

Scharfer Blick auf Nanopartikel

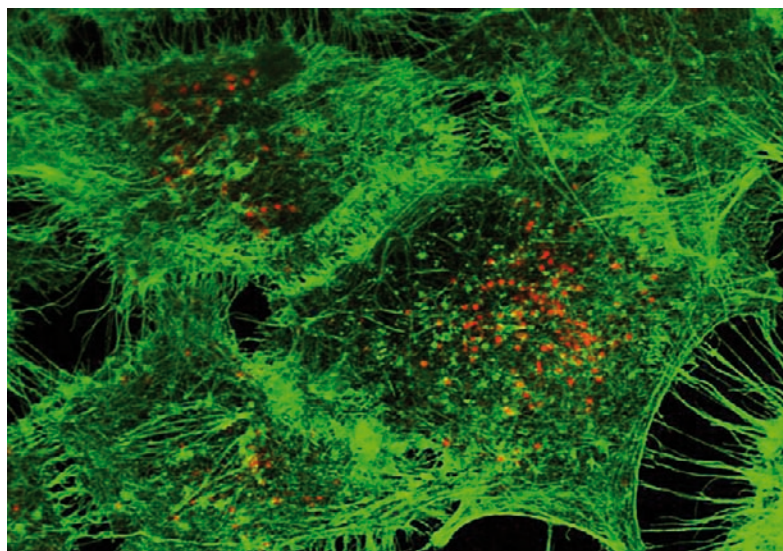
Die optische Fernfeldmikroskopie jenseits des Beugungslimits ermöglicht neue Einblicke in biologische Vorgänge auf der Nanoskala.

Christian Schumann und Annette Kraegeloh

Nanopartikel finden sich in immer mehr technischen Prozessen und Produkten. Inwieweit nanometergroße Teilchen in die Zelle eindringen können und wie sie dort wirken, ist von großem Interesse, sowohl für nützliche Anwendungen wie neuartige Medikamente als auch in Bezug auf schädliche Auswirkungen, etwa durch Nanopartikel in Alltagsprodukten. Für gründliche Analysen auf den Längenskalen biologischer Wechselwirkungen ist es nötig, die Beugung als auflösungsbegrenzenden Effekt in der optischen Fernfeldmikroskopie zu überwinden.

Viele Vorgänge in Zellen laufen auf der Nanometerskala ab, etwa wenn Substanzen ins Zellinnere gelangen und dort weitertransportiert werden. Auch beim Stoffwechsel innerhalb der Zellen sind Komponenten beteiligt, deren Größe zumindest in einer Dimension im Nanometerbereich liegt. Dazu gehören zahlreiche Proteine (Durchmesser 3 bis 20 nm) oder die Erbsubstanz DNA (2 nm). Biologische Membranen, die als äußere Begrenzung der Zelle dienen, sind nur 5 nm dick, die Fasern des Zytoskeletts zwischen 7 und 25 nm. Der Durchmesser intrazellulärer Membranbläschen liegt bei rund 100 nm.

Nanopartikel spielen zunehmend eine Rolle in technischen Anwendungen und finden sich in pharmazeutischen oder kosmetischen Produkten. Ein bekanntes Beispiel sind die Titan- oder Zinkoxidpartikel in Sonnenschutzcremes. Unsere Arbeitsgruppe untersucht daher die Wechselwirkungen künstlich erzeugter Nanopartikel mit Zellen: Sie können eine erwünschte Zellantwort hervorrufen, etwa im Zusammenhang mit einer biomedizinischen Anwendung, aber auch eine unerwünschte, bei einer unbeabsichtigten Exposition. Doch hier sind viele Zusammenhänge noch ungeklärt, nicht zuletzt wegen der Herausforderungen für die Mikroskopie. Teilchen mit einer Größe zwischen 1 und 100 nm lassen sich mit herkömmlichen lichtmikroskopischen Verfahren nicht trennen (Abb. 1). Um zu ermitteln, welche Mechanismen dazu führen, dass eine Zelle auf die Anwesenheit von Nanopartikeln reagiert, ist es entscheidend, deren Weg in die Zellen sowie ihre intrazelluläre Position genau zu untersuchen (Abb. 2). Die nötige Abbildungstechnik muss die beteiligten Wechselwirkungspartner sowohl mit hohem Kontrast als auch in hoher Auflösung detektieren können. Fluoreszenzmikroskopie kann dies leisten – mit ihr ist es



Um die Wirkung von Nanopartikeln (rot) auf Zellgewebe (hier menschliche Lungenepithelzellen, grün: Strukturen des Aktinzytoskeletts) verlässlich beurteilen zu können, ist eine kontrastreiche Auflösung im Nanometerbereich nötig.

möglich, biologische und chemische Strukturen gezielt nachzuweisen. Grundlage hierfür ist es, das Ziel durch Anheften fluoreszierender Moleküle (Fluorophore) zu markieren. Geeignetes Licht regt diese zum Leuchten an, ein Mikroskop fängt das emittierte Licht auf. Da die Fluoreszenzphotonen weniger Energie besitzen als die Anregungsphotonen, lassen sie sich gut voneinander unterscheiden. Mehr noch: Aufgrund der spezifischen spektralen Eigenschaften verschiedener Fluorophore lassen sich unterschiedliche Strukturen innerhalb ein und derselben Probe gleichzeitig markieren und par-

KOMPAKT

- Die Überwindung der Beugung als auflösungsbegrenzendem Effekt in der optischen Fernfeldmikroskopie ermöglicht Einblicke auf den Längenskalen biologischer Wechselwirkungen.
- Die STED-Mikroskopie (Stimulated Emission Depletion) spielt dabei eine Vorreiterrolle und eignet sich hervorragend, um die Wechselwirkungen synthetisch erzeugter Nanostrukturen mit biologischen Systemen zu erforschen.
- Grundlage dafür ist das Markieren der Zielobjekte mit Fluoreszenzfarbstoffen, die gezielt „ausgeschaltet“ werden müssen, um die Zuordnung des Fluoreszenzsignals zu bestimmten Strukturen zu ermöglichen.

Dr. Christian Schumann, Dr. Annette Kraegeloh, Leibniz-Institut für Neue Materialien gGmbH, Campus D2 2, 66123 Saarbrücken

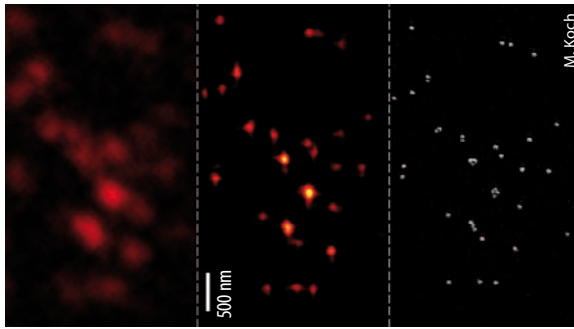


Abb. 1 Eine Probe mit SiO₂-Partikeln von 80 Nanometer Größe wurde mit verschiedenen Methoden abgebildet: Konfokal-Aufnahme (links), STED-Aufnahme (Mitte) und Rasterelektronenmikroskopie.

alle nachweisen. Moderne Optiken und Detektoren erreichen dabei hohe Empfindlichkeiten und erfassen unter optimalen Bedingungen einzelne fluoreszierende Moleküle.

Ein Mikroskop mit Fluoreszenz-Kontrast besteht im einfachsten Fall aus einem Auflichtmikroskop, das über eine Lichtquelle zur Fluoreszenzanregung verfügt, einen dichroitischen Strahlteiler sowie Anregungs- und Emissionsfilter. Bei der so genannten Weitfeldmikroskopie wird die Probe flächig angeregt und die Fluoreszenz mit einer Kamera detektiert. Ist das Signal mit unscharfen Bildern von Objekten außerhalb der Fokalebene überlagert, lässt sich auf diesem Weg jedoch keine physikalische Tiefenauflösung erreichen, also Strukturen in Ausbreitungsrichtung des Lichts trennen.

Dies ermöglicht erst die konfokale Mikroskopie. Sie nutzt im Vergleich zur Elektronenmikroskopie die hohe Eindringtiefe sichtbaren Lichts in biologisches Material von bis zu 100 µm zur echten Volumenbildung mit Auflösung sowohl senkrecht zur Lichtausbreitung (lateral) als auch in Ausbreitungsrichtung (axial). Dabei beleuchtet eine punktförmige Quelle die Probe durch das Objektiv, was dort einen beugungsbedingten Lichtfleck hervorruft. Dasselbe Objektiv sammelt das erzeugte Fluoreszenzlicht. Eine zur punktförmigen Lichtquelle konfokale Blende in der Zwischenbildebene unterdrückt Signalbeiträge von außerhalb

der Fokusebene des Objektivs sehr stark und begrenzt das Detektionsvolumen des Fluoreszenzsignals in axialer Richtung [1]. Zur Bildgebung wird das Detektionsvolumen dann in allen drei Raumrichtungen (x- und y-Achse lateral, z-Achse axial) durch die Probe gerastert (Abb. 3). Die beiden skizzierten Methoden der optischen Fernfeldmikroskopie unterscheiden sich dabei von höher auflösender Elektronen- oder Rasterelektronenmikroskopie zusätzlich durch vergleichsweise geringe Anforderungen an die Probenvorbereitung, hohe Bildraten sowie die Möglichkeit, auch lebende Zellen dreidimensional zu untersuchen.

Einer der zentralen Nachteile der Lichtmikroskopie in diesem Zusammenhang war lange Zeit die beugungsbedingt begrenzte Auflösung. Ernst Abbé formulierte schon Ende des 19. Jahrhunderts diese Grenze als

$$\Delta x \approx 0,61 \cdot \frac{\lambda}{n \cdot \sin \alpha},$$

mit der Wellenlänge des Lichts λ , dem Brechungsindex n der Probe und des Immersionsmediums sowie dem halben Objektivöffnungswinkel α . Die erreichbare laterale Auflösung ist dementsprechend proportional zur eingesetzten Wellenlänge. Einer Verkleinerung der Wellenlänge sind jedoch durch photochemische Effekte bis hin zur Ionisation enge Grenzen gesetzt, vor allem, wenn es um die Abbildung lebender Zellen geht. Auch lässt sich die Auflösung nicht wesentlich durch einen vergrößerten Brechungsindex von Einbett- und Immersionsmedium steigern.

Geschicktes Ausnutzen der photophysikalischen Eigenschaften bestimmter Fluoreszenzfarbstoffe überwindet jedoch diese fundamentale Auflösungsgrenze. Durch selektives „Ausschalten“ einer Großzahl der Fluorophore im abgebildeten Bereich lässt sich das Fluoreszenzsignal auch Strukturen zuordnen, deren Trennung beugungsbedingt nicht möglich ist. Mittlerweile existiert eine beachtliche Zahl solcher Verfahren [2], von denen der STED-Mikroskopie eine wichtige Rolle zukommt. Denn einerseits ließ sich mit ihr erstmals die Beugungsgrenze überwinden, andererseits verbessert sie die Auflösung rein physikalisch und muss nicht weiter numerisch aufgearbeitet werden.

Die STED-Mikroskopie ist wie die konfokale Mikroskopie eine rasternde Abbildungstechnik. Zunächst bringt ein Laser die Fluorophore an einem Punkt der Probe in den fluoreszierenden S₁-Zustand. Das gezielte Ausschalten der Fluorophore geschieht mithilfe eines zusätzlichen Lasers mit größerer Wellenlänge (Abb. 3). Dieser bewirkt, dass die Fluorophore in den elektronischen Grundzustand zurückkehren. Dabei werden Photonen der Wellenlänge des Abregungslasers emittiert (Abb. 4). Um so das Detektionsvolumen zu verringern und damit die Auflösung zu steigern, erzeugt man mittels einer Phasenmaske durch Interferenz eine torusförmige elektrische Feldverteilung des Abregungslasers in der Umgebung des Anregungsfokus, die eine zentrale Nullstelle aufweist [3]. So werden die Fluorophore im Randbereich des angeregten Fluoreszenzpunktes wieder ausgeschaltet, und es verbleibt lediglich ein Signal aus dem scharf definierten Zentrum.

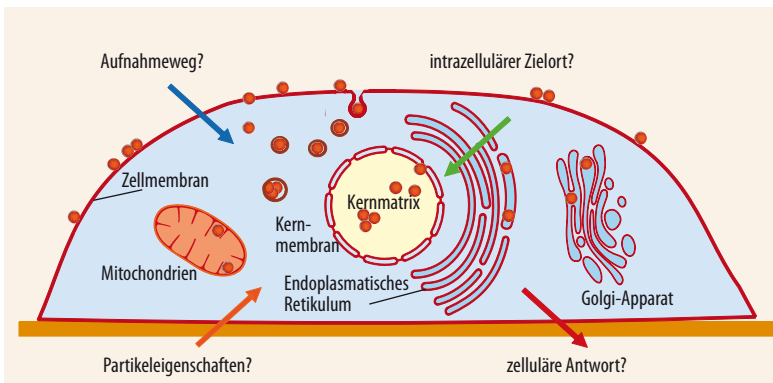


Abb. 2 Wie können Nanopartikel in Zellen geraten, welchen Weg legen sie in deren Innerem zurück, in welchen Zellbestandteilen landen sie schließlich, und wie reagieren die Zellen darauf? Dafür

gilt es, die Aufnahmeprozesse, Lokalisation und Anordnung der Partikel mit hoher Auflösung und großem Kontrast aufzuklären.

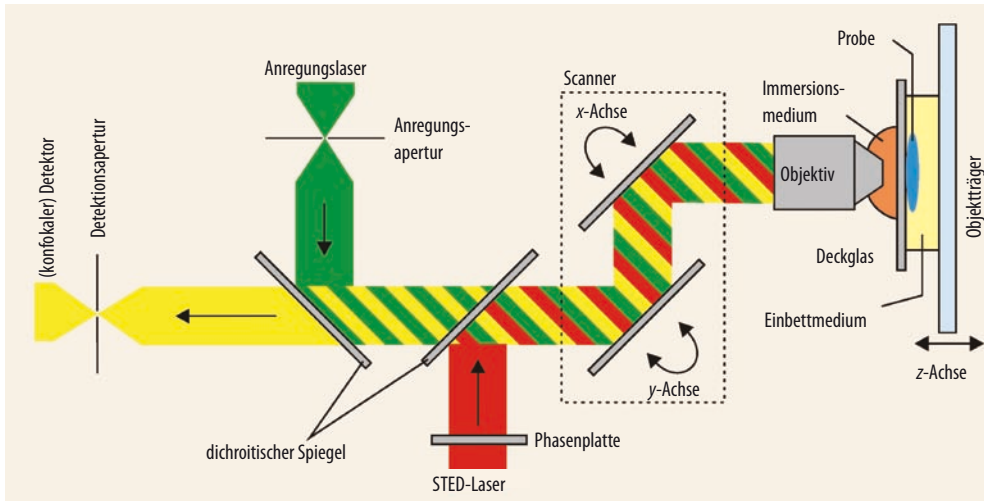


Abb. 3 Strahlengang und Lage der Probe im herkömmlichen konfokalen Laser-Raster-Mikroskop: Ein Scanner rastert die Probe zunächst in xy-Richtung lateral ab, die Fokusebene lässt sich durch Veränderung des Abstandes zwischen Probe und Objektiv (axial entlang der z-Achse) variieren. Mit STED-Laser entspricht der Aufbau einem STED-Mikroskop.

Ein effektives Ausschalten der Fluorophore erfordert eine sehr hohe Laserleistung ($I \gg I_{\text{sat}}$). Eine erhöhte Leistung des Anregungslasers führt dazu, dass der Bereich, in dem eine effektive Anregung erfolgt, sich weiter in Richtung der zentralen Nullstelle ausdehnt und sich das signalgebende Volumen verkleinert (Abb. 5). Die dadurch steigende Genauigkeit ist theoretisch nur durch die Laserleistung begrenzt, gemäß

$$\Delta x \approx 0,61 \cdot \frac{\lambda}{n \cdot \sin \alpha \cdot \sqrt{1 + I/I_{\text{sat}}}}$$

mit dem Verhältnis der Anregungslaserintensität I zur Sättigungsintensität I_{sat} , die von den spektralen Eigenschaften des Fluorophors abhängt. Basierend auf diesem Prinzip existieren mittlerweile verschiedene lasertechnische Umsetzungen mit Puls- und Dauerstrichstrahlquellen.

Zerstörerisches Bleichen

Da die Entwicklung verschiedener STED-Implementierungen in kommerzielle Systeme schon weit fortgeschritten ist, rücken immer mehr die praktischen Aspekte in den Mittelpunkt, die den Einsatz im Forschungsalltag betreffen. Die beiden Hauptkriterien, die STED neben der verbesserten Auflösung von der konventionellen konfokalen Mikroskopie unterscheiden,

sind das Signal-zu-Rausch-Verhältnis (Signal to Noise Ratio, SNR) sowie das Vorhandensein geeigneter Fluorophore. Aufgrund des verringerten Detektionsvolumens nimmt bei gleicher Markierungsdichte die Anzahl der Fluorophormoleküle und damit die Zahl der emittierten Photonen pro Rasterpunkt ab. Entsprechend ist – selbst bei idealer Detektion – das SNR geringer. Möglichkeiten, das SNR durch längere Pixelintegrationszeiten oder wiederholtes Mitteln der Daten zu verbessern, hängen maßgeblich von den photophysikalischen Eigenschaften des Fluorophors ab, insbesondere dem „Photobleichen“.

Hierbei handelt es sich um all jene Prozesse, die eine lichtinduzierte Zerstörung der Fluorophore auslösen. Somit stehen sie für eine Abbildung nicht mehr zur Verfügung. Dadurch nimmt die Signalstärke immer weiter ab, bis kein Kontrast mehr vorhanden ist. Bei der konventionellen Fluoreszenzmikroskopie beruht das Phänomen hauptsächlich auf Reaktionen, die von langlebigen Triplett-Zuständen ausgehen (Abb. 4). Das gilt ebenso für die konfokale Mikroskopie, bei der zwar das Detektionsvolumen begrenzt ist, nicht jedoch das Anregungsvolumen. Das heißt, sämtliche Bleichprozesse finden auch in den Lichtkegeln ober- und unterhalb der Fokalebene statt und zerstören die dortigen Fluorophore, bevor sie überhaupt zum Einsatz kommen. Die Einwirkung des intensiven Anregungslasers auf Moleküle im Triplett-Zustand bei der

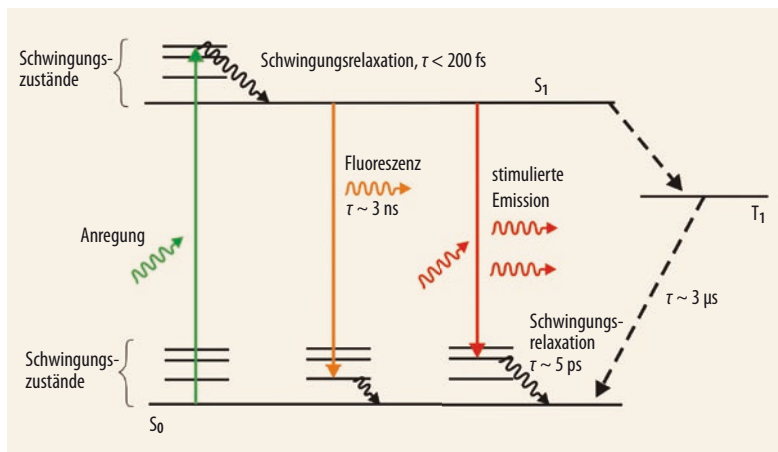


Abb. 4 Mithilfe des sog. Jablonski-Diagramms lassen sich die im STED-Schema involvierten molekularen Zustände und Übergänge kompakt veranschaulichen. Nach Anregung kann ein Fluorophormolekül entweder ein Fluoreszenz-Photon emittieren oder durch stimulierte Emission zurück in den elektronischen Grundzustand (S_0) überführt werden. Außerdem besteht eine gewisse Wahrscheinlichkeit dafür, in den Triplett-Zustand (T_1) zu wechseln.

STED-Mikroskopie verstärkt diesen Effekt zusätzlich. Um diesen Bleichmechanismus zu unterdrücken, gibt es verschiedene Ansätze. Zum Einen lässt bei Systemen mit gepulsten Lasern eine verringerte Repetitionsrate bzw. eine gesteigerte Rastergeschwindigkeit den Molekülen genügend Zeit, den Triplett-Zustand wieder zu verlassen [4]. Zum Anderen können auch chemische Reaktionen die Moleküle im Triplettzustand reduzieren bzw. oxidieren [5]. Beides entleert den Triplett-Zustand auf nichtstrahlende Weise und vermindert die Wahrscheinlichkeit des Photobleichens. Die Fluorophore stehen dann wieder für die Bildgebung zur Verfügung. Dies setzt allerdings eine hinreichend hohe Diffusionsrate in der Probe voraus, die bei hochviskosen Einbettmedien jedoch nicht gegeben ist. Schließlich tritt noch ein STED-spezifischer Bleichmechanismus auf: Fluorophore im S_1 -Zustand absorbieren Photonen des Abregungslasers und erreichen dadurch höher angeregte Singulett-Zustände, in denen sie mit höherer Wahrscheinlichkeit der Zerstörung anheimfallen [6].

Der passende Fluorophor für jeden Zweck

Neben den bisher genannten rein physikalischen Aspekten sind bei den verschiedenen Möglichkeiten, Fluorophore an ihre Ziele anzuheften, auch chemische

und biologische Parameter von zentraler Bedeutung. Aufgrund ihrer photochemischen Eigenschaften sind auch nicht alle Fluorophore gleichermaßen für die verschiedenen STED-Implementierungen geeignet. Gerade auf diesem Gebiet haben neue Entwicklungen in letzter Zeit jedoch dazu geführt, ihre Einsatzmöglichkeiten zu verbreitern.

Ein übliches Markierungsverfahren, sozusagen der Gold-Standard für die STED-Mikroskopie, ist die sogenannte Immunzytochemie. Dabei färben Antikörper (Immunglobuline) die interessierenden Zellkomponenten bzw. die Zielmoleküle anhand ihrer Fähigkeit, spezifische Strukturen zu erkennen. In der einfachsten Methode ist der Antikörper direkt mit organischen Fluoreszenzfarbstoffen versehen. Das indirekte Verfahren dagegen setzt zwei Antikörper nacheinander ein: Der erste – der Primärantikörper – erkennt die interessierende Struktur, ist aber unmarkiert. Erst ein weiterer, sekundärer Antikörper, der wiederum spezifisch an den Primärantikörper bindet, transportiert die Fluoreszenzmarkierung. Damit lässt sich letztlich sogar das Signal verstärken, zum Beispiel durch die Bindung mehrerer Sekundär- an einen Primärantikörper. Die Fluoreszenzmarkierung der Antikörper geschieht in der Regel auf chemischem Weg durch kovalente Ankopplung kleiner organischer Fluoreszenzfarbstoffe. Eine Reihe dieser Moleküle, wie der Farbstoff Atto647N, weisen für die STED-Mikroskopie geeignete

FLUORESCENZMARKIERTE NANOPARTIKEL

Nanopartikel können aus den unterschiedlichsten anorganischen oder auch organischen Materialien bestehen. Nur wenige Typen – wie die Quantenpunkte – besitzen eine intrinsische Fluoreszenz und sind so unmittelbar mit fluoreszenzbasierten Methoden nachweisbar. Solche Quantenpunkte sind auch zur Markierung zellulärer Strukturen geeignet und lassen sich wie organische Fluorophore an Antikörper koppeln. Der Vorteil von Quantenpunkten liegt in ihrer scharfen Emissionsbande und der hohen Bleichstabilität. Aufgrund ihres sehr breiten Anregungsspektrums eignen sie sich aber bisher nicht für die STED-Mikroskopie.

Viele andere Typen von Nanopartikeln lassen sich mithilfe organischer Fluoreszenzfarbstoffe markieren. Abhängig vom verwendeten Material kann die Markierung im Inneren oder

auf der Partikeloberfläche erfolgen (Abb. i). Durch eine geschickte Prozessführung lassen sich Parameter wie Größe und Morphologie der Partikel oder das Ausmaß der Fluoreszenzmarkierung gezielt einstellen. Auch der eingesetzte Farbstoff ist prinzipiell frei wählbar (Abb. ii). Entscheidend für die Markierung ist, dass der Fluorophor über eine kovalente Bindung dauerhaft an die Partikel bindet, ohne sich von diesen wieder abzulösen. Nanopartikel auf Basis von Siliziumdioxid bilden ein sehr flexibles System. Ihre Oberfläche lässt sich durch Kopplung funktioneller Gruppen oder Moleküle außerdem weiter modifizieren, sodass auch ihre Oberflächeneigenschaften systematisch einstellbar sind. Nicht weiter veränderte Nanopartikel dieser Art weisen beispielsweise ein negatives Oberflächenpotential auf.

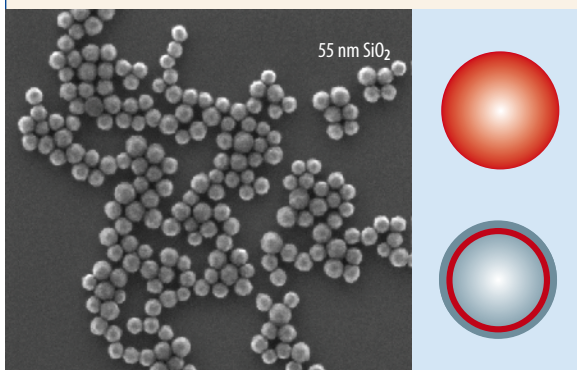


Abb. i Fluoreszenzmarkierte SiO_2 -Nanopartikel (REM-Abbildung). Die Schemata des Partikelbaus deuten an, dass der Farbstoff über die Partikelmatrix oder in einer dünnen Schicht angeordnet werden kann.

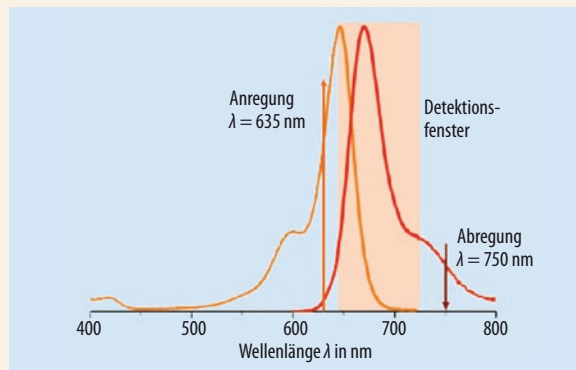


Abb. ii Das Spektrum veranschaulicht die Charakteristika des Farbstoffs Atto647N, der für die STED-Mikroskopie einsetzbar ist. Die Wellenlänge des Abregungslasers ist so gewählt, dass sie nicht zur Anregung des Farbstoffs führt.

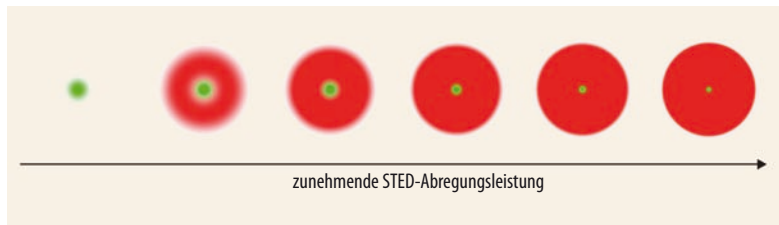


Abb. 5 Die Auflösung lässt sich durch Sättigung der stimulierten Emission im Abregungsvolumen verbessern. Eine höhere Leistung des Abregungslasers (rot) verkleinert den verbleibenden Fluoreszenzpunkt (grün).

Eigenschaften auf, darunter eine hohe Quanteneffizienz und Bleichstabilität.

Ein Nachteil der durch Antikörper vermittelten Markierung betrifft die Mikroskopie an lebenden Zellen. Denn Antikörper können in der Regel nicht eigenständig in das Innere intakter, lebender Zellen vordringen. Um intrazelluläre Strukturen zu markieren, ist es daher zuerst notwendig, die äußere Zellhülle, die Zytoplasmamembran, durch Behandlung mit oberflächenaktiven Substanzen durchlässig zu machen, wobei die Zellen ihre Lebensfähigkeit verlieren. Bis vor kurzem hat gerade dieser Aspekt dazu geführt, dass sich die STED-Mikroskopie nur sehr begrenzt für die Untersuchung lebender Zellen eignete.

Ein weit verbreitetes Verfahren zur Markierung von Strukturen lebender Zellen beruht deshalb auf autofluoreszierenden Proteinen. Der bekannteste Vertreter hierfür ist das grün fluoreszierende Protein (GFP), das über ein intrinsisches Fluorophor verfügt und sich mithilfe molekularbiologischer Methoden vor Ort in lebenden Zellen bildet. Um eine zelluläre Struktur zu markieren, bilden das Fluoreszenzprotein und das anvisierte Ziel ein „Fusionsprotein“. Neben dem GFP ist mittlerweile eine Vielzahl von Varianten bekannt, die einen weiten Bereich des sichtbaren Spektrums abdecken. Obwohl viele dieser Proteine im Vergleich zu den organischen Fluoreszenzmolekülen nur eine geringe Quanteneffizienz und Bleichstabilität aufweisen, lassen sich in letzter Zeit einige davon erfolgreich für verschiedene, auch für reine Anwender verfügbare Varianten der STED-Mikroskopie einsetzen.

So bietet sich etwa das gelb fluoreszierende Protein mit der Bezeichnung Citrine für die Darstellung eines intrazellulären röhrenartigen Kompartiments an, dem endoplasmatischen Retikulum (ER). Eine gepulste STED-Variante bildet damit separierte ER-Strukturen mit einer gegenüber der herkömmlichen Konfokalmikroskopie vierfach verbesserten lateralen Auflösung ab. Aufnahmen von Bildsequenzen über kurze Zeitspannen zeigen so beispielsweise, wie sich in einem ER-Netzwerk Einschlüsse bilden und auflösen [7].

Die Entwicklung von Markierungssystemen für die STED-Technik an lebenden Zellen steht jedoch erst am Anfang. Erst vor kurzem gelang es, ein dafür geeignetes rot fluoreszierendes Protein mit der Bezeichnung TagRFP657 zu entwickeln [8]. Auch selbst-markierende oder Fluorogen-aktivierende Proteine sind in diesem Zusammenhang von großem Interesse [9, 10].

Obwohl bereits zeitaufgelöste STED-Experimente durchgeführt wurden, bleibt die Frage, ob sich diese Technik auch für Langzeitbeobachtungen lebender Zellen eignet. Denn ob die hohe Laserleistung Zell-

schäden hervorruft, ist nach wie vor wenig untersucht. Die eingesetzten Laserintensitäten im Bereich von 0,4 bis 5 GW/cm² bei gepulsten STED-Systemen liegen zwar weit unterhalb der Intensitäten der gut etablierten Multiphotonen-Mikroskopie von 200 GW/cm², die Langzeit-Untersuchungen auch lebender Systeme ermöglicht, die verschiedenen Pulslängen (ca. 200 ps bei gepulstem STED gegenüber ca. 200 fs bei Multiphotonen-Mikroskopie) lassen einen direkten Vergleich jedoch nicht zu [1, 11, 12]. STED-Abbildungen lebender Zellen über eine Beobachtungszeit weniger Minuten hinaus erfordern somit in Zukunft einen ausgiebigen Nachweis der biologischen Kompatibilität.

Aufklärung von Nano-Zell-Interaktionen

Unsere Arbeitsgruppe nutzt die STED-Mikroskopie dazu, Wechselwirkungen von Nanopartikeln mit menschlichen Zellen zu untersuchen. Mit nanotechnologischen Methoden erzeugte Materialien, zu denen auch Nanopartikel gehören, haben eine zunehmende Bedeutung auf unterschiedlichen Gebieten, zum Beispiel in der Optik, der Tribologie, der Katalyse oder der Biomedizin. Ihre Wechselwirkungen mit Menschen und Umwelt sind unter verschiedenen Perspektiven interessant, denn die gezielte Nutzung von Nanoma-

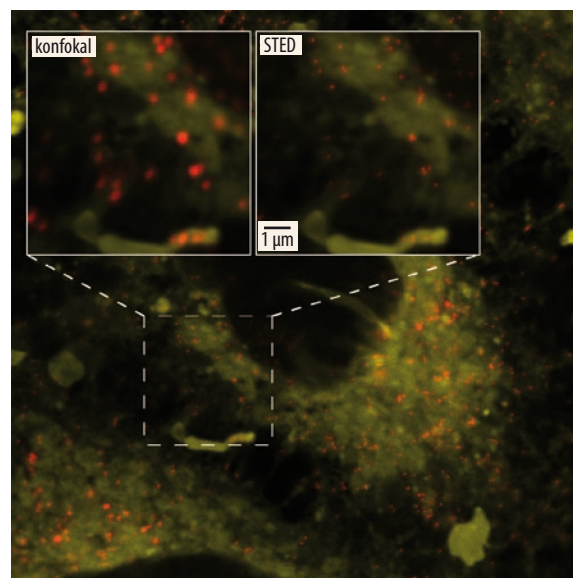


Abb. 6 Diese STED-Aufnahme zeigt SiO₂-Partikel von 130 nm Größe in einer A549-Zelle nach einem Tag Inkubationszeit. Gelb markiert ist die Zytoplasmamembran und von dieser abgegrenzte Membranvesikel, die bei der Aufnahme von Materie in die Zelle entstehen. Gezeigt ist eine einzelne konfokale Schnittebene. Kleine Agglomerate lassen sich durch die verbesserte STED-Auflösung deutlich trennen (Ausschnitt).

terialien, beispielsweise in Diagnostik und Therapie, besitzt ein großes Potenzial. Demgegenüber stellt die Sicherheit nanotechnologisch erzeugter Produkte in Bezug auf eine unbeabsichtigte Exposition bei ihrer Produktion und ihrem Einsatz ein weltweit interessierendes Forschungsthema dar. Beide Bereiche erfordern ein genaues Verständnis der Auswirkungen nanoskaliger Materialien sowohl auf den gesamten Organismus als auch auf einzelne Zellen.

Wir interessieren uns speziell dafür, wie Zellen auf synthetisch hergestellte Nanopartikel reagieren. Eine solche Reaktion kann sich vielfältig äußern, beispielsweise in einer veränderten Stoffwechselaktivität, ausgeschütteten Botenstoffen, geschädigten zellulären Strukturen bis hin zum Tod der Zelle. Dazu müssen wir erfassen, ob und wie bestimmte Nanopartikel in Zellen gelangen, wo sie sich innerhalb einer Zelle anreichern und wie sie dort vorliegen. Um Vorhersagen anzustellen, ob und warum eine bestimmte Partikelart eine stärkere oder schwächere Zellreaktion hervorruft, ist es entscheidend, strukturelle Daten mit den tatsächlich vorliegenden Partikeleigenschaften sowie mit der hervorgerufenen Zellreaktion in Verbindung zu setzen (Abb. 2). Diese Kenntnisse lassen sich schließlich nutzen, um verträglichere Nanomaterialien zu entwickeln. Aufgrund der geringen Größe von sowohl Nanopartikeln als auch den mit ihnen in Wechselwirkung stehenden zellulären Strukturen ist die STED-Mikroskopie für uns ein wertvolles Werkzeug.

Ihre Anwendung hat sich beispielsweise bei der Frage bewährt, ob Nanopartikel nach ihrer Aufnahme in Zellen vereinzelt und somit fein verteilt oder in Form von Agglomeraten vorliegen [13]. In unseren Untersuchungen setzten wir mit dem Fluoreszenzfarbstoff Atto647N markierte Nanopartikel unterschiedlicher Größen ein (Infokasten). Diese lagen nach ihrer Aufnahme zunächst vereinzelt und zumindest vorübergehend innerhalb von Membranbläschen vor. Erst mit der Zeit bildeten sich innerhalb der Zellen große Agglomerate (Abb. 6). Diese sind aber nicht nur irgendwo im Inneren der Zellen, sondern auch innerhalb bestimmter zellulärer Kompartimente wie dem Zellkern nachweisbar. In diesen konnten nur sehr kleine Partikel ($d = 30$ nm) eindringen, sie bildeten dort Agglomerate aus mehr als zehn einzelnen Partikeln. Die Tatsache, dass größere Partikel ($d > 80$ nm) nicht in den Zellkern eindringen konnten, deutet darauf hin, wie die kleineren überhaupt in den Zellkern gelangen, nämlich durch Poren in der Hülle des Zellkerns. Die intrazelluläre Bildung solcher Partikel-Agglomerate ist ein langsamer Prozess, der über einen Zeitraum von mehreren Stunden bis Tagen abläuft. Um dynamische Prozesse wie die Partikelaufnahme und ihren intrazellulären Transport in lebenden Systemen zu verfolgen, ist die STED-Technik von höchstem Interesse. In diesem Fall ist die Frage nach einer Markierung durch Verwendung der mit einem geeigneten Farbstoff ausgestatteten Nanopartikel bereits gelöst.

Das Potenzial der STED-Mikroskopie ist zum gegenwärtigen Zeitpunkt nur ansatzweise ausgeschöpft. Die Fluoreszenzmikroskopie ist prinzipiell in der Lage, mehrere Fluorophore simultan abzubilden. Gelingt der Transfer auf das STED-Prinzip, lassen sich so unterschiedlich markierte Strukturen in einer Probe gleichzeitig hochaufgelöst darstellen [14]. Die Entwicklung neuer Phasenplatten und die Verwendung neuer und preiswerterer Laserquellen reduzieren die Komplexität und die Kosten der Systeme, um einen breiteren Zugang zur STED-Mikroskopie in der biologischen Bildgebung und eine Erweiterung der Palette der nutzbaren Fluorophore zu ermöglichen [15]. Das Arsenal an Fluorophoren und Markierungssystemen, die sich eignen, dürfte weiter anwachsen, und die Analyse der verfügbaren Abbildungsmethoden im Hinblick auf ihre biologischen Auswirkungen in lebenden Zellen sollte dabei hohe Priorität haben.

Literatur

- [1] J. Pawley, Handbook of Biological Confocal Microscopy, Springer, Berlin (2006)
- [2] S. W. Hell, Physik Journal, Dezember 2007, S. 47
- [3] J. Keller, A. Schönle und S. W. Hell, Opt. Express **15**, 3361 (2007)
- [4] G. Donnert, C. Eggeling und S. W. Hell, Nat. Methods **4**, 81 (2007)
- [5] J. Vogelsang et al., Angew. Chem. Int. Ed. Engl. **47**, 5465 (2008)
- [6] J. Hotta et al., J. Am. Chem. Soc. **132**, 5021 (2010)
- [7] B. Hein, K. I. Willig und S. W. Hell, Proc. Natl. Acad. Sci. U S A **105**, 14271 (2008)
- [8] K. S. Morozova et al., Biophys. J. **99**, L13 (2010)
- [9] J. Schröder, H. Benink, M. Dyba und G. V. Los, Biophys. J. **96**, L1 (2009)
- [10] J. A. J. Fitzpatrick et al., Bioconjugate Chem. **20**, 1843 (2009)
- [11] U. V. Nägerl et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U S A **105**, 18982 (2008)
- [12] K. König, J. Microscopy **200**, 83 (2000)
- [13] S. Schübbe, C. Cavelius, C. Schumann, M. Koch und A. Kraegeloh, Adv. Eng. Mat. **12**, (2010)
- [14] L. Meyer et al., Small **4**, 1095 (2008)
- [15] M. Reuss, J. Engelhardt und S. W. Hell, Opt. Express **18**, 1049 (2010)

DIE AUTOREN

Christian Schumann (FV Molekülphysik) studierte Physik in Kaiserslautern und promovierte 2008 über ultraschnelle Spektroskopie biologischer Photorezeptoren. Seit 2009 arbeitet er als Postdoc am INM-Leibniz Institut für Neue Materialien gGmbH (INM) in der Gruppe „Nano Zell Interaktionen“ und beschäftigt sich mit optischen Methoden zur Untersuchung der Interaktion von Nanopartikeln und biologischen Systemen.



Annette Kraegeloh studierte Biologie in Bonn und Sydney und promovierte 2004 über Transportsysteme in halophilen Bakterien. Seit 2004 arbeitet sie am INM in Saarbrücken. Dort beschäftigte sie sich zunächst mit Nanomaterialien für biomedizinische Anwendungen. Seit 2008 konzentriert sie sich als Gruppenleiterin auf Wechselwirkungen zwischen synthetisch hergestellten Nanopartikeln und menschlichen Zellen.

