

• Blick ins Innerste der Zelle



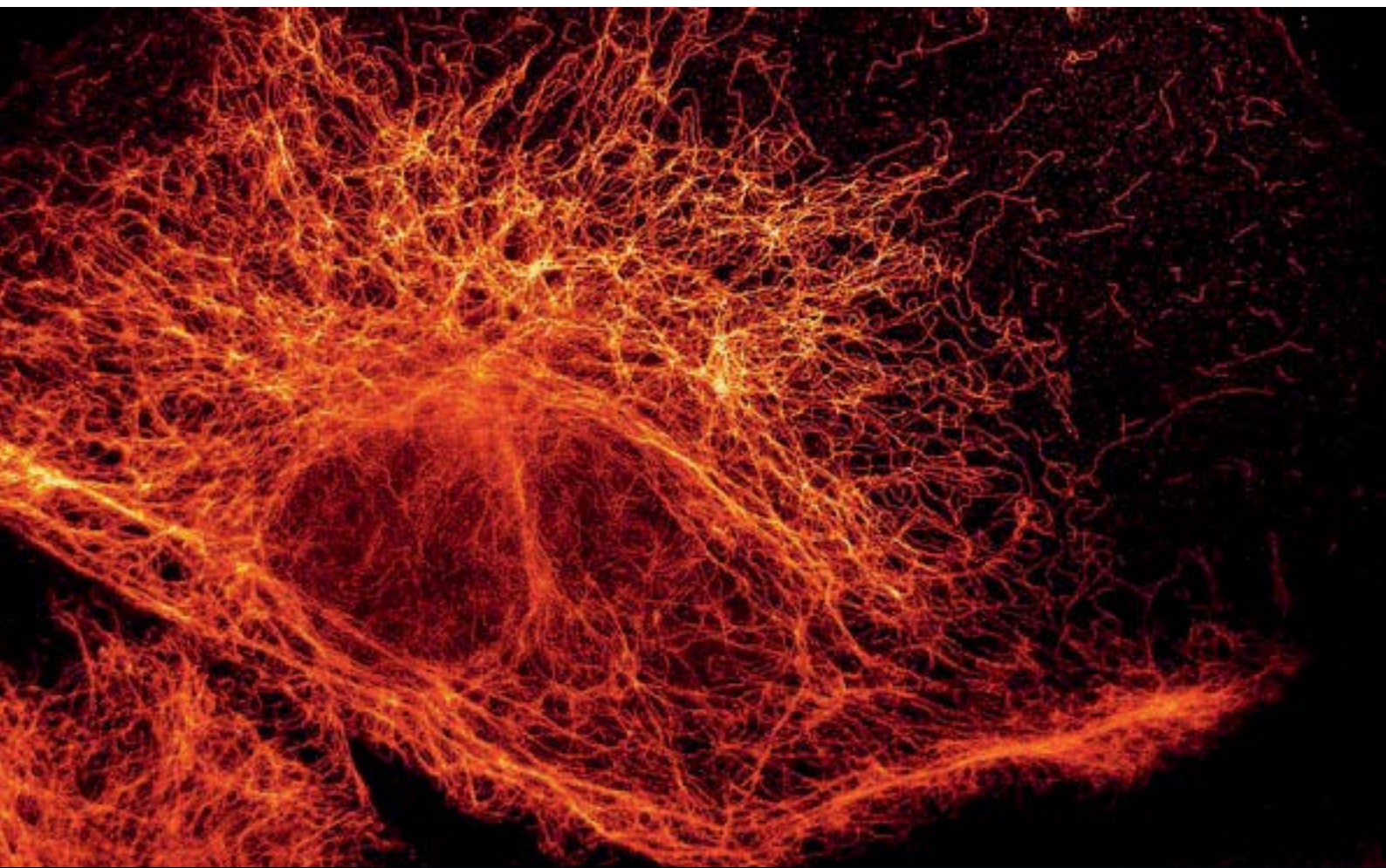
Skelett einer biologischen Zelle. Das Bild oben wurde mit einer herkömmlichen Mikroskopie-Methode aufgenommen, das Bild gegenüber mit dem innovativen STED-Verfahren.

Lichtmikroskope gehören zu den wichtigsten Werkzeugen der Zellbiologen. Professor Stefan Hell, der gleichzeitig eine Abteilung am Deutschen Krebsforschungszentrum und eine am Max-Planck-Institut für biophysikalische Chemie in Göttingen leitet, hat in der Lichtmikroskopie das innovative STED-Verfahren entwickelt. Es erlaubt eine optische Auflösung, die noch vor Kurzem unvorstellbar schien, und kann sogar Details im Faden des Erbmoleküls DNS abbilden.

In dem fensterlosen dunklen Labor sind nur rote und grüne Laserstrahlen zu sehen. Sie laufen auf einem großen Tisch kreuz und quer von Spiegeln zu Kristallen und durch Linsen, um dann in einem Mikroskop zu verschwinden. Dr. Johann Engelhardt, der die Experimente in dem Labor leitet, erklärt: „Der Aufbau ist nur deshalb so riesig, damit wir ihn jederzeit bequem verändern können. Wenn's darauf ankommt, passt er auch in einen Schuhkarton!“

Engelhardt arbeitet in der Abteilung „Optische Nanoskopie“ am

Deutschen Krebsforschungszentrum. Chef der Gruppe ist Professor Stefan Hell. Er und seine Mitarbeiter entwickeln unter anderem die so genannte STED-Mikroskopie, ein neues Mikroskopieverfahren, das Biologen und Medizinern ganz neue Möglichkeiten eröffnet. Der Name leitet sich ab von „STimulated Emission Depletion“, was soviel bedeutet wie „Verhindern durch stimulierte Emission“. Das Verfahren beruht darauf, mit einem Laserstrahl eine biologische Probe am Leuchten zu hindern und dabei einen winzigen Bereich auszusparen, der weiter leuchten



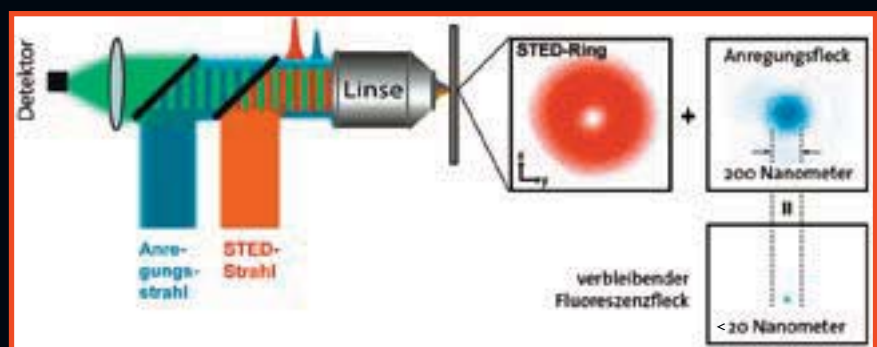
kann. Auf diese Weise können die Wissenschaftler kleinste Strukturen abbilden, viel feiner als die Wellenlänge des Lichts, was noch bis vor wenigen Jahren unmöglich schien.

Lange glaubten die Forscher, dass die Lichtmikroskopie nicht mehr entscheidend zu verbessern wäre. 1873 berechnete der deutsche Physiker Ernst Abbe das Auflösungsvermögen von Mikroskopen. Es entspricht dem kleinsten Abstand zweier Punkte, die man beim Blick durchs Mikroskop gerade noch voneinander unterscheiden kann. Abbe zufolge liegt das Auflösungsvermögen bei etwa 200 Nanometern (milliardstel Metern), das ist die halbe Wellenlänge von sichtbarem Licht und 500-mal feiner als ein menschliches Haar. Mikroskope, die dieses Auflösungsvermögen erreichen, gibt es schon lange. Sie machen zwar viele Bausteine der Zelle sichtbar, können aber in der Regel keine molekularen Details abbilden. Diese sind meist erheblich kleiner als 200 Nanometer und ließen sich bisher nicht auflösen.

Der Umweg zu schärferen Bildern

Zellbiologen verwenden bei ihren Untersuchungen oft die Fluoreszenzmikroskopie. Sie färben Zellen mit fluoreszierenden Farbstoffen an, die sich

an bestimmte Zellbausteine heften. Werden die Farbstoffe mit einem Laserstrahl einer bestimmten Farbe angeregt, dann leuchten sie in einer anderen Farbe auf, fluoreszieren also. Mit dieser Methode kann man viele Bestandteile von Zellen gezielt sicht-



STED-Mikroskopie: Ein Laserstrahl (blau) regt die Probe zum Leuchten an, ein zweiter Laserstrahl (rot, „STED-Strahl“) unterdrückt das Leuchten sofort wieder. Weil der zweite Laserstrahl einen ringförmigen Querschnitt hat, bleibt in der Mitte ein winziger Fleck übrig, der weiter leuchtet. Tastet man damit die Probe ab, entsteht ein Bild aus extrem feinen Punkten.



*Stefan Hell einmal ganz dunkel:
Diese Negativ-Aufnahme zeigt
ihn an einem Lichtmikroskop.*

bar machen. Aber auch hier endet die Auflösung bei 200 Nanometern. Bessere Auflösungen erreichen die Forscher mit Elektronenmikroskopen, die sogar Moleküle abbilden können. Die Elektronenmikroskopie hat aber bei den meisten biologischen Proben einen großen Nachteil: Zellen oder Gewebe müssen in feine Scheiben geschnitten, meist mit Metall bedampft und in ein Vakuum gebracht werden. So ist nur die Betrachtung toter Proben möglich. Zudem ist es sehr schwierig, Proteine und andere Biomoleküle, etwa das Erbgutmolekül DNS, spezifisch zu markieren.

Im Lichtmikroskop dagegen kann der Betrachter lebende Zellen beobachten, zum Beispiel bei der Vermehrung. Biologen und Mediziner wünschen sich daher schon lange ein lichtmikroskopisches Verfahren, das es erlaubt, auch Details von der Größe einiger Nanometer in Zellen zu betrachten. Diese Tür hat Stefan Hell mit der Entwicklung der STED-Mikroskopie aufgestoßen. Der Physiker erzählt: "Während meiner Doktorarbeit in Heidelberg habe ich mich mit der konfokalen Mikroskopie beschäftigt. Irgendwie hatte ich den Eindruck, dass das Thema Auflösung im Lichtmikroskop noch nicht endgültig durch ist, wie damals alle glaubten." Zunächst entwickelte er allerdings ein anderes Verfahren, die 4Pi-Mikroskopie. Sie bestrahlt die Probe nicht nur von oben, sondern auch von unten, erzielt dadurch eine stark verbesserte Tiefenschärfe und somit eine hervorragende dreidimensionale Abbildung. Doch die 4Pi-Mikroskopie durchbricht nicht die Abbe'sche Auflösungsgrenze,

sie führt lediglich die Tiefenauflösung an diese Grenze heran, die man vorher nur in der Brennebene erreicht hatte.

Aber das war Hell nicht genug. Er dachte weiter und ging dabei einen sehr ungewöhnlichen Weg. Statt zu versuchen, die Optik des Mikroskops weiter zu verbessern – was realistischlicherweise nicht mehr möglich war – manipulierte er das Farbstoffmolekül. Er sorgte dafür, dass nicht alle Farbstoffmoleküle, die vom Laserlicht angeregt werden, auch tatsächlich aufleuchten. Einige von den angeregten Molekülen zwang er dazu, erst einmal dunkel zu bleiben, so dass er sie von den leuchtenden Molekülen trennen konnte. Der Trick dabei bestand darin, Details, die enger beieinander sind als 200 Nanometer, nacheinander aufleuchten zu lassen.

Im STED-Mikroskop erfolgt das Dunkelhalten der Farbstoffmoleküle mit Hilfe der stimulierten Emission. Die Forscher regen die Probe mit einem ersten Laserstrahl zur Fluoreszenz an. Über diesen ersten Laserstrahl legen sie einen zweiten, der eine spezielle Wellenlänge besitzt. Der zweite Laserstrahl bewirkt, dass die angeregten Farbstoffmoleküle ihre Anregungsenergie schlagartig wieder abgeben, so dass sie nicht fluoreszieren können. Weil der zweite Laserstrahl einen ringförmigen Querschnitt hat, bleibt in der Mitte des beleuchteten Areals ein winziger Fleck übrig, der fluoreszieren kann. Auf diese Weise gelingt es Hell, die Farbstoffmoleküle in einem nur noch zwanzig Nanometer großen Bereich leuchten zu lassen (siehe Abbildung auf der vorigen Seite). Tasten nun die beiden übereinandergelegten

Laserstrahlen die Probe ab, entsteht ein Raster aus extrem feinen Punkten. Daraus erstellt der Computer ein hoch aufgelöstes Bild, das die Abbe'sche Auflösungs Grenze um das Zehnfache unterbietet. Mit dieser Technik lassen sich also Details unterscheiden, die nur 20 Nanometer voneinander entfernt sind. Die Beugung des Lichts existiert zwar immer noch, in Hells Mikroskop stellt sie aber keine fundamentale Grenze mehr dar und ermöglicht so den Wissenschaftlern einen tiefen Blick in die Details der Probe.

Die Erfindung des STED-Mikroskops hat die Sichtweise, was ein Lichtmikroskop leisten kann, grundlegend verändert. Für diese Arbeit hat der Forscher in den letzten Jahren mehrere renommierte Wissenschaftspreise bekommen: den Deutschen Zukunftspreis, den Leibniz-Preis, den Familien-Hansen-Preis und den Otto-Hahn-Preis für Physik. Zurzeit arbeitet Hell mit anderen Forschern intensiv daran, die Auflösung weiter zu verbessern, die Handhabung zu vereinfachen und mögliche Anwendungen für STED-

Mikroskope aufzuzeigen. Hell sieht noch viel Entwicklungsbedarf: „Die physikalischen Grundlagen sind verstanden. Jetzt ist es notwendig, die Methode an die unterschiedlichen Erfordernisse der Wissenschaftler anzupassen.“

Unzählige neue Anwendungsfelder

Neben seiner Abteilung am DKFZ leitet Hell eine Forschergruppe am Max-Planck-Institut für biophysikalische Chemie in Göttingen. Gemeinsam konnten die beiden Teams das STED-Verfahren deutlich erweitern. So gelang es den Forschern, den Kontrast des Mikroskopiebildes stark zu verbessern, indem sie die zeitliche Abfolge der Anregung, der Stimulation und eine zeitversetzte Bildaufzeichnung geschickt aufeinander abstimmten. Zudem erzielten sie eine bis zu vierfach bessere Auflösung, indem sie zur Beleuchtung der Probe einen simplen Diodenlaser verwendeten, wie er etwa in Laserpointern oder DVD-Spielern

steckt. Damit verbilligt sich ein STED-Mikroskop erheblich und wird für eine viel größere Gruppe von Anwendern zugänglich.

Viele biomedizinische Arbeitsgruppen nutzen die STED-Mikroskopie bereits oder haben Interesse daran bekundet. Vor Kurzem ist es Hell gemeinsam mit der Arbeitsgruppe von Jonas Tegenfeldt, Professor an der Universität in Göteborg (Schweden), gelungen, Stränge des menschlichen Erbgutmoleküls DNS mithilfe des STED-Verfahrens abzubilden. Bisher ließen sich DNS-Stränge entweder nur unscharf oder bruchstückhaft abbilden. Tegenfeldt und sein Mitarbeiter Fredrik Persson zwangen das normalerweise verknäulte DNS-Molekül jedoch, sich in einem winzigen Röhrchen lang auszustrecken. So war kein Teil des Moleküls von Windungen oder Schlaufen verdeckt. Pit Bingen, der als Doktorand in Hells Abteilung arbeitet, konnte anschließend Bilder der DNS-Stränge in bislang unerreichter Auflösung anfertigen. Mit diesem Verfahren wird es in Zukunft vielleicht einmal möglich sein, Wiederholungen oder Lücken innerhalb der DNS zu erkennen – also Fehler, die teils schwere Krankheiten verursachen, von der Farbenblindheit über Fehlentwicklungen bei ungeborenen Kindern bis hin zu Krebs. Tegenfeldt erhofft sich von dem sehr hohen Auflösungsvermögen des STED-Verfahrens künftig präzisere Diagnosen dieser Krankheiten – etwa Methoden, die anzeigen, wie stark das Erbmaterial verschiedener Zellen eines Tumors differiert. Auf dieser Grundlage könnten Ärzte und Mediziner die Therapie anpassen oder weiterentwickeln.

Vor dem bunt leuchtenden Laborisch mit den Laserstrahlen, Spiegeln und Linsen sagt Johann Engelhardt: „Ich erwarte, dass in fünf bis zehn Jahren jedes Labor über ein Lichtmikroskop mit einer STED-Funktion verfügen wird.“ Er ist begeistert, wie schnell die Entwicklung der Lichtmikroskopie in den letzten Jahren vorangeschritten ist: „Noch vor Kurzem erschien ein Durchbrechen der Abbe'schen Auflösungs Grenze unmöglich, jetzt entdecken wir ständig neue Anwendungen dafür.“

Fenna Bleyl

