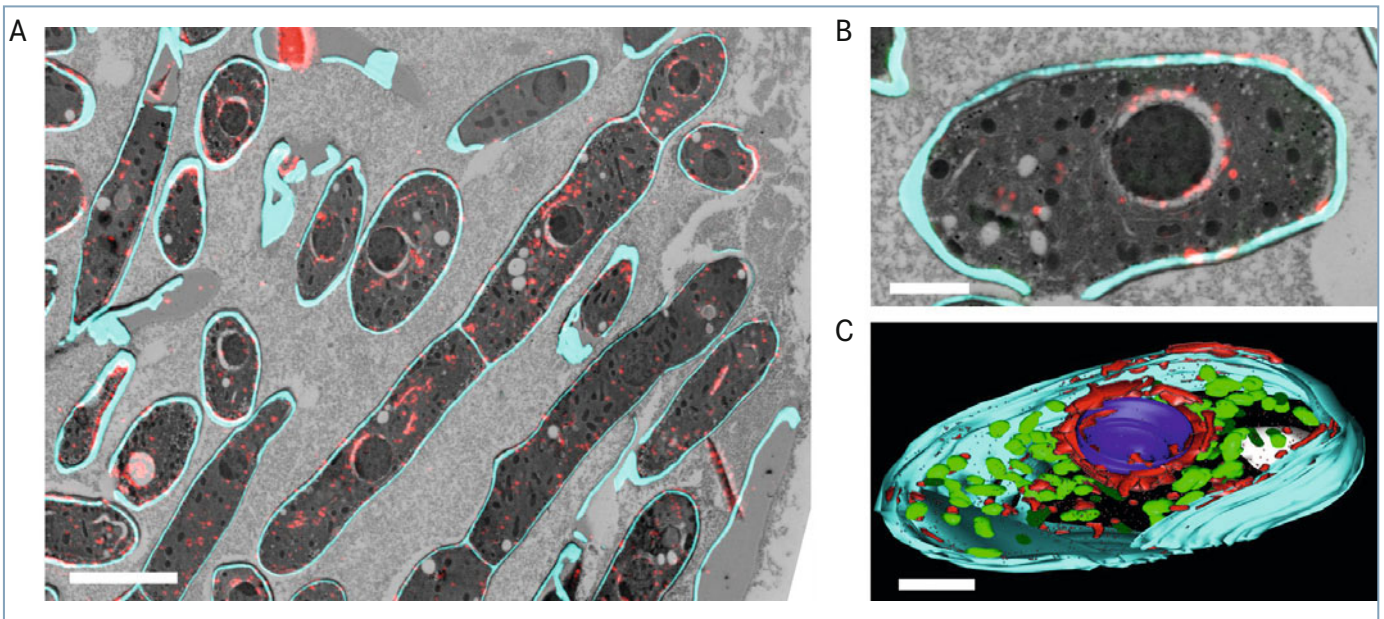
Neue mikroskopische Verfahren erhöhen die Auflösung

In den letzten Jahren wurden viele verschiedene Methoden entwickelt, die das Abbe-Limit umgehen und die Auflösung der Fluoreszenzmikroskope deutlich verbessern. Diese Methoden werden unter dem Begriff „Superaufgelöste Fluoreszenzmikroskopie“ zusammengefasst.

Besonders deutlich ist die Auflösungsverbesserung bei der Lokalisationsmikroskopie, die Techniken wie PALM (*photoactivated localisation microscopy*) und dSTORM (*direct stochastic optical reconstruction microscopy*) umfasst [1]. Die hierbei verwendeten Fluorophore geben normalerweise nach Anregung spontan innerhalb weniger Nanosekunden längerwelliges und energieärmeres Licht ab (Emission). Jedoch ist es mithilfe von sehr starken Lichtintensitäten und Sauerstoff-



▲ **Abb. 1:** Korrelative Licht- und Elektronenmikroskopie (LEM) an Dünnschnitten (65–100 nm dick) von *Fusarium fujikuroi*-CarO-YFP in LR-White. **A**, Übersicht über den experimentellen Ablauf für die korrelative Licht- und Elektronenmikroskopie. **B**, SIM-Aufnahmen. Die Zellwand wurde mit Calcofluor eingefärbt (türkis, links oben), YFP mit einem mit Alexa488-markierten Antikörper (pink, links unten). Überlagerung rechts. Maßstab: 5 µm. **C**, TEM-Aufnahme. Die Ultrastruktur der Hyphe ist deutlich zu erkennen. CW: Zellwand; ER: Endoplasmatisches Retikulum; M: Mitochondrium; N: Nucleus; V: Vakuole. Maßstab: 500 nm.



▲ **Abb. 2:** Korrelative Licht- und Elektronenmikroskopie von *Fusarium fujikuroi*-CarO-YFP. **A,** REM-Aufnahme mit korreliertem Fluoreszenzsignal der SIM-Aufnahmen mit Zellwand (türkis) und CarO-YFP (rot). Maßstab: 5 µm. **B,** Detailausschnitt. Von dieser Zelle wurde ein Z-Bildstapel erzeugt. Maßstab: 1 µm. **C,** Aus dem Bildstapel lässt sich nun ein Modell berechnen. Maßstab: 1 µm.

mangel möglich, die Fluorophore im dunklen Zustand zu stabilisieren. Betrachtet man eine solche Probe, blinken einzelne Fluorophore nur kurz auf, um anschließend lange Zeit dunkel zu bleiben. Mit sensitiven Hochgeschwindigkeitskameras kann dieses Blinken als Bilderserie aufgenommen werden. In jedem Bild erscheinen Fluorophore als Punktspreizfunktion mit einem Maximum, dessen Lage durch eine einfache mathematische Analyse bestimmt werden kann. Werden alle diese Maxima in ein neues Bild übertragen, entsteht ein rekonstruiertes neues Bild, das unter optimalen Bedingungen auch Strukturen auflösen kann, die weniger als 20 Nanometer Abstand haben. Lokalisationsmikroskopie erfordert allerdings insbesondere bei Pilzen teils intensive Protokolloptimierungen.

Seit wenigen Jahren gibt es für die Beobachtung von Strukturen jenseits des Abbe-Limits einen neuen Ansatz, die Expansionsmikroskopie (ExM) [2]. Statt das Mikroskop zu modifizieren, vergrößert man bei dieser Technik die Probe selbst. Dies erreicht man, indem man Farbstoffe in einem Hydrogel verankert, das sich dann bei Entsalzung in Wasser ausdehnt. ExM wurde bereits erfolgreich an Pilzen wie *Aspergillus fumigatus*, *Fusarium oxysporum* und *Ustilago maydis* etabliert [3].

Für die regelmäßige Arbeit mit Pilzen hat sich in unserem Labor die Strukturierte Illuminationsmikroskopie (SIM) [4] bewährt. Bei

SIM befindet sich ein rotierendes Gitter im Strahlengang des Anregungslichts, das Beleuchtungsmuster in der Probe erzeugt. Das resultierende Fluoreszenzbild enthält auch Strukturinformationen jenseits der Auflösungsgrenze. Alle Bilder der verschiedenen Einstrahlwinkel werden miteinander verrechnet, und so wird ein neues superaufgelöstes Bild rekonstruiert. Die Aufnahmen können in verschiedenen Z-Ebenen erfolgen, um somit ein 3D-Bild zu erzeugen. SIM ist auch bei lebenden Zellen anwendbar. So lässt sich z. B. der pH-Gradient innerhalb von Pilzzellen darstellen, wie kürzlich am Maisbeulenbrand *U. maydis* gezeigt [5].

Gemeinsame Fluoreszenz- und Elektronenmikroskopie

Klassischerweise wird und wurde die Elektronenmikroskopie (EM) verwendet, um mit einer Auflösung von unter einem Nanometer Strukturinformationen weit jenseits des Abbe-Limits zu erzielen. Allerdings erfordert die EM im Vergleich zur Lichtmikroskopie langwierige Fixierungs- und Einbettungsschritte der Probe. Die Ausgabe erfolgt in Graustufen, Farben werden nicht dargestellt. Daher ist es bestechend, die Vorteile von EM und Fluoreszenzmikroskopie zu verbinden. Man nennt diese Technik korrelative Licht- und Elektronenmikroskopie (CLEM), wobei Fluoreszenzsignale in elektronenmikroskopischen Bildern einer Struktur zugeordnet werden können. Erst die verbesserte Auflösung der

modernen fluoreszenzmikroskopischen Verfahren sowie die wachsende Rechenkapazität von Computern ermöglichte eine systematische und sinnvolle Verknüpfung der Bildinformationen von Fluoreszenz- und Elektronenmikroskopie.

Wir testeten, inwieweit dieser CLEM-Ansatz an Pilzen praktiziert werden kann. Für diesen Versuch wählten wir den Schlauchpilz (Ascomycet) *Fusarium fujikuroi*, der das fluoreszenzmarkierte Membranprotein CarO-YFP, ein Rhodopsin, bildet [6]. Eine Übersicht des experimentellen Ablaufs zeigt **Abbildung 1A**; im Wesentlichen folgten wir dem Protokoll von Sebastian Markert *et al.* [7], mit einigen Anpassungen.

Die Pilzsporen (Konidien) keimen 15 Stunden und werden dann unter Hochdruck schockgefroren und somit im nahezu nativen Zustand kryoimmobilisiert. Anschließend erfolgt nach allmählicher Niedertemperatur-entwässerung und Fixierung (Gefriersubstitution) mit Aceton und Ethanol als Lösungsmittel die Einbettung in das hydrophile Harz LR-White. In LR-White bleiben viele Proteinstrukturen erhalten, sodass spezifische Antikörper auch in den davon gefertigten Dünnschnitten binden können. Wir verwenden einen anti-YFP-Antikörper, der mit einem Fluoreszenzfarbstoff markiert ist und spezifisch das Membranprotein CarO-YFP erkennt. Außerdem färben wir die Zellwand mit Calcofluor, einem Farbstoff, der Chitin erkennt. Mit SIM ist im Dünnschnitt sowohl

das anti-YFP-Signal als auch die Zellwand gut zu erkennen (**Abb. 1B**).

Im Anschluss an die Fluoreszenzmikroskopie erfolgt die Kontrastierung mit Uranylacetat und Bleicitrat sowie die Bedampfung mit einer sehr dünnen Kohleschicht zur Vorbereitung der Analyse am Rasterelektronenmikroskop (REM). Auch in den REM-Aufnahmen sind die Zellwände deutlich zu erkennen (**Abb. 1C**). Damit eignet sich die Zellwand als Referenzstruktur, um die beiden bildgebenden Verfahren miteinander zu korrelieren.

Entwicklung eines Modells zur Darstellung des Pilzes

Da die Ultradünnschnitte in Serie gefertigt werden, ist es möglich, Bildstapel zu erstellen, bei denen dieselbe Hyphe in unterschiedlichen Z-Ebenen zu sehen ist. Um SIM- und REM-Daten zu korrelieren, müssen alle Bilder einer Schnittserie ausgerichtet, das Fluoreszenzsignal zugeordnet und schließlich über das EM-Bild gelegt werden (**Abb. 2A**). In unserem Beispiel ist deutlich erkennbar, dass das Rhodopsin CarO insbesondere im Endoplasmatischen Retikulum (ER) und in der Plasmamembran vorliegt. Mithilfe des Programms IMOD [8] kann ein 3D-Modell erzeugt werden (**Abb. 2B, C**), indem in jeder Ebene bestimmte Strukturen markiert werden, in unserem Beispiel das Rhodopsin, die Zellwand, der Zellkern und die Mitochondrien.

Superaufgelöste Mikroskopie hilft bei der Erforschung von Pilzen

In den letzten Jahren haben sich viele Möglichkeiten im Bereich der Mikroskopie ergeben. Für die Erforschung der Zellbiologie von Pilzen gibt es nunmehr eine Reihe von unterschiedlichen Methoden, um die Vorgänge in der Zelle jenseits des Abbe-Limits zu visualisieren. Die Korrelation von fluoreszenzmikroskopischen Daten mit der enormen Detailgenauigkeit von Hochdruck-Gefrier-EM-Präparaten ist eine vielversprechende Möglichkeit, um unser Verständnis von Pilzen voranzubringen.

Danksagung

Wir danken Nora Trinks und Jan Schlegel für die initialen CLEM-Experimente. Diese

Arbeit wurde gefördert durch die DFG (Projekt TE832/4-1).

Literatur

- [1] Hohlbein J, Gryte K, Heilemann M, Kapanidis AN (2010) Surfing on a new wave of single-molecule fluorescence methods. *Phys Biol* 7: 031001
- [2] Chen F, Tillberg PW, Boyden ES (2015) Optical imaging. *Expansion microscopy*. *Science* 347: 543–548
- [3] Götz R, Panzer S, Trinks N et al. (2020) Expansion microscopy for cell biology analysis in fungi. *Front Microbiol* 11: 574
- [4] Gustafsson MGL, Shao L, Carlton PM et al. (2008) Three-dimensional resolution doubling in wide-field fluorescence microscopy by structured illumination. *Biophys J* 94: 4957–4970
- [5] Panzer S, Brych A, Batschauer A, Terpitz U (2019) Opsin 1 and Opsin 2 of the corn smut fungus *Ustilago maydis* are green light-driven proton pumps. *Front Microbiol* 10: 735
- [6] García-Martínez J, Brunk M, Avalos J, Terpitz U (2015) The CarO rhodopsin of the fungus *Fusarium fujikuroi* is a light-driven proton pump that retards spore germination. *Sci Rep* 5: 7798
- [7] Markert SM, Bessereau J, Stigloher C et al. (2016) Filling the gap: adding super-resolution to array tomography for correlated ultrastructural and molecular identification of electrical synapses at the *C. elegans* connectome. *Neurophotonics* 3: 41802

[8] Kremer JR, Mastrorade DN, McIntosh JR (1996) Computer visualization of three-dimensional image data using IMOD. *J Struct Biol* 116: 71–76

Funding note: Open Access funding enabled and organized by Projekt DEAL.
Open Access: Dieser Artikel wird unter der Creative Commons Namensnennung 4.0 International Lizenz veröffentlicht, welche die Nutzung, Vervielfältigung, Bearbeitung, Verbreitung und Wiedergabe in jeglichem Medium und Format erlaubt, sofern Sie den/die ursprünglichen Autor(en) und die Quelle ordnungsgemäß nennen, einen Link zur Creative Commons Lizenz beifügen und angeben, ob Änderungen vorgenommen wurden. Die in diesem Artikel enthaltenen Bilder und sonstiges Drittmaterial unterliegen ebenfalls der genannten Creative Commons Lizenz, sofern sich aus der Abbildungslegende nichts anderes ergibt. Sofern das betreffende Material nicht unter der genannten Creative Commons Lizenz steht und die betreffende Handlung nicht nach gesetzlichen Vorschriften erlaubt ist, ist für die oben aufgeführten Weiterverwendungen des Materials die Einwilligung des jeweiligen Rechteinhabers einzuholen. Weitere Details zur Lizenz entnehmen Sie bitte der Lizenzinformation auf <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/deed.de>.

Korrespondenzadresse:

PD Dr. Ulrich Terpitz
 Lehrstuhl für Biotechnologie und Biophysik
 Universität Würzburg
 Am Hubland
 D-97074 Würzburg
ulrich.terpitz@uni-wuerzburg.de

AUTOREN



Sebastian Sputh

2015–2020 Bachelor- und Masterstudium der Biowissenschaften an der Universität Würzburg mit praktischem Aufenthalt am Helmholtz-Institut für RNA-basierte Infektionsforschung. Fokus auf Mikrobiologie und Biotechnologie.



Sabine Panzer

2013–2018 Bachelor- und Masterstudium der Biowissenschaften an der Universität Würzburg. 2018–2021 Wissenschaftliche Mitarbeiterin und Promovendin am Lehrstuhl für Biotechnologie und Biophysik mit Fokus auf Elektrophysiologie und Fluoreszenzmikroskopie.



Christian Stigloher

1999–2004 Biologiestudium an der Universität Würzburg und der Duke University, Durham, NC, USA. 2004–2008 Promotion an der TU München und dem Helmholtz-Zentrum München. 2008–2012 Postdoc an der Ecole Normale Supérieure in Paris, Frankreich. Seit 2012 Professor für Mikroskopie in der Zentralen Abteilung für Mikroskopie am Biozentrum der Universität Würzburg.



Ulrich Terpitz

1998–2004 Biologiestudium an der Universität Hamburg und der Universität Jena. 2005–2009 Promotion an der Universität Frankfurt a. M. und dem Max-Planck-Institut für Biophysik in Frankfurt a. M. 2009–2010 Postdoc am Max-Planck-Institut für Biophysik. Seit 2011 Akademischer Rat bzw. Oberrat am Lehrstuhl für Biotechnologie und Biophysik am Biozentrum der Universität Würzburg.