

BILDGEBUNG Mit einem speziellen Mikroskopierverfahren können Forscher neuronale Verschaltungen exakt nachverfolgen. Das Besondere daran: Die Nervenzellen selbst bleiben im Dunkeln.

Schattenriss des Gehirns

VON VALENTIN NÄGERL

Das menschliche Gehirn ist wohl eines der rätselhaftesten biologischen Gebilde, das man sich vorstellen kann; eine Art Supercomputer und Riesensbibliothek in einem, dazu in der Lage, sich selbst und seine Umwelt aktiv zu erforschen und zu manipulieren. In einem Volumen von lediglich eineinhalb Litern beherbergt es rund 80 Milliarden Nervenzellen vielfältigster Art, deren weit verzweigte Fortsätze – Dendriten und Axone – zusammen genommen mehrere hunderttausend Kilometer lang sind. Dazu kommen noch einmal so viele Gliazellen, die dem Nervensystem unter anderem als Stützgerüst, Isoliermaterial, Nährstofftransporter und Schutzschild dienen.

Jede einzelne Nervenzelle bildet tausende spezialisierte Kontaktstellen zu anderen Zellen, so genannte Synapsen, über die sie elektrische Signale in Sekundenbruchteilen austauschen kann. Stellt man sich das Gehirn als Erdkugel vor und die Neurone als Menschen, würde sie zehnmahl mehr Einwohner beherbergen als

unsere Welt, und jeder würde pausenlos hunderte Telefonate gleichzeitig führen.

Von einem lückenlosen Verständnis unseres Denkgorgans sind wir noch Lichtjahre entfernt. Und solange wir nicht in der Lage sind, die Aktivität aller Nervenzellen zu messen, geschweige denn alle Hirnfunktionen in einem Computer nachzubilden, gilt in den Neurowissenschaften die allgemeine Devise: Wenn wir die komplexe Funktion nicht verstehen können, sollten wir wenigstens versuchen, die zu Grunde liegende Struktur aufzuklären.

Deshalb haben sich zahlreiche Neurowissenschaftler in Forschungsverbänden wie der »BRAIN Initiative« und dem »Human Brain Project« zusammengetan, um die neuroanatomische Architektur des Gehirns möglichst genau in einer Art Landkarte abzubilden. Sie soll detailliert aufzeigen, wie und wo benachbarte Neurone und entfernte Hirnareale miteinander verbunden sind und wie sie zusammenarbeiten.

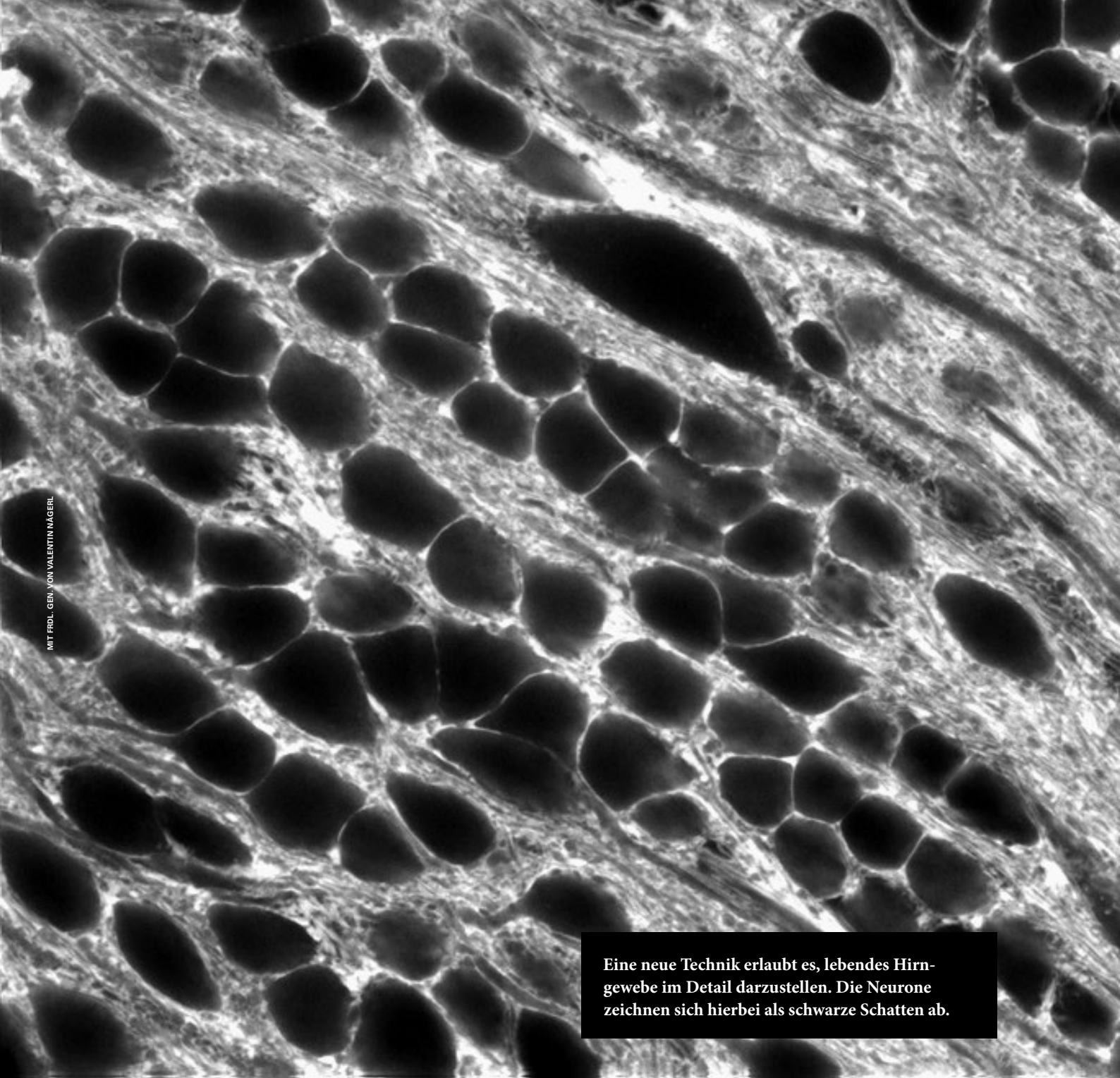
Von diesem »Konnektom« (der Begriff ist angelehnt an das »Genom« der verschlüsselten Erbinformationen) erhoffen sich die Forscher Einblicke in die tiefere Logik der neuronalen Schaltkreise. Letztlich soll es ihnen dabei helfen, die neurobiologischen Prozesse zu ergründen, auf denen unser Denken, Fühlen und Handeln, aber auch krankhafte Hirnveränderungen beruhen.

Doch selbst dieses vergleichsweise bescheidene Ziel ist längst nicht so nah, wie es auf den ersten Blick erscheinen mag. Denn die Bausteine des Gehirns sind auf komplizierte Art und Weise miteinander verschaltet



UNSER EXPERTE

Valentin Nägerl ist Professor für Neurowissenschaften und Bildgebungsverfahren an der Universität de Bordeaux in Frankreich.



MIT FROL. GEN. VON VALENTIN NÄGERL

Eine neue Technik erlaubt es, lebendes Hirngewebe im Detail darzustellen. Die Neurone zeichnen sich hierbei als schwarze Schatten ab.

Die Gehirn&Geist-Serie

»Neue Methoden der Hirnforschung« im Überblick:

Das Handwerkszeug von Neurowissenschaftlern hat sich in den letzten Jahrzehnten drastisch gewandelt. In einer 6-teiligen Serie stellen wir die innovativsten Methoden vor.

Teil 1: Per Tollwut ins Gehirn (Gehirn&Geist 4/2019)

Teil 2: Ein Strichcode für Neurone (Gehirn&Geist 5/2019)

Teil 3: Nervenzellen auf den Puls gefühlt (Gehirn&Geist 6/2019)

Teil 4: Monster-Scanner in Aktion (Gehirn&Geist 7/2019)

Teil 5: Schattenriss des Gehirns (dieses Heft)

Teil 6: Tiermodelle in den Neurowissenschaften – an der Realität vorbei? (Gehirn&Geist 9/2019)

Auf einen Blick: Nervengewebe in negativ

1 Wollten Forscher das Dickicht aus Nervenzellen im Gehirn kartieren, taten sie das bisher meist per Elektronenmikroskopie. Diese offenbart zwar kleinste Details, jedoch wird das Gewebe durch die Präparation abgetötet.

2 Ein neues Verfahren ermöglicht es nun, auch lebende Neurone in allen Feinheiten abzubilden: das Super-Resolution Shadow Imaging (SUSHI). Es basiert auf einer hochauflösenden Form der Lichtmikroskopie.

3 Hierbei werden nicht einzelne Nervenzellen angefärbt, wie das bei der herkömmlichen Fluoreszenzmikroskopie der Fall ist, sondern der Raum dazwischen. So entstehen kontrastreiche Negativ-aufnahmen des Gewebes.

und lassen sich in verschiedenen Maßstäben betrachten. So drängen sich in einem tausendstel Kubikmillimeter »Neuropil«, dem Dickicht aus Nervenfasern und Gliazell-Filamenten zwischen den Zellkörpern des Zentralnervensystems, im Schnitt mehr als hunderttausend Synapsen mit den unterschiedlichsten Eigenschaften. Am oberen Ende der räumlichen Skala befinden sich die langen Nervenfaserbündel der Neurone, die sich als dicke Datenkabel zu entfernten Hirnarealen und anderen Organen im Körper erstrecken. Motoneurone im Rückenmark etwa können mehr als einen Meter lang sein. Dieses enorme Größenspektrum mit Hilfe neurowissenschaftlicher Bildgebungsverfahren abzubilden, ist eine große Herausforderung.

Zudem ist das Hirngewebe sehr weich und empfindlich – im Gegensatz etwa zur Haut oder zu den Knochen. Wollen Forscher winzige Details unter dem Mikroskop betrachten, müssen sie das Gewebe in der Regel zuvor chemisch fixieren, was wiederum die Untersuchung von lebenden Zellen ausschließt.

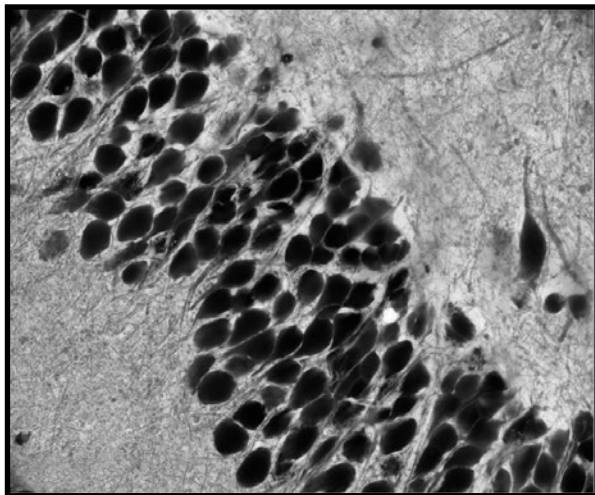
Und schließlich ist das Gehirn nicht fest verdrahtet wie die Elektroinstallation eines Hauses, sondern äußerst dynamisch und formbar. Gerade während der frühen Hirnentwicklung vermehren sich die Nervenzellen

explosionsartig und wachsen in ihre Zielregionen aus. Im Kindes- und Jugendalter baut sich das Synapsennetzwerk erneut um, angetrieben durch ein genetisches Programm sowie durch verschiedene Umweltfaktoren. Im Erwachsenenalter beruhigt sich die Lage zwar deutlich, aber auch hier finden immer wieder kleine Veränderungen statt.

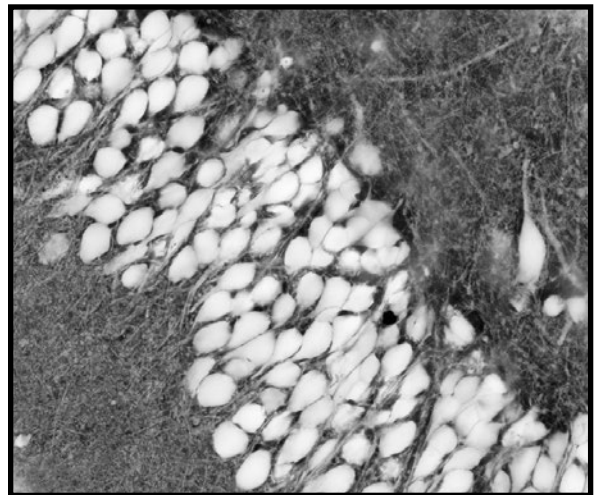
Wie jüngste Studien an erwachsenen Mäusen zeigten, wird beispielsweise ein Großteil der Synapsen im Hippocampus, einem wichtigen Gedächtnisareal, andauernd auf- und umgebaut. Diese so genannte morphologische Plastizität stellt eine Kerneigenschaft des Gehirns dar. Sie erlaubt es uns, unser Handeln ständig an neue Umstände anzupassen, Fertigkeiten zu lernen und Ereignisse in unserem Gedächtnis abzuspeichern.

Bilder vom neuronalen Kabelsalat

Wegen dieser kniffligen Eigenschaften der Hirnarchitektur ist es äußerst schwierig, das Durcheinander der neurozellulären Strukturen naturgetreu nachzuzeichnen. Deshalb suchen Forscher nach immer neuen Bildgebungsverfahren, die ausreichend Bildkontrast, Auflösung und Tiefenschärfe bieten. Dabei ist das Mikroskopieren nicht die einzige Herausforderung, schließlich



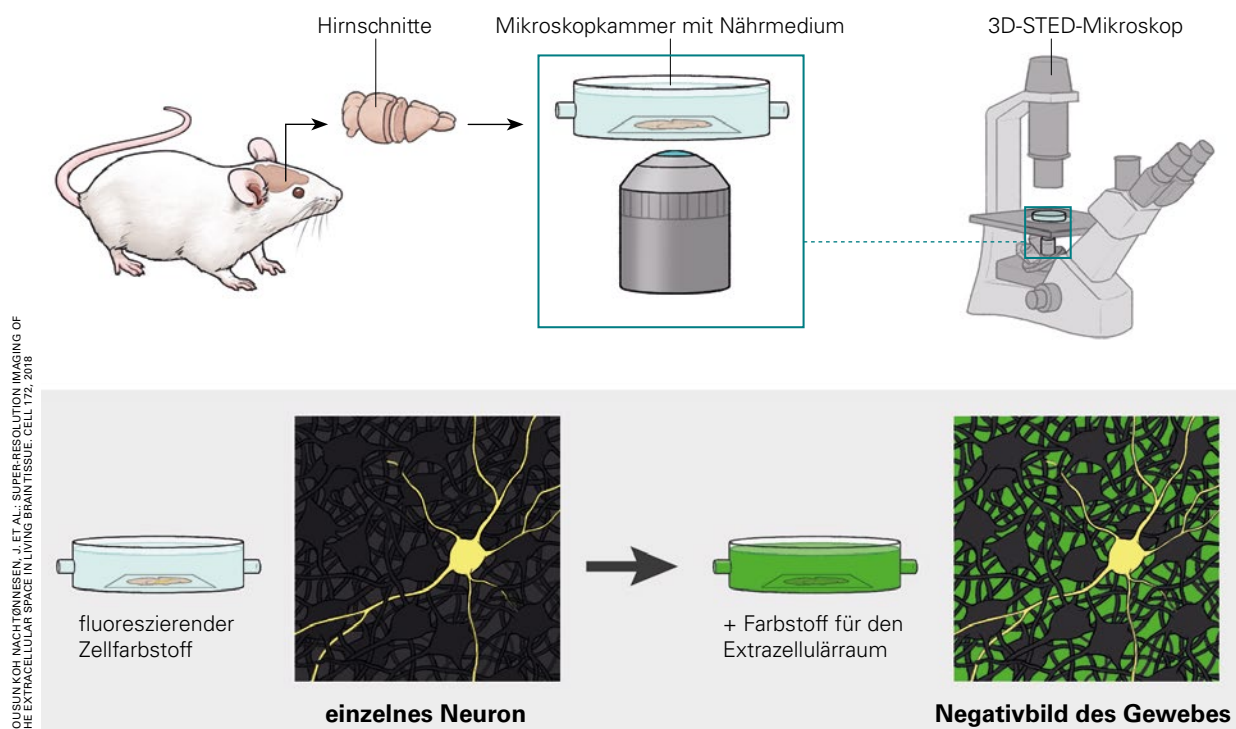
MIT FROL. GEN. VON VALENTIN NÄGERL



MIT FROL. GEN. VON VALENTIN NÄGERL

Bei der SUSHI-Technik werden nicht die Neurone selbst angefärbt, sondern die Zellzwischenräume. Das ergibt kontrastreiche Negativ-aufnahmen des Hirngewebes (links). Um sie optisch plastischer erscheinen zu lassen, wandelt ein Computerprogramm die Bilder anschließend in Positivbilder um (rechts).

So funktioniert SUSHI



Beim Super-Resolution Shadow Imaging (kurz: SUSHI) bilden Forscher lebendes Hirngewebe im Detail ab. Dazu schneiden sie Teile eines Mäusegehirns in Scheiben und legen diese in ein Nährmedium, worin die Zellen eine gewisse Zeit weiterleben. In einer speziellen Kammer eines hochauflösenden Mikroskops (3D-STED-Mikroskop) können die Forscher das Gewebe dann

stark vergrößert betrachten. Um zu erkennen, wie bestimmte Neurone in das Zellnetzwerk eingebettet sind, markiert man diese zuerst mit einem Fluoreszenzfarbstoff und gibt anschließend eine Substanz hinzu, die den Raum zwischen den Zellen einfärbt. So kombinieren Forscher ein Positivbild von einzelnen Neuronen mit einem Negativbild des übrigen Gewebes.

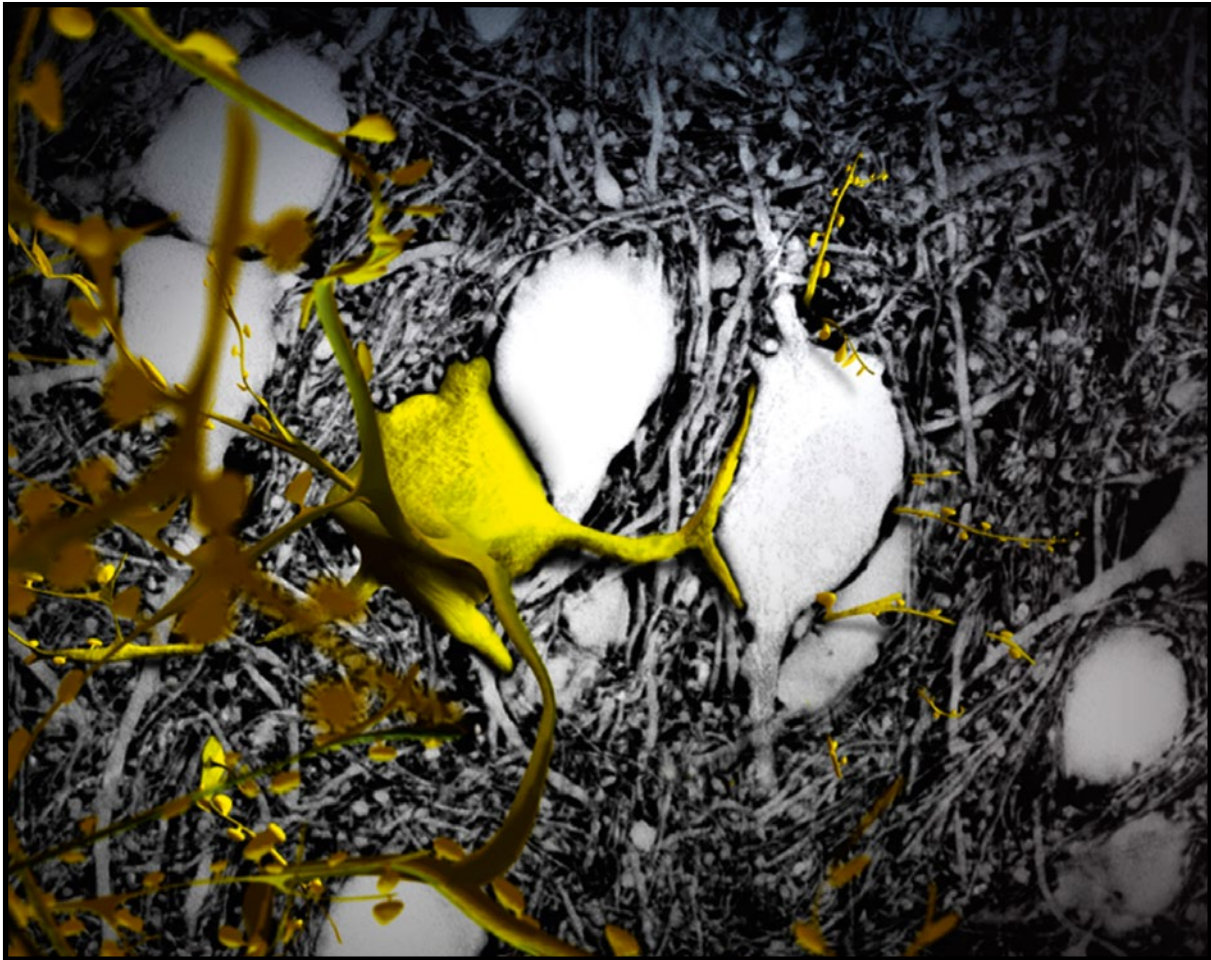
müssen die riesigen Datensätze auch ausgewertet und sinnvoll dargestellt werden, damit wir schlau aus ihnen werden (siehe »Im Dschungel der Neurone«, Gehirn&Geist 12/2016, S. 54).

Zwei wichtige Bildgebungsmethoden haben die neurowissenschaftliche Forschung bereits weit vorangebracht: die Diffusions-Tensor-Bildgebung (DTI) und die Elektronenmikroskopie. Allerdings haben beide Verfahren Nachteile, die den weiteren Fortschritt bedeutend einschränken.

Ersteres basiert auf der Kernspintomografie und macht den Verlauf großer Nervenfasern in der weißen Substanz des Gehirns sichtbar. Die räumliche Auflösung ist jedoch äußerst gering; sie liegt im besten Fall bei einem zehntel Millimeter (100 Mikrometern). Zum Vergleich: Das gesamte Sichtfeld eines hochauflösenden Lichtmikroskops ist maximal 100 Mikrometer

groß, also so groß wie gerade einmal ein DTI-Bildpunkt. Einzelne Zellen lassen sich mit dem Verfahren daher nicht darstellen.

Die Elektronenmikroskopie hingegen vermag zelluläre Strukturen von wenigen Nanometern Größe abzubilden, etwa Zellmembranen und den synaptischen Spalt. Wegen ihrer hohen Auflösung stellt die Technik deshalb den Goldstandard für die Rekonstruktion neuronaler Schaltkreise dar. Doch auch sie hat ein großes Manko: Das Gewebe muss für die Aufnahmen in hauchdünne Scheibchen geschnitten werden, was nur funktioniert, wenn es zuvor chemisch fixiert wurde. Das ist erstens sehr arbeitsintensiv und bedeutet zweitens, dass es tot ist. Es ist daher nicht möglich, mit dem Elektronenmikroskop Bewegungen und Veränderungen im Zeitverlauf anzusehen. Man erhält also immer nur statische Schnappschüsse.



Um ein spezielles Neuron im Zellverbund zu untersuchen, färben Forscher es mit einem Fluoreszenzmarker (hier gelb) ein und markieren zusätzlich den Extrazellulärraum mit einem Farbstoff, der nicht in die Zellen eindringt. So entsteht neben dem 3-D-Bild eines einzelnen gelb leuchtenden Neurons eine Negativaufnahme der Gewebestruktur, die sich per Computer in ein kontrastreiches Positivbild mit leuchtend weißen Zellen und schwarzen Zwischenräumen umwandeln lässt. Legt man die beiden Aufnahmen übereinander, sieht man, wie die Fortsätze der gefärbten Nervenzelle verlaufen.

Die Fluoreszenzmikroskopie, eine Variante der Lichtmikroskopie, wiederum erlaubt es, auch Details in lebenden Zellen zu beobachten. Bei der so genannten transgenen Markierung etwa programmieren Forscher einen Modellorganismus (häufig Mäuse, Zebrafische, Fruchtfliegen oder Würmer) gentechnisch so um, dass dessen Zellen fluoreszierende Proteine produzieren, die bei entsprechender Lichtanregung unter dem Mikroskop zu leuchten beginnen. Diese Methode wurde 2008 mit dem Nobelpreis für Chemie ausgezeichnet. Allerdings hat sie den entscheidenden Nachteil, dass man nur sieht, was man zuvor selektiv markiert hat. Alles andere bleibt zwangsläufig im Dunkeln. Würde man alle Zellen zugleich anfärben, sähe man im Mikroskop jedoch auch nichts, weil alles hell fluoreszieren und jegliche Details überstrahlen würde.

In meiner Arbeitsgruppe an der Université de Bordeaux haben wir deshalb den buchstäblich umgekehrten Weg eingeschlagen. Anstatt die einzelnen Zellen im Gewebe zu markieren, färben wir einfach die Bereiche dazwischen – den Extrazellulärraum. Er macht etwa 20 Prozent des Hirnvolumens aus und enthält Zerebrospinalflüssigkeit sowie die extrazelluläre Matrix aus Makromolekülen und Biopolymeren, die für eine gesunde Struktur und Funktion des Gehirns essenziell sind.

Wie bei einem Schattenriss, wo ein angestrahelter Gegenstand einen markanten Schatten auf die Leinwand wirft, werden bei unserem Verfahren alle Zellen als scharfe Silhouetten sichtbar. Wegen dieser Ähnlichkeit taufen wir die neue Technik »Super-Resolution Shadow Imaging« (deutsch: hochauflösende Schattenbildgebung), kurz SUSHI. Um echte Schatten handelt

es sich natürlich nicht, sondern eher um eine Art Negativbild.

Da die Bereiche zwischen den Hirnzellen viel kleiner sind als der von den Zellen eingenommene Raum, entsteht durch die Färbung ein sehr hoher Bildkontrast. Unsere neue Methode macht es daher erstmals möglich, lebendes Hirngewebe in einer Art Panoramaansicht, aber dennoch sehr detailliert abzubilden.

Wir schneiden dafür lebendes Hirngewebe von Mäusen in dünne Scheibchen und legen es in ein Nährmedium, worin es mehrere Stunden oder sogar Wochen überleben kann. Die neuronalen Schaltkreise inklusive Synapsen bleiben dabei weitestgehend erhalten. Dann geben wir einen ungiftigen Farbstoff zu den Schnitten, der sich in der Flüssigkeit auflöst und im Extrazellulärraum verteilt, ohne von den Zellen aufgenommen zu werden.

Freie Sicht auf winzige Details

Um hinreichend scharfe Bilder zu erhalten, konstruierten wir ein spezielles Fluoreszenzmikroskop. Es basiert auf der STED-Technik (kurz für: stimulated emission depletion), die 2014 mit dem Nobelpreis ausgezeichnet wurde. Das Besondere daran: Die räumliche Auflösung ist nicht, wie bei herkömmlichen Lichtmik-

roskopen, durch die Beugung von Lichtwellen begrenzt. So lassen sich mit STED dreidimensionale Bildpunkte mit einem Volumen von weniger als einem Attoliter (0,000000000000001 Millilitern) unterscheiden. Das ist nämlich nötig, um die Feinstruktur des Extrazellulärraums korrekt abzubilden.

Obwohl die SUSHI-Färbemethode im Gegensatz zu den gängigen Verfahren völlig unspezifisch ist, ermöglicht sie es, einzelne Hirnzellen klar voneinander abzugrenzen und verschiedene Zelltypen anhand ihrer äußeren Form zu unterscheiden. Denn die Negativfärbung offenbart auch feinste neuronale Strukturen wie zum Beispiel Axone, Dendriten und so genannte Dendritenfortsätze (englisch: dendritic spines), die den postsynaptischen Teil von erregenden Synapsen bilden.

Bei genauer Betrachtung sieht man auf den Bildern sogar synaptische Spalte, die nur etwa 20 Nanometer breiten Zwischenräume zwischen Prä- und Postsynapse (siehe Bild S. 62). Bisher waren diese Strukturen ausschließlich per Elektronenmikroskopie darstellbar. Verglichen mit der normalen Lichtmikroskopie hat SUSHI nicht nur eine höhere Auflösung, sondern auch wesentlich günstigere Kontrastbedingungen. So ist etwa der synaptische Spalt im Original-Negativbild als heller Streifen zwischen zwei stockdunklen Strukturen einge-

UNSERE SONDERHEFTE



Die lustigsten G&G-Kolumnen • Warum lachen gesund ist • Interview: Glücklich in der zweiten Hälfte • Was Komik im Kopf bewirkt • 10 Jahre HUMOR HILFT HEILEN: Anstiftung zum Lachen • Lob der Freundschaft • € 8,90

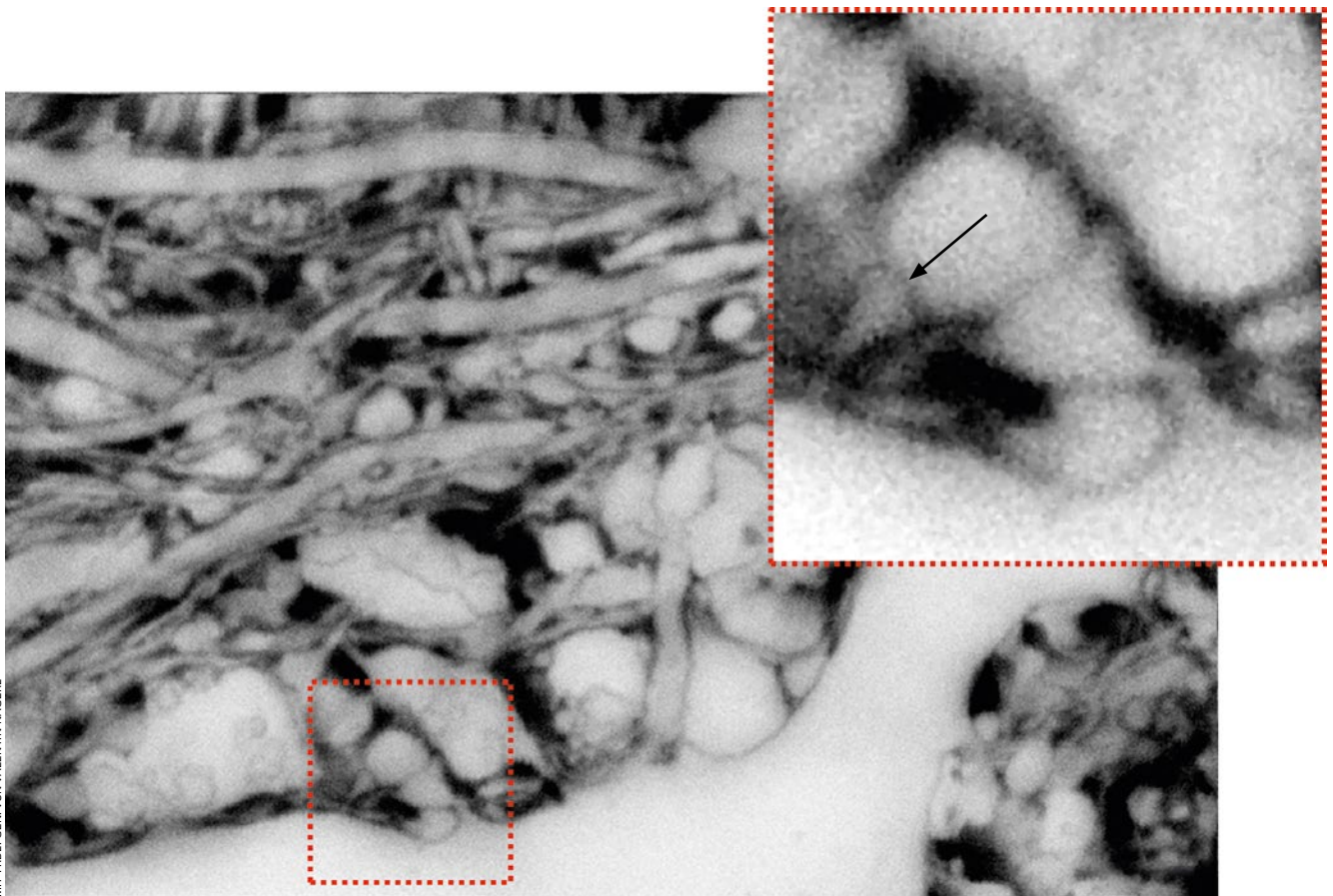


Amputation: Das Bein des Habsburgers • Magie: Heilen mit Amulett und Astrologie • Sexualität: Vom Arzt empfohlen, von der Kirche geduldet • Klostermedizin: Von Monte Cassino nach Bingen • Heilberufe: Doctores, Bader, Scharlatane • € 8,90



Stressreaktion: Hirn unter Druck • Widerstandskraft: Was die Psyche wachsen lässt • Selbstmitgefühl: Sich selbst ein Freund sein • Erholung: Bäume helfen gegen Stress • Psychomotorik: Kau dich fit? • € 5,90

Weitere Sonderhefte und Bestellmöglichkeit: www.spektrum.de/shop



Die SUSHI-Technik erlaubt es sogar, den synaptischen Spalt zwischen der Prä- und der Postsynapse darzustellen (Pfeil). Er ist nur etwa 20 Nanometer breit und war bislang ausschließlich im Elektronenmikroskop erkennbar. Hier wurde die Negativaufnahme in ein Positivbild konvertiert.

keilt. Im umgekehrten Fall, also bei hell fluoreszierenden Zellen, die einen dunklen Spalt umgeben, wäre dieser deutlich schlechter zu erkennen. Das veranschaulicht folgendes Beispiel: Stellen Sie sich vor, Sie sollen winzige Risse in zwei großen Scheiben finden, die Sie vor die Sonne halten. Die eine ist aus Milchglas, die andere aus lichtundurchlässigem, schwarzem Kunststoff. Wo finden Sie das Leck schneller? Vermutlich in der schwarzen Platte, denn der Riss würde darin hell leuchten!

Zudem können wir das Verfahren mit regulärer »positiver« Färbung kombinieren. Dazu markieren wir sowohl den Extrazellulärraum mittels SUSHI als auch einzelne Neurone mit herkömmlichen Fluoreszenzfarbstoffen. So sehen wir, wie bestimmte Nervenzellen in das sie umgebende Gewebe eingebettet sind (siehe Bild S. 60).

Wichtiger Schauplatz zwischen den Zellen

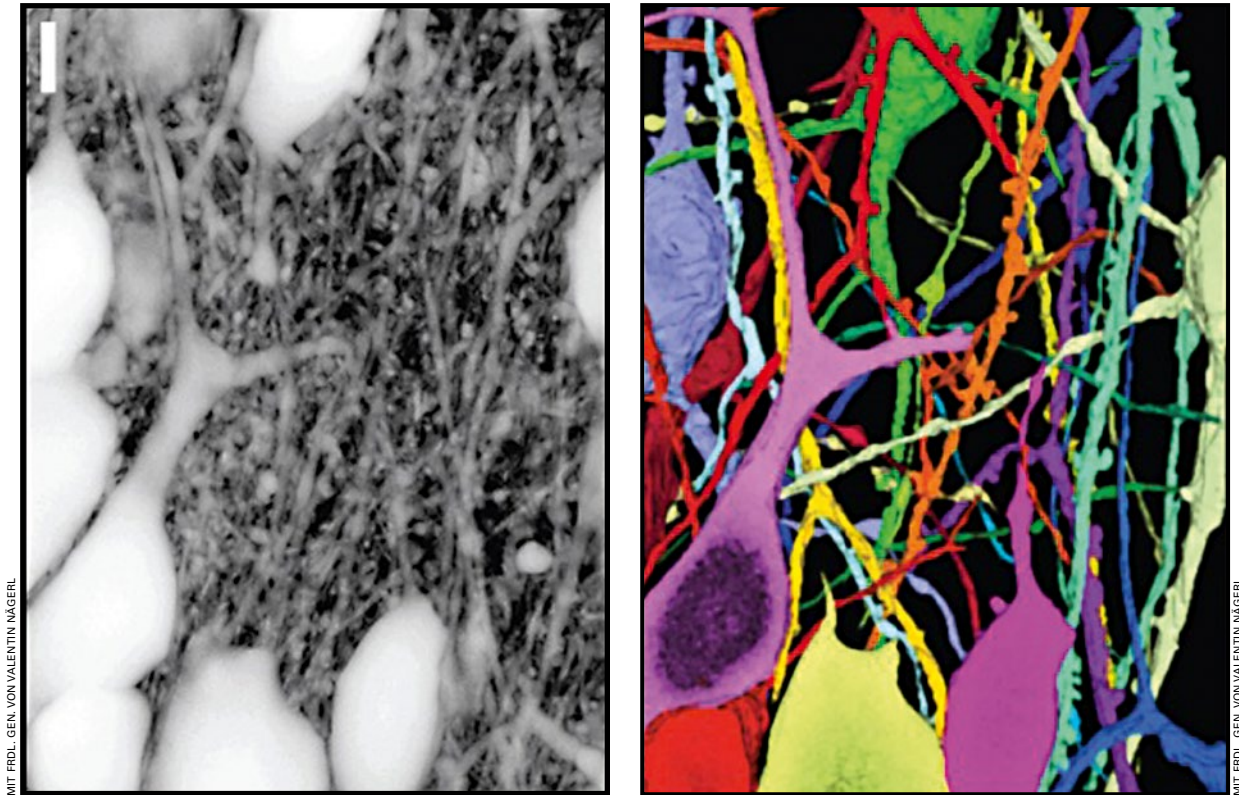
Unsere neue Bildgebungsmethode macht nicht nur zelluläre Strukturen sichtbar, sondern offenbart auch besondere Eigenschaften des Extrazellulärraums. Je nach Hirnaktivität und Bewusstseinszustand sowie im Verlauf von Hirnerkrankungen kann er sich stark verändern. Als Speicher von Ionen beeinflusst er zum Bei-

spiel maßgeblich die elektrische Erregbarkeit und Signalverarbeitung der Neurone.

Er bildet außerdem einen Korridor für den Transport von Substanzen innerhalb des Gehirns. Das sind unter anderem die Neurotransmitter, die durch den synaptischen Spalt wandern, sowie Abfallstoffe, die aus dem Gewebe herausbefördert werden. Der Extrazellulärraum ist auch die letzte Station für Arzneimittel, bevor sie in die Zellen eindringen oder an deren Oberflächen wirken. Sie gelangen entweder über die Blut-Hirn-Schranke oder durch direkte Injektion in die Hirnflüssigkeit und verteilen sich dann im Gewebe.

Bis vor Kurzem konnten Neurowissenschaftler diesen wichtigen Bereich des Gehirns nur mittels Elektronenmikroskopie oder Diffusions-Tensor-Bildgebung untersuchen. Doch die Methoden lieferten entweder ein sehr verzerrtes, statisches oder aber – mangels räumlicher Auflösung – ungenaues Bild. Durch die chemische Fixierung bei der Elektronenmikroskopie etwa schrumpft der Extrazellulärraum zu einer gleichförmig dünnen Schicht zusammen, die nichts mehr mit seiner ursprünglichen Form zu tun hat.

Mit der SUSHI-Bildgebung können Forscher nicht nur Hirnschnitte untersuchen. Sie eignet sich prinzi-



Mit Hilfe der neuen Mikroskopiertechnik können Forscher den neuronalen Schaltplan kleiner Hirnabschnitte entschlüsseln. Dieses Gewebestück aus dem Hippocampus einer Maus wurde zuerst mit einem hochauflösenden Mikroskop Schicht für Schicht gescannt. Dann rekonstruierte man die verschiedenen zellulären Bausteine des komplexen Netzwerks und färbte die einzelnen Neurone im Bild unterschiedlich ein (rechts).

piell auch für andere Gewebetypen, die für die klinische Forschung und Diagnostik interessant sind, wie zum Beispiel Tumore. Bisher hat sich die Technik an lebenden Proben in Nährlösung bewährt, so genannten Ex-vivo-Präparaten. In absehbarer Zukunft sollte sie aber auch in vivo, im lebenden Tier, anwendbar sein, in Kombination mit speziellen »Organfenstern«. Hierbei wird ein winziges Loch etwa in den Schädelknochen einer Maus gebohrt und von einem dünnen Glas überdeckt. Während das Tier durch seinen Käfig

läuft, können Forscher mit einem speziellen Mikroskop das hinter dem Fenster liegende Hirngewebe untersuchen.

Bahnbrechende neue Technologien, die das Konnektom des Gehirns strukturell und funktionell entschlüsseln, werden uns in den nächsten Jahren entscheidend dabei helfen, grundlegende Zusammenhänge in unserem Denkorgan aufzuklären – vom Molekül bis zum Verhalten. Nur so können wir dem großen Rätsel des Gehirns irgendwann auf die Schliche kommen. ★

QUELLEN

Hell, S. W.: Nanoscopy with focused light (Nobel Lecture).
Angewandte Chemie International Edition 54, 2015

Hrabetova, S. et al.: Unveiling the extracellular space of the brain: From super-resolved microstructure to in vivo function.
Journal of Neuroscience 38, 2018

Pfeiffer, T. et al.: Chronic 2P-STED imaging reveals high turnover of dendritic spines in the hippocampus in vivo. *Elife* 7, 2018

Tønnesen, J. et al.: Super-resolution imaging of the extracellular space in living brain tissue. *Cell* 172, 2018

Weitere Quellen im Internet: www.spektrum.de/artikel/1652260