

Einblicke ins Leben

Mit den Methoden der Nanobiophotonik die kleinsten Werkstätten des Lebens entschlüsseln

Petra Schwille

Die Geheimnisse lebender Materie aufzuklären, erfordert ein Verständnis biologischer Prozesse bis hinab zur molekularen oder gar atomaren Ebene. Dabei sind bildgebende Verfahren, mit denen sich lebende Organismen auch im submikroskopischen Maßstab untersuchen lassen, unerlässlich. Hier hat sich das Feld der Nanobiophotonik etabliert, das die drei Eckpfeiler des Gebiets im Namen trägt: Mithilfe des Lichts (*phos*) soll das Leben (*bios*) in der *Nanowelt* unter die Lupe genommen und aufgeklärt werden.

Wohl keine andere Wissenschaft wird so von optischen Methoden bestimmt wie die Biologie. Wenn es darum geht, die komplexen Strukturen und Prozesse des Lebens zu verstehen, kommt der Anschauung eine ganz besondere Bedeutung zu. Charles Darwin untersuchte noch ganze Organismen, um seine Evolutionstheorie zu entwickeln und um zu verstehen, wie die belebte Natur sich organisiert und fortpflanzt. Doch bereits erste einfache Mikroskope haben die Tür zu einer neuen Welt aufgestoßen: So beobachteten Robert Hooke und Antony van Leeuwenhoek damit einzelne Zellen. Insofern könnte man die ersten Mikroskopentwickler als die Urväter der Biophotonik bezeichnen, die der Sammelbegriff für die vielfältigen, meist bildgebenden, optischen Methoden ist, die helfen sollen, biologische und medizinische Fragestellungen aufzuklären.

Heutzutage gilt eine Zelle nicht mehr in erster Linie als kleinste Einheit der Organismen, sondern als eine Fabrikationsanlage von – in molekularer Hinsicht – gigantischen Ausmaßen und immens komplexer Organisationsstruktur, in der molekulare Maschinen (in erster Linie Proteine) mit höchster Präzision spezifische Aufgaben erfüllen. Diese neue Sicht auf biologische Systeme, die mit der revolutionären Aufklärung der DNA-Doppelhelixstruktur durch Watson und Crick im Jahr 1953 angefangen hat, ist ganz entscheidend von physikalischen Techniken geprägt, die Einblicke in kleinste Strukturen ermöglichen. Dazu zählen die Röntgenkristallographie, die Elektronenmikroskopie sowie die Rastertunnel- bzw. Rasterkraftmikroskopie. Die Nanobiophotonik ergänzt diese etablierten Verfahren und erschließt neue Bereiche.

Die Genomik, also die Aufklärung der auf der zellulären DNA niedergeschriebenen Information in Form der Basensequenz, ist bereits für viele Organismen weit

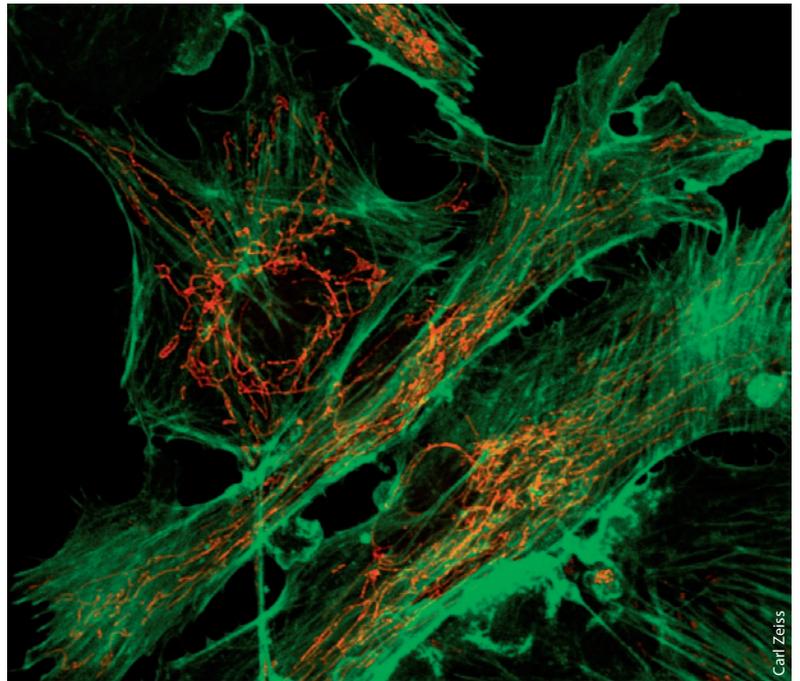


Abb. 1 Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen, wie hier von Fibroblasten, gehören längst zum Standardrepertoire

der Biophotonik und zeigen mithilfe verschiedener Fluoreszenzmarker die Verteilung zellulärer Substanzen.

voran geschritten. Doch wenn es darum geht, diese Information auf Proteinebene in der sog. Proteomik zu verstehen, stehen wir noch recht weit am Anfang. Hierbei kommt es nicht allein darauf an, die kodierten Proteine und ihre Struktur zu identifizieren, sondern insbesondere auch deren Konzentration, Verteilung und Funktion zu bestimmen. Die Funktion kann vom metabolischen Stadium der Zelle abhängen, geht oft mit Strukturänderungen (Konformationen) einher und wird in den meisten Fällen durch hoch komplexe Interaktionsnetzwerke vermittelt. Eines der großen Rätsel heutzutage ist, wie sich diese Netzwerke innerhalb einer zellulären Organisationseinheit etablieren und aufrechterhalten. Mit ihrer Struktur und Dynamik hängen viele fundamentale Fragen der Lebenswissenschaften unmittelbar zusammen: Welche Schlüsselmoleküle steuern, dass die unterschiedlichsten hoch spezialisierten Zellstrukturen aus einer einzelnen undifferenzierten Stammzelle gezielt entstehen? Welche molekularen Interaktionsmuster unterscheiden eine Krebszelle von einer gesunden Körperzelle? Woher „weiß“ eine Zelle, ob sie sich in einem jungen oder in einem alten Orga-

Prof. Dr. Petra Schwille, Biophysics Group, BIOTEC, TU Dresden, Tatzberg 47 - 51, 01307 Dresden

nismus befindet? Schließlich auch die Frage nach der Entstehung des Lebens selbst: Wie viele verschiedene Moleküle mag die erste einfache Zelle enthalten haben? Und welches Interaktionsmuster hat sich zwischen den Molekülen ausgebildet, um die Schlüsselfunktionen lebender Systeme – die Selbstreplikation und die Evolution – zuzulassen?

Bei der Suche nach den Antworten zu diesen Fragen haben sich in den letzten Jahren optische Verfahren als die vielleicht wichtigsten Werkzeuge der biomedizinischen Forschung erwiesen. Dies erklärt sich einerseits aus der hohen Affinität der Biologen zu Lichtmikroskopen, andererseits aus der enormen zeitlichen Dynamik und Flexibilität mikroskopischer Methoden. Nicht zuletzt hat die Möglichkeit, zelluläre Komponenten und Moleküle spezifisch durch Fluoreszenzfarbstoffe zu markieren, diese Entwicklung so enorm beschleunigt. Jeder von uns kennt die überaus ästhetischen, vielfarbigen Bilder zellulärer Substrukturen, die sich bereits mit einem einfachen Fluoreszenzmikroskop gewinnen lassen (Abb. 1). Noch faszinierender sind dreidimensionale Rekonstruktionen, die das Rastern (Scanning) eines beugungslimitierten Anregungsvolumens in der sog. Konfokalmikroskopie liefert (Abb. 2). Physikalische Grundlage all dieser Anwendungen ist die Fluoreszenz, d. h. die spezifische Anregung eines Moleküls in einen höheren elektronischen Zustand durch Licht und die nachfolgende Relaxation in den Grundzustand unter Aussendung eines Photons. Da die hierfür erforderliche Photonenenergie bei Raumtemperatur bzw. der physiologischen Temperatur von 37 °C mehrere Größenordnungen über der thermischen Energie kT liegt, ist nach Boltzmann ein spontaner Übergang in einen elektronisch angeregten Zustand höchst unwahrscheinlich. Dies beschert den Experimentatoren eine hohe Spezifität bzw. große Signal-zu-Rausch-Verhältnisse der gemessenen Fluoreszenz. Hinzu

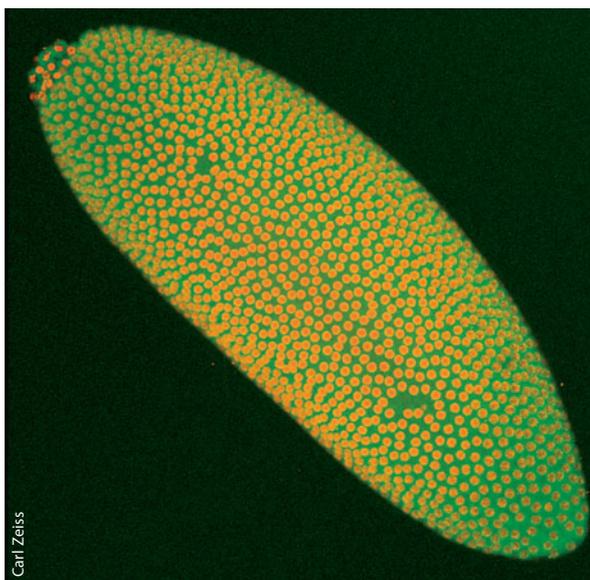


Abb. 2 Ein modernes Konfokalmikroskop zeigt in vielen Details den *Drosophila*-Embryo, unterliegt jedoch prinzipiell der Abbeschen Beugungsbegrenzung.

kommt die Möglichkeit der spektralen Identifikation verschiedener Fluorophore sowie ihre gleichzeitige Messung.

Fluoreszenz macht's möglich

Die Eigenfluoreszenz der natürlichen Aminosäuren und Nukleobasen ist relativ schwach ausgeprägt und liegt im nahen UV-Bereich. Zudem ist dies ein spektraler Bereich, der sehr nah an derjenigen Energie liegt, die zur Photoionisation verschiedener Molekülbindungen führt. Dies kann leicht die Zelle zerstören, denn dass zu viel UV-Licht Zellen schadet, wissen wir spätestens seit unserem letzten Sonnenbrand. Aus diesem Grund sind Fluoreszenzfarbstoffe erforderlich – meist kleine organische Moleküle mit mehreren aromatischen (Ring-)Systemen und demzufolge delokalisierten π -Elektronen. Reaktive chemische Gruppen erlauben es oft auch dem Nicht-Chemiker auf relativ einfache Weise, diese Farbstoffe nach einer Art „Kochrezept“ an die zu markierenden Biomoleküle zu „kleben“. Schwieriger ist es, diese Moleküle nach der Markierung wieder effizient und ohne Nebenwirkungen in die Zelle bzw. den Organismus, in der bzw. dem man sie analysieren möchte, zu transferieren.

Im letzten Jahrzehnt hat ein völlig anderes Markermolekül, das sog. Grün Fluoreszierende Protein (GFP), einen Siegeszug durch die biomedizinischen Wissenschaften angetreten und diese revolutioniert (Abb. 3). Dieses Molekül kann es in seinen Fluoreszenzeigenschaften neben dem Absorptionsquerschnitt, der Quantenausbeute und der Photostabilität durchaus mit einem Laserfarbstoff aufnehmen, weist aber den enormen Vorzug auf, genetisch kodiert zu sein. Das heißt, das GFP lässt sich durch einfache gentechnische Strategien in fast jedem beliebigen Zellsystem herstellen und noch wichtiger: Es lässt sich spezifisch gekoppelt an praktisch jedes andere Protein heften. Dieses enorme Potenzial des GFP für bildgebende Methoden hat in den letzten Jahren geradezu einen Boom auf ähnliche, strukturell verwandte Proteine oder Mutanten ausgelöst, sodass uns heute nicht nur fluoreszierende Proteine in praktisch jeder Farbe des sichtbaren Spektralbereichs zur Verfügung stehen, sondern auch „intelligente“ Varianten derselben. Inzwischen gibt es Fluoreszenzmarker, die sich nach Belieben durch Licht aus- und anschalten lassen oder durch Bestrahlung mit einem kurzen Lichtpuls ihre Farbe verändern.

Punkt oder Fläche?

Neben der Frage nach der spezifischen Markierung stellt sich auch die nach der effizienten Anregung. Im Wesentlichen sind dabei zwei Verfahren zu unterscheiden: Zum einen handelt es sich um eine flächige Beleuchtung, die sich über einen möglichst großen Bereich (z. B. eine ganze Zelle oder einen Zellverbund) erstreckt und die Probe dort anregt. Diese Weitfeld-

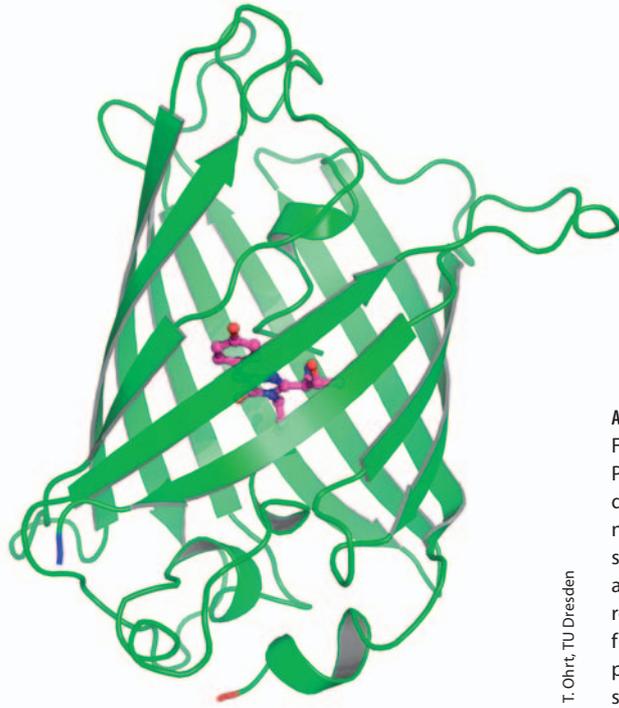
Illumination (auch Fernfeld genannt) dient hauptsächlich dazu, verschiedene Bereiche der Zelle gleichzeitig zu untersuchen, um räumliche Prozesse aufzulösen. Zur Detektion der Fluoreszenz dienen meist CCD- oder Videokameras. Zum anderen hat sich die Punkt-Beleuchtung (konfokal) durchgesetzt, die weniger auf die parallele Betrachtung verschiedener Bereiche als auf die effiziente Analyse eines einzelnen Messflecks abzielt. Hochempfindliche Punkt-Detektoren wie Lawinen-Photodioden (Avalanche Photodioden) bilden das Signal jedes Messflecks ab.

Die Konfokalbeleuchtung ermöglicht eine hohe Zeitauflösung im Submikrosekundenbereich sowie ein hohes Signal-zu-Hintergrund-Verhältnis von bis zu 1000. Die Fokussierung auf einen Raumpunkt geschieht meist, indem ein Objektiv mit hoher numerischer Apertur einen parallelen Laserstrahl auf einen Punkt fokussiert (Abb. 4) oder aber durch spezielle Fasern für die Nahfeldmikroskopie. Letztere erlauben weitaus bessere räumliche Auflösungen bis in den unteren Nanometerbereich, sind allerdings auf Oberflächen beschränkt. Aus diesem Grund gibt es erhebliche Anstrengungen, durch intelligente Anregungsschemata das von Ernst Abbe beschriebene Beugungslimit zu unterschreiten bzw. zu umgehen. Der Beitrag von Stefan Hell in diesem Heft erläutert eine faszinierende Methode, mit der dies gelingt.

Bei der Konfokalanregung wird immer nur jeweils ein Raumpunkt in der Größenordnung der halben Wellenlänge detektiert. Eine zwei- oder dreidimensionale Abbildung lässt sich daher nur erreichen, indem der Laserstrahl die Probe abrastert und ein Auswertprogramm anschließend die punktweise aufgenommenen Daten zu einem Bild zusammensetzt. Dieser Prozess ist allerdings recht zeitaufwändig, da üblicherweise ein Flächenbereich von mehreren hundert Mikrometern in jeder Dimension zu analysieren ist. Daraus folgen meist Aufnahmegeschwindigkeiten von maximal einigen zehn Bildern pro Sekunde, was die Analyse von Vorgängen im Milli- oder gar Mikrosekunden-Zeitbereich verhindert. Gerade dort aber spielen sich viele wesentliche Prozesse wie molekulare Erkennungsreaktionen, Proteinbewegung oder Konformations- bzw. Strukturänderungen ab, wobei letztere meist charakteristisch für die biologische Informationsübermittlung sind.

Gleich zwei Wünsche auf einmal

Das höchste Ziel der zell- und molekularbiologischen Forschung ist es gegenwärtig, physiologische Funktionen der genauen Lokalisation und zeitlichen Dynamik einzelner an einem Prozess beteiligter Proteine zuzuordnen, wobei die räumliche Auflösung idealerweise im Nanometerbereich, die zeitliche im unteren Mikro- bis Nanosekundenbereich liegen sollte. Beides gleichzeitig zu erreichen, ist beim gegenwärtigen Stand der Technologie nahezu unmöglich, wobei weniger Detektoren und Optik die Messung limitieren

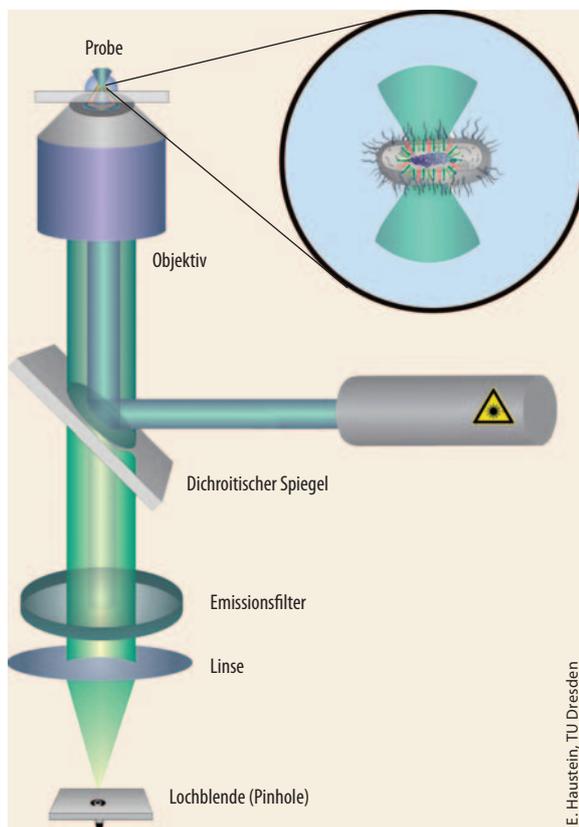


T. Ohrt, TU Dresden

Abb. 3 Das Grün Fluoreszierende Protein (GFP), hier die dreidimensionale Röntgenstruktur, hat sich als idealer Fluoreszenzfarbstoff für die Nanobiophotonik erwiesen.

als die Fluoreszenz und Stabilität der eingesetzten Farbstoffe und damit das erwartete Messsignal. Bei Raumtemperatur und im wässrigen Medium sendet ein Farbstoffmolekül ungefähr 10^5 Photonen aus, bevor der Laser es irreversibel zerstört (Bleichen). Auch die Photonenzählraten selbst sind limitiert. Die endlich kurze Fluoreszenzlebensdauer bewirkt, dass eine gewisse Beleuchtungsintensität zu einer Sättigung des Fluoreszenzsignals führt, wenn der Laser nicht schon weit unterhalb dieser Werte den Farbstoff bleicht. Um diese Probleme zu umgehen, wurden in den letzten Jahren ungleich stabilere und damit „hellere“ Fluoreszenz-Quantenpunkte verwendet. Diese Teilchen sind allerdings deutlich größer und sperriger als einfache Farbstoffmoleküle und stören daher signifikant die biologische Funktion vieler markierter Proteine.

Da es gegenwärtig beim Studium zellulärer Prozesse nicht möglich ist, die zeitliche und die räumliche Auflösung gleichzeitig voll auszuschöpfen, gibt es im Bereich der Fluoreszenzspektroskopie zwei Hauptstoßrichtungen. Die eine, intuitiv sehr eingängige Methode ist das sog. Einzelmolekül-Imaging bzw. -Tracking. Dieses hat sich zum Ziel gesetzt, die Fluoreszenzmikroskopie zum äußersten Sensitivitätslimit zu treiben und zu analysieren, wo sich einzelne Biomoleküle oder andere biologisch aktive Partikel (z. B. Viren) in einer lebenden Zelle oder einem Organismus befinden und wie sie sich dort bewegen. Daraus lassen sich Aussagen über biologische Prozesse im Bereich zwischen Millisekunden und einigen Sekunden bis Minuten ableiten. Intelligente Detektionsschemata und entsprechende Datenprozessierung ermöglichen räumliche Auflösungen bis in den Nanometerbereich. Hierbei wird die Zelle üblicherweise flächig angeregt, und die Detektion der Fluoreszenzsignale geschieht mithilfe einer ultrasensitiven Kamera. Der Artikel von



E. Haustein, TU Dresden

Abb. 4 Beim konfokalen Mikroskop wird die Probe mittels eines Objektivs punktförmig beleuchtet. Eine zweidimensionale Abbildung ergibt sich durch Abrastern der Probe und das rechnergestützte Zusammenfügen vieler Einzelaufnahmen. Charakteristisch für die konfokale Mikroskopie ist die Lochblende, die das Licht passieren muss, bevor es auf den Detektor trifft und die es ermöglicht, Proben schichtenweise abzulichten.

Don Lamb und Christoph Bräuchle zeigt faszinierende Beispiele auf, bei denen sich einzelne Moleküle in ihrer natürlichen Umgebung gewissermaßen in Aktion beobachten ließen. Daraus ergibt sich ein detailliertes „Filmskript“ über die räumliche Ordnung intrazellulärer Prozesse.

Das zweite wichtige Feld der Nanobiophotonik, über das Sören Doose und Markus Sauer berichten, ist die konfokale Fluoreszenzspektroskopie, mit der sich biomolekulare Dynamik mit bestmöglicher zeitlicher Auflösung bis in den Nanosekundenbereich charakterisieren lässt. Eine Vielzahl instrumentell verwandter Methoden erlaubt es, einzelne Moleküle beim Durchtritt durch ein beugungslimitiertes Detektionsvolumen im wässrigen Medium für ein Zeitfenster von rund einer Millisekunde (bzw. der durch den Diffusions- oder Transportkoeffizienten der Moleküle gegebenen Aufenthaltsdauer im Fokus) zu untersuchen. Damit lassen sich ihre Translations- und Rotationsgeschwindigkeit, das Fluoreszenzspektrum, ihre Fluoreszenzintensität und -lebensdauer sowie eine Modulation derselben durch inter- oder intramolekulare biologische Prozesse präzise analysieren.

Selbstverständlich ist die konfokale Spektroskopie mithilfe von Laser-Scannern jederzeit in eine bildgebende Methode zu überführen. Die Grenzen für zelluläre Anwendungen sind hierbei sowohl in zeitlicher als auch in räumlicher Hinsicht recht gravierend. Zeitlich begrenzen die recht langsamen Scanraten die Methode erheblich. Oftmals sind die in Zellen beobachteten Konzentrationen von Biomolekülen zu hoch, um in einem beugungslimitierten konfokalen Volumenelement sinnvolle Einzelmolekülbetrachtungen anzustellen. Auch die starke Fragmentierung von Zellen in teils unter dem Auflösungslimit liegende Organellen bringt starke Probleme mit sich, da auf diesen Skalen nicht mehr von frei beweglichen Molekülen ausgegangen werden kann. In diesem Kontext eröffnet der Artikel von Stefan Hell zur hochauflösenden STED-Mikroskopie auch für die Einzelmolekülanalyse neue Perspektiven – vom generellen gewaltigen Potenzial einer minimal- bzw. nichtinvasiven zellulären Nanoskopie einmal abgesehen.

Die nachfolgenden drei Artikel sollen die wichtigen Eckpfeiler der Nanobiophotonik und auch das Potenzial der Fluoreszenzspektroskopie aufzeigen, ohne dabei jedoch den Anspruch zu erheben, dieses vielseitige Feld der Biophysik umfassend abzudecken. Durch den rasanten Fortschritt der Biowissenschaften wird die Nanobiophotonik auch in den nächsten Jahren ein extrem spannendes und inspirierendes Tätigkeitsfeld für Physiker bleiben, das hoffentlich noch viele faszinierende Methoden und Technologien, aber auch ein präziseres Verständnis der Lebensprozesse hervorbringen wird.

DIE AUTORIN

Petra Schwille studierte Physik in Stuttgart und Göttingen und promovierte im Jahr 1996 mit einer Arbeit, die sich der Analyse biochemischer Systeme auf der Einzelmolekülebene widmete. Ihre Postdoc-Zeit verbrachte Petra Schwille in Göttingen sowie als Feodor-Lynen-Stipendiatin an der Cornell University in Ithaca (USA). Im Jahr 1998 gewann sie den Biofuture-Preis vom BMBF. Seit 2002 ist Petra Schwille Professorin für Biophysik an der TU Dresden und versucht dabei weiterhin, den Geheimnissen der kleinsten Werkstätten unseres Lebens auf die Spur zu kommen. Sofern ihre beiden Kinder ihr Zeit dazu lassen, treibt Petra Schwille alle Arten von Bergsport und musiziert in einem Streichquartett. Als Kuratorin des Physik Journal hat sie diesen Schwerpunkt koordiniert.

