

## ■ Super genau lokalisiert

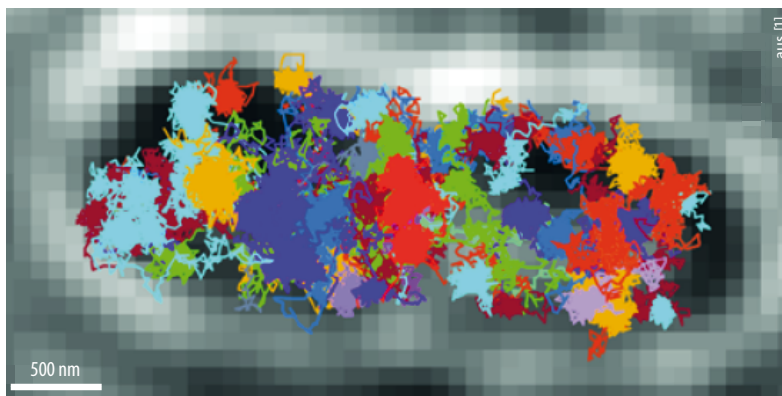
Eine neue Methode erlaubt es, Moleküle mittels weniger Photonen nanometergenau zu lokalisieren.

1) Grob abgeschätzt ist die Lokalisierungsgenauigkeit durch die Breite der Punktabbildungsfunktion geteilt durch die Wurzel der detektierten Photonen gegeben.

Lange Zeit ging es in der Entwicklung der Fluoreszenzmikroskopie darum, die Auflösung immer weiter zu verbessern. Für wichtige Durchbrüche erhielten Stefan W. Hell, Eric Betzig und William E. Moerner 2014 den Chemie-Nobelpreis. In den letzten Jahren sorgten vor allem neue Anwendungen und herausragende biologische Erkenntnisse mit Hilfe der hochauflösenden Fluoreszenzmikroskopie für Aufsehen.

Kürzlich präsentierten Physiker aus dem Labor von Stefan W. Hell in Kooperation mit den Gruppen von Fernando Stefani und Johan Elf eine neue Technik, mit der sich einzelne Moleküle mit weniger Photonen genauer lokalisieren lassen [1]. Bisher dominierten zwei konkurrierende Ansätze die „Superauflösungsmikroskopie“ – das „gezielte Schalten“ und das „stochastische Schalten“ [2]. Die neue Methode kombiniert Elemente beider Ansätze in origineller Weise.

In der Fluoreszenzmikroskopie werden die Zielstrukturen und Biomoleküle mit fluoreszierenden Farbstoffen modifiziert, um sie selektiv gegen den Hintergrund nicht-markierter Strukturen sichtbar zu machen. Diese fluoreszierenden Emitter, die näher bei-



Das Lichtmikroskopiebild eines *E. coli*-Bakteriums (schwarz-weiß) wurde mit 77 unabhängigen Trajektorien (bunt) ein-

einander liegen, als eine beugungsbegrenzte Optik abbilden kann, gilt es zu lokalisieren. Das geschieht z. B. dadurch, dass die Emission durch sättigbare optische Übergänge in einem konfokalen Aufbau auf einen Bereich eingeschränkt wird, der kleiner ist als die Auflösungsgrenze (RESOLFT) [2]. Durch einen Doughnut-förmigen STED-Laser (Stimulated Emission Depletion) werden alle Moleküle, die sich nicht in der Mitte des Doughnuts befinden, direkt nach der Anregung wieder in den Grundzustand überführt. Dadurch entsteht ein effektiv kleineres Detektionsvolumen. Ein Bild lässt sich Punkt für Punkt aufbauen, indem der verkleinerte Fokus durch die Probe gescannt

zelter 30S-Ribosom-Untereinheiten überlagert, die mit schaltbaren fluoreszierenden Proteinen markiert waren.

wird. Der Schlüssel ist dabei, dass die Position der Moleküle aus den Koordinaten des STED-Lasers folgt – mit einer Unsicherheit, die von der effektiven Fokusbreite herrührt.

Eine Alternative dazu ist das stochastische Schalten der Farbstoffe. Die verbliebenen Emitter in einem Bildbereich sind dadurch ausreichend weit voneinander entfernt, um sie effizient zu lokalisieren. Ein Algorithmus liefert die wahrscheinlichsten Positionen der Moleküle. Durch wiederholtes An- und Ausschalten werden sukzessive die Positionen für alle Moleküle in der Probe bestimmt. Daraus lässt sich ein supraaufgelöstes Bild rekonstruieren. Dieser Ansatz ist als PALM (Photo-Activated Localization Microscopy) bzw. STORM (Stochastic Optical Reconstruction Microscopy) bekannt [5, 6].

Beide Ansätze ermöglichen Auflösungen von 20 – 30 nm, da Fluoreszenzfarbstoffe nur eine begrenzte Zahl an Anregungszyklen vor der Photozerstörung überstehen [3]. Bei der Lokalisation einzelner Moleküle resultiert die Auflösung in erster Linie aus der Zahl der detektierten Photonen.<sup>1)</sup> Bei der STED-Mikroskopie ist die Auflösung ebenfalls eng mit der Zahl der Anregungszyklen verbunden [3].

In der aktuellen Arbeit geht es um die Frage, ob sich mit Hilfe einer strukturierten Beleuchtung wie bei STED die Lokalisierung der Moleküle verbessern lässt,

### KURZGEFASST

#### ■ Stabile Quantenmaterie

Vielteilchen-Quantensysteme reagieren sehr empfindlich, wenn sie durch äußere Kräfte gestört werden: Sie durchmischen und sind instabil. Physikern aus München ist es nun gelungen, Kaliumatome so in einem optischen Gitter aus Laserstrahlen einzufangen, dass sie robust gegenüber gezielten Störungen blieben. Die Forscher störten das empfindliche System, indem sie die Stärke der Laser variierten. Dann kam es zwar kurzzeitig zu Schwingungen der Kaliumatome, allerdings blieben sie dauerhaft an ihrem Gitterplatz. Dieser exotische Quantenzustand könnte robustere Quantencomputer erlauben. P. Bordia et al., Nat. Phys. (2017), DOI: 10.1038/nphys4020

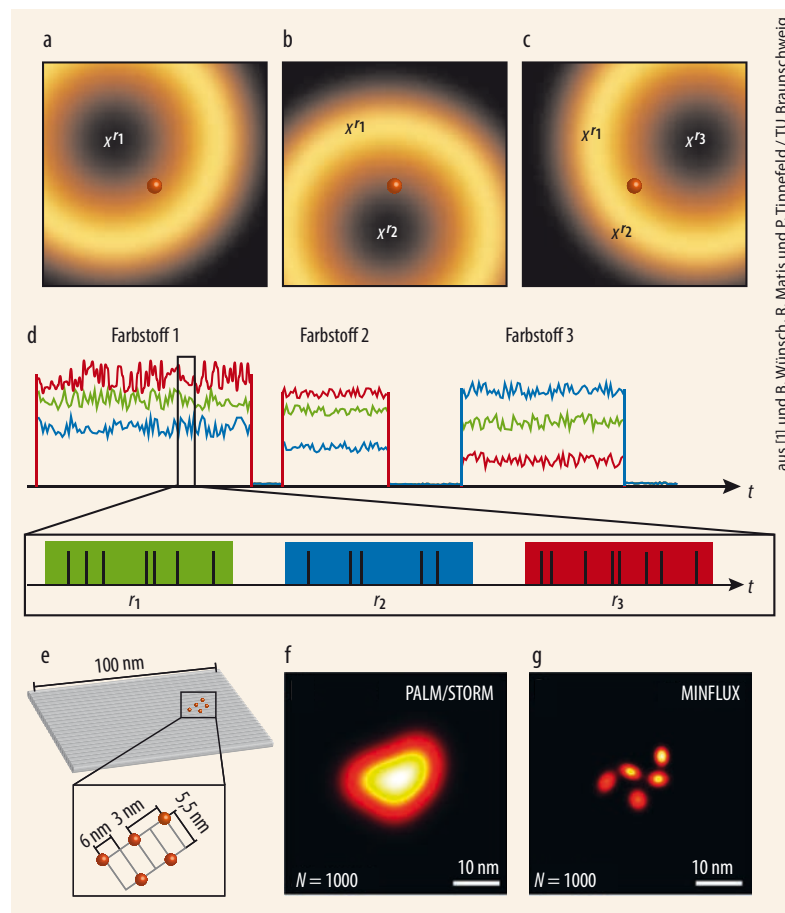
#### ■ Variable Architektur

Optimierte Materialien besitzen meist eine so spezielle Struktur, dass sie nur für einzelne Anwendungen infrage kommen. Ingenieure der Harvard University entwickelten kürzlich Architekturen aus Prismen, die sich durch gezielte Krafteinwirkung verformen lassen. Als Vorbild diente eine besondere Art von Origami („snapology“). Mithilfe von Karton und doppelseitigem Klebeband erzeugten sie zentimetergroße Modelle und wiesen nach, dass durch das Aneinanderreihen von Einheitszellen beliebig skalierbare Formen entstehen. Das Material ist rekonfigurierbar und damit für Anwendungen in der Festkörperphysik interessant. J. T. B. Overvelde et al., Nature 541, 347 (2017)

und zwar mit weniger Photonen [1]. Durch Weitfeld-Mikroskopie werden zunächst die interessierenden Objekte möglichst zentral im Beobachtungsfeld platziert. Ein Intensitätsvergleich von zwei Messungen erlaubt es, das Molekül bei eindimensionaler Betrachtung zu lokalisieren. Mit einem Doughnut-förmigen Anregungsfokus ist die detektierte Fluoreszenz ein Maß für die Entfernung des Farbstoffs von der Intensitäts-Null in der Fokussmitte. In einer zweiten Messung wird der gleiche Anregungsfokus auf die andere Seite des Moleküls gesetzt, um dort erneut die Fluoreszenzintensität zu messen. Aus dem Verhältnis der beiden Messwerte leitet sich bei Kenntnis der Doughnut-Profile und ihrer Koordinaten die Position des Moleküls ab. Dieses Verfahren ist bei gleicher Photonenzahl viel genauer als die Positionsbestimmung durch eine Anpassung an die Punktabbildungsfunktion, da sich das Licht auf viele Pixel verteilt, die einen sehr großen Bereich überdecken. Eine dritte Messung erlaubt eine Ortsbestimmung in zwei Dimensionen (Abb. 1a–d).

Dieses MINFLUX-Verfahren (Maximally Informative Luminescence Excitation Probing) benötigt bei gleicher Präzision 22-mal weniger Photonen im Vergleich zur Einzelmoleküllokalisierung und erlaubt es, Moleküle auf DNA-Nanostrukturen mit einer Präzision von rund 1 nm aufzulösen (Abb. 1e–g) [4]. Dies stellt ein ultimatives Auflösungslimit dar, da die Quantenemitter selbst eine Ausdehnung dieser Größenordnung besitzen. MINFLUX liefert auch eine höhere Zeitauflösung in Tracking-Experimenten (Abb. auf Seite 22).

Bei MINFLUX handelt es sich nicht um eine Methode der Superauflösungsmikroskopie, sondern um eine verbesserte Lokalisierungstechnik. Superauflösung beinhaltet die Fähigkeit, benachbarte Moleküle zu unterscheiden. Diesbezüglich bietet MINFLUX keine Innovation, da es weiterhin erforderlich ist, die Moleküle zeitlich voneinander zu trennen [5, 6]. Aber die Technik stellt einen



**Abb. 1** Beim Lokalisierungsprinzip von MINFLUX (a–c) markieren die roten Punkte die Farbstoffe und  $x^1$  bis  $x^3$  die Mittelpunkte der nacheinander geschalteten Doughnut-Fokusse. Aus den Intensitätsprofilen und den Fokus-Positionen

leitet sich die Position des Farbstoffs ab. (d) Mit dieser Nanoskopie-Methode lassen sich einzelne Farbstoffe auf DNA-Nanolinealen (e) bis zu Abständen von 6 nm auflösen (g), was lokalisierungs-basierte Mikroskopie (f) nicht erlaubt.

Paradigmenwechsel bei der Lokalisierung einzelner Moleküle dar. Die bekannte Position der Abfragepunkte reduziert den Informationsbedarf und entkoppelt ihn größtenteils von der Beugung. Daher ist das neue Verfahren in erster Näherung wellenlängenunabhängig und kann abhängig vom Abstand der Abfragelaser mit weniger Photonen mehr Information extrahieren. Dies ist aber keine a priori-Information im Sinne eines Modells. Die Information, die in die Position der Laser gesteckt wird, beinhaltet die Platzierung des untersuchten Objekts zwischen den drei Abfrage-Doughnuts. Durch die Variation der Abstände zwischen den Doughnut-Fokusse ist es somit möglich, in die Probe zu zoomen.

Künftig werden daher intelligente Lösungen mit schnellen Feedback-Schaltungen und effizienten Algorithmen nötig sein,

um die Technik optimal einsetzen zu können. Außerdem wird es spannend sein zu sehen, welche Anregungsprofile sich in der Realisierung durchsetzen. Besseres Ausnutzen der Information der emittierten Photonen bedeutet höhere räumliche und zeitliche Auflösung, geringere Ansprüche an die Farbstoffe und niedrigere Phototoxizität. MINFLUX eröffnet damit eine Spielwiese für Einblicke in molekulare biologische Prozesse.

**Philip Tinnefeld**

- [1] F. Balzarotti et al., *Science* **355**, 606 (2017)
- [2] S. W. Hell, *Science* **316**, 1153 (2007)
- [3] T. Cordes et al., in: P. Tinnefeld, C. Eggeling und S. W. Hell (Hrsg.), *Far-Field Optical Nanoscopy*, Springer, Berlin, Heidelberg (2015), S. 215
- [4] J. J. Schmied et al., *Nat. Protoc.* **9**, 1367 (2014)
- [5] E. Betzig et al., *Science* **313**, 1642 (2006)
- [6] M. J. Rust, M. Bates und X. Zhuang, *Nat. Methods* **3**, 793 (2006)

**Prof. Dr. Philip Tinnefeld**, Institute of Physical and Theoretical Chemistry, TU Braunschweig, Braunschweig Integrated Center for Systems Biology and Laboratory for Emerging Nanometrology, Rebenring 56, 38106 Braunschweig