

# Superhochauflösende Mikroskopie: Nobelpreis in Chemie 2014 für Eric Betzig, Stefan Hell und William E. Moerner\*\*

Leonhard Möckl, Don C. Lamb und Christoph Bräuchle\*

Einzelmoleküldetektion · Nobelpreis · PALM · STED ·  
Superhochauflösung

**D**er Nobelpreis für Chemie 2014 wurde zu je einem Drittel an Eric Betzig, Stefan Hell und William E. Moerner „für die Entwicklung der superhochauflösenden Mikroskopie“ vergeben. Die Auflösungsbegrenzung für optische Mikroskope, die Ernst Abbe in seiner berühmten Gleichung vor fast 150 Jahren niederschrieb, wurde allgemein für unüberwindbar gehalten:

$$\Delta x_{\min}, \Delta y_{\min} = \lambda / (2n \sin \alpha) \approx \lambda / 2$$

wobei  $\lambda$  die Wellenlänge des Lichts,  $n$  den Brechungsindex des Mediums und  $\alpha$  den halben Aperturwinkel der Objektivlinse bezeichnen.<sup>[1]</sup> Daraus folgt, dass zwei Objekte mindestens 200 nm oder etwa die halbe Wellenlänge des verwendeten Lichts voneinander entfernt sein müssen, wenn sie durch Lichtmikroskopie getrennt abgebildet werden sollen. Den bahnbrechenden Arbeiten der drei Nobelpreisträger ist es zu verdanken, dass diese Grenze umgangen und optische Mikroskopie zu Nanoskopie werden konnte. Sie erlaubt Wissenschaftlern, den Weg einzelner Moleküle in einer lebenden Zelle zu verfolgen, Moleküle beim Ausbilden von Synapsen zwischen Nervenzellen im Gehirn zu beobachten und die Aggregation von Proteinen im Verlauf von Krankheiten wie Alzheimer, Parkinson oder Chorea Huntington aufzulösen, um nur einige der bisher bewältigten Herausforderungen zu benennen.<sup>[2]</sup> Wie ist es dazu gekommen?

Die diesjährigen Nobelpreisträger entwickelten zwei unterschiedliche und voneinander unabhängige Ansätze, um die Auflösungsbegrenzung zu umgehen. Der eine Ansatz, auf den wir zuerst eingehen werden, basiert auf der Detektion einzelner Moleküle und ihrer bis auf wenige Nanometer präzisen Ortsbestimmung<sup>[3]</sup> (Moerner 1989) sowie auf einem Verfahren,<sup>[4]</sup> bei dem sehr viele Moleküle, die eine komplexe Struktur definieren, mit dieser hohen Genauigkeit lokalisiert werden können (Betzig 1995/2006). Der andere Ansatz, den

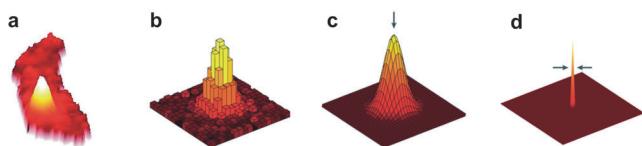
wir danach beschreiben werden, verwendet ein spezielles Beleuchtungsmuster, um angeregte Fluorophore und ihre Photonenemission räumlich einzuschränken<sup>[5]</sup> (Hell 1994/2000).

Im Jahr 1952 schrieb Erwin Schrödinger: „[...] Wir experimentieren niemals mit nur einem Elektron, Atom oder (kleinem) Molekül. In Gedankenexperimenten tun wir manchmal so, als könnten wir es;“<sup>[6]</sup> 1989, nach weniger als vier Jahrzehnten, widerlegte W. E. Moerner diese Aussage,<sup>[3]</sup> indem er ein einzelnes Molekül über dessen Absorption detektierte. Ein Jahr später wies Michel Orrit einzelne Moleküle auch durch ihre Fluoreszenz nach.<sup>[7]</sup> Während die ersten Experimente Tieftemperaturexperimente waren,<sup>[8]</sup> wurden noch im selben Jahr auch einzelne Moleküle bei Raumtemperatur detektiert,<sup>[9]</sup> was natürlich insbesondere für biologische Fragestellungen höchst relevant ist. Mit all diesen Ansätzen wurde der Grundstein für die Entwicklung der Einzelmolekülspektroskopie und -mikroskopie gelegt und das Konzept in die Physik, die Chemie und die Biologie getragen.<sup>[10]</sup> Damit war der Blick auf ein einzelnes Molekül und sein Verhalten nicht mehr wie zuvor durch Ensemblemitteilung ver stellt. Von den zahlreichen Experimenten aus dieser Zeit hatte die Entwicklung zur Mikroskopie die weitreichendsten Auswirkungen.

Der entscheidende Punkt für die Mikroskopie ist, dass das Intensitätsprofil eines einzelnen Fluoreszenzmittlers zwar der Beugung unterliegt, aber das Zentrum des Profils mit weit höherer Präzision bestimmt werden kann: Der Durchmesser eines fluoreszierenden Moleküls beträgt lediglich ca. 1 nm, hingegen ist das Fluoreszenzsignal, das durch Beugung innerhalb des Mikroskops erzeugt wird, mit einem Durchmesser von etwa 200 nm sehr viel größer, wie in Abbildung 1 a und b gezeigt. Diese beugungsbegrenzte Intensitätsverteilung wird als „point spread function“ (PSF) bezeichnet und kann durch eine zweidimensionale Gauß-Funktion angenähert werden (Abbildung 1 c). Vorausgesetzt, dass dieses Signal nur von einem Emitter – einem einzelnen Molekül – stammt, kann das Zentrum der PSF und damit die Position des Emitters mit sehr hoher Präzision (oft Superlokalisierung genannt) ermittelt werden. Die Genauigkeit dieser Positionsbestimmung hängt von der Anzahl der detektierten Photonen ab: Je größer sie ist, desto schärfer wird die Spitze der PSF

[\*] M. Sc. L. Möckl, Prof. Dr. D. C. Lamb, Prof. Dr. C. Bräuchle  
Department Chemie und Center for NanoScience (CeNS)  
Ludwig-Maximilians-Universität München (LMU)  
Butenandtstraße 5–13 (E), 81377 München (Deutschland)  
E-Mail: Christoph.Braeuchle@lmu.de

[\*\*] Wir danken Frauke Mickler und Philipp Messer für ihre Hilfe bei der Erstellung des Manuskripts.



**Abbildung 1.** Beugungsbegrenzte Detektion und Positionsbestimmung. Werden Photonen eines einzelnen Emitters detektiert, bilden sie ein beugungsbegrenztes Muster, die PSF. a) Reale Messung eines einzelnen YFP-Moleküls in einem Bakterium. b) PSF pixeliert auf einer Kamera. c) Die PSF kann durch eine zweidimensionale Gauß-Funktion angenähert werden. d) Das Zentrum der Gauß-Funktion kann mit sehr hoher Genauigkeit bestimmt werden.<sup>[35]</sup>

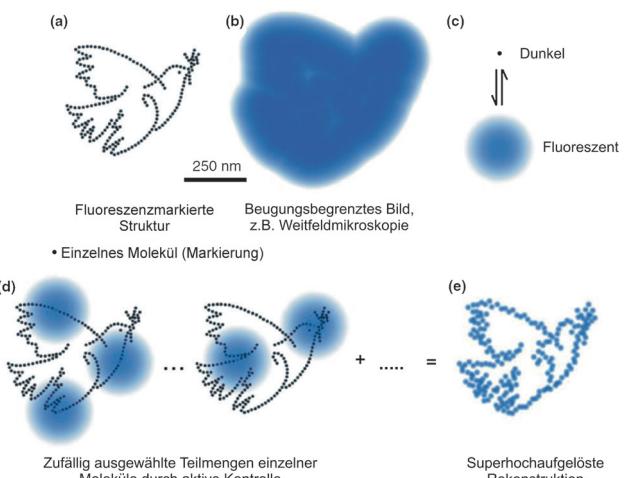
und damit ihre Lokalisierung. Dies drückt sich in einer modifizierten Abbe-Gleichung aus:

$$\Delta x_{\min}, \Delta y_{\min} = [\lambda / (2n \sin \alpha)] / \sqrt{N}$$

wobei  $N$  die Zahl der detektierten Photonen ist. Wird also ein einzelner Emitter mit 100 Photonen detektiert, so erhöht sich die Genauigkeit seiner Lokalisation um den Faktor 10 (Abbildung 1 d). Diese hochauflösende Mikroskopie erlaubt das Verfolgen einzelner Moleküle mit einer Positionierungsgenauigkeit im Bereich von wenigen Nanometern (FIONA, 1.5 nm). Es konnte damit beispielsweise die Hand-über-Hand-Fortbewegung des Motorproteins Myosin V aufgedeckt<sup>[11]</sup> und die dreidimensionale Bewegung von mRNA-Molekülen in Hefezellen mit hoher Genauigkeit visualisiert werden.<sup>[12]</sup>

Für die Verfolgung einzelner Moleküle genügt zwar ein einzelner Emitter, jedoch reicht dies für die korrekte Abbildung einer komplexen Struktur mit zahlreichen Details nicht aus; dafür sind viele Emitter als Markierung erforderlich (Abbildung 2 a). Allerdings lassen sich deren Positionen nicht mit hoher Präzision bestimmen, wenn sie alle zur gleichen Zeit angeregt werden, da sich dann ihre PSFs überschneiden (Abbildung 2 b). Dies führt zu einem verschwommenen Bild, wie es in der konventionellen optischen Fluoreszenzmikroskopie erhalten wird. Wählt man hingegen aus der Gesamtzahl der Markierungen einen hoch verdünnten Satz aus, was getrennte PSFs sicherstellen würde, so lässt sich die Struktur damit leider nicht korrekt wiedergeben. Der Grund liegt im „Undersampling“, wie es auch aus dem Nyquist-Shannon-Kriterium folgt.<sup>[13]</sup> Es wird also gleichzeitig sowohl eine hohe Emitterkonzentration für das vollständige Nachzeichnen der Struktur als auch eine niedrige Emitterkonzentration für ausreichend getrennte PSFs und die präzise Positionsbestimmung der einzelnen Markierungen benötigt.

Es war Eric Betzig, der als erster eine Idee<sup>[4a]</sup> zur Lösung dieses Widerspruchs hatte. Danach sollte eine spektrale Eigenschaft der Emitter dazu dienen, sie in Teilmengen zu isolieren. In den Teilmengen sind die Emitter verdünnt über die Struktur verteilt, sodass ihre Positionen genau bestimmt werden können. Die Messung einer Teilmenge nach der anderen und die anschließende Summierung über alle Positionsbestimmungen erzeugt dann das Gesamtbild in hoher Auflösung. In seiner Publikation von 1995 schlug Betzig vor, als spektrale Eigenschaft die Inhomogenität im Anregungs-wellenlängenbereich der Emitter einzusetzen.<sup>[14]</sup> Es stellte



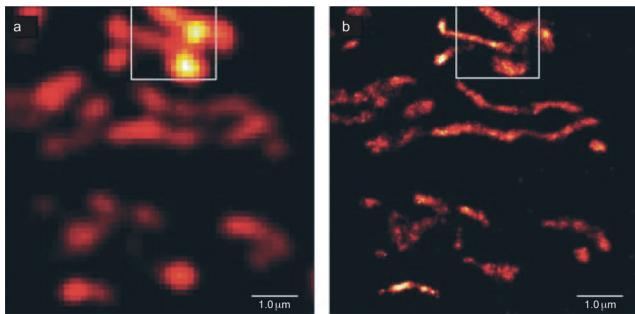
**Abbildung 2.** Prinzip der Lokationsmikroskopie. a) La Paloma de la Paz (P. Picasso, 1961), nachgebildet von fluoreszierenden Molekülen. Die Markierungsdichte ist sehr hoch. b) Wird dieses Muster mit konventioneller Mikroskopie abgebildet, können die einzelnen Markierungen aufgrund von Abbes Formel nicht aufgelöst werden. c,d) Werden hingegen vor jeder Aufnahme nur wenige Fluorophore stochastisch in den fluoreszierenden Zustand überführt, sind in jedem „Frame“ nur wenige beugungsbegrenzte Signale vorhanden, die mit hoher Präzision lokalisiert werden können. e) Die Summe aller Positionierungen führt dann zum pointillistisch rekonstruierten, superhochauflösten Bild.<sup>[36]</sup>

sich allerdings heraus, dass dieses Kriterium schwierig in einem allgemeinen Kontext einsetzbar ist.

Einmal mehr war es W. E. Moerner, der, nachdem der Stein ins Rollen gebracht war, mit einem wichtigen Experiment zur weiteren Entwicklung beitrug: Als er Mutanten des grün fluoreszierenden Proteins (GFP) untersuchte, stieß er auf eine seltsame photophysikalische Eigenschaft der T203F-Mutante.<sup>[15]</sup> Sie fluoreszierte bei Einstrahlung mit Laserlicht von 488 nm, ging aber nach einiger Zeit in einen dunklen Zustand über. Faszinierenderweise war die Mutante aber nicht irreversibel geblieben, sondern konnte bei Einstrahlung von Licht einer Wellenlänge mit 405 nm wieder in den fluoreszierenden Zustand überführt werden. (Abbildung 2 c). Diese Entdeckung war der Ausgangspunkt für die Suche nach weiteren GFP-Mutanten mit ähnlichen photophysikalischen Eigenschaften. Dabei stand diese Suche allerdings vorerst nicht im Kontext superhochauflösender Mikroskopie.<sup>[16]</sup>

Erst Betzig, der nach einem Abstecher in die Industrie an die Universität zurückkehrte, führte die Fäden zusammen und machte den letzten Schritt zur superhochauflösenden Mikroskopie. Er erkannte, dass durch solche Mutanten das Problem hoher und geringer Markierungsdichte auf einer Struktur elegant gelöst werden kann: Die zu untersuchende Struktur wird zunächst mit einer GFP-Mutante in hoher Dichte markiert, welche zu Beginn des Experiments nicht fluoreszierend ist. Durch einen Laserpuls der passenden Wellenlänge mit niedriger Intensität werden einige wenige GFP-Mutanten stochastisch in den fluoreszierenden Zustand überführt und bilden dann die dünn verteilten Emitter einer Teilmenge. Sie können nach Anregung mit 488 nm sehr genau lokalisiert werden. Nachdem sie vollständig geblieben sind, wird im folgenden „Frame“ eine neue Teilmenge von GFP-

Mutanten aktiviert und der Zyklus beginnt von neuem (Abbildung 2d). Schließlich erhält man das gesamte Bild in Superhochauflösung durch Aufsummieren der einzelnen Emitter aller „Frames“ (Abbildung 2e). Die erhebliche Steigerung der Auflösung auf typischerweise etwa 20 nm wird sehr schön an zwei Bildern aus Betzigs grundlegender Veröffentlichung<sup>[4b]</sup> aus dem Jahr 2006 deutlich (Abbildung 3). In dieser bezeichnete er die Technik als „photo-activated localization microscopy“ oder PALM.



**Abbildung 3.** Mitochondrien in COS-7-Zellen. a) Durch interne Totalreflexionsfluoreszenzmikroskopie (TIRF-Mikroskopie) und b) PALM gewonnene Bilder von Mitochondrien in COS-7-Zellen. Die Mitochondrien wurden mit einem photoschaltbaren fluoreszierenden Protein (dEosFP) markiert. Während TIRF-Mikroskopie nur die ungefähre Form der Mitochondrien zeigen kann, erlaubt PALM, Details im Längenbereich von 20–30 nm sichtbar zu machen, deutlich unterhalb der Beugungsbegrenzung.<sup>[4b]</sup>

Zusammenfassend müssen also zwei wesentliche Voraussetzungen erfüllt sein. Zum einen müssen die Fluorophore, die die Struktur markieren, kontrolliert schaltbar sein. Dadurch erreicht man, dass in jedem Bild nur eine geringe Teilmenge räumlich getrennter Emitter fluoresziert. Zum anderen muss jede PSF eines Emitters mit einer angemesenen Modellfunktion angenähert werden, wodurch sich dessen Position mit hoher Genauigkeit bestimmen lässt. Am Ende wird durch Aufsummieren aller Emitterpositionen die Struktur superhochauflösend in pointelistischer Weise rekonstruiert. Neben PALM wurden im Jahr 2006 zwei weitere Methoden vorgestellt, die verschiedene Mechanismen zur Schaltung der Fluorophore verwenden: fPALM<sup>[17]</sup> und STORM,<sup>[18]</sup> gefolgt von zahlreichen weiteren Ansätzen.<sup>[21]</sup>

Natürlich haben PALM und verwandte Verfahren auch ihre Grenzen. Eine ist die Zeitauflösung, die durch die erforderlichen zahlreichen Lokalisierungen und die nachträgliche Bildrekonstruktion eingeschränkt wird. Auch die fehlende dreidimensionale Auflösung war ursprünglich eine Limitierung, denn das Leben spielt sich in drei Dimensionen ab. Sie konnte jedoch z.B. durch Verwendung des Astigmatismus<sup>[19]</sup> oder Doppelhelix-PSF-basierter Methoden<sup>[20]</sup> überwunden werden. Ein weiterer Fortschritt stellt die Verwendung verschiedenfarbiger Markierungen dar.<sup>[21]</sup> Auch die Zeitauflösung ist inzwischen in Richtung Videorate verbessert worden.<sup>[22]</sup>

Einen alternativen Ansatz für superhochauflösende Mikroskopie, der auf räumlich modifizierter Beleuchtung basiert, wurde von Stefan Hell entwickelt. Sein Wunsch war es

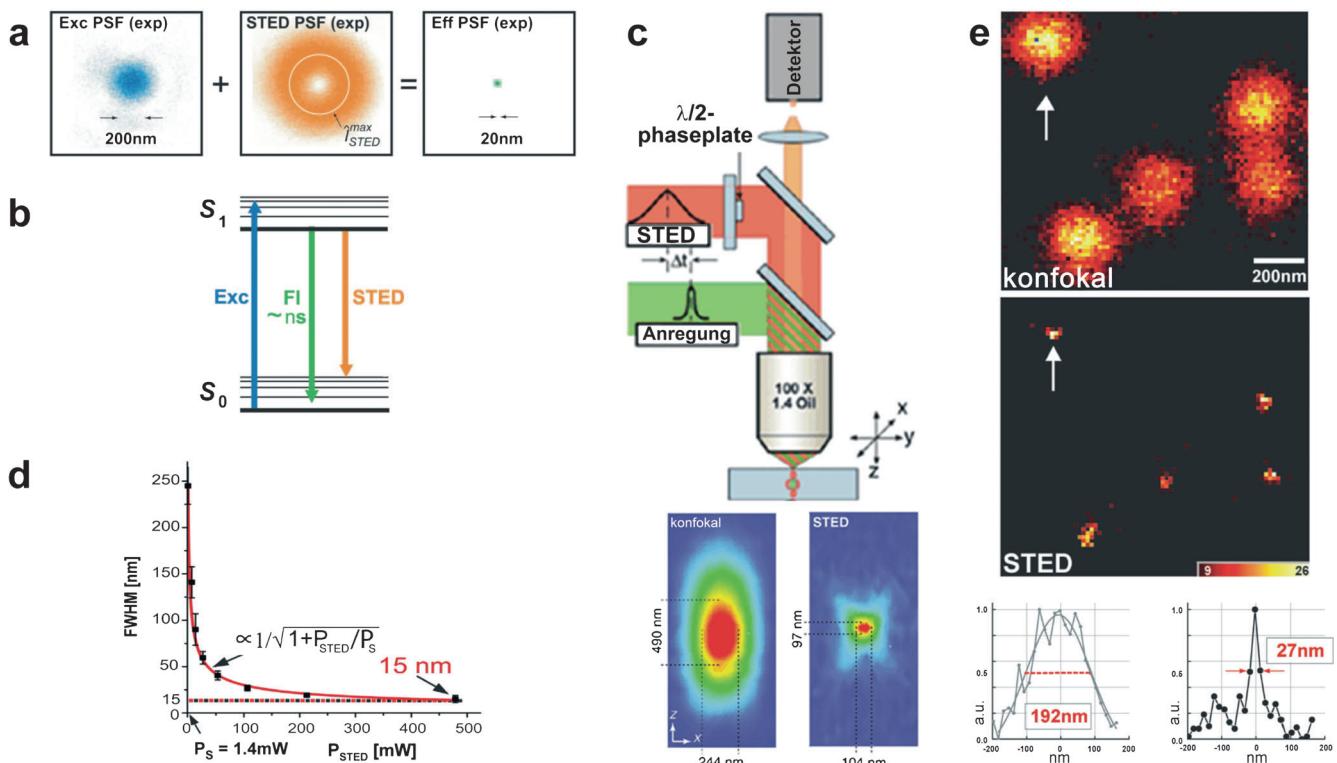
schon zu Beginn seiner Karriere, die Auflösung optischer Mikroskope unter das Beugungslimit zu verbessern. Während seines Aufenthalts an der Universität Turku in Finnland publizierte er 1994 ein theoretisches Konzept, um Superhochauflösung zu erreichen: stimulated emission depletion (STED)-Mikroskopie.<sup>[5a]</sup> Für diesen Ansatz sind zwei Laser erforderlich: Der eine Laser regt wie bei konventioneller Fluoreszenzmikroskopie die Probe an, während ein zweiter Laser Moleküle abregt, die sich nicht im Zentrum des Anregungsbereichs des ersten Lasers befinden (Abbildung 4a). Die Abregung wird durch stimuliertes Emission erreicht, eine der drei grundlegenden Interaktionen von Licht mit Materie, neben Absorption und spontaner Emission (Abbildung 4b). Die Moleküle im Zentrum des Anregungslasers bleiben von der Wirkung des STED-Lasers unberührt und können fluoreszieren, jedoch in einem räumlich deutlich eingeschränkten Bereich. Durch dieses Verfahren sollte die effektive Größe der Anregungs-PSF deutlich reduziert werden können (sowohl Anregungs- wie auch STED-Laser unterliegen der Beugung und haben dadurch jeweils ihre eigene PSF, d.h. Intensitätsverteilung auf der Probe; siehe Abbildung 4a).

Die Reaktionen auf diesen Vorschlag waren teilweise skeptisch. Dennoch bekam Stefan Hell die Gelegenheit, seine Idee zu realisieren, als ihm das Max-Planck-Institut in Göttingen im Dezember 1996 eine Stelle als Juniorgruppenleiter anbot. Er hatte Erfolg: Die erste experimentelle Umsetzung der STED-Mikroskopie gelang im Jahr 2000,<sup>[5b]</sup> wodurch die axiale Auflösung des Mikroskops um den Faktor 5 von 490 nm auf 97 nm erhöht wurde (Abbildung 4d), gezeigt anhand von 48 nm großen Beads, die mit dem Farbstoff LDS 751 markiert waren. Seit diesem ersten erfolgreichen STED-Experiment wurden weitere Experimente durchgeführt und elegante Wege gefunden, um auch die radiale Auflösung zu erhöhen.<sup>[23]</sup> Durch Kombination beider Ansätze konnte schließlich die Auflösung in allen drei Dimensionen deutlich verbessert werden.<sup>[24]</sup>

Die STED-Mikroskopie baut somit auf drei Gedanken auf. Der erste ist, stimuliertes Emission einzusetzen, um Moleküle vom angeregten Zustand in den elektronischen Grundzustand abzuregen. Dies geschieht durch Überlagerung des STED-Lasers mit dem Anregungslaser. Der zweite besteht darin, durch Modifikation der STED-Laser-PSF die Abregungsregion so zu modifizieren, dass in ihrer Mitte keine Abregung stattfindet (Donutform), wodurch angeregte Moleküle an dieser Stelle erhalten bleiben und fluoreszieren können. Dies wird momentan durch Phasenplatten erreicht, die durch konstruktive und destruktive Interferenz das gewünschte Muster erzeugen. Der dritte Gedanke besteht in der Sättigung der stimulierten Emission (Abbildung 4d). Davon und von der verfügbaren Intensität des STED-Lasers hängt letztlich die erreichbare Verbesserung der Auflösung ab. Diese wird durch eine modifizierte Abbe-Formel beschrieben:

$$\Delta x_{\min}, \Delta y_{\min} = \lambda / \left[ (2n \sin \alpha) \sqrt{1 + I_{\text{STED}} / I_{\text{sat}}} \right]$$

Dabei steht  $I_{\text{STED}}$  für die Intensität des STED-Lasers und  $I_{\text{sat}}$  charakterisiert als molekulare Eigenschaft die Wahrscheinlichkeit, mit der ein Molekül stimuliert Emission zeigt.



**Abbildung 4.** Prinzip der STED-Mikroskopie a) Intensitätsverteilung des Anregungslasers (links), des STED-Strahls (Mitte) und der effektiven PSF (rechts) durch Überlagerung.<sup>[25]</sup> b) Jablonski-Termschema mit den Übergängen, die in der STED-Mikroskopie von Bedeutung sind. Fluorophore werden mit dem Anregungslaser in den S1-Zustand angeregt, während der STED-Laser Moleküle außerhalb des Zentrums der PSF vom vibronischen Grundzustand von S1 in höhere vibronische Zustände von S0 abgeregelt.<sup>[25]</sup> c) Oberes Bild: Schematische Darstellung des ersten STED-Mikroskops. Unteres Bild: Die PSF von 48 nm großen Beads, welche mit dem Fluorophor LDS 751 markiert sind, und sowohl mit konfokaler Mikroskopie als auch mit STED vermessen wurden. Im STED-Bild ist die laterale Ausdehnung der PSF auf 97 nm reduziert.<sup>[26]</sup> d) Die Halbwertsbreite (FWHM) der effektiven PSF als Funktion der Intensität des STED-Strahls.<sup>[33]</sup> e) Synaptotagmin in Endosomen. Während das konfokale Bild beugungslimitierte Endosomen von rund 200 nm zeigt, erlaubt STED die wahre Größe der Objekte mit rund 30 nm darzustellen. Auch die Intensitätsprofile zeigen die deutliche Verbesserung der optischen Auflösung.<sup>[25]</sup>

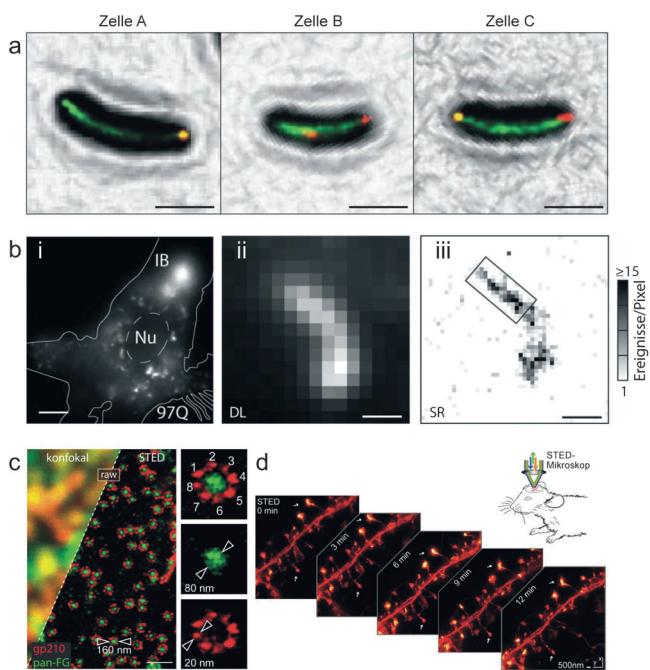
In Abbildung 4e ist ein Beispiel dargestellt, das die Vorteile von STED klar zeigt. Synaptotagmin I, das sich als transmembranes Protein in synaptischen Vesikeln befindet, wurde in aufgereinigten Endosomen markiert und mit einerseits konfokaler sowie andererseits STED-Mikroskopie dargestellt.<sup>[25]</sup> Die hohe Auflösung von STED erlaubt die Visualisierung kleinsten Proteincluster innerhalb der Endosomen.

Die besondere Eigenschaft von STED ist die Verkleinerung der effektiven PSF des Mikroskops auf physikalischem Wege, was sowohl für einzelne Moleküle als auch für ein Ensemble an Molekülen verwendet werden kann. Nichtsdestoweniger hat auch STED seine Grenzen. Das größte Problem ist die hohe Intensität des STED-Lasers, die für die stimulierte Emission benötigt wird, aber auch zu einem schnellen Ausbleichen der Probe und z.B. der Schädigung von lebenden Zellen führen kann. Dadurch müssen die Fluorophore für STED äußerst photostabil sein, was ihre Auswahl einschränkt.

Die STED-Mikroskopie entwickelt sich jedoch schnell weiter. Beispielsweise wurde Zwei- und Dreifarben-STED-Mikroskopie eingeführt,<sup>[26]</sup> die Entwicklung neuer Fluorophore vorangetrieben,<sup>[27]</sup> die Auflösung in Kombination mit

Fluoreszenzlebensdauermessungen weiter verbessert<sup>[28]</sup> und z.B. die hochauflöste Untersuchung von Lipid-Rafts zusammen mit Fluoreszenzkorrelationsspektroskopie ermöglicht,<sup>[29]</sup> um nur einige Fortschritte zu benennen. Kürzlich wurde auch eine weitere, STED-ähnliche Methode vorgestellt, RESOLFT genannt,<sup>[30]</sup> die auf photoschaltbaren Proteinen beruht und Superhochauflösung mit ca. einer Millionstel der Laserleistung klassischer STED-Mikroskopie erlaubt.

Es ist wichtig zu betonen, dass nicht allein Superhochauflösung die Stärke dieser beiden neuen Mikroskopietechniken ist – Elektronenmikroskopie ist diesbezüglich immer noch überlegen. Aber durch die Spezifität der Fluoreszenzmarkierungen in Kombination mit der Möglichkeit, lebende Zellen ohne vorausgehende komplizierte Probenpräparation zu untersuchen, eröffnet die superhochauflösende Mikroskopie Einblicke, die durch keine andere Methode gewonnen werden können. Weiterhin erlaubt sie, dynamische Prozesse in der lebenden Zelle zu verfolgen, was mithilfe der Elektronenmikroskopie ausgeschlossen ist. Vier Beispiele für kürzlich veröffentlichte Forschungsergebnisse, in denen superhochauflösende Mikroskopie eingesetzt wurde, sind in Abbildung 5 gezeigt. An ihnen wird ihr Einfluss auf ver-



**Abbildung 5.** Aktuelle Beispiele für superhochauflösende Mikroskopie in lebenden Zellen. a) Der Partitioning (Par) Apparatus zur Chromosomensegregation in *Caulobacter crescentus* wurde durch Zweifarben-PALM dargestellt. Diskrete lineare Strukturen der ATPase ParA sind aufgelöst, die den ParB-parS-Komplex zum neuen Spindelpol leiten (grün: ParA-eYFP, rot: ParB-CFP, verschiedene Stadien von Par). Zelle A: vor Initiierung der Replikation, Zelle B: während Segregation, Zelle C: nach parS-Segregation (Maßstab = 1  $\mu$ m).<sup>[31]</sup> b) Kleine Huntingtonin-Aggregate in neuronaler Modellzelle (PC12m). i,ii) Beugungsbegrenzte Bilder zeigen die subzelluläre Verteilung des mutierten Huntington-Exon-1-Proteins (Htt1-ex1-97Q-eYFP; 16 h nach Transfektion). Nu = Nukleus, Maßstab = 5  $\mu$ m für (i) und 500 nm für (ii). iii) Superhochauflösende (SR) Rekonstruktion durch PALM des einzelnen kleinen Huntingtonin-Aggregats (Maßstab = 500 nm), welches in (ii) konfokal dargestellt ist. Die umrissene Region wurde verwendet, um die Dicke der Faser zu etwa 90 nm zu bestimmen. Dies ist die erste Beobachtung kleiner Huntingtonin-Aggregate, die vermutlich relevant für die Krankheit sind.<sup>[32]</sup> c) Zweifarben-STED-Bild eines Amphibien-Kernporenkomplexes (KPK). In der oberen linken Region zum Vergleich die schlechtere konfokale Auflösung. Die achtfache Symmetrie des KPKs wurde mithilfe spezifischer Antikörper gegen gp210 (rot) dargestellt. In einer weiteren Farbe wurde das Zentrum der KPK durch Antikörper, die für Nukleoporin spezifisch sind, angefärbt (grün).<sup>[33]</sup> (d) STED-Mikroskopie von Aktin (markiert durch YFP-LifeAct) in Nervenzellen des Gehirns einer lebenden Maus. Dynamische Umorganisation des Aktins in dendritischen Dornen über 12 Minuten mit einer Auflösung von 60 nm.<sup>[34]</sup>

schiedene Forschungsfragen deutlich: Segregation von Chromosomen in Bakterien,<sup>[31]</sup> Aggregation eines Huntingtonproteins in Neuronen,<sup>[32]</sup> der Aufbau des Kernporenkomplexes,<sup>[33]</sup> und In-vivo-Mikroskopie von Dendriten im Gehirn einer lebenden Maus.<sup>[34]</sup>

Einzelmolekülexperimente und die superhochauflösende Fluoreszenzmikroskopie wurden in der Fachwelt begeistert aufgenommen. Inzwischen sind diese Methoden kommerziell erhältlich, wodurch sie auch von Nichtspezialisten eingesetzt werden können. Damit ist die Möglichkeit geschaffen, sie für viele Fragen im Bereich der Chemie und der Zellbiologie bis hin zur Medizin einzusetzen.

Es ist bemerkenswert, dass der Nobelpreis für superhochauflösende Fluoreszenzmikroskopie im Bereich Chemie verliehen wurde. Das Problem der Auflösung ist von physikalischer Natur mit wichtigen Anwendungen in der Biologie, wodurch bereits der interdisziplinäre Charakter dieses Themas benannt ist. Es sind jedoch Moleküle, die im Zentrum dieser Methoden stehen – und die wesentlichen Ergebnisse betreffen Moleküle, molekulare Strukturen und deren Verhalten.

Eingegangen am 20. Oktober 2014  
Online veröffentlicht am 4. November 2014

- [1] E. Abbe, *Arch. Mikrosk. Anat. Entwicklungsmech.* **1873**, 9, 413–418.
- [2] M. A. Thompson, M. D. Lew, W. E. Moerner, *Annu. Rev. Biophys.* **2012**, 41, 321–342.
- [3] W. E. Moerner, L. Kador, *Phys. Rev. Lett.* **1989**, 62, 2535–2538.
- [4] a) E. Betzig, *Opt. Lett.* **1995**, 20, 237–239; b) E. Betzig, G. H. Patterson, R. Sougrat, O. W. Lindwasser, S. Olenych, J. S. Bonifacino, M. W. Davidson, J. Lippincott-Schwartz, H. F. Hess, *Science* **2006**, 313, 1642–1645.
- [5] a) S. W. Hell, J. Wichmann, *Opt. Lett.* **1994**, 19, 780–782; b) T. A. Klar, S. Jakobs, M. Dyba, A. Egner, S. W. Hell, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2000**, 97, 8206–8210; c) S. W. Hell, M. Kroug, *Appl. Phys. B* **1995**, 60, 495–497.
- [6] E. Schrödinger, *Br. J. Phil. Sci.* **1952**, III, 233–242.
- [7] M. Orrit, J. Bernard, *Phys. Rev. Lett.* **1990**, 65, 2716–2719.
- [8] W. E. Moerner, T. Basché, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1993**, 32, 457–476; *Angew. Chem.* **1993**, 105, 537–557.
- [9] E. B. Shera, N. K. Seitzinger, L. M. Davis, R. A. Keller, S. A. Soper, *Chem. Phys. Lett.* **1990**, 174, 553–557.
- [10] *Single Molecule Spectroscopy in Chemistry, Physics and Biology (Nobel Symposium 2008)* (Hrsg.: A. Gräslund, R. Rigler, J. Widenrgen), Springer, Heidelberg, **2010**.
- [11] A. Yildiz, J. N. Forkey, S. A. McKinney, T. Ha, Y. E. Goldman, P. R. Selvin, *Science* **2003**, 300, 2061–2065.
- [12] M. A. Thompson, J. M. Casolari, M. Badieirostami, P. O. Brown, W. E. Moerner, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2010**, 107, 17864–17871.
- [13] a) C. E. Shannon, *Proc. IRE* **1949**, 37, 10–21; b) H. Nyquist, *Trans. AIEE* **1928**, 47, 617–644.
- [14] A. M. van Oijen, J. Kohler, J. Schmidt, M. Muller, G. J. Braekhoff, *Chem. Phys. Lett.* **1998**, 292.
- [15] R. M. Dickson, A. B. Cubitt, R. Y. Tsien, W. E. Moerner, *Nature* **1997**, 388, 355–358.
- [16] G. H. Patterson, J. Lippincott-Schwartz, *Science* **2002**, 297, 1873–1877.
- [17] S. T. Hess, T. P. Girirajan, M. D. Mason, *Biophys. J.* **2006**, 91, 4258–4272.
- [18] M. J. Rust, M. Bates, X. Zhuang, *Nat. Methods* **2006**, 3, 793–795.
- [19] B. Huang, W. Wang, M. Bates, X. Zhuang, *Science* **2008**, 319, 810–813.
- [20] S. R. Pavan, M. A. Thompson, J. S. Bieten, S. J. Lord, N. Liu, R. J. Twieg, R. Piestun, W. E. Moerner, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2009**, 106, 2995–2999.
- [21] H. Shroff, C. G. Galbraith, J. A. Galbraith, H. White, J. Gillette, S. Olenych, M. W. Davidson, E. Betzig, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2007**, 104, 20308–20313.
- [22] F. Huang, T. M. Hartwich, F. E. Rivera-Molina, Y. Lin, W. C. Duim, J. J. Long, P. D. Uchil, J. R. Myers, M. A. Baird, W. Mothes, M. W. Davidson, D. Toomre, J. Bewersdorf, *Nat. Methods* **2013**, 10, 653–658.
- [23] P. Török, P. R. T. Munro, *Opt. Express* **2004**, 12, 3605–3617.

- [24] D. Wildanger, R. Medda, L. Kastrup, S. W. Hell, *J. Microsc.* **2009**, *236*, 35–43.
- [25] G. Donnert, J. Keller, R. Medda, M. A. Andrei, S. O. Rizzoli, R. Luhrmann, R. Jahn, C. Eggeling, S. W. Hell, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2006**, *103*, 11440–11445.
- [26] a) G. Donnert, J. Keller, C. A. Wurm, S. O. Rizzoli, V. Westphal, A. Schonle, R. Jahn, S. Jakobs, C. Eggeling, S. W. Hell, *Biophys. J.* **2007**, *92*, L67–69; b) J. Bükers, D. Wildanger, G. Vicedomini, L. Kastrup, S. W. Hell, *Opt. Express* **2011**, *19*, 3130–3143.
- [27] V. N. Belov, G. Y. Mitronova, M. L. Bossi, V. P. Boyarskiy, E. Heibisch, C. Geisler, K. Kolmakov, C. A. Wurm, K. I. Willig, S. W. Hell, *Chem. Eur. J.* **2014**, *20*, 13162–13173.
- [28] a) J. R. Moffitt, C. Osseforth, J. Michaelis, *Opt. Express* **2011**, *19*, 4242–4254; b) G. Vicedomini, G. Moneron, K. Y. Han, V. Westphal, H. Ta, M. Reuss, J. Engelhardt, C. Eggeling, S. W. Hell, *Nat. Methods* **2011**, *8*, 571–573.
- [29] C. Eggeling, C. Ringemann, R. Medda, G. Schwarzmann, K. Sandhoff, S. Polyakova, V. N. Belov, B. Hein, C. von Middendorff, A. Schonle, S. W. Hell, *Nature* **2009**, *457*, 1159–1162.
- [30] T. Grotjohann, I. Testa, M. Leutenegger, H. Bock, N. T. Urban, F. Lavoie-Cardinal, K. I. Willig, C. Eggeling, S. Jakobs, S. W. Hell, *Nature* **2011**, *478*, 204–208.
- [31] J. L. Ptacin, S. F. Lee, E. C. Garner, E. Toro, M. Eckart, L. R. Comolli, W. E. Moerner, L. Shapiro, *Nat. Cell Biol.* **2010**, *12*, 791–798.
- [32] S. J. Sahl, L. E. Weiss, W. C. Duim, J. Frydman, W. E. Moerner, *Sci. Rep.* **2012**, *2*, 895.
- [33] F. Göttfert, C. A. Wurm, V. Mueller, S. Berning, V. C. Cordes, A. Honigmann, S. W. Hell, *Biophys. J.* **2013**, *105*, pL01–L03.
- [34] K. I. Willig, H. Steffens, C. Gregor, A. Herholt, M. J. Rossner, S. W. Hell, *Biophys. J.* **2014**, *106*, L01–03.
- [35] a) A. Gahlmann, W. E. Moerner, *Nat. Rev. Microbiol.* **2014**, *12*, 9–22; b) W. E. Moerner, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2007**, *104*, 12596–12602.
- [36] S. J. Sahl, W. E. Moerner, *Curr. Opin. Struct. Biol.* **2013**, *23*, 778–787.