

Einzelne Moleküle, Zellen und superhochauflösende Optik (Nobel-Aufsatz)**

Eric Betzig*

Mikroskopie · Nahfeld · PALM · Superhochauflösung

Eines der schönsten Dinge am Gewinn des Nobelpreises ist, von all den Menschen aus meiner Vergangenheit zu hören, die Zeit zu finden, einmal darüber nachzudenken, welche wichtige Rolle der eine oder andere für mein heute so glückliches und erfülltes Leben gespielt hat. Mein tiefster Dank geht an all meine Freunde und Kollegen, von der Schule bis hin zu den Fachkollegen, die mich für diesen Preis nominiert haben.

Meine erste Berührung mit der Superhochauflösung fand 1982 statt, als ich Doktorand bei Mike Isaacson und Aaron Lewis an die Cornell University wurde. Mike hatte kurz zuvor eine Methode entwickelt, um mittels Elektronenstrahlen Löcher von nur 30 nm in lichtundurchlässige Membranen zu bohren (Abbildung 1 A). Er und Aaron hatten die Idee, dass, wenn sie die Membran von der einen Seite beleuchten, das an der anderen Seite des Lochs austretende Licht kleiner als die

und dieses Projekt passte absolut zu meinem Plan. Also wollte ich dabei sein.

Damals sagten uns viele, die Idee würde nie funktionieren, weil sie das Abbesche Gesetz oder, schlimmer noch, die Unschärferelation verletze. Ich fand die Argumente nicht überzeugend, die letzten Zweifel verschwanden aber 1984, als wir von der Veröffentlichung von Ash und Nicholls 1972 in *Nature* erfuhren. Sie verwendeten 3 cm lange Mikrowellen und erzielten mittels Nahfeldtechnik eine Auflösung von $1/60$ der Wellenlänge λ in einem Testmuster (Abbildung 2).^[5] Tatsächlich geht die Idee der Nahfeldmikroskopie sogar noch weiter zurück, zu E. H. Synges 1928,^[6] und viele andere hatten seither unabhängig davon diese Idee aufgeworfen.

Das Durchbrechen der Abbeschen Auflösungsgrenze, d. h. $\lambda/(2NA)$ (NA ist die numerische Apertur des Objektivs), im Weitfeld wurde erstmals durch Lukosz demonstriert.^[7]

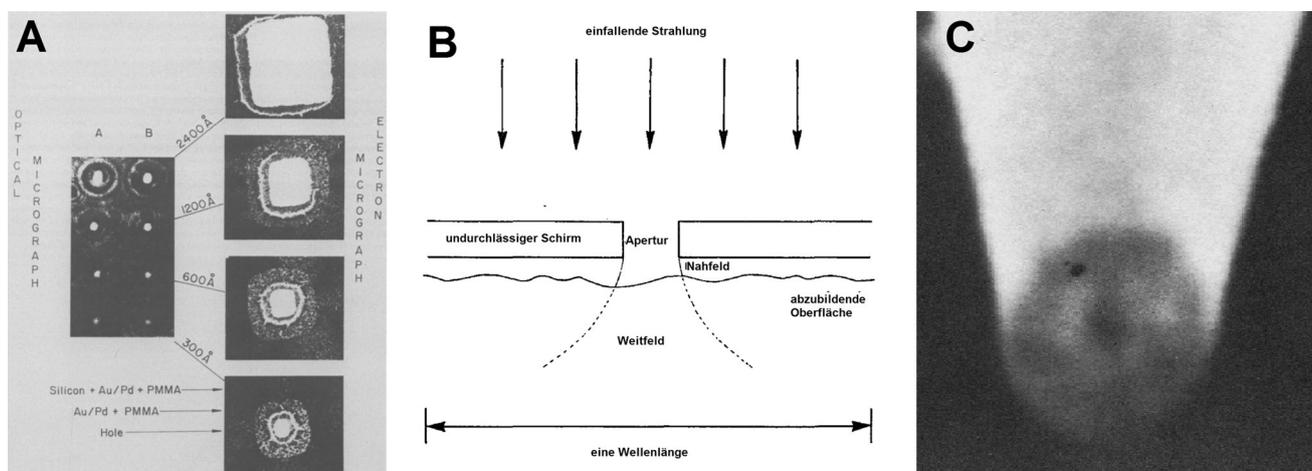


Abbildung 1. Aperturen und Nahfeldoptik. A) Durch Elektronenbeschuss erzeugte Apertur in einer Siliciumnitridmembran, mit Durchmessern wie gezeigt. Die Spalte links zeigt den Lichtdurchgang durch diese Aperturen.^[1] B) Das Konzept der optischen Rasternahfeldmikroskopie (NSOM) als Weg zur Superhochauflösung.^[2] C) 50 nm breite Apertur in einer konischen Glaspipette umhüllt mit lichtundurchlässigem Aluminium,^[3] hergestellt mit Patch-Clamp-Techniken.^[4]

Wellenlänge sein müsste (Abbildung 1B). Damit könnte dann eine Probe Punkt für Punkt abgetastet und so ein superhochaufgelöstes Bild erzeugt werden.^[1] Das ultimative Ziel war die Entwicklung eines optischen Mikroskops, mit dem lebende Zellen mit der Auflösung eines Elektronenmikroskops abgebildet werden können. Ich wollte Wissenschaftler werden, um große, bedeutungsvolle Dinge zu tun –

[*] E. Betzig
Janelia Research Campus, Howard Hughes Medical Institute
19700 Helix Dr., Ashburn, VA 20147 (USA)

[**] Copyright© Nobelstiftung 2014. Wir danken der Nobelstiftung, Stockholm, für die Genehmigung zum Abdruck einer deutschen Fassung dieses Vortrages.

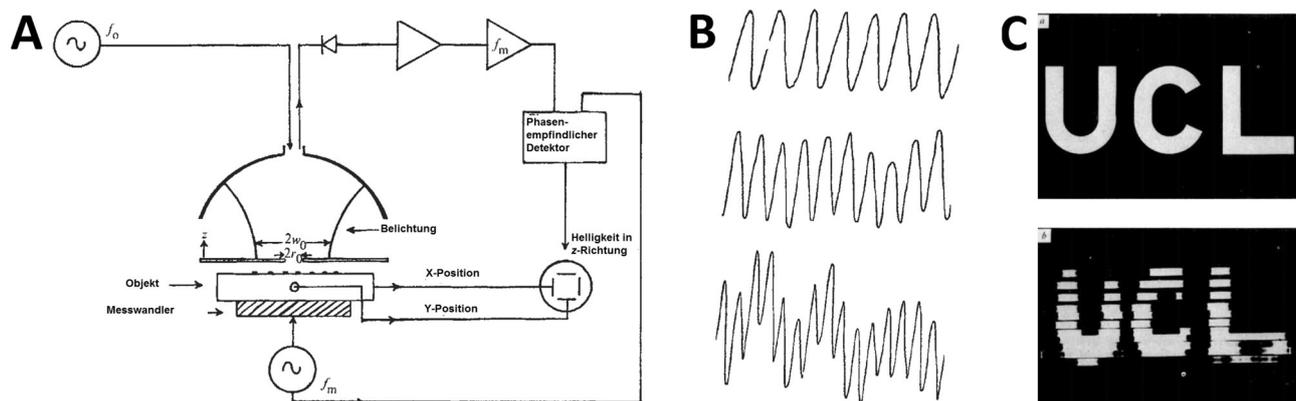


Abbildung 2. Durchbrechen der Beugungsgrenze im Nahfeld. A) Mikrowellenresonator mit Sub-Wellenlängen-Apertur (Ash und Nicholls, 1972).^[5] B) Aufgelöste Gitter mit Perioden von $1/30$, $1/40$ und $1/60$ (von oben nach unten) der 3-cm-Mikrowellenstrahlung. C) Aufnahmen von Buchstaben mit Linienbreiten von $1/15$ der Wellenlänge.

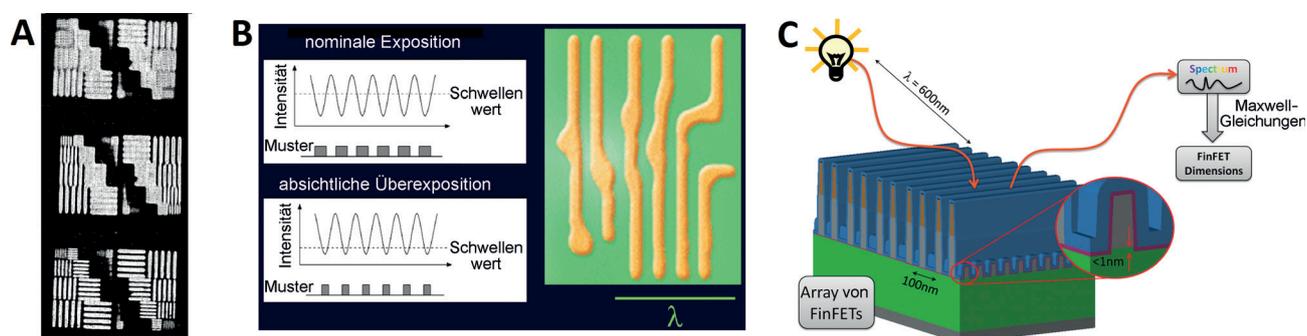


Abbildung 3. Durchbrechen der Beugungsgrenze im Weitfeld. A) Beugungsbegrenzte (oben) und superhochauflösende Testmuster in 1D (Mitte) und 2D (unten) mit einem linearen Gitter oder quadratischen Gittermasken im Bildweg (Lukosz, 1967).^[8] Die Auflösung beträgt das Dreifache der Abbeschen Auflösungsgrenze. B) Nichtlineare Wechselwirkungen von Licht mit Photolack und doppelte Musterbildung werden genutzt, um in der Produktion von integrierten Schaltkreisen Muster unterhalb der Abbeschen Auflösungsgrenze zu erzeugen.^[9] C) Vorkenntnisse über das Muster eines Schaltkreises und der Vergleich der Verteilung des gestreuten Lichts vom wirklichen Muster mit der vorhergesagten Verteilung werden genutzt, um Muster mit Nanometer- bis Ängström-Genauigkeit in der Halbleiterproduktion zu vermessen.^[9]

Durch die Einführung von Gittern in zu Objekt und Bild konjugierten Ebenen konnte er Testmuster mit dreifach hö-

herer Auflösung als die Abbesche Auflösungsgrenze abbilden (Abbildung 3A).^[8] Dieses war der Vorläufer der heutigen strukturierten Beleuchtungsmikroskopie. Lukosz führte das Experiment mit einer sehr kleinen NA durch, daher waren die Muster immer noch viel größer als die Wellenlänge des Lichts – dennoch bewies der Versuch, dass das Abbesche Gesetz nicht unumstößlich war.

Tatsächlich hat die Weitfeld-Superhochauflösung eine sehr lange Geschichte, insbesondere im Bereich der Halbleiter, wo die nichtlineare Wechselwirkung von Licht mit Photolack die Grundlage für die Herstellung von Linienbreiten deutlich unterhalb der Abbeschen Auflösungsgrenze ist (Abbildung 3B).^[9] Noch beeindruckender ist, wie sichtbares Licht genutzt wird, um Halbleiterplättchen zu inspizieren, und wie man heute Eigenschaften eines Musters bis auf $1/1000$ der Lichtwellenlänge dadurch messen kann, dass man mit Vorwissen über das zu kreierende Muster ein Modell für die Lichtbrechung an diesem Muster entwickelt und das Modell mit den gemessenen Daten vergleicht (Abbildung 3C).^[9] Dieser Prozess wird tagtäglich in großem Maßstab in der Halbleiterproduktion genutzt.



Eric Betzig ist Gruppenleiter am Janelia Research Campus in Ashburn, VA. Seine Doktorarbeit an der Cornell University (Ph.D. 1988) und nachfolgende Arbeiten bei AT&T Bell Labs befassten sich mit der Entwicklung der Nahfeldoptik, einer frühen Form der superhochauflösenden Mikroskopie. Nach seiner Kündigung und dem Rückzug aus der akademischen Welt veröffentlichte er 1995 ein Konzept, das zur Grundlage der Lokalisationsmikroskopie werden sollte. Er arbeitete anschließend in der F&E bei der Ann Arbor Machine Tool Company, kündigte aber 2002, nachdem die von ihm entwickelten Technologien keinen Absatz fanden. 2005 entwickelte er zusammen mit Harald Hess die superhochauflösende Lokalisationsmikroskopie mithilfe von photoaktivierbaren fluoreszierenden Proteinen. Für diese Arbeiten erhielt er 2014 den Nobelpreis für Chemie. Er beschäftigt sich weiterhin mit Aspekten der Superhochauflösung, z. B. mit nicht-beugenden Lichtscheiben für die dynamische 4D-Bildgebung lebender Systeme und mit adaptiver Optik für die Wiederherstellung optimaler Bildqualität in streuendem Gewebe.

Im Grunde also ist Superhochauflösung überhaupt nichts Neues, und es gibt Leute im Silicon Valley, die über uns hier vermutlich lachen, weil wir glauben, wir wären die Jungs, die all das erfunden haben, was für sie längst Alltag ist. Dennoch verdienen Ash und Nicholls meiner Meinung nach den Löwenanteil an Anerkennung. Sie waren die ersten, die nicht nur ein bisschen unter die Abbesche Auflösungsgrenze von $\lambda/(2NA)$ gelangt sind, sondern diese gänzlich zertrümmert haben, indem sie die halbe Lichtwellenlänge weit hinter sich ließen und 1/60 der Lichtwellenlänge mit ihrer Nahfeldtechnik erreichten.

Apropos zertrümmern: Die Arten von Aperturen, die wir in diesen dünnen Membranen erzeugten, zerbrachen immerzu; ihre Herstellung war schwierig, langwierig und außerdem teuer. Also ließen wir es irgendwann sein und zogen stattdessen Glasmikropipetten, ähnlich wie man es ein paar Jahre zuvor für die Patch-Clamp-Messung einzelner Ionenkanäle erfunden hatte. Die Idee kam von meinem Mitdoktoranden Alec Harootunian. Wir überzogen die Pipetten mit Aluminium und erzeugten damit eine lichtundurchlässige Struktur, bis auf ein kleines Loch am Ende, das unsere Apertur war (Abbildung 1 C).^[3]

Damit habe ich die Monstrosität konstruiert, die Sie in Abbildung 4 A sehen – mein erstes optisches Nahfeldmikroskop. Es lässt mich heute schaudern, wie komplex und verückt dieses Ding war, aber es bot mir auch reichlich Gelegenheit, jene technischen Fähigkeiten zu erlernen, die ein richtiger Physikingenieur braucht. Letztendlich gelang es mir mit diesem Mikroskop, das ich für meine Doktorarbeit kon-

struiert hatte, die Auflösungsgrenze zu durchbrechen (Abbildung 4 B,C).^[10,11]

Die Arbeit mit dem Mikroskop war ehrlich gesagt schrecklich, und der Gewinn an Auflösung betrug einen Faktor 2 unter der Abbeschen Grenze. Aber es war gut genug, um meinen Traumjob bei den Bell Labs zu ergattern. Ich versuchte, die Technik weiterzuentwickeln, und in den ersten zwei Jahren ging es wirklich nur langsam voran. Aber dank der Geduld und Aufmunterung durch meinen Boss, Horst Störmer, begriff ich schließlich, dass die Pipettensonde keine wirklich gute Bauweise war, weil das durch den Konus gesendete Licht größtenteils reflektiert wurde, bevor es überhaupt zur Spitze gelangte. Und das bisschen Licht, das es bis zur Spitze schaffte, war in elektromagnetischen Moden, die schlecht in die Apertur einkoppelten.

Zusammen mit dem Postdoc Jay Trautman konstruierte ich daraufhin eine Sonde aus einer adiabatisch-konischen optischen Faser, die das Licht sehr effizient in die Spitze lenkte und es dort sehr effizient in die evaneszenten Moden der Apertur einkoppelte (Abbildung 5 A,B). Die Sonde war 10000-mal heller als frühere Ausführungen und ermöglichte Auflösungen von 50 nm (Abbildung 5 C).^[12] Im folgenden Jahr erfand ich eine Methode, die Sonde seitlich hin und her zu bewegen – sie oszillieren zu lassen –, wobei die Oszillation gedämpft wurde, wenn sie nahe an die Oberfläche kam. Auf diese Weise konnte ich den Abstand der Spitze zur Probe regulieren (Abbildung 5 D).^[13]

Mit diesen zwei Neuerungen wurde die Nahfeldmikroskopie zu einer Routinetechnik. 1992 hielten wir den Weltrekord für Datenspeicherdichte, nachdem es uns gelungen war, nur 60 nm kleine Bits in ein magneto-optisches Material zu schreiben und auszulesen (Abbildung 6 A).^[15] Wir konnten eine Reihe weiterer Techniken demonstrieren, darunter superhochauflösende Photolithographie (Abbildung 6 B) und nanoskopische Spektroskopie.^[16] Des Weiteren nutzten wir verschiedene Kontrastmechanismen,^[14] wie Brechungsindex-, Absorptions- (Abbildung 6 C), Polarisations- und Fluoreszenzkontrast (Abbildung 6 D).^[17] In der Tat ist die Nahfeldmikroskopie bis heute die einzige nicht beugungsbegrenzte Technik, die die komplette Auswahl an optischen Kontrastmechanismen nutzen kann und nicht auf dem An- und Ausschalten einer Fluoreszenz beruht.

Nichtsdestotrotz ist Fluoreszenz der für die Mikroskopie biologischer Proben vermutlich wichtigste Mechanismus, da Fluoreszenz einen proteinspezifischen Kontrast ermöglicht. 1993 waren wir die ersten, die die superhochaufgelöste Fluoreszenzbildgebung von Zellen demonstrieren konnten, als wir das Aktinzytoskelett in der flachen lamellaren Region von fixierten Fibroblasten betrachteten (Abbildung 7).^[18] Was jedoch besonders aufregend war, war die Tatsache, dass das Signal-Rausch-Verhältnis, das wir für diese einzelnen Aktinfilamente erreichten, in Verbindung mit unserer Kenntnis des Aperturdurchmessers den Schluss nahelegte, dass es möglich sein müsste, einzelne fluoreszierende Moleküle abzubilden. Das war zu der Zeit ein absolut heißes Thema, da nur ein paar Jahre zuvor W. E. Moerner^[19] und Michel Orrit^[20] in dieses ultimative Empfindlichkeitsregime bei Kryotemperaturen vorgestoßen waren. Mehrere Gruppen, wie die von Dick Keller^[21] und Rudolf Rigler,^[22] hatten

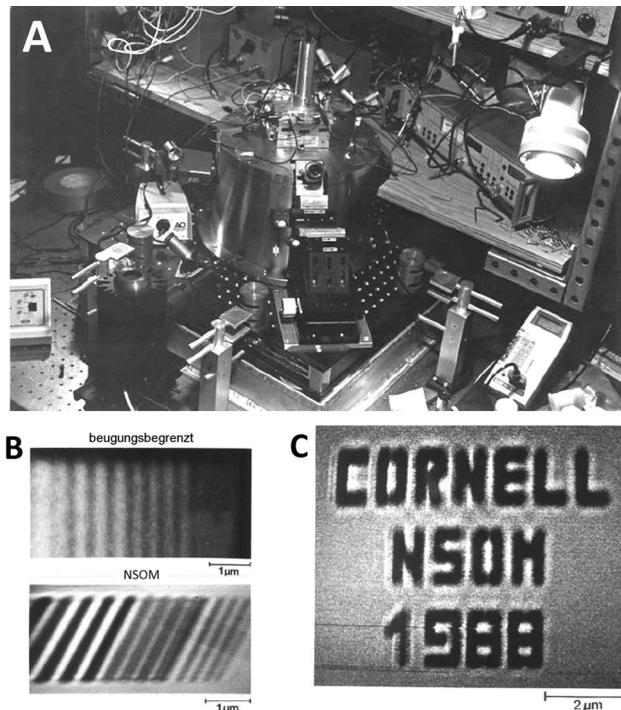


Abbildung 4. Mein erstes Nahfeldmikroskop. A) Das Mikroskop selbst. B) Testmuster: Vergleich von beugungsbegrenzter und superhochauflösender NSOM. C) Ein weiteres hochauflöstes Testmuster – ich lernte früh, wie ich meine Arbeit zu verkaufen hatte.^[11]

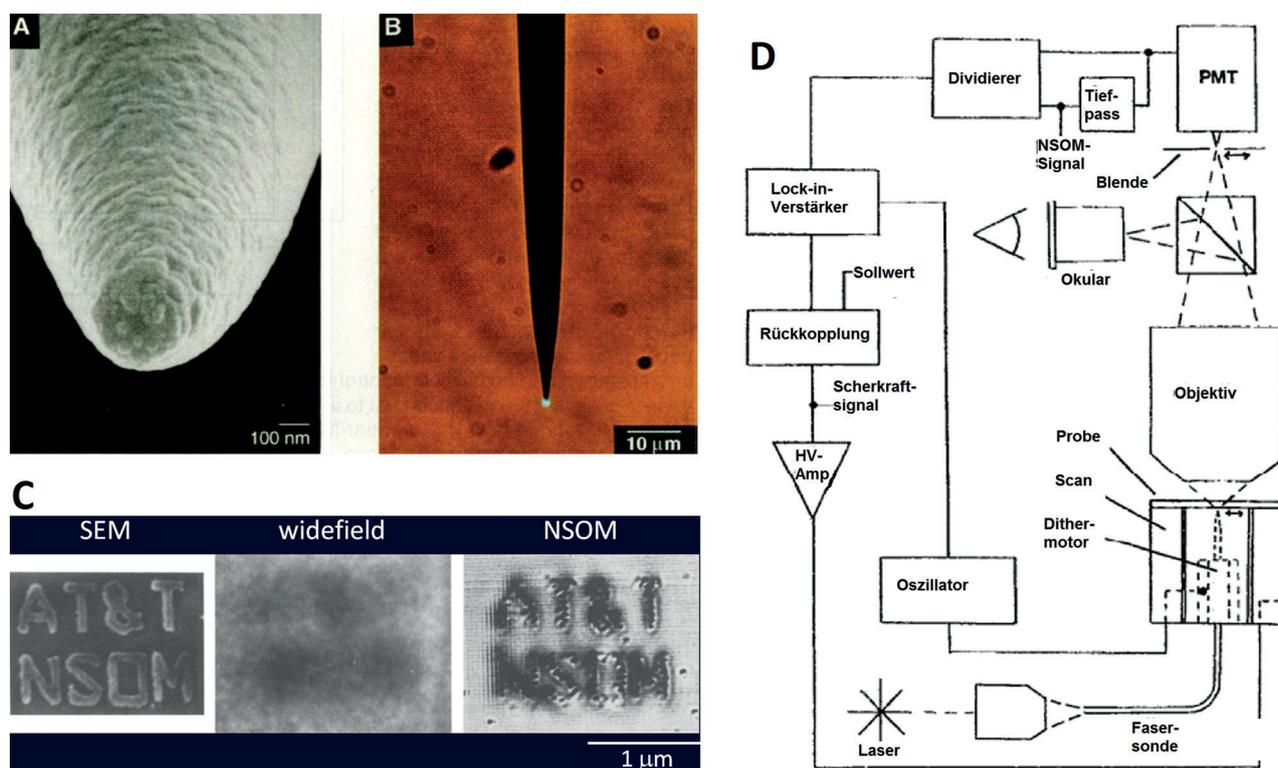


Abbildung 5. Entwicklung eines funktionsfähigen NSOM. A) Elektronenmikrograph und B) optischer Mikrograph einer adiabatisch-konischen Aluminium-umhüllten optischen Einzelmodenfaser, die als Nahfeldsonde benutzt wurde.^[14] C) Auflösungsvergleiche der Sonden. Von links nach rechts: Elektronenmikrograph, herkömmlicher optischer Mikrograph und optischer Nahfeldmikrograph.^[12] D) Schema der Scherkräftrückkopplung zur nanometeregenen Regulierung des Abstands zwischen Sonde und Probe.^[13]

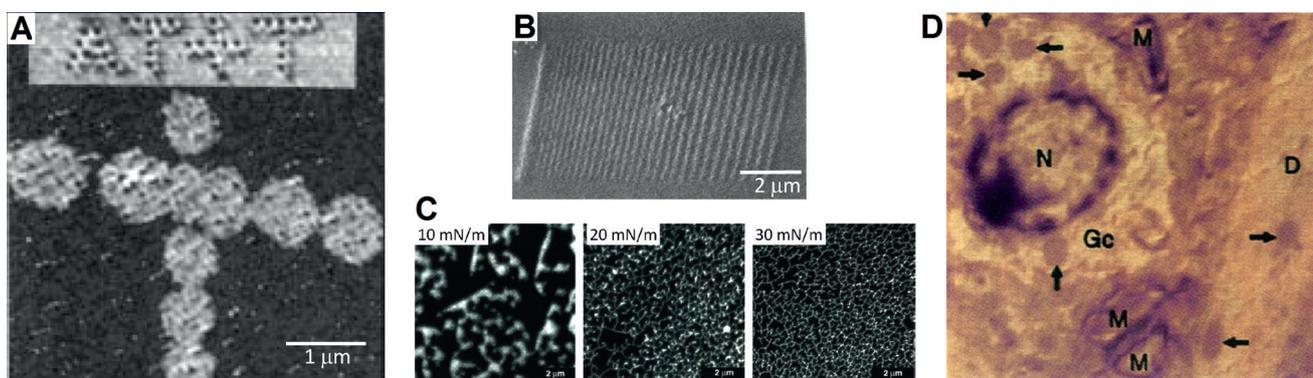


Abbildung 6. Das goldene Zeitalter der NSOM. A) Schreiben und Lesen einzelner Informationsbits in einem magneto-optischen Film mittels NSOM (oben) und Vergleich mit optisch erzeugten Bits (unten).^[15] B) Nahfeldphotolithographie.^[14] C) Fluoreszenzabbildung von Phasenübergängen in Phospholipid-Monoschichten.^[17] D) Histologisch gefärbter Schnitt vom Hippocampus des Affen.^[14]

auch schon bei Raumtemperatur in Lösung gezeigt, dass man Fluoreszenzsignale einzelner Moleküle beobachten konnte.

Der Schlüssel bei diesen Experimenten war die Idee, das Anregungsvolumen einzuschränken, um das Hintergrundrauschen zu reduzieren. Das ist genau das, worin sich Nahfeldmethoden hervortun – das Anregungsvolumen einzuschränken. Bereits in unserem ersten Versuch, einzelne Moleküle zu beobachten, erzielten Rob Chichester und ich exzellente Ergebnisse. Das Seltsame daran war jedoch, dass wir statt runder Flecken jede Menge verrückter Bögen oder Ellipsen oder andere Dinge sahen, die sich veränderten, wenn

wir die Polarisation des Lichts verstellten (Abbildung 8A).^[23] Ich erinnere mich noch gut daran, wie ich aufgeregt zu Horsts Büro rannte und versuchte, dies zu verstehen. Mit seiner Hilfe erkannten wir dann, dass wir die Wechselwirkung des elektrischen Dipolmoments des Moleküls mit dem evaneszierenden Feld im Inneren der Nahfeldapertur beobachteten (Abbildung 8B,C). Das verursachte diese Muster.

Das bedeutete nun, dass wir das Experiment umdrehen und uns das Molekül als Sonde und die Apertur als Probe denken konnten. Wir wählten Moleküle, die entlang der *x*-, *y*- und *z*-Achsen orientiert waren, und konnten damit die na-

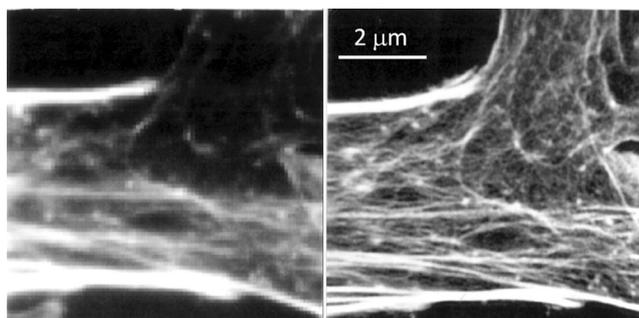


Abbildung 7. Superhochauflösende Fluoreszenzabbildung von Zellen. Herkömmliche Weitfeld-Aufnahme (links) und superhochaufgelöstes NSOM-Bild (rechts) vom Aktinzytoskelett in einer fixierten Fibroblastenzelle der Maus.^[18]

noskopischen elektrischen Felder innerhalb der Apertur ausmessen (Abbildung 9A, mittlere Spalte). Dies verglichen wir dann mit der Theorie der Nahfeldbeugung, die Hans Bethe 1944 entwickelt hatte,^[24] und waren in der Lage, eine sehr gute Übereinstimmung zu zeigen (Abbildung 9A, übrige Spalten). Sobald wir das hatten, konnten wir Bethes Modell verwenden, um vorherzusagen, welche Art Muster wir bei einer bestimmten Orientierung eines Moleküls sehen würden, dieses dann mit unseren Daten vergleichen und damit die Dipolorientierung (Abbildung 9C) der Moleküle im Beobachtungsfeld bestimmen (Abbildung 9B). Und mit dieser Information konnten wir diese verrückten Formen an die Theorie angleichen und die Positionen der Moleküle bis auf etwa 12 nm genau in x und y und etwa 6 nm in z bestimmen. Diese Studien waren die Grundlage für vieles, was später kommen sollte.

Für ein anderes Schlüsselexperiment tat ich mich mit meinem besten Freund und Kollegen bei Bell, Harald Hess, zusammen. Harald hatte sich bei Bell einen Namen gemacht, als er ein Kryorastertunnelmikroskop baute, mit dem er unter anderem die Kernzustände der Vortexzentren im Abrikosovschen Fluxgitter von Typ-II-Supraleitern entdeckte. Unser Ziel war es nun, meine Nahfeldsonde mit seinem Tieftemperaturmikroskop zu kombinieren, um damit Exzitonen, die Emissionsquellen in Halbleiter-Heterostrukturen wie beispielsweise einem Laserpointer, zu untersuchen (siehe auch den Nobelpreis im Jahr 2000). Auf diese Weise würden wir die hohe räumliche Auflösung meiner Nahfeldsonde mit der hohen spektralen Auflösung von Haralds Apparat, die

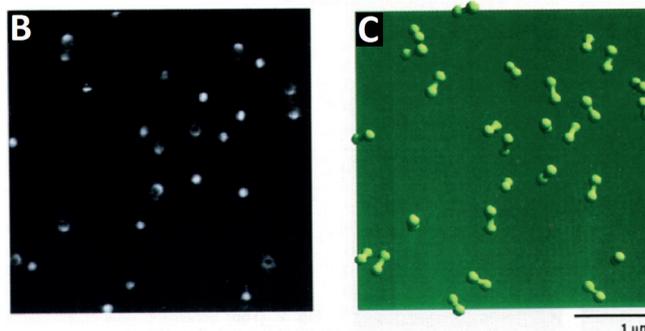
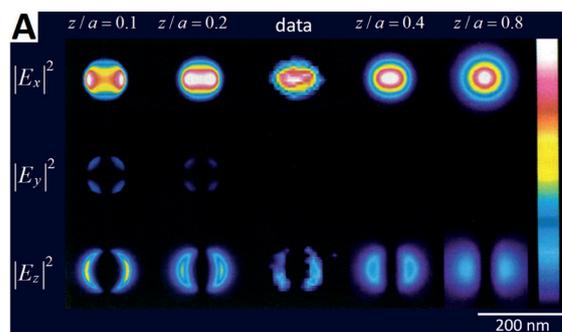


Abbildung 9. Kartierung elektromagnetischer Felder und Messung einzelner Dipolorientierungen. A) Vorausberechnete elektrische Feldkomponenten (Reihen) in unterschiedlichen Abständen (Spalten) von der Apertur und Vergleich mit den experimentellen Komponenten (mittlere Spalte), die an einzelnen Molekülen gemessen wurden. B, C) Orientierungen einzelner Moleküle, bestimmt durch Vergleich von gemessenen und vorausberechneten Emissionsmustern.^[23]

nahe dem absoluten Temperaturnullpunkt betrieben wurde, verbinden (Abbildung 10A).

Als wir das taten,^[25] fanden wir zu unserer Überraschung, dass sich die normalerweise glatten Spektren in diese verrückten scharfen Linien aufspalteten. Außerdem veränderte sich das Spektrum komplett, wenn wir die Sonde auch nur um kleinste Strecken von Punkt zu Punkt bewegten (Abbildung 10B). Irgendwann verstanden wir, dass die Exzitonen nicht überall emittieren konnten, sondern ihre Rekombination auf spezifische Punkte beschränkt war, wobei die Farbe des emittierten Lichts von der lokalen Dicke des Quantentopfs an dieser Stelle abhing. Was für später noch wichtiger war, war die Tatsache, dass obwohl ein Dutzend oder mehr dieser emittierenden Stellen unter unserer kleinen Nahfeldsonde lagen, wir diese trotzdem einzeln untersuchen konnten,

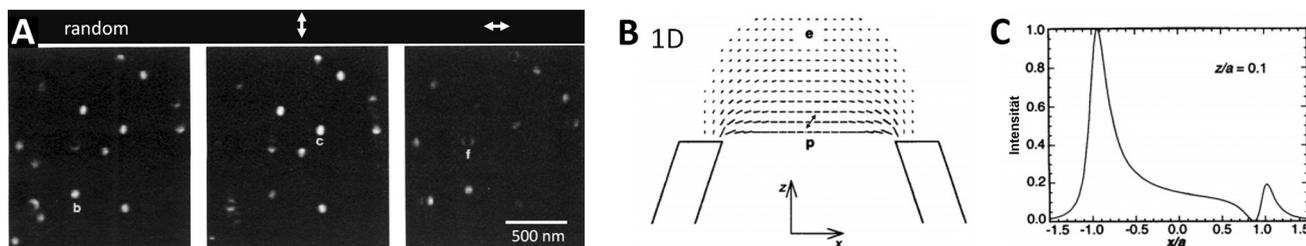


Abbildung 8. Einzelmolekülmikroskopie bei Raumtemperatur. A) Drei Ansichten des gleichen Ausschnitts eines Carbocyanin-Farbstoffmoleküls auf PMMA abgebildet durch NSOM mit drei verschiedenen Polarisationen wie darüber gezeigt. B) 1D-Schema der Wechselwirkung des elektrischen Feldes e , das aus der Nahfeldapertur austritt, mit dem elektrischen Dipolmoment p eines einzelnen Moleküls. C) Resultierende Intensität $I(x) \propto |e(x) \times p|^2$, aufgezeichnet während die Apertur über das Molekül fährt.^[23]

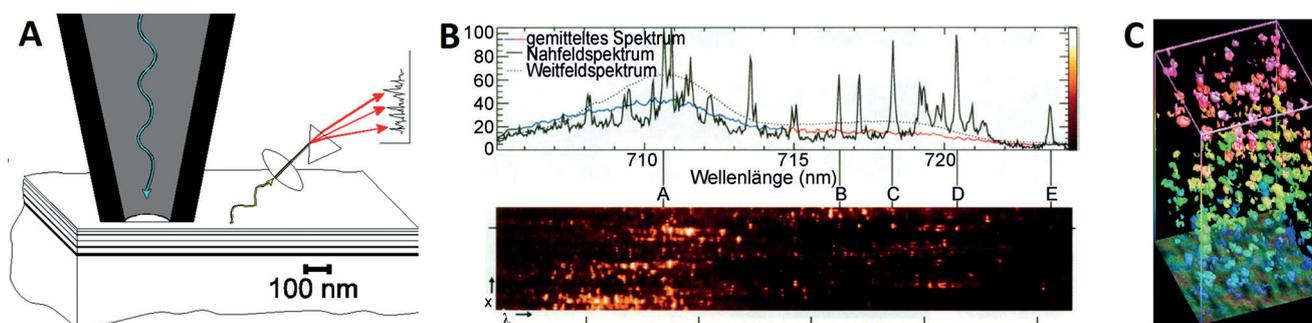


Abbildung 10. Nahfeld-Kryospektroskopie von Quantentöpfen. A) Experimenteller Aufbau: Eine Nahfeldsonde (links) regt eine Multiquantentopfstruktur (unten) an, und die resultierende Emission wird mit einem Spektrometer gemessen (rechts). B) Nah- und Weitfeldspektrale an einem einzelnen Punkt (oben) und spektrale Änderungen mit der Position (unten). C) Emissionsbilder von einzelnen, voneinander isolierten Exzitonrekombinationsstellen in einem 3D-Raum der x - und y -Position und der Wellenlänge λ .^[25]

weil sie in verschiedenen Wellenlängen leuchteten. Indem wir also diesen höherdimensionalen Raum aus x , y und der Emissionswellenlänge anlegten, konnten wir diese Stellen einzeln untersuchen (Abbildung 10C).

Zu dieser Zeit im Jahr 1994 traten die Grenzen der Nahfeldtechnik sehr klar hervor. Einige davon waren lediglich Herausforderungen an die Gerätekonstruktion, andere waren fundamental. In erster Linie ist das Nahfeld lächerlich kurz. In Anbetracht dieser kurzen Fokustiefe war klar, dass ich meinen Wunschraum, lebende Zellen mit der Auflösung eines Elektronenmikroskops zu betrachten, auf keinen Fall erreichen konnte. Das war frustrierend. Gleichzeitig jedoch kam das Thema Nahfeld groß in Mode, und wie bei allen wissenschaftlichen Modeerscheinungen hat man plötzlich viele Leute, die auf den Zug aufspringen. Sie publizieren schlampige Ergebnisse, kehren die Probleme unter den Teppich und machen übertriebene Versprechungen. Ich fand das alles sehr unangenehm. Und das dritte, das mich aus der Fassung brachte, war Bell. Um bei Bell Erfolg zu haben, musste man wirklich hart arbeiten – aber 1994 konnte man die Veränderungen spüren, die in der Firma vor sich gingen; Grundlagenforschung hatte nicht mehr die Wertschätzung wie früher. All das zusammen bewirkte, dass sich zwei junge, arglose Kerle wie Harald und ich fünf Jahre nach unserem Einstieg bei Bell in gestresste, abgenutzte Männer verwandelt hatten.

Ich sagte mir: „Pfeif drauf, ich habe die Wissenschaft satt. Ich hasse die Akademikerwelt. Ich höre auf.“ Und das tat ich. Ich hatte absolut keine Idee, was ich als nächstes tun sollte. Ein paar Monate lang versuchte ich, die Nahfeldmikroskopie aus meinem Kopf zu bekommen. Als ich dann einmal mit meiner Tochter im Kinderwagen spazieren ging, traf mich der Einfall – ich weiß nicht wie oder woher –, dass man mein Einzelmolekülexperiment doch mit Haralds und meinem Spektroskopieexperiment verbinden konnte, um so keine Nah-, sondern vielmehr eine Weitfeldmethode der superhochauflösenden Bildgebung zu erfinden.

Die Idee ist, dass die beugungsbegrenzten Lichtflecken, die von sehr nahe beieinanderliegenden Molekülen erzeugt werden, überlappen (Abbildung 11A). Wir haben darüber schon in W. E. Moerners Vortrag gehört. Findet man aber eine Möglichkeit, dass sie sich voneinander unterscheiden – und das kann alles mögliche sein –, so kann man die Moleküle

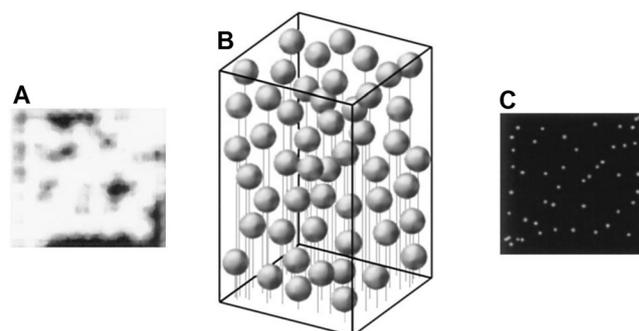


Abbildung 11. Das Konzept der superhochauflösenden Lokalisationsmikroskopie. A) Ein Bereich dicht gepackter Moleküle ist nicht aufgelöst, weil deren beugungsbegrenzte Bilder überlappen. B) Die gleichen Moleküle nach Isolation in einem höherdimensionalen Raum. C) Superhochauflösende Abbildung der Molekülpositionen nach Lokalisierung der isolierten Moleküle.^[26]

in einem höherdimensionalen Raum isolieren (Abbildung 11B). Sind sie erst einmal isoliert, kann man die Mittelpunkte jedes der beugungsbegrenzten Flecken in einer sehr viel besseren Auflösung als die Fleckenbreite bestimmen und so sämtliche Koordinaten der Moleküle auftragen (Abbildung 11C).

Ich veröffentlichte die Idee 1995.^[26] 1999 demonstrierten van Oijen und Mitarbeiter erstmals das Konzept bei tiefen Temperaturen, indem sie sieben Moleküle in einem einzelnen beugungsbegrenzten Volumen dreidimensional auflösten.^[27] In den 2000er Jahren wurde das Konzept auf verschiedene Weise bei Raumtemperatur realisiert, z.B. durch Unterschiede im Photobleichen,^[28,29] der Lebensdauer^[30] oder Blinking.^[31] Es war wirklich ein allgemeingültiges Konzept.

Das Problem bei all diesen Methoden ist jedoch das sogenannte Nyquist-Kriterium (Abbildung 12). Will man ein mikroskopisches Bild mit einer bestimmten Auflösung aufnehmen, muss man jedes aufzulösende Element geteilt durch 2 abtasten. Wenn ich z.B. das in Abbildung 12 gezeigte Sinusmuster nur einmal alle halbe Periode abtaste, kann es passieren, dass ich es komplett verpasse (Abbildung 12, unten links). Das bedeutet, will man mit dieser Methode eine Auflösung von 20 nm in zwei Dimensionen erreichen, muss man in der Lage sein, ein Molekül vor einem Hintergrund von 500 Molekülen zu erkennen, die zur selben Zeit leuchten können.

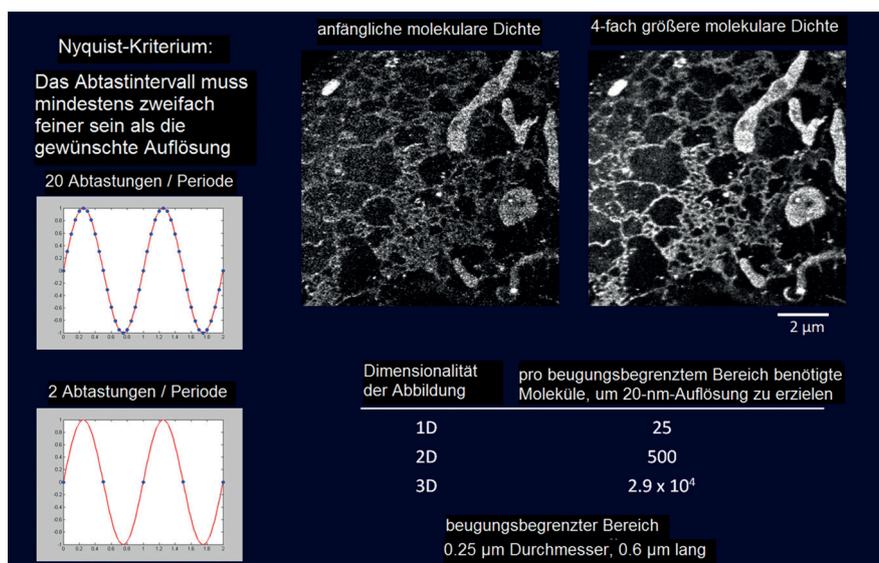


Abbildung 12. Das Nyquist-Kriterium und das Markierungsdichteproblem. Mit vielen lokalisierten Molekülen pro Periode ist jede Ortsfrequenz leicht detektierbar (Mitte links), sinkt jedoch die Anzahl auf zwei pro Periode oder weniger, kann die Frequenz übersehen werden. Das hat zur Folge, dass die Auflösung in der Lokalisationsmikroskopie eher durch die Dichte der Einzelmolekülmarkierungen als durch die Genauigkeit ihrer Lokalisation begrenzt ist (oben rechts). Die Mindestanzahl an Lokalisationen, die pro beugungsbegrenztem Bereich nötig sind, steigt rapide mit der Dimensionalität (unten rechts).

Keine der Methoden, die ich gerade beschrieben habe, vermochte eine genügende Isolation in der dritten Dimension zu erzielen, die ein signifikantes Vordringen hinter die Beugungsgrenze erlaubt hätte. Ich hatte 1995 keine wirklich gute Idee, wie ich dieses Problem lösen sollte, außer mit einem Nahfeldmikroskop bei Kryotemperaturen zu arbeiten. Das wäre jedoch ein heroisches Experiment gewesen, und ich hatte keine Lust mehr auf Wissenschaft – also veröffentlichte ich einfach nur die Idee und beließ es dabei.

Schließlich landete ich in der Werkzeugmaschinenfabrik meines Vaters in Michigan, wo ich verschiedene Dinge tat. Mein „Baby“ – das, worauf ich am stolzesten war – war eine servohydraulische Maschine, die alte Hydraulik mit modernen Steuerungsalgorithmen und der Art von Energiespeicherprinzipien in sich vereinigte, wie man sie heute in Hybridautos findet. Sie konnte 4 Tonnen mit 8 G Beschleunigung bewegen und auf 5 μm genau platzieren. Wir verkleinerten die Maschine von der Größe dieser Bühne auf ungefähr die Größe eines Autos – das machte sie viel billiger, viel schneller und viel produktiver. Ich verbrachte vier Jahre mit der Entwicklung dieser Idee und drei Jahre mit dem Versuch sie zu verkaufen, und am Ende verkaufte ich zwei. Was ich lernte war, dass ich vielleicht ein schlechter Wissenschaftler sein mochte, aber ein noch schlechterer Geschäftsmann.

2002 sagte ich: „Dad, ich will nicht länger Dein Geld verschwenden. Du weißt, es tut mir leid, aber das hier funktioniert einfach nicht.“ Und so gab ich auf. Wie üblich hatte ich keinen Plan B. Das war die dunkelste Zeit in meinem Leben, weil ich nicht nur meine akademische Karriere zerstört hatte, sondern auch meinen Reserveplan, nämlich in die Fußstapfen meines Vaters zu treten. 42 Jahre alt, zwei kleine Kinder, kein Job und keine Aussicht auf einen Job.

Aber ich habe etwas Schlaues getan. Harald war auch in die Industrie gegangen, wo er um einiges erfolgreicher war als ich und in einer Startup-Firma in San Diego arbeitete. Ich nahm wieder Kontakt mit ihm auf, und wir begannen, uns regelmäßig in verschiedenen Teilen des Landes zu treffen – wie etwa in den Nationalparks – und einfach zu reden. Was ist der Sinn des Lebens? Wie können wir etwas bewirken ehe wir sterben? Was ist interessant? Wir realisierten, dass zwar keiner von uns in ein normales akademisches Schema passte, wir aber beide die Wissenschaft liebten, und auch die Möglichkeit, unserer Neugierde nachzugehen. Also begannen wir von Neuem darüber nachzudenken, was wir tun konnten, um in der Wissenschaft etwas zu bewirken.

Ich fing wieder an, die wissenschaftliche Literatur zu lesen, was ich 10 Jahre lang nicht getan hatte. Das erste, auf das ich stieß, war das grün fluoreszierende Protein (GFP).^[32] Es war eine Offenbarung für mich – ein

Schock –, war es doch zu Nahfeldzeiten die ganz große Frage, wie man Zellen in einer genügend hohen Markierungsdichte und Spezifität markieren sollte. Der Gedanke, dass man eine lebende Zelle mit ein bisschen Quallen-DNA dazu bringen kann, jedes beliebige Protein mit einem fluoreszierenden Anhängsel zu produzieren, ließ mir die Kinnlade sinken. Anfangs wollte ich keine Mikroskopie betreiben, aber als ich das sah, dachte ich: „Verflucht nochmal, ich muss wieder Mikroskopie machen.“

Während Harald und ich uns weiter umsahen, stand die Wissenschaft nicht still. Gleich nachdem GFP in Erscheinung getreten war, wollten eine Menge Leute dessen Photophysik verstehen, um dann darauf aufbauend Mutagenesen durchzuführen und verschiedene Farben zu erzeugen, um so eine Vielfarbenbildgebung zu realisieren.

Steven Boxers Gruppe erkannte 1996, dass GFP nicht nur eine Absorptionsbande aufweist, sondern zwei. Noch verrückter war, dass das Maximum im nahen UV kleiner und das bei 488 nm größer wurde, wenn man mit Licht im nahen UV-Maximum anregte (Abbildung 13 A).^[33] Mit anderen Worten: Im GFP ging eine Art seltsamer Photoaktivierungseffekt vor sich.

Anschließend nutzte Tobias Meyers Gruppe diesen Effekt, um das erste photoaktivierte Pulse-Chase-Experiment durchzuführen. Sie bestrahlten Wildtyp-GFP mit UV-Licht, um die Helligkeit des GFP in einem bestimmten Teil der Zelle zu erhöhen, und sahen dann zu, wie diese Proteine in andere Teile der Zelle wanderten (Abbildung 13 B).^[34] Im Jahr darauf konnte W. E. Moerner mit Rob Dickson das gleiche Phänomen in GFP auf Einzelmolekülebene zeigen (Abbildung 13 C).^[35] Um das Jahr 2000 herum führte George Patterson in der Arbeitsgruppe von Jennifer Lippincott-

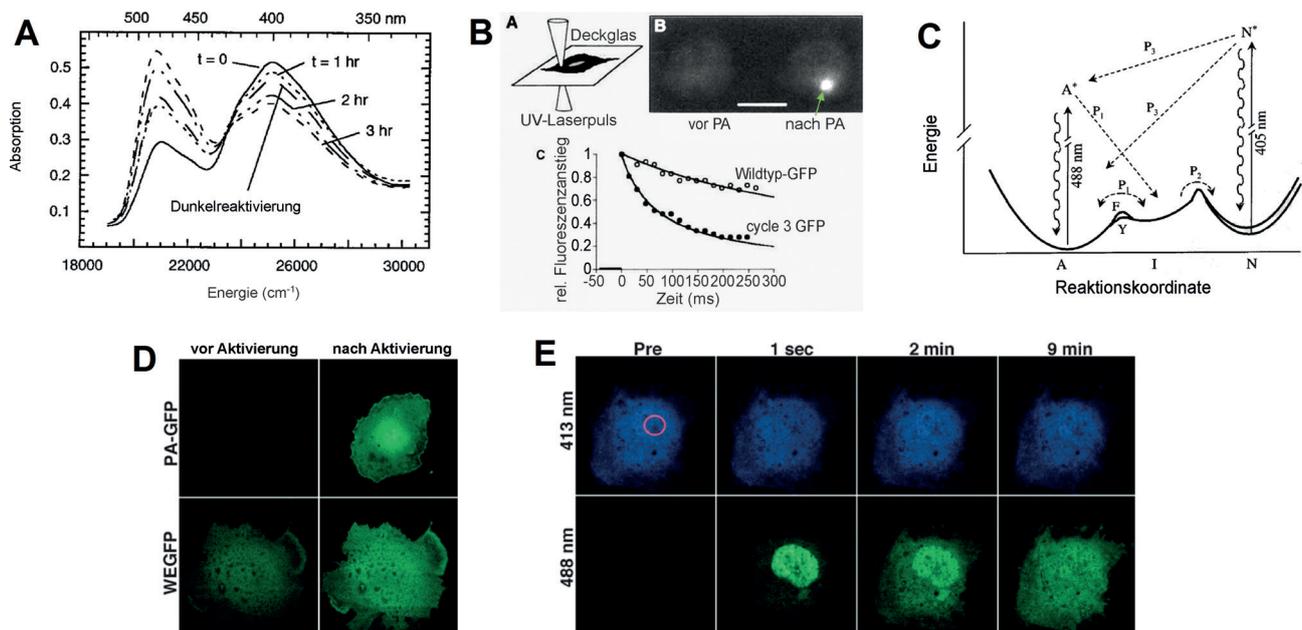


Abbildung 13. Die Entwicklung von photoaktivierbarem GFP. A) UV/Vis-Doppelabsorptionsmaxima von Wildtyp (wt)-GFP.^[33] B) Pulse-Chase-Experiment zur zeitlichen Verfolgung der Fluoreszenzänderung von wt-GFP, das lokal in einer Zellregion photoaktiviert wurde.^[34] C) Energiezustandsdiagramm der Einzelmolekülphotoaktivierung von GFP.^[35] D) Verbessertes An/Aus-Kontrastverhältnis von PA-GFP.^[36] E) Pulse-Chase-Experiment der relativen Geschwindigkeiten der Zellkern- und zytosolischen Diffusion von PA-GFP.^[36]

Schwartz am NIH Folgeexperimente zu Tobias Meyers Studien durch. Das Problem war, dass das An/Aus-Kontrastverhältnis bei Wildtyp-GFP sehr niedrig ist, weshalb er gerichtete Mutagenese anwendete und ein mutiertes Protein namens PA-GFP erzeugte.^[36] Damit konnte man die Fluoreszenz von Molekülen mit sehr viel höherem Kontrast anschalten (Abbildung 13D) und sehr viel bessere Pulse-Chase-Experimente durchführen (Abbildung 13E).

2005 besuchten Harald und ich das National High Magnetic Field Lab, das unser Freund aus Bell-Zeiten Greg Boebinger leitete, um uns dort mit einem Forscher namens Mike Davidson zu treffen. Mike war ein Mikroskopiker, der ein Vermögen mit dem Verkauf von Krawatten mit mikrophischen Motiven von Cocktails gemacht hatte und dieses Geld in die Entwicklung von Online-Tutorien für die großen Mikroskopfirmen investierte. Damit verdiente er noch mehr Geld, das er wiederum in seine Leidenschaft, die Lebendzellmikroskopie, steckte. Mike verfügte am Ende über eine Bibliothek von 3500 fluoreszierenden Proteinfusionen. Bei unserem Besuch bei Mike lernten Harald und ich vieles über das photoaktivierte GFP und die anderen photoaktivierten Proteine, die daraus hervorgegangen waren. Ich erinnere mich sehr lebhaft, wie Harald und ich am Flughafen in Tallahassee saßen und uns mit einem Mal klar wurde, dass diese Idee, Moleküle einzeln nacheinander anzuschalten, das fehlende Glied in der Kette war, um meine 10 Jahre vorher entwickelten Ideen zum Laufen zu bringen.

Ich hatte in der Zeit noch eine andere Mikroskop-Idee verfolgt,^[37,38] die wir nun aber verwarfen. Wir dachten, es ist leicht, also tun wir es, und tun wir es gleich. Das Problem war, dass Harald ein paar Monate vorher seinen Job gekündigt hatte. Wir waren also zwei Kerle ohne Arbeit – wie zur Hölle sollen wir das also tun? Fördergelder beantragen? Das würde

zu lange dauern, und Risikokapital genauso. Zum Glück hatte Harald die Brücken hinter sich nicht gar so endgültig eingegraben wie ich, sodass er einiges von seiner Ausrüstung bei Bell mitnehmen konnte. Wir holten die Gerätschaften aus dem Lagerschuppen und steuerten jeder 25 000 \$ von unserem eigenen Geld bei. Normalerweise macht man so etwas in der Garage, wie Jobs und Wozniak, da aber Harald nicht verheiratet war, konnten wir sein Wohnzimmer benutzen (Abbildung 14 A). So war niemand im Weg, der uns daran hindern konnte. Wir wussten, wir mussten schnell sein, weil die Idee reif war und in der Luft lag. Also arbeiteten wir rund um die Uhr Tag und Nacht. Manchmal, wenn ich das Sofa allzu bequem fand, machte Harald Fotos von mir im Schlaf, um mich damit aufzuziehen.

Uns fehlte allerdings eine Sache, denn wir waren schließlich Physiker und völlig ahnungslos, was Biologie anging. Diesbezüglich brauchten wir einen guten Partner. Kurz nach unserem Besuch bei Mike Davidson hielt ich einen Vortrag an den NIH, den ich mir über einen anderen Freund aus den Bell Labs, Rob Tycho, verschafft hatte. In dem Vortrag pries ich die andere Mikroskop-Idee an, bat aber darum, wo ich doch schon mal hier sei, bitte, bitte, bitte George Patterson und Jennifer Lippincott-Schwartz treffen zu können.

Ich lud George und Jennifer zum Mittagessen ein, ließ sie auf Geheimhaltung schwören und erzählte ihnen dann die Idee, an der Harald und ich arbeiteten. Viele hätten uns abblitzen lassen, zwei verrückte Kerle, die in den letzten 10 Jahren kein Paper veröffentlicht hatten. Jennifer ist anders, und ich verdanke ihr und Harald einen großen Teil meines Erfolges. Sie sagte: „*Fantastisch, bring es her.*“ Großartig! Nun hatten wir das Team, das wir brauchten (Abbildung 14B). Nachdem wir das Instrument in Haralds Wohn-

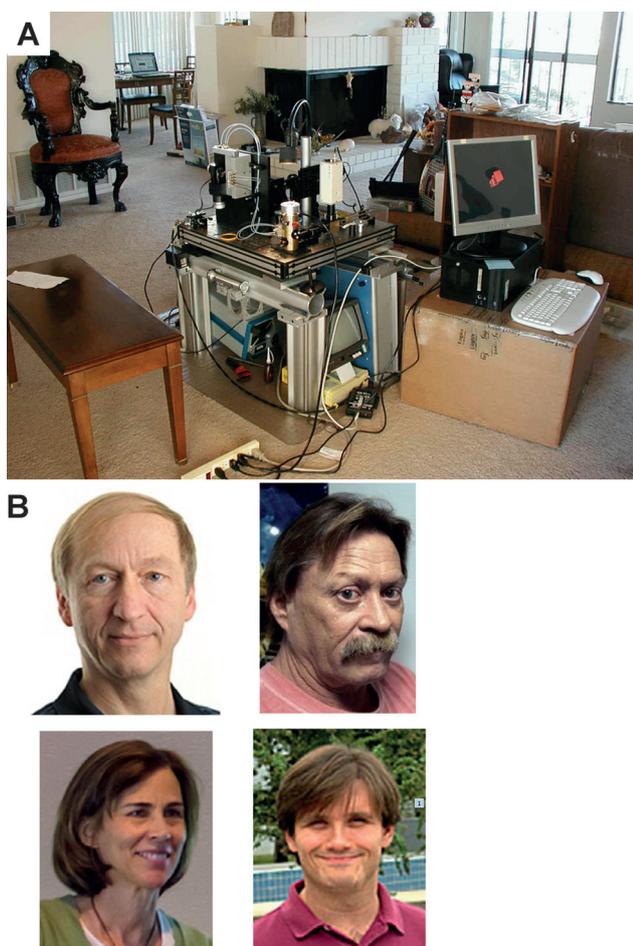


Abbildung 14. Die Entwicklung der photoaktivierten Lokalisationsmikroskopie (PALM). A) La Jolla Labs, auch bekannt als Haralds Wohnzimmer. B) Das PALM-Team. Im Uhrzeigersinn von oben links: Harald Hess, Mike Davidson, George Patterson und Jennifer Lippincott-Schwartz.

zimmer aufgebaut hatten, packten wir es ein und begannen in der Dunkelkammer von Jennifers Labor zu arbeiten, was sehr viel weniger bequem war.

Wir begannen sehr bald mit den ersten Experimenten. George kümmerte sich um die Zellkulturen, die Transfektionen und die Molekularbiologie und versuchte eine ganze Menge verschiedener Proteinfusionen. Wir stellten das violette Licht so niedrig, dass nur ein paar Moleküle gleichzeitig angeschaltet wurden. Wenn wir diese Flecken aufsummierten, erhielten wir das beugungsbegrenzte Bild. Wenn wir jedoch zuerst den Mittelpunkt jedes Flecken fanden und diese dann auftrugen, erhielten wir stattdessen das PALM-Bild (Abbildung 15A). Nach 20000 Einzelbildern kamen wir vom beugungsbegrenzten zum superhochauflösten Bild (Abbildung 15B).^[39] Mit genügend hoher Markierungsdichte kommt man mit dieser Technik auch im Wohnzimmer bis hinab auf 20 nm Auflösung. Es ist eine ziemlich einfache Methode.

In gewisser Hinsicht hatten Harald und ich Glück, denn es war keineswegs sicher, ob wir genügend Moleküle lokalisieren konnten, um bei sehr hoher Auflösung das Nyquist-Kriterium zu erfüllen. Wir hatten Glück in dem Sinne, dass wir

bestimmte photoaktivierte Proteine (Abbildung 16A) und photoaktivierbare („caged“) Farbstoffe (Abbildung 16B) fanden, die enorme An/Aus-Kontraste zeigten. Es gibt inzwischen viele Arbeiten auf dem Gebiet, und ich habe das Gefühl, viele verstehen immer noch nicht, wie wichtig der An/Aus-Kontrast ist, um gestochen scharfe Bilder zu erhalten.^[40]

Zwischen der Idee der photoaktivierten Lokalisationsmikroskopie (PALM) und dem Zeitpunkt, als wir die Daten für unsere bahnbrechende Veröffentlichung in *Science* hatten, lagen sechs Monate. Wir konnten das tun, weil wir allein in einem Wohnzimmer arbeiteten, was eine sehr effektive Umgebung ist. 2005 war das glücklichste Jahr meines Lebens, und nicht nur wegen PALM. Ebenfalls 2005 machte ich durch eine andere verrückte Kette von Umständen die Bekanntschaft von Gerry Rubin. Das Howard Hughes Medical Institute (HHMI) begann mit dem Aufbau eines Forschungsinstituts (Janelia Farm Research Center) nach dem Modell der Bell Labs. Harald und ich hatten großes Interesse an dieser Sache. Es war eine sehr weitsichtige Entscheidung von Gerry, zwei Kerle einzustellen, die seit Jahren kein Paper veröffentlicht hatten (das war bevor unser PALM-Paper herauskam). Und so brachten wir es „von Tellerwäschern zu Millionären“.

Sobald Janelia Farm eröffnete, begannen wir mit dem Bau der nächsten Mikroskopgeneration. Ich stellte Hari Shroff als Postdoc ein, Harald holte Gleb Shtengel als Senior Scientist ins Team, und dann machten wir uns an die Arbeit. In meiner Gruppe konzentrierten wir uns in den ersten Jahren auf Anwendungen. Mit Jan Liphards Gruppe in Berkeley untersuchten wir Chemotaxisrezeptoren in *E. coli* (Abbildung 17A) und konnten zeigen, dass die unterschiedlichen Clustergrößen und deren Positionen entlang der Pole mit einem stochastischen Modell der Selbstassemblierung, demzufolge die Proteine wahllos in die Membran insertieren und darin diffundieren bis sie an einen existierenden Cluster andocken, komplett vorhersagbar sind. Wir zeigten auch, dass viele Proteine, beispielsweise diejenigen in fokalen Adhäsionen, die die Zelle an das Substrat binden, im beugungsbegrenzten Bild kolokalisiert aussehen, in hoher Auflösung jedoch eindeutig nicht kolokalisiert sind (Abbildung 17B).^[42] Mit Bob Tijans Gruppe in Janelia Farm konnten wir den Mechanismus der Genstummenschaltung zeigen, bei dem zentrale Promotoren (grün in Abbildung 17C) von den an der Zellkernmembran befindlichen Genen räumlich getrennt sind (rot in Abbildung 17C).^[43] Mit Tom Blanpieds Gruppe in Maryland konnten wir lebende Neuronen in Kultur mittels sptPALM (single particle tracking PALM)^[44] betrachten und zeigen, dass das Aktin, das die Formen der dendritischen Dornen verursacht, nur an bestimmten diskreten Stellen polymerisiert ist.^[45]

Zur gleichen Zeit konstruierte Harald, der der bessere Physiker von uns beiden ist, das ultimative PALM-Mikroskop, das über einen Dreiphaseninterferometer verfügte, den er ursprünglich in der Industrie entwickelt hatte, um die Flughöhe des Schreibkopfes über einer magnetischen Scheibe zu messen.^[46] Er und Gleb untersuchten zusammen mit Clare Watermans Gruppe an den NIH die vollständige Architektur fokaler Adhäsionsproteine vertikal vom Substrat bis zum Aktinzytoskelett.^[47] In einer neueren Veröffentlichung mit Jennifers Gruppe konnten sie die Frage lösen, ob die am

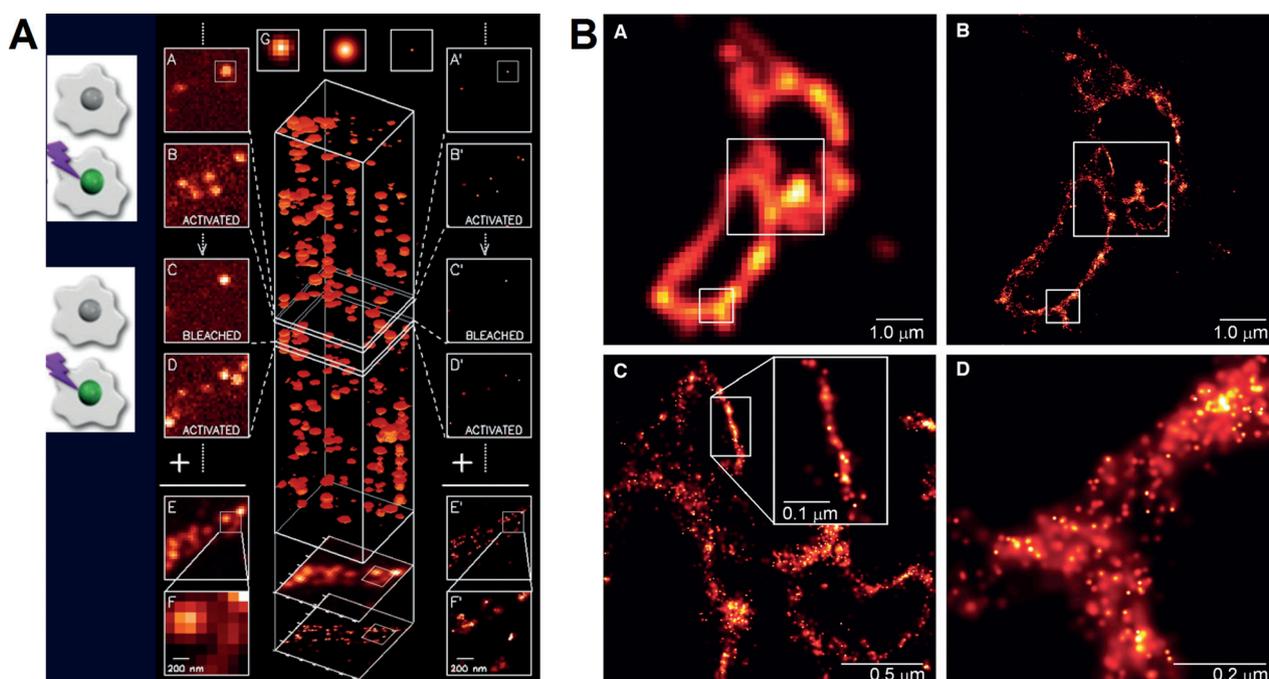


Abbildung 15. Photoaktivierte Lokalisationsmikroskopie (PALM). A) Wiederholte Runden von schwacher Photoaktivierung mit violetterm Licht führen zur Aktivierung unterschiedlicher Untergruppen von Molekülen in einer Probe. Durch Aufsummieren der beugungsbegrenzten Flecken erhält man ein beugungsbegrenztes Bild (linke Spalte). Summiert man hingegen die gemessenen Mittelpunkte aller Flecken, erhält man das superhochauflöste PALM-Bild (rechte Spalte). B) Beugungsbegrenzte (oben links) und superhochauflöste PALM-Bilder verschiedener zellulärer Bereiche, welche die Verteilung des Transmembranproteins CD-63 in einem 70-nm-Schnitt durch Lysosomen in einer COS-7-Zelle zeigen.^[39]

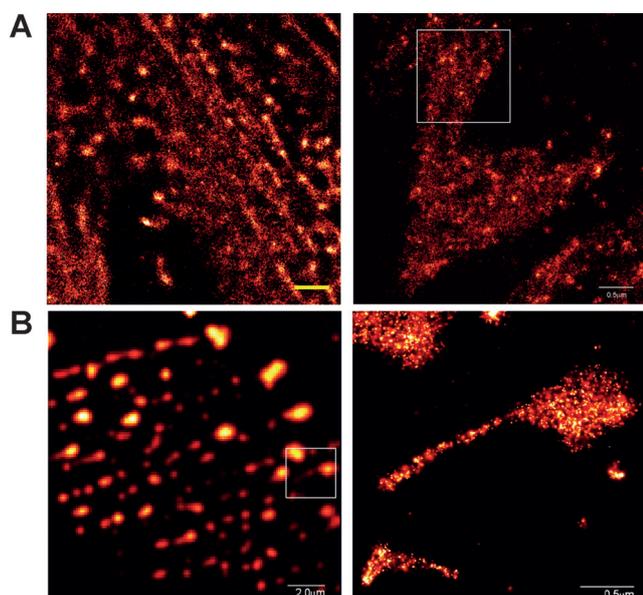


Abbildung 16. Die Bedeutung eines hohen molekularen An/Aus-Kontrastes. A) PA-GFP (links) mit einem niedrigen Kontrastverhältnis führt zu einer schlechten Auflösung im PALM-Bild einer fokalen Adhäsion, verursacht durch unpräzise Moleküllokalisationen vom umgebenden Hintergrund. Das photoaktivierbare fluoreszierende Protein Eos (rechts) mit einem hohen Kontrastverhältnis erzielt bessere Auflösung.^[40] Maßstabsleiste: 0,5 μm . B) Beugungsbegrenzte (links; Maßstabsleiste 2,0 μm) und vergrößerte PALM-Bilder (rechts; Maßstabsleiste 0,5 μm) von Inseln von photoaktivierbarem, kontraststarkem Q-Rhodamin.^[39] Das Experiment demonstriert, dass PALM nicht auf fluoreszierende Proteine beschränkt ist.

Knospungsprozess von HIV beteiligten ESCRT-Proteine außerhalb oder innerhalb der Ausstülpung aktiv sind – letzteres ist der Fall.^[48]

Harald hat von seiner Zeit in der Industrie einen starken Hintergrund in der Elektronenmikroskopie, und er kombinierte infolgedessen EM mit PALM in drei Dimensionen. Zum Beispiel untersuchte er mitochondriale Nukleotide und ihre Lokalisation innerhalb der Mitochondrien,^[49] in einem anderen Fall clathrinbedeckte Mulden.^[50]

Ich glaube, ich verdanke viel von meinem Erfolg der Tatsache, dass ich Pessimist bin. Ich fokussiere mich gerne auf Probleme, weil ich Probleme für günstige Gelegenheiten halte. Daher will ich ein wenig über die Probleme der superhochauflösenden Mikroskopie reden, statt ihre guten Seiten zu rühmen. Erstens braucht man, wegen des Nyquist-Kriteriums, eine irrsinnig hohe Markierungsdichte (Abbildung 12).^[51] Um zu diesen Dichten zu kommen, kann es sein, dass Proteine überexprimiert werden müssen (Abbildung 18A). Benutzt man exogene Farbstoffe, kann es schwierig werden, genügend Spezifität ohne einen allzu großen Hintergrund zu erhalten (Abbildung 18B). Zweitens sind 95% der Objekte, die wir mit Superhochauflösung betrachten, fixierte Zellen, obwohl bekannt ist, dass chemische Fixiermittel die Ultrastruktur auf der Nanoskala verändern (Abbildung 18C). Daher ist alles mit Vorsicht zu genießen, was mit einer chemischen Fixierung einhergegangen ist. Diesen Problemen hat man sich bei allen superhochauflösenden Methoden zu stellen – nicht nur bei PALM.

Eine sehr wichtige Innovation, um das Markierungsdichteproblem zu umgehen, resultierte aus den Zellkernporen-

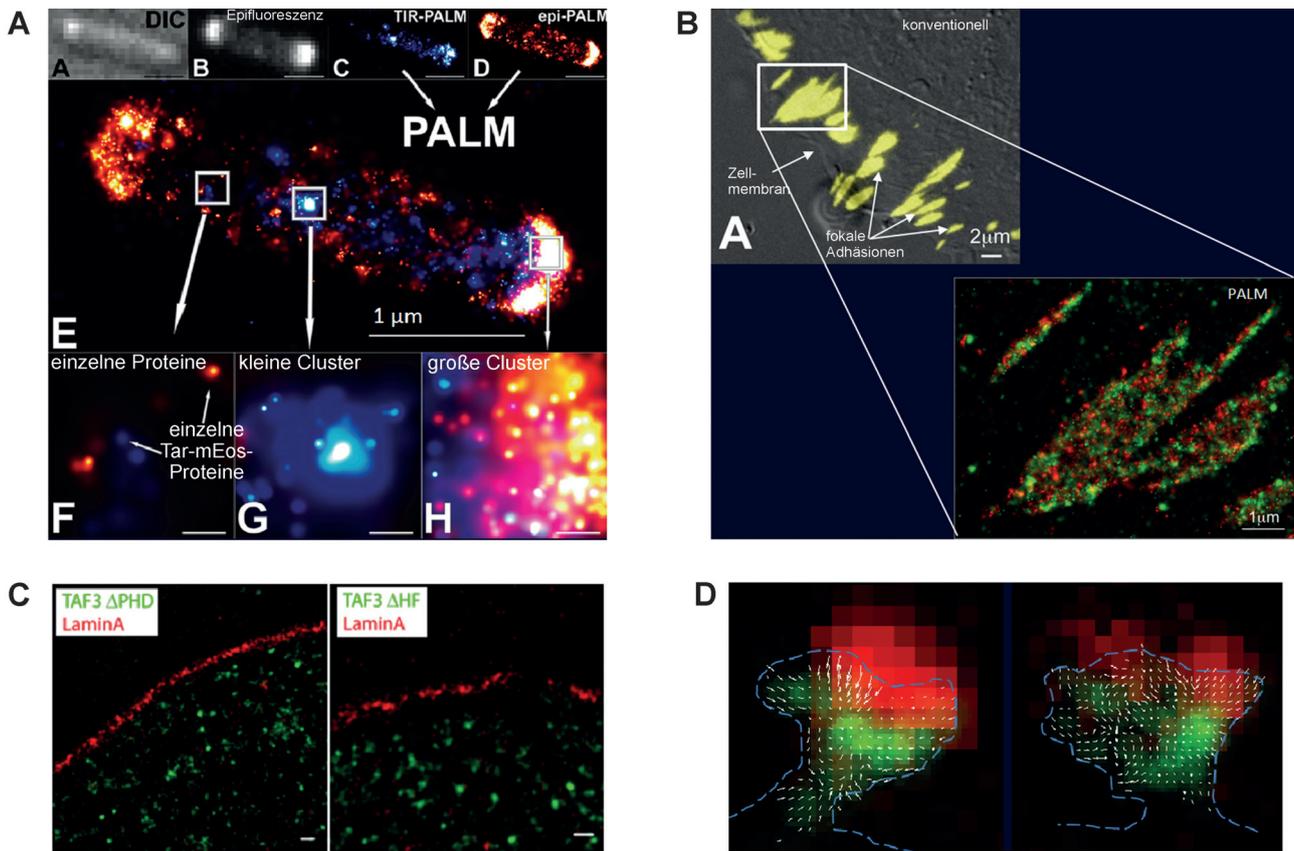


Abbildung 17. Anwendungen von PALM. A) Cluster von Chemotaxisrezeptoren in *E. coli*.^[41] B) Beugungsbegrenzte Zweifarben-Abbildung und PALM-Abbildung der räumlichen Beziehung von Vinculin und Paxillin in fokalen Adhäsionen.^[42] C) Räumliche Beziehung von Kernpromotoren der Transkription (grün) relativ zur Zellkernmembran (rot) in verschiedenen Stadien der Myogenese.^[43] D) Spuren der Aktinpolymerisation in dendritischen Dornen von lebenden Neuronen in Kultur.^[45]

studien in Jan Ellenbergs Gruppe. Sie wendeten Partikel-mittelungstechniken (wie in der Kryo-EM) an tausenden dieser stereotypischen Strukturen an und waren damit in der Lage, die radialen Positionen einiger Schlüsselproteine in den Zellkernporen auf weniger als 1 nm genau zu bestimmen.^[52] Eine Unklarheit in den Kryo-EM-Daten, nämlich bezüglich der Orientierung einer Untereinheit innerhalb der Pore, wurde mit superhochauflösender Mikroskopie geklärt. Ein wirklich großartiges Beispiel.

Natürlich haben wir in Sven Lidins Einführung gehört, dass die wahre Verheißung der Superhochauflösung die Fähigkeit und Hoffnung ist, lebende Zellen zu betrachten. Noch ist es mehr eine Hoffnung. Obwohl das Funktionieren des Prinzips nachgewiesen wurde, gab es bislang sehr wenig, was wir im Sinne echter Biologie gelernt haben. Ein Problem ist, dass man sehr viel mehr Photonen sammeln muss als im beugungsbegrenzten Fall (Abbildung 19, zweite Spalte). Noch ein Problem ist, dass sich das Leben unter einer Sonneneinstrahlung von 0.1 Watt pro Quadratmeter entwickelt hat. Die superhochauflösenden Methoden, von denen wir hier sprechen, benötigen Intensitäten irgendwo zwischen Gigawatt und Kilowatt pro Quadratmeter (Abbildung 19, dritte Spalte). Man muss sich fragen, was man der armen Zelle antut, beim Versuch sie im lebenden Zustand zu betrachten. Schließlich sind die Messzeiten vieler dieser Methoden (vierte Spalte) viel langsamer als die Zelldynamik,

weshalb man bewegungsinduzierte Artefakte erhält oder nicht den Ereignissen folgen kann, denen man gerne folgen möchte.

Eine in dieser Hinsicht bessere Technik ist SIM^[54] (Mikroskopie mit strukturierter Beleuchtung), weil sie nicht so viel Auflösungsgewinn bietet. SIM gelangt normalerweise nur um den Faktor 2 unter das Beugungslimit, bietet aber eine Menge anderer Vorteile, insbesondere bei der Lebendbildung (Abbildung 20).^[55] Es ist schade, dass nicht vier den Nobelpreis gewinnen können, weil ich glaube, es wäre absolut gerechtfertigt, SIM hier dabei zu haben.

Einer der Wegbereiter dieser Technologie war der aus Schweden stammende Mats Gustafsson, der mein Kollege in Janelia Farm war, bevor er 2011 an einem Hirntumor starb. Wir arbeiten mit Mats' SIM-Technik nun schon eine Weile und haben Wege gefunden, die 100-nm-Barriere zu überwinden — zuerst auf 80 nm und dann, mit nichtlinearer SIM,^[57] auf 60 nm; und dabei bleiben wir in der Lage, die Dynamik lebender Zellen zu betrachten. Ich glaube, PALM ist ein großartiges Werkzeug zur Abbildung von Strukturen auf der Nanoskala, ich glaube aber auch, dass SIM am Ende der Gewinner sein wird, wenn es darum geht, die Dynamik lebender Zellen jenseits der Beugungsgrenze zu verfolgen.

Letztlich bleibt es aber eine Tatsache, dass egal was man tut oder welche Technik man benutzt, höhere räumliche Auflösungen immer ein Mehr an Messungen erfordern

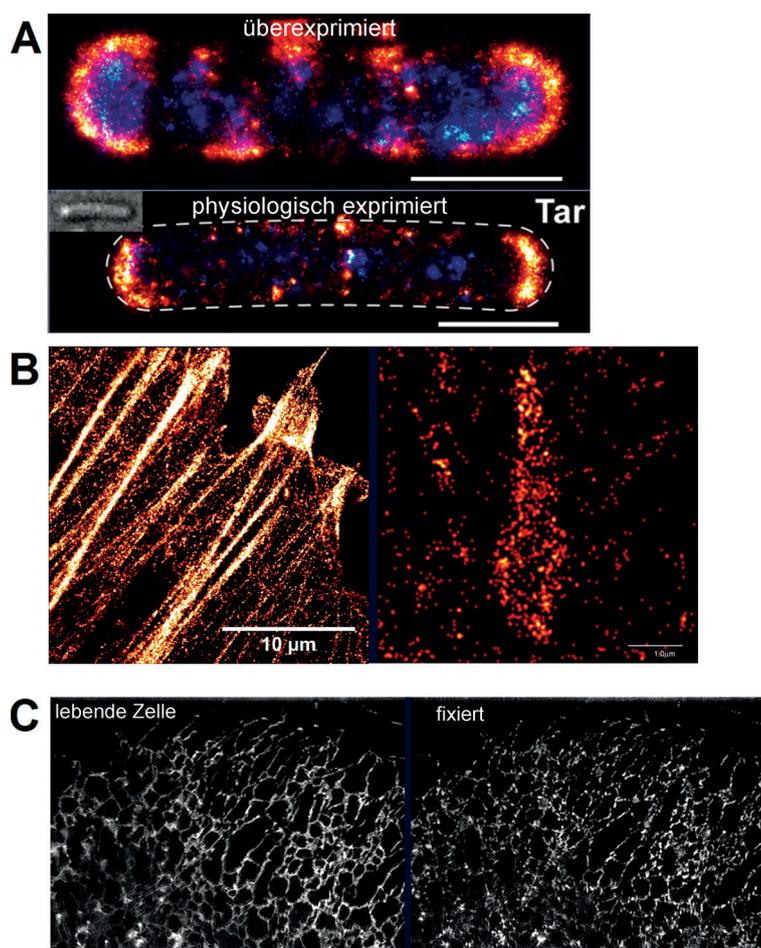


Abbildung 18. Probleme in der Superhochauflösung. A) Überexpression des Zielproteins kann den physiologischen Zustand der Zelle verändern.^[41] B) Exogen eingeführte Farbstoffe haben oft nur begrenzte Affinität für das erwünschte Ziel (links, Aktinzytoskelett) und einen hohen Resthintergrund (rechts, fokale Adhäsion). C) Chemische Fixierung kann die Ultrastruktur verändern; gezeigt ist ein endoplasmatisches Retikulum vor und nach Fixierung.

werden. Mehr Messungen bedeuten mehr Zeit und dass man mehr Licht auf die Probe strahlen muss. Die zu ziehende Lehre ist, dass wir viel mehr über Zelldynamik lernen können, wenn wir nur gewisse Abstriche in der Auflösung machen.

Was wäre also, wenn wir komplett bis zum Beugungslimit zurückrudern? Warum würden wir das tun wollen? Nun, das Kennzeichen des Lebens ist, dass es belebt ist. Jedes lebende Ding ist ein komplexes thermodynamisches System von reduzierter Entropie, das von Materie und Energie durchflossen wird. Während die rein strukturelle Bildgebung immer wichtig sein wird, benötigt man zum vollen Verständnis von Leben die hochaufgelöste Bildgebung in allen vier Raum-Zeit-Dimensionen gleichzeitig. Daher war ein anderer Fokus meiner Gruppe, in die Richtung einer 4D-Bildgebung vorzudringen. In den letzten 10 Jahren gab es enorme Entwicklungen in der Lichtscheibenmikroskopie.^[58] Die grundsätzliche Idee dabei war die Verwendung nicht-beugender Strahlen und insbesondere optischer Gitter, also jene verrückte Idee, an der ich vor dem PALM-Projekt gearbeitet hatte, und die ich dann fallen ließ. Damit haben wir nun ein wundervolles

Werkzeug, um die superschnelle 3D-Dynamik von einzelnen Molekülen bis hin zu vollständigen Embryonen über vier Größenordnungen in Raum und Zeit zu betrachten, und zwar nichtinvasiv und über sehr lange Zeiträume (Abbildung 21).^[59]

Das bringt uns schließlich zurück zur Superhochauflösung, weil im gleichen Jahr, in dem wir unser PALM-Paper veröffentlichten, Robin Hochstrassers Gruppe eine andere Art der Einzelmoleküllokalisierung publizierte, die keine Photoaktivierung erfordert, sondern nur die transiente Anbindung von Molekülen an Zellen. Der Vorteil dieser Methode ist, dass man die ganze Probe mit Fluorophoren überschwemmen kann und so eine endlose Armee von Molekülen hat, um zu immer höheren Lokalisationsdichten zu kommen. Mit unserer Lichtscheibenmikroskopie konnten wir nun selbst mit all diesen Molekülen als Hintergrund ein hohes Signal-Rausch-Verhältnis in der Einzelmolekülbildgebung erreichen, wodurch es gelang, eine 3D-Lokalisationsmikroskopie mit zwei Größenordnungen höherer Lokalisationsdichte zu realisieren. Zusätzlich können wir viel dickere Proben als mittels Weitfeldlokalisierung betrachten, wie z. B. eine komplette teilende Zelle von 15 µm Dicke, in der wir 300 Millionen individuelle Moleküle lokalisierten.

Die letzte Herausforderung ist, wie wir die Zellbiologie vom Mikroskopträger wegbekommen. Zellen sind nicht auf Deckgläsern entstanden, wir müssen sie im Inneren des ganzen Organismus anschauen. Das Problem ist, dass die Lichtstrahlen im festen Gewebe durcheinander geraten, also borgen wir uns Techniken der adaptiven Optik (AO) aus, die ursprünglich von Astronomen entwickelt wurden, um auf der Erde Teleskope mit der Auflösung des Hubble-Weltraumteleskops zu bauen. Wenn wir mit der AO-Technik tief in das Gehirn eines lebenden Zebrafischembryos gehen, sehen wir bei ausgeschalteter AO sehr geringe Auflösungen und schwache Signale (Abbildung 22 A). So würde man es mit einem normalen Mikroskop sehen. Wenn wir jetzt die adaptive Optik anschalten (Abbildung 22 B,C), die Aberrationen korrigieren und zur beugungsbegrenzten Auflösung zurückkehren, sehen wir das wiederhergestellte Ergebnis.^[61] Eine solche Bildgebung ist sogar im streuenden Gehirngewebe der Maus möglich (Abbildung 22 D).^[62–64] Das ultimative Ziel meiner Gruppe ist es, diese Techniken zu kombinieren, um mittels Methoden wie Gitterlichtscheibenmikroskopie nichtinvasiv, schnell und tief in ein multizelluläres Ensemble schauen zu können und dann superhochauflösende Techniken wie SIM und PALM einzubringen, um die hohe räumliche Auflösung hinzuzufügen. An diesem Punkt werde ich fertig sein und raus sein aus der Mikroskopie. Ich werde zurück sein in der schwarzen Phase und versuchen, etwas anderes zu finden, was ich dann tun möchte.

Ich möchte nur noch mit ein paar Dingen schließen. Erstens, es gibt viele, viele Menschen, denen es zu danken gilt; wen ich herausgreifen muss, ist Harald (Hess). Ohne

		berichtete Auflösung (nm)	erforderlicher Anstieg der Photonenzahl	Intensität (W/cm ²)	Akquisitionszeit (sec)
STED / RESOLFT	<p>Anregungs-PSF + STED-Puls-PSF = effektive PSF</p> <p>PSF-Form</p> <p>Raster-PMT/APD</p>	xy: 20 nm xyz: 30 nm	100 1,070	10 ⁴ - 10 ⁹	> 60 ~1,000
Localization	<p>Weitfeld-CCD</p> <p>Zeitreihe (einige 1000 Belichtungen)</p> <p>Gauß-Angleich einzelner Spots → Projektion</p>	xy: 20 nm xy: 10 nm, z: 20 nm	100 14,400	10 ³ - 10 ⁴	>20 1,500
SIM	<p>Weitfeld-CCD</p> <p>5 Phasen-Shifts</p> <p>Interferenz von Anregungslicht und Struktur der Probe (Moiré-Effekt)</p> <p>mathematische Rekonstruktion</p>	xy: 100 nm xy: 100 nm, z: 370 nm	4 8	10 - 10 ²	0.1 - 1 ~10

Abbildung 19. Probleme in der superhochauflösenden Mikroskopie lebender Zellen. Verglichen mit beugungsbegrenzten Abbildungstechniken erfordern die verschiedenen Superhochauflösendstechniken diverse Randbedingungen:^[53] einen starken Anstieg der von der Probe erzeugten Fluoreszenz (führt zu schnellem Photobleichen), viel höhere Beleuchtungsintensitäten (führt zu schneller Phototoxizität) und viel längere Aufnahmezeiten (führen zu bewegungsinduzierten Artefakten; Studien sind auf langsame dynamische Prozesse beschränkt).

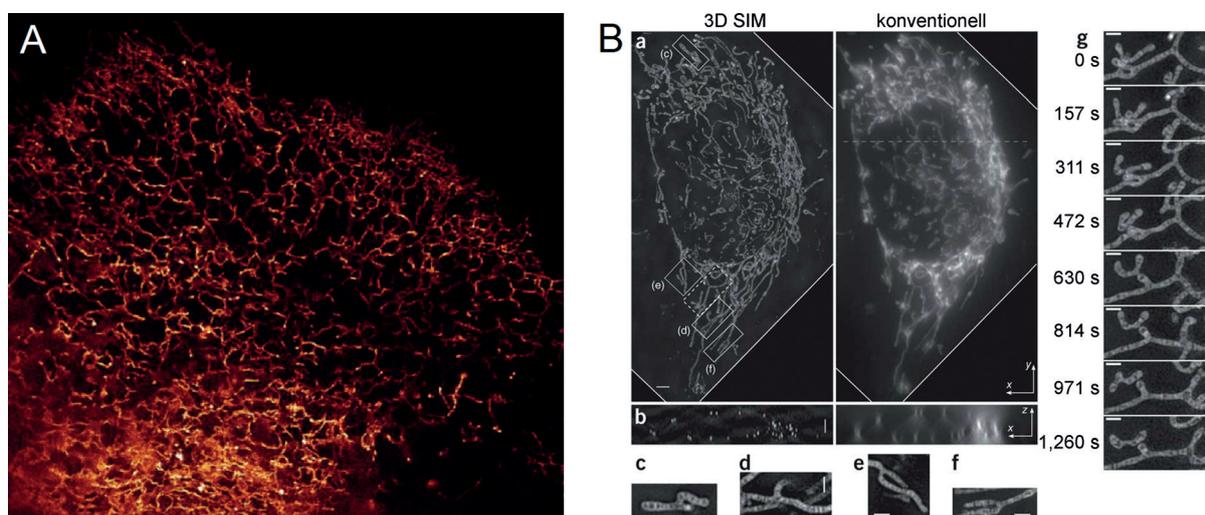


Abbildung 20. Mikroskopie mit strukturierter Beleuchtung eignet sich hervorragend für die Bildgebung lebender Zellen. A) 2D-SIM-Bild des endoplasmatischen Retikulums in einer LLC-PK1-Zelle, entnommen einem Film von 1800 Zeitpunkten in 0.75-s-Intervallen.^[56] B) 3D-SIM-Bilder der Mitochondrien in einer HeLa-Zelle, die die innere Struktur und die Dynamiken der Spaltungs- und Fusionsereignisse zeigen.^[55]

Harald als Freund und Mentor wäre ich in meinen ersten Jahren an den Bell Labs grandios gescheitert. Ich hätte nie den Mut gehabt, allein, ohne ihn an meiner Seite, das PALM-Projekt zu verfolgen. Einer der Wermutstropfen dieser Auszeichnung ist, ihn nicht hier an meiner Seite auf der Bühne zu haben. Ich denke, diese Auszeichnung ist genauso sehr seine wie meine.

Vieles, was Sie an diesem Morgen gehört haben, wie in Shuji Nakamuras, Stefan Hells und meinem Vortrag, handelt von der Bereitschaft, Risiken einzugehen. Menschen werden immerzu ermahnt, Risiken auf sich zu nehmen, und das ist in Ordnung. Aber Sie hören das von denjenigen, für die sich das Risiko ausbezahlt hat. Es ist kein Risiko, wenn man nicht die meiste Zeit scheitert. Und so will ich meinen Vortrag all

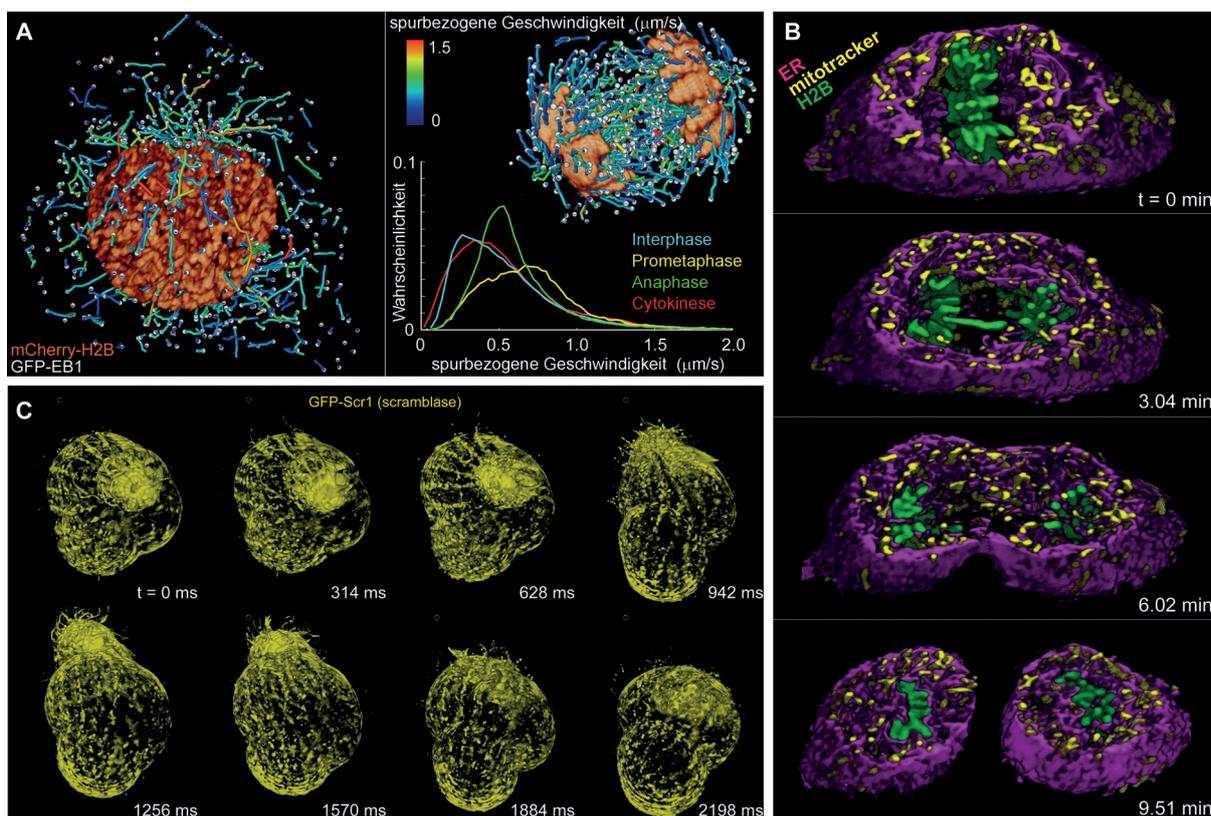


Abbildung 21. Schnelle, nichtinvasive 3D-Bildgebung mit Gitterlichtscheibenmikroskopie.^[59] A) Spuren der Plusenden wachsender Mikrotubuli an Chromosomen (orange) in verschiedenen Stadien der Mitose mit spurbezogenen Geschwindigkeiten. B) Computerschnitte zu verschiedenen Zeitpunkten einer sich teilenden LLC-PK1-Zelle, welche die 3D-räumliche Beziehung zwischen Chromosomen (grün), dem endoplasmatischen Retikulum (tiefrot) und den Mitochondrien (gelb) erkennen lassen. C) Schnelle Gestaltänderungen im Protozoon *Tetrahymena thermophila* in Intervallen von 0.31 s.

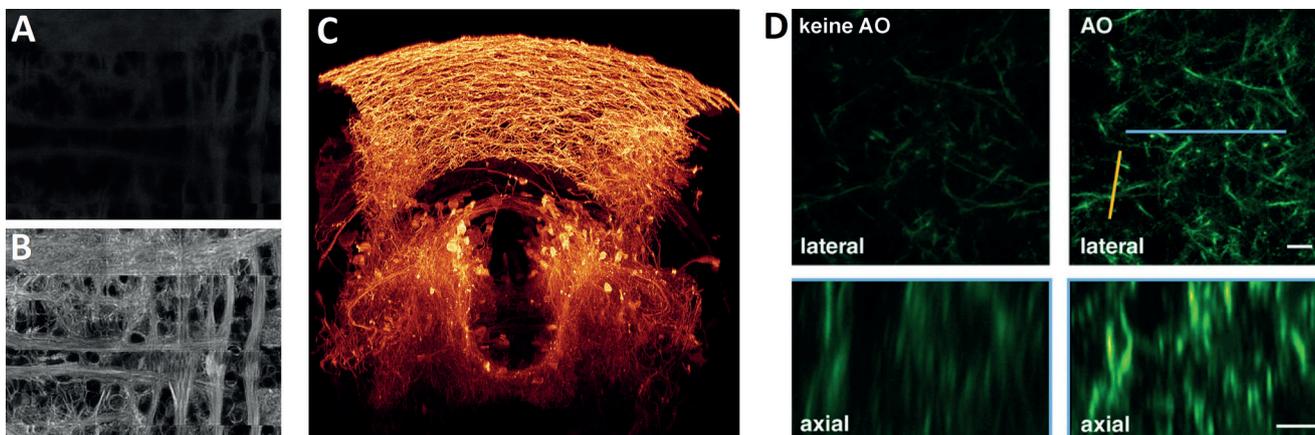


Abbildung 22. Adaptive Optik ermöglicht tiefe Bildgebung bei hoher Auflösung. A) Zweiphotonenbild eines membranmarkierten Neurons im Rückenmark eines Zebrafischembryos 72 h nach der Befruchtung. B) Die gleiche Region nach Korrektur mit adaptiver Optik unter Anwendung direkter Wellenfrontdetektion.^[61] Signal und räumliche Auflösung sind deutlich verbessert. C) Adaptive optische Korrektur einer spärlichen Untermenge von Neuronen auf einem dicken Block von Zebrafischgehirn. D) Laterale und axiale In-vivo-Zweiphotonenbilder von Nervenprozessen tief im MauskorTEX vor (links) und nach (rechts) Korrektur mit adaptiver Optik unter Anwendung indirekter Wellenfrontdetektion.^[63]

denen widmen, die ihr Glück verspielt haben, ihre Karrieren und ihren Ruf, um ein Risiko einzugehen, und am Ende gescheitert sind. Ihnen will ich nur sagen, dass die Mühe selbst der Lohn ist, und die Zufriedenheit zu wissen, dass man alles,

was man konnte, gegeben hat, um die Welt zu einem besseren Ort zu machen. Danke für Ihre Zeit.

Anhang: Autobiographie

Ich wurde in der Universitätsstadt Ann Arbor, Michigan, geboren, wo ich auch meine Kindheit verbrachte. Obwohl meine Eltern damals noch nicht an der Universität waren, glaube ich, dass die Umgebung und die Menschen sehr dazu beigetragen haben, dass mich die Wissenschaft so vereinnahmte.

Mein Vater ging nach dem Zweiten Weltkrieg an die University of Michigan mit Hauptfach Sport. Er wurde Kapitän des Ringer-Teams (Abbildung 23), und nach seinem Abschluss blieb er eine Weile als Trainerassistent. Danach begann er als technischer Zeichner in einer Maschinenfabrik, und meine Eltern wurden in Ann Arbor sesshaft.



Abbildung 23. Zwei aufstrebende Ingenieure. Links: Mein Vater, Kapitän der Ringermannschaft der University of Michigan, 1948. Rechts: Ich im Alter von 7 beim Bau einer Giraffe.

Mein Vater lehrte mich den Wert harter Arbeit zu schätzen. Er war sehr bescheidener Herkunft, gründete am Ende aber eine eigene Firma, die er auf 300 Angestellte mit 75 Millionen Dollar Jahresumsatz expandierte. Meine Mutter zog meine zwei älteren Schwestern, meinen jüngeren Bruder und mich groß. Meine Eltern waren beide ziemlich intelligent und außerdem extrem ehrgeizig. Mein Vater verpasste nur knapp die Olympiateilnahme 1948 im Ringerteam. Meine Mutter hatte kein Ventil für ihre Intelligenz, und ich glaube, sie war unglücklich in ihrer Rolle als Hausfrau in den 50er und 60er Jahren. Sie liebte es, die Kandidaten bei Jeopardy im Fernsehen vernichtend zu schlagen. Ich glaube, dass sich der Ehrgeiz meiner Eltern in gebündelter Form auf mich vererbt hat. Ich mag es nicht, zu verlieren.

Ich hatte eine glückliche Kindheit. Ich war bei den Pfadfindern, spielte ein wenig mit anderen Kindern, aber nichts interessierte mich so sehr wie Lesen und Lernen. Meine Geschwister sagen, ich war mit mir selbst beschäftigt. Schon im Kindergarten faszinierte mich die Raumfahrt – das Erforschen und die Aufregung, die Raketen und die Kraft. Ich zeichnete sorgfältig konstruierte Raketenentwürfe und andere sinnlose Maschinen, die mein Lehrer in der fünften Klasse in den Fluren der Grundschule an die Wand hängte. Als ich ein bisschen älter war, begann ich dann Modellraketen zu bauen. Wenn ich über Wissenschaft redete, konnte ich leidenschaftlich sein, aber sonst war ich sehr schüchtern.

In der dritten Klasse freundete ich mich mit einem Jungen an, dessen Vater Wissenschaftler an der Universität war, und er infizierte mich mit seiner Begeisterung für die Wissenschaft. Wir hatten den „Science Service“ abonniert und konnten es jeden Monat kaum abwarten, ein neues Bastelset zu bekommen, mit dem wir eine Batterie bauen oder das nächste Experiment durchführen konnten. Am Ende der vierten Klasse hatte ich jedes Wissenschaftsbuch der Schulbücherei ausgelesen und suchte nach mehr zum Lernen. Ich erinnere mich, dass ich unmittelbar nach der Entdeckung der Quarks einen Brief an einen Wissenschaftler der Universität schrieb. Ich fragte ihn über die Masse und Ladung der Quarks und war so aufgeregt, als er mir zurückschrieb und meine Fragen beantwortete. In der Middle School wollte ich theoretischer Astrophysiker werden.

In der siebten Klasse verbrachte ich die meisten Nachmittage damit, mit ein paar Freunden im Hinterzimmer des Naturwissenschaftslehrers herumzubasteln. Dort gab es alles, was man brauchte, um alles mögliche zu bauen, vom Feuerwerk bis zu einem Van-de-Graaff-Beschleuniger. Wir blieben oft bis zum Abend und stellten Schießpulver her oder mischten Chemikalien, um zu sehen, welche Farben man bekam, wenn man verschiedene Metalle zugab. Der Mann würde vermutlich verhaftet, wenn er das heute erlauben würde. Aber diese Freiheit, alles zu erforschen, war so wertvoll.

In der High School wurde ich zur Lernmaschine. Ich belegte alle Fortgeschrittenenkurse, ob mich das Fach interessierte oder nicht. Manchmal arbeitete ich die Nächte durch, um meine Hausarbeiten zu erledigen. Meine Anwesenheit in den Kursen war gerade noch genügend, um zu bestehen – aber Mann, ich lernte viel. Mein Biologielehrer im Abschlussjahr war Mr. Young. Man wusste, dass er noch keinem eine Eins gegeben hatte, und so machte ich es zu meiner Mission, eine Eins plus in seiner Klasse zu bekommen. Jede Woche hatten wir ein kompliziertes und extrem detailliertes Praktikum, und damals merkte ich, dass ich das Experimentieren mag, etwas mit den Händen zu tun. Ich gab jede Woche einen 50- bis 100-seitigen Bericht ab und bekam die Eins plus.

Nach der High School ging ich ans Caltech. Ich fühlte eine ziemliche Beklommenheit, weil ich Angst hatte, nicht mit den anderen mithalten zu können. Mir war nicht klar, dass meine High School eine der besten im Land war, und es stellte sich heraus, dass ich besser vorbereitet war als die meisten anderen Studenten.

Ich stürzte mich in das Studium und schrieb mich in immer schwierigere Kurse ein. In meinem dritten Jahr an der Uni stieß ich an meine Grenzen. Es fühlte sich an wie eine Dauerschleife aus Hausarbeiten, Lernen und Klausuren. Ich musste das dritte Trimester aus gesundheitlichen Gründen aussetzen; mein Haar fiel aus und ich bekam Ekzeme, ich sah aus wie ein Hummer. Niemehr in meinem Leben arbeitete ich so viel.

Ich erhielt eine sehr gute Ausbildung am Caltech, aber es war extrem theoretisch. Es war schließlich ein Projekt in einem Labor für Strömungsmechanik, das mich nach experimenteller Forschung süchtig machte. Mein Tutor, Garry Brown, ermutigte mich, meine Forschung bei einem Studentenwettbewerb des American Institute of Aeronautics and

Astronautics vorzustellen. Mein Übungsvortrag war unglaublich verdichtet und voller Gleichungen, und Garry zerfetzte ihn. Er brachte mir bei, dass ein Vortrag eine Geschichte erzählen musste. Es war unglaublich hilfreich zu lernen, wie man Wissenschaft kommuniziert, und am Ende gewann ich den Wettbewerb. Diese Erfahrung überzeugte mich, ein experimenteller Wissenschaftler zu werden.

1983 machte ich meinen Abschluss am Caltech und wollte nun also praktische Anwendungen für meine Physik finden. Cornell bot eine der landesweit wenigen Programme in angewandter Physik an, und die Studenten waren zur Hälfte Frauen. Obwohl ich immer noch sehr schüchtern war, war mir klar, dass ich dort gezwungenermaßen mit dem anderen Geschlecht konfrontiert würde. Also ging ich nach Cornell.

Mein künftiger Karriereweg begann sich schnell abzuzeichnen. Nach dem ersten Semester begegnete ich Mike Isaacson und Aaron Lewis. Aaron war Chemiker mit Erfahrung in der Raman-Spektroskopie, und Mike gehörte zu den Ersten, die Atome direkt in einem Elektronenmikroskop abgebildet hatten. Mike hatte das Mikroskop quasi umgedreht und es in ein Lithographieinstrument verwandelt, das Löcher von nur 30 nm in eine dünne Membran bohren konnte, die man dann mit einem Metall ummantelte, um es lichtundurchlässig zu machen.

Er und Aaron hatten die Idee, Licht durch diese Aperturen zu schicken und über lebende Zellen zu fahren, um auf diese Weise nur 30 nm kleine Zonen zu beleuchten und Bilder mit der Auflösung eines Elektronenmikroskops zu produzieren. Das klang nach einer großen Sache, und ich wollte dabei sein.

Als wir mit den Experimenten anfangen, konnte ich das Ende der Vorlesungen kaum abwarten. Ich wollte immerzu im Labor sein. Die ersten paar Jahre waren wirklich hart. Wir hatten kein Geld. Zusammen mit einem anderen Doktoranden, Alec Harootunian, konnte ich die Muster in der Submikrometeranlage erzeugen, alles andere mussten wir uns leihen oder selbst bauen. Ich lernte, Dinge zum Laufen zu bringen, auch wenn man nichts hat, womit man arbeiten kann. Meine Tutoren ließen mich meist allein, und als ich nach ein paar Jahren Forschungsmittel bekam, durfte ich daher meine eigenen Fehler machen. Ich machte jede Menge Fehler, aber man lernt ja aus Fehlern, und ich lernte viel.

Ich investierte viel Arbeit in die Charakterisierung der Aperturen, und Alec begann, einen Versuchsstand aufzubauen. Um diese Aperturen herstellen zu können, durften die Membranen nur 100 nm dünn sein; sie zerbrachen, wenn man sie nur schief ansah. Nach den ersten paar Jahren fanden wir heraus, dass wir Glaspipetten ziehen konnten – wie es bei der Patch-Clamp-Technik getan wird –, um so die Spitzen zu erzeugen, die wir für die Sonden benötigten. Alec schrieb seine Doktorarbeit, und ich baute dieses verrückte, komplizierte und teure Mikroskop, das irgendwie funktionierte (Abbildung 24). Ich mikroskopierte nichts weiter als Testmuster, aber es reichte, um zu beweisen, dass die Idee funktionierte.

Damals war Cornell eine führende Institution im Bereich der Physik kryogener Materie, und die Bell Labs rekrutierten darum zahlreiche Mitarbeiter aus Cornell. Ich habe nicht auf eine Anstellung bei den Bell Labs gelehzt, absolvierte aber Anfang 1988 ein Vorstellungsgespräch. Als ich wieder ging,

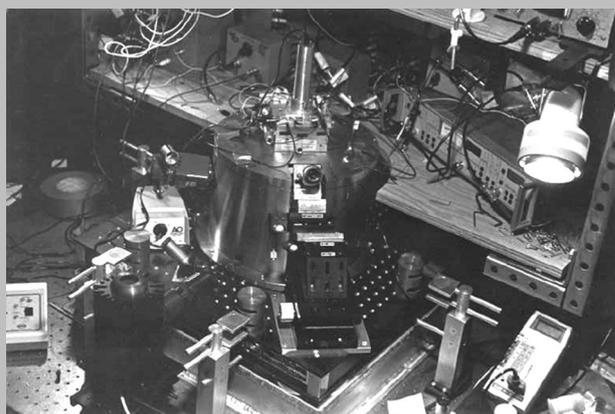


Abbildung 24. Mein Nahfeldmikroskop in Cornell.

wusste ich, dass dies der Ort war, wo ich sein wollte. Alle waren so gescheit und offen, man hielt nichts vor mir zurück. Ich hatte einen Vortrag von 45 Minuten vorbereitet, der doppelt so lange dauerte, weil ich mit Fragen überhäuft wurde. Es war fantastisch.

Während dieses Besuchs traf ich Horst Störmer, den Leiter des Departments für Halbleiterphysik (Abbildung 25). Horst strahlte aus jeder Pore Begeisterung und Energie aus und war auch sonst einfach brillant. Ich wusste fast nichts über Halbleiterphysik, aber Horst hielt Nahfeldmikroskopie für eine richtig tolle Idee. Er wollte mich einstellen, obwohl ich an etwas völlig anderem forschte als jeder andere im Department – mit Ausnahme von Harald Hess, den ich bei dem Besuch ebenfalls traf. Harald hatte ein Tieftemperatur-Rastertunnelmikroskop gebaut, um Supraleiter zu untersuchen, und er und ich verstanden uns auf der Stelle.

Ich wurde in Horsts Department eingestellt und machte mit meiner Nahfeldforschung da weiter, wo ich aufgehört hatte. Ich hatte genügend Ressourcen, um mein Mikroskop zu bauen, aber das verdammte Ding funktionierte nicht besser als in Cornell. Aufgrund der Geschichte der Bell Labs und jedermanns Brillanz fühlte ich mich von Beginn an wie in einer Probezeit. Nach zwei Jahren schrieb ich in meine Eigenevaluation, dass man mich nicht zu entlassen bräuchte,

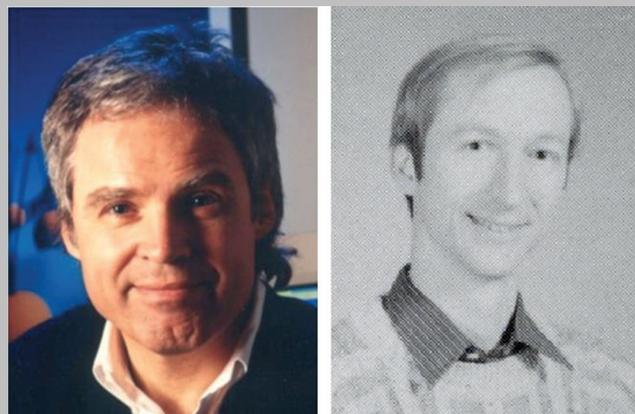


Abbildung 25. Meine Mentoren, 1989. Links: Mein Boss an den Bell Labs, Horst Störmer. Rechts: Mein bester Freund und der begabteste Wissenschaftler, den ich je kannte, Harald Hess.

falls ich im nächsten Jahr keinen Durchbruch erziele, da ich in dem Fall von mir aus kündigen würde.

Harald hielt mich während dieser Zeit über Wasser, persönlich und auch beruflich. Wir beide arbeiteten wahnsinnig viel in diesen Jahren. Ich kam um 4:30 morgens zur Arbeit, und wenn ich Haralds Auto sah, legte ich meine Hand auf die Kühlerhaube, um zu sehen ob der Motor noch warm war. Er tat exakt das Gleiche. Es war wie ein Wettstreit, aber wir spielten jeden Morgen Tennis und aßen jeden Tag gemeinsam zu Abend. Wir waren beste Freunde und sind es noch immer.

Im dritten Jahr hörte ich auf, einfach eine Sache nach der anderen auszuprobieren und begann wie ein Physiker zu überlegen, warum Dinge nicht funktionierten. Sobald ich die physikalischen Probleme der von mir benutzten Pipettenspitze verstanden hatte, realisierte ich, dass ich sie durch eine optische Faser ersetzen konnte, die mehr Licht in die Spitze leitete. Ich fand auch eine Methode, um mittels dissipativer Kraftrückkopplung den Abstand der Mikroskopspitze zur Probenoberfläche zu regulieren, ohne dass, wie bei meiner alten Methode, die Spitzen abbrachen. Die Technik konnte sowohl für Zellen als auch für Halbleiter benutzt werden.

Diese Durchbrüche ebneten den Weg für das goldene Zeitalter der Nahfeldmikroskopie in den folgenden Jahren. Ich probierte die Technik an allem aus, was mir einfiel. Manchmal funktionierte es und manchmal nicht; die Veröffentlichungen kamen in rascher Folge. 1992 wendeten wir die Technik zur Datenspeicherung an (einmal hielten wir den Weltrekord für Speicherdichte), und im nächsten Jahr demonstrierte ich erstmals eine superhochauflösende Fluoreszenzbildgebung von Zellen.

W. E. Moerner beobachtete 1989 erstmals die spektrale Signatur von Einzelmolekülen bei kryogenen Temperaturen, aber niemand hatte bis dahin einzelne Moleküle bei Raumtemperatur abgebildet. Man brauchte fokussiertes Licht, da sonst der Hintergrund die Signatur eines einzelnen Moleküls verdecken würde. Es gab damals keine bessere Möglichkeit zur Fokussierung von Licht als die Nahfeldmikroskopie, und als ich das Experiment versuchte, funktionierte es. Überraschenderweise sahen die Moleküle wie kleine Bögen statt runder Punkte aus – das Molekül verhielt sich als Lichtquelle, und sein Dipolmoment sondierte das elektrische Feld innerhalb der Nahfeldapertur. Das Experiment dauerte nur einen Nachmittag – aber es war ein Erdbeben für die Wissenschaft.

Der letzte Durchbruch kam, als wir meine Nahfeldsonde mit Haralds Tieftemperatur-Tunnelmikroskop kombinierten, um Quantentopfstrukturen zu untersuchen, die die Grundlage von Halbleiterlasern wie z.B. Laserpointern sind. Mit konventioneller beugungsbegrenzter Optik sahen ihre Spektren wie ein glatter Emissionshügel aus, wir aber sahen nun eine verrückte Abfolge von superscharfen Linien. Unser Sondenvolumen war so klein, dass das Licht nur an bestimmten diskreten Stellen emittiert werden konnte. Und die Wellenlänge dieses Lichts hing sehr empfindlich von der lokalen Dicke des Quantentopfes ab, sodass diese Stellen in unterschiedlichen Farben leuchteten, was bedeutete, dass wir sie einzeln beobachten konnten.

Es folgte eine fantastische Veröffentlichung – und trotzdem hatte ich es damals satt. Zwar hatte sich die Nahfeldtechnik als ein wertvolles Instrument für die Materialcha-

rakterisierung und die Untersuchung von Licht-Materie-Wechselwirkungen auf der Nanoskala erwiesen, mein ursprüngliches Ziel war aber ein optisches Mikroskop, mit dem man lebende Zellen mit der Auflösung eines Elektronenmikroskops betrachten konnte. Nahfeld funktionierte jedoch nur mit Proben, die lächerlich flach waren und in denen die gewünschten Objekte ganz nah an der Oberfläche lagen. Wenn man nur 20 nm weg ist, verliert man signifikant an Auflösung. Ich wusste, dass eine Zelle etwas unebener als 20 nm war, sodass es einfach nicht funktionieren würde.

In der Zwischenzeit hatte sich das Feld aufgebläht. Es gab Hunderte von Leuten, die Nahfeldmessungen betrieben, und vieles davon war Mist. Die Leute logen sich selbst in die Tasche mit Bildern von scharf aussehenden Strukturen, die jedoch von Artefakten stammten, und sie wollten es einfach nicht hören. Es fühlte sich an, als ob jedes gute Ergebnis, das ich hatte, die Rechtfertigung für hundert schlechte Folgearbeiten bot, was eine Verschwendung von Zeit und Steuergeldern bedeutete.

Damit nicht genug, zeichnete sich 1994 klar ab, dass die Bell Labs dem Ende entgegengingen. Das Telefonmonopol war 1984 gelockert worden, und AT&T war nicht mehr in der Lage, große Ausgaben für die Grundlagenforschung zu rechtfertigen. Wir spürten das Gewicht der Welt auf unseren Schultern. Ich war erschöpft.

Also kündigte ich. Während meine Frau arbeiten ging, blieb ich zuhause mit meiner Tochter Kriya, die 1993 auf die Welt kam, und wurde zum Hausmann. Ich wusste wirklich nicht, was ich tun wollte.

Mein Vater hatte für die gleiche Firma gearbeitet bis er 60 war und setzte dann seine Altersvorsorge für die Gründung einer eigenen Firma ein. Er hatte sich immer gewünscht, dass ich bei ihm arbeiten würde. Also fuhr ich gelegentlich nach Michigan, um ihn hier und da zu beraten, während ich weiter meine Tochter in New Jersey aufzog und über Wissenschaft nachdachte.

Ein paar Monate nach meiner Kündigung bei Bell schoss es mir beim Spaziergang mit Kriya durch den Kopf, dass man doch nur verschiedene Moleküle in mehreren Dimensionen einzeln isolieren müsste, um dann jedes einzelne lokalisieren und in superhoher Auflösung beobachten zu können. Ich war einige Monate begeistert davon und veröffentlichte die Idee. Ich wusste aber, dass eine praktische Anwendung dieses Konzepts in der Biologie schwierig werden würde, da sich in einem einzigen beugungsbegrenzten Lichtfleck hunderte oder tausende von Proteinen befinden konnten, und es keinen einfachen Weg gab, sie bei Raumtemperatur auseinanderzuhalten. Als Ingenieur wollte ich kein Heldenexperiment machen; ich wollte etwas Nützliches machen.

Mit drei begann Kriya mit Jersey-Akzent zu reden, und ich wusste, dass wir von New Jersey weg mussten. Ich glaubte inzwischen daran, dass ich in der Firma meines Vaters etwas bewirken konnte, und so zogen wir 1997 nach Michigan um.

Mein Vater gewährte mir die gleichen Freiheiten, wie ich sie von den Bell Labs kannte. Meine stolzeste Entwicklung war eine servohydraulische Werkzeugmaschine, die alte Hydraulik mit moderner Steuerungstechnik und Energiespeicherprinzipien kombinierte, wie sie heute in Hybridautos verbaut sind (Abbildung 26). Sie konnte 4 Tonnen bei 8 G



Abbildung 26. Mein Abstecher. Die servohydraulische Maschine, die ich in der Firma meines Vater entwickelte.

Beschleunigung bewegen und auf 5 μm genau positionieren. Sie war viel kleiner, billiger, schneller und besser als irgendeine Maschine zuvor. Sie war aber auch zu sehr anders, und nach drei oder vier Jahren Entwicklung konnte ich sie nicht für einen Heller verkaufen.

Man unterliegt in der Geschäftswelt so viel mehr Zwängen als im akademischen Leben. Wer immer es versteht, Profit zu machen, hat meinen allergrößten Respekt. Ich war sehr schlecht darin, und ich hatte das Gefühl, dass ich nur einen kleinen Teil meiner Fähigkeiten und Talente nutzte. Also kündigte ich 2002.

Das war wahrscheinlich der härteste Abschnitt meines Lebens. Ich hatte meine akademische Karriere in den Sand gesetzt, und nun auch meinen Ersatzplan in der Firma meines Vaters. Einmal mehr hatte ich keine Vorstellung, was ich tun wollte. Glücklicherweise hatte ich noch Geld auf der Bank, was mir etwas Zeit verschaffte, über eine Lösung nachzudenken.

Ich nahm wieder mit Harald Kontakt auf, der auch in die Industrie gegangen war und jetzt in San Diego arbeitete, dort aber auch nicht gänzlich zufrieden war. Wir trafen uns in diversen Nationalparks (Abbildung 27) und stellten uns unserer Midlife-Crisis. Was wollen wir vom Leben? Was ist wichtig? Wie können wir etwas bewirken? Den Rest der Zeit saß ich in unserer Hütte an einem See in Michigan, während Kriya und ihr Bruder Ravi in der Schule waren.

Ich begann wieder, die wissenschaftliche Literatur zu lesen und stieß sehr bald auf Marty Chalfies Arbeit über grün fluoreszierendes Protein (GFP), die er 1994 veröffentlicht hatte. Es war wie eine religiöse Offenbarung für mich. Was die Nahfeldmikroskopie unter anderem so schwierig machte, war die Tatsache, dass es sehr schwer war, Proteine in genügender Dichte zu markieren, ohne dabei den Fluorophor an eine Menge unspezifischen Mülls anzuhängen. Hier war nun eine Methode, die mit 100 % Spezifität markieren konnte, und man konnte es in einer lebenden Zelle tun. Ich konnte nicht glauben, wie unglaublich elegant das war. Ich hatte nicht



Abbildung 27. Auf der Suche nach dem rechten Weg. Harald (links) und ich (rechts) im Yosemite National Park, 2002.

wieder zurück zur Mikroskopie gewollt, aber als ich vom GFP hörte, hatte ich das Gefühl, zurückkehren zu müssen.

Ich wollte GFP nutzen, um lebende Zellen zu mikroskopieren, allerdings waren meine Physikkenntnisse inzwischen verkümmert. Ich kramte meine alten Lehrbücher hervor und begann, alte Aufgaben zu lösen. Ich war wirklich motiviert, es dieses Mal zu verstehen, denn es war sicher meine letzte Chance, Karriere in der Wissenschaft zu machen. Das Wissen befand sich immer noch in meinem Kopf, es war nur wie hinter einer Mauer versteckt, und diese Mauer fiel schnell. Robert Heinlein, in *Fremder in einer fremden Welt*, nannte es „grok“, wenn man etwas so gut kennt, dass man es liebt und hasst und es Teil von einem ist. Innerhalb von 3 Monaten „grokte“ ich Beugung und Licht und die Entstehung von Lichtfokussen.

Ich dachte darüber nach, mehrere Fokusse zu benutzen, um schneller Bilder aufzunehmen. Ich erfuhr von optischen Gittern, die ein paar Jahre zuvor entwickelt worden waren, und formulierte eine Theorie für neue Gitter, die eine schnellere und unschädlichere Aufnahme von Bildern ermöglichen könnten. Nachdem ich alle möglichen Anwendungen durchdacht hatte, reichte ich ein über 300 Seiten langes Patent ein.

Ich versuchte Harald zu überzeugen, mit mir zusammen dieses Gittermikroskop zu bauen. Er war interessiert, aber unsicher. Ich kontaktierte auch Horst, der 1998 den Nobelpreis gewonnen hatte und jetzt in Columbia war. Er lud mich ein, meine Idee am dortigen Biology Department im April 2005 vorzustellen. Einer meiner Gastgeber bei diesem Besuch war Marty Chalfie; im Taxi auf der Fahrt zum Abendessen wandte er sich zu mir um: „*Es hört sich an, als ob Sie wirklich an diese Idee glauben. Wie wollen Sie wieder zurück ins Labor?*“ Ich antwortete: „*Ich habe keine Ahnung, aber in Physics Today habe ich gelesen, dass es da einen Mann namens Gerry Rubin gibt, der ein biologisches Bell Labs aufmachen will*“, und dabei beließen wir es.

Mein vorderstes Interesse galt weiterhin der Suche nach einer Methode zur Realisierung des Gittermikroskops. Im selben Monat reiste ich mit Harald an die Florida State University, um Mike Davidson zu treffen. Mike hatte eine der

weltweit größten Sammlungen von fluoreszierenden Proteinfusionen, und wir erfuhren von ihm von photoaktivierbaren fluoreszierenden Proteinen. Am Flughafen von Tallahassee auf unserem Weg nach Hause wurde Harald und mir plötzlich klar, dass dies das fehlende Teil für meine Idee war: Wir könnten ein paar Moleküle zur gleichen Zeit isolieren, indem wir begrenzte Untergruppen photoaktivierbarer Proteine aktivieren. Es schien so leicht. Wir verwarfen die Gitter-Idee und begannen Patentanmeldungen zu schreiben. Wir trafen uns weiterhin in Nationalparks und machten Pläne für unsere Forschungs- und Patentstrategie.

Harald und ich wussten nichts über Biologie und brauchten deshalb Hilfe. Ich arrangierte ein Treffen mit den Entwicklern der photoaktivierbaren Fluorophore, Jennifer Lippincott-Schwartz und George Patterson an den National Institutes of Health, und erklärte ihnen unsere Idee. Jennifer meinte, wir sollten das Mikroskop bauen und herbringen.

Harald und ich bauten das erste PALM-Mikroskop in seinem Wohnzimmer in La Jolla (Abbildung 28). Wir waren beide arbeitslos, aber Harald hatte einige Geräte von Bell, die wir aus dem Lager holten. Jeder steuerte 25000 \$ bei, für alles was wir sonst noch benötigten. Wir arbeiteten hart und verschickten im September alle Einzelteile, um das Mikroskop in der Dunkelkammer von Jennifers Labor am NIH wieder aufzubauen. Als wir das erste Mal ein mit Molekülen überzogenes Deckglas unter das Mikroskop legten und das photoaktivierende Licht anschalteten, leuchtete die erste Untergruppe auf, und wir wussten, wir hatten es geschafft.

Indem wir das photoaktivierende Licht eingrenzten, sodass nur ein paar Markermoleküle in jedem Bild aufleuchteten, konnten wir den Mittelpunkt jedes Lichtflecks finden. Nach etwa 20000 Wiederholungen baute sich das superhochauflösende Bild auf. Anfang 2006 hatten wir Bilder von Aktinfilamenten, fokalen Adhäsionen, Mitochondrien und Lysosomen in 20 nm Auflösung. Wir reichten die Arbeit im März bei *Science* ein, und sie wurde im August publiziert, nach einem längeren Kampf mit einem Gutachter, der korrelative EM-Daten forderte und dann ablehnen wollte, als wir diese geliefert hatten.



Abbildung 28. La Jolla Labs. Das erste PALM-Mikroskop, gebaut in Haralds Wohnzimmer.

In der Zwischenzeit hatte Marty Gerry erzählt, dass ich an diesem „biologischen Bell Lab“ Interesse hatte, dem neuen Janelia Farm Research Campus des Howard Hughes Medical Institute. Der Campus war noch nicht gebaut, aber ich wurde im August zu einem Vorstellungsgespräch in einem kleinen Gebäude außerhalb eingeladen und stand im Oktober 2005 auf der Gehaltsliste.

2006 öffnete das Janelia seine Pforten. In den folgenden Jahren lebten mein Postdoc Hari Shroff und ich nur noch für die photoaktivierte Lokalisationsmikroskopie. Wir lebten und atmeten PALM. Es war eine sehr umkämpfte Zeit in der Superhochauflösung. Wir entwickelten Vielfarbenoptionen und demonstrierten PALM an lebenden Zellen. Zusammen mit Jennifer entwarfen wir eine Methode zur Untersuchung des zellulären Transports, indem wir die Diffusion von Untergruppen von Molekülen in Zellen beobachteten, und wir hatten ein paar andere Erfolge hier und da.

2008 ernannte *Nature Methods* die Superhochauflösung zur „Methode des Jahres“. Jedermann betrieb Superhochauflösung. Genau wie damals, als die Nahfeldtechnik auf ihrem Höhepunkt war, stellten die Leute allenthalben Behauptungen auf, von denen ich wusste, dass sie unmöglich waren. Obwohl wir die Mikroskopie lebender Zellen demonstriert hatten, ist PALM zu langsam und strahlt zu viel Licht auf die Probe, um eine praktische Lösung für das Problem zu sein. Das Gebiet wurde überrannt, und ich fand es jeher am produktivsten, dahin zu gehen, wo die Massen nicht sind. Es war Zeit, etwas Neues zu tun.

Viele meiner Kollegen aus den Neurowissenschaften in Janelia versuchten, in das Innere der Gehirne von Fliegen und Mäusen zu blicken, und ich wusste, dass die Bildgebung ziemlich bescheiden wird, wenn man versucht, tief unter die Oberfläche von Gewebe zu schauen. Wir benötigten adaptive Optiken, um Verzerrungen aufgrund der Gewebheterogenität zu korrigieren. Astronomen behandeln dieses Problem in Teleskopbildern, indem sie einen Laser hoch in die Atmosphäre in die Richtung des beobachteten Objekts schicken und dann mit einem speziellen Sensor messen, wie der Laserleitstern das Licht verzerrt, wenn es zur Erde zurückkehrt. Wir konnten nicht genau die gleiche Methode benutzen, weil Streuung im Gehirn den Leitstern überdeckt. Deshalb drehten meine Postdoktorandin Na Ji und ich 2010 das Sensorprinzip auf den Kopf und benutzten die Bildverschiebungen in der Probe selbst als Sensor. Na hat diese Idee in ihrem eigenen Labor seither stark verbessert und ist in der Lage, Neuronenaktivitäten tief im Kortex mit exzellenter Genauigkeit und Verlässlichkeit aufzuzeichnen.

In der Zwischenzeit war Ernst Stelzer 2008 an das Janelia gekommen und sprach davon, eine Lichtscheibe zu benutzen, um in einer Probe einzelne Ebenen nacheinander abzubilden, ohne die Regionen darüber und darunter zu bestrahlen. Für mich klang das nach einer eleganten Lösung für das Problem der Photoschädigung, und ich wollte etwas Neues dazu beitragen. Eine Lichtscheibe ist typischerweise zu dick, um Details in Zellen zu sehen. Deshalb verwendeten wir, zusammen mit meinen Postdocs Liang Gao und Thomas Planchon, einen so genannten Bessel-Strahl, den wir über die Probe fuhren, um eine sehr viel dünnere Lichtscheibe zu erzeugen. Nach etwa einem Jahr konnten wir Dynamiken im Inneren leben-

den Zellen mit guter Auflösung in allen drei Dimensionen abbilden.

Eines der Probleme war, dass der Bessel-Strahl Seitenlappen mit schwächerem Licht aufwies, die Anregungen außerhalb des Fokus erzeugten. Liang löste das Problem letztlich, indem er den Strahl schrittweise bewegte und Mikroskopie mit strukturierter Beleuchtung (SIM) verwendete. SIM war ursprünglich von einem Kollegen am Janelia, Mats Gustafsson, entwickelt worden und nutzt die resultierenden periodischen Anregungsmuster, um die Auflösung etwas über das Beugungslimit hinaus in zwei der drei Dimensionen zu erweitern.

Um durch die schrittweise Bewegung des Strahls keine Geschwindigkeitseinbußen zu haben, erzeugten wir sieben Bessel-Strahlen parallel. Zu unserer Überraschung führte die siebenfache Energieaufteilung zu einer signifikanten Verringerung der Photoschädigung. Was wir lernten war, dass die Gesamtdosis des in eine Zelle gestrahlten Lichts zwar wichtig ist, dass aber das weitaus Wichtigere die momentane auf eine Zelle einwirkende Leistung ist. Ich erkannte, dass dies im Einklang mit dem war, was Na und ich 2008 herausgefunden hatten, als wir die Photoschädigung durch Zweiphotonenmikroskopie reduzierten, indem wir ultraschnelle Lichtpulse in eine Serie von Unterpulsen von viel geringerer Spitzenleistung aufteilten.

Warum bei sieben aufhören? Ich simulierte die Wechselwirkungen zusätzlicher Strahlen und fand, dass man verrückte Resonanzen und Antiresonanzen erhielt, sobald die Strahlen dicht gedrängt wurden und die Seitenlappen anfangen zu interferieren. Ich fand aber auch magische Perioden, wo plötzlich die Seitenlappen destruktiv interferierten. Es ist ein dreifacher Gewinn: Man verteilt die Energie, man erhält eine sehr dünne Lichtscheibe, indem man das nervige Seitenlappenproblem eliminiert, und man erzeugt eine kontraststarke Lichtscheibe, die ideal ist für SIM.

Das brachte mich wieder zurück zur Theorie der optischen Gitter, über die ich 2005 publiziert hatte. Die Theorie konnte exakt vorhersagen, welche Lichtmuster diese magischen Perioden erzeugen würden. Mein Postdoc Kai Wang fand heraus, wie wir mithilfe eines räumlichen Lichtmodulators diese Muster erzeugen konnten, und zwei andere Postdocs, Bi-Chang Chen und Wesley Legant, konstruierten Gitterlichtscheibenmikroskope, um zu sehen, was wir mit dieser Technologie anfangen konnten.

Vieles, wie sich herausstellte. Die Lichtscheibe ist so dünn, dass nur die Moleküle im Fokus beleuchtet werden, was es zum perfekten Werkzeug macht, um die bis dahin geltende Beschränkung der Einzelmolekülmikroskopiemethoden, einschließlich PALM und SIM, auf dünne Proben zu überwinden. Im beugungsbegrenzten Modus können wir oft mehrere Bildvolumen pro Sekunde aufnehmen. Oder wir können bei langsameren Geschwindigkeiten eine Vielzahl hell markierter Proben zeitlich unbegrenzt aufnehmen. Wir haben mit über dreißig Forschungsgruppen zusammengearbeitet und so gut wie alles untersucht, von der Kinetik einzelner Transkriptionsfaktoren in Stammzellen bis hin zur Zellteilung, 3D-Zellmigration und embryonalen Entwicklung, bevor wir, kurz nach dem Nobelpreis, die Methode in *Science* veröffentlichten.

Ich glaube, das Gebiet der Superhochauflösung findet sich erst noch – ich habe aber den Verdacht, dass nicht PALM, sondern das Gitterlichtscheibenmikroskop der Höhepunkt meines Schaffens sein wird. Ich werde nie ein Biologe sein, aber ich habe große Freude an der Schönheit der Filme, den Verrücktheiten der Zelle und der Gelegenheit, von den besten Biologen in der Welt zu lernen. Jede Woche ist ein neues Abenteuer.

Mats starb 2011, aber wir fahren fort, die Grenzen der SIM-Technologie zu erweitern. Mein Postdoc Dong Li konnte in der Lebendzell-SIM mittlerweile 50 nm Auflösung und Subsekunden-Bildraten erreichen. Weil es so viel schneller ist und so viel weniger Energie einsetzt als PALM, STED oder RESOLFT, glaube ich, dass sehr wahrscheinlich SIM die Superhochauflösungsmethode mit dem größten Einfluss in der Bildgebung lebender Objekte sein wird.

Ich habe das Gefühl, dass ich unglaublich viel Glück hatte. Wo immer ich war, konnte ich mich zu 100% auf meine Arbeit fokussieren; ich habe nie in meinem Leben einen Antrag auf Forschungsmittel geschrieben. Ich bezweifle, dass ich auf einem traditionelleren akademischen Karriereweg Erfolg gehabt hätte. Meine Gruppe in Janelia war nie größer als fünf Postdocs, im Schnitt waren es drei. Die Zusammenarbeit mit ihnen macht ungeheuren Spaß, und es ist ein aufregendes Gefühl, einen echten intellektuellen Anteil an dem zu haben, was aus unserem Labor kommt. Ich bezweifle, dass ich mit einer größeren Gruppe die gleiche Begeisterung empfinden würde. Tatsächlich glaube ich, dass uns unser Forschungsmodell einen beinahe unfairen Vorteil gegenüber unseren Konkurrenten gibt.

Ich habe außerdem das Glück, dass ich eine zweite Chance bekommen habe, ein besserer Ehemann und Vater zu sein. Auch wenn ich ein enges Verhältnis zu Kriya und Ravi habe, bedaure ich, dass ich in ihrer Kindheit nicht mehr Zeit mit ihnen verbrachte. Na und ich haben zwei fröhliche und großartige Teufelsbraten, Max und Mia, mit denen ich nun mehr zusammen bin. Dennoch weiß ich nicht, ob ich es jemals herausbekomme, wie ich mein Forscher- und Familienleben in das richtige Gleichgewicht zu bringen habe.

Da ich im Grunde Pessimist bin, verfolgen mich noch immer zwei Ängste. Eine ist, dass der Nobelpreis unser Forschungsmodell durchkreuzt und unsere Produktivität behindern wird, so wie es bereits angefangen hat. Die zweite ist, dass ich das Gefühl habe, dass wir zu erfolgreich waren. Es gibt noch viel wichtige Arbeit zu tun, z. B. das Projekt meines Postdocs Tsung-Li Liu, der eine von Kai entwickelte Methode der adaptiven Optik für transparente Proben mit der von Bi-Chang und Wes entwickelten Gitterlichtscheibentechnologie kombiniert. Dies würde uns erlauben, Zellen vom Deckglas wegzunehmen und sie zurück in ihre multizelluläre Umgebung zu platzieren, in der sie sich entwickelt haben. Wahrscheinlich werden wir auch damit Erfolg haben. Ich glaube, es ist meine Schuldigkeit, in Anbetracht der Ressourcen in Janelia und mit dem Nobelpreis als Faustpfand, die Würfel aufs Neue zu werfen und verrückte, riskante Dinge zu tun. Harald und ich arbeiten mit unseren Gruppen in diese Richtung wieder zusammen. Die Zeit wird zeigen, ob irgendetwas dabei herauskommt, und das ist genau so, wie ich es mag.

Zitierweise: *Angew. Chem. Int. Ed.* **2015**, *54*, 8034–8053
Angew. Chem. **2015**, *127*, 8146–8166

- [1] A. Lewis, M. Isaacson, A. Harootunian, A. Muray, *Ultramicroscopy* **1984**, *13*, 227–232.
- [2] E. Betzig, A. Harootunian, A. Lewis, M. Isaacson, *Appl. Opt.* **1986**, *25*, 1890–1900.
- [3] E. Betzig, A. Lewis, A. Harootunian, M. Isaacson, E. Kratshmer, *Biophys. J.* **1986**, *49*, 269–279.
- [4] O. P. Hamill, A. Marty, E. Neher, B. Sackmann, F. J. Sigworth, *Pflügers Arch.* **1981**, *391*, 85–100.
- [5] E. A. Ash, G. Nicholls, *Nature* **1972**, *237*, 510–512.
- [6] E. H. Syngé, *Philos. Mag.* **1928**, *6*, 356–358.
- [7] W. Lukosz, *J. Opt. Soc. Am.* **1966**, *56*, 1463–1472.
- [8] W. Lukosz, *J. Opt. Soc. Am.* **1967**, *57*, 163–169.
- [9] Bildnachweis: Dr. Mehdi Vaez-Iravanian, Applied Materials, Inc.
- [10] E. Betzig, M. Isaacson, A. Lewis, *Appl. Phys. Lett.* **1987**, *51*, 2088–2090.
- [11] E. Betzig, „Non-destructive optical imaging of surfaces with 500 Å resolution,“ Ph.D. Thesis, Cornell University, **1988**.
- [12] E. Betzig, J. K. Trautman, T. D. Harris, J. S. Weiner, R. L. Kostelak, *Science* **1991**, *251*, 1468–1470.
- [13] E. Betzig, P. L. Finn, J. S. Weiner, *Appl. Phys. Lett.* **1992**, *60*, 2484–2486.
- [14] E. Betzig, J. K. Trautman, *Science* **1992**, *257*, 189–195.
- [15] E. Betzig, J. K. Trautman, R. Wolfe, E. M. Gyorgy, P. L. Finn, M. H. Kryder, C. H. Chang, *Appl. Phys. Lett.* **1992**, *61*, 142–144.
- [16] J. K. Trautman, J. J. Macklin, L. E. Brus, E. Betzig, *Nature* **1994**, *369*, 40–42.
- [17] J. Hwang, L. K. Tamm, C. Böhm, T. S. Ramalingham, E. Betzig, M. Edinin, *Science* **1995**, *270*, 610–614.
- [18] E. Betzig, R. J. Chichester, F. Lanni, D. L. Taylor, *Bioimaging* **1993**, *1*, 129–135.
- [19] W. E. Moerner, L. Kador, *Phys. Rev. Lett.* **1989**, *62*, 2535–2538.
- [20] M. Orrit, J. Bernard, *Phys. Rev. Lett.* **1990**, *65*, 2716–2719.
- [21] E. B. Shera, N. K. Seitzinger, L. M. Davis, R. A. Keller, S. A. Soper, *Chem. Phys. Lett.* **1990**, *174*, 553–557.
- [22] R. Rigler, J. Widengren, *BioScience* **1990**, *3*, 180–183.
- [23] E. Betzig, R. J. Chichester, *Science* **1993**, *262*, 1422–1425.
- [24] H. A. Bethe, *Phys. Rev.* **1944**, *66*, 163–166.
- [25] H. F. Hess, E. Betzig, T. D. Harris, L. N. Pfeiffer, K. W. West, *Science* **1994**, *264*, 1740–1745.
- [26] E. Betzig, *Opt. Lett.* **1995**, *20*, 237–239.
- [27] A. M. van Oijen, J. Köhler, J. Schmidt, M. Müller, G. J. Brakenhoff, *J. Opt. Soc. Am. A* **1999**, *16*, 909–915.
- [28] X. Qu, D. Wu, L. Mets, N. F. Scherer, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2004**, *101*, 11298–11303.
- [29] M. P. Gordon, T. Ha, P. R. Selvin, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2004**, *101*, 6462–6465.
- [30] M. Heilemann, D. P. Herten, R. Heintzmann, C. Cramer, C. Müller, P. Tinnefeld, K. D. Weston, J. Wolfrum, M. Sauer, *Anal. Chem.* **2002**, *74*, 3511–3517.
- [31] K. Lidke, B. Rieger, T. Jovin, R. Heintzmann, *Opt. Express* **2005**, *13*, 7052–7062.
- [32] M. Chalfie, Y. Tu, G. Euskirchen, W. W. Ward, D. C. Prasher, *Science* **1994**, *263*, 802–805.
- [33] M. Chatteraj, B. A. King, G. U. Bublitz, S. G. Boxer, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1996**, *93*, 8362–8367.
- [34] H. Yokoe, T. Meyer, *Nat. Biotechnol.* **1996**, *14*, 1252–1256.
- [35] R. M. Dickson, A. B. Cubitt, R. Y. Tsien, W. E. Moerner, *Nature* **1997**, *388*, 355–358.
- [36] G. H. Patterson, J. Lippincott-Schwartz, *Science* **2002**, *297*, 1873–1877.
- [37] E. Betzig, *Phys. Rev. A* **2005**, *71*, 063406.
- [38] E. Betzig, *Opt. Express* **2005**, *13*, 3021–3036.
- [39] 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.
- [40] H. Shroff, H. White, E. Betzig, *Curr. Protocols in Cell Biol.* **2008**, *4.21.1–4.21.27*.
- [41] D. Greenfield, A. L. McEvoy, H. Shroff, G. E. Crooks, N. S. Wingreen, E. Betzig, J. Liphardt, *PLoS Biol.* **2009**, *7*, e1000137.
- [42] 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.
- [43] J. Yao, R. D. Fetter, P. Hu, E. Betzig, R. Tjian, *Genes Dev.* **2011**, *25*, 569–580.
- [44] S. Manley, J. M. Gillette, G. H. Patterson, H. Shroff, H. F. Hess, E. Betzig, J. Lippincott-Schwartz, *Nat. Methods* **2008**, *5*, 155–157.
- [45] N. A. Frost, H. Shroff, H. Kong, E. Betzig, T. A. Blanpied, *Neuron* **2010**, *67*, 86–99.
- [46] G. Shtengel, J. A. Galbraith, C. G. Galbraith, J. Lippincott-Schwartz, J. M. Gillette, S. Manley, R. Sougrat, C. M. Waterman, P. Kanchanawong, M. W. Davidson, R. D. Fetter, H. F. Hess, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2009**, *106*, 3125–3130.
- [47] P. Kanchanawong, G. Shtengel, A. M. Pasapera, E. B. Ramko, M. W. Davidson, H. F. Hess, C. M. Waterman, *Nature* **2010**, *468*, 580–584.
- [48] S. B. Van Engelenburg, G. Shtengel, P. Sengupta, K. Waki, M. Jamik, S. D. Ablan, E. O. Freed, H. F. Hess, J. Lippincott-Schwartz, *Science* **2014**, *343*, 653–656.
- [49] B. G. Kopek, G. Shtengel, C. S. Xu, D. A. Clayton, H. F. Hess, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2012**, *109*, 6136–6141.
- [50] K. A. Sochacki, G. Shtengel, S. B. van Engelenburg, H. F. Hess, J. W. Taraska, *Nat. Methods* **2014**, *11*, 305–308.
- [51] H. Shroff, C. G. Galbraith, J. A. Galbraith, E. Betzig, *Nat. Methods* **2008**, *5*, 417–423.
- [52] A. Szymborska, A. de Marco, N. Daigle, V. C. Cordes, J. A. Briggs, J. Ellenberg, *Science* **2013**, *341*, 655–658.
- [53] L. Schermelleh, R. Heintzmann, H. Leonhardt, *J. Cell Biol.* **2010**, *190*, 165–175.
- [54] M. G. Gustafsson, *J. Microsc.* **2000**, *198*, 82–87.
- [55] L. Shao, P. Kner, E. H. Rego, M. G. L. Gustafsson, *Nat. Methods* **2011**, *8*, 1044–1046.
- [56] Bildnachweis: Dr. Dong Li, Janelia Research Campus, HHMI.
- [57] E. H. Rego, L. Shao, J. J. Macklin, L. Winoto, G. A. Johansson, N. Kamps-Hughes, M. W. Davidson, M. G. L. Gustafsson, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2012**, *109*, E135–E143.
- [58] J. Huisken, J. Swoger, F. Del Bebe, J. Wittbrodt, E. H. Stelzer, *Science* **2004**, *305*, 1007–1009.
- [59] B.-C. Chen, W. R. Legant, K. Wang, L. Shao, D. E. Milkie, M. W. Davidson, C. Janetopoulos, X. S. Wu, J. A. Hammer, Z. Liu, B. P. English, Y. Mimori-Kiyosue, D. P. Romero, A. T. Ritter, J. Lippincott-Schwartz, L. Fritz-Laylin, R. D. Mullins, D. M. Mitchell, J. N. Bembenek, A.-C. Reymann, R. Böhme, S. W. Grill, J. T. Wang, G. Seydoux, U. S. Tulu, D. P. Kiehart, *Science* **2014**, *346*, 1257998.
- [60] A. Sharonov, R. M. Hochstrasser, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2006**, *103*, 18911–18916.
- [61] K. Wang, D. E. Milkie, A. Saxena, P. Engerer, T. Misgeld, M. E. Bronner, J. Mumm, E. Betzig, *Nat. Methods* **2014**, *11*, 625–628.
- [62] N. Ji, D. E. Milkie, E. Betzig, *Nat. Methods* **2010**, *7*, 141–147.
- [63] N. Ji, T. R. Sato, E. Betzig, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2012**, *109*, 22–27.
- [64] C. Wang, R. Liu, D. E. Milkie, W. Sun, Z. Tan, A. Kerlin, T.-W. Chen, D. S. Kim, N. Ji, *Nat. Methods* **2014**, *11*, 1037–1040.

Eingegangen am 2. Februar 2015

Online veröffentlicht am 18. Juni 2015

Übersetzt von Dr. Hanna Engelke, München