

Wie arbeiten Proteine im Innern der Zelle? Um ihnen dabei zuschauen zu können, sind neue Mikroskope erforderlich, deren Auflösungsvermögen weit über das der herkömmlichen Lichtmikroskope hinausreicht. Stefan Hell und Dirk-Peter Herten beschreiben neue Mikroskopiearten, die es erlauben, bis in die Nanowelt der Zellen vorzudringen.

Einblick in den Nanokosmos

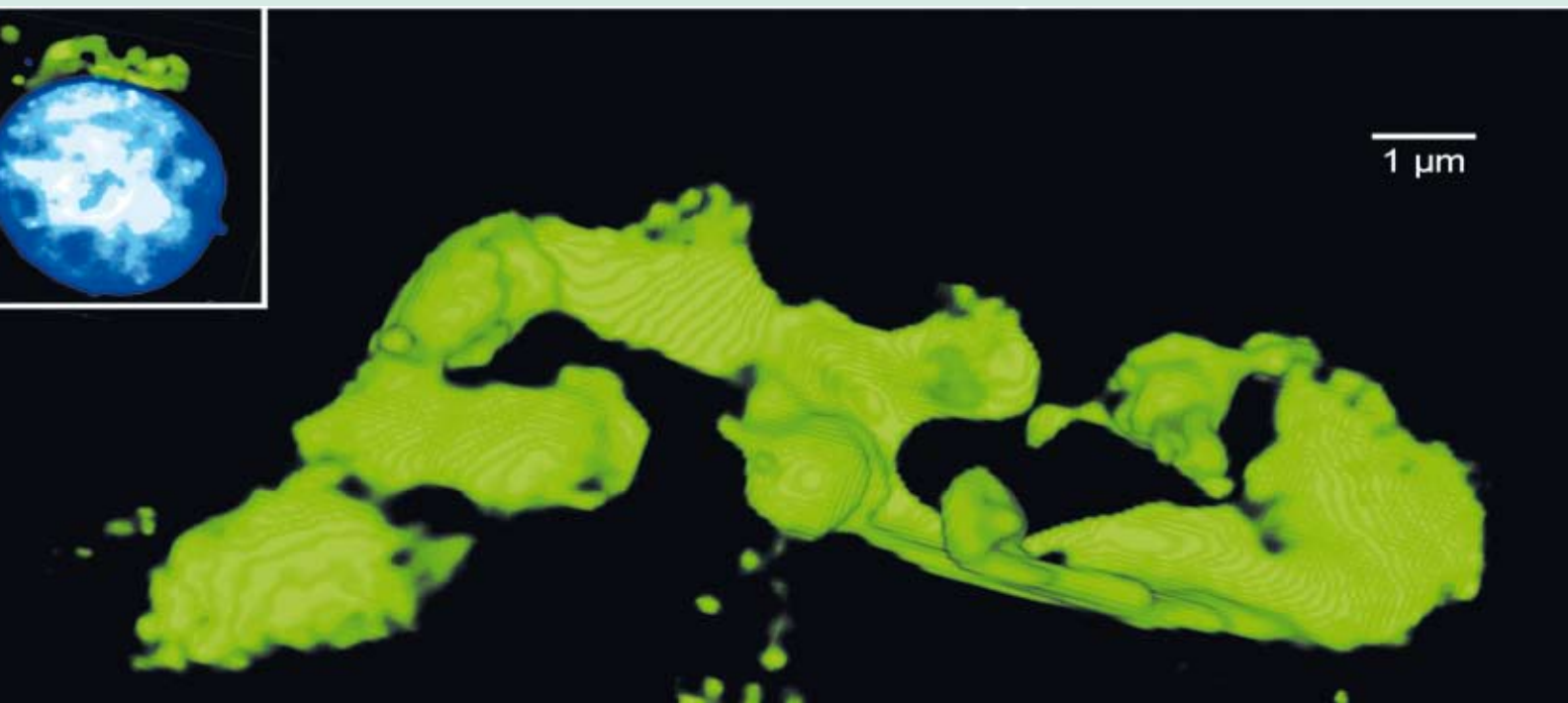
Um Zellen beobachten zu können, ist die Mikroskopie die Methode der Wahl. Fluoreszenzfarbstoffe haben es zudem möglich gemacht, Proteine und Nukleinsäuren zu markieren und mit einer Auflösung von bis zu einem Tausendstel Millimeter zu betrachten, wie sie sich in der Zelle verteilen. Bei dieser Auflösung können einzelne Kompartimente, abgeschlossene „Reaktionsräume“, der Zellen sichtbar gemacht werden, zum Beispiel die Kommandozentrale der Zelle, der Zellkern, ihre „Kraftwerke“, die Mitochondrien, oder eines ihrer Verteilungssysteme, der Golgi-Apparat. In solchen Kompartimenten finden wichtige Ereignisse im Leben einer Zelle statt, etwa die Verdopplung des Erbmoleküls DNS, die Biosynthese von Proteinen oder die Bildung und Fusion von Vesikeln, kleinen Transportbläschen.

Dreidimensionale Rekonstruktion des Golgi-Apparates in der lebenden Zelle bei 100 Nanometer räumlicher Auflösung. Der Golgi-Apparat ist ein Membransystem, das der Zelle vor allem dazu dient, Zellprodukte auszuscheiden. Das kleine Bild zeigt die Lage des Golgi-Apparates im Verhältnis zum Zellkern.

Molekulare Maschinen in molekularen Fabriken

Neue zell- und molekularbiologische Forschungsergebnisse legen nahe, dass diese Prozesse von „molekularen Maschinen“ organisiert und synchronisiert werden. Dabei handelt es sich um Proteine, die in größeren Gruppen zusammenarbeiten oder noch größere Strukturen, „molekulare Fabriken“, bilden. Molekulare Maschinen und molekulare Fabriken sichtbar zu machen und ihnen direkt bei der Arbeit zuzuschauen, ist eines der wichtigsten Ziele der aktuellen biophysikalischer Forschung. Mit einem „normalen“ Mikroskop ist das nicht möglich: Die Proteinaggregate sind zu klein, um sie mit der optischen Mikroskopie sichtbar zu machen.

Die von Stefan Hell geleitete Arbeitsgruppe „Optische Nanoskopie“ will Grenzen überschreiten und neue Mikroskope entwickeln, die bis in den Nanometerbereich



(1/1 000 000 mm) der lebenden Zelle vordringen. Mit diesen Mikroskopen sollen biologische Rätsel gelöst werden, die bislang als unlösbar galten. Das ist ein anspruchsvolles Vorhaben, und es kann nur gelingen, wenn Physiker, Chemiker und Biologen eng kooperieren.

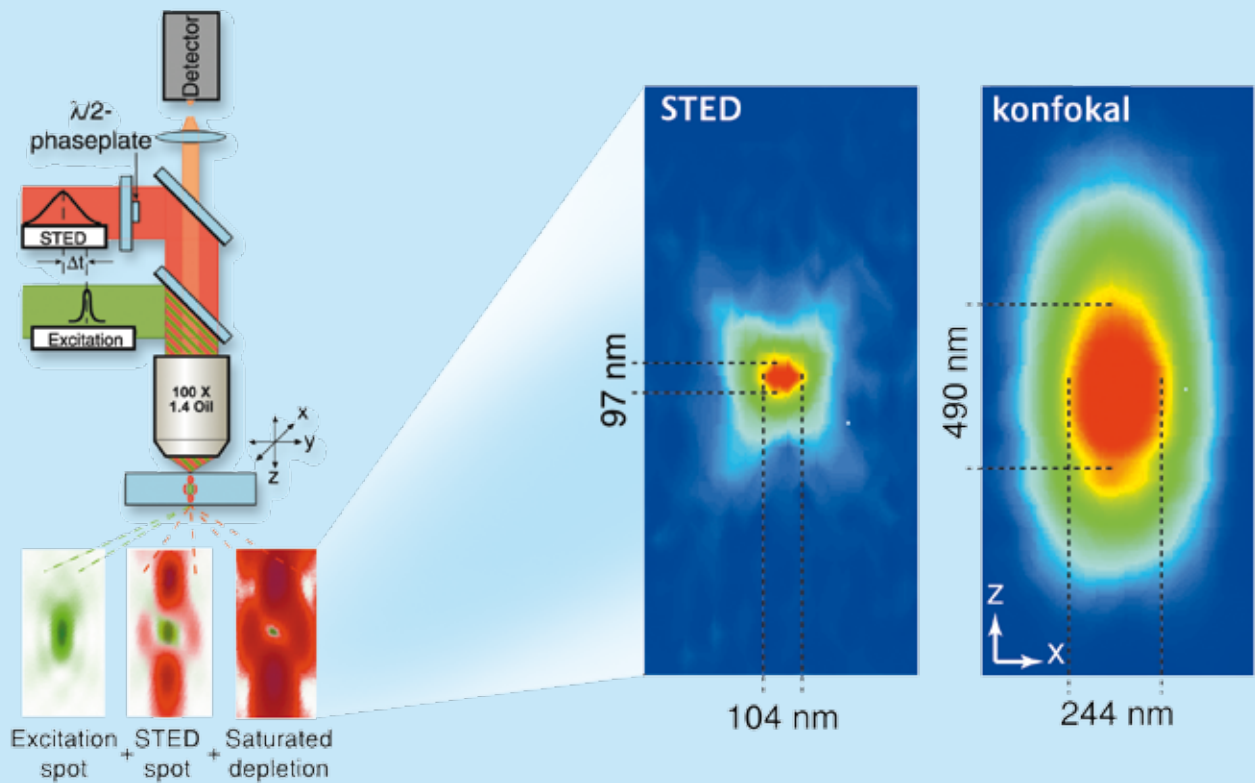
Die neuen Verfahren haben ein gemeinsames Charakteristikum: Das Intensitätsprofil einer punktförmigen Lichtquelle, die sogenannte Punktabbildungsfunktion, kurz PSF, eines einzelnen fluoreszierenden Farbstoffmoleküls wird durch verschiedene optische oder fotophysikalische Prozesse in seiner Ausdehnung begrenzt. Schneidet man Bereiche geringer Intensität ab – man spricht auch vom „PSF-Engineering“ –, überlappen benachbarte Lichtpunkte weniger und sind daher besser aufgelöst. Der Effekt ist vergleichbar mit einem unscharfen Lichtfleck, den man während einer nächtlichen Autofahrt durch die schmutzige Windschutzscheibe zu sehen glaubt – und der sich, nachdem man die Scheibenwischer eingesetzt hat, als die beiden Schweinwerfer eines entgegenkommenden Wagens entpuppt.

Grenzüberschreitende Mikroskopie

Unsere Arbeitsgruppe konnte kürzlich zeigen, dass PSF-Engineering durchaus eine realistische Möglichkeit ist, das lichtmikroskopische Auflösungsvermögen von 200 Nanometern deutlich zu unterschreiten: In biologischen Proben haben wir eine Auflösung von 40 Nanometern erreicht. Dieses eindrucksvoll verbesserte Auflösungsvermögen beruht auch auf Sättigungseffekten der optischen Antwort der Probe auf das einfallende Licht. Dies ist der Grund dafür, warum wir unsere Konzepte als „reversible sättigbare optische Fluoreszenzübergänge“ (engl. reversible saturable optical fluorescence transition, kurz RESOLFT) zwischen zwei Zuständen A und B bezeichnen.

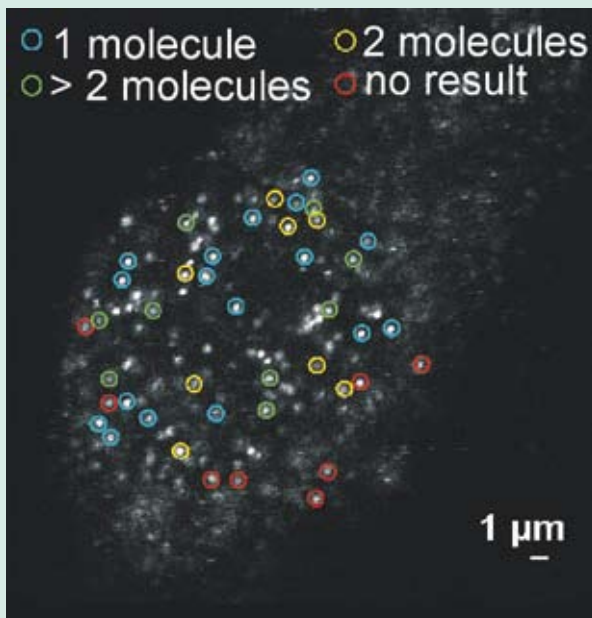
Bereits kommerziell verfügbar ist die sogenannte 4PI-Mikroskopie. Sie setzt das PSF-Engineering ein, indem fokale Wellenfronten kohärent überlagert werden. Formt man das fokale Volumen zwischen zwei gegenüberstehenden Linsen, kann eine drei- bis siebenfach verbesserte optische Auflösung entlang der optischen Achse erreicht werden. Die Zahl der Bildpunkte pro Volumen steigt in einer dreidimensionalen Abbildung mit der dritten Potenz an. Daher vergrößert sich nicht nur die zu verarbeitende Menge der Abbildungsdaten – auch die Zeit, die erforderlich ist, um die Abbildung mit dieser erhöhten Auflösung aufzunehmen, nimmt dramatisch zu. Die parallelisierte Datenaufnahme von Bildpunkten ist daher ein wichtiges Konzept, um schnelle biologische Prozesse in lebenden Proben zu untersuchen. Es konnte mit dem 4PI-Mikroskop realisiert werden.





Die „Stimulierte Emissions-Depletions Mikroskopie“ (STED-Mikroskopie) durchbricht die Beugungsgrenze der optischen Mikroskopie und verwendet für das PSF-Engineering fotophysikalische Prozesse. Wie in der konfokalen Fluoreszenzmikroskopie werden alle fluoreszierenden Farbstoffmoleküle innerhalb des beugungsbegrenzten fokalen Volumens des Mikroskops durch einen Laserpuls angeregt. Der Trick des STED ist es, die Fluoreszenz an den Rändern des fokalen Flecks selektiv zu unterdrücken. Dies geschieht durch „stimulierte Emission“. Das fundamentale physikalische Phänomen der stimulierten Emission – auf dem auch

Moderne Methoden der Fluoreszenzmikroskopie erlauben es, einzelne Moleküle im Zellkern zu zählen.



die Funktionsweise von Lasern basiert – wird hier genutzt, um angeregte Fluoreszenzfarbstoffmoleküle systematisch in ihren unangeregten Grundzustand zurückzutreiben. In diesem Zustand kann keine weitere Fluoreszenz mehr erfolgen.

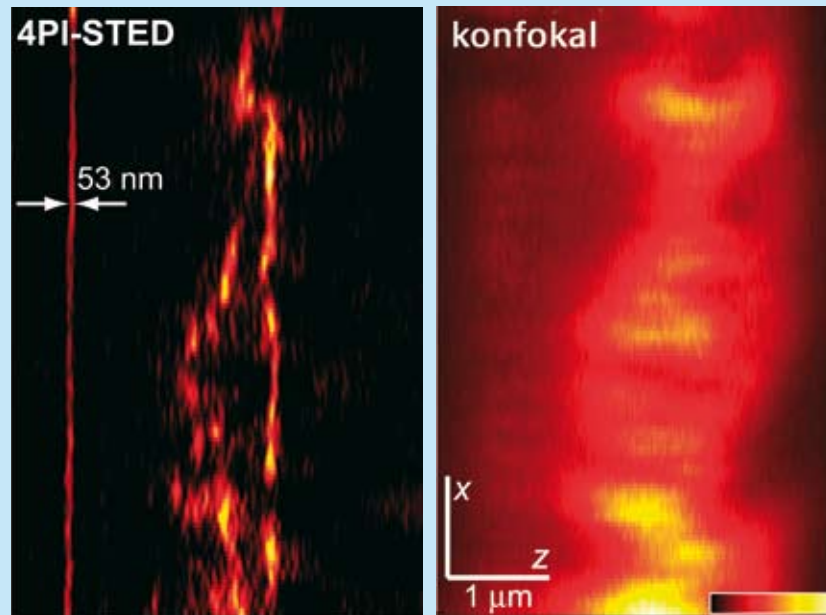
Technisch stützt sich das STED-Mikroskop auf Paare von synchronisierten Laserpulsen. Der Anregungspuls erzeugt zunächst einen dreidimensionalen Fleck von angeregten Molekülen mit normaler Beugungsgröße. Ein sofort darauf folgender, in den Rotbereich verschobener STED-Puls treibt die angeregten Moleküle in den Grundzustand. Der STED-Puls ist dabei so eingerichtet, dass nur die Fluoreszenz am Rande des Flecks gelöscht wird. Der zentrale Teil bleibt im Idealfall unberührt. Die daraufhin nachgewiesene Fluoreszenz stammt mithin von einem Fleck, der um den Faktor fünf bis zehn kleiner ist, als es die Beugungsgrenze des Anregungslichts definiert.

Gleich zwei Mikroskoptypen kombiniert die STED-4PI-Mikroskopie – das erste Verfahren, das eine räumliche Auflösung im Bereich von 40 bis 50 Nanometern mit sichtbarem Licht und mit normalen Linsen demonstrierte. Die Auflösung wird erhöht durch (nicht-lineare) Bildwiederherstellungsverfahren, die leistungsstarke Algorithmen und rechnerische Ressourcen, insbesondere für die dreidimensionale Bildwiederherstellung, benötigen.

Die Forschung der „Einzelmolekülgruppe“ unter Leitung von Dirk-Peter Herten hat zum Ziel, die subzellulären Strukturen und ihre Dynamik in lebenden Zellen quantitativ zu untersuchen. Mit kürzlich entwickelten Methoden, die auf der Einzelmolekül-Fluoreszenzmikroskopie (SMFS) basieren, können wir grundlegende strukturelle Informati-

Die Abbildung auf Seite 40 zeigt das Prinzip der „Stimulierten Emissions-Depletions Mikroskopie“, kurz STED. Mithilfe solcher neuer Mikroskope, die bis in den Einzelmolekülbereich vordringen können, hoffen die Wissenschaftler, bislang ungelöste biologische Rätsel aufzuklären.

Die Bilder rechts zeigen einen Querschnitt durch das Mikrotubuli-Netzwerk der Zelle. Die Mikrotubuli – röhrenförmige Strukturen des zellulären Skeletts – wurden konfokal (rechts außen) und mit der STED-4PI-Mikroskopie aufgenommen. Dieses neue mikroskopische Verfahren kombiniert zwei neue Mikroskoptypen und macht erstmals eine räumliche Auflösung im Bereich von 40 bis 50 Nanometer möglich.



„Wir wollen Grenzen überschreiten und dazu Mikroskope entwickeln, die bis in den Nanobereich der menschlichen Zelle vordringen.“

onen über molekulare Aggregate innerhalb von Zellen gewinnen. Wenn wir die Photonen, die von einzelnen fluoreszenzmarkierten Proteinen ausgesandt werden, aufspüren und zählen, können wir erfahren, wie viele Kopien eines Proteins sich innerhalb einer bestimmten molekularen Gruppe befinden. Sortiert man die Photonen nach charakteristischen Eigenschaften der Fluoreszenzmarkierungen – etwa Lebensdauer des angeregten Zustands oder Farbe –, sind individuelle Moleküle zu unterscheiden und die Entfernung zwischen zwei markierten Proteinen kann bis auf sieben Nanometer genau bestimmt werden. Die SMFS macht es außerdem möglich, die Dynamik einzelner molekularer Komplexe auf der Mikrosekundenskala zu beobachten und dazu entfernungsabhängige fotophysikalischen Prozesse wie den Fluoreszenzresonanz-Energie-transfer (FRET) zwischen einzelnen Farbstoffmolekülen zu nutzen.

Wie bewegen sich Proteine?

Eine weitere Methode, die derzeit entwickelt wird, soll quantitative Informationen darüber liefern, wie Stoffwechselprodukte und Signalproteine zwischen verschiedenen zellulären Reaktionsräumen transportiert werden. Solche Kenntnisse sind sehr wichtig, um zelluläre Prozesse simulieren und modellieren zu können. Die Kombination der Fluoreszenzautokorrelationspektroskopie (FCS) mit der Rastermikroskopie kann sichtbar machen, wie sich fluoreszenzmarkierte Proteine bewegen. Hier ist es das Ziel, die unterschiedliche Mobilität der Proteine abhängig vom Ort und der Art des Proteins zu erkennen.

Die beschriebenen experimentellen Ansätze sollen uns quantitative Daten für das mathematische Modellieren und Simulieren liefern und uns dazu verhelfen, das komplexe Netzwerk der biochemischen und molekularbiologischen Prozesse in lebenden Zellen besser zu verstehen.

Ausgewählte Literatur

- Hell SW. 2003.** Toward Fluorescence Nanoscopy. *Nature Biotech.* 21, 1347–1355
- Klar TA, Jakobs S, Dyba M, Egner A, Hell SW. 2000.** Fluorescence Microscopy with Diffraction Resolution Barrier Broken by Stimulated Emission. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97, 8206–8210
- Dyba M, Jakobs S, Hell SW. 2003.** Immunofluorescence Stimulated Emission Depletion Microscopy. *Nature Biotech.* 21, 2003, 1303–1304
- Willig, KI, Rizzoli SO, Westphal V, Jahn R, Hell SW. 2006.** STED-microscopy reveals that synaptotagmin remains clustered after synaptic vesicle exocytosis. *Nature* 440: 935–939
- Donnert G, Keller J, Medda R, Andrei MA, Rizzoli SO, Lüthmann R, Jahn R, Eggeling C, Hell SW. 2006.** Macromolecular-scale resolution in biological fluorescence microscopy. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 103, 11440–1145
- Herten DP, Sauer M. 2003.** Einzelmolekül-Fluoreszenzspektroskopie – Analytik an der ultimativen Grenze der Empfindlichkeit. *Bunsenmagazin* 1, 5–16
- Heinlein T, Biebricher A, Schlüter P, Roth CM, Herten DP, Wolfrum J, Heilemann M, Müller C, Tinnefeld P, Sauer M. 2005.** High Resolution Colocalization of Single Molecules within the Resolution Gap of Far-Field Microscopy. *Chem. Phys. Chem.* 6, 949–955