

Molekulare Lichtblicke

Den Transport einzelner Proteine oder winzige Membranbläschen in lebenden Zellen, die Synapsen von Neuronen oder das Skelett von Tumorzellen in allen Details – das alles können STED-Mikroskope sichtbar machen. Die Technik erfunden hat **Stefan Hell**, Direktor an den **Max-Planck-Instituten für biophysikalische Chemie** in Göttingen und **für medizinische Forschung** in Heidelberg. Inzwischen vertreibt das Spin-off Abberior Instruments die Fluoreszenzmikroskope mit der besten Auflösung am Markt. Und immer wieder verschieben Forschende des Instituts und auch des Unternehmens die Grenzen des Sichtbaren.

TEXT **JANOSCH DEEG**

Die schwarze Box misst knapp anderthalb mal anderthalb Meter, Höhe vielleicht 40 Zentimeter. In der Regel erzählt eine Blackbox die Geschichte einer Katastrophe – nicht so in diesem Fall: Hier steht sie für ein erfolgreiches Produkt der physikalischen Forschung. In ihrem Innern befinden sich Laser, Linsen, Spiegel und etliche weitere Komponenten. Zusammen bilden sie das neueste Mikroskop der Firma Abberior Instruments. MINFLUX heißt es, wird demnächst weltweit verfügbar sein – und die Lichtmikroskopie noch einmal auf eine neue Stufe heben. Dabei haben schon die bisherigen Modelle der Firma neue Maßstäbe gesetzt: Sie sind rund zehnmal schärfer, als es Experten noch vor zwanzig Jahren für möglich hielten.

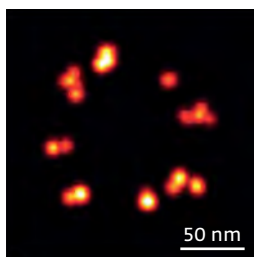
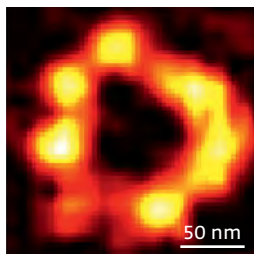
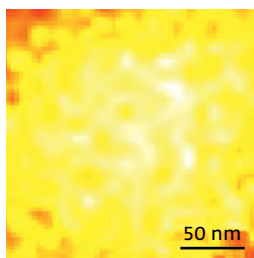
Erfunden hat die ultrascharfe Fluoreszenzmikroskopie einer der sieben Firmengründer. Und er wurde dafür sogar mit dem Nobelpreis ausgezeichnet. Mit seinen Arbeiten widerlegte er alle Experten, die meinten, in der Lichtmikroskopie sei schon im 20. Jahrhundert die Grenze des physikalisch Machbaren erreicht. Kein Wunder also, dass das Unternehmen beeindruckende Wachstumsraten zu verzeichnen hat. Und nun kommt MINFLUX, ein Lichtmikroskop, das in noch winzigere Dimensionen vordringen soll: in die der Moleküle. Aber der Reihe nach. Die Geschichte von Abberior Instruments beginnt – wenn man so will – mit einem Fehlschlag in den 1980er-Jahren.

Zu dieser Zeit sitzt in Heidelberg ein Physiker an seiner Doktorarbeit. Sein Name: Stefan Hell. Mit Laserrastermi-

Sprossendes Neuron: Mit einem solchen Wachstumskegel sucht das Axon einer Nervenzelle sein Ziel. In der Aufnahme mit einem STED-Mikroskop sind die feinen Fortsätze (grün), mit denen das rundliche Ende des Axons seine Umgebung abtastet, im Detail zu erkennen. Die roten und blauen Färbungen zeigen Proteine des Zellskeletts, die dem Wachstumskegel Struktur und Beweglichkeit verleihen.



Die Auflösungsdurchbrüche in der Fluoreszenzmikroskopie: Die von Stefan Hell und Mitarbeitern entwickelte STED-Mikroskopie (Mitte) erreichte bereits vor über zehn Jahren eine etwa zehnfach höhere Auflösung als die weitverbreitete Konfokal-Mikroskopie (oben). Mit MINIFLUX (unten) steigerten sie nun die Detailschärfe noch einmal um das Zehnfache – also auf insgesamt 100-fach und damit bis in den Bereich molekularer GröÙe.



roskopien inspiziert er Halbleiterchips bei der Firma Heidelberg Instruments. Das Unternehmen hat sein Doktorvater mit Kollegen erst kurz zuvor gegründet. Es geht bergauf, man holt sich zahlungskräftige Geldgeber ins Boot. Alles dreht sich um die neue Technik und zu wenig um den Kundenbedarf. Letztlich wird die Firma zerschlagen, die fast 100 Mitarbeiter werden teils entlassen oder von den Geldgebern auf Nachfolgeunternehmen verteilt. Stefan Hells Arbeit leidet darunter nicht mehr. Er hat seinen Dokortitel in der Tasche und ist bereit, in der Welt der Wissenschaft mitzumischen. Eine wichtige Erfahrung nimmt er allerdings mit: „Ich habe gesehen, was man bei einer Firmenausgründung besser nicht machen sollte“, erzählt der Forscher mit zufriedem Lächeln. „Man braucht Produkte, für die es schon Kunden gibt. Und man setzt nicht auf Geldgeber, die von der Sache wenig verstehen.“ Lässig lehnt er in seinem Stuhl in einem Besprechungszimmer von Abberior Instruments. Er weiß, er hat es besser gemacht.

Anfang der 1990er-Jahre arbeitet Hell als Nachwuchswissenschaftler in Finnland. Dort, im kalten Norden, verfolgt er eine heiÙe Spur: Was, wenn sich mittels eines quantenoptischen Effekts die Auflösungsgrenze von Lichtmikroskopen durchbrechen lieÙe? Ein kühner Gedanke. Denn die Auflösungsgrenze von Lichtmikroskopen war damals in Stein gemeißelt – und das seit 1873, als der Physiker Ernst Abbe das entsprechende Gesetz formulierte: Strukturen kleiner als die halbe Wellenlänge des sichtbaren Lichts kann ein Lichtmikroskop nicht darstellen. Wegen dieser Beugungsgrenze lassen sich lichtmikroskopisch nur Strukturen bis zu einer GröÙe von 200 Nanometern (nm) trennscharf abbilden, darunter geht es nicht. Das reicht, um einzelne Zellen und deren größere Bestandteile, etwa den Zell-

kern oder andere Organellen, zu sehen. Die molekulare Maschinerie der Zelle lässt sich so jedoch nicht erkennen. Heute kann die Elektronenmikroskopie zwar auf diese Ebene vordringen, doch nur dann, wenn man Zellen abtötet und aufwendig präpariert. Mit einem Gerät, wie es Hell im Sinn hatte, wäre das nicht nötig. Es wäre daher vor allem in der biomedizinischen Forschung sehr hilfreich.

Als Hell im Jahr 1997 Nachwuchsgruppenleiter am Max-Planck-Institut für biophysikalische Chemie in Göttingen wird, kann er ein Mikroskop nach seinen Vorstellungen bauen. Um die Jahrtausendwende ist es fertig – und löst am Ende sogar Details auf, die nur 20 bis 30 Nanometer klein sind. Die Technik ist seither als STED-Mikroskopie bekannt (siehe Kasten Seite 27).

STED GEWINNT DAS RENNEN UM DIE AUFLÖSUNG

Im Jahr 2004 sucht ein anderer Nachwuchsphysiker ein Thema für seine Doktorarbeit. Er ist beeindruckt von Hells Erfindung: „Ich war fasziniert, wie man damit ein physikalisches Gesetz umgehen kann“, sagt Gerald Donnert, heute Geschäftsführer von Abberior Instruments. 2004 kann er Stefan Hell, der mittlerweile Direktor am Max-Planck-Institut für biophysikalische Chemie ist und die Abteilung „Nano-Biophotonik“ leitet, überzeugen, ihn als Doktoranden anzunehmen.

Seinen Chef lernt der junge Wissenschaftler als sehr fokussiert und auch fordernd kennen. Das passt gut. Donnert ist ehrgeizig und motiviert. Er soll ein STED-Mikroskop mit der weltweit besten Auflösung bauen. „Das war eine extrem spannende Zeit“, erinnert er sich. Denn 2006 kam in den USA noch eine andere hochauflösende Form der Fluoreszenzmikroskopie auf. Ein bisschen sei es wie ein Wettrennen auf höchstem Niveau gewesen: „Wer hat

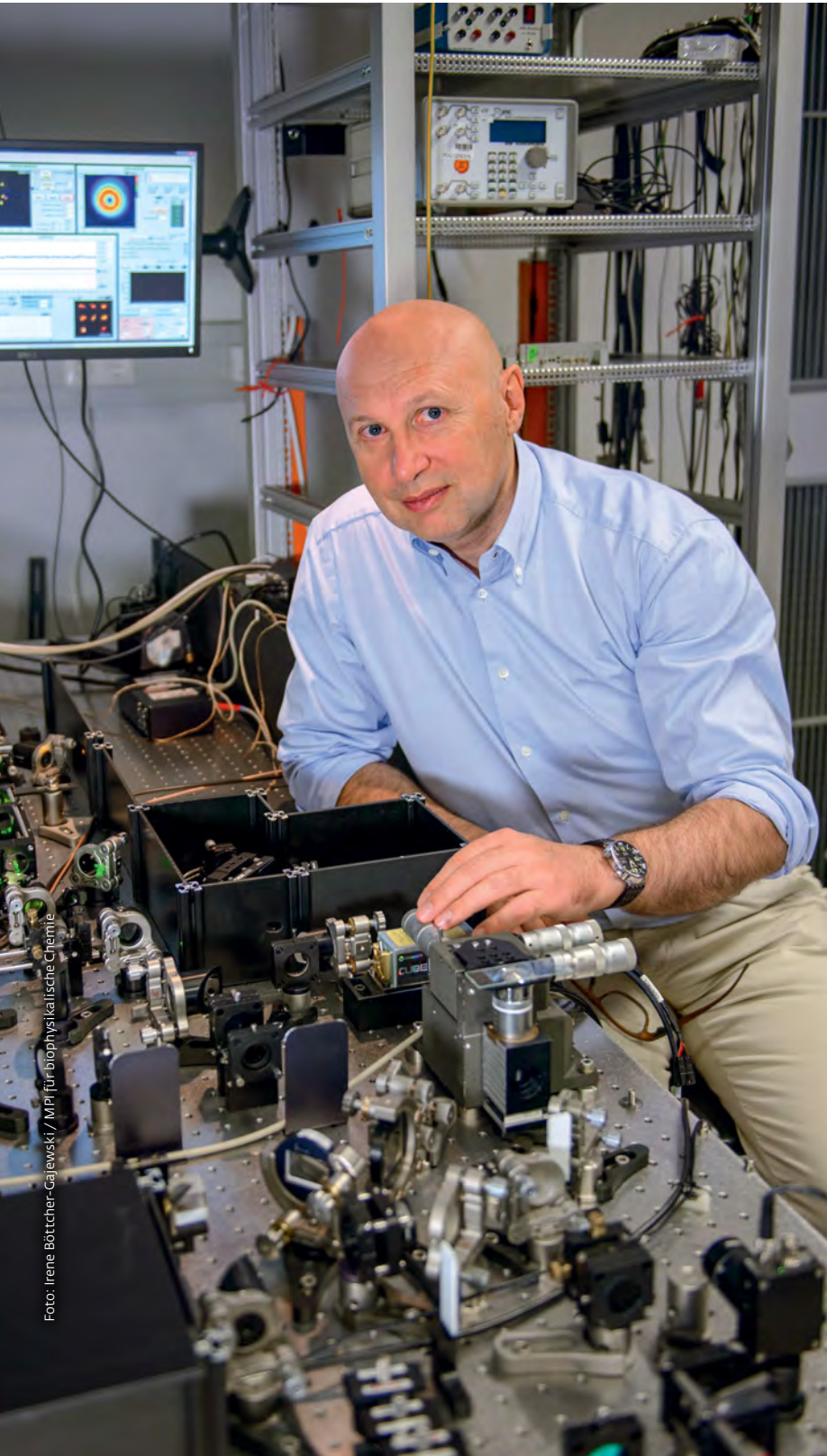


Foto: Irene Böttcher-Gajewski / MPI für biophysikalische Chemie

STED

Die hochauflösende Fluoreszenzmikroskopie STED steht für „Stimulated Emission Depletion“ und bezeichnet das gezielte, vorübergehende Ausschalten von winzigen fluoreszenten Farbstoffmolekülen. Generell markiert man bei der Fluoreszenzmikroskopie im Vorfeld die interessanten Bereiche der Probe – etwa bestimmte Strukturen einer Zelle – mit Fluoreszenzfarbstoffen. Diese beginnen zu leuchten, nachdem die Probe kurz mit Licht bestrahlt wurde. Allerdings lassen sich so zwei eng beieinanderliegende Farbmoleküle lediglich dann auseinanderhalten, wenn sich die ausgesendeten Fluoreszenzlichtwellen nicht zu stark überlappen. Die Auflösung ist aus diesem Grund bestenfalls auf rund 200 Nanometer (nm) beschränkt.

Der entscheidende Trick bei STED: Man stellt sicher, dass eng beieinanderliegende Fluoreszenzmoleküle nicht gleichzeitig leuchten. Dazu knipst ein donutförmiger Laserstrahl einen Teil der Moleküle aus. Es leuchten nur noch die Moleküle im Loch des Donutstrahls. Die ausgeknipsten Moleküle in der Nachbarschaft können die leuchtenden Moleküle nicht mehr stören. Durch Abrastern der Probe erhält man eine Fluoreszenzaufnahme mit einer Auflösung von 20 bis 100 Nanometern, je nach Einstellung.

Ein Ergebnis der Grundlagenforschung: Das erste STED-Mikroskop baute Stefan Hell am Max-Planck-Institut für biophysikalische Chemie.

die höchste Auflösung? Wessen Verfahren setzt sich durch?“ In weniger als drei Jahren beendet Donnert seine Doktorarbeit – in einem Fach wie Physik ist das ungewöhnlich schnell – und entscheidet mit seinem Mikroskop das Rennen für sich.

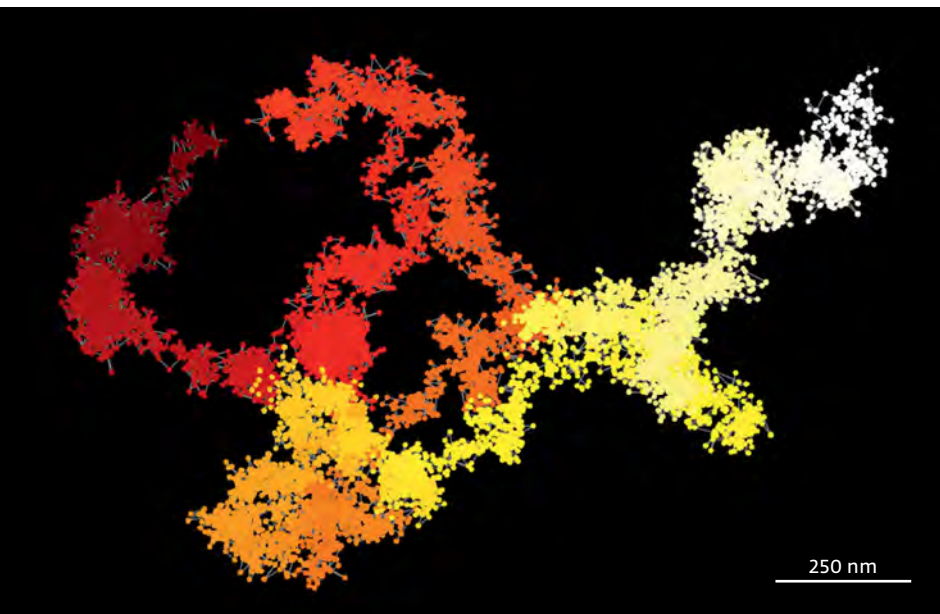
Die amerikanische National Academy of Sciences lädt ihn nach Washington ein und zeichnet seine Arbeit aus. Doch trotz dieses Erfolgs zieht es ihn erst einmal fort aus der Wissenschaft: „Ich wollte noch was anderes sehen.“ Als er von McKinsey & Company, einer Topadresse der Unternehmensberatung, ein Angebot erhält, kann Donnert nicht Nein sagen. Dort lernt er, wie die Wirtschaft funktioniert, und erkennt, dass man bereit sein muss, Risiken einzugehen, um erfolgreich zu sein. Unterdessen bleibt der Kontakt zu Hell bestehen. Das Gefühl, man könnte für die superscharfen Mikroskope einen weitaus größeren Markt finden, als die etablierten Mikroskophersteller glauben, teilen die beiden.

Denn in der Hoffnung, das Verfahren schnell zu verbreiten, hatte sich Hell zunächst mit einem namhaften Unternehmen zusammengetan, das die Patentlizenz für die STED-Mikroskopie erworben hatte. Aber die Geräte werden nicht so nachgefragt, wie er hofft. Auch die Idee, die STED-Mikroskopie über ein kleineres und flexibleres Joint Venture zu vermarkten – ein Vorschlag von Dieter Treichel, Start-up- und Portfolio-Manager bei Max-Planck-Innovation –, fruchtete nicht. „Große Unternehmen sind eher daran interessiert, ihre gut etablierten Produkte möglichst lange zu verkaufen“, sagt Treichel, „STED wurde als Sahnehäubchen gesehen und nicht als der neue Maßstab in der konfokalen Fluoreszenzmikroskopie. In dieser Situation war es sinnvoll, ein Start-up zu gründen, auch wenn man erst einmal keine eigenen Vertriebswege hatte.“

Gesagt, getan. Hell setzt sich also mit seinem ehemaligen Doktoranden Gerald Donnert zusammen, um die schärfsten Fluoreszenzmikroskope besser verfügbar zu machen. Dass Donnert bei McKinsey viel über Managementstrategien gelernt hat, ist jetzt unbezahlbar. Neben einem wasserdichten Businessplan ist aber für die beiden zunächst noch etwas anderes wichtig: „Der Erfolg der Firma steht und fällt mit den Leuten“, lautet ihre Devise. Insgesamt fünf weitere Personen mit unterschiedlichen Kompetenzen aus Physik, Chemie und Biologie holen sie als Gründer der Abberior Instruments GmbH mit an Bord. Alle haben bei Hell promoviert und wissen, dass sie als Team funktionieren. Alle kennen die STED-Technik von der Pike auf, und sie glauben an deren Potenzial. Hell, ihr ehemaliger Mentor, wird ihnen als Berater auch weiterhin zur Seite stehen.

Unterstützung bei der Gründung bekommt das Team von Max-Planck-Innovation. Besonders Dieter Treichel hilft dabei – sowohl am Anfang als auch

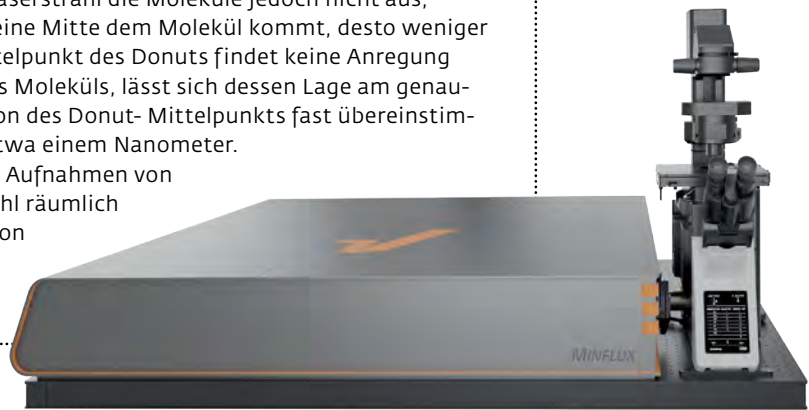
Spur eines in der Zellmembran diffundierenden Moleküls. Etwa 10 000-mal pro Sekunde wurde dessen Position mit 20 Nanometern (nm) Auflösung bestimmt.



MINFLUX

MINFLUX (von englisch „Minimal Fluorescence Flux“, minimaler Fluoreszenzfluss) ist gewissermaßen eine Kombination aus den Prinzipien von STED und jeweils einer anderen hochauflösenden Strategie, PALM oder STORM. Letztere schalten mit einem Lichtblitz in einem größeren Bereich der Probe zufällig einige wenige Moleküle an – gerade so viele, dass für zwei eng beieinanderliegende Farbstoffmoleküle die Wahrscheinlichkeit klein ist, gleichzeitig zu fluoreszieren. Computeralgorithmen rekonstruieren dann aus vielen Einzelbildern die Positionen der Fluorophore, vorausgesetzt, diese leuchten sehr hell. Doch dies ist oft nicht der Fall, sodass PALM und STORM in der Praxis selten eine bessere Auflösung als 20 bis 40 Nanometer liefern. MINFLUX schaltet die Moleküle ebenfalls vereinzelt an, zur endgültigen Positionsbestimmung tastet aber ein donutförmiger Laserstrahl die Farbstoffe ab. Im Gegensatz zu STED knipst der Donut-Laserstrahl die Moleküle jedoch nicht aus, sondern regt sie zum Leuchten an. Je näher seine Mitte dem Molekül kommt, desto weniger leuchtet dieses, denn im lichtschwachen Mittelpunkt des Donuts findet keine Anregung statt. Verschwindet das Fluoreszenzsignal des Moleküls, lässt sich dessen Lage am genauesten ermitteln, denn sie muss mit der Position des Donut- Mittelpunkts fast übereinstimmen. So ergibt sich eine Ortsauflösung von etwa einem Nanometer. Darüber hinaus erlaubt MINFLUX sehr präzise Aufnahmen von Molekülbahnen, weshalb jetzt erstmals sowohl räumlich als auch zeitlich hochaufgelöste Filme etwa von schnell diffundierenden Proteinen aus dem Inneren einer Zelle möglich sind.

Das MINFLUX-Mikroskop, das die STED-Technik mit einem anderen Mikroskopieverfahren kombiniert, ist die jüngste Entwicklung im Angebot von Abberior Instruments. Es ist das erste kommerzielle Mikroskop mit einer Auflösung von einem Nanometer.



ein paar Jahre später, als es um die Gründung einer Tochter in den USA geht. Bewusst verzichten die Jungunternehmer auf finanzielle Unterstützung von außen. Das Startkapital, insgesamt 200 000 Euro, stammt aus ihren eigenen Ersparnissen. Also keine externen Geldgeber, denn Hell will verhindern, was er bei Heidelberg Instruments erlebt hatte.

AB 2014 VON JAHR ZU JAHR FAST DOPPELT SO VIELE AUFTRÄGE

Im Jahr 2012 wird Abberior Instruments ins Handelsregister eingetragen. Zwei Aufträge sind mündlich bereits eingegangen – von „family and friends“, wie Hell die ersten Kunden scherzhaft

nennt: ausländische Forscherkollegen, die ihm persönlich bekannt sind und hochauflösende Mikroskope für ihre Forschung brauchen. Anfangs trifft sich das Team in der „Garage“ – so nennen sie den rund 25 Quadratmeter großen Raum, den sie im Erdgeschoss eines eher unscheinbaren dreistöckigen Gebäudes auf dem Campus der Universität Göttingen angemietet haben. Hier bauen die Forschenden die ersten Mikroskope. Die bieten den Kunden aus der Wissenschaft zwar mehr Möglichkeiten als etablierte Geräte, es sind allerdings noch keine STED-Mikroskope, weil die Patentlizenzen noch exklusiv bei dem großen Unternehmen liegen. Trotzdem, alles

läuft nach Plan. Ein Risiko bleibt jedoch: „Wenn ein Kunde ein bestelltes Mikroskop nicht bezahlt hätte, wären wir in große Schwierigkeiten geraten. Das Kapital steckte zunächst vollständig in den Geräten“, erinnert sich Donert. Doch die Kunden sind zufrieden – und sie begleichen ihre Rechnungen. Die junge Firma kann also weitere Geräte bauen und wachsen.

Der Erfolg spricht sich rum: Im Januar 2014 erhält Abberior Instruments den Innovationspreis der deutschen Wirtschaft in der Kategorie „Start-up“. Und im Frühjahr 2014 läuft die exklusive Patentlizenz des großen Unternehmens aus, sodass der Weg für Abberior Instruments frei ist, ebenfalls



Abberior Instruments hat weltweit die beste Entwicklungsmannschaft in der Laserrastermikroskopie“, sagt Stefan Hell.

STED-Mikroskope anzubieten. Und dann passiert, womit keiner zu diesem Zeitpunkt wirklich rechnet: Im Herbst 2014 erhält Stefan Hell den Nobelpreis für die Erfindung der STED-Mikroskopie. Laut Donnert stieg dadurch das Interesse an den Geräten deutlich: „Von nun an war das Wachstum beachtlich.“ Doch Hell widerspricht: „Der Nobelpreis hat die Entwicklung weniger beeinflusst, als man vermuten würde.“ Er glaubt, dass das eher an der Leistungsfähigkeit der Mikroskope, ihrem fairen Preis und dem kompetenten Service lag. „2014 hat sich der Preis für STED-Mikroskope dank Abberior Instruments als zweitem Anbieter nahezu halbiert. Das ist nicht nur gut für die Forschung und ihre Förderer, sondern auch für die Nachfrage. Und hat mit dem Nobelpreis nichts zu tun.“ Wie dem auch sei: Seit 2014 verdoppeln sich die Auftragszahlen nahezu von Jahr zu Jahr.

Das rasante Wachstum bedeutete auch, dass man räumlich erweitern musste: Aus dem einzelnen Raum wurde eine komplette Etage im selben Gebäude. Mehrere Büros, Labore, Werkstätten, Showroom, Besprechungszimmer, Pausenraum mit Kaffeemaschine und Kickertisch – was man eben so braucht für 40 Mitarbeiter und eine entspannte, kreative Arbeitsatmosphäre. Darüber hinaus gibt es mittlerweile drei zusätzliche kleinere Standorte: Heidelberg, Basel und Jupiter in Florida. Dort arbeiten zusammen weitere 20 Personen. Eine Pointe am Rande: Die Heidelberger Niederlassung ist zufällig in den-

selben Räumen untergebracht, in denen Hell ungefähr 30 Jahre vorher seine Doktorarbeit gemacht hat.

Einen ungewöhnlich großen Anteil am Personal machen die Angestellten der Abteilung „Research and Development“, die neue Methoden und Geräte entwickeln, aus. Und sie sind gut: „Abberior Instruments hat weltweit die beste Entwicklungsmannschaft in der Laserrastermikroskopie“, sagt Stefan Hell. Die Kunden würden das schätzen. Eine Erfahrung, die auch Donnert gemacht hat: „Wir werden als innovativstes Mikroskopieunternehmen wahrgenommen.“

ABBERIOR INSTRUMENTS VERLÄSST DIE START-UP-PHASE

Im Angebot hat Abberior Instruments für jeden Bedarf etwas: „Für diejenigen, die so schnell wie möglich gute und hochaufgelöste Bilder machen wollen, genauso wie für Experten, die das Maximale herausholen möchten“, erklärt Hell. Daher reicht die Produktpalette von sehr einfach zu bedienenden kompakten STED-Mikroskopen über leistungstärkere Modelle bis hin zu maßgeschneiderten Lösungen. Eine unabhängige Schwesterfirma namens Abberior vertreibt zudem die passenden Fluoreszenzfarbstoffe für die Mikroskope. Auch das ist Teil der Strategie: alles aus einer Hand, um die bestmöglichen Ergebnisse für die Forschung zu erzielen.

Das einzige Problem: Viele potenzielle Kunden kennen Abberior Instruments noch nicht. Vermehrt suchen die

Mitarbeiter daher den Kontakt zu möglichen Interessenten. Das machen sie nicht nur auf wissenschaftlichen Konferenzen, sie gehen vielmehr auch hier neue Wege: Im Jahr 2015 begaben sich einige Mitarbeiter für zwei Wochen auf Deutschlandtournee. In einem Container hatten sie ein STED-Mikroskop installiert und tingelten damit quer durchs Land. Jeden Tag eine andere Universität: aufbauen, Showtime, abbauen. „Die Leute waren ziemlich beeindruckt“, erzählt Donnert.

Um auch in den zwei großen Märkten USA und Asien besser aufgestellt zu sein, hat sich das Unternehmen mit zwei Branchenriesen zusammengetan: In den USA vertreibt seit 2019 die Firma Nikon das STED-Kompaktmodell von Abberior Instruments, und in China tut dies die Firma Zeiss. Die beiden großen Unternehmen hätten die Geräte auf „Herz und Nieren geprüft“ und waren sehr beeindruckt, berichtet Donnert nicht ohne Stolz. Spätestens seit der Zusammenarbeit mit solchen Platzhirschen hat Abberior Instruments die Start-up-Phase verlassen. Erstaunlich, wie schnell sich das Unternehmen innerhalb von sieben oder acht Jahren entwickelt habe, findet Hell. „Viele überschätzen, was sie in einem Jahr erreichen können, aber unterschätzen, wo sie in zehn Jahren stehen können“, zitiert er in diesem Kontext Bill Gates. „Auch dieser Firma ging es so.“

Dabei sind seit Gründung noch nicht einmal zehn Jahre vergangen. Alles deutet darauf hin, dass die Reise weiterhin steil nach oben geht. Der Markt



Ein Teil des Göttinger Teams um Geschäftsführer Gerald Donnert (vordere Reihe, Vierter von links). Insgesamt beschäftigt Abberior Instruments rund 60 Mitarbeiter, viele von ihnen entwickeln die Produkte ständig weiter.

für STED-Mikroskope entwickelt sich noch weiter, und da steht schon das nächste High-End-Produkt in den Startlöchern: MINFLUX wird dicht gepackte einzelne Moleküle in drei Dimensionen auflösen können (siehe Kasten Seite 29). Das schien vor nicht allzu langer Zeit undenkbar, und es wird insbesondere die biomedizinische Mikroskopie auf ein völlig neues Level heben. Auch in diesem Fall war es Hell, der die Idee für die Methode hatte. Schon im Jahr 2011 sicherte sich die Max-Planck-Gesellschaft die Patentrechte dafür. Ende 2016 folgte dann die erste wissenschaftliche Publikation zu MINFLUX. Abberior Instruments hat von der Max-Planck-Gesellschaft die Lizenzen erworben – mit dem Versprechen, aus dem physikalischen Konzept so schnell wie möglich ein Produkt zu entwickeln. Und tatsächlich: Nur gut drei Jahre später ist der Prototyp im schwarzen Kas-

ten so weit fortgeschritten, dass daraus ein von Biologen bedienbares Mikroskop geworden ist. „Das geht nur, weil Abberior Instruments ein feines und schlankes Unternehmen ist, bei dem alle, die über ein Produkt entscheiden, es auch im Detail verstehen. Und zwar von der Technik bis hin zur Anwen-

dung“, so Gerald Donnert. „Und weil alle Entscheider handverlesen und von keinem Geldgeber abhängig sind“, fügt Stefan Hell hinzu. Damit hat sich die Entscheidung, ein Start-up zu gründen, in dem außer den Wissenschaftlern niemand etwas zu sagen hat, einmal mehr als richtig erwiesen. ◀

GLOSSAR

Fluoreszenzmikroskopie: Bei dieser speziellen Variante der Lichtmikroskopie werden fluoreszierende Stoffe in einer Probe mit Licht zum Leuchten angeregt. Da das abgestrahlte Licht eine größere Wellenlänge aufweist als das Anregungslicht, lässt sich Letzteres herausfiltern. Auf dem Bild erscheinen dann nur die fluoreszierenden Strukturen. Einzelne Strukturen wie zum Beispiel der Zellkern lassen sich auch mit fluoreszierenden Farbstoffen als Markern versehen.

Konfokale Laserrastermikroskopie: Bei dieser Form der Mikroskopie wird die Probe nicht als Ganzes beleuchtet, sondern mit einem fokussierten Laserstrahl gescannt. Meistens regt der Laserstrahl geeignete Marker in der Probe zur Fluoreszenz an.