

Nanoskopie mit fokussiertem Licht

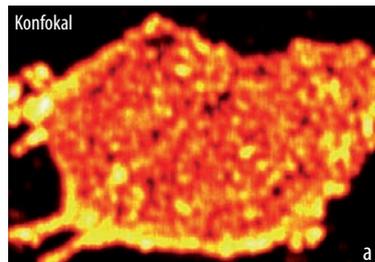
Indem man Moleküle zwischen Hell- und Dunkelzuständen überführt, lässt sich Abbes Grenze im Lichtmikroskop – trotz Beugung – aufheben

Stefan W. Hell

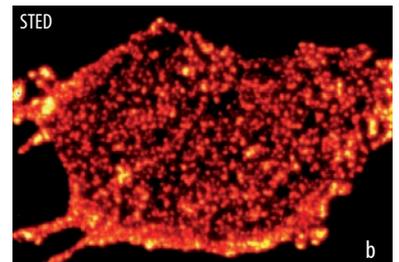
Mikroskopie mit fokussiertem Licht bedeutete lange Zeit, dass sich Details, die feiner sind als die halbe Lichtwellenlänge (200 nm), nicht auflösen lassen. Heute steht jedoch fest, dass man mit konventioneller Optik fluoreszierende Proben mit einer Detailschärfe weit unterhalb der Beugungsgrenze abbilden kann. Die *Stimulated Emission Depletion*-Mikroskopie (STED) und noch jüngere fernfeldoptische Verfahren können mit Auflösungen von besser als 20 nm aufwarten und sind prinzipiell sogar in der Lage, molekular auflösen. Die fernfeldoptische Nanoskopie eröffnet somit auch den nicht-invasiven Zugang zur Nanoskala der Zelle.

Ein Bild sagt mehr als tausend Worte – das gilt im Alltag wie auch in der Wissenschaft. Daher überrascht es nicht, dass das Lichtmikroskop wie kaum ein anderes Instrument zum Symbol wissenschaftlicher Forschung wurde. Doch die herkömmliche Lichtmikroskopie kämpft mit einem grundsätzlichen Problem, dessen volles Ausmaß Ernst Abbe 1873 erstmals erkannte: Beugung verhindert es, Objekte zu trennen, die in der Fokalebene weniger als $d = \lambda / (2n \sin \alpha)$ voneinander entfernt sind, denn das Beugungs-Hauptmaximum in der Brennebene des Objektivs kann im Durchmesser nicht schärfer als d sein. Dabei bezeichnet λ die Lichtwellenlänge, n den Brechungsindex und α den halben Öffnungswinkel des Lichtkegels. Für sichtbares Licht mit einer Wellenlänge zwischen 400 und 700 nm schien es daher unmöglich, mit frei propagierenden Lichtwellen Details aufzulösen, die feiner als 200 nm sind.

Um feinere Strukturen abzubilden, wurde das Elektronenmikroskop entwickelt, das aufgrund seiner erheblich besseren Auflösung enorm zum wissenschaftlichen Fortschritt beigetragen hat. Doch die Abkehr vom Licht führte zu neuen Einschränkungen: Da Elektronenstrahlen nur wenige Mikrometer in die Probe eindringen, ist die Abbildung auf Oberflächen oder dünne Proben beschränkt. Lebende Zellen lassen sich aufgrund der notwendigen Probenpräparation ohnehin nicht mit dem Elektronenmikroskop betrachten. Die Rastertunnel- und die Rasterkraftmikroskopie haben fraglos eine neue Welt erschlossen, aber auch sie sind auf Oberflächen begrenzt. Letzteres gilt auch für ihr optisches Pendant, das Raster-Nahfeldmikroskop, das mit einer feinen Spitze die Licht-Objekt-Wechselwirkung auf einen Bruchteil von λ einengt [1].



Im Gegensatz zu ihrem konfokalen Pendant (a) nimmt die STED-Mikroskopie (b) die Verteilung eines fluoreszenzmarkierten Proteins (SNAP-25) auf einer Zellmembran



mit einer Auflösung von rund 60 nm auf. SNAP-25 spielt bei der Verschmelzung von synaptischen Vesikeln mit der Zellmembran eine wichtige Rolle.

Das Abrastern einer (lebenden) Zelle lässt sich damit kaum bewerkstelligen, und schon gar nicht in ihrem Inneren.

Einen interessanten Ansatz bieten dagegen „perfekte Linsen“, die auf Metamaterialien mit negativem Brechungsindex basieren und das Licht im Nahfeld auffangen, verstärken und prinzipiell weiter bündeln können [2]. Doch gerade deswegen wird sich dieses Konzept wohl nur für Oberflächen eignen. Noch naheliegender ist es, sehr kurze Wellenlängen zu verwenden. Die Röntgenmikroskopie ($\lambda = 2 - 5$ nm) ermöglicht heute tatsächlich Auflösungen von rund 30 nm in der Fokalebene [3]. Doch Röntgenstrahlung ist schwer zu fokussieren, sodass sich Tiefenaufklärung nur tomographisch realisieren lässt. Allerdings führt bereits die erste Belichtung zum sofortigen Zelltod. Damit zeichnet sich ab, dass die hochauflösende dreidimensionale Abbildung von intakten oder sogar

KOMPAKT

- Im Fluoreszenzmikroskop lässt sich die Abbesche Auflösungsgrenze trotz Beugung radikal aufheben. Dies gelingt, indem man die Markermoleküle des Objekts ausgeklügelt zwischen einem hellen (fluoreszierenden) und einem dunklen Zustand schaltet.
- Dabei wird der Probenbereich, in dem die Moleküle fluoreszieren, vorübergehend auf einen Bruchteil der Wellenlänge eingegrenzt. Durch sequenzielles Auslesen der Fluoreszenz aus solchen engen Bereichen lässt sich ein Bild punktwise zusammensetzen.
- Obwohl alle Strahlen durch Beugung begrenzt sind, ermöglichen diese Verfahren prinzipiell molekulare Auflösungen. Die Überwindung der Beugungsgrenze wird die Lebenswissenschaften nachhaltig verändern.

Prof. Dr. Stefan W. Hell, Max-Planck-Institut für Biophysikalische Chemie, Abteilung Nanobiophotonik, Am Fassberg 11, 37077 Göttingen

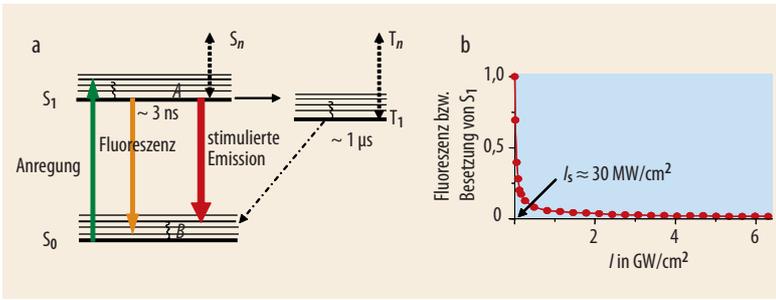


Abb. 1 Ein Farbstoffmolekül wird durch Absorption eines Photons in ein höheres Vibrationsniveau des Zustands S_1 angeregt (a, grün). Nach dem strahlungslosen Übergang in das unterste Niveau von S_1 kehrt das Molekül durch spontane Emission eines Fluoreszenzphotons (gelb) in den Grundzustand zurück. Diese Rückkehr lässt sich auch durch stimulierte

Emission erzwingen (rot). Die Besetzung des Zustands S_1 und damit die Fluoreszenz nehmen fast exponentiell mit der Intensität I des für die stimulierte Emission verantwortlichen STED-Strahls ab, sodass S_1 bei hohen Intensitäten nahezu unbesetzt ist (b). Bei der Sättigungsintensität I_s ist die Fluoreszenz auf den halben Wert gesunken.

lebenden Zellen nur mithilfe sichtbaren fokussierten Lichts möglich ist.

Hierbei spielt die Fluoreszenzmikroskopie eine herausragende Rolle, da sich interessante Zellbestandteile mit einem Markermolekül versehen lassen, das ein sehr spezifisches Fluoreszenzsignal aussendet. Man kann sogar die Zelle dazu bringen, ihre eigenen Marker zu produzieren. Kein anderes Mikroskopieverfahren eröffnet vergleichbare Möglichkeiten. Daher überrascht es nicht, dass rund 80 % aller Mikroskopieaufnahmen in den Life Sciences im Fluoreszenzkontrast durchgeführt werden. Die Überwindung der Beugungsgrenze in einem „Fernfeld“-Fluoreszenzmikroskop ist daher nicht nur physikalisch spannend, sondern auch von eminenter praktischer Bedeutung.

Dieser Artikel zeigt, dass man die Beugungsgrenze im Fluoreszenzmikroskop radikal aufheben kann, ohne die Beugung selbst aufheben zu müssen. Der Schlüssel liegt in der Einbeziehung der Zustände des Markermoleküls in die Bildentstehung. In der Tat liefen bisher alle fernfeldoptischen „nanoskopischen“ Verfahren darauf hinaus, die Markermoleküle transient zwischen einem fluoreszierenden (hellen) Zustand A und einem dunklen Zustand B oder umgekehrt zu überführen, und zwar so, dass (zumeist) der helle Zustand A auf einen räumlichen Bereich eingengt wird, der sehr viel kleiner als $\lambda/2$ ist [4–6]. Das Bild wird dabei erfasst durch sequenzielles Auslesen dieser transient geschaffenen ultrascharfen (hellen) Bereiche. Weil sich mehrere geeignete Hell-Dunkel-Zustandspaare A, B in Markermolekülen finden lassen, ist dieser Ansatz erstaunlich generell- und im Grunde genommen auch nicht auf Fluoreszenz beschränkt [6, 7].

Ein Doughnut für mehr Schärfe

Wie lässt sich nun der räumliche Bereich, in dem der fluoreszierende Molekülzustand A besetzt ist, mit frei propagierenden Lichtwellen auf Bruchteile von λ eingrenzen? Das erste Verfahren, mit dem dies gelang und das somit die Beugungsgrenze durchbrach, war die STED-Mikroskopie (Stimulated Emission Depletion, stimulierte Emissionslöschung) [4]. In seiner einfachsten Ausführung verwendet ein rasterndes STED-Mikroskop einen fokussierten Laserstrahl, der den Fluoreszenzmarker durch die Absorption eines Photons aus dem Grundzustand S_0 in den fluoreszenten elektronischen Zustand S_1 anregt (Abb. 1a). Das angeregte Molekül emittiert binnen einer Zeit τ_{fl} von ca. 3 ns ein Fluoreszenzphoton einer größeren Wellenlänge und kehrt in den Grundzustand zurück. Der Zustand S_1 ist somit der signalgebende „helle“ Zustand A und der Grundzustand S_0 sein dunkles Pendant B . In den angeregten Zustand lassen sich alle Moleküle bringen, die sich innerhalb der Airy-Scheibe mit Durchmesser $d = 200 - 350$ nm befinden, also in dem hellen Fleck in der Mitte des Beugungsmusters, das bei der Fokussierung des Lichts im Mikroskop entsteht.

Im STED-Mikroskop wird nun die effektive Anregung in den Zustand S_1 auf einen kleinen räumlichen Bereich beschränkt (Abb. 2). Dies geschieht mithilfe eines zweiten, meist doughnut-förmig fokussierten Laserstrahls mit einer zentralen Nullstelle, der über die Airy-Scheibe gelegt wird. Die Wellenlänge dieses STED-Strahls ist so stark rotverschoben, dass seine Photonenenergie nicht ausreicht, um die Moleküle anzuregen. Sie passt aber genau, um bereits angeregte Moleküle durch stimulierte Emission abzuregen. Der Doughnut sorgt also dafür, dass ein Molekül, das sich im Außenbereich der Airy-Scheibe befindet und gerade angeregt wurde, sofort wieder abgeregt wird und damit im Grundzustand S_0 – dem dunklen Zustand B – bleibt. Lediglich in der Doughnut-Mitte verbleiben die Moleküle ausreichend lange im angeregten Zustand S_1 (also A) und können Fluoreszenzphotonen aussenden.

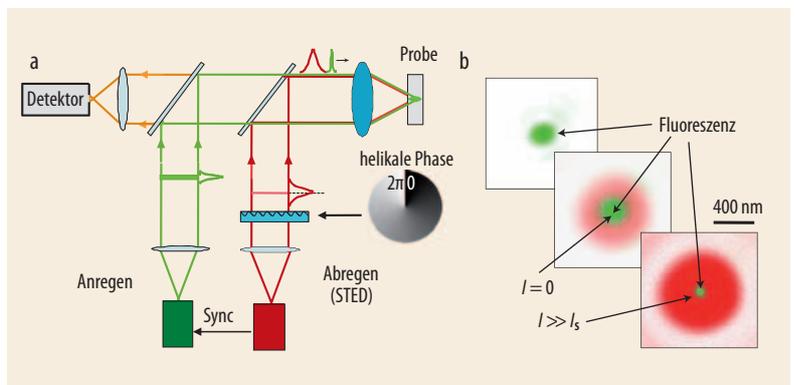


Abb. 2 In einem STED-Mikroskop werden beide Lichtpulse gleichzeitig eingekoppelt (a). Während der Anregungslaser einen Beugungsfleck mit $d > 250$ nm erzeugt, wird die Wellenfront des STED-Strahls mittels einer helikalen Phasenver-

zögerung so modifiziert, dass er im Fokus einen Doughnut bildet. Am Doughnut-Berg wird die Fluoreszenz verhindert ($I \gg I_s$), während sie in der Nullstelle des STED-Strahls (also in der Doughnut-Mitte, $I = 0$) erhalten bleibt (b).

Die Anregung und abschließende Abregung lässt sich gut mit synchronisierten Lichtpulsen durchführen, die kürzer als 100 ps bzw. länger als 300 ps sind. Pulse sind nicht prinzipiell erforderlich, sie erlauben es aber, das An- und Abregen zeitlich zu trennen [4]. Die Energie des ehemals angeregten Moleküls wird größtenteils als ein weiteres Photon des STED-Strahls mitgeführt, der spektral scharf und gerichtet ist, sodass er sich leicht mit Farbfiltern von der breit und ungerichtet emittierten Fluoreszenz trennen lässt. Die Verstärkung des STED-Strahls durch die stimulierten Photonen ist vernachlässigbar, da die wenigen angeregten Moleküle nur mit ebenso wenigen Photonen zum intensiven STED-Strahl beitragen; anders als beim Laser gibt es hier ja keinen Resonator. Ein wichtiges Detail ist aber, dass die Abregung in ein höheres Vibrationsniveau von S_0 erfolgt, aus dem das abgeregte Molekül binnen 1 ps in einen tieferen Vibrationszustand von S_0 zerfällt. Damit werden abgeregte Moleküle nicht gleich wieder angeregt. Die stimulierte Emission wird zur Einbahnstraße.

Nun liegt es auf der Hand: Je enger das Minimum des Doughnuts wird, desto schärfer ist der Bereich eingegrenzt, in welchem Moleküle im angeregten Zustand S_1 vorliegen. Desto schärfer wird also auch der fluoreszierende Spot, der am Ende die Auflösung bestimmt. Doch auch der Doughnut unterliegt der Beugungsgrenze, sodass seine Halbwertsbreite (FWHM) nicht ohne weiteres rund 150 nm unterschreiten kann. Um den fluoreszierenden Bereich noch stärker einzugrenzen, nutzt die STED-Mikroskopie aus, dass die Besetzung des angeregten Zustands S_1 nahezu exponentiell mit der Intensität I des STED-Strahls abnimmt (Abb. 1b) [8]. Auf den Doughnut übertragen, bedeutet das nun: je intensiver der Doughnut, desto stärker wird die effektive Besetzung von S_1 zur Mitte des Doughnuts hin eingeschnürt. Für Maximal-Intensitäten I_m (die am Doughnut-Kamm) weit unterhalb der Sättigungsintensität ($I_m \ll I_s$) ist die Einengung des Fluoreszenzspots gering. Die Sättigungsintensität $I_s \approx 30 \text{ MW/cm}^2$ gibt hierbei den Schwellenwert an, bei dem die Besetzung des Zustands S_1 halbiert ist. Aber mit wachsender Intensität wird der runde Fleck, in dem die Fluoreszenz zugelassen ist, immer kleiner, weil dann ein größerer Teil des Licht-Doughnuts über eine Intensität weit über dem Schwellenwert verfügt und somit die Besetzung des angeregten Zustands S_1 verhindert. Damit „frisst“ sich der dunkle, nicht fluoreszierende Bereich immer näher an die Nullstelle heran (Abb. 2b). Doch egal wie hoch I_m auch ist, an der Nullstelle ($I = 0$) kann ein Molekül immer fluoreszieren, denn dort gibt es keine stimulierte Emission.

Rasterfahndung in der Zelle

Rastert man die Nullstelle über die Probe, liefert das punktweise registrierte und auf dem PC abgetragene Fluoreszenzlicht automatisch Strukturen unterhalb der Beugungsgrenze, denn eng benachbarte Punkte werden jetzt sequenziell erfasst. Für das gemeinsame Rastern

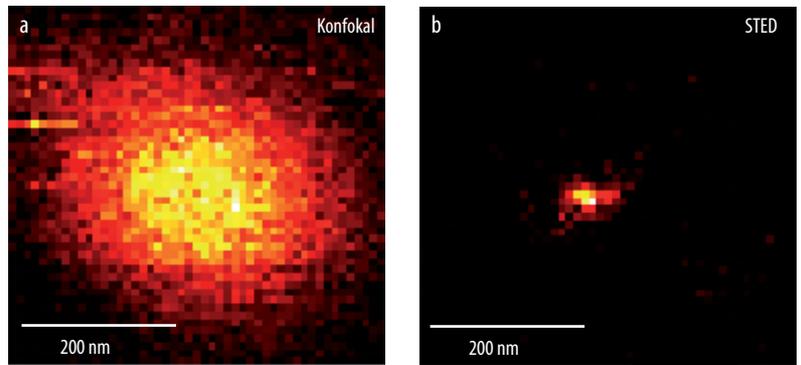


Abb. 3 Die effektiven fokalen Fluoreszenz-Spots eines konfokalen Mikroskops (a) bzw. eines STED-Mikroskops (b), aufgenommen durch Rasterung eines ein-

zelnen Fluoreszenzmoleküls durch den Fokus. Die Halbwertsbreite (FWHM) beträgt beim STED-Mikroskop nur 48 nm, verglichen mit 254 nm in a).

beider Laserstrahlen eignen sich Strahlrasterstechniken, wie sie z. B. in der konfokalen Mikroskopie zum Einsatz kommen. STED lässt sich in der Tat gut in einem konfokalen Mikroskop realisieren, obwohl dessen Funktionsprinzip – die Abbildung auf einen Punktdetektor – nicht erforderlich ist. Denn es ist konzeptionell irrelevant, ob das aus der Nullstelle emittierte Fluoreszenzlicht abgebildet wird oder nicht; die Auflösung ist nur durch den Durchmesser d des Spots gegeben, in welchem Moleküle im angeregten Zustand verbleiben und fluoreszieren können. Einfache Rechnungen zeigen, dass die Auflösung einem neuen Gesetz folgt [5, 7, 9]:

$$d = \frac{\lambda}{2n \sin \alpha \sqrt{1 + I_m/I_s}} \quad (1)$$

I_s ist charakteristisch für den verwendeten Fluoreszenzmarker sowie die Wellenlänge des STED-Strahls. Die Auflösung nimmt mit der Intensität I_m des STED-Strahls zu; lässt man ihn weg ($I_m = 0$), so ergibt sich Abbes Formel. Das grundsätzlich Neue am STED-Konzept ist, dass sich durch $I_m/I_s \rightarrow \infty$ prinzipiell $d \rightarrow 0$

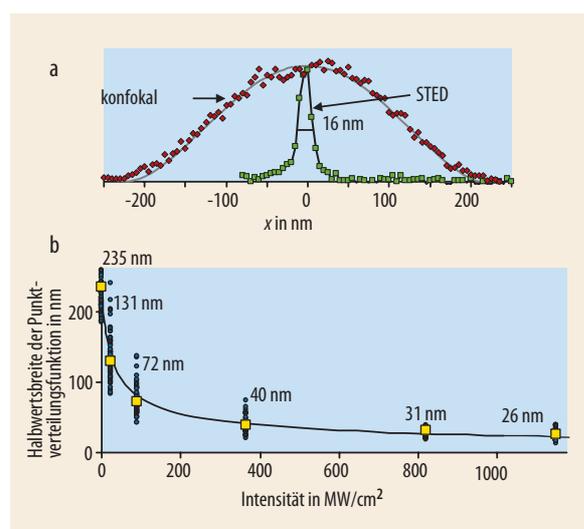


Abb. 4 Die STED-Mikroskopie erlaubt einen fokalen Fluoreszenzspot mit einer Halbwertsbreite von 16 nm, was einer Auflösung von $\lambda/50$ entspricht (a). Bei der konfokalen Mikroskopie ist die Auflösung rund 15-mal schlechter. Die Halbwertsbreite nimmt mit steigender Intensität des STED-Strahls gemäß Gl. (1) ab (b).

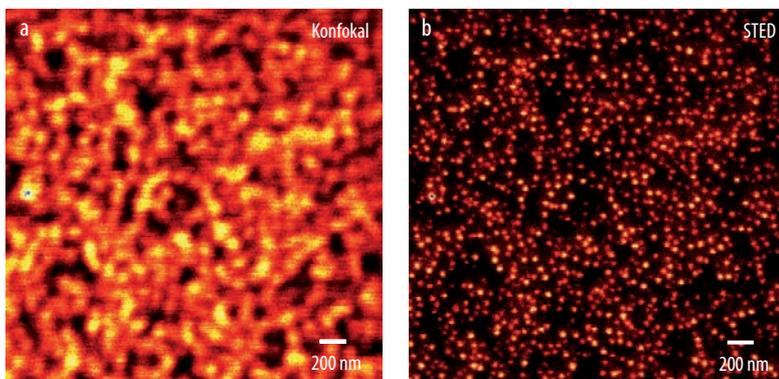


Abb. 5 Die konfokale Aufnahme (a) ist nicht in der Lage, die Verteilung fluoreszenter Latexkügelchen von 40 nm Durchmesser aufzulösen, während die

STED-Aufnahme (b) mühelos die Kügelchen trennt, obwohl sie dichter gepackt sind als die Beugungsgrenze.

erzielen lässt. Somit ist es möglich, molekulare Auflösung zu erreichen, obwohl alle Strahlen gebeugt sind! Die Beugungsgrenze ist also nicht verschoben, sondern aufgehoben.

Abgesehen von der Rasterung hat das STED-Mikroskop nichts mit einem optischen Nahfeldmikroskop gemeinsam, da es kein evaneszentes Licht verwendet und die Probe viele hundert Wellenlängen vom Objektiv entfernt ist. Dass es sich um ein Fernfeldmikroskop handelt, zeigt sich auch darin, dass die Auflösung d mit der Wellenlänge skaliert. Abb. 3 zeigt einen herkömmlichen Fluoreszenzspot verglichen mit dem durch STED geschärften. In Abhängigkeit von I_m/I_s nimmt die Halbwertsbreite, und damit auch die Auflösung, nach einer Wurzelfunktion ab (Abb. 4). Dies liegt letztendlich daran, dass der Intensitätsverlauf an der Nullstelle in erster Näherung parabolisch ist. Diese Messungen mit einzelnen Molekülen zeigten erstmals experimentell auf, dass man in einem Fernfeldmikroskop nanoskalige Auflösungen – hier explizit 16 nm entsprechend $\lambda/50$ – auf rein physikalischem Wege erzielen kann [9]. Die Kombination aus konfokalem und STED-Mikroskop verfügt über die Vorteile beider Methoden: Es kann dreidimensionale Bilder aufnehmen und funktioniert unter normalen Umgebungsbedingungen, gleichzeitig ermöglicht es nanoskalige Auflösungen. Anwendungen finden sich sowohl in der Zellbiologie [10] als auch in den Materialwissenschaften [11], sofern Fluoreszenzmarkierungen möglich sind (Abb. 5).

Experimenteller Hürdenlauf

Auch bei der STED-Mikroskopie stellt sich natürlich die Frage nach den praktischen Hürden. Wenn das Minimum des STED-Strahls in der Mitte des Doughnuts nicht Null ist, wird auch dort die Fluoreszenz verhindert. Das macht sich bei großen I_m/I_s bemerkbar. Um dies zu verhindern, sollte die Intensität in der Mitte des Doughnuts kleiner als $0,02 I_m$ sein. Dies lässt sich durch geeignete Wellenfrontmodifikationen erreichen. Auch das Photobleichen des Farbstoffs muss beachtet

werden. Zwar führt der STED-Strahl an und für sich nicht zum Bleichen, doch können die Farbstoffe durch Stoß in angeregte Dunkelzustände (z. B. metastabile Triplet-Zustände T_n) gelangen (Abb. 1a). Dort können sie weitere Photonen absorbieren und so in einen chemisch reaktiven Zustand übergehen. Dies lässt sich vermeiden durch Pausen über einer Mikrosekunde zwischen aufeinanderfolgenden Pulspaaren [12]. Bei Farbstoffen, die kaum Übergänge in den Zustand T_1 aufweisen, reichen kontinuierlich strahlende Laser, die die STED-Mikroskopie denkbar einfach machen – sogar für Studentenpraktika geeignet [13].

Charakteristisch für die STED-Mikroskopie ist aber nicht der Doughnut, sondern die Lichtverteilung mit einer Nullstelle, die den Übergang $S_1 \rightarrow S_0$ übersättigt, sodass sich der signalgebende Zustand S_1 nur an der Nullstelle einstellen kann. So lässt sich der Fluoreszenzfleck auch entlang der optischen Achse (der z -Achse) quetschen [14]. Bisher gelang es, die axiale Auflösung damit um den Faktor 5 bis 6 zu verbessern, was einer Auflösung von rund 100 nm entspricht. Eine noch höhere axiale Auflösung (rund 30 bis 60 nm) lässt sich mit einer Kombination aus 4Pi- und STED-Mikroskopie erreichen, indem man die Nullstelle durch destruktive Interferenz gegeneinander laufender fokaler Lichtwellen generiert [8].

Vom Modellfall zur Allgemeinheit

Die STED-Mikroskopie ist der Modellfall eines viel allgemeineren Konzepts, das ohne stimulierte Emission auskommt, und bei dem es darum geht, die Besetzung eines signalgebenden Zustands A mit einer Intensitätsnullstelle räumlich zu begrenzen und die Markermoleküle außerhalb der Nullstelle vorübergehend in einem dunklen Zustand B zu „parken“.

Natürlich kann man auch die beiden Zustände A und B vertauschen, indem man die Besetzung des dunklen Zustands B auf einen kleinen Raum beschränkt [5, 15]. Aber was noch wichtiger ist: Es muss außer den Zuständen S_1 und S_0 auch andere Hell-Dunkel-Paare A und B in einem Molekül geben, die für diese Zwecke geeignet sind [5, 6]. Eine Bedingung ist aber, dass das Markermolekül nicht im Zustand B verbleibt, weil man sonst den Zustand A nicht mehr einstellen könnte und der Marker unsichtbar bliebe. Es ist also eine Rückreaktion aus dem dunklen in den fluoreszenten Zustand erforderlich, die natürlich auch spontan, also thermisch, stattfinden kann.

Für die Auflösung dieser als RESOLFT¹⁾ bezeichneten Verallgemeinerung des STED-Verfahrens gilt ebenfalls Gl. (1). Die Sättigungsintensität ist allerdings i. A. eine andere, da sie von der Wahl der beiden Zustände A und B abhängt, denn im allgemeinen Fall werden auch spontane Übergänge zwischen Zustand A und B stattfinden, die dem gezielten Aufbau von A entgegenwirken [5, 6]. Ihre Rate ist durch den Kehrwert der Lebensdauer der beiden Zustände A und B gegeben, nämlich durch $1/\tau_{A,B}$. Die optisch erzwungene Rate

1) RESOLFT steht für REversible Saturable/switchable Optical Linear [Fluorescence] Transitions.

für den Übergang von A nach B ergibt sich durch das Produkt aus Wirkungsquerschnitt σ und eingestrahlttem Photonenfluss $I/\hbar\omega$. Bei $I_s = \hbar\omega/\sigma\tau_{A,B}$ sind beide Raten gleich. Je langlebiger die beiden Zustände A und B nun sind, desto geringer ist laut Gl. (1) die Intensität I_m , die notwendig ist, um die Beugungsgrenze zu durchbrechen.

Mit wenig Leistung zum Erfolg

Die hohe Sättigungsintensität von 10–100 MW/cm² beim STED-Verfahren resultiert also aus der Lebensdauer des angeregten Zustands S_1 , die wenige Nanosekunden beträgt, und aus dem Wirkungsquerschnitt $\sigma \approx 10^{-16}$ cm² für die optischen Übergänge zwischen Grund- und angeregtem Zustand $S_0 \leftrightarrow S_1$. Interessant wäre es also, geeignete Zustände A und B zu finden, deren Lebensdauer im Mikro-, Milli- oder sogar Sekundenbereich liegt, dann nämlich wäre die Sättigungsintensität – und damit auch die erforderliche Intensität I – deutlich geringer [16]. Als Dunkelzustand B eignet sich z. B. der metastabile Triplett-Zustand T_1 mit einer Lebensdauer von etwa einer Mikrosekunde, solange man das Photobleichen unterdrücken kann. Ein passender signalgebender Zustand wäre dann der stabile Grundzustand S_0 , dessen Besetzung über die Fluoreszenzanregung abgefragt werden kann. Die tausendmal längere Lebensdauer des Dunkelzustands verringert die Sättigungsintensität um etwa den Faktor tausend [17]. Eine Messung an fixierten Zellen hat diese Reduktion bei einer Auflösung von rund 50 bis 80 nm bestätigt [18].

Die ultimative Form des „optischen Sättigens“ ist das „optische Schalten“. Optisch bistabile Moleküle ermöglichen daher noch geringere Sättigungsintensitäten, wenn man sie zwischen einem zur Fluoreszenz fähigen und einem dunklen (Konformations-)Zustand hin- und herschalten kann [5, 16]. Während das Molekül im Zustand A nach optischer Anregung (in den Zustand A^*) fluoresziert, senden Moleküle aus dem Zustand B kein Signal aus. Da die Lebensdauer der Zustände A und B bei über einer Millisekunde liegt, reduziert sich die Sättigungsintensität auf weniger als 1–10 W/cm². Die Abbesche Grenze lässt sich mit diesem Verfahren daher mit wesentlich geringeren Intensitäten überwinden als mit STED. Erste Experimente mit reversibel schaltbaren fluoreszierenden Proteinen und organischen Fluorophoren haben dies mit geringen Lichtleistungen im Nanowatt-Bereich bestätigt [19].

Diese geringen Lichtintensitäten ermöglichen es auch, die Bildaufnahme durch Nullstellen-Arrays und die gleichzeitige Detektion der Fluoreszenz mit einer Kamera zu parallelisieren. Natürlich wird das von der Nullstelle emittierte Fluoreszenzlicht gebeugt und unscharf auf der Kamera abgebildet. Doch wenn die einzelnen Nullstellen weiter als eine halbe Wellenlänge auseinander sind, lassen sich die unscharfen Flecke auf der Kamera trennen und jeder einzelnen Nullstelle

direkt zuordnen [5]. Das Signal addiert man auf und ordnet es der bekannten Koordinate der Nullstelle zu. Das „überaufgelöste“ Bild baut sich sukzessive auf, wenn das Array über die Probe rastert und die Kamera an jeder Stelle die Signale ausliest. Hierbei müssen die Nullstellen jeweils über eine Distanz von rund einer halben Wellenlänge verschoben werden, weil dann die nächste Nullstelle ansetzen kann bzw. weil Objekte, die weiter als eine halbe Wellenlänge auseinander sind, ohnehin getrennt werden können. Die Nullstellen-Arrays können auch als Streifen ausgebildet sein, die man wiederholt dreht, um den Auflösungsgewinn in alle Richtungen zu erhalten [15]. Diese Kamera-basierte Auslese-Strategie lässt sich prinzipiell für alle RESOLFT-Verfahren – also auch für die STED-Mikroskopie realisieren – aber ein „Hell-“ oder „Weitfeld“-Verfahren ist sie nicht, denn das Bild entsteht nicht auf der Kamera, sondern wird durch Rastern aufgebaut. Die Auflösung ist aber nach wie vor über den Durchmesser d bestimmt, auf den die Besetzung des signalgebenden Zustands eingengt wird.

Das räumliche Rastern mit einer Nullstelle erfordert, dass die Moleküle mehrfach zwischen den beiden Zuständen A und B wechseln müssen. In vielen Fällen kann ein Molekül aber nicht unbegrenzt oft diesen Zyklus $A \leftrightarrow B$ durchlaufen. Dennoch ist das Photoschalten der richtige und wegweisende Ansatz. Denn die bereits genannten schaltbaren Fluorophore bieten auch die Möglichkeit, die Position des Zustands A mit hoher Genauigkeit auszulesen, ohne vorher seine Position mithilfe einer Nullstelle festgelegt zu haben.

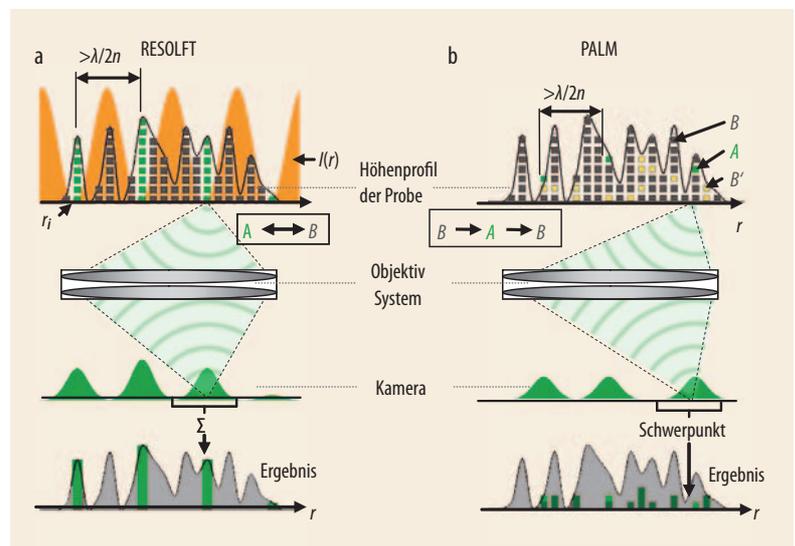


Abb. 6 Das RESOLFT-Verfahren verwendet mehrere Nullstellen r_i einer Intensitätsverteilung $I(r)$ (orange), um die Besetzung des signalgebenden Zustands A (grün) durch optisches Schalten des Markermoleküls in einen dunklen Zustand B (grau) auf $d \ll \lambda/2$ einzuengen (a). Die Kurve zeichnet das Höhenprofil der Probe nach, die kleinen Quadrate stehen symbolisch für die beteiligten Moleküle, die sich im dunklen oder hellen Zustand befinden. Das Signal aus

den Nullstellen wird auf eine Kamera abgebildet und das Bild durch Rastern der Nullstellen über die Probe aufgebaut. Beim PALM-Verfahren (b) schaltet man einzelne Moleküle zufällig verteilt in den hellen Zustand A und führt das ausgelesene Molekül anschließend in den Dunkelzustand B zurück. Das Bild entsteht durch stochastisches Auslesen isolierter ein- und ausgeschalteter Moleküle und der Eintragung ihrer Position.

Voraussetzung dafür ist allerdings, dass das Molekül im Zustand A durch mehrfache Anregung $A \rightarrow A^*$ mehrere Photonen hintereinander emittiert, ohne dabei nach B zu gelangen [20].

Wie geht das? Nehmen wir an, dass alle Markermoleküle zunächst ausgeschaltet, also im Zustand B sind. Man schaltet großflächig Moleküle in den fluoreszenzfähigen Konformationszustand A , und zwar mit so geringer Intensität, dass die eingeschalteten Moleküle weiter als eine halbe Wellenlänge voneinander entfernt sind. Die Moleküle in ihrer Nachbarschaft verbleiben weiterhin im Dunkelzustand B (Abb. 6b). Nachbarmoleküle müssen also nicht gezielt ausgeschaltet werden, weil sie ja schon ausgeschaltet sind. Doch im Gegensatz zur STED- oder RESOLFT-Mikroskopie weiß man hier nicht, wo man die Moleküle eingeschaltet hat. Um dies herauszufinden, regt man die eingeschalteten Moleküle mehrfach zur Fluoreszenz an ($A \rightarrow A^*$) und misst m Photonen. Anschließend kehrt das Molekül spontan in den dunklen Zustand B zurück bzw. man schickt es gezielt nach B zurück. Wenn die Bewegung der Moleküle vernachlässigbar ist, hinterlassen sie auf der Kamera einzelne, trennbare Beugungsflecke, deren Schwerpunkt sich mit einer Präzision von etwa $\lambda/(2\sqrt{m})$ mithilfe eines Fits berechnen lässt. Jeder Beugungsfleck gehört zu einem einzelnen Molekül, daher kann das Bild sequenziell durch stochastisches Registrieren einzeln geschalteter Moleküle und der Eintragung ihrer Position als Punkt aufgebaut werden. Sendet jedes Molekül $m = 100$ Photonen aus, verbessert sich die Auflösung um eine Größenordnung (Abb. 7). Allerdings folgt die Zahl der emittierten Photonen m einer geometrischen Verteilung, sodass die Mehrzahl der Ereignisse verworfen werden muss, um eine bestimmte hohe Auflösung zu erzielen. Im Gegensatz zu

STED oder RESOLFT besitzt sie auch keinen scharf definierten Wert.

Diese Rückkehr $A \rightarrow B$ des ausgelesenen Moleküls in den Dunkelzustand ist erforderlich, da sonst mit der Zeit zu viele Moleküle fluoreszieren würden und das Konzept, einzelne Moleküle auszulesen, zusammenbrechen würde. Doch bei diesem Einzelmolekülverfahren muss das Molekül nur einen einzigen Dunkel-Hell-Dunkel-Zyklus [$B \rightarrow A (\leftrightarrow A^*) \rightarrow B$] durchlaufen, denn die Aussendung der m Photonen geschieht über die mehrfache Anregung in den Fluoreszenzzustand A^* . Dieses PALM-Verfahren²⁾ war zunächst auf Flächenaufnahmen beschränkt und benötigte Aufnahmezeiten von Stunden [21], neuere Varianten wie PALMIRA nehmen das Bild in weniger als zehn Sekunden auf und bilden die Probe auch dreidimensional ab [22]. Noch kürzere Aufnahmezeiten scheinen möglich.

Entscheidend in diesen Verfahren ist die Verwendung eines molekularen Prozesses, der zur Emission von m Photonen aus derselben Stelle führt [20]. Wie bei den Nullstellen-Rasterverfahren wird auch hier das Bild sequenziell aufgebaut, mit dem Unterschied, dass sich das „Rastern“ stochastisch entwickelt. Die Notwendigkeit eines Zustands A , der zur konsekutiven Emission von m Photonen führt, erfordert speziellere Zustände als STED, das als rein physikalisches Verfahren ohne Berechnungen auskommt. Mit geeigneten Fluorophoren ist das Einzelmolekülschalten jedoch einfach anzuwenden.

Mehr als nur Fluoreszenz

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass alle nanoskopischen Verfahren darauf basieren, vorübergehend die Besetzung eines signalgebenden Zustands A auf einen Bereich zu begrenzen, der deutlich kleiner ist als die halbe Wellenlänge des eingesetzten Lichts. Der Schlüssel zum Durchbruch der Beugungsgrenze war dabei der Ansatz, die Zustände des Markermoleküls in die Bildentstehung einzubeziehen [4]. Daher stellt sich die Frage, ob die hier beschriebenen Verfahren grundsätzlich auf fluoreszente Objekte beschränkt sind? Die Antwort ist nein, denn die Fluoreszenz des Zustands A ist keine Voraussetzung für seine räumliche Einengung. Ein Zustand, der z. B. Wärme oder ein anderes messbares Signal aussendet, würde sich ebenfalls eignen, um Abbes Beugungsgrenze zu umgehen. Die Signale sind nur notwendig, um den Kontrast zwischen den Bereichen zu schaffen, in denen der Zustand A besetzt ist bzw. Zustand B . Daher wäre es nicht überraschend, wenn in naher Zukunft auch andere Kontrastverfahren der optischen Fernfeldmikroskopie die Beugungsgrenze durchbrechen würden.

Schon heute ist klar, dass sich im Fluoreszenzkontrast ohne größeren Aufwand Auflösungen von 15 bis 50 nm realisieren lassen, was vor kurzem noch der Elektronenmikroskopie vorbehalten zu sein schien. Dadurch, dass lediglich die Molekülbewegungen dem Verfahren eine Grenze setzen, sind weitere Verbesse-

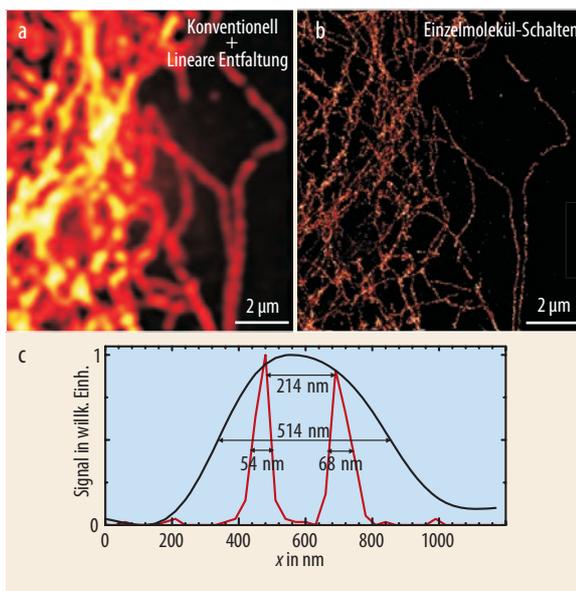


Abb. 7 Fluoreszenzmarkierte Mikrotubuli in einer Zelle aufgenommen mit Weitfeld-Epifluoreszenz (a) und durch gezieltes Schalten einzelner Fluorophore nach dem PALMIRA-Verfahren (b). In a) wurden die Rohdaten mit der Punktbildfunktion des Mikroskops linear entfaltet. Dennoch ist die Auflösung in b) deutlich besser, wie sich an den Profilen in c) ablesen lässt.

rungen vorprogrammiert. Aber auch Molekülbewegungen und -fluktuationen lassen sich mit kleineren Fokallvolumina besser erfassen [23].

Die Bedeutung, die diese Entwicklung für die Lebenswissenschaften haben wird, beginnt sich erst abzuzeichnen. So gelang es mit der STED-Mikroskopie erstmals, das neuronale Protein Synaptotagmin aus einzelnen neuronalen Bläschen (Vesikel) direkt an der Synapse aufzulösen und eine langjährige Debatte über seine Verteilung zu beenden [10]. Mithilfe eines STED-Mikroskops ließ sich herausfinden, wie viele Syntaxin-1 Proteine an der präsynaptischen Membran zusammenfinden müssen, damit Vesikel mit ihr verschmelzen können [24] – um nur zwei Beispiele zu nennen. Führt man sich vor Augen, dass die meisten Proteininteraktionen der Zelle auf einer Skala von 10 bis 200 nm stattfinden und dass dieser Bereich bisher mangels geeigneter Methoden kaum zugänglich war, so lässt sich bereits erahnen, dass der fernfeldoptischen Nanoskopie eine Schlüsselrolle in den Lebenswissenschaften zukommen wird. STED-Mikroskope sind bereits kommerziell erhältlich. Es ist davon auszugehen, dass binnen fünf Jahren die fernfeldoptische Nanoskopie zum Standardrepertoire zellbiologischer Forschung gehören wird.

*

Mein Dank gilt allen Mitstreitern, die zu den hier berichteten Arbeiten maßgeblich beigetragen haben, insbesondere Katrin Willig, Volker Westphal, Christian Eggeling, Lars Kastrop, Andreas Schönle und Alexander Egner, als auch den neueren Mitarbeitern Benjamin Harke, Mariano Bossi und Jonas Fölling sowie den Ehemaligen Thomas Klar, Marcus Dyba und Gerald Donnert.

Literatur

- [1] D. W. Pohl, W. Denk und M. Lanz, *Appl. Phys. Lett.* **44**, 651 (1984)
 [2] J. B. Pendry, *Phys. Rev. Lett.* **85**, 3966 (2000)
 [3] P. Guttmann et al., *J. de Physique IV* **104**, 85 (2003)
 [4] S. W. Hell und J. Wichmann, *Opt. Lett.* **19**, 780 (1994)

- [5] S. W. Hell, *Nature Biotechnol.* **21**, 1347 (2003)
 [6] S. W. Hell, *Science* **316**, 1153 (2007)
 [7] S. W. Hell, *Phys. Lett. A* **326**, 140 (2004)
 [8] M. Dyba und S. W. Hell, *Phys. Rev. Lett.* **88**, 163901 (2002)
 [9] V. Westphal und S. W. Hell, *Phys. Rev. Lett.* **94**, 143903 (2005)
 [10] K. I. Willig et al., *Nature* **440**, 935 (2006)
 [11] K. I. Willig et al., *New J. Phys.* **8**, 106 (2006)
 [12] G. Donnert et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **103**, 11440 (2006)
 [13] K. I. Willig et al., *Nature Methods* **4**, 915 (2007)
 [14] T. A. Klar et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **97**, 8206 (2000)
 [15] R. Heintzmann et al., *J. Opt. Soc. Am. A* **19**, 1599 (2002) und M. G. L. Gustafsson, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **102**, 13081 (2005)
 [16] S. W. Hell, S. Jakobs und L. Kastrop, *Appl. Phys. A* **77**, 859 (2003)
 [17] S. W. Hell und M. Kroug, *Appl. Phys. B* **60**, 495 (1995),
 [18] S. Bretschneider, C. Eggeling und S. W. Hell, *Phys. Rev. Lett.* **98**, 218103 (2007)
 [19] M. Hofmann et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **102**, 17565 (2005), M. Bossi et al., *New J. Phys.* **8**, 275 (2006)
 [20] S. W. Hell, J. Soukka und P. E. Hänninen, *Bioimaging* **3**, 65 (1995)
 [21] E. Betzig et al., *Science* **313**, 1642 (2006)
 [22] A. Egner et al., *Biophys. J.* **93**, 3285 (2007) und J. Fölling et al., *Angew. Chem. Int. Ed.* **46**, 6266 (2007)
 [23] L. Kastrop et al., *Phys. Rev. Lett.* **94**, 178104 (2005)
 [24] J. J. Sieber et al., *Science* **317**, 1072 (2007)

DER AUTOR

Stefan W. Hell (44) studierte Physik in Heidelberg, wo er 1990 promovierte und sich 1996 habilitierte. Bereits gegen Ende seiner Promotion begann Hell, sich der Aufgabe zu widmen, Abbes Beugungsgrenze im Fernfeldmikroskop zu überwinden. Nach kurzer Zeit als freier Erfinder ging er zunächst für zwei Jahre an das Europäische Molekularlaboratorium (EMBL) in Heidelberg. Zwischen 1993 und 1996 forschte er an der Universität Turku in Finnland sowie in Oxford. 1997 wechselte Hell zum Göttinger MPI für Biophysikalische Chemie, wo er im Jahr 2002 zum Direktor berufen wurde. Darüber hinaus leitet er eine Arbeitsgruppe am Deutschen Krebsforschungszentrum in Heidelberg. Seiner alma mater ist er auch als außerplanmäßiger Professor verbunden, der Göttinger Physik als Honorarprofessor und Mitglied der dortigen Akademie.



Deutscher Zukunftspreis,
A. Pudenz