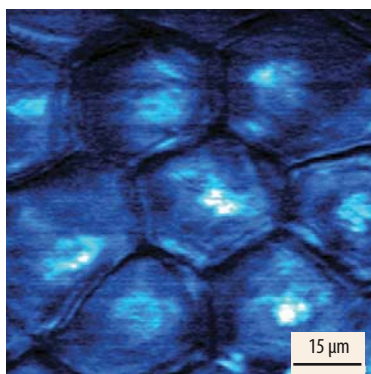


■ Licht aus dem Dunkeln

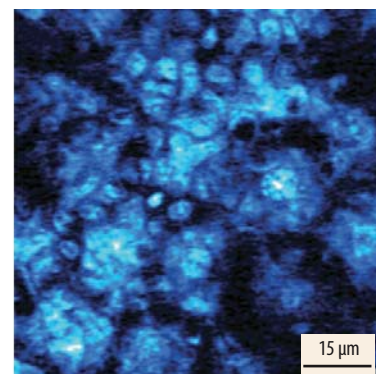
Mittels stimulierter Emissionsmikroskopie lassen sich auch bislang nicht detektierbare Fluoreszenzsignale nachweisen.

Fluoreszenzmikroskopische Verfahren sind aus der biophysikalischen und biomedizinischen Forschung und ihren Anwendungen nicht mehr wegzudenken. Meist ist es dabei erforderlich, die zu untersuchenden zellulären Strukturen mit Substanzen zu markieren, die bei Anregung in einem geeigneten Wellenlängenbereich fluoreszieren. Das Objektiv des Mikroskops sammelt das Signal auf und bildet es auf einen Detektor (meist ein CCD-Chip; bei der Rastermikroskopie ein Punktdetektor) ab [1]. Weitverbreitet für die spezifische Markierung sind Antikörper mit daran gebundenen fluoreszierenden Verbindungen oder fluoreszierende Proteine. Mittels molekularbiologischer Techniken lassen diese sich an das zelluläre Protein binden, dessen räumliche Verteilung in der Zelle zu analysieren ist.

Die Anwendungen dieser Methoden reichen von der Analyse von Zell-Zell-Verbindungen über



Mit der stimulierten Emissionsmikroskopie lässt sich verfolgen, wie sich das Arzneimittel TBO in der Haut eines Mäuseohrs verteilt: 30 Minuten nach Applikation



sammelt sich das TBO in der obersten Hautschicht in der Mitte der Zellen (links). In einer Tiefe von 25 µm verteilt sich TBO in anderer Weise (rechts).

Proteinkomplexe auf der Zellmembran und im Zytoplasma bis zum Zellkern. Unter günstigen Präparationsbedingungen und dank Detektionssystemen mit hoher Quantenausbeute und niedrigem Rauschen lassen sich sogar einzelne Moleküle nachweisen und auf ihrem Weg in lebenden Zellen verfolgen. In vielen Anwendungen sind die Fluoreszenzsignale der markierten zellulären Strukturen jedoch so schwach, dass sie sich nicht ausreichend von der unspezifischen Hintergrundfluoreszenz abheben und konventionelle Verfahren sie nicht nachweisen können.

Bei der konventionellen Fluoreszenzspektroskopie regt ein fokussierter Laserstrahl Elektronen in ein höheres Energieniveau an (Abb. 1). Von dort gehen sie mittels Vibrationsrelaxation in ein niedrigeres Niveau E_2 über, von dem aus durch spontane Emission ein Übergang in den Zustand E_3 möglich ist. Dabei entstehen Fluoreszenzphotonen der Energie $h\nu_{23} = E_2 - E_3$ ausgesendet. Anschließend relaxieren die Elektronen zurück in den Grundzustand E_0 .

rigere Konsequenz der nichtstrahlenden Übergänge ist eine geringere Effizienz des Fluoreszenzübergangs von E_2 zu E_3 bis zur weitgehenden Auslöschung. Bei wichtigen Biomolekülen wie Hämoglobin und Cytochrom dominieren nichtstrahlende Übergänge, sodass ihre Fluoreszenz nicht detektierbar ist. Dunkle Moleküle sind aber im Lichtmikroskop genauso wenig sichtbar wie Dunkle Materie im Teleskop.

Wissenschaftler von der Harvard University haben nun ein neues Verfahren entwickelt, das auch solche dunklen Moleküle optisch nachweisen kann [2]. Sie nutzten dafür die stimulierte Emission [3]: Ein zweiter fokussierter Laserstrahl mit der Intensität I_s und der Photonenenergie $h\nu_{23} = E_2 - E_3$ bewirkt einen Übergang von E_2 nach E_3 . Dabei entstehen stimulierte Photonen mit derselben Energie wie bei der spontanen Emission. Auf diesem Prinzip beruht z. B. die hochauflösende „Stimulated Emission Depletion“-Mikroskopie [4]. Die Lichtintensität I_s nimmt durch die stimulierte Emission zu, allerdings nur um etwa 10^{-7} bei einem einzelnen Chromophor. Um dies zu detektieren, ist es nötig, Änderungen des Photonenflusses in dieser Größenordnung zu messen. Das erscheint ziemlich hoffnungslos, da die Intensität des anregenden Laserstrahls typischerweise um ein Prozent schwankt. Die Forscher

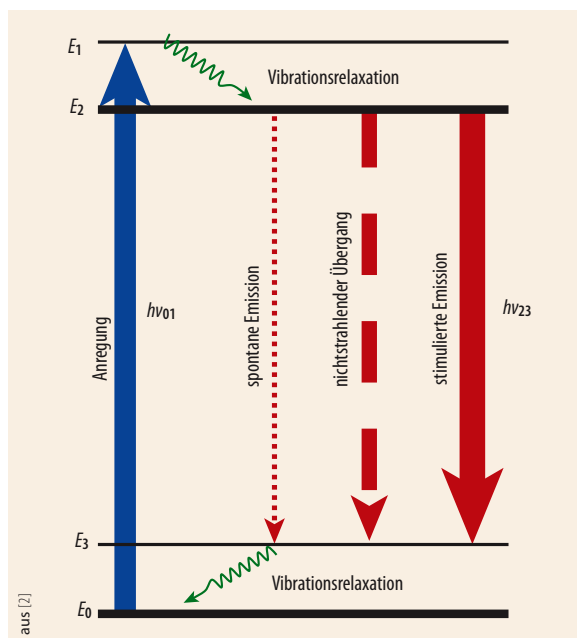


Abb. 1 Ein fokussierter Laserstrahl regt die Elektronen vom Grundzustand E_0 in den Zustand E_1 an. Von dort geben die Elektronen Energie an Schwingungszustände ab, bis sich ihre Energie auf das Niveau E_2 verringert hat. Aus diesem Zustand ist durch spontane Emission ein Übergang in einen niedrigeren Zustand E_3 möglich. Dabei werden Fluoreszenz-Photonen der Energie $h\nu_{23} = E_2 - E_3$ ausgesendet. Anschließend relaxieren die Elektronen zurück in den Grundzustand E_0 .

aus Cambridge haben dieses Problem sehr elegant überwunden: Sie nutzten die Tatsache aus, dass die Laserintensität hauptsächlich bei niedrigen Frequenzen fluktuiert (bis zum Kilohertzbereich). Sie modulierten den Anregungsstrahl bei 5 MHz und bewirkten damit eine gleichartige Modulation des Lichtsignals der stimulierten Emission. Diese ließ sich elektronisch verstärken und nachweisen.

Verschiedene Anwendungen stellten die Brauchbarkeit dieses Verfahrens unter Beweis. So analysierten die Wissenschaftler damit die Verteilung bestimmter Chromoproteine in Bakterien. Sie verwendeten dabei je nach nachzuweisendem Chromophor Anregungswellenlängen zwischen 590 und 680 nm. Die Wellenlängen für die stimulierte Emission lagen etwa 70 bis 80 nm darüber. Hierbei kamen zwei optisch parametrische Oszillatoren mit einer Pulsdauer von 200 fs zum Einsatz, die durch einen Titan-Saphirlaser gepumpt wurden.

Zudem untersuchten die Forscher, wie sich das Arzneimittel TBO (Toluidin-blau O) aus der photodynamischen Therapie in der Haut verteilt. Verwendet wurden Laserleistungen von 0,1 bis 1 mW, die zu Fokusintensitäten unterhalb 1 MW/cm^2 führten. Um ein Bild zu erzeugen, wurden die zellulären Objekte mit diesen stark fokussierten gekoppelten Laserstrahlen rastermikroskopisch abgetastet. Elektronisch lassen sich die ortskodierten Signale der stimulierten Emission, die proportional zur Anregungs- und Stimulationsintensität sind, zu einem Bild zusammensetzen. Oberhalb und unterhalb der Fokusebene ist die stimulierte Emission gering. Daher sind dreidimensionale Bilder von intrazellulären Chromophoren möglich, deren Fluoreszenz konventionell nicht detektierbar ist.

Die Arbeit von Wei Min et al. zeigt eindrucksvoll, wie physikalisches Know-how zu wesentlichen Fortschritten in den Lebenswissenschaften und der zellulären Bio-

physik führen kann. Die stimulierte Emissions-Mikroskopie weist selbst einzelne Moleküle nach (< 5 Moleküle im Laserfokus). Die optische Auflösung ist dagegen vergleichbar mit konventionellen Methoden. Für viele biophysikalische und biomedizinische Anwendungen reicht sie jedoch nicht aus. Der nächste Schritt könnte daher sein, die bereits existierenden Methoden der supraauflösenden Mikroskopie [4, 5] so zu erweitern, dass sie auch Moleküle mit sehr schwacher oder nicht detektierbarer Fluoreszenz messen können. Dies würde den Blick auf dunkle Moleküle mit bislang unerreichter Auflösung eröffnen.

Christoph Cremer

Prof. Dr. Christoph Cremer, Kirchhoff Institut für Physik, Im Neuenheimer Feld 227, 69120 Heidelberg

- [1] J. B. Pawley (Hrsg.), Handbook of Biological Confocal Microscopy, 3. Aufl., Springer, Berlin (2006)
- [2] W. Min et al. Nature **461**, 1105 (2009)
- [3] A. Einstein, Phys. Z. **18**, 121 (1917); C. E. Hamilton et al., Annu. Rev. Phys. Chem. **37**, 493 (1986)
- [4] S. W. Hell, Science **316**, 1153 (2007); vgl. Physik Journal, Dezember 2007, S. 47
- [5] P. Lemmer et al., J. of Microscopy **235**, 163 (2009)

■ Solide Verschränkung

Supraleitende Nanostrukturen ebnen den Weg zur Erzeugung verschränkter Elektronenspins.

Korrelationen sind ein alltägliches Phänomen: Greift man sich z. B. aus einem Karton, der ein Paar Schuhe enthält, zufällig einen Schuh heraus und stellt fest, dass es der linke ist, dann weiß man ohne hineinzusehen, dass sich in der Schachtel ein rechter Schuh befindet. Klassisch betrachtet ist dies eine maximale Korrelation. Interessanterweise erlaubt aber die Quantenmechanik Formen noch stärkerer Korrelation. In ihrer berühmten Arbeit von 1935 kamen Einstein, Podolski und Rosen (EPR) aufgrund solcher seltsamen Korrelationen zum Schluss, dass die quantenmechanische Wellenfunktion zweier Teilchen (EPR Paar) nicht die gesamte Information über einen Zustand enthalte. Schrödinger kam nicht zum selben Schluss und führte in seiner Antwort auf den EPR-Artikel das Konzept der

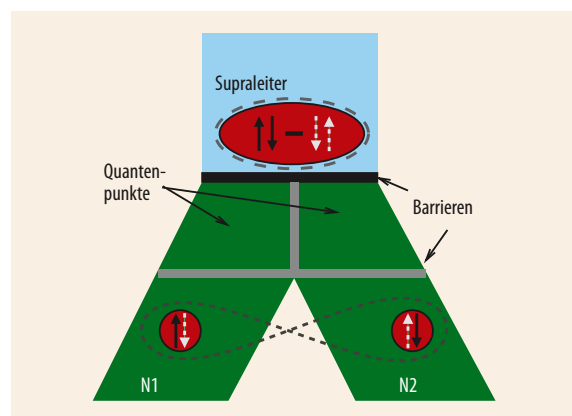


Abb. 1 In drei neuen Experimenten lassen sich spinverschränkte Cooper-Paare trennen und so in den beiden normalen Kontakten N1 und N2 als EPR-Paar nutzen. Dabei werden Quantenpunkte zur effizienten Trennung verwendet [1, 2]. Diese zusätzlichen Barrieren sind im dritten Experiment [3] nicht vorhanden.

Verschränkung ein. Während in der Diskussion zwischen Einstein und Schrödinger die Grundlagen der Quantenmechanik im Mittelpunkt standen, wurden in der Pionierphase der Quanteninformation zu Beginn der 90er-Jahre die ersten Theorien dazu aufgestellt, wie sich diese seltsamen Quantenkorrelation zweier verschränkter Teil-

chen nutzen lassen könnten, um z. B. Daten effizient zu versenden oder zu verschlüsseln. Wenige Jahre später gelang es, diese Ideen mithilfe verschränkter Photonen experimentell umzusetzen. Weil sich Photonen über weite Strecken frei bewegen können, eignen sie sich ausgezeichnet zur Herstellung nichtlokaler EPR-Paare. Deshalb