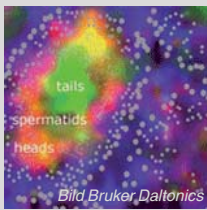


Das Lichtmikroskop ist tot. Es lebe das Lichtmikroskop!

Gastkommentar

Spätestens seit 1858, als Rudolf Virchow die „Cellularpathologie“ publizierte, ist das Lichtmikroskop das wichtigste Werkzeug des Pathologen – aber wird es das auch im 21. Jahrhundert bleiben?

Die nebenstehend beschriebenen technologischen Weiterentwicklungen spielen in der Tat nicht nur in der Grundlagenforschung eine große Rolle, sie halten auch bereits Einzug in die Routinediagnostik. So kommt die Fluoreszenzmikroskopie an vielen pathologischen Instituten additiv zum Einsatz (S. 44), und die konfokale Laserscanmikroskopie hat sich in der angewandten Forschung fest etabliert; sie erschließt die dritte Dimension räumlicher Darstellungen, die zeitliche Dimension sowie submikroskopische Größenordnungen für die derzeit rasant wachsende Molekularpathologie.



Hier bekommt das Licht als Signalquelle erstzunehmende Konkurrenz durch völlig neuartige Technologien mit molekularer

Auflösung, beispielsweise die im Bild gezeigte TissueMALDI TOF Massenspektrometrie oder die im Artikel erwähnte CARS-Technik, die die Eigenschwingung von Molekülen erfasst. Was aber in der täglichen Routine letztlich das Rennen macht, wird nicht die technologische Faszination entscheiden, sondern die ganz bodenständige Frage nach der Standardisierung und Vereinfachung von Arbeitsprozessen – und natürlich die Kostenfrage. Vorläufig sind die meisten modernen Techniken im Bereich der GKV-Vergütung schlichtweg nicht abzubilden. So bleibt das Lichtmikroskop auf absehbare Zeit das wertvollste Werkzeug des Pathologen, um medizinische Diagnosen zu stellen. Und auf die kommt es doch letztlich an.



Priv. Doz. Dr. med. Dipl.-Med. Mike Otto
MVZ für Histologie, Zytologie und
Molekulare Diagnostik
otto@patho-trier.de



Fortschritte der Mikroskopie

Auf zu neuen Dimensionen

Die Lichtmikroskopie dringt mit neuen Technologien in submikroskopische Bereiche bis zur molekularen Ebene vor und erlaubt beim *Life Cell Imaging* sogar realistische Filmaufnahmen von Vorgängen aus dem Inneren lebender Zellen.

STED, FRET, FLIM, CARS – Ernst Abbe, der große Wegbereiter der Lichtmikroskopie hätte sich nicht träumen lassen, dass die Technologien, die sich hinter diesen kryptischen Kürzeln verbergen, eines Tages das theoretisch Unmögliche möglich machen würden. Abbe berechnete im Jahr 1873 die höchstmögliche mikroskopische Auflösung, die aufgrund der Wellennatur des Lichts erreichbar ist. Er fand heraus, dass Abstände von weniger als $0,2\ \mu\text{m}$ selbst bei höchster Qualität der Linsensysteme nicht mehr auflösbar sein würden. Ganze Zellen mit einem etwa hundertfach größeren Durchmesser lassen sich demnach gut darstellen, doch was sich innerhalb der Zelle abspielt, versinkt zum Großteil in Unschärfe. Und an die Darstellung dreidimensionaler Objekte – wie es Zellen nun einmal sind – ist rein theoretisch aufgrund der begrenzten Tiefenschärfe überhaupt nicht zu denken.

Dass viele dieser Limitationen nicht mehr gelten, liegt unter anderem an der Entwicklung der Fluoreszenzmikroskopie. Dabei regt eine monochromatische Lichtquelle Farbstoffe an, die die aufgenommene Energie in Form einer längerwelligen Fluoreszenzstrahlung wieder abgeben.

Um Moleküle oder ganze Stoffwechselwege innerhalb einer Zelle zu untersuchen, setzt man heute in der Forschung meist fluoreszierende Eiweiße als Marker ein, die dank gentechnologischer Tricks von den Zellen selbst gebildet werden und diese zum Leuchten bringen. Am berühmtesten ist das *Green Fluorescent Protein* (GFP), das Douglas Prasher aus der Qualle *Aequorea victoria* isolierte und genetisch charakterisierte. Zusammen mit Marty Chalfie publizierte er 1994 die ersten erfolgreichen Experimente an Bakterien, die GFP selbst synthetisieren konnten. 2008 wurde die Entdeckung mit dem Nobelpreis für Chemie ausgezeichnet, wobei sich Chalfie den Preis mit Shimomura und Tsien teilte. Prasher, der eigentliche Vater des GFP, ging aber leer aus.

Räumliche Bilder

Die vor über 50 Jahren von Marvin Lee Minsky am MIT entwickelte konfokale Lasermikroskopie ermöglicht es, Zellbestandteile oder Moleküle dreidimensional darzustellen. Dabei nutzt man einen Laser als Lichtquelle, der das Objekt zeilenweise absannt und so einen optischen Schnitt erzeugt. Das Bild entsteht am Computer,

der die Schichten zu einer dreidimensionalen Struktur zusammensetzt. Minsky ließ sein „konfokales Lasermikroskop“ 1961 patentieren, es sollte aber rund zwanzig Jahre dauern, bis die Methode in der biomedizinischen Forschung umfassend genutzt wurde.

Anfang der 1990er-Jahre entwickelte Prof. Hell, MPI-Direktor in Göttingen, die 4Pi konfokale Fluoreszenzmikroskopie. Sein Verfahren arbeitet mit zwei gegenüberliegenden Objektiven, die so ausgerichtet sind, dass sich Lichtwellen in ihrem Brennpunkt verstärken. Diese „konstruktive Interferenz“ führte zu einer bis dahin unerreichten Detailschärfe (s. großes Bild). Hell entwickelte 1993 auch die STED-Mikroskopie (*Stimulated Emission Depletion*), um im Fluoreszenzmikroskop den Brennfleck zu verkleinern. Hier wird ein Fluorochrom im Laser angeregt und anschließend über einen zweiten Impuls teilweise in den Grundzustand überführt.

Molekulare Videofilme

Heute dient eine Hightech-Variante der Lichtmikroskope dazu, um im Rahmen des *Live Cell Imaging* Transportvorgänge oder Zellwanderungen in mikroskopischen Videofilmen zu beobachten. Dabei kommen

hochauflösende CCD-Kameras zum Einsatz. Die Aufnahmen können an lebenden Zellen unter physiologischen Bedingungen bei 37 °C erfolgen und von wenigen Sekunden in Echtzeit bis zu mehreren Tagen im Zeitraffer dauern.

Neue Marker

Neue Fluoreszenzmarker haben das Vordringen des Mikroskops in zeitliche und molekulare Dimensionen ermöglicht. So erlaubt es die FRET-Technik (*Fluorescence Resonance Energy Transfer*), den Abstand zwischen zwei Molekülen zu bestimmen. Hierfür koppelt man an diese zwei unterschiedliche Marker und regt für die Messung einen der beiden durch Fluoreszenzeinstrahlung an. Befindet sich das zweite Molekül in unmittelbarer Nachbarschaft, so wird die absorbierte Energie strahlungsfrei übertragen und von dort als Fluoreszenzstrahlung wieder abgegeben.

Als FRAP (*Fluorescence Recover after Photobleaching*) bezeichnet man ein Verfahren, bei dem zum Beispiel Oberflächenproteine auf Zellen mit fluoreszenzmarkierten Antikörpern beladen werden. Die Fluoreszenz wird durch einen kurzen Laserpuls lokal ausgelöscht und bildet sich wieder neu aus, wenn andere Ober-


flächenproteine in die „gebleichte“ Stelle diffundieren. Die Methode eignet sich zur Messung der Diffusionsgeschwindigkeiten in Zellen oder zum Nachweis der Fluidität von Biomembranen.

Bei der FLIM-Technik (*Fluorescence Lifetime Imaging Microscopy*) setzt man Fluoreszenzmarker ein, bei denen die Zeitspanne, in der sich die Moleküle im angeregten Zustand befinden, von der umgebenden Ionenkonzentration abhängt. Somit erlaubt die Messung der emittierten Fluoreszenzstrahlung eine Aussage über Ionenkonzentrationen in der Zelle.

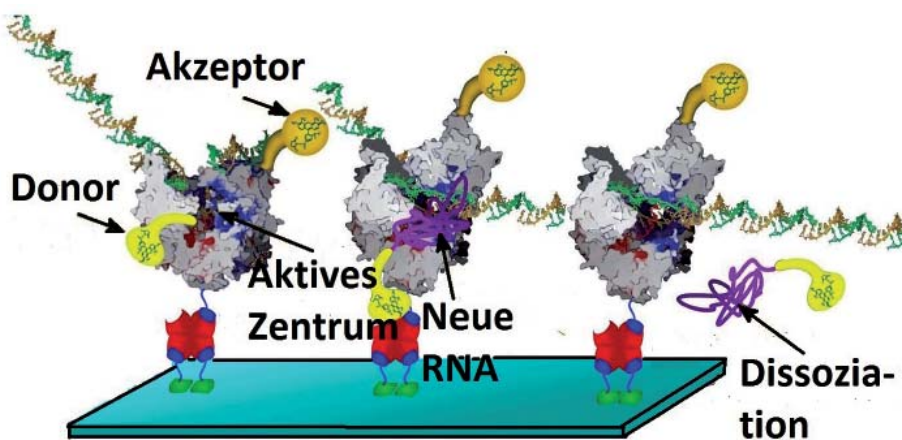
Der Vollständigkeit halber sei schließlich die CARS-Technik (*Coherent Anti-Stokes Raman Scattering*) erwähnt, die ganz ohne Marker auskommt. Hier werden Eigenschwingungen von Molekülen gemessen und in Bilder umgerechnet.

Neue Lichtquellen

Für einen Durchbruch sorgen derzeit neue Lichtquellen, die eine maximale sowie flächendeckend gleichmäßige Ausleuchtung der Probe ermöglichen. Speziell für das *Live Cell Imaging* wurden Hochleistungs-LEDs entwickelt, deren Helligkeit sich im Gegensatz zu den klassischen Halogen-Lichtquellen exakt einstellen lässt. Das Umschalten von einer Lichtintensität auf eine andere ist innerhalb von Mikrosekunden möglich, so dass lichtempfindliche Moleküle während der Aufnahmen nur kurze Zeit der Lichtquelle ausgesetzt sind.

Fachleute sehen in den LEDs eine ernsthafte Konkurrenz zu den teuren Lasern, und das nicht nur wegen ihrer extrem schnellen Schaltzeiten, sondern auch wegen ihrer hohen Lichtausbeute bei geringer Wärmeabgabe. Dazu kommt, dass Hochleistungs-LEDs inzwischen einen weiten Wellenlängenbereich abdecken und aufgrund ihres monochromatischen Emissionsspektrums oft nicht einmal einen Anregungsfilter benötigen. 

Dr. Olaf Spörkel



Molekulare Filmsequenz der RNA-Synthese: Die FRET-Technik erlaubt es, den Abstand zwischen zwei Fluoreszenzmarkern (Donor und Akzeptor) zu bestimmen. Im vorliegenden Fall leuchtet nur die neu entstehende RNA im aktiven Enzymzentrum auf. Nach der Dissoziation des Moleküls von der RNA-Polymerase erlischt das Fluoreszenzsignal wieder (Bildquelle www.wfu.edu, modifiziert).