

# CHANCEN

## DER NANOSKOPIE

CHANCEN DER NANOSKOPIE

# ZOOM IN DIE ZELLE

DIRK-PETER HERTEN &amp; OLIVER TILL FACKLER

**Hochauflösende Mikroskopie-Techniken erlauben es heute, den Molekülen bei der Arbeit zuzusehen. Die detailreichen Einblicke in das Leben der Zellen lassen besser verstehen, wie es zu Krankheiten kommt. Das verspricht molekülgenaue Diagnosen und präzise ansetzende Medikamente.**

# A

Alzheimer, Parkinson, Aids oder Krebs unterscheiden sich sehr in ihren Ursachen und Auswirkungen. Doch sie haben auch eine Gemeinsamkeit: Sie beginnen mit Veränderungen der Moleküle und deren Zusammenarbeit im Innern von Zellen. Mit den herkömmlichen Lichtmikroskopen war es bislang nicht möglich, solche molekularen Veränderungen zu beobachten und zu untersuchen – das Auflösungsvermögen der Mikroskope reichte dazu nicht aus. Mittlerweile jedoch konnte dieses Problem weitgehend behoben werden: Dank der Forschungsarbeiten der Chemie-Nobelpreisträger des Jahres 2014, Stefan Hell, Eric Betzig und William Moerner, gelingt es heute, einzelne Moleküle nachzuweisen und Strukturen in lebenden Zellen abzubilden, die eine Größenordnung unter der üblichen optischen Auflösung von Lichtmikroskopen liegen. So wird es erstmals möglich, krankhafte Veränderungen unmittelbar auf molekularer Ebene zu beobachten, und es lässt sich besser nachvollziehen, wie es zu Krankheiten kommt. Dies lässt auf neue Diagnose- und Behandlungsmethoden hoffen.

## Das Beispiel Aids

Infektionen mit dem Aids erzeugenden „Humanen Immundefizienz-Virus“, kurz HIV, sind ein Beispiel dafür, wie aufgrund des Umprogrammierens menschlicher Zellen Krankheiten entstehen. Viren sind obligate Zellparasiten, das heißt, sie können sich nur mithilfe von Zellen vermehren. Die Viren dringen dazu in die Körperzellen ein und missbrauchen deren Lebensfunktionen zu eigenen Zwecken. Daraufhin entstehen große Mengen neuer Viren, die wiederum Körperzellen befallen.

Im Falle von HIV verfügen die Ärzte über eine breite Palette von Medikamenten, mit denen die Vermehrung der Viren im Körper infizierter Menschen eingedämmt werden kann. Mit der Zeit widerstehen die Viren jedoch den Wirkstoffen, sie werden „resistent“. Dann wird es notwendig, die Patienten mit anderen Medikamenten oder Medikamentenkombinationen zu behandeln. Die derzeitige HIV-Therapie muss zudem lebenslang erfolgen: Mit den Wirkstoffen lässt sich die Ausbreitung der Viren zwar kontrollieren – endgültig aus dem Körper der Patienten vertreiben können die Medikamente die Viren jedoch nicht. Ein Impfstoff, der vor einer Infektion mit HIV schützen könnte, ist nicht verfügbar. Die Entwicklung neuer oder ergänzender Therapieoptionen ist daher nach wie vor ein wichtiges Ziel der Forschung.

Alle derzeit verfügbaren Medikamente richten sich gegen bestimmte Schritte im Lebenszyklus der Viren. Zum Teil können diese Infektionsprozesse mit hochauflösenden

Mikroskopieverfahren bereits sichtbar gemacht und analysiert werden. Bislang noch wenig verstanden ist allerdings, wie es dem HI-Virus gelingt, seine Zielzellen zu manipulieren. Diese Mechanismen wollen wir mit unseren Arbeiten aufklären. Eines unserer Ziele dabei ist es, bislang unbekannte Strukturen zu identifizieren, an denen Wirkstoffe ansetzen können, und so zusätzliche Therapieoptionen zu bieten.

### Die Achillesferse des HI-Virus

Das HI-Virus befällt zwei grundverschiedene Zelltypen des menschlichen Körpers: die Makrophagen (Fresszellen) und die „T-Helferzellen“ des Immunsystems. T-Helferzellen sind sehr wichtig für die Immunantwort unseres Körpers: Sobald eine T-Helferzelle erkannt hat, dass eine Körperzelle von einem Erreger befallen ist, wird sie aktiv und signalisiert anderen Zellen des Immunsystems, Abwehrmoleküle, sogenannte Antikörper, zu bilden. Interessanterweise kann sich das HI-Virus nur in aktivierten T-Helferzellen effizient vermehren – der Aktivierungszustand der T-Helferzelle definiert also deren Zugänglichkeit für das Virus.

Das HI-Virus wiederum hat Mechanismen entwickelt, den Aktivierungszustand der T-Helferzellen zu seinen Gunsten zu manipulieren. Dabei kommt dem HIV-Protein „Nef“



**PROF. DR. DIRK-PETER HERTZEN** ist Chemiker und leitet seit dem Jahr 2007 eine unabhängige Nachwuchsgruppe, die im Rahmen des Exzellenzclusters „Zelluläre Netzwerke“ in der Physikalischen Chemie eingerichtet wurde. Im Februar 2015 hat er den Ruf auf eine Startprofessur in der Physikalischen Chemie der Universität Heidelberg angenommen. Die Schwerpunkte seiner Arbeitsgruppe liegen im Bereich der Entwicklung von mikroskopischen Techniken und schaltbaren Fluoreszenzsonden sowie der Anwendung von Einzelmolekül-Techniken zur Untersuchung chemischer Reaktionen und zur Beobachtung zellbiologischer Prozesse in lebenden Zellen. Seit Oktober 2013 koordiniert er das BMBF-Verbundprojekt Switch-Click Microscopy.

Kontakt: [dirk-peter.herten@urz.uni-hd.de](mailto:dirk-peter.herten@urz.uni-hd.de)

### Neues Schwerpunktprogramm zur angeborenen Immunreaktion

Die Deutsche Forschungsgemeinschaft (DFG) hat im März 2015 die Einrichtung eines neuen Schwerpunktprogrammes (SPP) „Innate Sensing and Restriction of Retroviruses“ an der Universität Heidelberg beschlossen. Ziel des Programms ist es, angeborene Immunreaktionen gegen Retroviren zu untersuchen, zu denen unter anderem auch das HI-Virus gehört. Im Gegensatz zu adaptiven Immunreaktionen, etwa der Produktion von Antikörpern und zytotoxischen T-Zellen, sind die Mechanismen der angeborenen Immunantwort zur Abwehr retroviraler Infektionen nur sehr lückenhaft bekannt. In jüngster Zeit wurden wichtige Elemente der zellulären Erkennungsmaschinerie entdeckt und Zellsysteme entwickelt, in denen deren Funktion studiert werden kann. Darauf aufbauend werden in dem neuen Schwerpunktprogramm Retrovirologen und Immunologen mit Experten zusammenarbeiten, die Schlüsseltechnologien für die Quantifizierung und Visualisierung angeborener Immunreaktionen entwickeln. Langfristig wird ein gesteigertes Verständnis der angeborenen Immunerkennung von Retroviren zur Verbesserung antiviraler Impf- und Therapiestrategien beitragen. Koordinator des neuen Schwerpunktprogramms, das im Jahr 2016 seine Arbeit aufnehmen wird, ist Prof. Dr. Oliver T. Fackler.

eine wesentliche Rolle zu: Es sorgt dafür, dass sich die Viren in den befallenen T-Helferzellen gut vermehren können, und trägt auf diese Weise entscheidend zur Ausbildung der Immunschwäche Aids bei. Dazu verändert das HIV-eigene Protein Nef bestimmte molekulare Ereignisse, die während der Aktivierung der T-Zellen stattfinden, um einen Zustand herbeizuführen, der für die Vermehrung der Viren optimal ist. Unsere Arbeiten sowie die vieler anderer Arbeitsgruppen konnten die Manipulation der T-Helferzell-Aktivierung durch die HI-Viren mittlerweile als eine „Achillesferse“ identifizieren, die womöglich therapeutisch nutzbar ist.

Die Aktivierung der T-Zellen erfolgt im Laufe der Kommunikation verschiedener Immunzellen und wird durch den direkten Kontakt dieser Zellen vermittelt: Die T-Helferzelle erkennt mit einem Protein, das sie auf ihrer Oberfläche trägt (dem „T-Zell-Rezeptor“), kleine körperfremde Strukturen, sogenannte Antigene. Sie werden von „Antigen-präsentierenden Zellen“ als Zeichen für den Befall mit einem Infektionserreger dargeboten. Wenn die T-Zelle dieses „Erkennungszeichen“ mithilfe ihres Rezeptors identifiziert, folgt eine molekulare Signalkaskade, die mit der Aktivierung der T-Helferzelle endet.

Werden immunologische und bildgebende Verfahren miteinander kombiniert, ist es möglich, die Moleküle der Signalkaskade in den Zellen sichtbar zu machen. Bei diesen Untersuchungen stellte sich heraus, dass die Übertragung (Transduktion) der Signale sehr präzise mithilfe sogenannter Signaltransduktions-Mikrocluster erfolgt. Diese Cluster lassen sich besonders gut nachweisen, wenn man T-Helferzellen im Labor auf Oberflächen fixiert, die aufgrund ihrer Eigenschaften Stimuli vermitteln, die denen Antigen-präsentierender Zellen entsprechen. Als Antwort auf die Stimulation breiten sich die T-Helferzellen auf der Oberfläche aus und „beordern“ Signaltransduktions-Moleküle in definierte Bereiche – die „Mikrocluster“. Das Nef-Protein des HI-Virus verhindert, dass die T-Helferzellen sich ausbreiten – und es verändert die Zusammensetzung der Mikrocluster.

Die zentralen Fragen sind nun: Welche einzelnen Komponenten werden von Nef manipuliert, und auf welche Weise beeinflusst Nef die Zusammensetzung der Cluster? Weil die Cluster sehr klein (circa zehn Nanometer) und sehr kurzlebig sind (sie existieren nur für etwa zwei Minuten), lassen sich diese Fragen mit herkömmlichen biochemischen oder mikroskopischen Ansätzen nicht beantworten. Dazu bedarf es neuer hochauflösender Mikroskopie-Verfahren.

### Neue Mikroskopie-Techniken – neue Einsichten

Die begrenzte optische Auflösung herkömmlicher Lichtmikroskopie ist ein Phänomen der Lichtbeugung. Licht lässt

sich physikalisch sehr gut mit der Ausbreitung von Wellen beschreiben: Wellen können sich gegenseitig überlagern und hierdurch vielfältige Muster bilden, die der ursprünglichen Quelle in ihrer Form nicht mehr entsprechen – das im Mikroskop erzeugte Bild weist dann eine räumliche Ausdehnung aus, die mehr mit dem Durchmesser der Linsensysteme und der Farbe des Lichts zu tun hat als mit der Größe des abgebildeten Objekts.

Als Faustregel gilt, dass die Auflösung optischer Systeme bestenfalls bei etwa der halben Wellenlänge des beobachteten Lichts liegt. Bei roter Beleuchtung beträgt die Auflösung also etwa 0,3 Mikrometer und bei blauer Beleuchtung 0,2 Mikrometer. Mit der Lichtmikroskopie kann man also bestenfalls 2.000stel Millimeter auflösen. Die Abbildung kleinerer Objekte gelingt nicht – sie verschmelzen zu einem einzigen verschwommenen Fleck. Folglich können mit der herkömmlichen Lichtmikroskopie so kleine Strukturen wie die Signaltransduktions-Mikrocluster nicht untersucht und die Anzahl der daran beteiligten Proteine nicht ermittelt werden.

Eine Lösung für das generelle Problem der nicht ausreichenden lichtmikroskopischen Auflösung begann sich im Jahr 1989 abzuzeichnen. Damals gelang es dem amerikanischen Physiker William Moerner und seinen Mitarbeitern erstmals, einzelne Moleküle mithilfe der Spektroskopie sichtbar zu machen – mit flüssigem Helium und bei sehr tiefen Temperaturen. Bereits ein Jahr später erfolgten ähnliche Versuche bei Raumtemperatur und in Lösung. Daraufhin entwickelte sich die „Einzelmolekül-Spektroskopie“ rasch zu einem wichtigen Forschungsgebiet. Heute lassen sich einzelne Moleküle mit verbesserten Fluoreszenzmikroskopen abbilden und verfolgen. Aus den stochastischen Änderungen der Fluoreszenzintensität einzelner Moleküle lässt sich dabei auch auf Änderungen ihrer Zustände schließen. Auf diese Weise ist es möglich, die Dynamik der Moleküle unmittelbar zu verfolgen. Insgesamt haben Einzelmolekül-Techniken in den vergangenen 25 Jahren ungeahnte Möglichkeiten eröffnet, molekulare Prozesse zu untersuchen – nicht nur in der Biophysik, wo sie es erlauben, dynamische Prozesse von Proteinen

**„Hochauflösende Mikroskopie-Techniken erlauben es heute, einzelne Moleküle in lebenden Zellen nachzuweisen. Das macht es erstmals möglich, krankhafte Veränderungen unmittelbar auf molekularer Ebene zu beobachten.“**



**PROF. DR. OLIVER TILL FACKLER** leitet seit dem Jahr 2013 die Sektion „Integrative Virologie“ am Department für Infektiologie des Universitätsklinikums Heidelberg. Er ist Biologe und baute nach einem dreijährigen Forschungsaufenthalt an der University of California in San Francisco im Jahr 2001 eine Emmy-Noether-Nachwuchsgruppe am Universitätsklinikum auf. 2007 schließlich wurde er hier auf eine Professur berufen. Seine Forschungsschwerpunkte liegen auf der Zellbiologie, Immunologie und Pathogenese der HIV-Infektion.

Kontakt: [oliver.fackler@med.uni-heidelberg.de](mailto:oliver.fackler@med.uni-heidelberg.de)

und Proteinverbänden zu studieren. Auch in den Materialwissenschaften werden sie eingesetzt, beispielsweise, um „OLED-Materialien“ (OLED = Organic Light Emitting Diodes) zu charakterisieren, sowie in der Chemie, um die chemische Transformation einzelner Moleküle direkt zu verfolgen.

Für alle diese Anwendungen wird ein zu beobachtendes Molekül mit einem Fluoreszenzfarbstoff verknüpft – so wird es möglich, Veränderungen des Moleküls als Änderung des Fluoreszenzsignals zu erkennen. Da einzelne Moleküle isolierte Quantensysteme darstellen, erfolgen diese Änderungen sprunghaft: Das Fluoreszenzsignal wird an- oder ausgeschaltet, oder die abgestrahlte Fluoreszenz ändert plötzlich ihre Farbe.

#### Ein Schalter für die verbesserte Auflösung

Genau diese sprunghaften Zustandsänderungen haben sich als Schlüssel erwiesen, um die Auflösung von Lichtmikroskopen zu verbessern. Wie bei den meisten genialen Ideen ist auch hier der prinzipielle Ansatz trivial: Eine Ansammlung dicht beieinanderliegender Lichtquellen erscheint deshalb als verschwommener Fleck, weil sich die Lichtflecken aller Lichtquellen summieren. Sorgt man aber dafür, dass die Lichtquellen einzeln und nacheinander leuchten, erscheinen die Lichtflecken leicht gegeneinander verschoben. Stellt man also sicher, dass nur einzelne Lichtflecken abgebildet werden, kann man deren Lage mit höherer Genauigkeit bestimmen. Der Chemie-Nobelpreis des vergangenen Jahres ging an zwei Forscher, die sich dieses Prinzip zunutze gemacht haben, um auf jeweils unterschiedlichen Wegen Mikroskopie-Techniken zu entwickeln, die eine rund zehnfach bessere Auflösung erreichen als herkömmliche Methoden. Einer der Preisträger, der deutsche Physiker Stefan Hell, wurde von der Universität Heidelberg promoviert, schloss hier seine Habilitation ab und lehrt an der Universität seit dem Jahr 2003 als außerplanmäßiger Professor. Mit den neuen Techniken sind erstmals Objekte auf einer Größenskala von rund 0,02 Mikrometern zugänglich – was etwa der Größe kleinerer Proteinverbände entspricht.

Die von Eric Betzig und seinen Mitarbeitern entwickelte Methode nutzt das beschriebene Prinzip direkt: Der größte Teil aller Fluoreszenzfarbstoff-Moleküle in einer Probe, beispielsweise in einer Zelle, sind in einem dunklen (nicht-fluoreszenten) Zustand, und nur wenige werden in den „An“-Zustand (fluoreszent) geschaltet. Diese Schaltprozesse passieren ständig und zufällig. Deshalb nimmt man von der Probe einen kompletten Film auf, aus dessen einzelnen Bildern anschließend die Informationen über die Lage der Farbstoffmoleküle gewonnen und in einem resultierenden Bild höherer Auflösung gesammelt werden können.

#### Entwicklung neuartiger Mikroskopie-Methoden

Im Verbund „Switch-Click Microscopy“ werden neue Fluoreszenzmarker und Fluoreszenzmarkierungs-Verfahren für die Hochauflösungs-Mikroskopie im medizinischen Kontext der HIV-Infektion erforscht. Das Projekt wird vom Bundesministerium für Bildung und Forschung seit Oktober 2013 in der Initiative „Biophotonik“ mit rund 4,6 Millionen Euro gefördert. Beteiligt sind neben den Fakultäten für Biowissenschaften und für Medizin der Universität Heidelberg auch das Heidelberger „European Molecular Biology Laboratory“ (EMBL), die Julius-Maximilian-Universität in Würzburg sowie die Unternehmen „ATTO-TEC“ aus Siegen, „Sirius Feinchemikalien“ aus Bremen, „TOP-TICA“ aus München und „Picoquant“ aus Berlin.

Es liegt auf der Hand, dass die Qualität der mikroskopischen Aufnahme von der Dynamik des Schaltprozesses abhängt. Denn es muss sichergestellt sein, dass nur wenige Moleküle leuchten – diese aber mit möglichst hoher Lichtausbeute. Nur so lässt sich deren Lage genau bestimmen. Es ist deshalb erforderlich, die Schaltprozesse auf molekularer Ebene zu kontrollieren. Bei allen genannten Methoden geschieht dies derzeit mithilfe von Licht. Um die Farbstoffe zu aktivieren oder zu deaktivieren, muss das Präparat also mit einem gewissen Quantum an Licht bestrahlt werden, entweder der Anregungswellenlänge oder einer anderen durch den Schaltprozess vorgegebenen Wellenlänge. Da aber gleichzeitig auch die Fluoreszenz durch das Bestrahlen mit Licht angeregt wird – was ausschlaggebend für die Bildqualität ist –, muss meist ein Kompromiss in der Bestrahlungsleistung gefunden werden.

#### Neue Sonden für eine noch bessere Mikroskopie

Wir verfolgen seit einigen Jahren das Ziel, die Schaltprozesse von der Fluoreszenzanregung zu entkoppeln: Auf diese Weise ließen sich beide unabhängig voneinander optimieren. Eine Grundlage unserer Arbeiten sind „Fluoreszenzsonden“, wie sie beispielsweise zum Nachweis von Chemikalien, etwa von Schwermetallen, eingesetzt werden. Fluoreszenzsonden, mit denen man die Zusammensetzung von Stoffen analysieren kann, nutzen das analoge Prinzip: Das Binden des zu untersuchenden Stoffes (Analyten) beeinflusst die spektroskopischen Eigenschaften der Sonde, und die Fluoreszenz kann an- und ausgeschaltet werden. Im Unterschied hierzu muss der Schaltprozess für die uns interessierenden biologischen Anwendungen aber reversibel sein.

Zurzeit arbeiten wir an Fluoreszenzsonden, die durch Zugabe von Kupfer(II)-Salzen ausgeschaltet werden. Prinzipiell können aber beliebige Reaktionen genutzt werden, beispielsweise Reaktionen mit Kationen, die

THE POSSIBILITIES OF NANOSCOPY

# ZOOMING INTO THE CELL

DIRK-PETER HERTEN &amp; OLIVER TILL FACKLER

Alzheimer's disease, Parkinson's disease, AIDS and cancer differ greatly in their causes and effects. But they have one thing in common: They all begin with a change in molecules and their cooperation inside the cells. Until recently, it was impossible to observe and examine such molecular changes – the resolution of conventional light microscopes was too low. Now, however, this problem has been virtually solved: New, high-resolution microscopy techniques allow scientists to detect individual molecules and depict structures inside living cells that are one order of magnitude below the usual optical resolution of light microscopes. For the first time, we can observe pathological changes directly at the molecular level.

We are currently attempting to implement these new microscopy techniques in the area of HIV research. One important mechanism of HIV's pathogenic effect is its ability to interfere with the communication of T-helper cells – the main targets of HIV – in such a way that the cells can no longer trigger an efficient immune response to the virus. Our aim is to observe and quantify the molecular events of this mechanism with the improved microscopic resolution. These new insights into the interaction of viral and human proteins will supply important information on the mode of operation of the HI virus. They will help us understand how diseases develop and deliver accurate diagnoses at the molecular level and the chance for high-precision drug therapies. ●

PROF. DR DIRK-PETER HERTEN is a chemist and has been heading an independent research group in the field of physical chemistry within the 'Cellular Networks' cluster since 2007. In February 2015, he accepted a starting professorship in physical chemistry at Heidelberg University. His work group focuses on developing microscopy techniques and switchable fluorescent probes, and on applying single molecule techniques to the examination of chemical reactions and the observation of cellular processes in living cells. Prof. Herten has been coordinating the joint BMBF-funded project 'Switch-Click Microscopy' since October 2013.

Contact: dirk-peter.herten@urz.uni-hd.de

PROF. DR OLIVER TILL FACKLER has been heading the 'Integrative Virology' section of Heidelberg University Hospital's Department of Infectious Diseases since 2013. After completing a three-year research stay at the University of California in San Francisco, the biologist established an Emmy Noether junior research group at the university hospital in 2001. In 2007 he accepted a professorship in Heidelberg. Prof. Fackler's research interests are cellular biology, immunology and the pathogenesis of HIV infection.

Contact: oliver.fackler@med.uni-heidelberg.de

**“Improved microscopy techniques allow us to detect individual molecules in living cells. For the first time, we can observe pathological changes directly at the molecular level.”**

in biologischen Materialien vorkommen (etwa Calcium oder Natrium), oder reversible intramolekulare Reaktionen. Zur Kontrolle der Sonden in der Bildgebung wird die Konzentration der Analytmoleküle so eingestellt, dass die meisten Fluoreszenzmarker sich im „Aus“-Zustand befinden. Die Analytmoleküle bewegen sich durch freie Diffusion in der Probe: Sie können so mit den verschiedenen Markern in Wechselwirkung treten und sie an- beziehungsweise ausschalten. Die Fluoreszenzanregung kann damit also unabhängig vom Schalten für die Bildgebung optimiert werden und hat die Chance, eine höhere Präzision zu erreichen. Das Resultat ist eine Einzelmolekül-basierte hochauflösende Mikroskopie-Methode, für die Fluoreszenzmarker eingesetzt werden, die sich durch die Zugabe bestimmter Reagenzien kontrollieren lassen.

Mit der Entwicklung derartiger Fluoreszenzmarker, die durch reversible chemische Reaktionen kontrolliert werden und selbstständig ihre Fluoreszenzaktivität schalten, verfolgen wir einen neuen Ansatz der Einzelmolekül-basierten Hochauflösungs-Mikroskopie. Zurzeit versuchen wir, die neuen Sonden im Bereich der HIV-Forschung zu implementieren. Unser Ziel dabei ist es – wie oben beschrieben –, die molekularen Ereignisse, über die das HI-Virus Signalübertragungs-Wege in der Zelle manipuliert, mit verbesserter mikroskopischer Auflösung zu beobachten und quantitativ zu erfassen. Diese neuartigen Einblicke in die Interaktionen viraler und menschlicher Proteine werden wichtige Erkenntnisse über die Arbeitsweise des HI-Virus liefern und versprechen neue Ansatzpunkte für Medikamente. ●

**„Neue Sonden machen eine noch bessere Mikroskopie möglich. Sie werden derzeit in der HIV-Forschung erprobt und versprechen molekulare Ansatzpunkte für zielgerichtet wirkende Medikamente.“**