

# Spektroskopie, Visualisierung und Photomanipulation einzelner Moleküle: die Grundlage für superhochauflösende Mikroskopie (Nobel-Aufsatz)\*\*

W. E. (William E.) Moerner\*

Einzelmolekülspektroskopie · Fluoreszenzmikroskopie  
· Photomanipulation · Superhochauflösung

Die ersten Schritte hin zur optischen Detektion und Spektroskopie einzelner Moleküle in kondensierter Materie folgten auf Tieftemperaturstudien inhomogen verbreiteter Absorptionsprofile molekularer Verunreinigungen in Festkörpern. Spektrale Charakteristika, die mit der Anzahl der Moleküle in Resonanz zusammenhingen, führten durch den Einsatz von frequenzmodulierter Laserspektroskopie zum Erreichen der Einzelmolekülgrenze im Jahr 1989. In den frühen 90er Jahren wurden zahlreiche faszinierende physikalische Effekte einzelner Moleküle entdeckt. Ihre Visualisierung, die Beobachtung spektraler Diffusion und optischer Schaltung sowie die Möglichkeit, verschiedene einzelne Moleküle im selben Fokusvolumen durch schlichtes Variieren der Frequenz des eingestrahlten Pumpasers auszuwählen, waren Wegbereiter für die spätere superhochauflösende Mikroskopie mit einzelnen Molekülen. Die Visualisierung individueller Kopien des grün fluoreszierenden Proteins förderte ebenfalls Erstaunliches zu Tage. Insbesondere ist hier das Blinken und die lichtinduzierte Schaltbarkeit zu nennen, welche die Entwicklung photoschaltbarer Proteine als Fluoreszenzmarkierungen anregten. Da sich jeder einzelne Fluorophor wie eine Lichtquelle von ungefähr 1 nm Größe verhält, ist die mikroskopische Beobachtung und Lokalisierung individueller Fluorophore eine Grundvoraussetzung für Abbildungen über die optische Beugungsgrenze hinaus. Die Kombination dieser Techniken mit aktiver Kontrolle der Anzahl emittierender Moleküle im Anregungsvolumen führte zur superhochauflösenden Mikroskopie von Eric Betzig und anderen. Im Folgenden werden die Voraussetzungen, die in diese Entdeckungen mündeten, dargestellt und gegenwärtige Entwicklungen zusammengefasst.

## 1. Die Anfänge

### 1.1. Einführung und frühe Inspirationen

Ich möchte dem Nobelkomitee für Chemie, der Königlichen Schwedischen Akademie der Wissenschaften und der Nobelstiftung dafür danken, dass sie mir in Anerkennung der Entwicklung der superhochauflösenden Fluoreszenzmikroskopie diesen Preis verleihen. Ich fühle mich geehrt, ihn mit zwei hochgeschätzten Kollegen zu teilen, Stefan Hell und Eric

Betzig. Meine wichtigsten Beiträge liegen in der ersten optischen Detektion und Spektroskopie einzelner Moleküle in kondensierter Materie,<sup>[1]</sup> in ihrer Visualisierung sowie in der Beobachtung des Blinkens und der Photokontrolle nicht nur einzelner Moleküle bei niedrigen Temperaturen in Festkörpern, sondern auch nützlicher Varianten des grün fluoreszierenden Proteins bei Raumtemperatur.<sup>[2]</sup> In diesem Vortrag will ich die Umstände nachvollziehen, die zu diesen Entdeckungen führten, und einen Teil der folgenden Entwicklungen beschreiben, die sich auf der ganzen Welt und in meinem Labor vollzogen.

In der Mitte der 80er Jahre zog ich viele meiner frühen Inspirationen aus den großartigen Entdeckungen, die rund um die Welt zur Detektion und wissenschaftlichen wie tech-

[\*] Prof. Dr. W. E. Moerner

Departments of Chemistry and (by Courtesy) of Applied Physics  
Stanford University, Stanford, California 94305 (USA)

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

nischen Erforschung einzelner Quantensysteme im Nanometerbereich führten. Darunter finden sich 1) die Spektroskopie einzelner Elektronen oder Ionen in elektromagnetischen Vakuumfallen,<sup>[3-5]</sup> 2) Rastertunnelmikroskopie (STM)<sup>[6]</sup> und Rasterkraftmikroskopie (AFM)<sup>[7]</sup> sowie 3) die Untersuchung von Ionenströmen einzelner Ionenkanäle in Membranen.<sup>[8]</sup> Aber warum sollte man nicht auch die optische Detektion und Spektroskopie einzelner Moleküle tief in einer komplexen, kondensierten Phasenumgebung und nicht im Vakuum versuchen, was Einzelmolekülspektroskopie (SMS) ermöglichen würde?

Nun, da gibt es ein Problem. Jahre zuvor stellte Erwin Schrödinger, der große theoretische Physiker und Mitbegründer der Quantenmechanik, fest:<sup>[9]</sup>

„Wir experimentieren niemals nur mit einem Elektron oder Atom oder Molekül. In Gedankenexperimenten nehmen wir manchmal an, dass wir das könnten; doch dies hat stets lächerliche Konsequenzen... Es ist nun einmal so, dass wir genauso wenig mit einzelnen Teilchen experimentieren, wie wir auch keine Ichthyosaurier im Zoo züchten können.“

Auch in den 80er Jahren dachten so noch viele. Zahlreiche Wissenschaftler glaubten, dass man, auch wenn beispielsweise das Erfassen einzelner Photoelektronen durch Photoionisierung eines Moleküls im Vakuum möglich sein könnte, niemals ein einzelnes Molekül in einer kondensierten Phase optisch detektieren werde. Aus diesem Grund ist der wichtigste Aspekt zu Beginn dieser Geschichte zu erklären, wie ich überhaupt zu der Überzeugung kam, dass genau dieses möglich ist.

## 1.2. Tieftemperaturspektroskopie von Molekülen in Festkörpern: inhomogene Linienverbreiterung

Um die ersten SMS-Experimente in den späten 80er Jahren darzustellen, müssen zunächst in aller Kürze einige Konzepte der hochauflösenden optischen Spektroskopie molekularer Verunreinigungen in Festkörpern betrachtet werden. In den Jahrzehnten um 1970 wurde in diesem Feld intensive Forschung betrieben, beispielsweise durch E. V. Shpol'skii, R. Personov oder K. K. Rebane. (Vollständige Literaturhinweise können an dieser Stelle nicht gegeben werden. Ich möchte aber für einen Übersichtsartikel, der viele Aspekte behandelt, auf Lit. [10a] verweisen.)

Betrachten wir zunächst das optische Absorptionsspektrum bei Raumtemperatur von Terrylenmolekülen, die in niedriger Konzentration (etwa  $10^{-6}$  mol/mol<sup>-1</sup>) im festen, durchsichtigen Wirtsmaterial *p*-Terphenyl (Abbildung 1) verteilt sind. Die Abbildung zeigt das optische Absorptionspektrum, ausgedrückt als optische Dichte der Probe gegen die Wellenlänge  $\lambda$  des einfallenden Lichts — also die Art Spektrum, wie man es von kommerziellen UV/Vis-Spektrometern kennt. Eine Farbskala verdeutlicht den Zusammenhang mit den Farben des sichtbaren Lichts. Kommen wir von den langen Wellenlängen auf der rechten Seite, findet dort keine Absorption statt. Wird jedoch  $\lambda$  kleiner (und damit nach  $E = hf$ , mit der Planckschen Konstante  $h$  und der Frequenz  $f$ , die Energie größer), absorbiert das Molekül schließlich Licht. Der Pfeil weist auf den ersten elektroni-

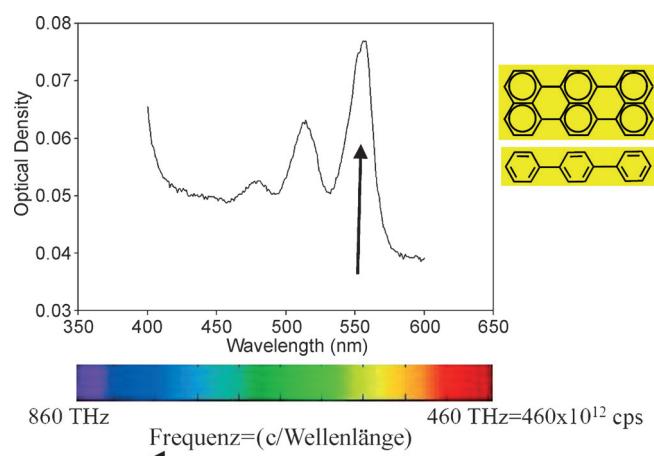
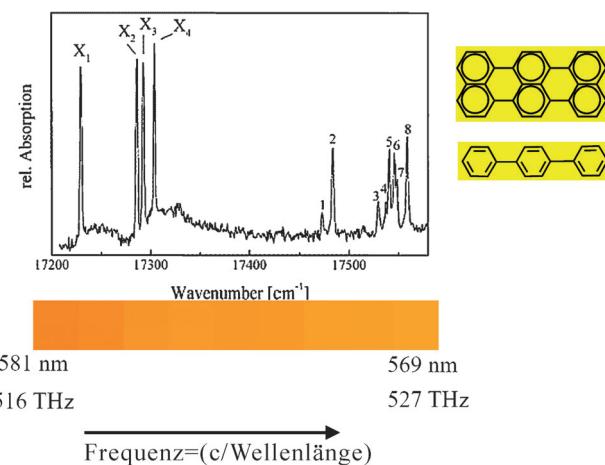


Abbildung 1. Spektrum (Absorption vs. Wellenlänge bzw. Farbe) von Terrylenmolekülen im festen Wirtsmaterial *p*-Terphenyl bei Raumtemperatur.

schen Übergang hin, welcher der Anregung eines Elektrons vom Grundzustand (höchstes besetztes Molekülorbital) in den ersten angeregten Zustand (niedrigstes unbesetztes Molekülorbital) entspricht. Die gezeigten Absorbtionen bei kürzeren Wellenlängen sind auf die Anregung zusätzlicher Schwingungen im Molekül zurückzuführen. Weil außerdem  $f$  und  $\lambda$  zueinander indirekt proportional sind ( $f = c/\lambda$  mit der Lichtgeschwindigkeit  $c$ ), erhöht sich die Frequenz nach links, da  $\lambda$  nach rechts ansteigt. Die Frequenzen sind an den Rändern des Graphs in Hundertfachen von THz ( $10^{12}$  Zyklen pro Sekunde) angegeben.

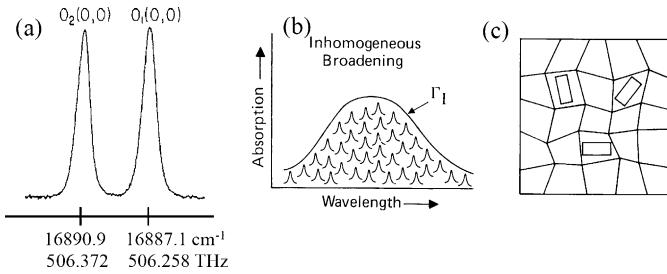
Terrylen (und andere ähnliche aromatische Kohlenwasserstoffe) ist ein vergleichsweise planares, starres Molekül, das durch die konjugierten  $\pi$ -Orbitale und die Bindungen, die durch die aromatischen Ringe aufgebaut werden, flach gehalten wird. Aus diesem Grund sind am ersten elektronischen Übergang keine großen Verformungen des Moleküls beteiligt, sondern wesentlich seine elektronischen Freiheitsgrade, was auch als minimale Franck-Condon-Verformung bezeichnet wird. Wir wollen nun die Probe auf sehr tiefe Temperaturen von nur wenigen Kelvin über dem absoluten Nullpunkt abkühlen (die Temperatur flüssigen Heliums) und die horizontale Skala um etwa den Faktor 25 expandieren. Spektroskopiker wechseln oft zwischen Wellenlängen und Frequenzen hin und her. In Abbildung 2 sind diesmal Frequenzen in der Einheit Wellenzahl oder inversen cm angegeben, die nach rechts ansteigen.  $1 \text{ cm}^{-1}$  entspricht etwa 30 GHz. Nur noch ein kleiner Bereich oranger Wellenlängen ist übrig. Bei so niedrigen Temperaturen können die Schwingungen des Moleküls nicht mehr thermisch angeregt werden, weshalb die erste elektronische Anregung jetzt äußerst schmal ist. Weiterhin sind die Schwingungen des Wirtsmaterials (Phononen) praktisch nicht mehr vorhanden – auch sie können nicht mehr zur Verbreiterung der optischen Absorption beitragen, und die gezeigte Linie wird zur Nullphononenlinie. Im *p*-Terphenyl-Wirtskristall gibt es vier unterschiedliche Einbaulagen für das Terrylenmolekül, also vier elektronischen „Ursprünge“  $X_1$ – $X_4$ , an denen die Struktur des Wirtskristalls recht verschieden ist. Die Absorptionslinien sind schmal genug ge-



**Abbildung 2.** Spektrum (Absorption vs. Frequenz, Wellenlänge bzw. Farbe) von Terrylenmolekülen im festen Wirtsmaterial *p*-Terphenyl bei tiefen Temperaturen (ca. 2 K). Aus Lit. [10b].

worden, um die verschiedenen Störungen, die von den vier unterschiedlichen Umgebungen stammen (eine Analogie wären lokale Druckunterschiede), beobachtbar zu machen.

Tatsächlich gibt das Spektrum in Abbildung 2 nicht den vollständigen Sachverhalt wieder, weil die Breite der Absorptionslinie für jede der vier Plätze noch weitaus schmäler ist als gezeigt. Darum begannen Spektroskopiker damit, schmalbandig auflösende Geräte wie Doppelmonochromatoren oder schließlich auf einzelne Frequenzen einstellbare Continuous-Wave(CW)-Laser als Lichtquelle zu verwenden, um die Absorptionslinie vollständig, also nicht durch den Versuchsaufbau beschränkt, aufzulösen. Aber eine weitere Überraschung wartete schon auf ihre Entdeckung. Abbildung 3a zeigt die Situation für Pentacen-Gastmoleküle in *p*-Terphenylkristallen bei 1.8 K, wie sie von Orlowski und Zewail im Jahr 1979 beschrieben wurde.<sup>[11]</sup> Man könnte erwarten, dass die Linienbreite nur etwa 10 MHz beträgt, was einer Linienbreite für molekulare Absorptions entspräche, die nur von der Lebenszeit des angeregten Zustandes begrenzt wird. Jedoch ist das Absorptionsprofil sehr viel weiter, etwa 0.7  $\text{cm}^{-1}$  oder ca. 21 GHz! Diese erhöhte Breite wurde als inhomogene Linienverbreiterung identifiziert, wie in Abbildung 3b. Die vielen verschiedenen Moleküle im Feststoff

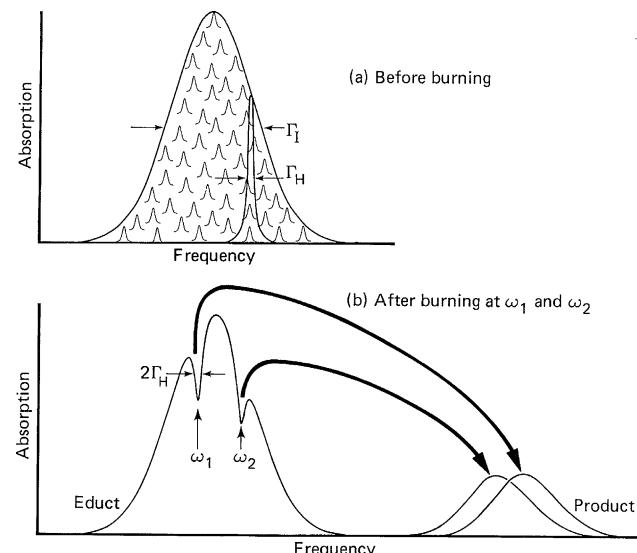


**Abbildung 3.** Inhomogene Linienverbreiterung in Festkörpern bei tiefen Temperaturen. a) Absorptionsspektrum von Pentacen in *p*-Terphenyl (0.09  $\text{cm}^{-1}$  Auflösung); aus Lit. [11]. b) Schematische Zeichnung des Effekts der inhomogenen Linienverbreiterung mit der Breite  $\Gamma_I$ . c) Schematische Zeichnung verschiedener lokaler Umgebungen, die zur inhomogenen Verbreiterung führen.

weisen intrinsisch schmale Linien auf (die sogenannte homogene Breite), aber das Linienprofil der Absorption aller Moleküle zusammen spiegelt die unterschiedlichen Zentren der Absorptionsfrequenzen einzelner Moleküle wider, die von ungleichen lokalen Umgebungen stammen (veranschaulicht in Abbildung 3b), was zur Streuung der Absorptionsenergien über einen weiten Bereich führt. Verschiedene Faktoren verursachen diese Störungen, unter anderem lokale Spannungen und Verschiebungen durch Fehler im Kristallgitter, andere Kristaldefekte oder möglicherweise auch lokale elektrische Felder. Zahlreiche theoretische Modelle wurden entwickelt, um den Mechanismus inhomogener Linienverbreiterung zu erklären.<sup>[12]</sup>

### 1.3. Das Umfeld bei IBM Research: spektrales Lochbrennen für optische Speicher

Ein Ziel hochauflösender Spektroskopie war es, die wahre homogene Linienbreite des Nullphononen-, also rein elektronischen Übergangs von Molekülen in Feststoffen ohne die Einflüsse inhomogener Linienverbreiterung zu messen. Aus diesem Grund waren viele Forschungsanstrengungen in den 70er und 80er Jahren Methoden wie Fluoreszenzlinienverschärfung (FLN)<sup>[13,14]</sup> und transienten Spektroskopien wie freiem Induktionsabfall, optischer Nutation oder Photonenechos gewidmet.<sup>[15-17]</sup> Alle diese Techniken waren vielseitig und hatten ihre Vor- und Nachteile. Aber es gab noch eine weitere Methode, um die homogene Breite unter bestimmten Umständen festzustellen, nämlich persistentes spektrales Lochbrennen, gezeigt in Abbildung 4. Dieser optische Effekt wurde in den 70er Jahren von zwei russischen Gruppen entdeckt: Zum einen von Gorokhovskii et al. an  $\text{H}_2$ -Phtaocyanin



**Abbildung 4.** Illustration des persistenten spektralen Lochbrennens in inhomogen verbreiterten Linien von Verunreinigungen in Festkörpern bei tiefen Temperaturen. a) Vor dem Lochbrennen weist die inhomogen verbreiterte Linie ein „glattes“ Absorptionsprofil auf. b) Werden in bestimmten Materialien ausgewählte Frequenzen durch einen schmalbandigen Laser angeregt, können spektrale Einschnitte oder „Löcher“ erzeugt werden.

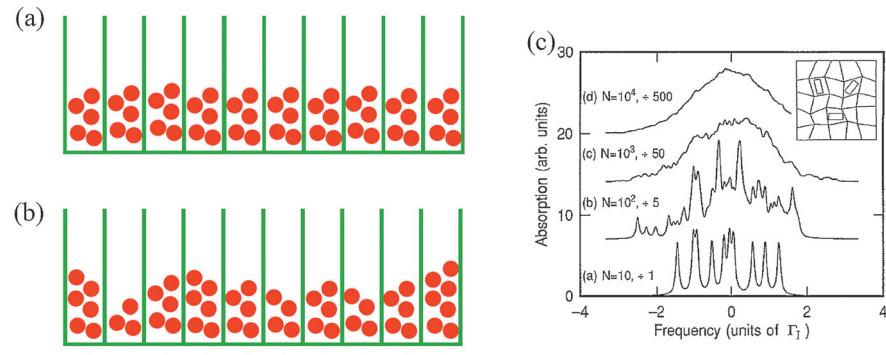
in einer Shpol'skii-Matrix,<sup>[18]</sup> zum anderen von Kharlamov et al. an Perylen und 9-Aminoacridin in glasartigem Ethanol.<sup>[19]</sup> Es zeigte sich, dass persistentes spektrales Lochbrennen ein relativ weitverbreiteter Effekt optischer Übergänge von Verunreinigungen in Feststoffen bei tiefen Temperaturen ist. Geht man von einer inhomogen verbreiterten Linie aus (Abbildung 4 oben), dann regt Bestrahlung mit einem schmalbandigen Laser nur eine Teilmenge von jenen Molekülen innerhalb einer homogenen Breite  $\Gamma_H$  an, die mit dem Laser resonant sind. Spektrales Lochbrennen tritt auf, wenn durch Licht verursachte physikalische oder chemische Veränderungen nur bei solchen Molekülen hervorgerufen werden, die sich in Resonanz mit dem Licht befinden, was diese Moleküle dann zu einer anderen Wellenlänge oder Frequenz verschiebt. Dies lässt im Absorptionsprofil aller Moleküle einen Einschnitt oder ein „spektrales Loch“ zurück, dessen Breite ungefähr  $2 \Gamma_H$  beträgt. Insbesondere erkannten die Wissenschaftler bei IBM Research, dass Lochbrennen für das optische Aufzeichnen von Information in der optischen Frequenzdomäne verwendet werden kann, darum die Bezeichnung „optisches Speichern in der Frequenzdomäne“. Eine detailliertere Darstellung des spektralen Lochbrennens findet sich in Lit. [21].

Im Jahre 1981 begann ich bei IBM Research zu arbeiten, einem der bedeutenden industriellen Forschungslabore, um Materialien und Mechanismen für Speichertechniken auf Basis des spektralen Lochbrennens zu entwickeln. Zu dieser Zeit konnte eine neue Idee mit möglichen Anwendungen in einem industriellen Forschungslabor detailliert untersucht werden — angefangen bei fundamentalen wissenschaftlichen Problemen über die Entwicklung der benötigten Materialien bis hin zur möglicherweise industriellen Umsetzung des Systems. Persistentes spektrales Lochbrennen war interessant, denn es versprach, viele Bits an Information am selben Ort in der optischen Frequenzdomäne zu speichern: Man muss nur wählen, ob man ein Loch in das inhomogen verbreiterte Linienprofil schreibt oder nicht. Da für eine ganze Reihe von Systemen das Verhältnis  $\Gamma_l/\Gamma_H$  bei tiefen Temperaturen Werte von 1000 oder mehr aufwies, sah man einen gewaltigen Anstieg der optischen Speicherdichte in Reichweite. Die Mechanismen dieses Prozesses können photochemisch,<sup>[22]</sup> wobei das Licht eine photochemische Veränderung hervorruft, oder photophysikalisch (nicht-photochemisch) sein, wobei nur das Zwei-Niveau-System des räumlich nahen Gastmaterials verändert werden muss.<sup>[23,24]</sup> Große Anstrengungen wurden unternommen, um neue Materialtypen zu entwickeln. Leider machte die Notwendigkeit tiefer Temperaturen und die enorme Leistungssteigerung magnetischer Speichereinheiten schließlich die Hoffnungen auf eine praktische Anwendung dieser Idee zunichte, obwohl Untersuchungen zur Signalverarbeitung durch Mikrowellen<sup>[25]</sup> nach wie vor auf den Effekt des Lochbrennens zurückgreifen.

#### 1.4. Statistische Feinstruktur inhomogen verbreiteter Linien

Glücklicherweise war es bei IBM auch wichtig, die grundlegenden Beschränkungen neuer Techniken für optische Speicher zu untersuchen. Das interessierte mich ganz besonders. Im Jahre 1985 arbeitete ich mit Marc Levenson an den Defiziten des Einphotonen- oder linearen Lochbrennens.<sup>[26]</sup> Werden spektrale Löcher mit immer höherer Geschwindigkeit geschrieben, verringert sich die Tiefe des Lochs immer weiter, bis es schließlich nur noch einen Bruchteil der ursprünglichen Tiefe erreicht, die der Ein-Zyklus-Quanteneffizienz des Brennens eines spektralen Loches entspricht. Wir bemerkten, dass neben Shot Noise, das von Poisson-Fluktuationen des einfallenden Lichts stammt, eine besonders faszinierende Limitierung des Signal-Rausch-Verhältnisses eines spektralen Lochs durch die endliche Anzahl von Molekülen, die zum Absorptionsprofil in der Nähe des Lochs beitragen, verursacht werden könnte. Es stellte sich die Frage: Gibt es eine feststehende spektrale Rauheit an der inhomogenen Linie, die von der *statistisch fluktuierenden Anzahl oder der diskreten Natur einzelner Moleküle* herrührt? Dies würde die endgültige Grenze des schmalsten noch detektierbaren spektralen Lochs definieren. Die zugrundeliegende Idee wird in Abbildung 5 anhand vertrauter Überlegungen zur Wahrscheinlichkeit veranschaulicht. Nehmen wir an, dass 50 Kugeln zufällig in 10 Gefäße geworfen werden. Dann ist es ziemlich unwahrscheinlich, dass genau 5 Bälle in jedem Gefäß landen (Abbildung 5a). Ein weitaus wahrscheinlicherer Ausgang ist in Abbildung 5b gezeigt: Die Anzahl an Kugeln pro Gefäß wird durchschnittlich 5 betragen, aber die tatsächliche Anzahl in einem einzelnen Gefäß wird über und unter diesen Wert verteilt sein. Das ist der bekannte Effekt der Streuung um den Mittelwert, äquivalent zur Größe des Standardfehlers, wobei das quadratische Mittel der Fluktuationen um den Durchschnitt  $\sqrt{N}$  beträgt (im Beispiel  $\sqrt{5}$ ).  $N$  bezeichnet die durchschnittliche Anzahl. Der zentrale Grenzwertsatz gilt hier, weil die Moleküle als unabhängig angenommen werden.

Um zu erkennen, wie diese Idee mit hochauflösender Spektroskopie inhomogen verbreiteter Linien bei tiefer Temperatur verwandt ist, denken wir uns die horizontale



**Abbildung 5.** Illustration der Streuung von Zahlen in der Stochastik und der Spektroskopie. a) Ein unwahrscheinliches Ergebnis, wenn 50 Kugeln in 10 Behälter geworfen werden. b) Ein wahrscheinlicherer Ausgang. c) Simulation einer inhomogen verbreiterten Linie in einer Probe. Es wird angenommen, dass die Moleküle ihre Absorptionsfrequenz nach einer gleichmäßigen Gauß-Verteilung auswählen.

Achse einfach als optische Frequenz (oder Wellenlänge) und stellen uns vor, dass  $\Gamma_1$  sehr groß ist, sodass die inhomogene Linie im Maßstab der Seite lokal als flach erscheint. Jede Box ist dann ein Gefäß mit der homogenen Linienbreite einer optischen Absorption  $\Gamma_H$ . Die Moleküle wählen sich Frequenzen, wenn die Probe auf eine zufällige Art hergestellt wird. Das resultierende Spektrum sollte eine *spektrale Rauheit* oder eine *Feinstruktur* aufweisen, die mit  $\sqrt{N}$  skaliert und durch die diskrete Natur individueller Moleküle verursacht wird! Dies wird auch an der Simulation in Abbildung 5c deutlich, bei der eine (vollkommen glatte) Gauß-Kurve für die Wahrscheinlichkeit angenommen wurde, mit der Moleküle eine bestimmte Resonanzfrequenz annehmen. Bei einer sehr kleinen Anzahl an Molekülen ist die Streuung der Absorption eindeutig. Steigt die Konzentration immer weiter, scheint sich der Effekt zu nivellieren, wie es wahrscheinlich auch für die frühen Spektren von Pentacen in *p*-Terphenyl

(Abbildung 3a)<sup>[11]</sup> der Fall war. (Zusätzlich war die spektrale Auflösung der ersten Experimente zu niedrig, um diesen Effekt beobachten zu können.) Man muss hier unbedingt anmerken, dass der Effekt nicht „Rauschen“ ist, worunter man gemeinhin zeitabhängige interferierende Fluktuationen versteht, sondern eher eine feststehende Variation der Absorption gegen die Wellenlänge bzw. optische Frequenz. Wir nannten diesen Effekt „statistische Feinstruktur“ (SFS). Es ist wichtig zu erkennen, dass sich die *relative* Größe der SFS mit höheren Konzentrationen entsprechend  $(1/\sqrt{N_H})$  verringert, während das absolute quadratische Mittel der Feinstruktur mit  $\sqrt{N_H}$  ansteigt. Überraschenderweise wurde die Beobachtung von SFS vor den späten 80ern nicht berichtet — ein erstes Ziel war also erreicht.

Im Jahre 1987 beobachteten mein Postdoc Tom Carter und ich SFS zum ersten Mal.<sup>[27,28]</sup> Dazu verwendeten wir eine mächtige Zero-Background-Absorptionstechnik, nämlich die weiter unten besprochene Laser-Frequenzmodulations-Spektroskopie (Laser-FM-Spektroskopie).<sup>[29,30]</sup> Die Wahl der Probe war sehr wichtig — wir versuchten viele Monate lang, den Effekt an Perylenmolekülen als Verunreinigung in einem dünnen Film von Polyvinylchlorid zu erfassen, aber wann immer wir das Spektrum aufnahmen und in ihm ein Anzeichen der Struktur sahen, hatte es sich beim nächsten Scan verändert! Dies lag am Probenlaser, der bei diesem System photophysikalisches Lochbrennen induzierte. Schließlich, verzweifelt auf der Suche nach einem System ohne Lochbrennen, bat ich Michael Fayer in Stanford um Rat, der Pentacen als Verunreinigung in einem *p*-Terphenylkristall vorschlug (Abbildung 6, links). An einem Wochenende schmolz ich also einfach etwas *p*-Terphenyl mit einem winzigen Körnchen Pentacen zwischen zwei Glasplättchen auf einer Heizplatte, legte das ganze in den Kryostaten, und wir

## Statistische Feinstruktur in einer inhomogen verbreiterten Linie

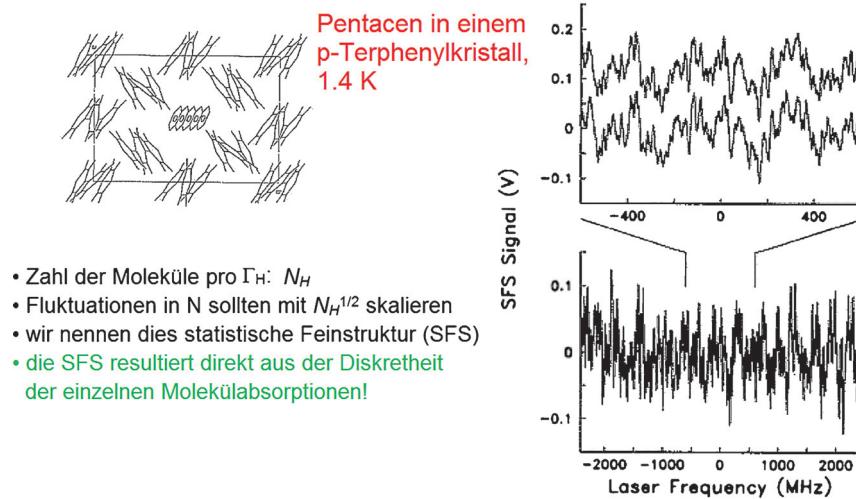


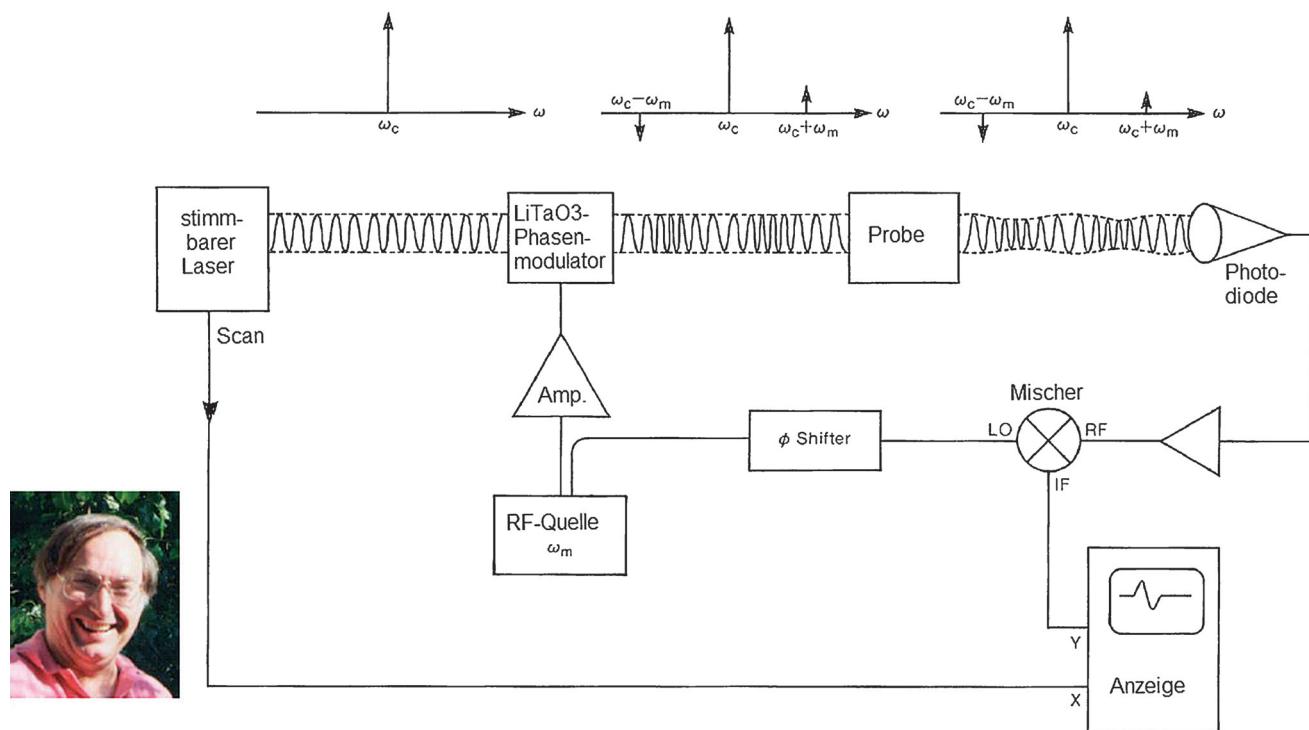
Abbildung 6. Beobachtung der statistischen Feinstruktur (SFS) (rechts) für Pentacen in *p*-Terphenyl. Photo: Tom Carter. Aus Lit. [28].

sahen sofort das SFS-Signal! Abbildung 6 rechts zeigt einen schmalen, 5 GHz umfassenden Ausschnitt des O<sub>1</sub>-Bereichs der inhomogenen Linie, zentriert bei etwa 506 THz. SFS ist eine großartige spektrale Struktur, die wundervoll reproduzierbar immer wieder auftritt, wenn die Aufnahme des Spektrums wiederholt wird (oberes Bild). SFS ist sicherlich insofern ein ungewöhnlicher Effekt, weil er nicht von der Gesamtzahl resonanter Moleküle, sondern von der Quadratwurzel dieser Anzahl abhängt, und dass er unmittelbar von der diskreten Natur einzelner Moleküle stammt. (Es zeigte sich, dass Lochbrennen auch im neuen System nicht vollständig unterblieb, aber sehr viel unwahrscheinlicher war — durch verlängerte Laseranregung konnten spektrale Löcher direkt in die SFS gebrannt werden.)

## 2. Detektion, Spektroskopie und Visualisierung einzelner Moleküle bei tiefen Temperaturen

### 2.1. FMS und ein Skalierungsargument führen zur ersten Detektion und Spektroskopie einzelner Moleküle in kondensierten Phasen

Der andere zentrale Teil des SFS-Experiments war die ultrasensitive Detektionsmethode, Laser-FM-Spektroskopie (Laser-FMS).<sup>[29,31]</sup> Gary C. Bjorklund erfand FMS bei IBM im Jahr 1980. Er lehrte mich diese Technik, sodass ich in der Lage war, sie für die Detektion spektraler Löcher einzusetzen. Wie in Abbildung 7 gezeigt, passiert ein Einzelfrequenzlaser, der auf die Frequenz  $\omega_C$  eingestellt wurde, einen elektro-optischen Phasenmodulator und erfährt dadurch eine Frequenzmodulation mit einer hochfrequenten Modulationsfrequenz  $\omega_M$ , die gewöhnlich im Bereich von 100 MHz liegt. Wie ab-



**Abbildung 7.** Laser-Frequenzmodulations-Spektroskopie zur Detektion schwacher Absorptions- und Dispersionssignale. Photo: Gary C. Bjorklund. Aus Lit. [33].

gebildet, tauchen in der Frequenzdomäne zwei Seitenbanden auf. Diese sind phasenverschoben. Werden sie durch die Probe nicht beeinflusst, erzeugt ein schneller Detektor, der natürlich die Hüllkurve der Lichtwelle misst, kein Signal bei  $\omega_m$ . Weist die Probe hingegen ein enges spektrales Merkmal auf (eng auf der Skala von  $\omega_m$ ), führt das Ungleichgewicht der Laserseitenbanden zu einer Amplitudenmodulation des detektierten Photostroms bei  $\omega_m$ , die im Wesentlichen durch hochfrequente Lock-in-Techniken erfasst wird. Mit andern Worten: Die Probe wandelt den frequenzmodulierten Lichtstrahl in einen amplitudenmodulierten Lichtstrahl um, wenn eine enges spektrales Merkmal vorhanden ist. Das ganze Experiment verhält sich in etwa wie ein FM-Radio bei 506 THz, wenn auch mit einem niedrigen Modulationsindex. Ein wichtiges Merkmal von FMS ist, dass es nur die Abweichungen der Absorption vom Durchschnittswert erfasst, genauer: Das Signal ist proportional zu  $\alpha(\omega_c + \omega_m) - \alpha(\omega_c - \omega_m)$ , wobei  $\alpha$  der Absorptionskoeffizient ist. Das ist der Hauptgrund, weshalb die Detektion von SFS mit dieser Technik leicht bewerkstelligt werden konnte: Es gab keine Veranlassung, mit großem Aufwand eine Probe mit unangenehm niedrigen Konzentrationen anzufertigen, um SFS zu beobachten, weil das SFS-Signal, das durch FMS gemessen wird, mit steigender Konzentration anwächst!

Mit der Gewissheit, dass die Detektion von SFS möglich ist, durfte ich nun hoffen, dass dies auch für die Detektion einzelner Moleküle zutrifft. Diese wichtige Konsequenz ist durch ein simples Skalierungsargument einsichtig: Wenn eine SFS, die durch ungefähr 1000 Moleküle verursacht wird, detektierbar ist (wie es ungefähr in Abbildung 6 der Fall ist), dann bedeutet dies, dass das gemessene FMS-Signal (Amplitude des quadratischen Mittelwerts) von der gleichen

Größe wie ungefähr 32 Moleküle ist (d.h.  $(1000)^{1/2}$ ). Das jedoch bedeutet wiederum, dass man zur Verbesserung des Signal-Rausch-Verhältnisses (SNR) nur 32-mal härter arbeiten muss, um ein einzelnes Molekül zu beobachten, und nicht etwa 1000-mal! Diese Einsicht, zusammen mit zwei weiteren Tatsachen – nämlich erstens, dass die FM-Absorptionsspektroskopie unempfindlich gegen jede Art von Hintergrund durch Rayleigh- oder Raman-Streuung aus imperfekten Proben war, und zweitens, dass FMS quantenbegrenzte Detektionsempfindlichkeit ermöglicht –, brachten mich und meinen Postdoc Lothar Kador dazu, FM-Spektroskopie bis ans Einzelmoleküllimit zu treiben. Hinzu kommt, dass das System Pentacen in *p*-Terphenyl aufgrund seiner besonders niedrigen Quanteneffizienz hinsichtlich spektralen Lochbrennens eine hervorragende Wahl für Einzelmoleküldetektion darstellte.

Die ersten SMS-Experimente im Jahr 1989 verwendeten eine von zwei leistungsfähigen Doppelmodulations-FMS-Absorptionstechniken: Laser-FMS mit Stark-Sekundärmodulation (FM-Stark) oder FMS mit Ultraschall-Strain-Sekundärmodulation (FM-US).<sup>[1,32]</sup> Sekundärmodulation ist erforderlich, um den Effekt noch vorhandener Amplitudenmodulation zu entfernen, die durch den mangelhaften Phasenmodulator erzeugt wird.<sup>[33]</sup> Abbildung 8, insbesondere Spur d, führt Beispiele für optische Absorptionsspektren eines einzelnen Pentacenmoleküls in *p*-Terphenyl an, die mit der FM-Stark-Methode aufgenommen wurden. Das Zentrum der Laserfrequenz wurde dabei schlicht auf die Flanken der inhomogen verbreiterten Linie eingestellt, um den Konzentrationsbereich einzelner Moleküle auszuwählen, ohne eine neue Probe mit verringrigerer Dotierung herstellen zu müssen.

Optical Detection and Spectroscopy of Single Molecules in a Solid

W. E. Moerner and L. Kador<sup>(a)</sup>

IBM Research Division, Almaden Research Center, San Jose, California 95120

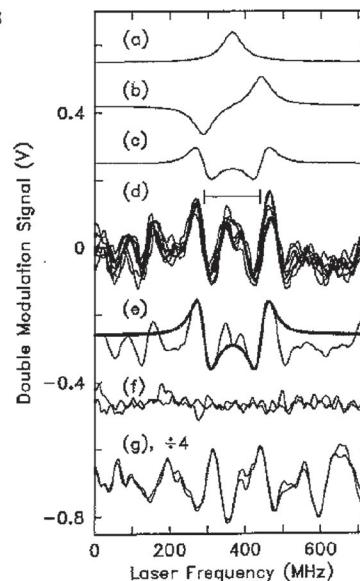
(Received 17 March 1989)



- Pentacen in kristallinem *p*-Terphenyl, 1.8 K, 593 nm
- Laser-FM-Absorptionsspektroskopie mit Stark- (E-Feld) oder Ultraschall-Strain-Sekundärmodulation
- unempfindlich gegen Streulicht von der Probe
- eingeschränkt durch Shot Noise (sowie außerhalb des Fokus befindliche Moleküle aufgrund der relativ dicken Kristallschnitte)
- Herausforderung: Intensität des fokussierten Lasers war niedrig zu halten
- Machbarkeitsnachweis: einzelne Moleküle können optisch detektiert werden; Pentacen/*p*-Terphenyl ist ein nützliches Modellsystem



Wie ein FM-Radio bei 506 THz!



**Abbildung 8.** Erste optische Detektion und Spektroskopie einzelner Moleküle in kondensierter Materie. a–c) Ausbildung der erwarteten Linienform bei der FM-Stark-Spektroskopie. d) Wiederholte aufgenommene Spektren zeigen ein einzelnes Molekül bei 592.423 nm. e) Gemittelte Spektren im Vergleich zur Linienform. f) Weit in den Flanken der Linie findet sich kein Molekül. g) Näher am Zentrum der Linie: SFS. Photo: Lothar Kador. Aus Lit. [1].

Obwohl diese frühen Beobachtungen und ähnliche Ergebnisse, gewonnen durch die FM-US-Methode, nützlich waren, weil sie viele weitere Arbeiten anregten, gab es eine wichtige Eigenschaft von FM-basierten Techniken, die ihren Einsatz für SMS-Experimente prinzipiell einschränkte. Wie in den ersten Publikationen zu FMS gezeigt wurde,<sup>[29,31]</sup> können bei Mittelung über ein Zeitfenster von 1 s sehr kleine Absorptionsmerkmale mit einer relativen Größe bis zu  $10^{-7}$  erfasst werden. Dies trifft jedoch nur zu, wenn große Laserleistungen im Bereich einiger mW am Detektor ankommen, damit der Shot Noise der Photonen unter den Johnson-Noise des Detektors gezwungen wird. Der Laserstrahl bei SMS-Experimenten muss jedoch auf einen kleinen Bereich fokussiert werden, um die Wahrscheinlichkeit eines optischen Übergangs zu maximieren. Deshalb ist es notwendig, die Laserleistung unterhalb des kritischen Wertes zu halten, bei dem Sättigungsverbreiterung der Linienform des einzelnen Moleküls eintritt. Dies aber ist für so schmale Linien bei tiefen Temperaturen schwer zu erreichen. Die Daten, die Abbildung 8 zugrundeliegen, mussten deshalb mit Laserleistungen gesammelt werden, bei denen weniger als 100  $\mu$ W am Detektor ankamen. Darin liegt einer der beiden Gründe für das Signal-Rausch-Verhältnis von nur ca. 5. (Der andere Grund war die Verwendung relativ dicker, geschnittener Proben, die zu einer Menge von schwächer emittierenden Molekülen außerhalb des Fokus im untersuchten Volumen führten. Dieses Problem war in der Folge leichter zu lösen.) In späteren Experimenten, die Lothar durchführte,<sup>[34]</sup> rief ein oszillierendes elektrisches Stark-Feld die Frequenzmodulation der Absorptionslinie selbst (und nicht des Lasers) hervor.

Diese Methode wurde auch verwendet, um die Absorption einzelner Moleküle bei der Temperatur flüssigen Heliums zu detektieren. Obwohl diese Transmissionsmethoden erfolgreich waren, bestand ihre hauptsächliche Einschränkung im Quanten-Shot-Noise des Laserstrahls: Bei niedrigen Laserintensitäten, wie sie zur Vermeidung von Sättigung notwendig sind, ist dieses vergleichsweise hoch.

## 2.2. Ein Meilenstein: Detektion der Absorption eines einzelnen Moleküls durch Fluoreszenz

In der Tat wiesen die optischen Absorptionsexperimente mit Pentacen in *p*-Terphenyl nach, dass dieses Material ausreichend ineffizientes spektrales Lochbrennen aufweist, um es als Modellsystem für Einzelmoleküluntersuchungen einzusetzen. Im Jahr 1990 zeigten Michel Orrit und Jacky Bernard, dass das Erfassen der optischen Absorption durch Detektion der emittierten Fluoreszenz zu einem besseren Signal-Rausch-Verhältnis führt, sofern die Emission effizient gesammelt und der Einfluss von Streuung minimiert wird.<sup>[35]</sup> Aufgrund des vergleichsweise einfachen Versuchsaufbaus verwendeten die folgenden Experimente fast ausschließlich diese Technik, die auch Fluoreszenzanregungsspektroskopie genannt wird. Sie ist eine Anwendung laserinduzierter Fluoreszenz in der Gasphase, die im Jahr 1968 von R. N. Zare an Festkörpern eingeführt wurde.<sup>[36]</sup> Bei der Fluoreszenzanregungsspektroskopie tastet ein einstellbarer, schmalbandiger Einzelfrequenzlaser das Absorptionsprofil des einzelnen Moleküls ab. Die Absorption wird durch Messung von



VOLUME 65, NUMBER 21

PHYSICAL REVIEW LETTERS

19 NOVEMBER 1990

Single Pentacene Molecules Detected by Fluorescence Excitation in a *p*-Terphenyl Crystal

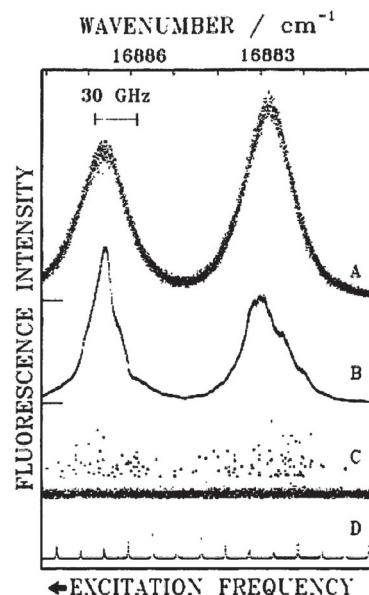
M. Orrit and J. Bernard

Centre de Physique Moléculaire Optique et Hertzienne, Centre National de la Recherche Scientifique et Université de Bordeaux I,  
351, Cours de la Libération, F-33405 Talence CEDEX, France

(Received 9 July 1990)



- verwendete das Pentacen/*p*-Terphenyl-Modellsystem
- detektierte die Absorption durch Messung der emittierten Fluoreszenz
- sensitiv gegen Rayleigh- und Raman-Streulicht von der Probe, weshalb sorgfältiges Probenwachstum erforderlich war – kristallklar sublimierte Schuppen
- erzeugte höheres Signal-Rausch-Verhältnis bei gleicher Bandweite



**Abbildung 9.** Detektion und Absorptionsspektroskopie einzelner Moleküle durch Aufzeichnen der emittierten Fluoreszenz. A, B) Die inhomogen verbreiterte Linie. C) Bei sehr niedriger Konzentration zeigen die Punkte den Anstieg der Emission an, wenn einzelne Moleküle in Resonanz mit dem einstellbaren Laser treten. Photo: Michel Orrit. Aus Lit. [35].

Fluoreszenz in Richtung längerer Wellenlängen, weg von der Wellenlänge des Lasers, detektiert (Abbildung 9). Häufig wird die Verwendung dieser Methode durch Hintergrundrauschen eingeschränkt, und sie erfordert weiterhin den Einsatz sehr dünner, makeloser Proben, um jedes Streusignal des *p*-Terphenylkristalls zu unterdrücken. Andererseits krankt sie aber nicht, wie FMS, am problematischen Kompromiss zwischen Signal-Rausch-Verhältnis und optischer Verbreiterung. Darin bestand einer der Hauptvorteile der Einzelmolekülspektroskopie. Könnte es einen vierten Nobelpreisträger geben, sollte es Michel Orrit sein.

Da nun die Möglichkeit bestand, einzelne Moleküle in Kristallen und Polymeren zu detektieren, sprangen Anfang der 90er Jahre zahlreiche Forscher in der ganzen Welt auf den Zug auf, um den Vorteil der äußerst engen optischen Absorptionslinien und den Wegfall der Ensemblemittelung auszunutzen, worin die beiden wichtigsten Anreize zur Untersuchung einzelner Moleküle bestanden. Manchmal wurden die Experimente gezielt auf spezifische Fragestellungen ausgerichtet, etwa den Stark-Effekt,<sup>[37]</sup> die Dynamik von Zweiniveausystemen<sup>[38]</sup> oder Polarisationseffekte,<sup>[39]</sup> um nur einige zu nennen. Manchmal wurden Experimente aber auch schlicht durchgeführt, um zu beobachten, denn Überraschungen sind zu erwarten, wenn ein neues Gebiet zum ersten Mal beschritten wird. Die vielen Forschungsergebnisse können hier nicht erschöpfend behandelt werden, weshalb der Leser auf ausgewählte Publikationen<sup>[21,40]</sup> und Übersichtsartikel<sup>[41-47]</sup> verwiesen sei. Meine talentierten Postdocs und Kooperationspartner führten ein breites Spektrum von

Experimenten durch, unter anderem zur lebenszeitbegrenzten Linienbreite, zu temperaturabhängigen Phasenverschiebungen und optischen Sättigungseffekten,<sup>[48,49]</sup> zum Photonen-Antibunching,<sup>[50]</sup> zur Vibrationsspektroskopie,<sup>[51-53]</sup> zur Magnetresonanz eines einzelnen molekularen Spins<sup>[54]</sup> sowie zur Nahfeld-Spektroskopie.<sup>[55]</sup> Einige dieser Experimente sind besonders relevant für die superhochauflösende Mikroskopie und werden im Folgenden diskutiert.

### 2.3. Spektroskopie und Visualisierung einzelner Moleküle

Mit der Einzelmolekülsensitivität, die in den frühen 90er Jahren Einzug hielt, ging auch ein detaillierteres Verständnis der inhomogenen Linienverbreiterung einher. Abbildung 10a zeigt ein Spektrum des inhomogen verbreiterten optischen Absorptionsspektrums von Pentacene in *p*-Terphenyl — man vergleiche Abbildung 3a. Während nahe des Zentrums der Linie bei 592.321 nm (0 GHz) die Moleküle überlappen, werden einzelne, isolierte Lorentz-Profilen an den Flanken der Linie beobachtet, wenn jedes der Moleküle der Reihe nach mit dem einstellbaren Laser in Resonanz tritt. Die Situation lässt sich gut mit der Suche nach einem Sender vergleichen, wenn Sie weit von großen Städten entfernt sind: Sie drehen und drehen am Rad Ihres AM-Radios und empfangen die meiste Zeit nur statisches Rauschen. Aber dann sind Sie endlich bei einer Frequenz in Resonanz mit einer Radiostation angekommen: Über dem Rauschen erhebt sich ein Signal. Natürlich können bei Verwendung einer niedriger

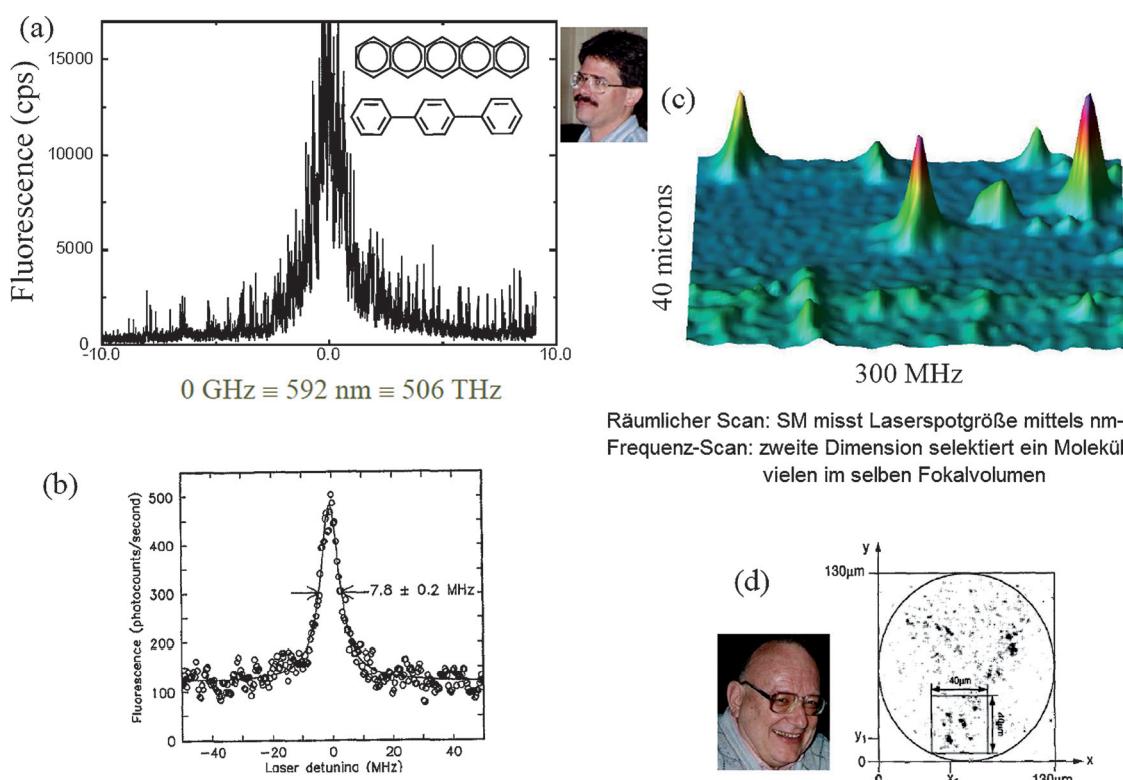


Abbildung 10. a, b) Einzelmolekülspektroskopie und c, d) Einzelmolekülbildgebung. Photos: W. Pat Ambrose (oben), Urs P. Wild (unten). Aus Lit. [49] (a), [56] (b), [48] (c) und [58] (d).

konzentrierten Probe auch einzelne Moleküle im Zentrum der Linie untersucht werden. Nur in dieser Gegend ist das Linienprofil eine Gauß-Kurve. Ein wenig weiter vom Zentrum entfernt finden sich deutliche Flanken, die nicht einer Gauß-Kurve entsprechen. Diese großartigen Spektren legten das Fundament der frühen Experimente. Beispielsweise wurde bei niedrigen Pumpintensitäten die lebenszeitbegrenzte homogene Linienweite von  $7.8 \pm 0.2$  MHz direkt beobachtet (Abbildung 10b).<sup>[56]</sup> Diese stellt den maximalen Wert dar, der durch die Lebenszeit des angeregten  $S_1$ -Zustandes von 24 ns erlaubt ist, wobei hervorragende Übereinstimmung mit früheren Photonenechoexperimenten an großen Ensembles festgestellt wurde.<sup>[15,57]</sup> So enge Absorptionslinien einzelner Moleküle sind eine wunderbare Spielwiese für Spektroskopiker: Weil die schmalen Linien deutlich empfindlicher auf Störungen reagieren als breite spektrale Merkmale, können viele detaillierte Untersuchungen der lokalen Umgebung durchgeführt werden.

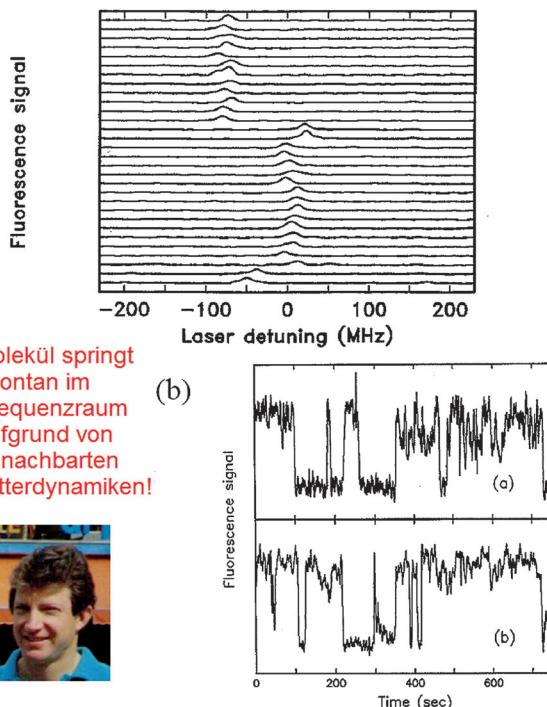
In meinem Labor ging Pat Ambrose über rein spektroskopische Studien hinaus und nahm ein Hybridbild eines einzelnen Moleküls auf, indem er Spektren als Funktion des Laserfokus auf der Probe aufnahm.<sup>[48]</sup> Das räumliche Abtasten folgte dem Prinzip konfokaler Mikroskopie, bei der der Fokus des Lasers über die Probe gerastert wird. Abbildung 10c zeigt ein solches dreidimensionales „Pseudobild“ einzelner Pentacenmoleküle in *p*-Terphenyl. Die  $z$ -Achse ist dabei das rotverschobene Emissionssignal, die horizontale Achse ist die Verstimmung des Lasers (in der Größenordnung von 300 MHz), und die Achse, die in das Papier hinein zeigt, ist eine transversale räumliche Dimension, die durch das

Rastern des Laserfokus abgetastet wurde (in der Größenordnung von 40  $\mu\text{m}$ ). Die spektralen Eigenschaften sind in der Frequenzdomäne vollständig aufgelöst, weil die Linienbreite des Lasers mit etwa 3 MHz schmäler ist als die Linienbreite des Moleküls. Betrachtet man jedoch die räumliche Auflösung des Bildes, dann stellt das einzelne Molekül letztlich eine genau lokalisierte Nanosonde für den Durchmesser des Laserstrahls selbst dar. Dieser beträgt hier ca. 5  $\mu\text{m}$ , was an der niedrigen Qualität des Fokus liegt, den die Linsen in flüssigem Helium erzeugen.<sup>[48]</sup> Das Molekül kann also als nanometergroße Sonde für den Fokus angesehen werden, was gleichbedeutend mit der Vermessung der Point-Spread-Function (PSF) des Aufbaus ist. Damit ist dieses Experiment das erste Beispiel für das räumliche Bild der PSF eines einzelnen Moleküls, was weiter unten noch genauer beleuchtet werden wird. Wenig später nahmen Wild und Mitarbeiter in der Schweiz<sup>[58]</sup> erfolgreich zweidimensionale Bilder eines einzelnen Emitters auf, wie in Abbildung 10d gezeigt.

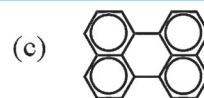
#### 2.4. Überraschungen – spektrale Diffusion und optische Kontrolle

Im Verlauf der frühen SMS-Untersuchungen an Pentacen in *p*-Terphenyl trat ein unerwartetes Phänomen auf: Verschiebungen der Resonanzfrequenz einzelner Pentacenmoleküle im Kristall bei 1.5 K,<sup>[48,56]</sup> was zuvor schon kurz erwähnt wurde.<sup>[35]</sup> Wir nannten diesen Effekt „spektrale Diffusion“, weil er eng mit ähnlichen spektralen Verschiebungen verwandt war, die schon früh für optische Übergänge von Verunreinigungen in amorphen Systemen postuliert

## Einige der Überraschungen aus Einzelmolekülmessungen!

(a) spektrale Diffusion, Pentacen in *p*-Terphenyl

Moleköl springt spontan im Frequenzraum aufgrund von benachbarten Gitterdynamiken!



in  $(\text{CH}_2\text{CH}_2)_n$



optisch induzierte spektrale Verschiebungen!  
Poisson-Kinetik wird beobachtet

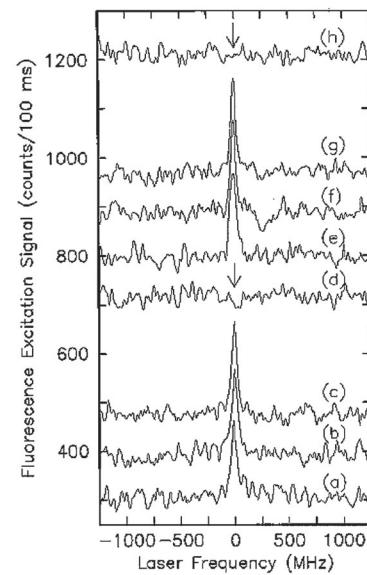


Abbildung 11. a, b) Spektrale Diffusion und c) lichtinduzierte spektrale Verschiebungen. Aus Lit. [48, 56, 64], Photos: Jim Skinner (links), Thomas Basché (rechts).

wurden.<sup>[59]</sup> Spektrale Diffusion bedeutet hier, dass sich das Zentrum der (Resonanz)Frequenz eines einzelnen Moleküls durch Veränderung des räumlich nahen Wirtmaterials verschiebt, was die Frequenz der elektronischen Übergänge über Gast-Wirt-Wechselwirkungen beeinflusst. Abbildung 11 a zeigt beispielsweise eine Serie von Fluoreszenzanregungsspektren eines einzelnen Pentacenmoleküls in *p*-Terphenyl, bei der ein Spektrum alle 3 s aufgenommen wurde – so schnell, wie es das Signal-Rausch-Verhältnis zuließ: Die spektrale Verschiebung oder das Springen des Moleküls von einer Resonanzfrequenz zu einer anderen ist eindeutig. Wird die Laserfrequenz konstant nahe der molekularen Absorptionsfrequenz gehalten, dann scheint das Moleköl an- und auszugehen, während es in Resonanz und wieder hinaus springt (Abbildung 11 b, zwei Anregungsintensitäten). Die Rate dieses Übergangs ist nicht abhängig von der Intensität des Lasers, weshalb diese spontanen Prozesse darauf hinweisen, dass in der Wirtmatrix Zweiniveausysteme vorhanden sind, welche sogar bei diesen niedrigen Temperaturen thermische Übergänge aufweisen. Ein möglicher Ursprung für Tunnelzustände in diesem kristallinen System könnten Torsionsfreiheitsgrade des zentralen Phenylrings der benachbarten *p*-Terphenylmoleküle um die molekulare Achse sein. Die *p*-Terphenylmoleküle innerhalb einer Domängrenze zwischen zwei Zwillingen oder nahen Gitterdefekten könnten erniedrigte Barrieren für solche Tunnelprozesse des zentralen Rings aufweisen. Eine theoretische Untersuchung der Trajektorien spektraler Diffusion von Jim Skinner und Mitar-

beitern<sup>[60–62]</sup> postulierte, dass bestimmte Defekte dieses Phänomen erzeugen können, was die Leistungsfähigkeit der SMS bei der Erforschung von Details der lokalen Nanoumgebung und die Bedeutung theoretischer Fundierung für ein tieferes Verständnis hervorhebt. Spektrale Verschiebungen der Linien einzelner Moleküle wurden nicht nur an einigen kristallinen Wirtsystemen beobachtet, sondern auch an so gut wie allen untersuchten Polymeren und sogar an polykristallinen Shpol'skii-Matrizen.<sup>[63]</sup> Dies ist ein beeindruckendes Beispiel der Heterogenitäten, die durch Einzelmoleköluntersuchungen aufgedeckt wurden.

Mein Postdoc Thomas Basché und ich beobachteten auch für Perylenmoleküle als Verunreinigung in Polyethylen durch Licht verursachte Verschiebungen der Absorptionsfrequenz, wobei hier die Rate des Prozesses eindeutig mit der angelegten Laserleistung anstieg,<sup>[64, 65]</sup> wie in Abbildung 11 c gezeigt. Dieser Effekt einer Photoschaltung könnte in Analogie zu den früheren Experimenten „spektrales Lochbrennen“ genannt werden;<sup>[21]</sup> in diesem Fall jedoch verschwindet die Absorptionslinie einfach, weil nur ein einziges Moleköl in Resonanz mit dem Laser steht. Die Subspektren (a), (b) und (c) zeigen drei aufeinanderfolgende Scans eines Perylenmoleküls. Nach Aufnahme des Spektrums (c) wurde der Laser auf Resonanz mit dem Moleköl eingestellt. Bei dieser höheren Anregungsstärke verschwand das Fluoreszenzsignal schließlich, d.h., das Moleköl verlöschte anscheinend. Anschließend wurde das Subspektrum (d) aufgenommen. Es zeigt, dass sich die Resonanzfrequenz des Moleküls offenbar

um mehr als  $\pm 1.25$  GHz verschob, verursacht durch die lichtinduzierte Veränderung in der näheren Umgebung. Überraschenderweise war dieser Effekt für einen beachtlichen Teil der Moleküle reversibel: Beim nächsten Scan des Spektrums einige Minuten später (Spektrum (e)) war das Molekül zu seiner ursprünglichen Absorptionsfrequenz zurückgekehrt. Nach dem Subspektrum (g) war das Molekül wiederum „umgeschaltet“, und der ganze Zyklus konnte viele Male wiederholt werden, was uns ermöglichte, die Poisson-Kinetik des Prozesses über die Wartezeit vor einer spektralen Verschiebung zu messen.<sup>[65]</sup>

Eine Reihe von Einzelmolekülsystemen wiesen lichtinduziertes Verschieben bei niedrigen Temperaturen auf, beispielsweise Terrylen in Polyethylen<sup>[66]</sup> oder Terrylen in einer Shpol'skii-Matrix.<sup>[67]</sup> Optische Veränderungen der Spektren einzelner Moleküle eröffneten nicht nur einen einzigartigen Weg zur Photophysik und zu den Tieftemperaturdynamiken amorpher Phasen — dieser Effekt war Vorbote eines anderen, heute sehr relevanten Gebiets bei Raumtemperatur: Photoschaltung einzelner Moleküle zwischen einem emittierenden und einem dunklen Zustand ist ein momentan vielfach genutztes, mächtiges Hilfsmittel, um Superhochauflösung zu erreichen (siehe unten).

### 3. Intermezzo – warum sollte man einzelne Moleküle untersuchen?

Bevor wir mit den Untersuchungen bei Raumtemperatur fortfahren, sollten wir uns an einige der wichtigsten Motivationen und Vorteile dieser Arbeit erinnern. Einzelmolekülspektroskopie ermöglicht es, genau ein Molekül, das tief innerhalb eines Kristalls, eines Polymers, einer Flüssigkeit oder einer Zelle verborgen ist, durch optische Anregung zu beobachten. Das bedeutet Detektion und Spektroskopie bei maximal möglicher Sensitivität von ungefähr  $1.66 \times 10^{-24}$  Mol des Moleküls (1.66 Yoctomol) — oder eine Menge des Moleküls, die dem Inversen der Avogadro-Zahl entspricht. Die

Detektion des einzelnen Moleküls muss dabei in Gegenwart von Milliarden bis Trilliarden von Lösungsmittel- oder Wirtmolekülen durchgeführt werden. Um dies zu erreichen, wird ein Lichtstrahl (typischerweise ein Laser) verwendet, um einen elektronischen Übergang des einen Moleküls, das resonant mit der optischen Wellenlänge ist, zu stimulieren. Diese Interaktion der optischen Anregung mit dem Molekül ermöglicht es, das einzelne Molekül zu erfassen. Erfolgreiche Experimente müssen zwei Kriterien erfüllen: 1) Sie müssen garantieren, dass nur ein Molekül innerhalb des Probenvolumens in Resonanz mit dem Laser steht, und 2) sie müssen ein Signal-Rausch-Verhältnis für das Signal des einzelnen Moleküls aufweisen, das für eine sinnvolle Mittelungszeit größer als 1 ist.

Warum werden Einzelmoleküluntersuchungen heutzutage als zentraler Bestandteil moderner physikalischer Chemie, chemischer Physik und Biophysik angesehen (Abbildung 12)? Durch den Wegfall der Ensemblemittelung ist es möglich, direkt die Verteilung des Verhaltens einzelner Moleküle zu messen, um verborgene Heterogenität zu erkunden. Diese Heterogenität kann statisch sein und von verschiedenen Arten der Wechselwirkung stammen, die das einzelne Molekül mit der (komplexen) Umgebung eingeht; oder sie kann in der Zeitdomäne auftreten und von internen Zuständen eines Moleküls stammen sowie von den Übergängen zwischen ihnen. SMS erlaubt es dann, verborgene kinetische Pfade zu vermessen und seltene, kurzlebige Intermediate zu detektieren. Da sich typische Einzelmolekül-Markierungen wie kleine Lichtquellen mit 1–2 nm Größe verhalten und ihre unmittelbare Umgebung anzeigen, eröffnen Einzelmolekülstudien ein neues Fenster in Interaktionen im Nanobereich mit einfacherem Zugang zu zeitabhängigen Veränderungen. Durch FRET-Messungen einzelner Moleküle können konformationelle Veränderungen auf Längenskalen von ca. 5 nm<sup>[68]</sup> verfolgt werden. Da ein einzelnes Molekül mit Licht hauptsächlich über das lokale elektromagnetische Feld und das molekulare Übergangsdipolmoment interagiert, können verstärkte lokale Felder in nanophotonischen Metallstruktu-



Abbildung 12. Inspirationen und Einfluss des Moerner-Labors, zusammen mit ausgewählten Titelbildern von Fachzeitschriften.

#### Wegfall der Ensemble-Mittelung

- **Erforschung von Heterogenitäten:** Sind die verschiedenen Kopien identisch in ihrem Verhalten oder unterscheiden sie sich?
- **zeitliche Verfolgung von Zustandsänderungen,** insbesondere in biologischen Prozessen und komplexen Materialien
- Überprüfung der Theorie des stochastischen Verhaltens

#### Bildgebung/Detektion von Wechselwirkungen auf der Nanometerskala

- Einzelne Moleküle als nanoskalige Reporter und nanoskalige Lichtquellen
- Abstandsmessungen mittels FRET, TJ Ha et al. (1996)
- Messung lokaler Felder in nanophotonischen Strukturen
- superhochauflösende Bildgebung

#### Kommerzialisierung: DNA-Sequenzierung, Bildgebung

- PacBio-Sequenzierung mit ZMW, ...
- superhochauflösende Mikroskope

ren sondiert werden.<sup>[69,70]</sup> Die Verwendung eines einzelnen Moleküls als nanometergroße Lichtquelle ist eine Hauptenschaft, die bei der superhochauflösenden Mikroskopie verwendet wird, wie im Folgenden nach Zusammenfassen der Raumtemperatur-SMS-Experimente beschrieben werden wird. Schließlich sind einzelne Moleküle auch zu kommerzieller Anwendung sowohl in der DNA-Sequenzierung als auch in der Mikroskopie über das Beugungslimit hinaus gelangt. Dass wir in der Lage sind, auf optischem Wege die kleinsten Bestandteile eines komplexen Systems zu untersuchen, hat tiefen und weitreichende Konsequenzen.

#### 4. Raumtemperaturstudien einzelner Moleküle

Bald nach den ersten Tieftemperaturexperimenten begannen auch Experimente mit einzelnen Molekülen bei Raumtemperatur. Eine Auswahl von Meilensteinen ist nach meinem besten Wissen in Tabelle 1 aufgeführt.

Erste Schritte waren inspiriert von der Entwicklung der „Fluoreszenzkorrelationsspektroskopie“ (FCS),<sup>[72,73]</sup> der eine umfangreiche Theorie zugrunde liegt, die detailliert in Lit. [88–90] vorgestellt wird. Die Methode basiert auf Fluktuationen der Emission aus einem kleinen fokalen Volumen, die durch den Durchgang einzelner Moleküle in Lösung durch den Laserstrahl verursacht werden. Autokorrelationsanalyse eröffnet die Möglichkeit, eine Reihe von dynamischen Eigenschaften des Systems auf Zeitskalen unterhalb der Durchgangszeit, die etwa 1–10 ms beträgt, zu ermitteln. Der Kontrast der Autokorrelation verschwindet bei hohen Konzentrationen und verbessert sich bei niedrigen. Im Jahr 1990 wurden Korrelationsfunktionen aufgezeichnet, bei denen die Konzentration so niedrig war, dass sich durchschnittlich deutlich weniger als ein Molekül im Probenvolumen befand.<sup>[77]</sup> Der Durchgang vieler einzelner Moleküle muss gemittelt werden; es ist nicht möglich, nur ein einziges Molekül für eine lange Zeit durch FCS zu untersuchen.

Ebenfalls im Jahr 1990 verwendete das Labor von Keller in Los Alamos ein sorgfältig entworfenes Flusssystem, um das Volumen, das den Hintergrund verursachte, zu reduzieren.

Damit konnten sie direkt individuelle Fluoreszenzblitze detektieren, wenn einzelne Rhodamin6G-Moleküle den Fokus passierten.<sup>[79]</sup> Darin bestand ein wesentlicher Schritt der Hintergrundreduktion. Allerdings wäre es auch sehr aufschlussreich, dasselbe einzelne Molekül über eine lange Zeit hinweg zu beobachten und seine Signalstärke, Lebenszeit, Polarisation, Fluktuation usw. zu messen — alles als Funktion der Zeit und mit dem Ziel, direkt jede Heterogenität von Molekül zu Molekül zu erfassen. Hirschfeld berichtete die Detektion eines einzelnen Antikörpers mit 80–100 Fluorophoren in einem kurzen Aufsatz bereits 1976,<sup>[81]</sup> doch Bleichen und die damals verfügbaren optischen Geräte begrenzten weitere Arbeiten.

Ein wichtiger Meilenstein für die Abbildung eines einzelnen Moleküls bei Raumtemperatur war 1993 erreicht, als optische Nahfeld-Rastermikroskopie (NSOM) verwendet wurde, um das angeregte Volumen und damit auch möglicherweise interferierenden Hintergrund zu verringern.<sup>[82–84]</sup> In der Folgezeit wurde gezeigt, dass durch sorgfältige Probenpräparation und optimale Detektionsmethoden einzelne Moleküle auch durch Fernfeldtechniken wie konfokale Mikroskopie,<sup>[85]</sup> Weitfeld-Epifluoreszenz oder totale interne Reflexionsfluoreszenzmikroskopie<sup>[86]</sup> abgebildet werden können. Von besonderer Bedeutung im Bereich der Zellbiologie war die Arbeit von Schmidt et al. aus dem Jahr 1996, in der die Diffusion einzelner markierter Lipide auf der Zellmembran untersucht wurde.<sup>[87]</sup> Die rasend schnelle Entwicklung von immer neuen Methoden zur Detektion und Abbildung einzelner Moleküle führte zu faszinierender Forschung auf diesem Gebiet, deren Fortschritte viel zu umfangreich sind, um sie vollständig darzustellen.<sup>[91–93]</sup> Zwei Serien von *Nobel Conference Proceedings* sind inzwischen zu diesem Themenkomplex erschienen.<sup>[94,95]</sup>

##### 4.1. Grundlagen der Detektion und Abbildung einzelner Moleküle bei Raumtemperatur

Der Deutlichkeit halber sollte an diesem Punkt kurz die prinzipielle Detektionsstrategie geschildert werden, die in

**Tabelle 1:** Meilensteine der Detektion und Abbildung einzelner Moleküle bei Raumtemperatur.

Lösung: Korrelationsfunktionen	Fluoreszenzkorrelationsspektroskopie (FCS): Magde, Elson, Webb (1972); <sup>[71–74]</sup> Ehrenberg, Rigler (1974); <sup>[75]</sup> Aragón, Pecora (1976). <sup>[76]</sup> Autokorrelation, die von maximal einem Molekül im fokalen Volumen detektiert wurde: Rigler, Widengren (1990). <sup>[77]</sup>
Lösung: einzelne Fluoreszenzblitze	Fluoreszenzblitze von Emittieren mit mehreren Chromophoren (Phycoerythrin): Peck, Stryer, Glaser, Mathies (1989). <sup>[78]</sup> Fluoreszenzblitze von einem einzigen Fluorophor: Shera, Seitzinger, Davis, Keller, Soper (1990); <sup>[79]</sup> Nie, Zare (1994). <sup>[80]</sup>
In Lösung und an der Oberfläche	Einzelner Antikörper mit vielen (80–100) Markierungen: Hirschfeld (1976). <sup>[81]</sup>
Nahfeld-NSOM, SNOM	Abilden eines einzelnen Fluorophors: Betzig, Chicester (1993); <sup>[82]</sup> Ambrose, Goodwin, Martin, Keller (1994); <sup>[83]</sup> Xie, Dunn (1994). <sup>[84]</sup>
Konfokale Mikroskopie	Macklin, Trautman, Harris, Brus (1996). <sup>[85]</sup>
Abilden einzelner Moleküle durch Weitfeldmikroskopie	In vitro, einzelnes Myosin oder Actin: Funatsu, Harada, Tokunaga, Saito, Yanagida (1995). <sup>[86]</sup> Verfolgen einzelner Lipide in Zellmembranen mit Superlokalisierung: Schmidt, Schütz, Baumgartner, Gruber, Schindler (1996). <sup>[87]</sup>

- typische organische Fluorophormarkierungen sind nur ca. 1 nm groß, fluoreszierende Proteine 3-4 nm
- Licht regt elektronische Übergänge im Molekül an ("pumpen")
- das Signal beschreibt die lokale Mikroumgebung, da nur ein Molekül angeregt und gemessen wird, sofern der Hintergrund niedrig ist und das Molekül effizient emittiert

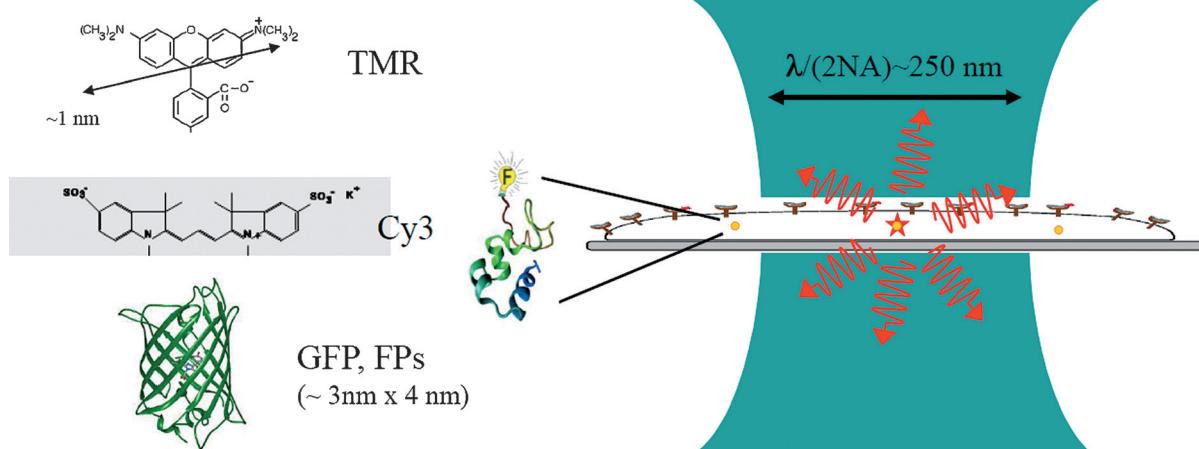
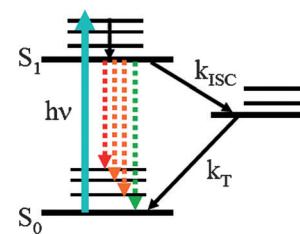


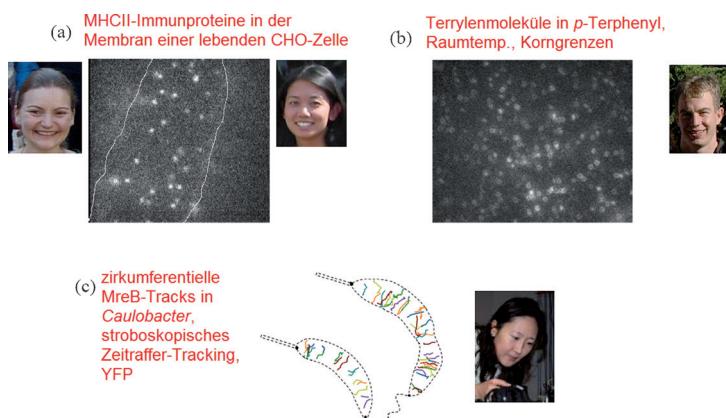
Abbildung 13. Überblick über die Detektion und Abbildung einzelner Moleküle bei Raumtemperatur. Aus Lit. [139].

modernen Einzelmolekülstudien bei Raumtemperatur eingesetzt wird. Abbildung 13 illustriert einige der wichtigsten Ideen für das Untersuchen von Zellen, aber die Methode ist die gleiche für jede Art von Probe, sofern das Experiment streng darauf ausgelegt ist, den Hintergrund zu minimieren und die detektierte Emission des einzelnen Moleküls zu maximieren. Eine Reihe von Lehrbüchern geht noch weiter auf die Details ein.<sup>[96–99]</sup> Typischerweise werden organische fluoreszierende Farbstoffe (z.B. Tetramethylrhodamin (TMR), Cyaninfarbstoffe wie Cy3, Alexa-Farbstoffe usw.) oder fluoreszierende Proteinmarkierungen an das zu untersuchende Biomolekül angebracht, bei dem es sich um Proteine, Lipide, Zucker oder Oligonukleotide handeln kann. Das Anregungslight regt normalerweise die Energieniveaus wie oben rechts gezeichnet an; sehr oft ist es ein erlaubter Singulett-Singulett-Übergang. Bevor die Fluoreszenz rotverschoben emittiert wird, kann vibronische Relaxation auftreten, was nützlich für die Detektion ist: Meist werden Long-Pass-Filter eingesetzt, um jedes gestreute Anregungslight zu entfernen. Es kann auch zu Intersystem-Crossing in einen Triplett-Zustand kommen, aber normalerweise werden Fluorophore gewählt, die sich möglichst selten und kurz in dunklen Zuständen aufhalten, außer wenn Blinken erforderlich ist. Unabhängig von der Art des verwendeten Mikroskops können wir, ohne das Problem zu vereinfachen, von einem beugungsbegrenzten Anregungsvolumen ausgehen, das die Probe auf einem meist transparenten Träger anregt. Das bekannte Beugungslimit sollte hier erwähnt werden: In Fernfeldoptiken kann der Fokus nicht unter  $\lambda/(2NA)$  verkleinert werden, wobei NA die numerische Apertur des Mikroskops

bezeichnet. Für sichtbares Licht entspricht diese Untergrenze mit etwa 250 nm: Der Unterschied zwischen der Größe des Fokus und der Markierungen (wenige nm) ist gewaltig. Nichtsdestoweniger wird nur ein einziges Molekül angeregt, wenn die Konzentration der markierten Moleküle niedrig ist, und die emittierte Fluoreszenz zeigt dieses eine markierte Molekül an.

Sogar ohne superhochauflösende Methoden, die dichte Emitten über die Beugungsbegrenzung hinaus trennen (behandelt weiter unten), wurden und werden nach wie vor viele Einzelmolekülstudien durchgeführt, bei denen einzelne, voneinander getrennte Moleküle abgebildet und über die Zeit hinweg beobachtet werden. Schon das einfache Verfolgen der Bewegung einzelner Moleküle gewährt Einblicke in ihr Verhalten. Abbildung 14 gibt einige ausgewählte Beispiele für Experimente dieser Art im Moerner-Labor aus den frühen 2000er Jahren. Abbildung 14a zeigt ein Bild einzelner MHCII-Proteine (major histocompatibility complexes of type II), die in der Plasmamembran einer CHO-Zelle (chinese hamster ovary) verankert sind. Ein hochaffines antigeines Peptid wurde mit einem einzelnen Fluorophor markiert, um die MCHII-Moleküle zum Leuchten zu bringen, und ein Fluoreszenzvideo in Echtzeit dieser Moleküle lässt uns den faszinierenden Tanz der MCHIIs verfolgen, wie er auf der Oberfläche von Leberzellen geschieht. Die Eigenschaft der Diffusion und der Einfluss von Cholesterin wurden von meinen Studenten in Zusammenarbeit mit Harden McConnell untersucht.<sup>[100–103]</sup>

Um auch ein Beispiel aus den Materialwissenschaften zu geben, zeigt Abbildung 14b ein Fluoreszenzbild von einzel-



**Abbildung 14.** Ausgewählte Studien zur Bildgebung und zum Tracking von Einzelmolekülen bei Raumtemperatur. Aus Lit. [158] (a), [104] (b) und [108] (c). Photos (links nach rechts): Marija Vrljic, Stefanie Nishimura, Christopher (Kit) Werley, So Yeon Kim.

nen Terrylenmolekülen in einem rotationsbeschichteten Kristall von *p*-Terphenyl.<sup>[104]</sup> Die genaue Betrachtung des Bildes lässt erkennen, dass einige Moleküle als kleine Ringe erscheinen, während andere unstrukturierte Punkte sind. Die Ringe sind leicht verständlich: Es handelt sich um Dipole, die in *z*-Richtung orientiert sind<sup>[105]</sup> und in geordneten, kristallinen Regionen der Probe auftreten. Aufschlussreicher aber ist es, diese Bilder als Funktion der Zeit zu betrachten (vgl. die Supporting Information von Lit. [104]). Überraschenderweise bewegen sich die unstrukturierten Punkte, wobei sie eine starke Präferenz für ungefähr horizontale und vertikale Linien in der Probe aufweisen. Diese einzelnen Moleküle bewegen sich höchstwahrscheinlich entlang der Risse der Probe; ihre Bewegung kann also eingesetzt werden, um Kristalldefekte zu visualisieren.

Als ein letztes Beispiel für die Leistungsfähigkeit des Trackens einzelner Moleküle seien Untersuchungen genannt, die im Moerner-Labor in Kooperation mit dem Labor von Lucy Shapiro seit inzwischen mehr als zehn Jahren die helle und rotverschobene Emission des verbesserten gelb fluoreszierenden Proteins (EYFP) einsetzen, in denen es als Markierung für die Fusion intrazellulärer Proteine verwendet wird. Der Organismus, der uns hierbei besonders interessiert, ist *Caulobacter crescentus*, denn seine Zellen zeigen asymmetrische Division im Zellzyklus: Eine Tochterzelle besitzt ein Flagellum, die andere einen Strunk mit einem klebrigen Ende. Das bedeutet, dass diese Zellen ein genetisches Programm haben, durch das verschiedene Gruppen von Proteinen in verschiedenen Tochterzellen erscheinen. Diesen Prozess zu verstehen würde dazu beitragen, die generellen Abläufe bei der Zellentwicklung besser nachzuvollziehen.<sup>[106,107]</sup> Im Prinzip wird dieser Effekt von einer räumlichen Mustierung regulatorischer Proteine verursacht, was zu zahlreichen interessanten Fragestellungen führt: Wie produzieren diese Proteine Muster, wie kommt es von diesen Mustern zu verschiedenen Phänotypen in den Tochterzellen und so weiter. Abbildung 13c zeigt das Ergebnis unserer Beobachtungen, als wir einzelne EYFP-Moleküle an das zytoskelettale Protein MreB in lebenden Zellen anbrachten.<sup>[108]</sup> Eine Gruppe von MreB-Molekülen diffundierte wie erwartet im Zyt-

plasma. Auf einer längeren Zeitskala jedoch deckten Zeitrafferaufnahmen auf, dass sich einzelne Moleküle eindeutig gerichtet entlang linearer Pfade in einem Muster am Rand der Zelle bewegten. Die Abbildung zeigt Trajektorien einzelner Moleküle in verschiedenen Zellen. Während zuerst vermutet wurde, dass dieser Beobachtung ein Tretmühlmechanismus von Filamenten zugrunde liegt, hängt das Verhalten wahrscheinlich mit MreB-Molekülen zusammen, die mit den Synthesekomplexen der Zellwand interagieren.<sup>[109]</sup>

#### 4.2. Auf dem Weg zur Superhochauflösung: Schlüssel #1 ist die Superlokalisierung von Einzelmolekülemittern

Wir sind damit an einem Punkt angekommen, an dem wir leicht superhochauflösende Mikroskopie direkt behandeln können. Es ist hinlänglich bekannt, dass Fluoreszenzmikroskopie in der Biologie von einer Reihe von Markierungsmethoden profitiert, um die verschiedenen Strukturen der Zelle zum Leuchten zu bringen. Der Preis jedoch, der oft dafür gezahlt werden muss, ist eine, verglichen mit Röntgen- oder Elektronenmikroskopie, schlechte räumliche Auflösung. „Auflösung“ wird hier im exakten Sinn des Wortes verwendet: Die Möglichkeit, zwei Objekte, die räumlich nah beieinander stehen, als zwei Objekte zu unterscheiden. Das Grundproblem ist, wie schon kurz anklängt, dass konventionelle Fernfeldmikroskopie durch Abbes grundlegendes Beugungslimit (BL)<sup>[110]</sup> auf eine Auflösung von ungefähr der optischen Wellenlänge  $\lambda$  geteilt durch zweimal die numerische Apertur (NA) des Aufbaus,  $\lambda/(2NA)$ , beschränkt ist. Da die größten Werte für NA, wie sie bei modernsten, stark korrigierenden Immersionsobjektiven erreicht werden, in etwa bei 1.3–1.6 liegen, folgt eine untere Grenze der Auflösung von ungefähr 200–250 nm für sichtbares Licht mit 500 nm Wellenlänge.

Tatsächlich ermöglicht das Licht, das von einer einzelnen fluoreszierenden Markierung mit einer Größe von 1–2 nm emittiert wird, dieses Problem zu umgehen, also „Superhochauflösung“ zu erreichen, d.h. Auflösung besser als durch das Beugungslimit vorgegeben. (Stimulierte Emissionsdepletion (STED)<sup>[111]</sup> und strukturierte Illuminationsmikroskopie sind andere Methoden, die das BL übertreffen; aber sie benötigen keine einzelnen Moleküle und werden von Stefan Hell und Eric Betzig an anderer Stelle erläutert.) Wie können einzelne Moleküle helfen? Die Zeichnung in Abbildung 13 verdeutlicht das typische Abbildungsproblem bei Raumtemperatur: Das einzelne Molekül ist sehr viel kleiner als der Fokus des Lasers; aber wenn nur ein einzelnes Molekül angeregt wird, können Informationen über dieses eine Molekül und seine lokale „Nanoumgebung“ gewonnen werden, indem nur Photonen dieses Moleküls erfasst werden.<sup>[45]</sup> Betrachtet man jedoch die räumliche Auflösung, zeichnet der beobachtete Peak des einzelnen nanometergroßen Emitters beim Aufbau des Bildes die beugungsbegrenzte Point-Spread-Function (PSF) des Mikroskops nach, denn das Molekül ist nur wenige Nanometer groß und damit sehr viel kleiner als die PSF. (Genau genommen ist das einzelne Molekül keine

punktförmige Quelle, sondern ein Dipolemitter.<sup>[113]</sup> Diese Feinheit ist jedoch für die folgende Diskussion nicht wichtig.) Wenn viele Emitter eine Struktur nachbilden, überlappen die PSFs und erzeugen ein verschwommenes Bild, das auf elementare Weise „nicht im Fokus“ ist.

Dieses Problem wurde auf direktem Wege von Betzig im Jahr 2006 gelöst,<sup>[114]</sup> indem er einfach die Moleküle davon abholt, alle zur gleichen Zeit zu emittieren (vgl. Abschnitt 4.4). Der Nachvollziehbarkeit halber werde ich die grundlegenden Ideen in ihrer einfachsten Ausprägung beschreiben, um zu unterstreichen, dass das Problem generell gelöst werden kann. Es gibt nur zwei Dinge zu tun: Erstens muss man in der Lage sein, das Bild eines einzelnen Moleküls zu erfassen und seinen Ort mit sehr viel größerer Präzision zu lokalisieren als es der Breite der PSF entspricht. Diesen Prozess könnte man „Superlokalisierung“ nennen. Zweitens muss man die Menge an emittierenden Molekülen aktiv kontrollieren können. Dies wird in Abschnitt 4.4 beschrieben.

Abbildung 15 verdeutlicht das Konzept der Superlokalisierung einzelner Moleküle. In einer Analogie ausgedrückt: Jeder kann auf den Gipfel des Aschekegels im Crater Lake in Oregon (Abbildung 15 a) wandern und dort mit einem GPS-Empfänger die Koordinaten der Position des Berges ablesen. Diese Idee wird letztlich auf einzelne Emitter übertragen: Allein durch Vermessen der Form der PSF kann die Position ihres Zentrums sehr viel genauer bestimmt werden als ihre Breite. Beispielsweise sind im Weitfeldbild einzelner Moleküle in Abbildung 15 b die beugungsbegrenzten Punkte klar erkennbar. Wichtig ist, dass sich jeder detektierte Punkt auf mehreren Pixeln der Kamera ausbreitet, wie in Abbildung 15 c gezeigt. Dann messen die verschiedenen Pixel verschiedene Photonen, der Form der PSF folgend (ver-

sinnbildlich an einem eindimensionalen Schnitt wie in Abbildung 15 d zu sehen). Formal ist die PSF eine Airy-Funktion, aber man kann sie der Einfachheit halber auch durch eine Gauß-Funktion annähern, insbesondere in Gegenwart von Hintergrund. Die Anzahl der Photonen, die an den verschiedenen Pixeln gemessen wird, repräsentieren Punkte der Funktion, die mathematisch gefittet werden können. Während die Breite  $\hat{w}$  dieses Fits nach wie vor beugungsbegrenzt ist, besitzt die Lokalisierung der Zentrumsposition eine sehr viel engere Fehlerverteilung mit der Standardabweichung  $\sigma$ , die allgemein als „Lokalisationspräzision“ bezeichnet wird. Die Genauigkeit, mit der ein einzelnes Molekül durch Digitalisierung seiner PSF lokalisiert werden kann, hängt grundlegend vom Poisson-Prozess der Photendetektion ab, weshalb die wichtigste Variable die Gesamtzahl der Photonen  $N$  ist, die über dem Hintergrund detektiert wurden. Weitere Einflussfaktoren sind die Größe der Pixel und der Hintergrund selbst.<sup>[115–117]</sup> Die dominierende Abhängigkeit von  $\sigma$  ist dann einfach das Abbe-Limit dividiert durch die Wurzel der Anzahl detekтирter Photonen. Diese funktionale Form ergibt Sinn, weil jedes erfasste Photon eine Abschätzung der Position des Moleküls beinhaltet, sodass sich für  $N$  Messungen die Präzision entsprechend verbessert. Superlokalisierung bedeutet also, dass beispielsweise durch die Detektion von 100 Photonen eine Genauigkeit von 20 nm erreicht werden kann und so weiter. Natürlich sind damit Fluorophore vorzuziehen, die eine möglichst große Zahl von Photonen vor dem Bleichen emittieren.

Das Fitten eines Bildes zur Ermittlung des Zentrums eines Objekts ist kein neues Konzept in den Naturwissenschaften. Es wird schon eine Weile zur Analyse experimenteller Daten eingesetzt.<sup>[121]</sup> Tatsächlich wusste schon Heisen-

## Schlüsselidee #1: Superlokalisierung

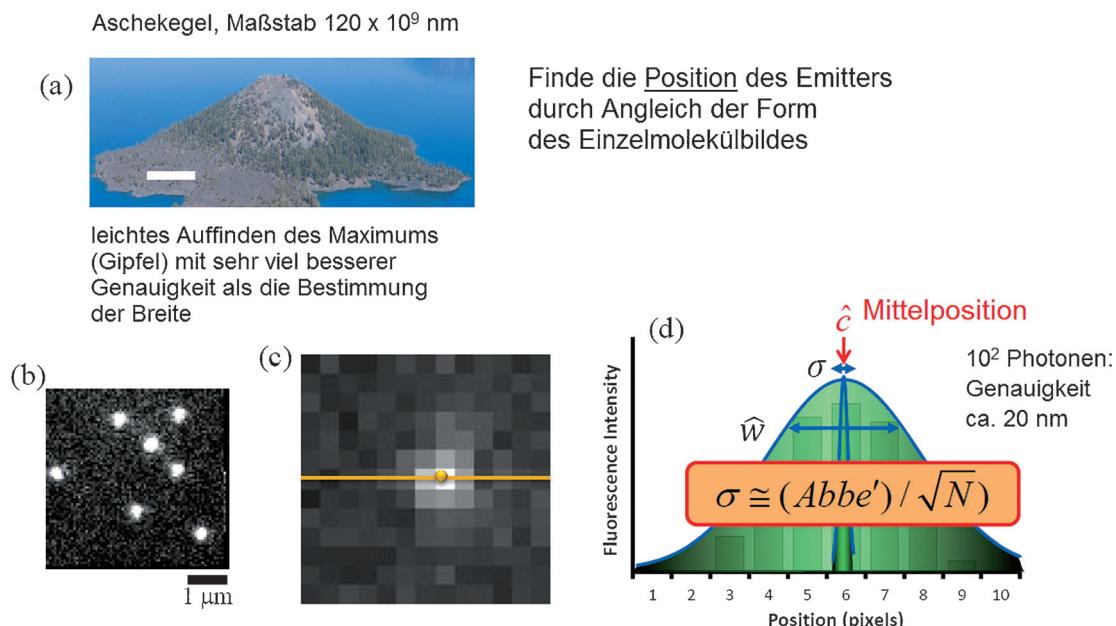


Abbildung 15. Die wichtigsten Ideen, die der Superlokalisierung einzelner Molekülemitter zugrunde liegen.

**Tabelle 2:** Frühe Anwendungen der Superlokalisierung einzelner Objekte in der biologischen Mikroskopie.

Bestimmen des Schwerpunkts eines großen fluoreszierenden Objekts	LDL-Partikel (low-density lipoprotein) mit vielen Markierungen auf der Zelloberfläche: Barak, Webb (1982). <sup>[118]</sup> Verfolgen eines 190-nm-Kügelchens, das durch das Motorprotein Kinesin bewegt wird, bis auf wenige Nanometer genau: Gelles, Schnapp, Sheetz (1988). <sup>[119]</sup>
Positionsbestimmung eines einzelnen Fluorophors	Verfolgen einzelner Lipide mit 30 nm Genauigkeit auf der Zellmembran: Schmidt, Schütz, Baumgartner, Gruber, Schindler (1996). <sup>[87]</sup> Einzelne Viruspartikel auf HeLa-Zellen mit 40 nm Genauigkeit: Seisenberger,...Bräuchle (2001). <sup>[120]</sup>

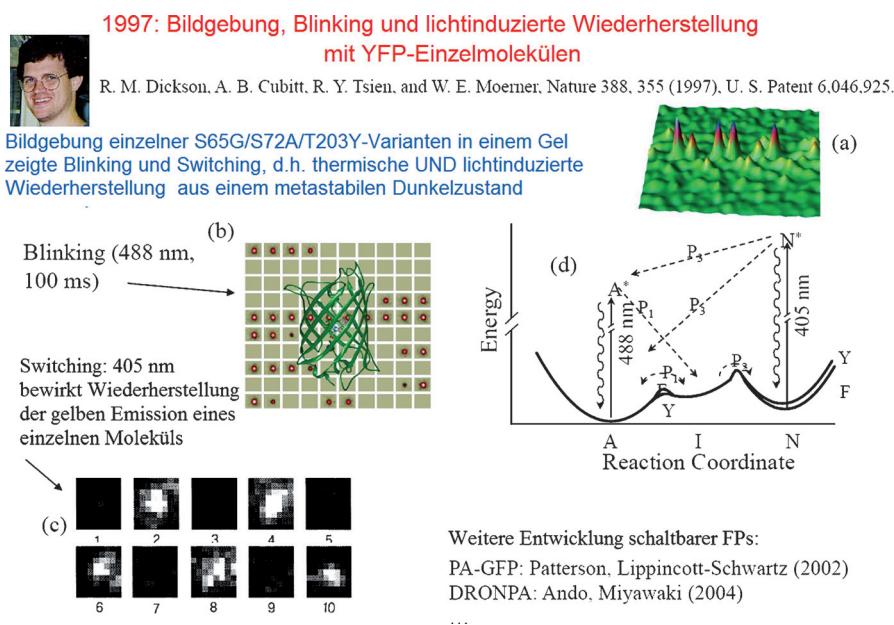
berg im Jahr 1930, dass die Verbesserung der Auflösung mit eins geteilt durch die Wurzel der Anzahl an detektierten Photonen skaliert.<sup>[122]</sup> Um nicht zu sehr auszufern, werde ich die Diskussion auf biologische Proben beschränken. Tabelle 2 führt einige der frühen Anwendungen auf, die mir bekannt sind. Anfangs wurde die Idee auf Objekte wie LDL-Partikel<sup>[118]</sup> oder fluoreszierende Kügelchen<sup>[119]</sup> angewendet, die über dem BL lagen. In diesem Fall ist die ermittelte Lokalisierung nur der Schwerpunkt des großen Objekts. Interessanter für diese Diskussion ist der Fall, wenn ein einzelner Fluorophor emittiert. Diese Art von Superlokalisierung wurde zuerst von Schmidt et al.<sup>[87]</sup> eingesetzt, um einzelne Lipide bis auf 30 nm Genauigkeit zu verfolgen. Eine folgende Studie an Zellen befasste sich mit dem Eintritt einzelner Viruspartikel in Zellen.<sup>[120]</sup> Auch *in vitro* wurde diese Methode eingesetzt: Beispielsweise verwendeten Yildiz et al.<sup>[123]</sup> Digitalisierung der PSF und einzelne Myosinmoleküle, die mit Cy3 markiert waren, und ermittelten damit Positionen bis auf wenige Nanometer Präzision, wofür ein neues Akronym vorgeschlagen wurde: FIONA (fluorescent imaging with one nanometer accuracy). Wenn dasselbe Molekül alle detektierten Photonen emittiert, bedeutet dies, dass eine N-Photonen-Korrelation gemessen wird. Solange die Photonen voneinander unabhängig sind, kann dieselbe Analyse angewendet werden. Wenn zukünftig kompliziertere Photonenzustände für die Analyse herangezogen werden können, wird sich die Situation verändern.

#### 4.3. Überraschung bei einzelnen fluoreszierenden Proteinen: Blinken und Photokontrolle

Eine weitere spannende Entwicklung in den 90er Jahren war das Aufkommen genetisch exprimierter grün fluoreszierender Proteine. Diese Entdeckung war überaus bedeutend für die molekulare und zelluläre Biologie und wurde schließlich durch die Vergabe des Nobelpreises für Chemie an Osamu Shimomura, Martin Chalfie und Roger Y. Tsien im Jahr 2008 ausgezeichnet.<sup>[124]</sup> Tatsächlich konnte ich mein Tätigkeitsfeld verbreitern, als ich 1995 IBM in Richtung der University of California

in San Diego verließ und mich nun auch mit Biologie und Untersuchungen bei Raumtemperatur beschäftigte. Mein Postdoc Robert Dickson und ich arbeiteten zuerst an der teilweisen Immobilisierung von einzelnen organischen Molekülen in wässrigen Umgebungen, wobei wir auf wassergefüllte Poren von Polyacrylamidgelen zurückgriffen.<sup>[125]</sup> Dann hatte ich im Jahr 1996 die Gelegenheit, nachdem mir die schnelle Entwicklung fluoreszierender Proteine aufgefallen war, durch Andy Cubitt aus dem Labor von Roger Tsien Proben einer neuen Proteinmutante (yellow fluorescent protein, YFP) zu untersuchen. Im Gegensatz zu GFP, das zwei Absorptionsbanden aufweist und vor der Emission einen Protonentransfer von der kurzwelligen zur langwelligen Form zeigt,<sup>[126]</sup> war YFP darauf ausgelegt, die langwellige Form zu stabilisieren, und konnte mit einem unserer Argon-Ionenlaser bei 488 nm angeregt werden. Robert Dickson und ich gingen dann zu Experimenten über, einzelne Kopien von YFP bei Raumtemperatur zu detektieren und abzubilden. Durch Verwendung von totaler interner Reflexionsmikroskopie (TIRF) konnte Rob 1997<sup>[2]</sup> die ersten Bilder einzelner fluoreszierender Proteine in einem Gel aufnehmen, wie in Abbildung 16a gezeigt.

Diese frühen Experimente führten auch zum ersten Beispiel eines Einzelmolekül-Photoschalters bei Raumtemperatur



**Abbildung 16.** a) Bildgebung, b) Blinken und c, d) lichtinduzierte Wiederherstellung oder Schaltung der Fluoreszenz für ein einzelnes YFP. Photo: Rob Dickson. Aus Lit. [2].

tur<sup>[2]</sup> und zu den ersten Details der photophysikalischen Eigenschaften von GFP-Varianten auf der Ebene einzelner Moleküle. Die Experimente verwendeten zwei rotverschobene GFP-Varianten (S65G/S72A/T203Y, „T203Y“, und S65G/S72A/T203F, „T203F“), die sich nur durch die Abwesenheit einer Hydroxygruppe nahe dem Chromophor unterscheiden und dem weitverbreiteten verbesserten gelb fluoreszierenden Protein EYFP (S65G/V68L/S72A/T203Y) recht ähnlich sind. Bei diesen Experimenten trat ein faszinierendes und unerwartetes Blinken zu Tage, das nur auf der Ebene eines einzelnen Moleküls erkannt werden konnte (vgl. den Hintergrund von Abbildung 16b als Beispiel für eine Serie von Fluoreszenzbildern eines einzelnen Moleküls). Dieses Blinken stammt vermutlich aus Transformationen zwischen den letzten beiden Zuständen des Chromophors (A und I, Abbildung 16d), von denen nur einer (A) bei 488 nm angeregt werden und fluoreszieren kann. Weiterhin beobachteten wir einen sehr viel länger andauernden dunklen Zustand N, wenn längere Zeit angeregt wurde. Dieser langlebige Zustand war im Dunklen thermisch über viele Minuten stabil, aber nicht permanent gebleicht — ein wenig Licht mit einer Wellenlänge von 405 nm stellte den ursprünglichen fluoreszierenden Zustand wieder her, wie es in der Bilderserie in Abbildung 16c gezeigt wird. Das bedeutet, dass das Protein als emittierende Markierung fungiert, bis es den langlebigen dunklen Zustand erreicht, und daraufhin durch Licht mit 405 nm wieder in die emittierende Form zurückgebracht wird, was einer Aufhebung des scheinbaren Bleichens entspricht. Als Rob und ich das Blinken und die lichtinduzierte Wiederherstellung beobachteten, dachten wir damals, man könnte dieses Photoschalten für optische Speicher einsetzen. Dafür wurde ein Patent gewährt.

Die Möglichkeiten, auf optischem Weg die emittierenden Zustände fluoreszierender Proteine zu kontrollieren, vermehrten sich schnell, als andere Forscher auf der ganzen Welt viele neue photoschaltbare fluoreszierende Proteine entwickelten (z.B. Kaede,<sup>[127]</sup> PA-GFP,<sup>[128]</sup> EosFP<sup>[129]</sup> und DRONPA).<sup>[130]</sup> Diese interessanten Moleküle mit einfallsreichen Namen sollten bald eine entscheidende Rolle beim letzten Schritt zur superhochauflösenden Mikroskopie spielen.

#### 4.4. Schlüssel #2: Aktive Kontrolle der emittierenden Population und sequentielle Bildgebung

Superlokalisierung funktioniert gut, solange Moleküle räumlich getrennt sind — doch was soll man tun, wenn sie überlappen? Wie kann die räumliche Auflösung solch verschwommener Bilder verbessert werden? An dieser Stelle sollte man sich daran erinnern, dass die hochauflösende Spektroskopie (Abschnitt 2) bei tiefen Temperaturen einen Hinweis auf die Lösung gibt: Sogar innerhalb eines beugungsbegrenzten Fokus konnten viele verschiedene Moleküle leicht getrennt voneinander durch Einstellen des Lasers ausgewählt werden. Die Resonanzfrequenz war eine Kontrollvariable, die die Moleküle praktisch ein- und ausschaltete, sodass sie sich nicht überlagerten. Aber wir dachten damals in den frühen 90er Jahren einfach nicht an räumliche Auflösung, denn wir hatten eine ganze Menge *spektraler* Auflösung bei der Hand! Gleichzeitig gab es Mitte der 90er Jahre einige Fortschritte bei der Entwicklung allgemeiner Methoden zur Überwindung des Problems der räumlichen Auflösung, wie in Tabelle 3 zusammengefasst.

Nachdem Eric Betzig einige Jahre damit verbracht hatte, optische Nahfeldmikroskopie bei den Bell-Laboratorien zu entwickeln, schrieb er im Jahr 1995 einen bahnbrechenden Aufsatz, in dem er anmerkte, dass eine Kontrollvariable, die Moleküle entlang einer anderen Dimension unterschied, für superhochauflösende Mikroskopie eingesetzt werden kann. Er selbst schlug das Verwenden vieler Moleküle mit unterschiedlichen Farben vor, wie es in den Tieftemperaturexperimenten gemacht wurde.<sup>[131]</sup> Diesem Vorschlag folgend demonstrierten Antoine van Oijen et al. 1998 die Richtigkeit dieser Idee direkt: Sie nutzten spektrales Tunen bei tiefen Temperaturen, um ein Ensemble von einzelnen Molekülen in drei Dimensionen räumlich zu trennen. Die Auflösung betrug 40 nm lateral und 100 nm axial, das optische Beugungslimit deutlich übertreffend.<sup>[132,133a]</sup> Biologische Anwendungen konnten freilich nur eintreten, wenn dieses Problem auch bei Raumtemperatur gelöst werden könnte, weshalb Forscher weiterhin neue Ansätze ausprobierten, um räumlich nahe Moleküle zu trennen. Mehrfarben-Bildgebung verschiedenartig gefärbter Kugelchen oder Quantenpunkte wurde genutzt, um in mehreren Fällen Superhochauflösung eng beinanderliegender Emitter zu erreichen.<sup>[133b]</sup> Eine Strategie

**Tabelle 3:** Schritte zur Superhochauflösung mit Einzelmolekülemittern. Für eine Liste von Akronymen vgl. Lit. [139].

Schlüsselidee	Verwendung einer zusätzlichen Kontrollvariable, um beugungsbegrenzte Signale räumlich voneinander zu trennen – Vorschlag der spektralen Abtastung: E. Betzig (1995). <sup>[131]</sup>
Tiefe Temperaturen	Verwendung spektraler Abtastung, um Superhochauflösung in drei Dimensionen zu erreichen, 40 nm lateral, 100 nm axial für mehrere einzelne Moleküle: A. van Oijen, J. Köhler, J. Schmidt, M. Müller, G. J. Brakenhoff (1998). <sup>[132,133a]</sup>
Raumtemperatur	Mehrfarben-Bildgebung zur Unterscheidung mehrerer Fluoreszenzsonden: T. D. Lacoste, X. Michalet, F. Pinaud, D. S. Chemla, A. P. Alivisatos, S. Weiss (2000). <sup>[133b]</sup> Unterscheiden zweier Farbstoffe anhand ihrer Fluoreszenzlebensdauer: M. Heilemann, D. P. Herten, R. Heintzmann, C. Cremer, C. Müller, P. Tinnefeld, K. D. Weston, J. Wolfrum, M. Sauer (2002). <sup>[134]</sup> Verwendung des Photobleichens überlappender Fluorophore: SHRImp: M. P. Gordon, T. Ha, P. R. Selvin (2004); <sup>[135]</sup> NALMS: X. Qu, D. Wu, L. Mets, N. F. Scherer (2004). <sup>[136]</sup> Zwei unterschiedlich markierte Proben: SHREC: L. S. Churchman, Z. Oekten, R. S. Rock, J. F. Dawson, J. F. Spudich (2005). <sup>[137]</sup> Blinken von Halbleiter-Quantenpunkten: K. A. Lidke, B. Rieger, T. M. Jovin, R. Heintzmann (2005). <sup>[138]</sup>

nutzte den Unterschied in der Fluoreszenzlebensdauer zwischen Emittern,<sup>[134]</sup> was an der Trennung zweier 30 nm voneinander entfernter Farbstoffmoleküle demonstriert wurde. Andere Ideen nutzten natürlich auftretendes Bleichen: Am Schluss werden alle Moleküle geblichen sein bis auf eines. Dieses Konzept, weitere Vertreter zu der rasend anwachsenden Menagerie von Akronymen hinzufügend, wurde von Gordon et al. anhand von Cy3-Markierungen auf DNA<sup>[135]</sup> (SHRIMP, single-molecule high-resolution imaging with photobleaching) und von Qu et al. anhand von Cy3-markierten PNA-Proben auf DNA<sup>[137]</sup> (NALMS, nanometer localized multiple single-molecule fluorescence microscopy) demonstriert. Durch getrenntes Abbilden zweier Fluorophore (Cy3 und Cy5), angeheftet an zwei Calmodulinmoleküle, die an die „Beine“ eines einzelnen Myosin-V-Moleküls binden, wurden Distanzmessungen mit einer Genauigkeit von ca. 10 nm erreicht, und ein weiteres Akronym wurde erfunden<sup>[137,140]</sup> (SHREC, single-molecule high resolution colocalization of fluorescent probes). Lidke et al. zeigten, dass Superhochauflösung bis zu einem gewissen Grad auch über das Blinken fluoreszierender Halbleiter-Quantenpunkte erreicht werden konnte.<sup>[138]</sup>

Die Grundlagen waren nun geschaffen, um die vielen verschiedenen Konzepte zusammenzuführen und eine allgemeine Methode für superhochauflösende Mikroskopie zu finden. Der Schlüssel #2 dazu ist schematisch in Abbildung 17 gezeigt. Eine Struktur wird mit vielen fluoreszierenden Emittern markiert. Wenn sie alle gleichzeitig fluoreszieren können, resultiert ein durch die überlappenden PSFs verschwommenes Bild. Die Idee ist nun, ganz einfach nicht allen Molekülen zur gleichen Zeit das Fluoreszieren zu erlauben! Nehmen wir an, es gäbe einen Mechanismus, der es ermöglichen würde, die Moleküle eine zeitlang einzuschalten, sodass sie Photonen emittieren, und eine zeitlang auszuschalten, sie also in einen dunklen Zustand zu versetzen. Der Experimentator nutzt dann diesen Mechanismus, um durch aktive Kontrolle die Konzentration emittierender Moleküle sehr niedrig einzustellen, sodass die PSFs nicht überlappen.

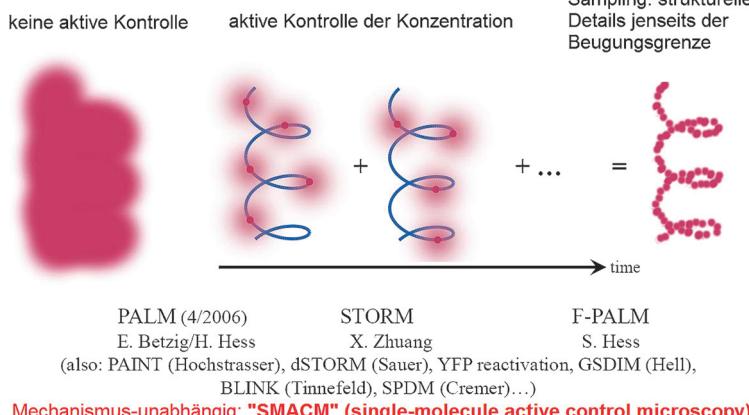
Durch Superlokalisierung werden die Positionen dieser Moleküle in dem einzelnen aufgenommenen Bild bestimmt. Dann werden sie ausgeschaltet oder geblichen, und eine andere Teilmenge von Molekülen wird eingeschaltet, superlokaliert usw. Am Ende, nachdem eine Reihe von aufeinanderfolgenden Bildern angefertigt wurde, sind viele Lokalisierungen auf der Struktur durch die Einzelmolekül-„Blinklichter“ ermittelt. Das zugrundeliegende Bild wird dann auf pointillistische Art rekonstruiert, wodurch Details zu Tage treten, die zuvor durch die Beugungsbegrenzung verborgen waren (rechts).

Ich erfuhr von dieser Idee durch Eric Betzig und seinen Kooperationspartner Harald Hess im April 2006 bei der Frontiers in Live Cell Imaging Conference am NIH Hauptcampus in Bethesda, Maryland. Sie nutzten die fluoreszierenden PA-GFP-Proteine von George Patterson und Jennifer Lippincott-Schwartz<sup>[128]</sup> sowie andere photoschaltbare fluoreszierende Proteine als aktiven Kontrollmechanismus und nannten die Methode PALM (photoactivated localization microscopy).<sup>[114]</sup> Durch lichtinduzierte Photoaktivierung von GFP-Fusionsproteinen werden zufällig einzelne Moleküle in fixierten Zellen eingeschaltet. In ihrem großartigen Experiment wurden so individuelle PSFs detailliert aufgenommen, um ihre Positionen auf 20 nm genau zu bestimmen, und anschließend geblichen, sodass andere eingeschaltet werden konnten. Durch viele Wiederholungen dieser Schritte bestimmten sie die Position von tausenden von PSFs, aus denen das superhochauflösende Bild rekonstruiert wurde.

Sehr schnell nach dem NIH-Treffen zeigte eine Flut von Forschern superhochauflösende Mikroskopie mit einzelnen Molekülen, weiteren aktiven Kontrollmechanismen und weiteren Akronymen. Die Gruppe von Xiaowei Zhuang nutzte kontrolliertes Photoschalten kleiner fluoreszierender Moleküle, um Superhochauflösung zu erreichen (STORM, stochastic optical reconstruction microscopy).<sup>[141]</sup> Ihre ursprüngliche Methode setzte ein Cy3-Cy5-Emitterpaar in räumlicher Nähe ein, das eine neuartige Eigenschaft zeigte:

Nach Photobleichen von Cy5 kann die Fluoreszenz wiederhergestellt werden, indem die Cy3-Moleküle kurz angeregt werden. Auf diese Weise wird die Emission eines einzelnen Cy5 auf DNA oder auf einem Antikörper durch kurzes Anregen von Cy3 eingeschaltet und durch Photobleichen wieder ausgeschaltet, wieder und wieder, um seine Position viele Male genau zu vermessen. Nach zahlreichen Positionsbestimmungen kann die Genauigkeit von ca. 20 nm erreichen. Markierte Antikörper (markiert mit  $>1\text{ Cy3}$ ,  $\ll 1\text{ Cy5}$ ) wurden eingesetzt, um RecA-Proteine an DNA gebunden zu lokalisieren. Samuel Hess et al. publizierten einen ähnlichen Ansatz unter dem Akronym F-PALM (fluorescence photoactivation localization microscopy),<sup>[142]</sup> der sich auch photoaktivierbarem GFP mit PSF-Lokalisierung bediente, um Superhochauflösung zu erreichen. Ebenfalls im Jahr 2006 veröffentlichte die Gruppe um Robin Hochstrasser einen alternativen Ansatz, der auf dem vielfachen Binden difundierender Proben fußt, die in Lösung nicht fluoreszieren, aber in der Nähe des zu visualisie-

### Schlüsselidee #2: aktive Kontrolle der Emitterkonzentration; sequenzielle Bildgebung



**Abbildung 17.** Aktive Kontrolle der Emitterkonzentration ermöglicht superhochauflösende Mikroskopie. Aus Lit. [155].

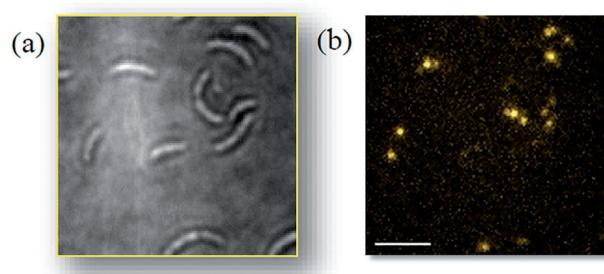
renden Objekts emittieren (PAINT, points accumulation for imaging in nanoscale topography).<sup>[143]</sup> Die Methode basiert auf der photophysikalischen Eigenart bestimmter Moleküle, erst dann zu leuchten, wenn sie gebunden oder in ihrer Bewegung eingeschränkt sind. Sie demonstrierten ihre Idee anhand des verschränkten intermolekularen Charge-Transfer(TICT)-Zustands von Nile Red.<sup>[144]</sup> Ein Vorzug von PAINT besteht darin, dass das abzubildende Objekt nicht markiert werden muss und dass viele einzelne Fluorophore für die Rekonstruktion des Bildes verwendet werden, was die Anforderung lockert, möglichst viele Photonen von jedem einzelnen Molekül zu detektieren.

Andere aktive Kontrollmechanismen erschienen ebenfalls schnell, beispielsweise dSTORM<sup>[145]</sup> (direct STORM), GSDIM (ground-state depletion with intermittent return),<sup>[146]</sup> Blinken der Fluorophore wie bei der BLINK-Mikroskopie,<sup>[147]</sup> SPDM (spectral precision determination microscopy)<sup>[148]</sup> und weitere. Die Liste ließe sich fortführen. Im Jahr 2008 setzte Julie Biteen in meinem Labor den Mechanismus der Wiederherstellung der EYFP-Fluoreszenz ein, um superhochauflösende Mikroskopie in Bakterien durchzuführen;<sup>[149]</sup> aber da wir dafür kein neues Akronym erfanden, wurde dieser Arbeit wenig Aufmerksamkeit gewidmet. Aus diesem Grund verwenden wir in meiner Gruppe, um scherhaft ein neues Akronym einzuführen, das unabhängig vom Mechanismus ist, inoffiziell SMACM, was für single-molecule-active control microscopy steht. So oder so, die zugrundeliegende Idee ist sehr allgemein, und PALM war der Anfang. Es gibt auch photochemische Methoden, um einzelne Moleküle anzuschalten;<sup>[150]</sup> und sogar enzymatische Methoden wurden eingeführt, bei denen das Einschalten durch die Konzentration des Substrats und der Rate des Enzyms beeinflusst werden kann.<sup>[151]</sup> Der Experimentator muss aktiv irgendeine Methode wählen, um die Konzentration der Emitter zu steuern. Natürlich geschieht das Generieren des Bildes nach wie vor sequenziell, weshalb dieser Ansatz am besten zu quasi-statischen Strukturen oder fixierten Zellen passt. Gleichwohl sind erhebliche Fortschritte hinsichtlich der Erhöhung der Bildrate gemacht worden.<sup>[152]</sup> Ausgewählte Übersichtsartikel können herangezogen werden, um weitere Details der Herausforderungen und Fortschritte von heute zu erfahren.<sup>[153–161]</sup>

#### 4.5. Anwendungen und Entwicklungen superhochauflösender Mikroskopie im Moerner-Labor

Seit den frühen 2000er Jahren hat mein Labor an der Fakultät für Chemie der Stanford University eine fruchtbare Kooperation mit dem Mikrobiologie- und Entwicklungsbioologie-Labor von Lucy Shapiro, um fortgeschrittene superhochauflösende Mikroskopie zur Untersuchung der Lokalisationsmuster von Regulationsproteinen in einem besonders interessanten Bakterium einzusetzen, *Caulobacter crescentus*. Da Bakterien sehr klein sind — nur wenige Mikrometer breit und lang —, ist schon die Größe des ganzen Organismus nahe am Beugungslimit. Superhochauflösende Mikroskopie ist hier ein großer Vorteil. Aus diesem Grund, wie im letzten Abschnitt erwähnt, begannen wir im Jahr 2007 die superhoch-

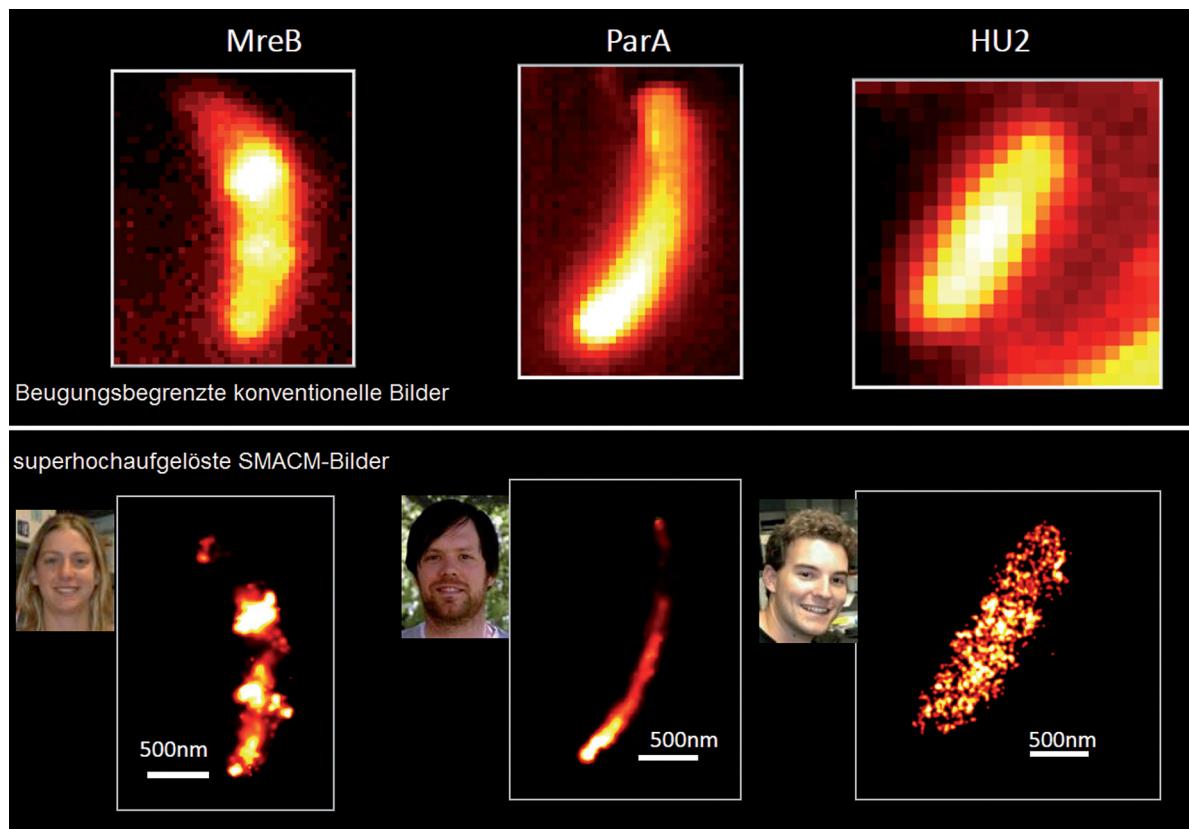
#### Wie die Daten aussehen...



**Abbildung 18.** Rohdaten, die das Blinken einzelner EYFP-Proteine zeigen, die an Zielproteine in *Caulobacter*-Bakterien angeheftet wurden. a) Durchlichtbild. b) Einzelner 10-ms-Frame der Fluoreszenzbilder, Maßstabsbalken 5 µm.

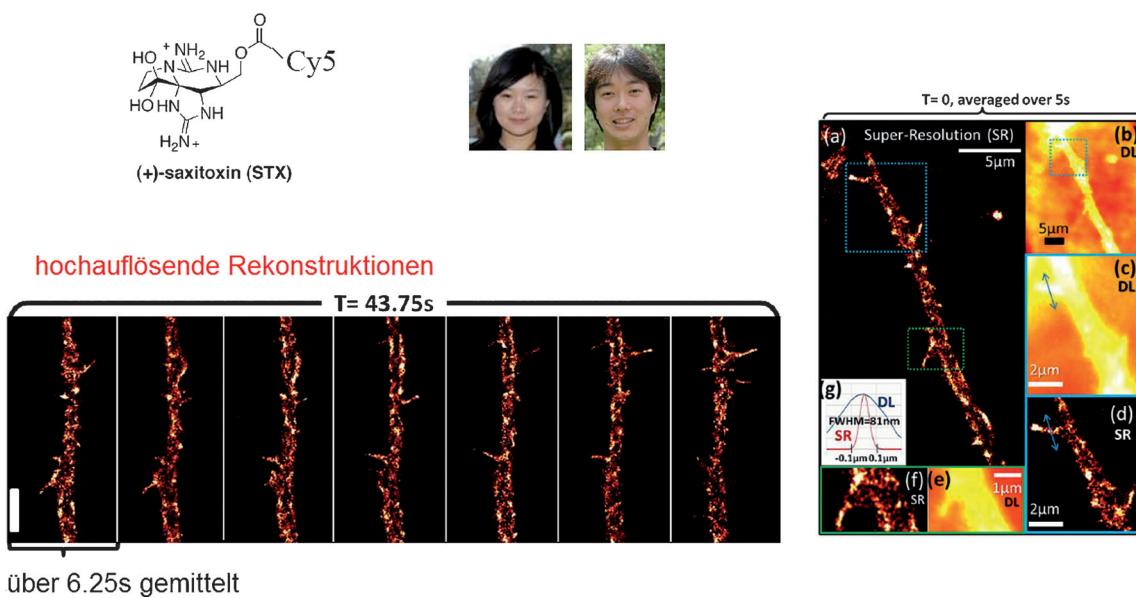
auflösende Visualisierung einzelner Moleküle in Bakterien, wobei wir die von uns 1997<sup>[2]</sup> entdeckte photoinduzierte Fluoreszenzwiederherstellung und/oder das Blinken einzelner EYFP-Moleküle als aktiven Kontrollmechanismus einsetzen. Abbildung 18 verdeutlicht, wie die Rohdaten tatsächlich aussehen: Abbildung 18a zeigt ein Durchlichtbild einiger Zellen und Abbildung 18b einen einzelnen Frame nach vorherigem Bleichen. An vielen 10–50 ms-Frames wie diesem wird dann Superlokalisierung durchgeführt und ein superhochauflösendes Bild rekonstruiert.

Abbildung 19 führt einige der superhochauflösten Bilder auf, die wir in den letzten Jahren in drei *Caulobacter*-Studien anfertigten. Die obere Reihe zeigt, was in beugungsbegrenzter konventioneller Fluoreszenzmikroskopie beobachtet wird, die untere Reihe zeigt superhochauflöste SMACM-Bilder derselben Zellen. In jeder Spalte wurde ein anderes Zielprotein mit EYFP fusioniert. Spalte 1 zeigt Ergebnisse meiner damaligen Postdoktorandin Julie Biteen über das zytoskelettale Protein MreB. Es scheint eine quasihelikale Struktur auszubilden.<sup>[149]</sup> (Spätere Arbeiten wiesen darauf hin, dass diese Struktur vermutlich ein Artefakt ist und von dem fluoreszierenden Proteinkonstrukt herrührt, das eingesetzt wurde.<sup>[162]</sup> Superhochauflösung stellt natürlich höhere Auflösungen zur Verfügung, sodass derartige Effekte beobachtbar werden, weshalb besondere Vorsicht geboten ist, damit die Markierungen keine Störungen verursachen und weshalb verbesserte Markierungen entwickelt werden müssen.) Spalte 2 zeigt Ergebnisse über die ParA-Proteine, die aus der Zusammenarbeit zwischen Jerod Ptacin aus Lucy's Labor und meinem Postdoc Steven Lee stammen.<sup>[163]</sup> ParA ist an der Chromosomensegregation beteiligt und ist während dieses Prozesses in einer engen, linearen Struktur lokalisiert, die entlang der Zellachse verläuft und die während der Translokation des chromosomalen Ursprungs vom alten zum neuen Pol wandert. Schließlich zeigt Spalte 3 Daten aus fixierten Zellen über das Nukleotid-bindende Protein HU2, eine Arbeit von Steven Lee und meinem Doktoranden Mike Thompson.<sup>[164]</sup> Da HU2 unspezifisch an viele Orte auf dem Chromosom bindet, sind die Lokalisationen aufschlussreich über die intrazelluläre DNA-Verteilung, die durch Spatial-Point-Statistiken ausgewertet werden können. Insgesamt zeigen diese Bilder, wie wichtig superhochauflösende Mikroskopie ist, um Details zu visualisieren, die zuvor nicht



**Abbildung 19.** Superhochauflöste Abbildung dreier verschiedener Proteine in *Caulobacter*: MreB,<sup>[149]</sup> ParA,<sup>[163]</sup> HU2.<sup>[164]</sup> Photos (links nach rechts): Julie Bitten, Stephen Lee, Mike Thompson.

### Superhochauflösendes Sampling von Nav-Verteilungen auf PC-12-Modellzellen mit STX-fluor und zielspezifischem PAINT



**Abbildung 20.** Beispiel für die superhochauflöste Bildgebung von Zellen unter Verwendung eines fluoreszierenden Saxitoxinliganden, der an Ionenkanäle auf der Zelloberfläche bindet. Maßstabsbalken in der linken Bilderserie: 5  $\mu$ m. Aus Lit. [168]. Photos: Hsiao-lu Lee, Shigeki Iwanaga.

beobachtet werden konnten, weshalb heute superhochauflösende Mikroskopie häufig für die Untersuchung von Bakterien eingesetzt wird.<sup>[165-167]</sup>

Natürlich ist auch Superhochauflösung in eukaryotischen Zellen ein wichtiges Forschungsfeld. In Abbildung 20 nehme ich ein Beispiel aus meinem Labor auf, bei dem aktive Kontrolle auf eine neuartige Weise bewerkstelligt wurde, die man als zielspezifisches PAINT bezeichnen könnte. Dies wurde durch Zusammenarbeit mit dem Labor für synthetische Chemie von Justin Du Bois in Stanford ermöglicht.<sup>[168]</sup> Alison Ondrus, eine Postdoc bei Du Bois, schaffte es, das hochwirksame Neurotoxin Saxitoxin (STX, Abbildung 20) mit einer kovalent angehängten Fluoreszenzmarkierung wie Cy5 zu synthetisieren. STX bindet und blockiert spannungsabhängige Natrium( $Na_V$ )-Kanäle. Meine Doktorandin Hsiao-lu Lee und unser Gastwissenschaftler Shigeki Iwanga ließen PC12-Zellen auf einem Objektträger wachsen, induzierten sie, damit sie in neuronenartige Zellen ausdifferenzierten, und konnten dann einfach die Lösung über den Zellen mit STX-Cy5 versetzen. In Lösung lässt sich das Konstrukt nicht leicht abbilden, weil es sich so schnell bewegt. Diffusion bringt STX-Cy5 an die Zelloberfläche, wo das Molekül an die  $Na_V$ -Kanäle bindet und ein helles Fluoreszenzsignal erzeugt, das für Superlokalisierung verwendet werden kann. Die Markierung bleicht dann und dissoziert von der Zelle, was neuen Liganden die Möglichkeit zu binden gibt. Indem ein Film aufgenommen wurde, konnten viele Einzelmoleküllokalisierungen durchgeführt und aus ihnen eine superhochauflösende Rekonstruktion der  $Na_V$ -Kanalpositionen in der Zellmem-

bran angefertigt werden. Abbildung 20 zeigt Daten, die von axonartigen Projektionen gewonnen wurden, während die Bilder auf der rechten Seite beugungsbegrenzte und superhochauflösende Rekonstruktionen vergleichen. Durch Gruppieren aller Lokalisationen innerhalb eines 6.25 s großen Intervalls kann man an der Bilderserie links die Veränderung der Zelle über die Zeit verfolgen, in deren Verlauf verschiedene neuritische Auswüchse, mit Größen unterhalb des Beugungslimits, ausgestülppt und wieder zurückgezogen werden. Es war ebenfalls möglich, zeitabhängige Bilder auf einer Zeitskala von 500 ms durch gleitende Rechtecksfunktion-Mittelung (vgl. Supporting Information von Lit. [168]) aufzunehmen. Mit dieser Methode kann also zeitabhängiges Verhalten mit einer vernünftigen Auflösung beobachtet werden, wobei das Beugungslimit trotzdem deutlich übertrffen wird.

Eine weitere kürzlich vorgestellte Anwendung von PALM/SMACM auf eukaryotischen Zellen widmet sich dem Abbilden von Huntingtin(Htt)-Proteinaggregaten in Zellen. Das Htt-Protein führt zur neurodegenerativen Erkrankung Chorea Huntington, wenn seine Polyglutaminsequenz unnatürlich verlängert ist. Superhochauflösende Bilder der Aggregatstrukturen wurden in vitro von meiner Doktorandin Whitney Dium angefertigt.<sup>[169,170]</sup> In einer Kooperation mit dem Labor von Judith Frydman in Stanford transfizierten mein Postdoc Steffen Sahl und der Doktorand Lucien Weiss die neuronalen Modellzellen PC12m mit der pathogen veränderten Form des Exons 1 des Htt-Proteins, an das ein EYFP-gekuppelt war, und untersuchten die Fluoreszenz von



## Strukturen von Huntingtinproteinaggregaten in Zellen

Mutation von Huntingtin (Htt) durch Erweiterung des Polyglutamin(PolyQ)-Abschnitts verursacht Huntington-Krankheit (HD)

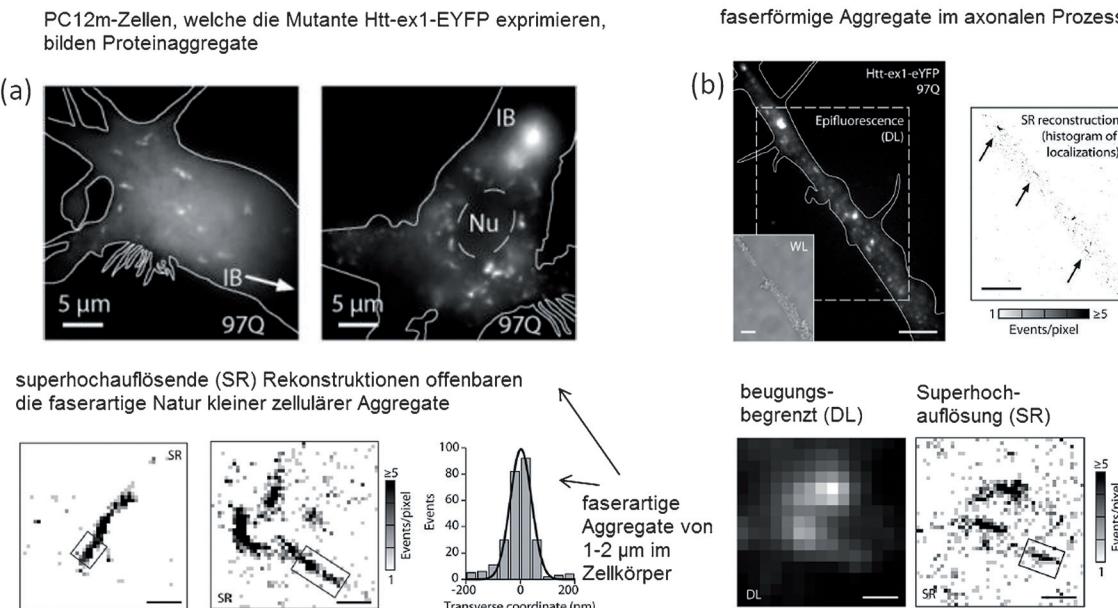


Abbildung 21. Superhochauflösende Detektion von fibrillären Htt-Aggregaten in Zellen. a) Zellkörper. Maßstabsbalken in den unteren Bildern: 500 nm. b) Axonale Prozesse. Maßstabsbalken in den oberen Bildern: 5 μm, in den unteren Bildern: 500 nm. Photos: Steffen Sahl, Lucien Weiss. Aus Lit. [171].

lebenden und fixierten Zellen zu verschiedenen Zeitpunkten nach der Transfektion.<sup>[171]</sup> Es erwies sich als kritisch für den Ausgang des Experiments, dass vor der Detektion des Blinns einzelner EYFP-Moleküle gezieltes Photobleichen der äußerst hellen Einschlussskörper (IB) durchgeführt wurde. Dadurch wurde es möglich, die winzigen Aggregatspezies in der Zelle zu beobachten, wie in Abbildung 21 a gezeigt. Superhochauflöste Rekonstruktionen mit umgekehrtem Kontrast zeigen, dass diese Aggregate schmale, fibrilläre Strukturen aufweisen. In axonartigen Projektionen der Zellen (Abbildung 21 b) wurden ebenfalls verschiedene kleine Aggregate in Superhochauflösung beobachtet. Bis heute ist es nicht vollständig geklärt, ob diese Aggregate selbst toxisch sind oder das Produkt eines zellulären Prozesses, der sie entfernen soll; aber es ist ein wichtiger Anfangspunkt, diese Strukturen zu visualisieren und zu quantifizieren, um die Krankheit besser zu verstehen, weshalb diese Methode auch für andere neurodegenerative Erkrankungen eingesetzt wird.

Am Ende dieser sehr kurzen Zusammenfassung von Superhochauflösung mit einzelnen Molekülen möchte ich einige der zentralen Herausforderungen sowie gegenwärtige Entwicklungen des Feldes anhand von Abbildung 22 erwähnen. Auf jeden Fall gibt es einen großen Bedarf an verbesserten Fluorophoren, insbesondere an Molekülen, die nach Bedarf ein- und ausgeschaltet werden können und mehr Photonen emittieren als beispielsweise fluoreszierende Proteine. Kleine organische Moleküle weisen generell etwa zehnmal mehr insgesamt emittierte Photonen auf als fluoreszierende Pro-

teine und sollten auch das System weniger stören, weshalb die Kombination solcher Moleküle mit einem photochemischen oder photophysikalischen Mechanismus, durch den man sie ein- und ausschalten kann, sehr wünschenswert wäre. (Unzweifelhaft ist es auch notwendig, solche Moleküle dann an die zu untersuchenden Biomoleküle anzubringen. Auch in diesem Bereich werden große Anstrengungen unternommen.) Die linke Seite von Abbildung 22 zeigt ein photoschaltbares Rhodamin-Spirolactam, das von Prabin Rai im Labor meines Kooperationspartners Robert Twieg an der Kent State University modifiziert wurde, sodass es durch blaues und nicht mehr durch ultraviolettes Licht eingeschaltet werden kann, indem sich der Lactamring öffnet.<sup>[172]</sup> Durch den Einsatz eines *N*-Hydroxysuccinimidderivats konnte es meine Doktorandin Marissa Lee kovalent an der Oberfläche lebender *Caulobacter*-Zellen anbringen und damit superhochauflöste Bilder der Zelloberfläche anfertigen. Die Bilder im unteren Teil zeigen, dass diese Methode hervorragende Rekonstruktionen mit vielen Lokalisationen erzeugt, wobei die Ausbuchtungen des Bakteriums mit Größen unterhalb des Beugungslimits leicht erfasst und quantifiziert werden können.

Weiterhin wird intensiv daran geforscht, superhochauflösende Mikroskopie von zwei Dimensionen zu drei Dimensionen, *x*, *y* und *z*, zu führen. Während manche Forscher Astigmatismus<sup>[173]</sup> oder Multiplane-basierte<sup>[174,175]</sup> Bilderfassung oder noch andere Ansätze verfolgen, hat sich meine Arbeitsgruppe auf fortgeschrittene Methoden der optischen

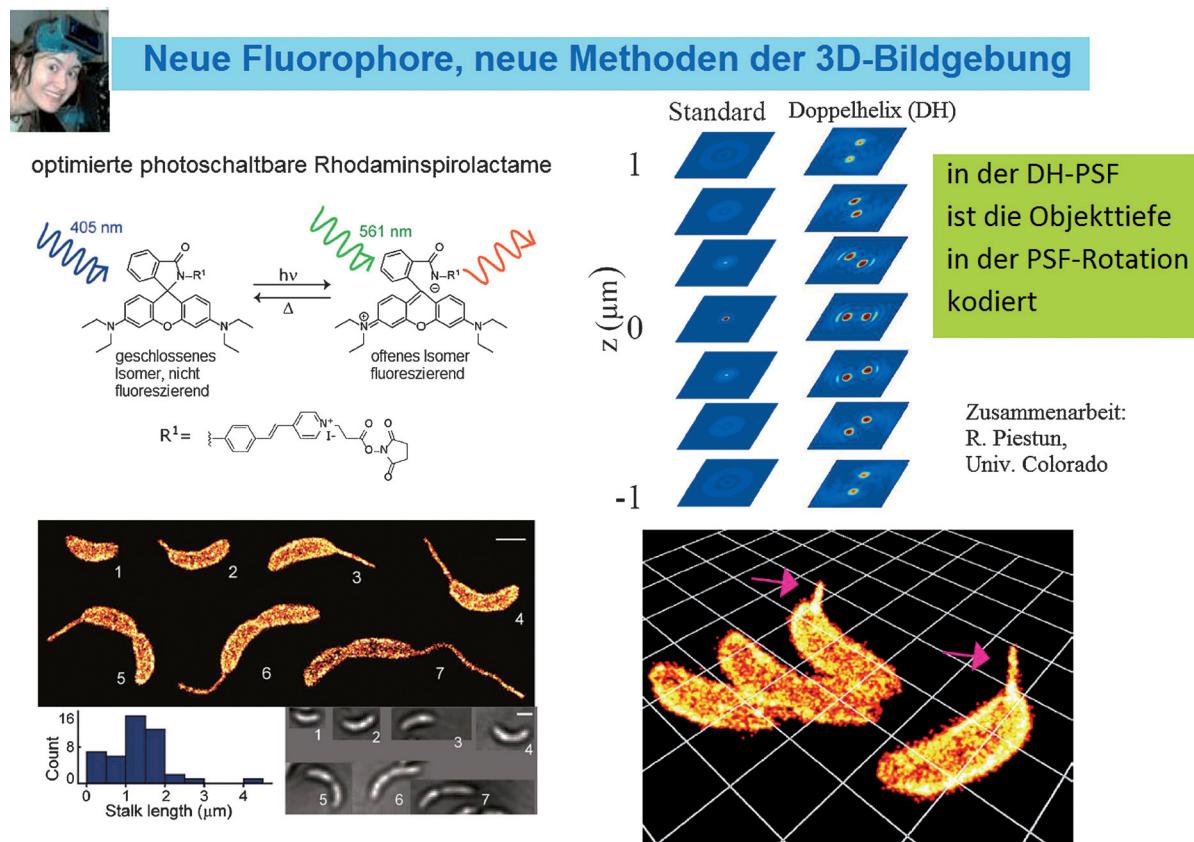


Abbildung 22. Neue photoschaltbare Fluorophore (links) und Strategien für dreidimensionale Mikroskopie (rechts) Photo: Marissa Lee. Aus Lit. [172].

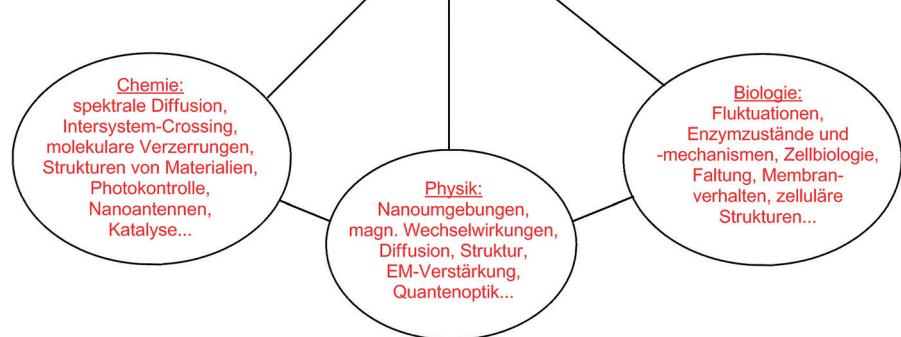
Pupil-Plane-Fourier-Prozessierung konzentriert,<sup>[176]</sup> um die  $z$ -Position des einzelnen Moleküls direkt in der Form der PSF selbst zu kodieren. Unser erster Schritt in diesem Feld war es, zusammen mit Rafael Piestun von der University of Colorado zu demonstrieren, dass die Doppelhelix-PSF (DH-PSF) für die Mikroskopie einzelner Moleküle verwendet werden kann.<sup>[177]</sup> Das obere Bild auf der rechten Seite von Abbildung 22 zeigt, dass die DH-PSF den normalen einfachen Punkt eines einzelnen Moleküls in zwei Punkte umwandelt, die abhängig von der  $z$ -Position des Moleküls umeinander kreisen. Der Winkel der Verbindungsline dieser zwei Punkte transportiert die  $z$ -Position gleichzeitig für alle Moleküle in einem Bild über eine Fokustiefe von 2  $\mu\text{m}$ . Dieser Ansatz weist eine überlegene Fisher-Information und darum eine höhere Genauigkeit der Lokalisierung auf als die anderen Ansätze.<sup>[178]</sup> Wir konnten durch die

DH-PSF in zwei Farben zwei verschiedene fluoreszierende Fusionsproteine in *Caulobacter* untersuchen.<sup>[159,179]</sup> Die untere Hälfte von Abbildung 22 zeigt die Anwendung der DH-PSF-Methode für das Abbilden der dreidimensionalen Oberfläche von *Caulobacter*, die mit dem Rhodamin-Spiro-lactam markiert wurde.<sup>[172]</sup> Viel bleibt noch zu tun. Es werden immer wieder neue PSF-Designs entwickelt,<sup>[180–182]</sup> die alle nur ein Ziel haben: auf eine möglichst effiziente Art möglichst viel Information aus jedem der winzigen Einzelmolekülemitter zu gewinnen.

## 5. Abschließende Bemerkungen und Dank

In diesem Beitrag wurden die frühen Schritte dargestellt, die zu den ersten Detektionen und spektroskopischen Untersuchungen einzelner Moleküle führten.<sup>[1,27]</sup> Mit den Experimenten zum Abbilden einzelner Moleküle bei tiefen Temperaturen in den frühen 90er Jahren wurden viele physikalische Effekte entdeckt, etwa spektrale Diffusion und lichtaktiviertes Schalten, die später in den Experimenten bei Raumtemperatur in anderer, aber ähnlicher Weise erneut auftauchten. Das überraschende Blinken und Schalten einzelner GFP-Moleküle bei Raumtemperatur ermöglichte die aktive Kontrolle, die für superhochauflösende Mikroskopie durch PALM und ähnliche Methoden erforderlich war. Heute ist superhochauflösende Mikroskopie eine leistungsfähige Anwendung einzelner Moleküle, die großen Einfluss auf viele verschiedene Gebiete hat (Abbildung 23). Neue, faszinierende Entdeckungen werden nach wie vor gemacht, etwa die Beobachtung von Actinbändern in Axonen.<sup>[183]</sup> All das ist nicht nur durch meine Anstrengungen geschehen, sondern

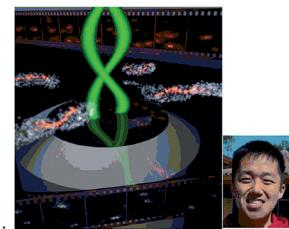
## Anwendungen der Einzelmolekülspektroskopie und -bildung



Viele talentierte Wissenschaftler weltweit befassen sich mit der Erforschung einzelner Moleküle und erzielen weiterhin bahnbrechende Beiträge!

FRET: TJ Ha, S Weiss, ...  
Enzyme: XS Xie, H Yang, ...  
RNA-Faltung, Aktinbänder: X Zhuang, ...

und viele andere Gebiete: Motoren, DNA-Prozessierung, DNA-Dynamik, Genexpression, Kernporen, RNA/Proteine in Zellen, Chaperonine, Vireneintritt, Quantenoptik, neue Markierungen, 3D, ...



**Abbildung 23.** Einfluss der Spektroskopie und Bildgebung einzelner Moleküle mit ausgewählten Beispielen: Mehrfarben-3D-Bild intrazellulärer Proteine und der Zelloberfläche. Zur Verfügung gestellt von Matthew Lew (Photo); vgl. Lit. [179].

zum großen Teil auch durch die kluge und fundierte Forschung, die von vielen Forschern auf der ganzen Welt durchgeführt wurde, die zu zahlreich sind, um sie alle an dieser Stelle zu nennen. Neben superhochauflösender Mikroskopie führt auch das schlichte Beobachten einzelner Moleküle und ihrer Eigenschaften zu immer neuen, begeisterten Ergebnissen — sei es durch das Verfolgen ihrer Bewegung,<sup>[184]</sup> durch das Untersuchen biomolekularer Interaktionen und Konformationen durch FRET,<sup>[185,186]</sup> durch das Aufdecken von Photodynamiken gefangener einzelner Moleküle<sup>[187,188]</sup> oder auch durch das Bestimmen enzymatischer Mechanismen.<sup>[189]</sup> Die Zukunft der Einzelmolekülspektroskopie und der superhochauflösenden Mikroskopie ist strahlend.

Ich schätze mich glücklich, dass ich durch meine ganze wissenschaftliche Karriere hindurch das Privileg hatte, mit einer Gruppe brillanter und außergewöhnlicher Studenten und Postdocs zu arbeiten. Die Ehemaligen aus dem Moerner-Labor sind in Abbildung 24 aufgeführt. Ich möchte jedem von ihnen für ihre harte Arbeit und ihre Einsichten danken. Ich bin auch meinen gegenwärtigen Studenten und Postdocs sehr dankbar. Abbildung 25 zeigt meine Gruppe nahe dem Rodin Sculpture Garden an Halloween, neben unserem „No Ensemble Averaging“-Logo von Sam Lord. Das Bild erklärt auch, warum wir ein Molekül gerne als ein „Guacamole“ von Teilchen bezeichnen! Meine Ausbildung und meine Forschung seit meinen Jahren auf dem College wurden von einer Menge wunderbarer Kooperationspartner und Kollegen bereichert, die ich in Abbildung 26 aufführe; und ich habe es wirklich genossen, Schüler von vielen unter ihnen zu sein. Ich bin mir sicher, dass ich einige vergessen habe, wofür ich um Entschuldigung bitte. Natürlich schulde ich besonderen pri-

vaten und beruflichen Dank meinen großartigen Mentoren, den Institutionen, an denen ich tätig war, den verschiedenen Fördereinrichtungen, den Verwaltungen und Mitarbeitern, die meine Arbeit unterstützen und in Abbildung 27 aufgeführt sind. Schließlich danke ich zutiefst meiner Familie und meinen engen Freunden, die in Abbildung 28 gezeigt sind und die mir während der vielen Herausforderungen über die Jahre hinweg zuhörten und mir mit Rat zur Seite standen. Meine Eltern opferten viel für mich und waren mit ständiger Liebe und Unterstützung an meiner Seite. Ich habe auch die vielen guten Wünsche und die Bestärkung von meinen anderen Familienmitgliedern sehr genossen. Mein Sohn Daniel, ein wissbegieriger und sorgfältiger Denker, hört mir stets zu und begeistert mich immer wieder aufs Neue, was mir eine ununterbrochene Inspiration für die Zukunft ist. Meine Frau Sharon war mir während unserer gesamten Ehe eine unersetzliche Quelle der Liebe, der Gemeinschaft, der Geduld und der Bestärkung. Ich kann ihr nicht genug danken.

**IBM Almaden Research Ctr, San Jose:**

- Dr. Alan Huston
- Dr. Howard Lee
- Dr. Thomas Carter
- Dr. Lothar Kador
- Dr. W. Pat Ambrose
- Prof. Dr. Thomas Basché
- Prof. Anne Myers
- Dr. Paul Tchenio
- Dr. Jürgen Köhler
- Prof. Stephen Ducharme
- Dr. Peggy Walsh
- Dr. John Stankus
- Dr. Scott Silence
- Dr. Constantina Poga
- Dr. Yiwei Jia

**University of California, San Diego:**

- Ms. Courtney Thompson
- Dr. David J. Norris
- Dr. Anders Grunnet-Jepsen
- Dr. Susanna Kummer
- Dr. Rob Dickson
- Dr. Maria Diaz-Garcia
- Mr. James Frazier
- Mr. Tim Marsh
- Ms. Julie Casperson
- Ms. Laura Neaurter
- Mr. Bany Smith

**Stanford University:**

- Dr. Erwin J. G. Peterman
- Dr. Arosha Goonesekera
- Dr. Sophie Brasselet
- Dr. Brahmin Louis
- Mr. André Leopold
- Mr. Erik Bjerneld
- Mr. Shuaomu Sudhakhan
- Ms. Yeonduk Roh
- Dr. Ueli Gubler
- Dr. Dan Wright
- Dr. Matt Paige
- Dr. Oksana Ostrovskaya
- Dr. Stephan Hess
- Dr. Marjan Vlijic
- Dr. Jason Deich
- Mr. Jahan Schleifer-Smith
- Dr. Kallie Willets
- Dr. Hans-Philipp Lerch
- Dr. Stefanie Nishimura
- Dr. David P. Fromm
- Dr. P. James Schuck
- Ms. Jennifer Alyono
- Dr. Jaesuk Hwang
- Mr. Kit Werley
- Dr. Hanhsin Hwang
- Mr. Naveneen Sinha
- Dr. Adam E. Cohen
- Dr. Laurent Coolen
- Dr. Marcelle Koenig
- Dr. Andrea Kurtz
- Dr. So Yeon Kim
- Dr. Frank Jaekel
- Ms. Nicole Tselenitis
- Dr. Magnus Hs
- Dr. Nick Conley
- Dr. Julie Bitten
- Dr. Sam Lord
- Dr. Shigeki Iwanaga
- Dr. Anika Kinkhabwala
- Dr. Alexandre Fuerstenberg
- Mr. Andrey Andreev
- Dr. Jiawei Liu
- Dr. Steven F. Lee
- Dr. Mojtaba Badieirostami
- Dr. Randall Goldsmith
- Dr. Michael Thompson
- Mr. Alex Chang
- Dr. Heino-Ju Denise Lee
- Ms. Yao Yue
- Dr. Whitney Duim
- Dr. Yan Jiang
- Ms. Katie Evans
- Dr. Lata Lai
- Dr. Sam Bockenhauer
- Dr. Andreas Giehmann
- Dr. Steffen Sahl
- Dr. Gabriela Schlau-Cohen
- Dr. Matthew Lew
- Prof. Michael Börsch

**Abbildung 24.** Ehemalige Mitarbeiter des Moerner-Labors.



ein Molekül = ein Guacamol  
(d.h. 1 geteilt durch Avogadros Zahl,  $1/N_A$  mol)  
(mit Entschuldigungen an das Andenken von Amadeo Avogadro)



**Abbildung 25.** Das aktuelle Guacamole-Team.

**Washington University:**

- Jan Brown, Harry Ringermacher, Marjorie Yuhas, ...

**Cornell University**

- Yves Chabal, Aland Chin, Andy Chraplyvy, Fred Pinkerton, Eric Schiff, Don Trotter, ...

**IBM Research:**

- Gary C. Bjorklund, Christoph Bräuchle (TU Munich), Don Burland, Bryan Kohler (Wesleyan), Bill Lenth, Marc Levenson, Roger MacFarlane, Chris Moylan, Michel Orrit (CNRS), Jan Schmidt (Leiden), Robert Shelby, Campbell Scott, Robert Twieg, ...

**ETH Zürich:**

- Bert Hecht, Thomas Ingartinger, Viktor Palm, Taras Plakhotnik, Dieter Pohl (IBM), Aleks Rebane, Urs P. Wild, ...

**UCSD:**

- Larry Goldstein, Jay Siegel, Susan Taylor, Mark Thiemens, Roger Tsien, Bruno Zimm, ...

**Stanford:**

- Thijs Aartsma (Leiden), Steve Boxer, Chris Calderon (Numerica), Gerard Canters (Leiden), Wah Chiu (BCM), Justin DuBois, Shanhui Fan, Gordon Kino, Eric Kool, Harden McConnell, Rafael Peistun (CU), Ljiljana Milenkovic, Matthew Scott, Lucy Shapiro, Andy Spakowitz, Tim Stearns, Bob Waymouth, Karsten Weis (UCB), Paul Wender, and many more

**Abbildung 26.** Meine Kooperationspartner/Kollegen.

**Mentors:**

- High School (Thomas Jefferson): Mrs. Blanche Rodriguez, Dr. Richard G. Domey (Bioengineering, UTMSSA)
- Undergrad (Wash U): James G. Miller
- Graduate (Cornell): Albert J. Sievers III
- Professional:
  - IBM: Gary C. Bjorklund, Dan Auerbach, Jerry Swalen, George Castro, Grant Willson
  - UCSD: Kent Wilson, Katja Lindenberg
  - Stanford: Harden McConnell, Dick Zare, Michael Fayer



Funding: U. S. Agencies: ONR, NSF, NIH-NIGMS, NIH-NEI, DOE-BES



**Institutions post PhD:**

- IBM Research, San Jose and Almaden Research Centers
- ETH Zurich (Guest Professor of Urs P. Wild)
- The University of California, San Diego, Dept. Chemistry and Biochemistry
- Stanford University, Department of Chemistry
- Administrators and Staff, Administrative Assistants Kathi Robbins, Ann Olive

**Abbildung 27.** Meine Mentoren und Geldgeber.

Freunde: Burr Stewart, Ed Snyder, Dave Palmer und viele mehr  
Schwiegereltern: Ruth und Michel Stein  
Eltern: William A. und Frances R. Moerner; Stiefmutter: Maria Esther Moerner



Frau und Sohn: Sharon S. Moerner und Daniel E. Moerner und meine gesamte Familie!



**Abbildung 28.** Meine Familie und Freunde.

**Zitierweise:** Angew. Chem. Int. Ed. 2015, 54, 8067–8093

Angew. Chem. 2015, 127, 8182–8210

- [1] „Optical detection and spectroscopy of single molecules in a solid“: W. E. Moerner, L. Kador, *Phys. Rev. Lett.* **1989**, *62*, 2535–2538.
- [2] „On/Off blinking and switching behavior of single molecules of green fluorescent protein“: R. M. Dickson, A. B. Cubitt, R. Y. Tsien, W. E. Moerner, *Nature* **1997**, *388*, 355–358.
- [3] „Laser spectroscopy of trapped atomic ions“: W. M. Itano, J. C. Bergquist, D. J. Wineland, *Science* **1987**, *237*, 612.
- [4] „Laser experiments with single atoms as A test of basic physics“: F. Diedrich, J. Krause, G. Rempe, M. O. Scully, H. Walther, *IEEE J. Quantum Electron.* **1988**, *24*, 1314.
- [5] „Experiments with an isolated subatomic particle at rest“: H. Dehmelt, *Rev. Mod. Phys.* **1990**, *62*, 525–530.
- [6] „Scanning tunneling microscopy—from birth to adolescence“: G. Binnig, H. Rohrer, *Rev. Mod. Phys.* **1987**, *59*, 615.
- [7] „Atomic force microscope“: G. Binnig, C. F. Quate, C. Gerber, *Phys. Rev. Lett.* **1986**, *56*, 930–933.
- [8] „Single-channel currents recorded from membrane of denervated frog muscle fibres“: E. Neher, B. Sakmann, *Nature* **1976**, *260*, 799–802.
- [9] „Are there quantum jumps? part II“: E. R. J. A. Schrödinger, *Br. J. Phil. Sci.* **1952**, *3*, 233–242.
- [10] a) M. Pope, C. E. Swenberg, *Electronic Processes in Organic Crystals and Polymers*, Oxford Univ. Press, London, **1999**; b) „Absorption, excitation, and emission spectroscopy of terylene in p-terphenyl: Bulk measurements and single molecule studies“: S. Kummer, F. Kulzer, R. Kettner, T. Basché, C. Tietz, C. Glowatz, C. Kryschi, *J. Chem. Phys.* **1997**, *107*, 7673–7684.
- [11] „Radiationless relaxation and optical dephasing of molecules excited by wide- and narrow-band lasers. II. pentacene in low-temperature mixed crystals“: T. E. Orlowski, A. H. Zewail, *J. Chem. Phys.* **1979**, *70*, 1390–1426.
- [12] „Shapes of inhomogeneously broadened resonance lines in solids“: A. M. Stoneham, *Rev. Mod. Phys.* **1969**, *41*, 82.
- [13] „The effect of fine structure appearance in laser-excited fluorescence spectra of organic compounds in solid solutions“: R. I. Personov, E. I. Al'Shits, L. A. Bykovskaya, *Opt. Commun.* **1972**, *6*, 169–173.
- [14] „High-resolution spectroscopy of organic molecules in solids: From fluorescence line narrowing and hole burning to single molecule spectroscopy“: M. Orrit, J. Bernard, R. I. Personov, *J. Phys. Chem.* **1993**, *97*, 10256–10268.
- [15] „Fluorescence transient and optical free induction decay spectroscopy of pentacene in mixed crystals at 2 K. determination of intersystem crossing and internal conversion rates“: H. de Vries, D. A. Wiersma, *J. Chem. Phys.* **1979**, *70*, 5807.
- [16] „Coherent optical transient studies of dephasing and relaxation in electronic transitions of large molecules in the condensed phase“: D. A. Wiersma, *Adv. Chem. Phys.* **1981**, *47*, 421.
- [17] „Dynamics in low temperature glasses: Theory and experiments on optical dephasing, spectral diffusion, and hydrogen tunneling“: M. Berg, C. A. Walsh, L. R. Narasimhan, K. A. Littau, M. D. Fayer, *J. Chem. Phys.* **1988**, *88*, 1564–1587.
- [18] „Hole burning in the contour of a pure electronic line in a Shpol'skii system“: A. A. Gorokhovskii, R. K. Kaarli, L. A. Rebane, *JETP Lett.* **1974**, *20*, 216.
- [19] „Stable “gap,” in absorption spectra of solid solutions of organic molecules by laser irradiation“: B. M. Kharlamov, R. I. Personov, L. A. Bykovskaya, *Opt. Commun.* **1974**, *12*, 191–193.
- [20] „Molecular electronics for frequency domain optical storage: Persistent spectral hole-burning – a review“: W. E. Moerner, *J. Mol. Electron.* **1985**, *1*, 55–71.
- [21] W. E. Moerner, *Persistent Spectral Hole-Burning: Science and Applications (Top. Curr. Phys. 44)*, Springer, Berlin, **1988**.
- [22] „Photochemical hole burning: A spectroscopic study of relaxation processes in polymers and glasses“: J. Friedrich, D. Haarer, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1984**, *23*, 113–140; *Angew. Chem.* **1984**, *96*, 96–123.
- [23] „Mechanisms of non-photochemical hole-burning in organic glasses“: J. M. Hayes, G. J. Small, *Chem. Phys. Lett.* **1978**, *54*, 435–438.
- [24] „Non-photochemical hole burning and impurity site relaxation processes in organic glasses“: J. M. Hayes, G. J. Small, *Chem. Phys.* **1978**, *27*, 151–157.
- [25] „From spectral holeburning memory to spatial-spectral microwave signal processing“: W. R. Babbitt, Z. W. Barber, S. H. Bekker, M. D. Chase, C. Harrington, K. D. Merkel, R. K. Mohan, T. Sharpe, C. R. Stiffler, A. S. Traxinger, A. J. Woidtke, *Laser Phys.* **2014**, *24*, 094002.
- [26] „Can single-photon processes provide useful materials for frequency-domain optical storage?“: W. E. Moerner, M. D. Levenson, *J. Opt. Soc. Am. B* **1985**, *2*, 915–924.
- [27] „Statistical fine structure in inhomogeneously broadened absorption lines“: W. E. Moerner, T. P. Carter, *Phys. Rev. Lett.* **1987**, *59*, 2705.
- [28] „Statistical fine structure in the inhomogeneously broadened electronic origin of pentacene in p-terphenyl“: T. P. Carter, M. Manavi, W. E. Moerner, *J. Chem. Phys.* **1988**, *89*, 1768.
- [29] „Frequency-modulation spectroscopy: A new method for measuring weak absorptions and dispersions“: G. C. Bjorklund, *Opt. Lett.* **1980**, *5*, 15.
- [30] „Pseudo-stark effect and FM/Stark double-modulation spectroscopy for the detection of statistical fine structure in alexandrite“: T. P. Carter, D. E. Horne, W. E. Moerner, *Chem. Phys. Lett.* **1988**, *151*, 102.
- [31] „Frequency modulation (FM) spectroscopy“: G. C. Bjorklund, M. D. Levenson, W. Lenth, C. Ortiz, *Appl. Phys. B* **1983**, *32*, 145.
- [32] „Optical detection and probing of single dopant molecules of pentacene in a p-terphenyl host crystal by means of absorption spectroscopy“: L. Kador, D. E. Horne, W. E. Moerner, *J. Phys. Chem.* **1990**, *94*, 1237–1248.
- [33] „Residual amplitude modulation in laser electro-optic phase modulation“: E. A. Whittaker, M. Gehrtz, G. C. Bjorklund, *J. Opt. Soc. Am. B* **1985**, *2*, 1320.
- [34] „Absorption spectroscopy on single molecules in solids“: L. Kador, T. Latychevskaia, A. Renn, U. P. Wild, *J. Chem. Phys.* **1999**, *111*, 8755–8758.
- [35] „Single pentacene molecules detected by fluorescence excitation in a p-terphenyl crystal“: M. Orrit, J. Bernard, *Phys. Rev. Lett.* **1990**, *65*, 2716–2719.
- [36] „Spectroscopy of K<sub>2</sub> using laser-induced fluorescence“: W. J. Tango, J. K. Link, R. N. Zare, *J. Chem. Phys.* **1968**, *49*, 4264–4268.
- [37] „Stark effect on single molecules in a polymer matrix“: M. Orrit, J. Bernard, A. Zumbusch, R. I. Personov, *Chem. Phys. Lett.* **1992**, *196*, 595.
- [38] „Probing individual two-level systems in a polymer by correlation of single-molecule fluorescence“: A. Zumbusch, L. Fleury, R. Brown, J. Bernard, M. Orrit, *Phys. Rev. Lett.* **1993**, *70*, 3584–3587.
- [39] „Single molecule polarization spectroscopy: Pentacene in p-terphenyl“: F. Gütter, M. Croci, A. Renn, U. P. Wild, *Chem. Phys.* **1996**, *211*, 421–430.
- [40] *Single-Molecule Optical Detection, Imaging and Spectroscopy* (Hrsg.: T. Basché, W. E. Moerner, M. Orrit, U. P. Wild), Verlag Chemie, Weinheim, **1997**.
- [41] „Optical spectroscopy of single impurity molecules in solids“: W. E. Moerner, T. Basché, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1993**, *32*, 457; *Angew. Chem.* **1993**, *105*, 537.
- [42] „Single-molecule spectroscopy and quantum optics in solids“: W. E. Moerner, R. M. Dickson, D. J. Norris, *Adv. At. Mol. Opt. Phys.* **1998**, *38*, 193–236.

- [43] „Structure and dynamics in solids as probed by optical spectroscopy“: J. L. Skinner, W. E. Moerner, *J. Phys. Chem.* **1996**, *100*, 13251–13262.
- [44] „High-resolution optical spectroscopy of single molecules in solids“: W. E. Moerner, *Acc. Chem. Res.* **1996**, *29*, 563.
- [45] „Examining nanoenvironments in solids on the scale of a single, isolated molecule“: W. E. Moerner, *Science* **1994**, *265*, 46–53.
- [46] „Optical spectroscopy of single molecules in solids“: M. Orrit, J. Bernard, R. Brown, B. Lounis, *Prog. Opt.* **1996**, *35*, 61–144.
- [47] „Single-molecule spectroscopy“: T. Plakhotnik, E. A. Donley, U. P. Wild, *Annu. Rev. Phys. Chem.* **1997**, *48*, 181–212.
- [48] „Fluorescence spectroscopy and spectral diffusion of single impurity molecules in a crystal“: W. P. Ambrose, W. E. Moerner, *Nature* **1991**, *349*, 225–227.
- [49] „Detection and spectroscopy of single pentacene molecules in a p-terphenyl crystal by means of fluorescence excitation“: W. P. Ambrose, T. Basché, W. E. Moerner, *J. Chem. Phys.* **1991**, *95*, 7150–7163.
- [50] „Photon antibunching in the fluorescence of a single dye molecule trapped in a solid“: T. Basché, W. E. Moerner, M. Orrit, H. Talon, *Phys. Rev. Lett.* **1992**, *69*, 1516–1519.
- [51] „Dispersed fluorescence spectra of single molecules of pentacene in p-terphenyl“: P. Tchénio, A. B. Myers, W. E. Moerner, *J. Phys. Chem.* **1993**, *97*, 2491.
- [52] „Vibrational analysis of dispersed fluorescence from single molecules of terrylene in polyethylene“: P. Tchénio, A. B. Myers, W. E. Moerner, *Chem. Phys. Lett.* **1993**, *213*, 325.
- [53] „Vibronic spectroscopy of individual molecules in solids“: A. B. Myers, P. Tchénio, M. Zgierski, W. E. Moerner, *J. Phys. Chem.* **1994**, *98*, 10377.
- [54] „Magnetic resonance of a single molecular spin“: J. Köhler, J. A. J. M. Disselhorst, M. C. J. M. Donckers, E. J. J. Groenen, J. Schmidt, W. E. Moerner, *Nature* **1993**, *363*, 242–244.
- [55] „Near-field optical spectroscopy of individual molecules in solids“: W. E. Moerner, T. Plakhotnik, T. Irngartinger, U. P. Wild, D. Pohl, B. Hecht, *Phys. Rev. Lett.* **1994**, *73*, 2764.
- [56] „Comment on single pentacene molecules detected by fluorescence excitation in a p-terphenyl crystal“: W. E. Moerner, W. P. Ambrose, *Phys. Rev. Lett.* **1991**, *66*, 1376.
- [57] „Intersystem crossing from singlet states of molecular dimers and monomers in mixed molecular crystals: Picosecond stimulated photon echo experiments“: F. G. Patterson, H. W. H. Lee, W. L. Wilson, M. D. Fayer, *Chem. Phys.* **1984**, *84*, 51.
- [58] „Fluorescence microscopy of single molecules“: F. Gütter, T. Irngartinger, T. Plakhotnik, A. Renn, U. P. Wild, *Chem. Phys. Lett.* **1994**, *217*, 393.
- [59] J. Friedrich, D. Haarer in *Optical Spectroscopy of Glasses* (Hrsg.: I. Zschokke), Reidel, Dordrecht, **1986**, S. 149.
- [60] „Spectral diffusion of single molecule fluorescence: A probe of low-frequency localized excitations in disordered crystals“: P. D. Reilly, J. L. Skinner, *Phys. Rev. Lett.* **1993**, *71*, 4257–4260.
- [61] „Spectral diffusion of individual pentacene molecules in p-terphenyl crystal: Stochastic theoretical model and analysis of experimental data“: P. D. Reilly, J. L. Skinner, *J. Chem. Phys.* **1995**, *102*, 1540.
- [62] „Theory of single-molecule optical line-shape distributions in low-temperature glasses“: E. Geva, J. L. Skinner, *J. Phys. Chem. B* **1997**, *101*, 8920–8932.
- [63] „Single-molecule spectroscopy in Shpol'skii matrices“: T. Plakhotnik, W. E. Moerner, T. Irngartinger, U. P. Wild, *Chimia* **1994**, *48*, 31.
- [64] „Optical modification of a single impurity molecule in a solid“: T. Basché, W. E. Moerner, *Nature* **1992**, *355*, 335–337.
- [65] „Optical spectra and kinetics of single impurity molecules in a polymer: Spectral diffusion and persistent spectral hole-burning“: T. Basché, W. P. Ambrose, W. E. Moerner, *J. Opt. Soc. Am. B* **1992**, *9*, 829.
- [66] „Optical studies of single terrylene molecules in polyethylene“: P. Tchénio, A. B. Myers, W. E. Moerner, *J. Lumin.* **1993**, *56*, 1.
- [67] „Optical probing of single molecules of terrylene in a shpol'skii matrix – A two-state single-molecule switch“: W. E. Moerner, T. Plakhotnik, T. Irngartinger, M. Croci, V. Palm, U. P. Wild, *J. Phys. Chem.* **1994**, *98*, 7382–7389.
- [68] „Probing the interaction between two single molecules: Fluorescence resonance energy transfer between a single donor and a single acceptor“: T. Ha, T. Enderle, D. F. Ogletree, D. S. Chemla, P. R. Selvin, S. Weiss, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1996**, *93*, 6264–6268.
- [69] W. E. Moerner, P. J. Schuck, D. P. Fromm, A. Kinkhabwala, S. J. Lord, S. Y. Nishimura, K. A. Willets, A. Sundaramurthy, G. S. Kino, M. He, Z. Lu, R. J. Twieg in *Single Molecules and Nanotechnology* (Hrsg.: R. Rigler, H. Vogel), Springer, Berlin, **2008**, S. 1–23.
- [70] „Large single-molecule fluorescence enhancements produced by a gold bowtie nanoantenna“: A. Kinkhabwala, Z. Yu, S. Fan, Y. Avlasevich, K. Mullen, W. E. Moerner, *Nat. Photonics* **2009**, *3*, 654.
- [71] „Thermodynamic fluctuations in a reacting system – measurement by fluorescence correlation spectroscopy“: D. Magde, E. Elson, W. W. Webb, *Phys. Rev. Lett.* **1972**, *29*, 705.
- [72] „Fluorescence correlation spectroscopy. I. conceptual basis and theory“: E. L. Elson, D. Magde, *Biopolymers* **1974**, *13*, 1–27.
- [73] „Fluorescence correlation spectroscopy. II. an experimental realization“: D. L. Magde, E. L. Elson, W. W. Webb, *Biopolymers* **1974**, *13*, 29–61.
- [74] „Fluorescence correlation spectroscopy. III. uniform translation and laminar flow“: D. Magde, W. W. Webb, E. L. Elson, *Biopolymers* **1978**, *17*, 361–367.
- [75] „Rotational brownian motion and fluorescence intensify fluctuations“: M. Ehrenberg, R. Rigler, *Chem. Phys.* **1974**, *4*, 390–401.
- [76] „Fluorescence correlation spectroscopy as a probe of molecular dynamics“: S. R. Aragón, R. Pecora, *J. Chem. Phys.* **1976**, *64*, 1791–1803.
- [77] R. Rigler, J. Widengren in *Ultrasensitive Detection of Single Molecules by Fluorescence Correlation Spectroscopy, Bioscience Third Conference* (Hrsg.: B. Klinge, C. Owman), Lund University Press, Lund, Sweden, **1990**, S. 180–183.
- [78] „Single-molecule fluorescence detection - auto-correlation criterion and experimental realization with phycoerythrin“: K. Peck, L. Stryer, A. N. Glazer, R. A. Mathies, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1989**, *86*, 4087–4091.
- [79] „Detection of single fluorescent molecules“: E. Brooks Shera, N. K. Seitzinger, L. M. Davis, R. A. Keller, S. A. Soper, *Chem. Phys. Lett.* **1990**, *174*, 553–557.
- [80] „Probing individual molecules with confocal fluorescence microscopy“: S. Nie, D. T. Chiu, R. N. Zare, *Science* **1994**, *266*, 1018–1021.
- [81] „Optical microscopic observation of single small molecules“: T. Hirschfeld, *Appl. Opt.* **1976**, *15*, 2965–2966.
- [82] „Single molecules observed by near-field scanning optical microscopy“: E. Betzig, R. J. Chichester, *Science* **1993**, *262*, 1422–1425.
- [83] „Single-molecule detection and photochemistry on a surface using near-field optical-excitation“: W. P. Ambrose, P. M. Goodwin, J. C. Martin, R. A. Keller, *Phys. Rev. Lett.* **1994**, *72*, 160–163.
- [84] „Probing single-molecule dynamics“: X. S. Xie, R. C. Dunn, *Science* **1994**, *265*, 361–364.
- [85] „Imaging and time-resolved spectroscopy of single molecules at an interface“: J. J. Macklin, J. K. Trautman, T. D. Harris, L. E. Brus, *Science* **1996**, *272*, 255–258.
- [86] „Imaging of single fluorescent molecules and individual ATP turnovers by single myosin molecules in aqueous solution“: T.

- Funatsu, Y., Harada, M., Tokunaga, K., Saito, T., Yanagida, *Nature* **1995**, *374*, 555–559.
- [87] „Imaging of single molecule diffusion“: T. Schmidt, G. J. Schutz, W. Baumgartner, H. J. Gruber, H. Schindler, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1996**, *93*, 2926–2929.
- [88] *Fluorescence Correlation Spectroscopy* (Hrsg.: R. Rigler, E. Elson), Springer, Berlin, **2001**.
- [89] „Fluorescence correlation spectroscopy and its potential for intracellular applications“: P. Schwille, *Cell Biochem. Biophys.* **2001**, *34*, 383–408.
- [90] „Biological and chemical applications of fluorescence correlation spectroscopy: A review“: S. T. Hess, S. Huang, A. A. Heikal, W. W. Webb, *Biochemistry* **2002**, *41*, 697–705.
- [91] „Fluorescence spectroscopy of single biomolecules“: S. Weiss, *Science* **1999**, *283*, 1676–1683.
- [92] „Illuminating single molecules in condensed matter“: W. E. Moerner, M. Orrit, *Science* **1999**, *283*, 1670–1676.
- [93] W. E. Moerner in *Single Molecule Spectroscopy in Chemistry, Physics and Biology: Nobel Symposium 138 Proceedings* (Hrsg.: A. Graslund, R. Rigler, J. Widengren), Springer, Berlin, **2009**, S. 25–60.
- [94] *Single Molecule Spectroscopy: Nobel Conference Lectures* (Hrsg.: R. Rigler, M. Orrit, T. Basche), Springer, Berlin, **2001**.
- [95] *Single Molecule Spectroscopy in Chemistry, Physics and Biology: Nobel Symposium 138 Proceedings* (Hrsg.: A. Graslund, R. Rigler, J. Widengren), Springer, Berlin, **2010**.
- [96] C. Zander, J. Enderlein, R. A. Keller, *Single-Molecule Detection in Solution: Methods and Applications*, Wiley-VCH, Weinheim, **2002**.
- [97] C. Gell, D. J. Brockwell, A. Smith, *Handbook of Single Molecule Fluorescence Spectroscopy*, Oxford Univ. Press, Oxford, **2006**.
- [98] *Single-Molecule Techniques: A Laboratory Manual* (Hrsg.: P. R. Selvin, T. Ha), Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, **2008**.
- [99] *Handbook of Single-Molecule Biophysics* (Hrsg.: P. Hinterdorfer, A. M. van Oijen), Springer, New York, **2009**.
- [100] „Translational diffusion of individual class II MHC membrane proteins in cells“: M. Vrljic, S. Y. Nishimura, S. Brasselet, W. E. Moerner, H. M. McConnell, *Biophys. J.* **2002**, *83*, 2681–2692.
- [101] „Cholesterol depletion suppresses the translational diffusion of class II major histocompatibility complex proteins in the plasma membrane“: M. Vrljic, S. Y. Nishimura, W. E. Moerner, H. M. McConnell, *Biophys. J.* **2005**, *88*, 334–347.
- [102] „Cholesterol depletion induces solid-like regions in the plasma membrane“: S. Nishimura, M. Vrljic, L. O. Klein, H. M. McConnell, W. E. Moerner, *Biophys. J.* **2006**, *90*, 927–938. PMCID: PMC1367117.
- [103] „Single-molecule tracking“: M. Vrljic, S. Y. Nishimura, W. E. Moerner, *Methods Mol. Biol.* **2007**, *398*, 193–219.
- [104] „Single-molecule nanoprobe explore defects in spin-grown crystals“: C. A. Werley, W. E. Moerner, *J. Phys. Chem. B* **2006**, *110*, 18939–18944.
- [105] „Simultaneous imaging of individual molecules aligned both parallel and perpendicular to the optic axis“: R. M. Dickson, D. J. Norris, W. E. Moerner, *Phys. Rev. Lett.* **1998**, *81*, 5322–5325.
- [106] „Generating and exploiting polarity in bacteria“: L. Shapiro, H. McAdams, R. Losick, *Science* **2002**, *298*, 1942–1946.
- [107] „Cell cycle regulation in *Caulobacter*: Location, location, location“: E. D. Goley, A. A. Iniesta, L. Shapiro, *J. Cell Sci.* **2007**, *120*, 3501–3507.
- [108] „Single molecules of the bacterial actin MreB undergo directed treadmilling motion in *caulobacter crescentus*“: S. Y. Kim, Z. Gitai, A. Kinkhabwala, L. Shapiro, W. E. Moerner, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2006**, *103*, 10929–10934.
- [109] „The bacterial actin MreB rotates, and rotation depends on cell-wall assembly“: S. van Teeffelen, S. Wang, L. Furchtgott, K. C. Huang, N. S. Wingreen, J. W. Shaevitz, Z. Gitai, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2011**, *108*, 15822–15827.
- [110] „Beiträge zur Theorie des Mikroskops und der mikroskopischen Wahrnehmung“: E. Abbe, *Arch. Mikroskop. Anat.* **1873**, *9*, 413–468.
- [111] „Breaking the diffraction resolution limit by stimulated emission: Stimulated-emission-depletion fluorescence microscopy“: S. W. Hell, J. Wichmann, *Opt. Lett.* **1994**, *19*, 780–782.
- [112] „Surpassing the lateral resolution limit by a factor of two using structured illumination microscopy“: M. G. L. Gustafsson, *J. Microsc.* **2000**, *198*, 82–87.
- [113] „The role of molecular dipole orientation in single-molecule fluorescence microscopy and implications for super-resolution imaging“: M. P. Backlund, M. D. Lew, A. S. Backer, S. J. Sahl, W. E. Moerner, *ChemPhysChem* **2014**, *15*, 587–599.
- [114] „Imaging intracellular fluorescent proteins at nanometer resolution“: 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.
- [115] „Precise nanometer localization analysis for individual fluorescent probes“: R. E. Thompson, D. R. Larson, W. W. Webb, *Biophys. J.* **2002**, *82*, 2775–2783.
- [116] „Using photon statistics to boost microscopy resolution“: X. Michalet, S. Weiss, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2006**, *103*, 4797–4798.
- [117] „Optimized localization analysis for single-molecule tracking and super-resolution microscopy“: K. I. Mortensen, L. S. Churchman, J. A. Spudich, H. Flyvbjerg, *Nat. Methods* **2010**, *7*, 377–381.
- [118] „Diffusion of low density lipoprotein-receptor complex on human fibroblasts“: L. S. Barak, W. W. Webb, *J. Cell Biol.* **1982**, *95*, 846–852.
- [119] „Tracking kinesin-driven movements with nanometre-scale precision“: J. Gelles, B. J. Schnapp, M. P. Sheetz, *Nature* **1988**, *331*, 450–453.
- [120] „Real-time single-molecule imaging of the infection pathway of an adeno-associated virus“: G. Seisenberger, M. U. Ried, T. Endress, H. Buning, M. Hallek, C. Braeuchle, *Science* **2001**, *294*, 1929–1932.
- [121] „Position measurement with a resolution and noise-limited instrument“: N. Bobroff, *Rev. Sci. Instrum.* **1986**, *57*, 1152–1157.
- [122] W. Heisenberg, *The Physical Principles of Quantum Theory*, University of Chicago Press, Chicago, **1930**, S. 22.
- [123] „Myosin V walks hand-over-hand: Single fluorophore imaging with 1.5-nm localization“: A. Yildiz, J. N. Forkey, S. A. McKinney, T. Ha, Y. E. Goldman, P. R. Selvin, *Science* **2003**, *300*, 2061–2065.
- [124] „The green fluorescent protein“: R. Y. Tsien, *Annu. Rev. Biochem.* **1998**, *67*, 509–544.
- [125] „Three-dimensional imaging of single molecules solvated in pores of poly(acrylamide) gels“: R. M. Dickson, D. J. Norris, Y. L. Tzeng, W. E. Moerner, *Science* **1996**, *274*, 966–969.
- [126] „Ultra-fast excited state dynamics in green fluorescent protein: Multiple states and proton transfer“: M. Chattoraj, B. A. King, G. U. Bublitz, S. G. Boxer, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1996**, *93*, 8362–8367.
- [127] „An optical marker based on the UV-induced green-to-red photoconversion of a fluorescent protein“: R. Ando, H. Hama, M. Yamamoto-Hino, H. Mizuno, A. Miyawaki, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2002**, *99*, 12651–12656.
- [128] „A photoactivatable GFP for selective photolabeling of proteins and cells“: G. H. Patterson, J. A. Lippincott-Schwartz, *Science* **2002**, *297*, 1873–1877.
- [129] „EosFP, a fluorescent marker protein with UV-inducible green-to-red fluorescence conversion“: J. Wiedenmann, S. Ivancic

- henko, F. Oswald, F. Schmitt, C. Röcker, A. Salih, K. Spindler, G. U. Nienhaus, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2004**, *101*, 15905–15910.
- [130] „Regulated fast nucleocytoplasmic shuttling observed by reversible protein highlighting“: R. Ando, H. Mizuno, A. Miyawaki, *Science* **2004**, *306*, 1370–1373.
- [131] „Proposed method for molecular optical imaging“: E. Betzig, *Opt. Lett.* **1995**, *20*, 237–239.
- [132] „3-dimensional super-resolution by spectrally selective imaging“: A. M. van Oijen, J. Köhler, J. Schmidt, M. Müller, G. J. Brakenhoff, *Chem. Phys. Lett.* **1998**, *292*, 183–187.
- [133] a) „Far-field fluorescence microscopy beyond the diffraction limit“: A. M. van Oijen, J. Köhler, J. Schmidt, M. Müller, G. J. Brakenhoff, *J. Opt. Soc. Am. A* **1999**, *16*, 909–915; b) „Ultra-high-resolution multicolor colocalization of single fluorescent probes“: T. D. Lacoste, X. Michalet, F. Pinaud, D. S. Chemla, A. P. Alivisatos, S. Weiss, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2000**, *97*, 9461–9466.
- [134] „High-resolution colocalization of single dye molecules by fluorescence lifetime imaging microscopy“: M. Heilemann, D. P. Herten, R. Heintzmann, C. Cremer, C. Müller, P. Tinnefeld, K. D. Weston, J. Wolfrum, M. Sauer, *Anal. Chem.* **2002**, *74*, 3511–3517.
- [135] „Single-molecule high-resolution imaging with photobleaching“: M. P. Gordon, T. Ha, P. R. Selvin, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2004**, *101*, 6462–6465.
- [136] „Nanometer-localized multiple single-molecule fluorescence microscopy“: X. Qu, D. Wu, L. Mets, N. F. Scherer, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2004**, *101*, 11298–11303.
- [137] „Single molecule high-resolution colocalization of Cy3 and Cy5 attached to macromolecules measures intramolecular distances through time“: L. S. Churchman, Z. Oekten, R. S. Rock, J. F. Dawson, J. A. Spudich, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2005**, *102*, 1419–1423.
- [138] „Superresolution by localization of quantum dots using blinking statistics“: K. A. Lidke, B. Rieger, T. M. Jovin, R. Heintzmann, *Opt. Express* **2005**, *13*, 7052–7062.
- [139] „New directions in single-molecule imaging and analysis“: W. E. Moerner, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2007**, *104*, 12596–12602.
- [140] „A non-gaussian distribution quantifies distances measured with fluorescence localization techniques“: L. Stirling Churchman, H. Flyvbjerg, J. A. Spudich, *Biophys. J.* **2006**, *90*, 668–671.
- [141] „Sub-diffraction-limit imaging by stochastic optical reconstruction microscopy (STORM)“: M. J. Rust, M. Bates, X. Zhuang, *Nat. Methods* **2006**, *3*, 793–796.
- [142] „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.
- [143] „Wide-field subdiffraction imaging by accumulated binding of diffusing probes“: A. Sharonov, R. M. Hochstrasser, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2006**, *103*, 18911–18916.
- [144] „Controlled biomolecular collisions allow sub-diffraction limited microscopy of lipid vesicles“: E. Mei, F. Gao, R. M. Hochstrasser, *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2006**, *8*, 2077–2082.
- [145] „Subdiffraction-resolution fluorescence imaging with conventional fluorescent probes“: M. Heilemann, S. van de Linde, M. Schüttelpelz, R. Kasper, B. Seefeldt, A. Mukherjee, P. Tinnefeld, M. Sauer, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, *47*, 6172–6176; *Angew. Chem.* **2008**, *120*, 6266–6271.
- [146] „Multicolor fluorescence nanoscopy in fixed and living cells by exciting conventional fluorophores with a single wavelength“: I. Testa, C. A. Wurm, R. Medda, E. Rothermel, C. von Middendorf, J. Foelling, S. Jakobs, A. Schoenle, S. W. Hell, C. Eggeling, *Biophys. J.* **2010**, *99*, 2686–2694.
- [147] „Resolving single-molecule assembled patterns with superresolution blink-microscopy“: T. Cordes, M. Strackharn, S. W. Hell, W. Summerer, C. Steinhauer, C. Forthmann, E. M. Puchner, J. Vogelsang, H. E. Gaub, P. Tinnefeld, *Nano Lett.* **2010**, *10*, 645–651.
- [148] „SPDM: Light microscopy with single-molecule resolution at the nanoscale“: P. Lemmer, M. Gunkel, D. Baddeley, R. Kaufmann, A. Urich, Y. Weiland, J. Reymann, P. Mueller, M. Hausmann, C. Cremer, *Appl. Phys. B* **2008**, *93*, 1–12.
- [149] „Super-resolution imaging in live *caulobacter crescentus* cells using photoswitchable EYFP: J. S. Biteen, M. A. Thompson, N. K. Tselenitis, G. R. Bowman, L. Shapiro, W. E. Moerner, *Nat. Methods* **2008**, *5*, 947–949.
- [150] „Superresolution imaging of targeted proteins in fixed and living cells using photoactivatable organic fluorophores“: H. D. Lee, S. J. Lord, S. Iwanaga, K. Zhan, H. Xie, J. C. Williams, H. Wang, G. R. Bowman, E. D. Goley, L. Shapiro, R. J. Twieg, J. Rao, W. E. Moerner, *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 15099–15101.
- [151] „Enzymatic activation of nitro-aryl fluorogens in live bacterial cells for enzymatic turnover-activated localization microscopy“: M. K. Lee, J. Williams, R. J. Twieg, J. Rao, W. E. Moerner, *Chem. Sci.* **2013**, *4*, 220–225.
- [152] „Video-rate nanoscopy using sCMOS camera-specific single-molecule localization algorithms“: F. Huang, T. M. P. Hartwich, F. E. Rivera-Molina, Y. Lin, W. C. Duim, J. J. Long, P. D. Uchil, J. R. Myers, M. A. Baird, W. Mothes, M. W. Davidson, D. Toomre, J. Bewersdorf, *Nat. Methods* **2013**, *10*, 653–658.
- [153] „Breaking the diffraction barrier: Super-resolution imaging of cells“: B. Huang, H. Babcock, X. Zhuang, *Cell* **2010**, *143*, 1047–1058.
- [154] „Extending microscopic resolution with single-molecule imaging and active control“: M. A. Thompson, M. D. Lew, W. E. Moerner, *Annu. Rev. Biophys.* **2012**, *41*, 321–342.
- [155] „Molecules and methods for super-resolution imaging“: M. A. Thompson, J. S. Biteen, S. J. Lord, N. R. Conley, W. E. Moerner, *Methods Enzymol.* **2010**, *475*, 27–59.
- [156] „Single-molecule and superresolution imaging in live bacteria cells“: J. S. Biteen, W. E. Moerner, *Cold Spring Harbor Perspect. Biol.* **2010**, *2*, a000448.
- [157] M. D. Lew, S. F. Lee, M. A. Thompson, H. D. Lee, W. E. Moerner in *Single-Molecule Photocontrol and Nanoscopy*, Springer, Berlin, Heidelberg, **2012**, S. 1–24.
- [158] „Microscopy beyond the diffraction limit using actively controlled single molecules“: W. E. Moerner, *J. Microsc.* **2012**, *246*, 213–220.
- [159] „Quantitative multicolor subdiffraction imaging of bacterial protein ultrastructures in 3D“: A. Gahlmann, J. L. Ptacin, G. Grover, S. Quirin, A. R. S. von Diezmann, M. K. Lee, M. P. Backlund, L. Shapiro, R. Piestun, W. E. Moerner, *Nano Lett.* **2013**, *13*, 987–993.
- [160] „Super-resolution fluorescence imaging with single molecules“: S. R. Sahl, W. E. Moerner, *Curr. Opin. Struct. Biol.* **2013**, *23*, 778–787.
- [161] „Super-resolution microscopy approaches for live cell imaging“: A. Godin, B. Lounis, L. Cognet, *Biophys. J.* **2014**, *107*, 1777–1784.
- [162] „The helical MreB cytoskeleton in *Escherichia coli* MC1000/pLE7 is an artifact of the N-terminal yellow fluorescent protein tag“: M. T. Swulius, G. J. Jensen, *J. Bacteriol.* **2012**, *194*, 6382–6386.
- [163] „A spindle-like apparatus guides bacterial chromosome segregation“: J. L. Ptacin, S. F. Lee, E. C. Garner, E. Toro, M. Eckart, L. R. Comolli, W. E. Moerner, L. Shapiro, *Nat. Cell Biol.* **2010**, *12*, 791–798.
- [164] „Super-resolution imaging of the nucleoid-associated protein HU in *caulobacter crescentus*“: S. F. Lee, M. A. Thompson, M. A. Schwartz, L. Shapiro, W. E. Moerner, *Biophys. J.* **2011**, *100*, L31–L33.

- [165] „Superresolution microscopy for microbiology“: C. Coltharp, J. Xiao, *Cell. Microbiol.* **2012**, *14*, 1808–1818.
- [166] „Exploring bacterial cell biology with single-molecule tracking and super-resolution imaging“: A. Gahlmann, W. E. Moerner, *Nat. Rev. Microbiol.* **2014**, *12*, 9–22.
- [167] „Single-molecule super-resolution imaging in bacteria“: D. I. Cattoni, J. B. Fiche, M. Noellmann, *Curr. Opin. Microbiol.* **2012**, *15*, 758–763.
- [168] „Fluorescent saxitoxins for live cell imaging of single voltage-gated sodium ion channels beyond the optical diffraction limit“: A. E. Ondrus, H. D. Lee, S. Iwanaga, W. H. Parsons, B. M. Andresen, W. E. Moerner, J. Du Bois, *Chem. Biol.* **2012**, *19*, 902–912.
- [169] „Sub-diffraction imaging of huntingtin protein aggregates by fluorescence blink-microscopy and atomic force microscopy“: W. C. Duim, B. Chen, J. Frydman, W. E. Moerner, *ChemPhysChem* **2011**, *12*, 2387–2390.
- [170] W. C. Duim, „Single-molecule fluorescence and super-resolution imaging of Huntington’s disease protein aggregates“, Dissertation, Stanford, CA, Stanford University, **2012**.
- [171] „Cellular inclusion bodies of mutant huntingtin exon 1 obscure small fibrillar aggregate species“: S. J. Sahl, L. E. Weiss, W. C. Duim, J. Frydman, W. E. Moerner, *Sci. Rep.* **2012**, *2*, 1–7.
- [172] „Small-molecule labeling of live cell surfaces for three-dimensional super-resolution microscopy“: M. K. Lee, P. Rai, J. Williams, R. J. Twieg, W. E. Moerner, *J. Am. Chem. Soc.* **2014**, *136*, 14003–14006.
- [173] „Three-dimensional super-resolution imaging by stochastic optical reconstruction microscopy“: B. Huang, W. Wang, M. Bates, X. Zhuang, *Science* **2008**, *319*, 810–813.
- [174] „High accuracy 3D quantum dot tracking with multifocal plane microscopy for the study of fast intracellular dynamics in live cells“: S. Ram, P. Prabhat, J. Chao, E. S. Ward, R. J. Ober, *Biophys. J.* **2008**, *95*, 6025–6043.
- [175] „Three-dimensional sub-100 nm resolution fluorescence microscopy of thick samples“: M. F. Juette, T. J. Gould, M. D. Lessard, M. J. Mlodzianoski, B. S. Nagpure, B. T. Bennett, S. T. Hess, J. Bewersdorf, *Nat. Methods* **2008**, *5*, 527–529.
- [176] „Extending single-molecule microscopy using optical Fourier processing“: A. S. Backer, W. E. Moerner, *J. Phys. Chem. B* **2014**, *118*, 8313–8329.
- [177] „Three-dimensional, single-molecule fluorescence imaging beyond the diffraction limit by using a double-helix point spread function“: S. R. P. Pavani, M. A. Thompson, J. S. Biteen, S. J. Lord, N. Liu, R. J. Twieg, R. Piestun, W. E. Moerner, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2009**, *106*, 2995–2999.
- [178] „Three-dimensional localization precision of the double-helix point spread function versus astigmatism and biplane“: M. Badieirostami, M. D. Lew, M. A. Thompson, W. E. Moerner, *Appl. Phys. Lett.* **2010**, *97*, 161103.
- [179] „Three-dimensional superresolution colocalization of intracellular protein superstructures and the cell surface in live *Caulobacter crescentus*“: M. D. Lew, S. F. Lee, J. L. Ptacin, M. K. Lee, R. J. Twieg, L. Shapiro, W. E. Moerner, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2011**, *108*, E1102–E1110.
- [180] „Corkscrew point spread function for far-field three-dimensional nanoscale localization of pointlike objects“: M. D. Lew, S. F. Lee, M. Badieirostami, W. E. Moerner, *Opt. Lett.* **2011**, *36*, 202–204.
- [181] „A bisected pupil for studying single-molecule orientational dynamics and its application to 3D super-resolution microscopy“: A. S. Backer, M. P. Backlund, A. R. Diezmann, S. J. Sahl, W. E. Moerner, *Appl. Phys. Lett.* **2014**, *104*, 193701.
- [182] „Optimal point spread function design for 3D imaging“: Y. Shechtman, S. J. Sahl, A. S. Backer, W. E. Moerner, *Phys. Rev. Lett.* **2014**, *113*, 133902.
- [183] „Actin, spectrin, and associated proteins form a periodic cytoskeletal structure in axons“: K. Xu, G. Zhong, X. Zhuang, *Science* **2013**, *339*, 452–456.
- [184] „Tracking single molecules at work in living cells“: A. Kusumi, T. A. Tsunoyama, K. M. Hirosawa, R. S. Kasai, T. K. Fujiwara, *Nat. Chem. Biol.* **2014**, *10*, 524.
- [185] „A practical guide to single-molecule FRET“: R. Roy, S. Hohng, T. Ha, *Nat. Methods* **2008**, *5*, 507–516.
- [186] „FRET in cell biology: Still shining in the age of super-resolution?“: H. E. Grecco, P. J. Verveer, *ChemPhysChem* **2011**, *12*, 484–490.
- [187] „Probing single biomolecules in solution using the anti-brownian electrokinetic (ABEL) trap“: Q. Wang, R. H. Goldsmith, Y. Jiang, S. D. Bockenhauer, W. E. Moerner, *Acc. Chem. Res.* **2012**, *45*, 1955–1964.
- [188] „Single-molecule spectroscopy of photosynthetic proteins in solution: Exploration of structure–function relationships“: G. S. Schlau-Cohen, S. Bockenhauer, Q. Wang, W. E. Moerner, *Chem. Sci.* **2014**, *5*, 2933–2939.
- [189] „Enzyme kinetics, past and present“: X. S. Xie, *Science* **2013**, *342*, 1457–1459.

Eingegangen am 2. März 2015

Online veröffentlicht am 18. Juni 2015

Übersetzt von Dr. Leonhard Möckl, München