

Nanoskopie mit fokussiertem Licht (Nobel-Aufsatz)**

Stefan W. Hell*

Beugungsgrenze · Mikroskopie · Nanoskopie ·
STED-Mikroskopie · Superhochauflösung

Wir alle kennen das Sprichwort „Ein Bild sagt mehr als tausend Worte“ und wissen, wie wichtig es ist, sich „ein Bild zu machen“. Dies gilt sicherlich nicht nur für das tägliche Leben, sondern auch für die Naturwissenschaften. Es ist daher vielleicht auch kein Zufall, dass der Beginn der modernen Naturwissenschaften historisch erkennbar mit der Erfindung des Lichtmikroskops zusammenfällt. Denn mit dem Lichtmikroskop wurden die Bakterien entdeckt, und die Menschheit erkannte zum ersten Mal, dass jedes Lebewesen aus Zellen besteht, als fundamentale Bausteine des Lebens.

Dennoch haben wir alle in der Schule gelernt, dass die räumliche Auflösung eines Lichtmikroskops auf ungefähr die halbe Wellenlänge des Lichts begrenzt ist,^[1–4] was typischerweise ungefähr 200–350 Nanometer beträgt (Abbildung 1).

Wenn wir Details von kleineren Dingen sehen wollen, wie z. B. von Viren, so müssen wir Elektronenmikroskope einsetzen.

Es stimmt einfach: Die Elektronenmikroskopie hat viel höhere räumliche Auflösungen erreicht – zehnfach, hundertfach, manchmal tausendfach höher –, tatsächlich hinunter bis zur Größe eines einzelnen Moleküls. Es stellt sich daher die Frage: Warum ist uns das Lichtmikroskop noch immer so wichtig? Warum interessiert uns noch seine Auflösung, wo wir doch die des Elektronenmikroskops haben?

Die Antwort auf diese Frage ist inhärent in Abbildung 2 gegeben, wo ich ein kleines „Experiment“ durchgeführt habe. Ich zählte die Anzahl von Veröffentlichungen in der abgebildeten Ausgabe von *Nature Medicine*, für die ein Lichtmikroskop verwendet worden war, und diejenigen, in denen ein Elektronenmikroskop eingesetzt wurde. Der klare Gewinner war die Lichtmikroskopie. Fakt ist, sie ist weiterhin die am meisten eingesetzte Mikroskopiemethode in den Lebenswissenschaften. Und das aus zwei guten Gründen.

Der erste Grund ist, dass die Lichtmikroskopie die einzige Technik ist, mit der wir in das Innere einer lebenden Zelle

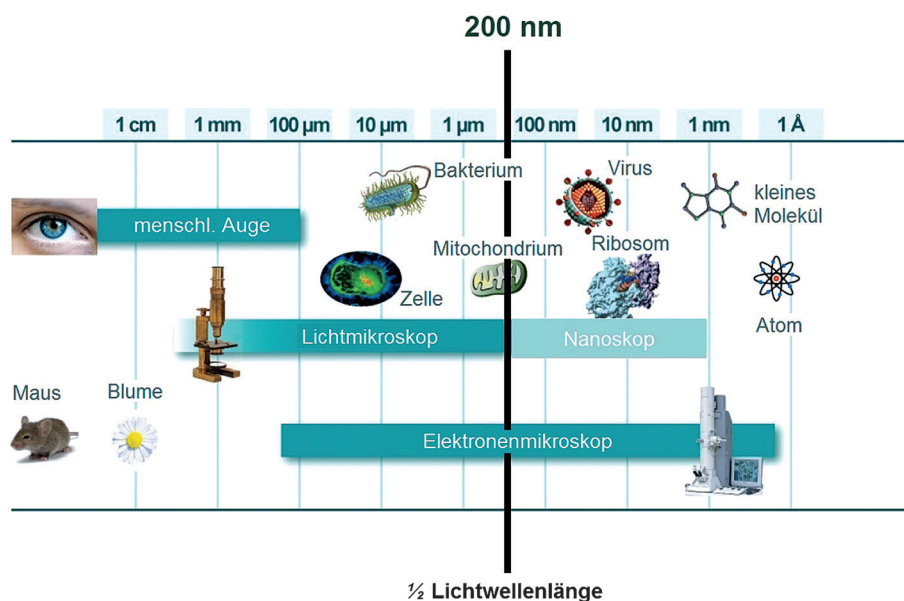


Abbildung 1. Längenskalen und Grenzen des räumlichen Auflösungsvermögens für das menschliche Auge, die (optische) Lichtmikroskopie und die Elektronenmikroskopie. Die fernfeldoptische Nanoskopie erweitert die Auflösungsfähigkeiten weit über die Abbe'sche Beugungsgrenze (ungefähr die halbe Lichtwellenlänge, ca. 200 Nanometer) hinaus.

oder in das Innere von Gewebe blicken können, und zwar in 3D. Die Lichtmikroskopie ist minimal-invasiv. Es gibt jedoch noch einen Grund. Wenn wir in eine Zelle schauen, interessieren wir uns normalerweise für eine bestimmte Spezies von Proteinen oder anderen Biomolekülen, und wir müssen diese Spezies unterscheidbar machen von all den anderen Molekülen in der Zelle – wir müssen dieses Protein „hervorhe-

[*] Prof. Dr. S. W. Hell

Max-Planck-Institut für Biophysikalische Chemie
Abteilung NanoBiophotonik
Am Fassberg 11, 37077 Göttingen (Deutschland)
und

Deutsches Krebsforschungszentrum (DKFZ)
Abteilung Optische Nanoskopie
Im Neuenheimer Feld 280, 69120 Heidelberg (Deutschland)
E-Mail: shell@gwdg.de

[**] Copyright© Nobelstiftung 2014. Wir danken der Nobelstiftung, Stockholm, für die Genehmigung zum Abdruck einer deutschen Fassung dieses Vortrages. Nobel-Vorlesung, 8. Dezember 2014 (Universität Stockholm) mit Ergänzungen vom 13. Dezember 2014 (Universität Uppsala).

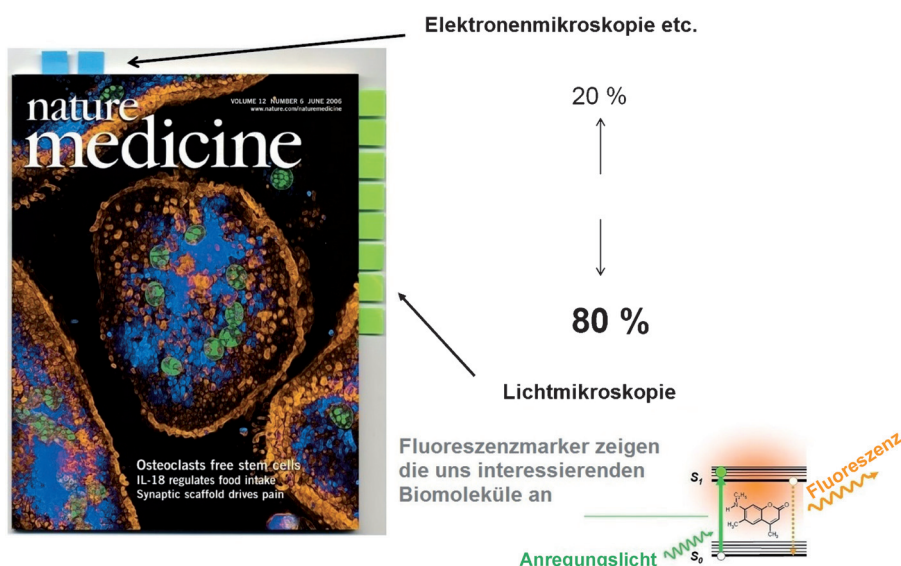


Abbildung 2. Die Lichtmikroskopie bleibt die am meisten eingesetzte Mikroskopiemethode in den Lebenswissenschaften aufgrund mehrerer klarer Vorteile, darunter die Fähigkeit zur Lebendzellabbildung und die hohe Spezifität bei der Visualisierung der zu erfassenden Biomoleküle. Letztere wird ermöglicht durch Markierung der Biomoleküle mit fluoreszenten Markermolekülen, sodass sie aufgrund ihrer Fluoreszenz im Mikroskop gezielt hervorgehoben und detektiert werden können.

ben“.^[5] Denn für Licht, wie auch für Elektronen, sehen alle Proteine einfach gleich aus.

In der Lichtmikroskopie ist diese „Hervorhebung“ einfach zu bewerkstelligen, indem ein fluoreszentes Molekül an das uns interessierende Biomolekül angehängt wird.^[6] Ein fluoreszentes Molekül (Abbildung 2)^[7] hat zwei fundamentale Zustände: einen Grundzustand und einen angeregten fluoreszenten Zustand höherer Energie. Wenn wir das Molekül mit Licht von geeigneter Wellenlänge, z.B. mit grünem Licht, beleuchten, so kann es ein (grünes) Photon absorbieren, sodass das Molekül von seinem Grundzustand zum angeregten Zustand befördert („angeregt“) wird. Direkt hierauf zittern die Atome des Moleküls ein bisschen – daher besitzen die Moleküle weitere Zwischenzustände gemäß ihres Schwingungsverhaltens –, doch innerhalb von ein paar Nanosekunden kehrt das Molekül von seinem untersten Schwingungszustand in den Grundzustand zurück, indem es ein Fluoreszenzphoton emittiert.

Da ein Teil der Energie des absorbierten (grünen) Photons im Zittern der Atome verlorengelht, ist das Fluoreszenzphoton von rotverschobener Wellenlänge – in Abbildung 2 orange dargestellt. Diese Tatsache ist sehr nützlich, denn wir können das Fluoreszenzlicht vom Anregungslicht, dem Licht, mit dem die Zelle beleuchtet wird, leicht trennen. Diese Verschiebung der Wellenlänge macht die Fluoreszenzmikroskopie extrem sensitiv. So sensitiv, dass sogar ein einzelnes Molekül in einem komplexen Hintergrund detektiert werden kann, wie in den Arbeiten von meinem Kollegen W. E. Moerner,^[8] von Michel Orrit^[9] und ihren Mitstreitern sukzessive gezeigt wurde.

Wenn jedoch ein zweites Molekül oder ein drittes Molekül, ein viertes Molekül, ein fünftes Molekül und so weiter, näher beieinander sind als ungefähr 200–350 Nanometer, so

können wir sie nicht auseinanderhalten, da sie im Mikroskop als ein einziger verwaschener Fleck erscheinen. Es ist daher wichtig festzuhalten, dass es bei der Auflösung darum geht, Dinge/Objekte zu trennen. Es geht darum, sie im Bild zu unterscheiden. Das Auflösungsvermögen darf nicht verwechselt werden mit der Detektionsempfindlichkeit oder ähnlichem, denn es geht darum, verschiedene Objekte (Moleküle) als separate Einheiten zu erfassen.

Es ist also einfach zu erkennen, weshalb viel Information verlorengeht, wenn wir mit einem Fluoreszenzmikroskop in eine Zelle schauen: Alle Details unterhalb einer Längenskala von etwa 200 Nanometern sind verwaschen und verschwinden. Wenn man daher ein fokussierendes (Fernfeld-) Fluoreszenzmikroskop erfinden könnte, das eine viel höhere Auflösung besitzt, so hätte dies eine große Bedeutung für

die Lebenswissenschaften und darüber hinaus.

Zunächst müssen wir uns darüber klar werden, weshalb die Auflösung eines herkömmlichen Mikroskops, das Licht fokussiert, begrenzt ist. In einfachen Worten kann dies folgendermaßen erklärt werden. Das wichtigste Element eines Lichtmikroskops ist die Objektivlinse, auch einfach Objektiv genannt (Abbildung 3). Die Aufgabe dieser Objektivlinse ist es, Licht so scharf wie möglich – also auf einen Punkt – zu fokussieren. Weil sich Licht aber als Welle ausbreitet, ist es nicht möglich, das Licht auf einen Punkt zu bringen. Stattdessen wird das Licht gebeugt und im Fokusbereich „ausgeschmiert“; es bildet sich ein Lichtfleck aus, der mindestens 200 Nanometer breit und 500 Nanometer entlang der optischen Achse ist.^[10]

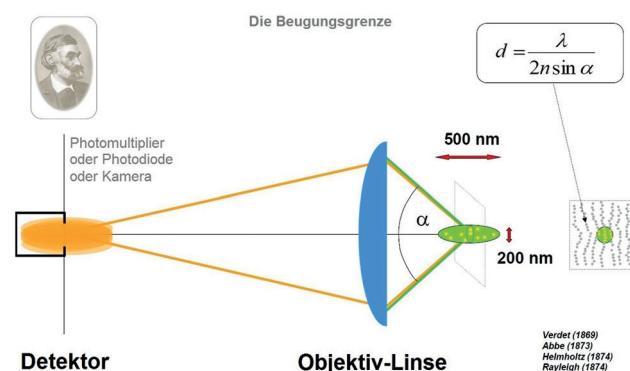


Abbildung 3. Die Fokussierung des Lichts im Mikroskop (insbesondere auch durch die Objektivlinse) kann nicht schärfer erfolgen als die Abbe'sche Auflösungsgrenze. In der Folge werden alle Moleküle innerhalb eines jeweils beugungsbegrenzten Bereichs gleichzeitig beleuchtet. Daher fluoreszieren sie auch praktisch gleichzeitig und können nicht unterschieden/getrennt werden.

Die Konsequenz daraus ist: Wenn nun mehrere Objekte/Moleküle in diesen Bereich fallen, so werden sie alle zur selben Zeit mit dem Licht geflutet und erzeugen somit Fluoreszenzlicht auf einmal. Im Falle der Fluoreszenzmikroskopie ist dies das Anregungslicht, das alle Moleküle gleichzeitig flutet. Da wir das Fluoreszenzlicht mit einer Linse, also dem Objektiv, einfangen und auf einen Detektor schicken, wird das Licht der Moleküle innerhalb dieses Flecks von ≥ 200 Nanometern miteinander unentwirrbar vermischt. Dies liegt daran, dass jedes Molekül am Detektor wiederum zu einem Fleck von fokussiertem (Fluoreszenz-)Licht führt und die Flecken von diesen gleichzeitig beleuchteten Molekülen überlappen (Abbildung 3). Kein Detektor kann die Signale von diesen Molekülen wieder trennen, egal ob Auge, ein Photovervielfacher oder gar eine pixelbasierte Kamera.

Ernst Abbe erkannte im späten 19. Jahrhundert das volle Ausmaß des Problems, das die Beugung für die Auflösung darstellt, und formulierte diese „Beugungsgrenze“ (Abbildung 4) in einer Formel, die auch heute noch nach ihm be-



Abbildung 4. Die Beugungsgrenze für das mikroskopische Auflösungsvermögen – in Stein gemeißelt (oben: Denkmal zu Ehren von Ernst Abbe in Jena). Abbildung des Zytoskeletts einer Säugerzelle im direkten Vergleich: STED-Nanoskopie (Mitte) und Konfokalmikroskopie (unten).

nannt ist.^[1] Sie besagt: Um voneinander im Bild getrennt werden zu können, müssen zwei gleichartige Objekte oder Strukturen weiter voneinander entfernt sein als die Wellenlänge geteilt durch zweimal die numerische Apertur der Objektivlinse. Man kann diese Gleichung in den meisten Lehrbüchern der Physik finden. Aufgrund der enormen Bedeutung der optischen Mikroskopie für diese Gebiete findet man sie auch in Büchern der Biochemie und Molekularbiologie. Abbes Formel ist auch auf einem Denkmal in Jena, wo Ernst Abbe lebte und arbeitete, zu finden, und dort ist sie tatsächlich in Stein gemeißelt. Diese Formel drückt aus, was Wissenschaftler während des gesamten 20. Jahrhunderts über die Auflösung im Lichtmikroskop glaubten.

Es war aber nicht nur Glaube, sondern Fakt, also eine experimentelle Tatsache. Wenn man im 20. Jahrhundert z. B. die Struktur des Zytoskeletts abbilden wollte,^[5] so war die Auflösung im besten Fall so, wie in Abbildung 4 (unten, „konfokal“) gezeigt. Heute jedoch erreichen wir Auflösungen wie in Abbildung 4 Mitte („STED“), und diese Auflösung ist mittlerweile Routine. Ich werde nun beschreiben, wie man die Beugungsgrenze doch so radikal überwinden konnte.

Das Ganze begann in den späten 1980er Jahren. Ich war zu dieser Zeit Physikdotorand an der Universität Heidelberg und arbeitete an einem Thema in der Lichtmikroskopie, kannte also die Abbe'sche Formel. Ich begann mich zu fragen: Diese Formel wurde 1873 gefunden, und jetzt schreiben wir fast schon 1990. Im 20. Jahrhundert wurde doch so viel neue Physik entdeckt, so viele neue physikalische Effekte und Phänomene – schließlich hatte ich ja eine ganze Menge für meine Prüfungen lernen müssen. Es müsste doch ein Phänomen geben – mindestens eines – das sich dafür eignen sollte, die Beugungsgrenze im Lichtmikroskop zu knacken, und zwar in einem Lichtmikroskop, das mit sich ausbreitendem Licht und herkömmlichen Optiken arbeitet.

Mir war klar, dass es nicht funktionieren würde, einfach die Art und Weise wie sich Licht ausbreitet zu ändern, also die Art und Weise wie Licht fokussiert wird. [Tatsächlich hatte ich dieses Thema genau untersucht. Es führte mich zur Erfindung des 4Pi-Mikroskops,^[11,12] das die axiale Auflösung verbesserte, aber die Abbe'sche Grenze nicht aufhob.] Ich war überzeugt, dass eine potenzielle Lösung etwas mit den wichtigen Entdeckungen des 20. Jahrhunderts zu tun haben müsse, also mit Quantenmechanik, Molekülen, Molekülzuständen und so weiter.

Also fing ich an, meine Bücher durchzukämmen, um einen physikalischen Effekt zu finden, der einem dazu verhelfen könnte, die Beugungsgrenze im fokussierenden Mikroskop auszuhebeln.

Eines Tages legte ich, wie in Abbildung 5 gezeigt, meinen Denkanatz zur Lösung des Problems in einer Veröffentlichung nieder. Im Grunde genommen war es die Idee, die spektroskopischen Eigenschaften von Fluorophoren genau anzusehen, ihre Zustandsübergänge und so weiter nicht nur für die Generierung von Fluoreszenzsignalen oder für die Messung von pH-Werten und anderen chemischen Parametern zu verwenden, sondern speziell für die Auflösung. Vielleicht gab es ja eine Fluorophor-Eigenschaft, die eingesetzt werden könnte, um die Abbe'sche Grenze zu überwinden. Vielleicht gab es ja einen quantenoptischen Effekt, dessen Potenzial nicht erkannt worden war – ganz einfach deshalb, weil niemand an die Beugungsgrenze gedacht hat.^[13]

Mit diesen Ideen in meinem Kopf blätterte ich eines Samstagmorgens nicht weit von hier [Anm.: Stockholm], am anderen Ufer des Bottnischen Meerbusens, in Åbo/Turku, ein Lehrbuch zur Quantenoptik durch.^[14] Dabei stieß ich auf eine Seite (Abbildung 5), in der die stimulierte Emission behandelt wurde. Als mein Blick auf „stimulierte Emission“ viel, war ich wie elektrisiert. Warum?

Wie bereits erklärt, ist das Kernproblem, dass die Objektivlinse das Licht nicht besser als bis auf einen Fleck von 200 Nanometern fokussiert. Damit werden also alle Moleküle, die sich innerhalb dieses 200-Nanometer-Bereichs be-

Wovon ich 1990 überzeugt war:

“... the resolution limiting effect of diffraction can be overcome (...) by fully exploiting the properties of the fluorophores. Combined with modern quantum optical techniques the scanning (confocal) microscope has the potential of dramatically improving the resolution in far-field light microscopy.”

SWH, Opt. Commun. 106 (1994)
accepted November 1993

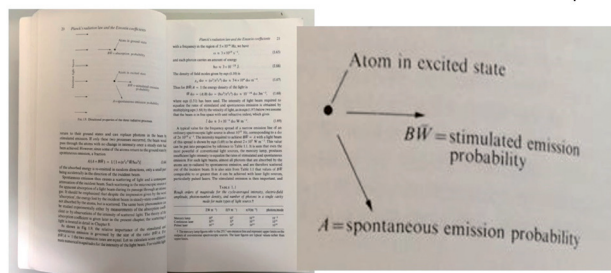


Abbildung 5. Die Einsicht, in den frühen 1990er Jahren, dass der Schlüssel zur Überwindung der Beugungsgrenze in den spektralen molekularen Eigenschaften des Fluorophors selbst liegt (Zitat aus einem 1993 eingereichten Manuskript, oben). Der Text der Manuskript-Passage lautet: „... die auflösungsbegrenzende Wirkung der Beugung kann ausgehebelt werden (...), indem die Eigenschaften der Fluorophore voll ausgeschöpft werden. Zusammen mit modernen quantenoptischen Techniken hat das Scanning-(Konfokal-) Mikroskop das Potenzial, die räumliche Auflösung in der fernfeldoptischen Mikroskopie dramatisch zu verbessern.“ Das Bild (unten) zeigt die Seite 20 aus dem Buch *The Quantum Theory of Light* von Roudney Loudon (verlegt von Oxford Science Publications), wo ich, nach einem physikalischen Effekt zur Überwindung der Beugungsgrenze stöbernd, am Samstagmorgen, dem 6. November 1993 an das Phänomen der stimulierten Emission erinnert wurde, das mir natürlich aus dem Physikstudium bekannt war. Mein Exemplar des Buchs wird nun im Nobel-Museum in Stockholm aufbewahrt und ausgestellt.

finden, gleichzeitig mit Anregungslicht geflutet. Dies kann man nicht ändern, jedenfalls nicht mit herkömmlichen Optiken und Objektiven. Aber vielleicht kann man ja die Tatsache ändern, dass alle Moleküle, die gleichzeitig mit (Anregungs-)Licht geflutet werden, am Ende in der Lage sind, auch Licht (zurück) zum Detektor zu schicken, also detektierbares Licht zu produzieren. Wenn es ginge, einige der Moleküle dunkel zu halten – präziser, in einem Zustand, in dem sie nicht in der Lage sind, Licht zum Detektor zu schicken – so werden wir nur die Moleküle sehen, die dies können. Anders formuliert, man wird nur solche beleuchteten Moleküle detektieren, die sich in einem hellen, d. h. signalgebenden Zustand befinden. So können wir Moleküle, die sich in einem hellen Zustand befinden von beleuchteten Molekülen, die sich in einem dunklen Zustand befinden, unterscheiden. Die Unterscheidbarkeit der Moleküle kommt also dadurch zustande, dass wir für den Zeitpunkt der Messung zwei Klassen von Molekülen kreieren, die wir problemlos voneinander unterscheiden können: helle und dunkle.

Die Idee war also, einen Teil der Moleküle, die sich im selben beugungsbegrenzten Bereich befinden, transient in einen Dunkelzustand zu überführen. Transient bedeutet hier für die Dauer, in der dieser Bereich vom Detektor erfasst wird. Der Zustand (bzw. Zustandsübergang) ist also der Schlüssel, um Moleküle unterscheidbar zu machen. Und bei der Auflösung geht es ja darum, Moleküle (welche die Strukturen repräsentieren) unterscheiden zu können.

Daher ergab sich die Frage: Gibt es dunkle Zustände in einem fluoreszenten Molekül? Die Antwort war eigentlich

schon in Abbildung 2 und Abbildung 6b gegeben. Der Grundzustand des Fluorophors ist natürlich ein Dunkelzustand! Denn es ist klar: Damit ein Molekül Fluoreszenz emittieren kann, muss es sich in seinem angeregten Fluoreszenz-Zustand befinden. Der angeregte Zustand ist also der helle Zustand, der Grundzustand ist der dunkle. Damit haben wir ein Zustandspaar, mit welchem wir die Trennung durchführen können.

Was ist nun die Rolle der stimulierten Emission? Die Antwort klingt einfach, hat es aber wirklich in sich: Sie erzeugt dunkle Moleküle, d. h. Moleküle, die nicht vom Detektor gesehen werden! Das war der Grund, weshalb ich so elektrisiert war. Ich hatte einen Weg gefunden, wie Fluorophore *nicht*-fluoreszent ge-

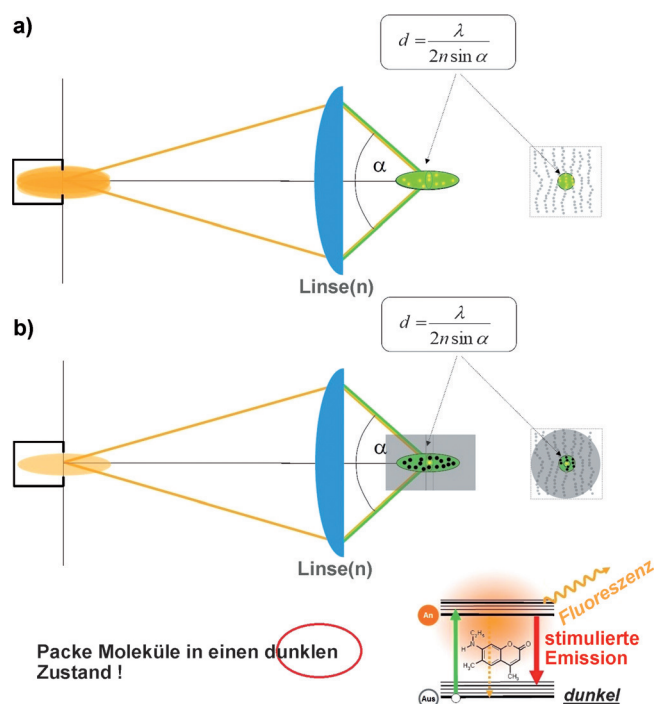


Abbildung 6. Das temporäre „Aus“-Schalten der Signalfähigkeit von Molekülen innerhalb des beugungsbegrenzten Bereichs ermöglicht die getrennte Detektion von benachbarten Molekülen, die sich innerhalb desselben Beugungsbereichs befinden. a) In der Fluoreszenzmikroskopie mit herkömmlichen Linsen (z. B. Konfokalmikroskopie) werden alle Moleküle innerhalb des vom Hauptbeugungsmaximum erfassten Bereichs gleichzeitig mit Anregungslicht beleuchtet und emittieren gleichzeitig Fluoreszenzlicht. Der Grund dafür ist, dass ihnen allen gleichzeitig erlaubt ist, den fluoreszierenden (d. h. signalgebenden) Zustand einzunehmen. b) Das Problem kann gelöst werden, indem die allermeisten Moleküle – bis auf dasjenige oder diejenigen, das/die registriert werden soll/en – in einem dunklen (nicht signalgebenden) Zustand gehalten werden. Der Dunkelzustand ist ein Zustand, von dem, wenn sich das Molekül in ihm befindet, kein Signal zum Detektor gelangt. Ein solcher Übergang zum dunklen „Aus“-Zustand wird am fundamentalsten durch stimulierte Emission realisiert, da bei diesem Übergang die Moleküle sofort in ihren Grundzustand überführt werden, der ja der fundamentalste dunkle („Aus“-) Zustand ist. Damit werden die beiden fundamentalsten Zustände eines Fluorophors zur Detailtrennung herangezogen: der erste elektronisch angeregte (Fluoreszenz-) Zustand als der signalgebende „An“-Zustand und der Grundzustand als der „Aus“-Zustand.

macht werden können, ganz normale Fluorophore, wie sie routinemäßig in der Mikroskopie Verwendung finden. Jetzt kann man sich leicht ausmalen, wie das Mikroskop, das ich im Kopf hatte, funktioniert: durch „stimulated emission depletion“, also „Leerräumen (des angeregten Zustands) durch stimulierte Emission“ oder: STED-Mikroskopie.^[15–23]

Abbildung 7a zeigt die Objektivlinse, sowie Probe und Detektor. Wir verwenden einen Lichtstrahl, der Moleküle vom Grundzustand zum angeregten Zustand anregen, also hell („an“) machen kann. Das Anregungslicht wird gebeugt – was ja unausweichlich ist –, und man erhält den üblichen Lichtfleck von mindestens 200 Nanometern. Ein Fluoreszenzsignal, das innerhalb dieses Flecks erzeugt wird, gelangt zum Detektor. Jetzt verwenden wir jedoch einen zweiten Lichtstrahl, der stimulierte Emission durchführt und somit Moleküle, die vielleicht vom Anregungsstrahl „angeschaltet“ wurden, sofort wieder in den Dunkenzustand überführt, also diese Moleküle „ausschaltet“. Moleküle, die angeregt wurden, werden also sofort wieder in den Grundzustand hinunter geschickt, sodass das Molekül kein Licht emittieren kann, da es den dunklen Grundzustand („aus“) eingenommen hat.

Um dies zu erreichen, muss die Wellenlänge des stimulierenden Lichtstrahls weiter im Roten liegen (Abbildung 7c). Die Photonen dieses stimulierenden Lichtstrahls haben also eine niedrigere Energie, was auch dazu führt, dass die Moleküle durch dieses Licht nicht angeregt werden können, sondern nur herunter-stimuliert, vom angeregten

Zustand zurück in den Grundzustand. Es gibt jedoch noch eine weitere Bedingung. Um sicher zu sein, dass das Molekül auch nie im „An“-Zustand verweilen kann, müssen wir sicherstellen, dass immer ein herunter-stimulierendes Photon an das Molekül heranfliegt, welches das Molekül auch tatsächlich herunterschickt. Ich erwähne dies, weil die meisten Photonen die Moleküle nur passieren; die Wahrscheinlichkeit der Wechselwirkung des Photons mit dem Molekül ist ja endlich, d.h. man hat einen endlich großen Wirkungsquerschnitt. Wenn jedoch die Intensität des stimulierenden Lichts über einem bestimmten Schwellwert ist, so kann man sicher sein, dass mindestens ein Photon zur Verfügung steht, welches das Molekül sofort in den Grundzustand zurückschickt, sodass es quasi nie den fluoreszenten Zustand, sondern immer nur den Dunkenzustand einnimmt. Das Vorhandensein einer gewissen Lichtintensität I_s „schaltet das Fluoreszenzmolekül effektiv aus“.

Abbildung 7d zeigt die Wahrscheinlichkeit, dass das Molekül den hellen Zustand einnimmt, den Zustand S_1 , in Gegenwart des roten Lichtstrahls, der das Molekül in den dunklen Grundzustand überführt. Bei Intensitäten über einem bestimmten Wert I_s ist das Molekül sicher ausgeschaltet. Man kann dann praktisch beliebige Intensitäten von (grünem) Anregungslicht verwenden. Das Molekül wird den hellen Zustand dennoch nicht besetzen und daher kein Signal abgeben können.

Damit das Ausschalten der Moleküle sinnvoll zur Trennung von Molekülen eingesetzt werden kann, verändern wir den roten Strahl, sodass er in der Fokalebene die Form eines Ringes hat,^[19,24] und zwar so, dass er in der Mitte eine Intensitätsnullstelle hat. Somit können wir die Fähigkeit zur Fluoreszenz überall ausschalten – bis auf die Mitte selbst. Die Intensität des Rings oder „Doughnuts“ wird zur Mitte hin – prozentual zu seinem „Kamm“ – schwächer und schwächer, aber um Moleküle auszuschalten, können wir den Ring immer intensiver machen. In der Mitte geht das nicht, denn dort ist seine Intensität idealerweise null. Dort, in der Mitte, können wir die Moleküle nicht ausschalten, da dort idealerweise kein STED-Licht ist, oder es einfach viel zu schwach ist.

Betrachten wir die Probenstruktur (Abbildung 7b) und nehmen wir an, wir wollten die Fasern trennen. Zuerst wollen wir beispielsweise nur die Faser in der Mitte sehen und dazu die Fasern links und rechts davon ausschalten. Was machen wir, um das zu erreichen? Den Ring können wir nicht kleiner machen, da auch er aufgrund der Beugung eine Minimalgröße einnehmen muss. Abbe würde sagen: „Engere Lichtringe zu

STED-Mikroskop:

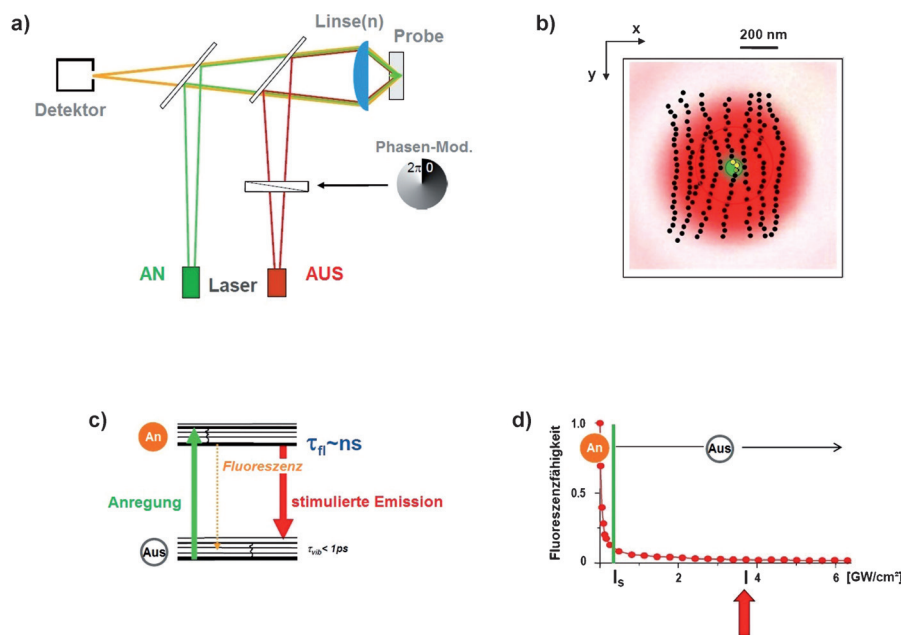


Abbildung 7. STED-Mikroskopie. a) Prinzip des Aufbaus. b) Bereich, wo ein Molekül den „An“-Zustand einnehmen kann (grün) und wo es den „Aus“-Zustand einnehmen muss (rot). c) Zustandsübergänge im Molekül. d) Für Lichtintensitäten des STED-Lichts (rot) in Höhe oder oberhalb des Schwellenwerts I_s sind Moleküle effektiv „ausgeschaltet“, denn der STED-Strahl hat jederzeit ein stimulierendes Photon parat, welches das Molekül instantan in den Grundzustand zurück zwingen kann; das geschieht auch in Gegenwart des Anregungslichts (grün). Die Gegenwart des STED-Lichts mit Intensität oberhalb des Schwellenwerts I_s schaltet somit die Fähigkeit der Moleküle zu fluoreszieren aus.

erzeugen ist unmöglich aufgrund der Beugung“. Das Entscheidende ist aber, dass wir das gar nicht tun müssen. Wir müssen lediglich die Moleküle in den Fasern, die wir nicht sehen wollen, „ausschalten“, d. h., wir stellen sicher, dass ihre Moleküle auf den Dunkelzustand abonniert sind, bis wir das Signal aus dem uns interessierenden Bereich, also von der Faser in der Mitte, detektiert haben. Der Schlüssel liegt ganz offensichtlich in der Präparierung der Zustände! Also machen wir den Lichtstrahl intensiv genug, sodass selbst Moleküle, die sehr nahe am Mittelpunkt des Rings sind, ausgeschaltet werden. Das geht, wenn die Intensität in unmittelbarer Nähe der Ringmitte absolut gesehen über der Schwelle I_s liegt.

Somit gelingt uns die Trennung: Nur am Ort (den Koordinaten) der Doughnut-Mitte dürfen die Moleküle emittieren, und wir können daher dieses Signal vom Signal der benachbarten Fasern trennen. Infolgedessen können wir auch Bilder mit räumlicher Auflösung besser als die Beugungsgrenze aufnehmen. Dazu bewegen wir die Lichtstrahlen über die Probe hinweg, was dazu führt, dass das Signal jeder Faser von dem der anderen zeitlich getrennt (hintereinander) gemessen wird. Die jeweiligen Moleküle sind nämlich gezwungen, zu unterschiedlichen Zeiten zu emittieren. Wir spielen also ein „An und Aus“-Spiel.

Innerhalb des viel größeren Anregungsbereichs ist es nur einer kleinen Zahl von Molekülen, die sich gerade im Zentrum des Doughnuts befinden, erlaubt, zu einem bestimmten Zeitpunkt zu emittieren. All die anderen um sie herum werden effektiv im dunklen Grundzustand gehalten, selbst wenn sie doch immer wieder ein grünes Photon absorbieren. Wann immer man nachprüfen würde, in welchem Zustand sie sich gerade befinden, man würde diese Moleküle fast durchgängig im Grundzustand antreffen, weil die Besetzung des angeregten Zustands sofort durch das STED-Licht verhindert wird.

Es zeigte sich, dass dieser Ansatz in der Praxis sehr gut funktioniert.^[17,19,23,25] Abbildung 8a zeigt eine hochwertige Konfokalaufnahme von einem Proteinkomplex in einer Zelle, von dem man anhand dieser Aufnahme wirklich nicht sagen kann, was es ist. Abbildung 8b zeigt dasselbe Bildfeld, aber mit dem STED-Verfahren aufgenommen. Die Auflösung ist um ungefähr eine Größenordnung besser (im roten Kanal), und man kann nun klar erkennen, was tatsächlich aufgenommen wurde: Kernporen auf der Membranhülle des Zellkerns. Die hohe Auflösung gibt sehr schön die achtfache Rotationssymmetrie dieses Komplexes mit seinen achtfach wiederholten molekularen Untereinheiten wieder.^[25] Die Konfokalaufnahme lässt nicht einmal im Ansatz eine Struktur erkennen.

Es liegt auf der Hand, dass eine solche Steigerung der räumlichen Auflösung neue Informationen liefert. Mit anderen Worten: Es werden Entdeckungen gemacht. Ich beschreibe hier kurz Forschungen in Zusammenarbeit mit einer virologischen Arbeitsgruppe (Prof. H.-G. Kräusslich an der Universität Heidelberg), die sich für das HI-Virus (human immunodeficiency virus) interessiert. Viren sind im Allgemeinen zwischen 30 und 150 Nanometer im Durchmesser.^[5] Wenn man ihre Details und Substrukturen mit einem herkömmlichen Lichtmikroskop abbilden möchte, so wird dies

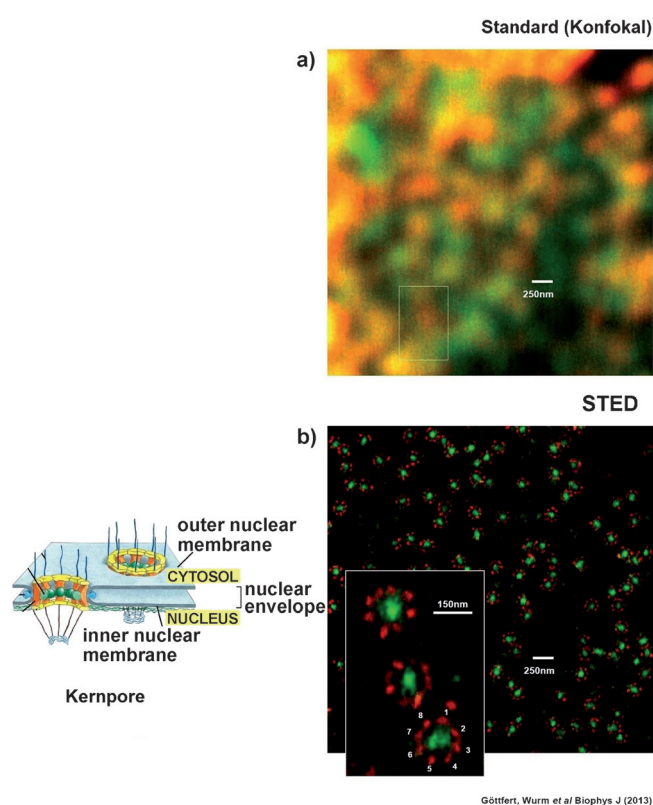


Abbildung 8. Architektur der Kernpore in einem intakten Zellkern, abgebildet im beugungsbegrenzten Konfokalmikroskop (a) und im STED-„Nanoskop“ (b).

nicht gelingen. Man wird z. B. keine Details von Proteinverteilungen auf den Viruspartikeln erkennen. Ein herkömmliches Fluoreszenzmikroskop, sei es konfokal oder nicht, würde pro Viruspartikel nur einen 250–350 Nanometer großen Fluoreszenzleck produzieren.

Der HI-Virus ist ungefähr 140 nm groß. Die Wissenschaftler, mit denen wir zusammenarbeiteten, wollten wissen, wie ein Protein namens Env auf dem HIV-Partikel verteilt ist (siehe Abbildung 9).^[26] In den normalen Aufnahmen kann man nichts Spezifisches erkennen. Hochauflösende STED-Bilder zeigen hingegen, dass das Protein Env räumliche Muster auf den HIV-Partikeln bildet. Was so herausgefunden werden konnte ist, dass reife HIV-Partikel – also diejenigen, die fähig sind, die nächste Zelle zu infizieren – ihre Env-Proteine tendenziell an einer Stelle konzentriert haben. Dies scheint eine Bedingung dafür zu sein, dass der HI-Virus effektiv sein kann – eine neue mechanistische Einsicht, die dank der hochauflösenden Bildgebung gewonnen werden konnte.

Lichtmikroskopische Verfahren können natürlich lebende Zellen untersuchen und auch bewegte Bilder, also einen Film, abliefern. Abbildung 10 zeigt eine STED-Mikroskopie-Filmaufnahme mit Video-Rate. Es sind synaptische Vesikel im Axon eines lebenden Neurons.^[20] Man kann direkt sehen, wie sie sich bewegen, ihre Dynamik studieren und herausfinden, wo sie ankommen.

Eine besonders „extreme“ Lebendzell-Studie zeigt Abbildung 11. Hierfür wurde der Schädel einer anästhesierten Maus geöffnet und in das Gehirn der Maus geschaut; genauer

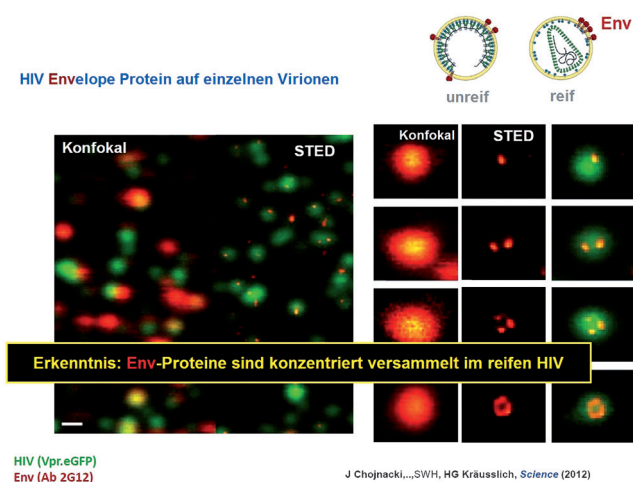


Abbildung 9. STED-Nanoskopie des HIV-Hüllenproteins Env in einzelnen Virionen. Die Konfokalmikroskopie kann die räumliche Verteilung des Env-Poteins nicht visualisieren. Bilder von Env auf den Viruspartikeln erscheinen als 250–350 nm große verwaschene Flecke (orange, linke Spalte). Die STED-Mikroskopie lässt erkennen, dass Env auf reifen Viruspartikeln räumliche Muster bildet (mittlere Spalte, orange), und Env in völlig gereiften (infektiösen) Partikeln stark in einem Punkt konzentriert ist (Bild in oberster Reihe der mittleren Spalte, orange).

gesagt in die obere (sogenannte molekulare) Schicht des visuellen Cortex.^[21] Es war eine transgen „fluoreszenzmarkierte“ Maus, was heißt, dass einige wenige Neuronen ein fluoreszierendes Protein exprimierten, genauer gesagt das gelb-fluoreszierende Protein YFP (yellow fluorescent protein). Wir gewannen mehrere Aufnahmen über einen Minutenzeitraum hinweg und konnten dabei die empfangenden synaptischen Enden des markierten Neurons beobachten – die sogenannten dendritischen Dornfortsätze. Diese bewegen sich ein bisschen, und es lohnt sich, genauer hinzuschauen indem man „hinein zoomt“. Man erkennt die feinen Hälse der Dornfortsätze und, ganz besonders schön, auch ihr kelchförmiges Ende – also die Stellen, an denen sich das empfangende Ende der Synapse befindet. Die STED-Mikroskopie erlaubt es, diese kleinen morphologischen Details zu visualisieren und somit die leichten zeitlichen Morphologieveränderungen zu vermessen. Ich bin überzeugt, dass wir in absehbarer Zeit die Proteine an der Synapse im Detail abbilden können.^[27] Ich kann mir auch vorstellen, dass man in Zukunft der Maus einen optischen Reiz anbieten kann und dann beobachten, wie sich dieser Reiz auf die Proteinverteilung direkt an der Synapse auswirkt. Im Prinzip sollte es so möglich sein, zu erkennen, wie neuronale Kommunikation oder die Herausbildung von Erinnerungen auf der molekularen Skala funktionieren.

Da die STED-Mikroskopie frei propagierendes, fokussiertes Licht verwendet, kann man auch dreidimensionale (3D) Bilder erstellen. Es ist z.B. möglich, Licht in das Nervengewebe zu fokussieren, um einen 3D-Datensatz zu gewinnen. Abbildung 12 zeigt eine hochauflösende 3D-Aufnahme

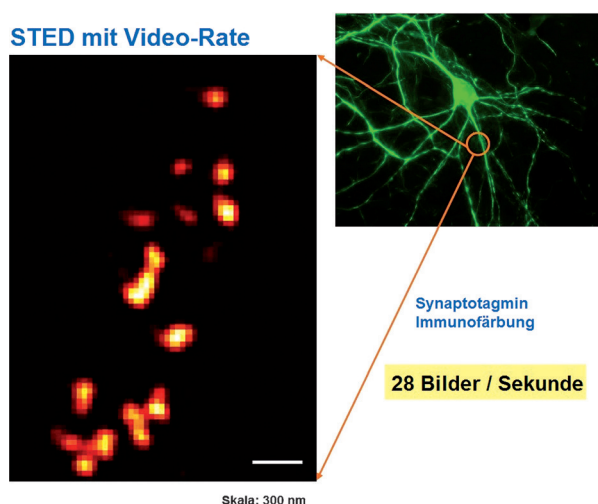


Abbildung 10. STED-Bildgebung mit Videogeschwindigkeit: Bewegung synaptischer Vesikel in einem Axon eines lebenden Neuron des Hippocampus.

von Aktin in einem lebenden Neuron. Dieses Neuron entstammt einem lebenden, organotypischen Hirnschnitt aus dem Hippocampus eines Nagers.

Kehren wir noch einmal zu den Grundlagen zurück und fragen nochmal nach der Auflösung: Welche Auflösungs- werte kann man jetzt erreichen? Gibt es jetzt eine neue Grenze? Um diese Fragen zu beantworten, schauen wir uns noch einmal das Prinzip an. Das Prinzip ist ja, dass wir Moleküle überall ausschalten, außer in der Nähe des Intensitätsminimums in der Mitte des STED-Strahls.^[28–31] Wenn wir

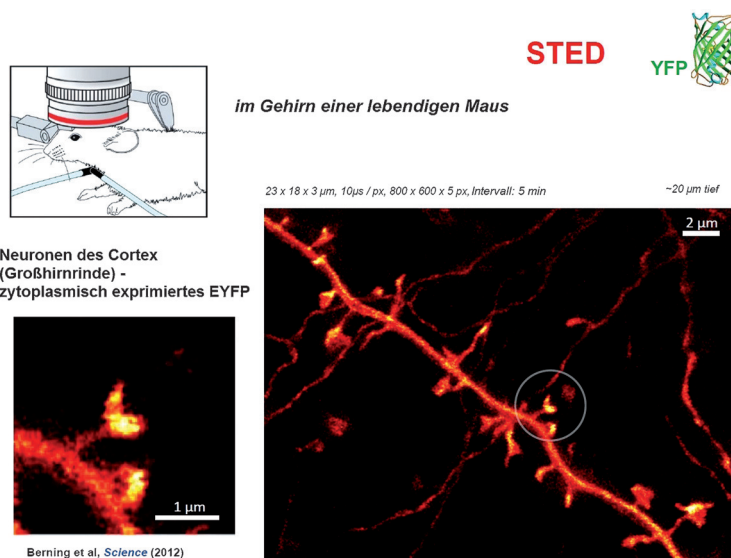
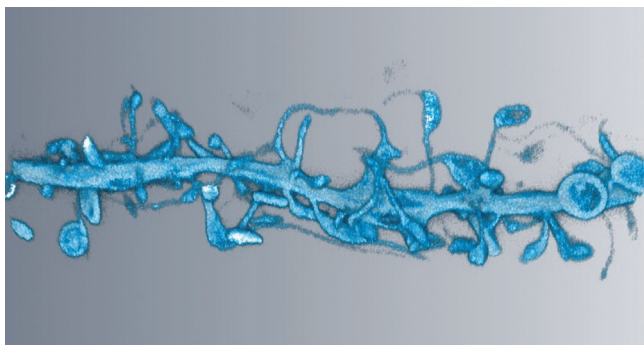


Abbildung 11. STED-Nanoskopie im Gehirn einer lebenden Maus. Gut zu erkennen ist ein Neuron mit seinen Dornfortsätzen, die in kelchförmigen Strukturen enden, an denen sich der signalempfangende Teil einer Synapse befindet. Sequenzen solcher und ähnlicher Bilder zeigten auf, dass sich die Dornfortsätze auf der Minutenskala leicht morphologisch verändern und bewegen.



JG Danzl, SC Sidenstein et al

Abbildung 12. Dreidimensionaler STED-Datensatz, der das dendritische Aktin eines Neurons aus einem lebenden organotypischen Hirnschnitt (aus Hippocampus) zeigt.

den Bereich, in dem die Moleküle immer noch emittieren, also den „An“-Zustand annehmen können, kleiner machen, so wird die Auflösung besser. Die Größe (Durchmesser) des Bereichs, in dem Moleküle noch „an“ sind, bestimmt nun die räumliche Auflösung. Dieser Bereich ist sicherlich nicht mehr durch die Abbe'sche Formel gegeben. Tatsächlich muss dieser Durchmesser von der maximalen Intensität I_s , die sich auf dem Kamm des Doughnuts befindet, abhängen (Abbildung 13b,d). Und sie hängt ebenfalls von der für das Molekül charakteristischen Schwellenintensität I_s ab. Je größer der Quotient I/I_s , desto kleiner wird d . Wenn wir die Auflösung mit einer neuen Gleichung beschreiben, so muss I/I_s im Nenner erscheinen.^[23,28,29] In der Tat skaliert d invers mit der Quadratwurzel aus I/I_s . (Die Quadratwurzel hängt damit zusammen, dass die Intensität in der Nähe der Nullstelle in

erster Näherung quadratisch verläuft). Je größer also I/I_s ist, desto kleiner wird d . In der Folge tendiert d gegen 0 für immer größere Werte von I/I_s (Abbildung 13b,d).

Im in Abbildung 13b gezeigten Fallbeispiel können wir zwei der nahe beieinanderliegenden Moleküle nicht trennen, da sie zur gleichen Zeit emittieren dürfen. Machen wir aber den roten Strahl etwas stärker, sodass nur ein Molekül in den Bereich, in dem die Moleküle „an“ sein dürfen, „hineinpasst“, wird die (theoretische) Grenze der Auflösung sichtbar: Es ist die Größe des Moleküls. Das ist nicht verwunderlich, denn das Molekül ist die Einheit, mit der getrennt wird, und somit die kleinste Einheit, die getrennt werden kann. Denn in unserem Verfahren trennen wir ja nicht mithilfe der Lichtbündelung. Sondern wir trennen Strukturen, indem wir ihre Moleküle in zwei unterschiedlichen Zuständen präparieren. Daher muss es das Molekül selbst sein, das die Grenze der räumlichen Auflösung darstellt. Wenn zwei Moleküle nahe zusammenkommen, können wir sie trennen, weil zum Zeitpunkt, da eines von beiden „an“ ist, das andere „aus“ ist und umgekehrt.^[28,30–32]

Es lohnt auch, sich Folgendes klarzumachen: Wenn alle „Aus“-Moleküle wirklich vollständig dunkel sind, also wirklich „aus“, so reicht es vollkommen aus, ein *einziges* Photon von einem Molekül zu detektieren, um zu wissen, dass sich am Ort des Minimums des STED-Strahls ein Molekül befindet. Das emittierte Photon (oder falls es doch mehrere sind, die emittierten Photonen) zeigt/zeigen ja lediglich an, dass dort ein Molekül ist. Und dazu genügt ein einziges Photon. Der Ort dieses emittierenden „An“-Moleküls ist vollständig bestimmt durch die Photonen des STED-Strahls. Seine Photonen bestimmen exakt, wo ein Molekül „an“ sein kann und wo es „aus“ (dunkel) sein muss! Die detektierten Fluoreszenzphotonen zeigen damit lediglich die Anwesenheit eines oder mehrerer Moleküle an.^[30–32]

Erreicht man nun in der Praxis Auflösung auf der Größenskala eines Moleküls, und wie sieht es in der Zelle aus? Für die heutige STED-Mikroskopie liegt die Standardauflösung zwischen 20 und 40 Nanometern, je nach Fluorophor und je nach chemischer Umgebung des Fluorophors,^[25] welche ja auf die molekularen Zustände einen Einfluss haben kann. Doch dies entwickelt sich fortlaufend. Mit Fluorophoren, die nahezu ideale Eigenschaften aufweisen und so oft an- und ausgeschaltet werden können, wie man möchte – mit solchen Fluorophoren können wir natürlich noch viel bessere Auflösungen erreichen.

In der Tat gibt es Fluorophore, die diese ideale Bedingung fast erfüllen. Es sind nicht organische, sondern anorganische Fluorophore, nämlich Farbzentren in Festkörpern, wie z.B. Stickstoff-Fehlstel-

STED-Mikroskop:

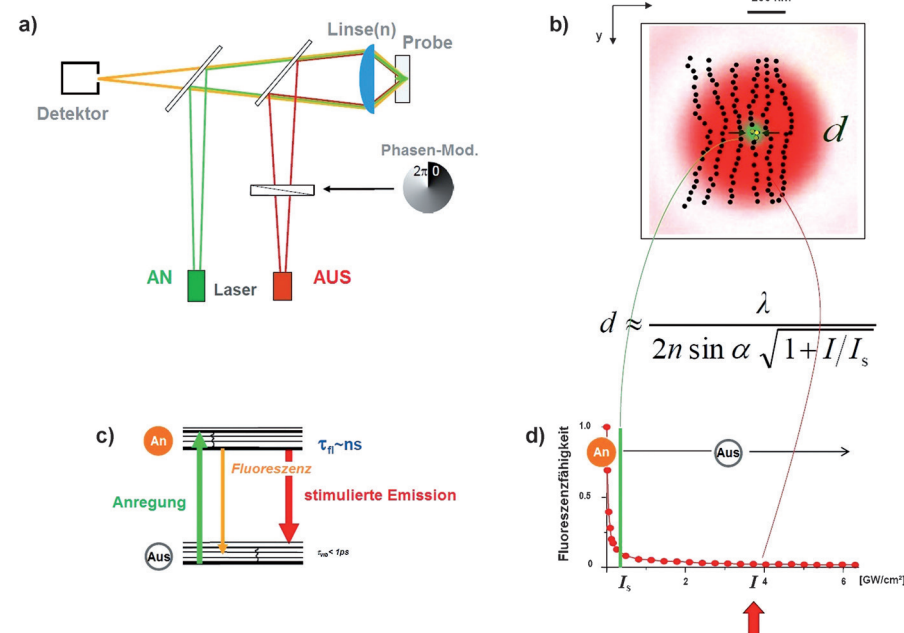


Abbildung 13. Skalierverhalten der Auflösung im STED/RESOLFT-Konzept: Erweiterung der Abbe'schen Formel. Die Auflösung skaliert invers mit der Wurzel aus dem Verhältnis der Maximalintensität am Doughnut-Kranz zur Fluorophor-charakteristischen Schwellenintensität I_s .

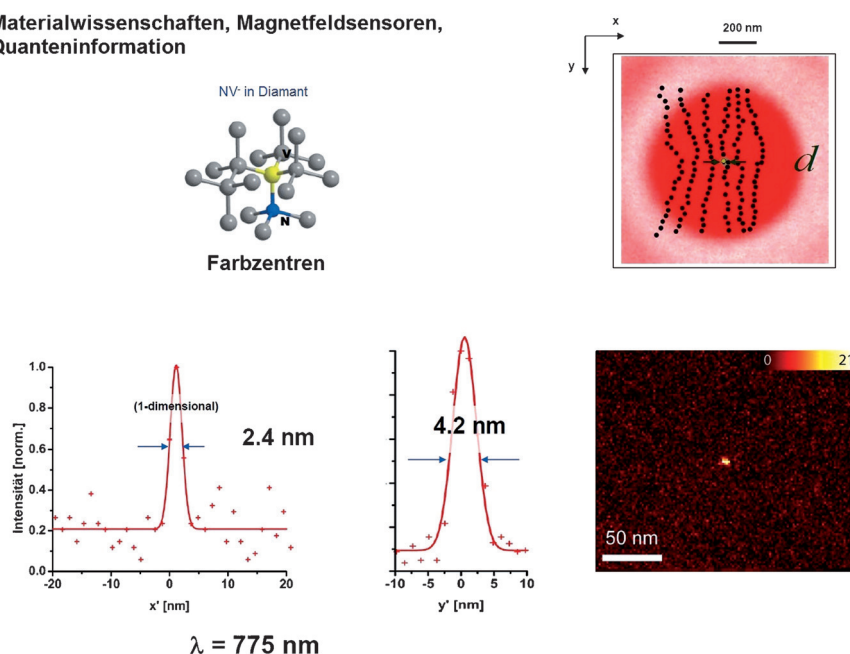
Materialwissenschaften, Magnetfeldsensoren,
Quanteninformation

Abbildung 14. Fluophore, die eine praktisch unbegrenzte Zahl von auflösungsermöglichenden „An“-„Aus“-Zustandsübergängen erlauben, haben die bisherigen Auflösungsrekorde im optischen Fernfeld möglich gemacht: im einstelligen Nanometerbereich. Hier wurde die STED-Mikroskopie auf NV⁻-Farbzentren (geladene Stickstoff-Fehlstellen) in Diamant angewendet. Weil sie über einen Spinzustand mit langer Kohärenzzeit bei Raumtemperatur verfügen, der optisch initialisiert und auch über Fluoreszenzanregung ausgelesen werden kann, haben NV⁻-Zentren großes Einsatzpotenzial für mehrere Anwendungen: als Sensoren atomarer Größe zur Messung magnetischer Felder auf der Nanoskala oder als Qbits in zukünftigen Quantenrechnern. STED-Mikroskopie oder ähnliche Verfahren könnten in Zukunft das optische Auslesen dicht gepackter NV⁻-Zentren (auf der Nanoskala) ermöglichen.

len(NV)-Zentren in Diamant (Abbildung 14). Diese fluoreszierenden Defekte können nahezu beliebig oft an- und ausgeschaltet werden.^[33] Bei ihrer Abbildung konnten wir den Bereich, in dem sie „an“ sein können, also den fluoreszierenden Zustand einnehmen können, auf 2.4 Nanometer verengen.^[34] Man bedenke, dass die Wellenlänge, mit der dieses Ergebnis erreicht wurde, 775 Nanometer beträgt! Der Bereich, in dem Emission stattfindet, beträgt weniger als ein Prozent davon, und ist also ein sehr kleiner Bruchteil der Wellenlänge.

Diese Messung mag wie ein Grundlagenexperiment, wie eine reine Demonstration des Prinzips ohne Anwendungsbezug aussehen, und zum Teil ist es das auch. Doch es gibt einen weiteren Grund, weshalb uns Auflösungsexperimente mit NV-Zentren interessant erschienen.^[33,35,36] Diese einfach geladenen NV-Zentren sind exzellente Kandidaten für „Qbits“ bei Raumtemperatur. Sie könnten sich für die Realisierung von Quantenrechnern eignen.^[37,38] Sie besitzen einen Spin-Zustand, der selbst bei Raumtemperatur über eine relativ lange Kohärenzzeit verfügt (\approx ms), und der optisch präpariert und ausgelesen werden kann. Da sie selbst weniger als ein Nanometer groß sind, können sie magnetische Felder auf der Nanoskala vermessen und die Signale optisch übermitteln.^[39,40] Wenn sie räumlich gepackt sind und ihre Signale nicht mehr konventionell optisch getrennt werden können, ist STED vielleicht die beste Methode, an die Signale einzelner NV-Zentren heranzukommen, also den Zustand und die

magnetischen Felder auf der Nanoskala auszulesen. Vielleicht könnte am Ende STED hilfreich sein, um Qbits in einem Quantencomputer auszulesen, wer weiß... Die Entwicklung geht jedenfalls weiter!

Ich hatte betont, dass die Trennung eng benachbarter Moleküle dadurch möglich geworden ist, indem man einen Teil der aufgrund der Beugung zwangsweise beleuchteten Moleküle dunkel hält.^[30–32] Man spielt „An/Aus“, man schaltet zwischen einem hellen und einem dunklen Zustand, um die Emitter zum Zeitpunkt der Abfrage unterscheidbar zu machen. Wenn einem das klar ist, wird einem auch klar, dass dies ein generelles Prinzip ist. Die stimulierte Emission ist sicherlich nicht der einzige Zustandsübergang, mit dem man das „An/Aus“-Spiel spielen kann. In einem (fluoreszierenden) Molekül muss es auch andere „An“- und „Aus“-Zustände geben, die man für denselben Zweck benutzen kann.^[22,28–30] Weil mir das schnell klar wurde, kämmte ich auch andere Lehrbücher durch und habe nach anderen „An/Aus“-Zustandspaaren gesucht. So kam ich darauf, dass man auch Triplett-Zustände und andere metastabile Dunkelzustände einsetzen kann. Und

in Chemiebüchern findet man auch die photoinduzierte *cis-trans*-Isomerisierung (Abbildung 15).

Aber weshalb sollte man nun speziellere Übergänge verwenden? Anders als die stimulierte Emission finden diese Übergänge ja nicht zwischen den beiden fundamentalen Zuständen des Fluorophors statt. Denn die Zustandsübergänge, die in STED Verwendung finden, sind wahrlich fundamental: optische Anregung und Abregung. Und die zwei Molekülzustände, zwischen denen diese Übergänge herbeigeführt werden, sind ja die grundlegendsten Zustände, die man sich vorstellen kann, der Grund- und der erste elektronisch angeregte Zustand. Hingegen durchläuft nicht jeder Fluorophor einen *cis-trans*-Übergang. Ganz im Gegenteil: Dazu braucht man spezielle Fluorophore.

Doch es gibt tatsächlich einen sehr wichtigen Grund, andere Zustände und Zustandsübergänge in Betracht zu ziehen und dafür speziellere Fluorophore in Kauf zu nehmen. Das wird einem klar, wenn man die Lebensdauern der beteiligten Zustände oder Zustandspaare betrachtet (Abbildung 15). In der STED-Mikroskopie ist die Lebensdauer des entscheidenden Zustands, nämlich des fluoreszierenden Zustands, im Nanosekundenbereich (Abbildung 15 a). Für metastabile Dunkelzustände, die in Methoden namens „Ground State Depletion“ (GSD)-Mikroskopie („Entvölkerung des Grundzustands“)^[41–43] (Abbildung 15 b) zum Einsatz kommen, ist die Lebensdauer des (Dunkel-)Zustands im Bereich von Mikrosekunden, und im Falle der *cis-trans*-

Prinzip: Unterscheide durch AN / AUS- Zustände in der Probe

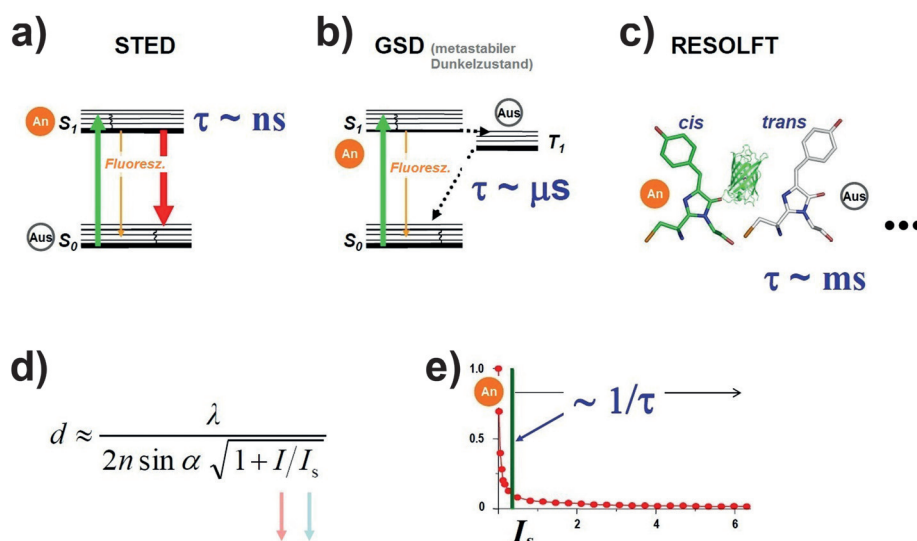


Abbildung 15. Zustände und Zustandsübergänge, die in der a) STED-, b) GSD- und c) RESOLFT-Nanoskopie Einsatz finden. d) Die modifizierte Auflösungsformel beschreibt den räumlichen Bereich, in welchem die Moleküle noch den „An“-Zustand annehmen können. e) Die Intensität I_s , die den für die Trennung erforderlichen Übergang von einem zum zweiten Zustand gewährleistet, steht in inversem Zusammenhang mit der Lebensdauer der beteiligten Zustände. Je länger die Lebensdauer der beteiligten Zustände, desto weniger Photonen pro Sekunde sind nötig, um den „An“-„Aus“-Zustands-Unterschied herbeizuführen, der benötigt wird, um Strukturen/Moleküle innerhalb der Beugungsgrenze zu unterscheiden und somit zu trennen.

Übergänge bewegt sie sich im Millisekundenbereich (Abbildung 15c). Warum ist diese Erhöhung der Lebensdauer der eingesetzten Zustände so relevant?

Man erinnere sich, dass wir umeinanderliegende Strukturen trennen, indem wir ihre fluoreszenten Moleküle kurzfristig in zwei verschiedene Zustände überführen. Wenn jedoch einer der Zustände (oder beide) innerhalb einer Nanosekunde wieder verschwindet, dann verschwindet auch der Unterschied der Zustände, den man herbeigeführt hatte. Man muss sich also beeilen, ständig neue Photonen in die Probe hineinzuschicken, um den Zustandsunterschied zu erzeugen (zu erhalten) und ihn auch auszulesen, bevor er wieder verschwindet. Wenn man dagegen mehr Zeit dafür zur Verfügung hat – Mikrosekunden, Millisekunden – so kann man Moleküle ausschalten, die verbleibenden auslesen, anschalten, ausschalten usw... Die Zustände und damit der Zustandsunterschied bleiben länger erhalten, und man hat Zeit ihn zu nutzen. Am besten kann man sich das klar machen, wenn man an bistabile optische Schalter denkt. Wenn man den Zustandsunterschied durch Schalten kurzfristig festmacht und es keine konkurrierenden „Zerfallsprozesse“ gibt, so hat man Zeit, den Unterschied aufzubauen und ihn zu verwenden. Man muss sich nicht beeilen, Photonen hineinzuschicken, und dies macht die „Trennung nach Zuständen“ bei viel niedrigeren Lichtintensitäten möglich.^[28,41]

Um formaler zu sein: die vorher erwähnte Schwellenintensität I_s skaliert invers mit der Lebensdauer der beteiligten Zustände (Abbildung 15e): Je länger die Lebensdauer, desto kleiner ist I_s , und die Beugungsgrenze kann mithilfe dieses Übergangs bei deutlich niedrigeren Lichtintensitäten

überwunden werden. I_s sinkt von Megawatt (STED) zu Kilowatt (GSD) zu Watt pro Quadratzentimeter für Schaltzeiten im Millisekundenbereich (RESOLFT) – ein Bereich von sechs Größenordnungen.^[28] Dies macht Übergänge zwischen längerlebigen Zuständen natürlich sehr interessant. In der Formel (Abbildung 15d) nimmt I_s somit ab. Und damit natürlich auch I , denn man benötigt nicht so viele Photonen pro Fläche und Sekunde, um dieselbe Auflösung d zu erreichen.

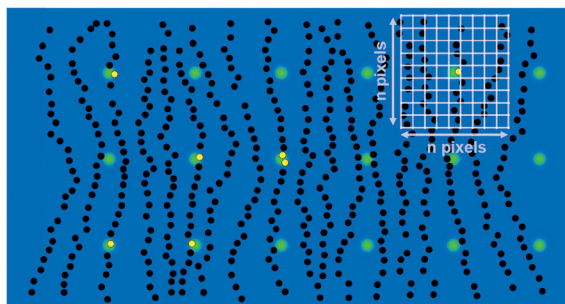
Die cis-trans-Isomerisierung ist besonders interessant, da sie sich in schaltbaren fluoreszenten Proteinen findet. Wir untersuchten diese bereits ab 2003 experimentell, um zu prüfen, ob sie sich für STED-ähnliche Verfahren anbieten. Ich nannte diesen Ansatz RESOLFT, für „reversible saturable/switchable optically linear (fluorescence) transitions“ („reversibel sättigbare/schaltbare optisch lineare (Fluoreszenz-)Übergänge“),^[28,44–46] ganz einfach deshalb, weil ich es nicht

mehr „STED“ nennen konnte. Es findet dabei ja keine stimulierte Emission statt, also musste ich einen anderen Namen finden. Die Stärke des Ansatzes liegt nicht nur darin, dass man eine hohe Auflösung mit weniger intensivem Licht erreichen kann. Man kann auch günstigere Laserquellen einsetzen, CW-Laser („continuous wave“), und/oder man kann das Licht über ein großes Bildfeld verteilen, einfach weil man nicht so intensives Licht benötigt, um die Moleküle zu schalten.

Konkret bedeutet das, dass man die Aufnahme parallelisieren kann. Man kann also ein Muster mit vielen „Löchern“ (Intensitätsminima, Nullstellen) gleichzeitig erzeugen und dadurch ein großes Bildfeld schnell auslesen (Abbildung 16). Es ist kein Problem, viele Intensitätsnullstellen gleichzeitig zu haben. Solange sie weiter auseinander sind als die Abbe'sche Beugungsgrenze, können sie alle gleichzeitig ausgelesen werden, indem die Signale – in den Minima des Musters erzeugt – gleichzeitig auf eine Kamera projiziert werden. Natürlich wird dabei das ganze Nullstellen-Array über die Probe gerastert, und die Kamera, welche das Signal für jeden Schritt integriert, wird auch nach jedem Schritt ausgelesen. Nur wenige Scanschritte in eine Richtung und in die dazu orthogonale Richtung, und fertig ist das hochaufgelöste Bild eines großen Probenbereichs. In Abbildung 17^[47] wurde eine lebende Zelle innerhalb von zwei Sekunden mit mehr als 100000 „Doughnuts“ parallel aufgenommen.

Trotz des leicht anderen optischen Arrangements (sprich: das Array von Intensitätsminima) ist hier der Schlüssel zum Erfolg der molekulare Zustandsübergang. Die Auswahl des geeigneten molekularen Zustandsüberganges bestimmt die

Viele „Doughnuts“ (Nullstellen) parallel



niedrige Intensitäten

Abbildung 16. Parallelisierung des STED/RESOLFT-Konzepts ermöglicht schnellere Bildgebung. Das Beugungsproblem muss nur für die Moleküle gelöst werden, die sich innerhalb eines Bereichs, der durch die Beugungsgrenze gegeben ist, befinden, also innerhalb von ca. 200–400 nm. Deshalb kann man das Verfahren parallelisieren, indem man gleichzeitig zahlreiche Intensitätsminima („Doughnuts“) erzeugt – jeweils in einem Abstand, der größer ist als die Beugungsgrenze. Damit kann man große Probenbereiche sehr effizient mit mehreren nanoskaligen Messbereichen abrastern. Dabei wird das Signal auf einen parallelisierten Detektor projiziert, wie z. B. eine Kamera, die natürlich nach jedem Rasterschritt ausgelesen und neu initialisiert wird. Die Verwendung hochparallelisierter Ansätze wird dabei massiv erleichtert, wenn Übergänge zwischen langlebigen molekularen „An“-„Aus“-Zuständen eingesetzt werden, wie sie typischerweise bei *cis*- und *trans*-Zustands-paaren vorkommen.

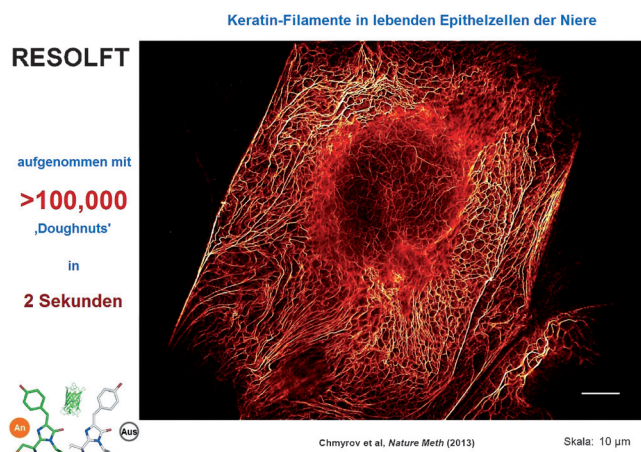


Abbildung 17. Hochparallelisierte RESOLFT-Nanoskopie. Im gezeigten Beispiel wurde ein Muster von ca. 114 000 Intensitätsminima (Nullstellen) benutzt, um eine lebende Zelle in zwei Sekunden voll abzubilden.

Parameter der Bildgebung fast vollkommen. Die Leistungsfähigkeit der Bildgebung, darunter Auflösung und Bildkontrast, sowie andere Faktoren werden durch den eingesetzten molekularen Übergang vorgegeben.^[32]

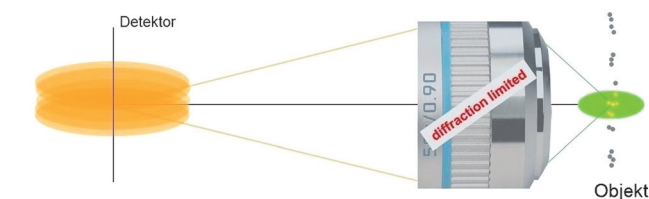
Und nun noch eine interessante Frage: Was braucht man also, um die höchste Auflösung zu erreichen? Wenn man diese Frage im 20. Jahrhundert gestellt hätte, was wäre wohl die Antwort gewesen? Nun, die Antwort wäre fraglos gewesen: gute Linsen, also gute Objektive.^[10] Klar! Natürlich, brauchte man gute Objektive. Ganz einfach, weil die Trennung benachbarter Strukturen durch möglichst scharfes Fo-

kussieren von Licht bewerkstelligt wurde. Und dafür benötigt man gute Objektive, die den schärfsten Lichtfleck in der Probe und/oder den schärfsten Lichtfleck am Detektor erzeugen. Man kann jedoch keinen noch kleineren Lichtfleck erzeugen als das, was durch die Beugung vorgegeben ist. Diese Strategie ist zu Ende gekommen (Abbildung 18, oben)! Und wenn mehrere Strukturen räumlich in diesen Lichtfleck fallen, so kann man sie einfach nicht mehr trennen. Solange man Strukturen durch die Fokussierung des Lichts (mit herkömmlichen Objektiven) zu trennen versucht, ist die Auflösung durch Beugung begrenzt (Abbildung 18, oben).

Was war also die Lösung für dieses Problem? Die Antwort ist: *Trenne nicht durch die Fokussierung des Lichts, sondern trenne durch Molekül-Zustände*, im einfachsten Fall durch „An/Aus“-Zustände.^[28–31] Wenn man nämlich anhand molekularer Zustände trennt, so kann man die Strukturen oder die Moleküle, die sie repräsentieren, auseinanderhalten. Und das obwohl sie innerhalb der Beugungsgrenze liegen, also innerhalb eines Abstands, das zwangsweise gleichzeitig von frei propagierendem Licht abgedeckt wird. Durch einen Zustandsunterschied können wir z. B. ein einziges Molekül von seinen Nachbarn unterscheiden und es gesondert wahrnehmen (Abbildung 18, unten). Zu diesem Zweck haben wir also eine Auswahl an Zuständen eingeführt oder in Betracht

20. Jahrhundert:

... Trenne Strukturen durch **Fokussierung des Lichts**



STED, GSD, SSIM, RESOLFT, ...



... Trenne mittels (An/Aus)- Zuständen

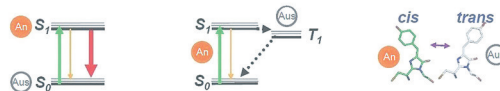
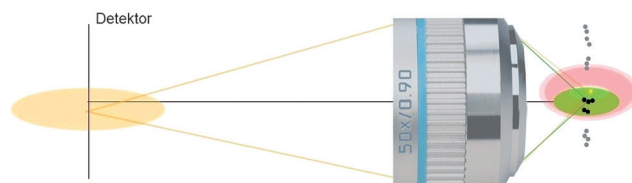


Abbildung 18. Paradigmenwechsel im Blick auf das physikalische Phänomen, durch das Strukturen/Moleküle im fernfeldoptischen Fluoreszenzmikroskop getrennt werden: Von der Lichtfokussierung im 20. Jahrhundert und davor, zur heutigen Verwendung eines Molekülübergangs, wie z. B. eines „An/Aus“-Zustandsübergangs.

gezogen (Abbildung 15), um Moleküle/Strukturen innerhalb des Beugungsbereichs unterscheidbar zu machen.

In den Methoden, die ich bisher beschrieben habe, STED, RESOLFT usw., sind die Orte des Zustands, wo ein Molekül „an“ und wo ein Molekül „aus“ ist, durch ein Lichtmuster gegeben, wie z. B. den Doughnut oder das Doughnut-Array. Genauer gesagt, legen die Intensitätsnullstellen den Ort fest. Dieses Lichtmuster bestimmt ganz klar, wo das Molekül „an“ sein kann und wo es „aus“ sein muss, oder umgekehrt. Die Koordinaten X, Y, Z der Zustandsbesetzung werden fest kontrolliert durch das einfallende Lichtmuster und die Positionen seiner Nullstellen. Indem das Muster kontrolliert zur nächsten Position X, Y, Z bewegt wird, kennt man zu jedem Zeitpunkt die Orte, in welchen der „An“- und der „Aus“-Zustand eingenommen wird. Der für die Trennung so essentielle räumliche Zustandsunterschied ist vollständig durch das einfallende Lichtmuster bestimmt. Im Übrigen benötigt man nicht unbedingt viele *detektierte* Photonen von den Molekülen oder dem Molekül im „An“-Zustand, da die detektierten Photonen lediglich die Anwesenheit der Moleküle an dem Ort anzeigen, an dem der „An“-Zustand zuge-lassen ist.

Wie hängt nun dieses erste Konzept zur Überwindung der Beugungsgrenze mit dem jüngeren PALM-Konzept („photo-activated localization microscopy“) von Eric Betzig^[48] zusammen. Wo sind die Gemeinsamkeiten und wo die Unterschiede? Ein fundamentaler Unterschied ist, dass dieses Verfahren zur Trennung benachbarter Strukturen deren Moleküle einzeln an- und ausschaltet. Es beruht auf der Entdeckung, dass man Moleküle individuell detektieren kann, eine Entdeckung von W. E. Moerner,^[8,49] die von Michel Orrit entscheidend erweitert wurde. Dabei werden im PALM-Konzept^[49] (auch STORM^[50] oder FPALM^[51] genannt) die Moleküle räumlich völlig zufällig an- und ausgeschaltet. Der für die Trennung erforderliche Zustandsunterschied, die Besetzung von „An“- und „Aus“-Zustand, wird also Molekül für Molekül und räumlich stochastisch erzeugt (Abbildung 19). Dabei muss sichergestellt werden, dass in etwa nur ein Molekül pro Beugungsbereich (≈ 200 nm) „an“ ist, sonst kann man es ja nicht von einem potentiellen Nachbarn trennen. Ein Molekül taucht also irgendwo zufällig im „An“-Zustand auf, ein einzelnes Molekül pro beugungsbegrenztem Bereich, und so wird der Zustandsunterschied zwischen „an“ und „aus“ erzeugt. Da man jedoch nicht weiß, an welcher Koordinate X, Y, Z ein Molekül in den „An“-Zustand gewechselt ist, muss man das herausfinden. Dazu braucht man wiederum ein *Lichtmuster*, mit dem man die Position, den Ort (die Koordinaten), messen/bestimmen kann. Dieses Lichtmuster ist das Fluoreszenzlicht, das vom Molekül emittiert und vom Objektiv auf ein Detektor-Array, normalerweise eine Kamera, fokussiert wird. Dabei entsteht natürlich ein Beugungsmuster, das von einzelnen Detektorpixeln der Kamera erfasst wird. Die Koordinaten der Detektorpixel geben das räumliche Bezugssystem vor, aus dem

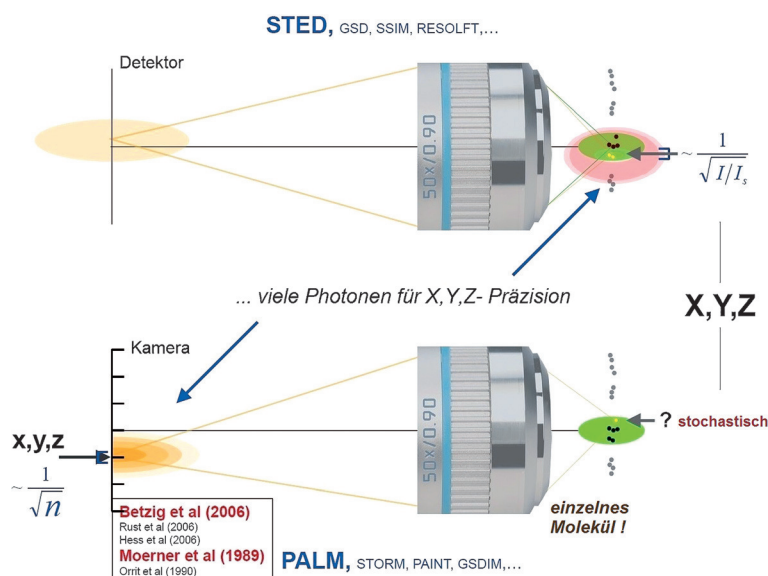


Abbildung 19. Sowohl in den Nanoskopiemethoden, die gezielte Abfrage-Koordinaten setzen, als auch in solchen mit stochastischen Molekülkoordinaten werden viele Photonen benötigt, um die molekularen Koordinaten auf Längenskalen unterhalb der Beugungsgrenze zu definieren bzw. um sie herauszufinden. In Modi mit gezielter Koordinatensetzung und -abfrage (STED, RESOLFT, usw.) werden die räumlichen Koordinaten z. B. des „An“-Zustands festgesetzt, indem die Probe mit einem Lichtmuster *beleuchtet* wird, das (mindestens) ein Intensitätsminimum beinhaltet. Der Ort dieses/r Minimums/Nullstelle(n) definiert die Koordinaten mit einer viel höheren Präzision als die Beugungsgrenze. In Koordinaten-stochastischen Verfahren (PALM, STORM usw.) werden die Koordinaten der zufällig im „An“-Zustand auftretenden Moleküle herausgefunden („lokalisiert“), indem die Lichtmuster, die von den Molekülen *emittiert* werden, auf einen Koordinaten-gebenden Detektor projiziert und analysiert werden. Räumliche Präzision wird dabei in beiden Fällen durch eine ausreichende Zahl von Photonen erreicht. In beiden Methodenfamilien werden benachbarte Moleküle in der Probe getrennt, indem man dafür sorgt, dass sie für kurze Zeit unterscheidbare molekulare Zustände einnehmen.

man die Koordinaten des emittierenden Moleküls ermitteln kann, und zwar aus dem „Schwerpunkt“ des Beugungsmusters.

Wichtig dabei ist, dass man ein relativ *helles* Fluoreszenzbeugungsmuster benötigt, um die Position der Emission möglichst genau *herauszufinden*, genauso wie man ein relativ helles Muster von einfallendem Licht in STED/RESOLFT benötigt, um den Ort der Zustände (und damit die Position der Emission) *vorzugeben*. Es ist wirklich nicht überraschend, dass man in beiden Verfahren helle Muster von Licht – also viele Photonen – benötigt, um eine räumliche Koordinate genau festzulegen oder herauszufinden. Denn hätte man z. B. nur ein Photon zur Verfügung, so würde das aufgrund der Beugung statistisch verteilt irgendwo im Beugungsbereich landen. Es gibt bei frei propagierendem Licht keine Möglichkeit, seinen Ort zu kontrollieren. Mit anderen Worten, wenn wir es mit Positionsbestimmung zu tun haben, benötigen wir viele Photonen, quasi per definitionem, denn dies ist das Wesen der Beugung selbst. Viele Photonen helfen dagegen, Ortskoordinaten von „An“- und „Aus“-Zustands-Molekülen genau vorzugeben in STED-RESOLFT, genauso wie viele Photonen es ermöglichen, die Orte von „An“-Zustands-Molekülen im räumlich stochastischen PALM-Verfahren genau zu ermitteln.

Wie bereits angedeutet, müssen wir uns im STED/RESOLFT-Verfahren nicht auf einen einzelnen Doughnut – sprich auf ein einziges Intensitätsminimum – und daher auf einen einzelnen beugungsbegrenzten Bereich beschränken. Wir können mehrere „Beugungsbereiche“ unabhängig voneinander und gleichzeitig behandeln und somit ein großes Bildfeld gleichzeitig auflösen (vgl. das blaue Muster in Abbildung 16), z.B., indem man ein periodisches Muster von Intensitätsminima, also mehrere „Doughnuts“, parallel verwendet. Wiederum ist der fundamentale Unterschied zu PALM/STORM (Abbildung 20), dass die Koordinaten der Besetzung des „An“-und „Aus“-Zustands fest vom Lichtmuster kontrolliert werden, egal wieviele Moleküle sich dort befinden. Die Koordinaten, an denen ein bestimmter Zustand angenommen werden kann, sind festgelegt. Im PALM-Fall, in dem die Besetzung der Zustände räumlich stochastisch ist, muss dagegen sichergestellt werden, dass es nur ein Molekül pro Beugungszone ist, das den „An“-Zustand annimmt. Die Ortskoordinaten sind entweder gegeben durch das einfallende Lichtmuster (Abbildung 19, oben) bzw. durch das Lichtmuster, das aus der Probe „herauskommt“ (Abbildung 19, unten).

Wofür steht nun I/I_s ? I_s ist die Zahl der Photonen, die benötigt werden, damit sichergestellt ist, dass zumindest ein Photon mit dem Molekül wechselwirkt und damit in den anderen Zustand schickt. (Bei STED wäre das die Zahl der Photonen pro Zeiteinheit und Fläche, die sicherstellt, dass zumindest ein Photon immer da ist, um das Molekül vom fluoreszenten („An“) in den nicht-fluoreszenten („Aus“) Zustand zu transferieren.) I/I_s ist dann gewissermaßen die Anzahl der Photonen, die tatsächlich in der Lage wären, diesen Transfer am Molekül durchzuführen. Genauso ist im PALM-Konzept die detektierte Photonenanzahl n in $1/\sqrt{n}$ nichts anderes als die Anzahl von emittierten Photonen, die zum Messprozess tatsächlich etwas beitragen. Man braucht also Photonen, die wirklich etwas ausrichten – sei es am Molekül in der Probe oder sei es am Detektor –, und dieser Vergleich zeigt dies deutlich.

In beiden Fällen, also sowohl in den Koordinaten-deterministischen (STED/RESOLFT) als auch den Koordinaten-stochastischen (PALM/STORM) Verfahren, wird die Trennung benachbarter Moleküle und Strukturen durch einen „An“-„Aus“-Zustandsübergang durchgeführt.^[28–31] Das ist in beiden Methodenvarianten der gemeinsame Knackpunkt.

Mittels zweier unterscheidbarer Zustände machen wir die Strukturen kurzfristig unterscheidbar, so halten wir sie auseinander. Tatsächlich bewerkstelligen alle ernstzunehmenden beugungsunbegrenzten Fernfeld-Mikroskopiemethoden die Trennung im Bild, indem sie die Moleküle, die enger beieinander sind als die Beugungsgrenze, für die Dauer der Erfassung durch den Detektor in zwei verschiedene Zustände überführen. „Fluoreszent (AN)“ und „nicht-fluoreszent (AUS)“ ist das einfachste Zustandspar, das man dafür verwenden kann, und so ist es auch nicht verwunderlich, dass „An“- und „Aus“-Zustände bisher am häufigsten dafür eingesetzt wurden. Außerdem ergibt „An“ und „Aus“ in der Regel einen sehr guten Kontrast, d.h. die Zustände sind leicht zu unterscheiden. Ein inhärenter Nachteil des An/Aus-Kontrastes ist natürlich die Tatsache, dass die Moleküle, die nicht registriert wurden, weil sie aus waren, zu einem späteren Zeitpunkt angeschaltet und registriert werden müssen. Trennen über An/Aus geht also unweigerlich auf Kosten der Zeit. (Trennen über Zustände, die rote bzw. grüne Photonen emittieren, täte das nicht.)

Man kann also den Standpunkt vertreten, dass im 20. Jahrhundert die Qualität der Objektivlinse der für die Auflösung entscheidende Faktor war. Und die Objektivhersteller waren die „Könige“, die das Feld der Mikroskopie regierten. Um die schärfsten Bilder zu bekommen, musste man zu ihnen gehen und sie um die besten Objektive bitten. Doch wie ist es heute? Es sind nicht die Linsenschleifer, die Objektivhersteller, die am Ende des Tages die Auflösung bestimmen. Denn bei der Auflösung heute geht es im Kern nicht mehr um die Linsen oder die Objektive: Es geht um Molekülzustände! Und die hängen natürlich von den Molekülen ab. Die Moleküle entscheiden heute darüber, wie gut unsere Bilder werden

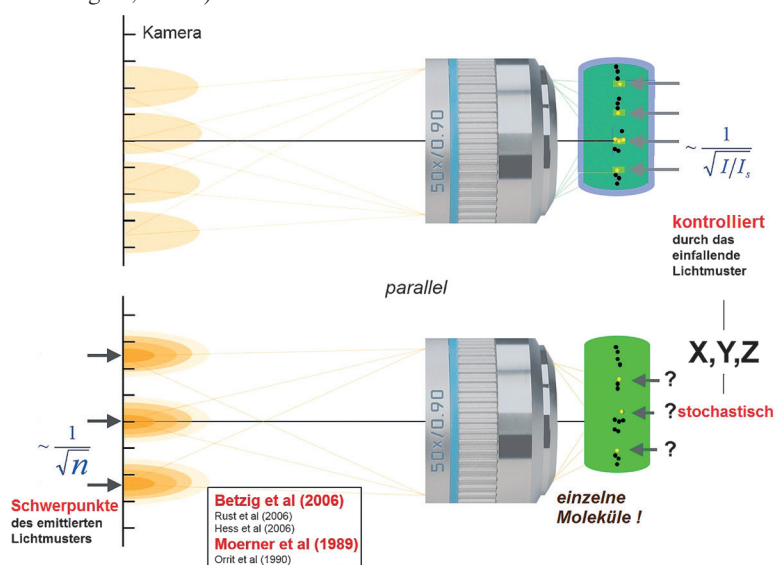


Abbildung 20. Im STED/RESOLFT-Konzept sind die Koordinaten, an denen sich ein Molekül im „An“- (oder „Aus“-) Zustand befinden kann, durch ein Lichtmuster genau festgelegt. Dabei ist es egal, ob sich dort lediglich ein Molekül, drei Moleküle oder wieviele auch immer befinden. Im PALM-Fall muss sichergestellt werden, dass sich dort nur ein Molekül pro Beugungszone befindet; sie müssen also weiter voneinander entfernt sein als die Beugungsgrenze (oder es müssen zumindest so wenige sein, dass sie noch trennbar sind). Dabei sind die Koordinaten dieser „An“-Zustands-Moleküle aber räumlich stochastisch verteilt. (Obwohl man das PALM-Verfahren sicherlich auch mit einem einzigen, rasternden, gebeugten Strahl durchführen könnte, wird PALM so gut wie immer „parallelisiert“ implementiert, d.h. viele Beugungszonen werden mittels einer Kamera gleichzeitig aufgenommen.) Auch hier muss die Kamera nach Aufnahme des Beugungsflecks eines Moleküls ausgelesen werden, bevor das nächste Molekül aus derselben Beugungszone registriert wird. Bei beiden Methodenfamilien sind die Ortskoordinaten entweder durch das einfallende Lichtmuster oder durch das (Fluoreszenz-)Lichtmuster, das aus der Probe „herauskommt“, gegeben. I_s ist die Zahl der Photonen, die benötigt werden, um sicherzustellen, dass ein Photon auf jeden Fall mit einem dort vorhandenen Molekül wechselwirkt und es von einem zum nächsten Zustand überführt. I/I_s in $1/\sqrt{I/I_s}$ kann interpretiert werden als die Anzahl der Photonen, die tatsächlich zum Prozess beitragen, also mit dem Molekül wechselwirken können (und nicht einfach vorbeifliegen). In PALM ist n , in $1/\sqrt{n}$, ebenfalls die Anzahl Photonen, die zum Detektorsignal beitragen.

können! Die erzielbare räumliche Auflösung wird also durch die Moleküle bestimmt. Und Moleküle machen, die besonders gut auflösen können, das ist nicht optische Technologie – das ist *Chemie* (Abbildung 21). Man könnte sagen, dass es heute die Chemie ist, die bestimmt, wie scharf wir abbilden können. In gewisser Weise hatten wir es mit der Mikroskopie zunächst mit einem Problem der Physik zu tun – die Beugungsgrenze war zweifelsohne ein Thema der Physik. Aber durch die Lösung, die Trennung benachbarter Strukturen nicht durch die Fokussierung von Licht, sondern über die transiente Besetzung zweier Molekülzustände zu erreichen, ist sie ein Thema der chemischen Forschung geworden.

Dieser Nobelpreis ist für die höchstauflösende *Fluoreszenzmikroskopie* verliehen worden. Obwohl das Element, das den Durchbruch ermöglicht hat, der Übergang zwischen zwei Zuständen war, so müssen diese zwei Zustände nicht zwingend in einem Fluorophor stattfinden, also auch nicht ein „An“ und „Aus“ der Fluoreszenz bedeuten. Sie können einfach ein Paar von gut unterscheidbaren Zuständen „A“ und „B“ sein (Abbildung 22), wie „Absorption“/„keine Absorption“, „streuend“/„nicht streuend“, „spin up“/„spin down“, oder „gebunden“ und „ungebunden“, wie in der Methode, die PAINT^[52] genannt wird. Man kann sich somit auch gut ein beugungsunbegrenztes Mikroskop vorstellen, das auf „An/Aus“ von *Absorption* oder *Streuung* beruht – wenn man geeignete Zustände dafür identifiziert. Diese Geschichte, die Überwindung der Beugungsgrenze, geht weiter. Und ich gehe davon aus, dass sich da noch mehr entwickeln wird. In meinen Augen, hat sie gerade erst angefangen.

Mit Blick auf Abbes Formel (Abbildung 4) stellt man fest, dass sie für viele Jahre wie in Stein gemeißelt war. Doch heute kann sie natürlich nicht erklären, dass wir jetzt in der Lage sind, viel höhere Auflösungen zu erzielen. Aber zum Glück können wir Abbes Formel leicht anpassen. Wir fügen einfach den Wurzelterm hinzu (Abbildung 15 d), und nun: Die

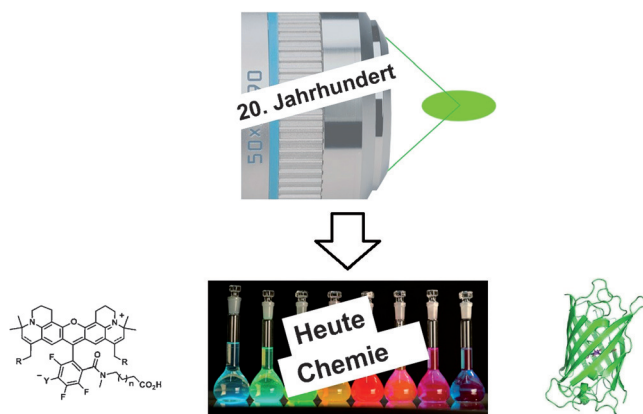


Abbildung 21. Von Objektivlinsen zu molekularen Schaltern. Während bis zum Ende des 20. Jahrhunderts die Güte der Objektive – also die Aberrationsfreiheit der Fokussierung – entscheidend war, um hohe räumliche Auflösungen zu erreichen, sind es nun die Moleküle selbst und ihre Zustandsübergänge, die zentral für die bestmögliche Auflösung werden. Moleküle dahingehend zu optimieren, möglichst robuste und wiederholbar ausführende „An“-„Aus“-Zustandsübergänge zu ermöglichen, ist primär ein chemisches Forschungsthema.

Superresolution

trennt Strukturen unter Verwendung von (mindestens) 2 Molekül-Zuständen

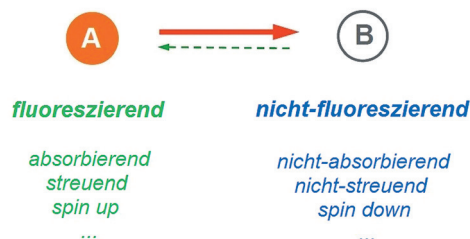


Abbildung 22. Die auflösungsbegrenzende Rolle der Beugung wird überwunden, indem (mindestens) zwei Molekülzustände eingesetzt werden, um Strukturen/Moleküle zu trennen, die näher zusammen liegen als die Beugungsgrenze. Wenngleich fluoreszente Moleküle die ersten Moleküle waren, die solche Zustände lieferten und einsetzbar machten, sind sicherlich auch andere Moleküle und Zustände denkbar, die nicht unbedingt etwas mit Fluoreszenz zu tun haben. Daher kann man sich vorstellen, die Beugungsgrenze auch in einem fernfeldoptischen Mikroskop, das nicht auf Fluoreszenzkontrast basiert, zu überwinden. Die Voraussetzung dafür ist, dass man geeignete Zustände und Übergänge zwischen ihnen findet. Zweifelsohne ist dies ein hochinteressantes zukünftiges Forschungsthema auf dem Gebiet der Nanoskopie.

Grenze ist überwunden, und die Auflösung lässt sich im Prinzip bis hinunter zur Größe eines Moleküls steigern. Die Natur ist so beschaffen, dass wir mit frei propagierendem Licht Bildauflösungen auf molekularer Skala erreichen können.

Danksagung

Mein Dank gilt Steffen J. Sahl für die Erstellung der ursprünglichen Version der transkribierten Vorlesung und deren Übersetzung ins Deutsche, sowie Mark Bates für weitere hilfreiche Bemerkungen. Zu guter Letzt möchte ich unterstreichen, dass ich nicht über diese Entwicklungen berichten könnte ohne die Hilfe der vielen talentierten Studenten, Doktoranden und Postdoktoranden, die zu dieser Entwicklung wichtige Beiträge geliefert haben. Ihnen allen bin ich zu großem Dank verpflichtet. Viele von ihnen sind weiter in diesem Forschungsgebiet aktiv, denn das Gebiet ist weiterhin sehr, sehr spannend.

Zitierweise: *Angew. Chem. Int. Ed.* **2015**, 54, 8054–8066
Angew. Chem. **2015**, 127, 8167–8181

- [1] „Beiträge zur Theorie des Mikroskops und der mikroskopischen Wahrnehmung“: E. Abbe, *Arch. Mikrosk. Anat.* **1873**, 9, 413–468.
- [2] E. Verdet, *Leçons d'optique physique*, Vol. 1, Victor Masson et fils, Paris, **1869**.
- [3] „On the Theory of Optical Images, with Special Reference to the Microscope“: Lord Rayleigh, *Philos. Mag.* **1896**, 42, 167–195.
- [4] „Die theoretische Grenze für die Leistungsfähigkeit der Mikroskope“: H. von Helmholtz, *Ann. Phys. Chem.* **1874**, 557–584 (Jubelband, J. C. Poggendorff gewidmet).
- [5] B. Alberts, et al., *Molecular Biology of the Cell*, 4th ed., Garland Science, New York, **2002**.

- [6] „The Fluorescent Toolbox for Assessing Protein Location and Function“: B. N. G. Giepmans, et al., *Science* **2006**, *312*, 217–224.
- [7] J. R. Lakowicz, *Principles of fluorescence spectroscopy*, Springer, New York, **2006**.
- [8] „Optical-detection and spectroscopy of single molecules in a solid“: W. E. Moerner, L. Kador, *Phys. Rev. Lett.* **1989**, *62*, 2535–2538.
- [9] „Single pentacene molecules detected by fluorescence excitation in a p-terphenyl crystal“: M. Orrit, J. Bernard, *Phys. Rev. Lett.* **1990**, *65*, 2716–2719.
- [10] M. Born, E. Wolf, *Principles of Optics*, 7th ed., Cambridge University Press, Cambridge, **2002**.
- [11] „Properties of a 4pi confocal fluorescence microscope“: S. Hell, E. H. K. Stelzer, *Opt. Soc. Am. J. A* **1992**, *9*, 2159–2166.
- [12] „Far-field fluorescence microscopy with three-dimensional resolution in the 100 nm range“: S. W. Hell, M. Schrader, H. T. M. Van der Voort, *J. Microsc.* **1997**, *187*, 1–7.
- [13] „Improvement of lateral resolution in far-field light microscopy using two-photon excitation with offset beams“: S. W. Hell, *Opt. Commun.* **1994**, *106*, 19–24.
- [14] R. Loudon, *The Quantum Theory of Light*, Oxford University Press, Oxford, **1983**.
- [15] „Breaking the diffraction resolution limit by stimulated emission: stimulated-emission-depletion fluorescence microscopy“: S. W. Hell, J. Wichmann, *Opt. Lett.* **1994**, *19*, 780–782.
- [16] „Subdiffraction resolution in far-field fluorescence microscopy“: T. A. Klar, S. W. Hell, *Opt. Lett.* **1999**, *24*, 954–956.
- [17] „Fluorescence microscopy with diffraction resolution barrier broken by stimulated emission“: T. A. Klar, et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2000**, *97*, 8206–8210.
- [18] „Macromolecular-scale resolution in biological fluorescence microscopy“: G. Donnert, et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2006**, *103*, 11440–11445.
- [19] „STED microscopy reveals that synaptotagmin remains clustered after synaptic vesicle exocytosis“: K. I. Willig, et al., *Nature* **2006**, *440*, 935–939.
- [20] „Video-Rate Far-Field Optical Nanoscopy Dissects Synaptic Vesicle Movement“: V. Westphal, et al., *Science* **2008**, *320*, 246–249.
- [21] „Nanoscopy in a living mouse brain“: S. Berning, et al., *Science* **2012**, *335*, 551.
- [22] „Focal spots of size $\lambda/23$ open up far-field fluorescence microscopy at 33 nm axial resolution“: M. Dyba, S. W. Hell, *Phys. Rev. Lett.* **2002**, *88*, 163901.
- [23] „Nanoscale Resolution in the Focal Plane of an Optical Microscope“: V. Westphal, S. W. Hell, *Phys. Rev. Lett.* **2005**, *94*, 143903.
- [24] „Efficient fluorescence inhibition patterns for RESOLFT microscopy“: J. Keller, A. Schoenle, S. W. Hell, *Opt. Express* **2007**, *15*, 3361–3371.
- [25] „Coaligned Dual-Channel STED Nanoscopy and Molecular Diffusion Analysis at 20 nm Resolution“: F. Göttfert, et al., *Biophys. J.* **2013**, *105*, L01–L03.
- [26] „Maturation-dependent HIV-1 surface protein redistribution revealed by fluorescence nanoscopy“: J. Chojnacki, et al., *Science* **2012**, *338*, 524–528.
- [27] „Nanoscopy of Filamentous Actin in Cortical Dendrites of a Living Mouse“: K. I. Willig, et al., *Biophys. J.* **2014**, *106*, L01–L03.
- [28] „Toward fluorescence nanoscopy“: S. W. Hell, *Nat. Biotechnol.* **2003**, *21*, 1347–1355.
- [29] „Strategy for far-field optical imaging and writing without diffraction limit“: S. W. Hell, *Phys. Lett. A* **2004**, *326*, 140–145.
- [30] „Far-Field Optical Nanoscopy“: S. W. Hell, *Science* **2007**, *316*, 1153–1158.
- [31] „Microscopy and its focal switch“: S. W. Hell, *Nat. Methods* **2009**, *6*, 24–32.
- [32] S. W. Hell, *Far-Field Optical Nanoscopy*, in *Single Molecule Spectroscopy in Chemistry, Physics and Biology* (Hrsg.: A. Gräslund, R. Rigler, J. Widengren), Springer, Berlin, **2009**, S. 365–398.
- [33] „STED microscopy reveals crystal colour centres with nanometric resolution“: E. Rittweger, et al., *Nat. Photonics* **2009**, *3*, 144–147.
- [34] „Solid Immersion Facilitates Fluorescence Microscopy with Nanometer Resolution and Sub-Angström Emitter Localization“: D. Wildanger, et al., *Adv. Mater.* **2012**, *24*, 309–313.
- [35] „Far-field fluorescence nanoscopy of diamond color centers by ground state depletion“: E. Rittweger, D. Wildanger, S. W. Hell, *Europhys. Lett.* **2009**, *86*, 14001.
- [36] „Three-Dimensional Stimulated Emission Depletion Microscopy of Nitrogen-Vacancy Centers in Diamond Using Continuous-Wave Light“: K. Y. Han, et al., *Nano Lett.* **2009**, *9*, 3323–3329.
- [37] „Defect center room-temperature quantum processors“: J. Wrachtrup, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2010**, *107*, 9479–9480.
- [38] „Processing quantum information in diamond“: J. Wrachtrup, F. Jelezko, *J. Phys. Condens. Matter* **2006**, *18*, S807–S824.
- [39] „Nanoscale magnetic sensing with an individual electronic spin in diamond“: J. R. Maze, et al., *Nature* **2008**, *455*, 644–647.
- [40] „Diffraction unlimited all-optical recording of electron spin resonances“: D. Wildanger, J. R. Maze, S. W. Hell, *Phys. Rev. Lett.* **2011**, *107*, 017601.
- [41] „Ground-state depletion fluorescence microscopy, a concept for breaking the diffraction resolution limit“: S. W. Hell, M. Kroug, *Appl. Phys. B* **1995**, *60*, 495–497.
- [42] „Breaking the Diffraction Barrier in Fluorescence Microscopy by Optical Shelving“: S. Bretschneider, C. Eggeling, S. W. Hell, *Phys. Rev. Lett.* **2007**, *98*, 218103.
- [43] „Fluorescence nanoscopy by ground-state depletion and single-molecule return“: J. Fölling, et al., *Nat. Methods* **2008**, *5*, 943–945.
- [44] „Breaking the diffraction barrier in fluorescence microscopy at low light intensities by using reversibly photoswitchable proteins“: M. Hofmann, et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2005**, *102*, 17565–17569.
- [45] „Diffraction-unlimited all-optical imaging and writing with a photochromic GFP“: T. Grotjohann, et al., *Nature* **2011**, *478*, 204–208.
- [46] „Concepts for nanoscale resolution in fluorescence microscopy“: S. W. Hell, M. Dyba, S. Jakobs, *Curr. Opin. Neurobiol.* **2004**, *14*, 599–609.
- [47] „Nanoscopy with more than 100,000 ‘doughnuts’“: A. Chmyrov, et al., *Nat. Methods* **2013**, *10*, 737–740.
- [48] „Imaging Intracellular Fluorescent Proteins at Nanometer Resolution“: E. Betzig, et al., *Science* **2006**, *313*, 1642–1645.
- [49] „On/off blinking and switching behaviour of single molecules of green fluorescent protein“: R. M. Dickson, et al., *Nature* **1997**, *388*, 355–358.
- [50] „Sub-diffraction-limit imaging by stochastic optical reconstruction microscopy (STORM)“: M. J. Rust, M. Bates, X. Zhuang, *Nat. Methods* **2006**, *3*, 793–795.
- [51] „Ultra-High Resolution Imaging by Fluorescence Photoactivation Localization Microscopy“: S. T. Hess, T. P. K. Girirajan, M. D. Mason, *Biophys. J.* **2006**, *91*, 4258–4272.
- [52] „Wide-field subdiffraction imaging by accumulated binding of diffusing probes“: A. Sharonov, R. M. Hochstrasser, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2006**, *103*, 18911–18916.

Eingegangen am 7. Mai 2015

Online veröffentlicht am 18. Juni 2015