

Press release**Ludwig-Maximilians-Universität München****Luise Dirscherl**

06/05/2008

<http://idw-online.de/en/news264059>Research results, Transfer of Science or Research
Biology, Chemistry, Information technology, Medicine, Nutrition / healthcare / nursing
transregional, national**Panoramablick in die Zelle - Mikroskopieren in 3D, mehrfarbig und in hoher Auflösung**

Aufnahmen, die mit dem 3D-SIM-Mikroskop gemacht wurden, können Sie in Druckqualität über Professor Heinrich Leonhardt beziehen. Die Rätsel der Zelle besser auflösen - das ist nun möglich dank einer bahnbrechenden neuen Mikroskoptechnik, die von einem internationalen Forscherteam um Professor Heinrich Leonhardt von der Ludwig-Maximilians-Universität (LMU) München und Professor John Sedat von der University of California in San Francisco, USA, entwickelt und erfolgreich angewendet wurde. Und zwar auf der Basis eines herkömmlichen Lichtmikroskops: Forschung im Bereich der Zellbiologie ist ohne diese Geräte nicht denkbar, doch ihr Einsatz ist begrenzt durch eine relativ niedrige räumliche Auflösung. Das ist die kleinste, noch wahrnehmbare Distanz zwischen zwei Punkten: Strukturen, deren Abstand diese Grenze unterschreitet, werden als ein Objekt abgebildet. Wie online in der Fachzeitschrift *Science* berichtet, erlaubte die neue 3D-SIM-Technik die Abbildung von Details im Kern einer Säugerzelle in 3D, mehrfarbig und in etwa zweifach erhöhter Auflösung als bei konventionellen Mikroskopen. "Gleichzeitig zu sehen waren genetisches Material, die umgebende Kernhülle und einzelne Kernporen", berichtet Leonhardt. "Manche Details können mit konventioneller Technik gar nicht oder nur mit Hilfe hochkomplexer Elektronenmikroskope abgebildet werden, während wir zelluläre Strukturen - und künftig möglicherweise sogar bewegte Prozesse - als 3D-Film aufnehmen. Die neue Technik wird bald wohl auch kommerziell erhältlich sein."

Es ist ein weiter Weg von Antoni van Leeuwenhoek, dem niederländischen Mikroskopebauer aus dem 17. Jahrhundert. Seine Geräte waren eher extrem starke Lupen, mit deren Hilfe er aber immerhin als erster Bakterien nachweisen konnte. Lichtmikroskope der heutigen Generation dagegen erlauben sogar die Abbildung subzellulärer Strukturen. Dabei wird Licht von mehreren Linsen gebündelt, nachdem es von dem Untersuchungsobjekt reflektiert wurde oder dieses durchfließen hat. Eine breit eingesetzte Weiterentwicklung dieser Technik ist die Fluoreszenzmikroskopie. Dabei markieren fluoreszierende Farbstoffe Strukturen, die damit sichtbar sind und in der Zelle verfolgt werden können. Eine Grenze ist der Lichtmikroskopie in all ihren Varianten aber gesetzt: Die Auflösung, also die Unterscheidbarkeit kleinster Strukturen, hängt von der Wellenlänge des Lichts ab und liegt im Idealfall bei rund 200 Nanometern. Ein Nanometer entspricht einem Milliardstel Meter. "Es war übrigens ein deutscher Physiker, der Eisenacher Ernst Abbe, der das nach ihm benannte Abbe-Limit der Lichtmikroskopie im 19. Jahrhundert entdeckt hat", so Leonhardt. "Doch diese Grenze ist nicht absolut: Sie kann - nicht zuletzt mit unserem Verfahren - unterschritten werden. Doch keine der bislang entwickelten Techniken konnte bis jetzt breit eingesetzt werden."

Deshalb versuchen Wissenschaftler seit langem, die Methoden zur Abbildung molekularer Strukturen mit den Vorteilen der Lichtmikroskopie, etwa der einfachen Handhabung, zu kombinieren - und zwar unterhalb des Abbe-Limits. "Eben dies ist nun gelungen", berichtet Leonhardt. "Wir erreichen eine zweifach erhöhte Auflösung von etwa 100 Nanometern. Die Grundlage unseres 3D-SIM-Verfahrens ist herkömmliche Lichtmikroskopie, allerdings mit einer besonderen Beleuchtungstechnik. Damit machen wir etwas, was man bei Lichtmikroskopen eigentlich tunlichst vermeiden sollten: Wir beleuchten strukturiert. Wir bestrahlen also unsere Proben, etwa eine Zelle, mit einem bekannten und sehr feinen Muster aus Licht. Das führt zu Interferenzen mit den Strukturen der Probe, die sich als Schattenmuster zeigen - und die

man an sich vermeiden will." Eine ähnliche wellenförmige Interferenz ist in der Grafik als sogenannter Moiré-Effekt bekannt und entsteht etwa beim Einscannen von gedruckten Bildern. "Diese auf den ersten Blick störenden Interferenzmuster enthalten aber wertvolle Informationen", sagt Leonhardt. "Mit viel Mathematik und einem guten Computer können wir aus diesen Rohdaten kleinste Strukturen der Probe errechnen, die mit einem einfachen Lichtmikroskop nicht aufgelöst werden können."

Das Verfahren wird stufenweise in den verschiedenen Ebenen der Zelle mit unterschiedlichen Farben wiederholt. Aus den Daten wird schließlich im Computer ein mehrfarbiges, dreidimensionales Bild der Zelle mit besonders hoher Auflösung rekonstruiert. "Mit dieser Technik können zelluläre Strukturen abgebildet werden, die von konventionellen Lichtmikroskopen nicht erfasst werden", meint Leonhardt. "Dies ermöglicht eine ganz neue Art der Analyse in den Lebenswissenschaften: von der Grundlagenforschung bis zu den angewandten Fragestellungen." Für die Forscher ergaben sich damit faszinierende neue Einblicke in den Kern einer Säugerzelle kurz vor der Teilung und damit vor einem kritischen Moment in deren Lebenszyklus. Denn dabei müssen die zwei Kopien des genetischen Materials peinlich genau auf die beiden Tochterzellen verteilt werden. Fehler bei diesem sensiblen Vorgang können fatal sein: Der Tod der Zelle ist die vergleichsweise harmlose, die Entstehung von Krebs dagegen die sehr viel gefährlichere Konsequenz. Dank der neuen Technik konnten die Wissenschaftler die Kernhülle im Detail sehen. Dazu gehörten die Membran, die das ebenfalls zum Teil sichtbare genetische Material umschließt, sowie Kernporen, also Öffnungen und wichtige Transportwege in der Kernhülle.

"Besonders interessant waren für uns auch zwei große Einstülpungen in der Kernhülle", erinnert sich Leonhardt. "Dort setzen nämlich die sogenannten Zentrosomen an. An diesen Strukturen bilden sich lange Fäden aus, an denen das genetische Material in Form von Chromosomen entlang wandert, um in die Tochterzellen zu gelangen." Diesen grundlegenden biologischen Prozess hat man in einem vergleichbaren Detailreichtum bislang noch nicht sehen können. Aber auch auf der Oberfläche der Chromosomen, also des genetischen Materials, sind neue Einzelheiten zu erkennen. Das ist nur möglich, weil die unterschiedlichen Strukturen verschieden eingefärbt sind - und zwar mit herkömmlichen Farbstoffen. Ein anderes Gerät, das sogenannte STED-Mikroskop, kann ebenfalls das Abbe-Limit unterschreiten, ist aber technisch sehr aufwändig und noch auf spezielle Farbstoffe beschränkt. Im Vergleich zu diesen Lichtmikroskopen erreicht die Elektronenmikroskopie eine noch sehr viel höhere Auflösung, ist aber extrem aufwändig und kann nicht mehrfarbig abbilden. "Bilder in 3D in drei oder sogar vier Farben mit sehr hoher Auflösung abzubilden, ist derzeit also nur mit unserer 3D-SIM-Technik möglich", so Leonhardt. "Dazu kommt, dass wir etablierte und einfache Verfahren anwenden können, um die Proben aufzubereiten und anzufärben."

Schon im Laufe des nächsten Jahres soll der Weg vom 3D-SIM-Prototyp zum kommerziell erhältlichen Gerät führen. "Derart groß angelegte Projekte wie die Entwicklung und erste Anwendung dieser Technik sind natürlich immer nur als gemeinschaftliche Anstrengung eines Teams möglich", sagt Leonhardt. "Hier haben zum Beispiel Hard- und Software-Ingenieure sehr eng mit Physikern und Zellbiologen zusammengearbeitet. Langfristig wollen wir jetzt das Verfahren noch verbessern, um Prozesse in lebenden Zellen filmen zu können." Professor Leonhardt ist Mitglied der Exzellenzcluster "Nanosystems Initiative Munich (NIM)" und "Center for Integrated Protein Science Munich (CIPSM)".

Publikation:

"Subdiffraction Multicolor Imaging of the Nuclear Periphery with 3D Structured Illumination Microscopy",
Lothar Schermelleh, Peter M. Carlton, Sebastian Haase, Lin Shao, Lukman Winoto, Peter Kner, Brian Burke, M. Cristina Cardoso, David A. Agard, Mats G. L. Gustafsson, Heinrich Leonhardt, John W. Sedat,
Science, online am 6. Juni 2008

Ansprechpartner:

Professor Dr. Heinrich Leonhardt
Biozentrum der LMU
Department Biologie II
Tel.: 089 / 2180 - 74232
E-Mail: h.leonhardt@lmu.de

Web: <http://sci.bio.lmu.de/epigenetics/index.htm>

URL for press release: <http://www.lmu.de>

URL for press release: <http://Web: http://sci.bio.lmu.de/epigenetics/index.htm>