

## Hochauflösende Lichtmikroskopie

◆ Neben markierungsfreien Techniken ist die Verbesserung der räumlichen Auflösung zur Zeit eines der wichtigsten Gebiete der optischen Mikroskopie. In den letzten beiden Jahren gab es hier spektakuläre Fortschritte. Die Beugungsgrenze hat ihre Bedeutung als Maß für die bestmögliche optisch-mikroskopische Abbildung verloren. Die neuen Techniken erzielen stattdessen eine räumliche Auflösung von wenigen zehn Nanometern, und das auch in schwierigen Proben wie lebenden Zellen. Damit dringt die optische Mikroskopie in Bereiche vor, die bislang der Elektronenmikroskopie vorbehalten waren. Bestehen bleiben alle Vorteile optischer Untersuchungen, vor allem ihre geringe Invasivität.

Aus chemischer Sicht ist bedeutsam, dass die neuen Verfahren auf grundlegenden fluoreszenzspektroskopischen Verfahren aufbauen. Damit sind durch neue spektroskopische Techniken und neue Chromophore weitere Fortschritte zu erwarten.

Die räumliche Auflösung herkömmlicher, gut etablierter Verfahren wie der konfokalen Mikroskopie oder der Zweiphotonenmikroskopie ist beugungsbegrenzt. Damit ist in der Ebene senkrecht zur optischen Achse des Mikroskops mit sichtbarem Licht nur eine Auflösung von etwa 200 nm, auf der dazu senkrechten Achse von etwa 500 nm zu erreichen. In den letzten drei Jahren haben sich, aufbauend auf Arbeiten aus den 1990er Jahren, zwei Verfahren etabliert, mit denen in der optischen Mikroskopie Auflösungen weit unterhalb der Beugungsgrenze möglich sind: Die Stimulated-Emission-Depletion (STED)-Mikroskopie und die Photoactivated Localization Microscopy (PALM), auch als Fluorescence Photo Activation Localization Microscopy (FPALM) und STORM (Stochastic Optical Reconstruction Microscopy) bezeichnet (Abbildung 1).

### STED-Mikroskopie

◆ Die Stimulated-Emission-Depletion (STED)-Mikroskopie hat die Gruppe um Stefan Hell entwickelt. Die grundlegende Idee besteht in der Kombination eines normalen, beugungsbegrenzten Strahls zur Fluoreszenz-

anregung mit einem räumlich überlagerten, frequenzverschobenen STED-Strahl zur Anregung stimulierter Emission.<sup>1)</sup> Das Intensitätsprofil dieses zweiten Strahls wird so geformt, dass im Brennpunkt die Intensität in der Mitte des Strahlprofils null ist. Die Wahrscheinlichkeit, mit der die Fluorophore durch diesen STED-Strahl in den Grundzustand gepumpt werden, hängt exponentiell von dessen Intensität ab. Dies gilt dann auch für die Wahrscheinlichkeit, dass sich die Fluorophore im Fokus im elektronisch angeregten Zustand befinden. In der Mikroskopie wird nun die Intensitätsnull im Fokus des STED-Strahls über die Probe gerastert. Im Prinzip lässt sich mit ausreichend großer Intensität des STED-Strahls so eine beliebig hohe Auflösung erzielen. Praktisch auflösungsbegrenzend sind unter anderem nicht-lineare optische Prozesse, welche die Fluorophore bleichen.

### STED-Mikroskopie in der Praxis

◆ Im letzten Jahr wurden die Konzepte der STED-Mikroskopie praktisch umgesetzt. Inzwischen sind Geräte auf dem Markt.

Ein wesentlicher Anwendungsbereich optischer Mikroskopieverfahren sind heute zellbiologische Untersuchungen. Etablierte molekularbiologische und biochemische Analysen klären zwar molekulare Wechselwirkungen auf, liefern aber keine dynamischen Informationen. Diese erhält man durch optische Mikroskopie. Doch dafür sind Bildwiederholraten von 1 Hz oder mehr erforderlich. Westpahl et al. erreichten mit STED-Mikroskopie in kleinen Bildausschnitten sogar Videoraten, also 28 Bilder pro Sekunde.<sup>2)</sup> Für diese hohen Bildwiederholraten war durch die Wahl der STED-Intensitäten ein Kompromiss zwischen Auflösung und Signalintensität erforderlich, denn höhere STED-Intensität bedeutet zwar höhere Auflösung, aber geringere Fluoreszenzintensität. So ließ sich die Bewegung einzelner fluoreszenzmarkierter synaptischer Vesikel (Durchmesser etwa

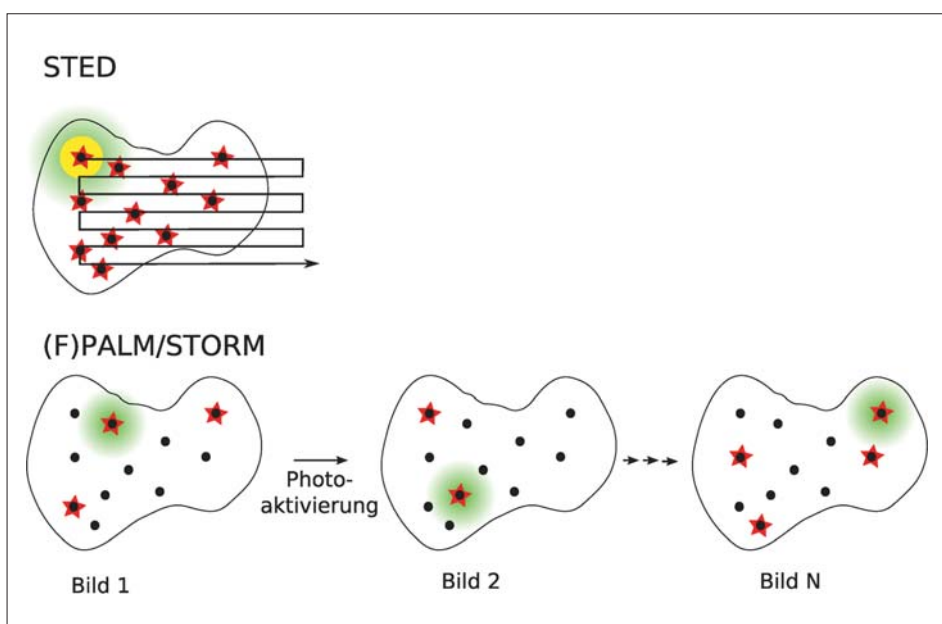


Abb. 1. Bilderzeugung in der STED- und (F)PALM/STORM-Mikroskopie. STED: Das Bild entsteht durch Rasterscannen einer Intensitätsnull (gelb: STED-Strahl). (F)PALM/STORM: Das Gesamtbild entsteht durch Zusammensetzen von  $N$  Weitfeld-Einzelbildern mit einzelnen jeweils neu photoaktivierten Molekülen. (grün: beugungsbegrenztes Detektionsvolumen)

40 nm) in funktionalen Axonen verfolgen und analysieren.

Untersuchungen dieser Art verbessern noch nicht die axiale Auflösung, da die Intensität des STED-Strahls in den herkömmlichen Verfahren keinen Nulldurchgang entlang der optischen Achse hat. Hein et al. projizierten die Intensitätsnull entlang der optischen Achse und erreichten dadurch auch in dieser Richtung eine bessere räumliche Auflösung. Eine simultane Verbesserung der Auflösung in allen drei Raumrichtungen ist dann durch Kombination von zwei durch verschiedene Phasenmasken modulierte STED-Strahlen möglich. Mit diesem Experiment ließen sich beispielsweise morphologische Veränderungen des endoplasmatischen Reticulums lebender Zellen beobachten.<sup>3)</sup>

Die hohe dreidimensionale Auflösung der STED-Technik ist auch für materialwissenschaftliche Untersuchungen nutzbar. So bildeten Härke et al. Strukturen kolloidaler Modellsysteme ab.<sup>4)</sup>

### Fluoreszenzmikroskopie mit hoher räumlicher Auflösung

◆ Vor zwei Jahren haben fast zeitgleich drei Gruppen ein weiteres Verfahren zur Fluoreszenzmikroskopie mit einer Auflösung unterhalb der Beugungsgrenze beschrieben; die Bezeichnungen sind unterschiedlich: PALM (Photoactivated Localization Microscopy),<sup>5)</sup> FPALM (Fluorescence Photoactivation Localization Microscopy)<sup>6)</sup> und STORM (Stochastic Optical Reconstruction Microscopy)<sup>7)</sup> – sie funktionieren aber alle gleich. Die räumliche Hochauflösung beruht auf der Abbildung einzelner fluoreszierender Moleküle. Das Prinzip wurde erstmals Mitte der 90er Jahre beschrieben<sup>8)</sup> und bei tiefen Temperaturen (1,7 K) experimentell umgesetzt.<sup>9)</sup> Dabei macht man sich zunutze, dass die Position eines einzelnen fluoreszierenden Moleküls auf wenige 10 nm genau bestimmbar ist, wenn das Molekül genügend weit vom nächsten, spektral ununterscheidbaren fluoreszierenden Molekül ent-

fernt ist. Für die Positionsbestimmung ist das räumliche Maximum der Photonenverteilung zu ermitteln. Abhängig vom Signal-zu-Rausch-Verhältnis gelingt dies mit einer Genauigkeit bis hin zu wenigen Nanometern.<sup>10)</sup>

Bildet man die Emission mehrerer einzelner Moleküle gleichzeitig mit einer CCD-Kamera ab, so können Bilder mit Videoraten aufgenommen werden. Dies nutzt beispielsweise die dynamische Mikroskopie, um Bewegungen einzelner nanoskopischer Partikel in biologischen Zellen zu verfolgen.<sup>11)</sup> Hochaufgelöste statische Bilder einer Probe mit vielen Fluorophoren innerhalb eines beugungsbegrenzten Abbildungsvolumens entstehen durch die Zusammensetzung nacheinander aufgenommener Bilder identischer Bildausschnitte. Dabei wird der fluoreszierende Zustand der Chromophore in diesen Bildern erst optisch aktiviert. Wählt man die Photoaktivierung so, dass in jedem Bild nur so wenige Moleküle fluoreszieren, dass diese einzeln auflösbar sind, so ist deren Position in jedem

Bild genau zu bestimmen. Da die Photoaktivierung ein stochastischer Prozess ist, führt die Kombination der Bilder im Idealfall zu einem hochaufgelösten Bild aller Chromophore.

### Höhere Bildaufnahmezeit

◆ Die ersten Demonstrationen der PALM-Technik beruhten entweder auf der Photoaktivierung von fluoreszierenden Proteinen oder von Paaren von Cyaninfarbstoffen und zeigten sehr hohe räumliche Auflösung. Allerdings waren diese ersten Umsetzungen für die meisten Anwendungen noch ungeeignet: Die Farbstoffkonzentrationen durften nur sehr gering sein, das Anregungsvolumen musste durch Anregung über totale interne Reflexion auf etwa 100 nm in der Tiefe begrenzt werden und die Aufnahme eines hochaufgelösten Bildes dauerte mehrere Stunden. Alle diese Schwierigkeiten wurden in der Zwischenzeit beseitigt.

Zwei technische Änderungen führten zu Bildaufnahmezeiten bis in

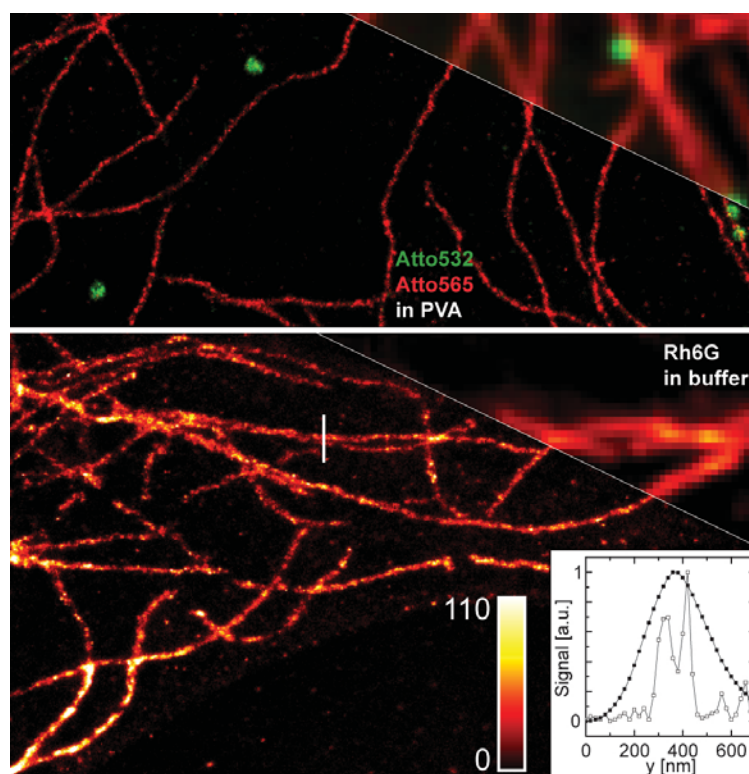


Abb. 2. Mikroskopie mit stochastischer Photoaktivierung: Atto532(grün)- und Atto565(rot)-gefärbte Peroxisomen (oben) und Rhodamin-6G-gefärbte Mikrotubuli, jeweils konfokal (rechtes oberes Eck) und mit Ground State Depletion in den Triplettzustand aufgenommen.<sup>17)</sup>

den Minutenbereich: Die Bildaufnahme rate der CCD-Kamera lässt sich auf die Photoaktivierungskinetik der Farbstoffe abstimmen. Damit ist es möglich, Bilder unsynchronisiert mit hoher Geschwindigkeit (2 Minuten pro Bild) aufzunehmen.<sup>12,13)</sup> Bei schnell schaltbaren Chromophoren ist eine stroboskopartige Photoaktivierung mit 20 ms pro Aktivierung möglich, die wiederum zu kurzen Bildaufnahmedauern führt.<sup>14)</sup>

Diese Experimente erfordern immer Kompromisse zwischen Aufnahmedauer und Auflösung, da eine hohe Auflösung eine lange Belichtungszeit erfordert. So eignet sich PALM für die Untersuchung zellulärer Transportphänomene mit Geschwindigkeiten um  $1 \mu\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$ . Vorteil der Photoaktivierung hierbei ist, dass mit der Aufnahme einer einzigen Zelle mehr als 1000 Trajektorien sichtbar werden können. Sonst müssten viele Zellen untersucht werden.<sup>15)</sup>

### Chromophore für die neuen Techniken

◆ Inzwischen gibt es eine Menge photoschaltbarer Proteine und synthetischer Chromophore, die für die neuen Fluoreszenzmikroskopietechniken optimiert sind.<sup>13)</sup> Die

Auswahl an Chromophoren hat sich deutlich vergrößert, seit klar ist, dass sich mehrere Mechanismen zur Photoschaltung zwischen aktiven und inaktiven Zuständen eignen. So können sich Cyaninfarbstoffe durch optisches Schalten ohne zusätzlichen Aktivator von cis- in trans-Isomere und umgekehrt umwandeln.<sup>16)</sup> Ausdehnung auf eine größere Anzahl an Fluorophoren verspricht hier die Entvölkerung des Grundzustands durch Übergänge in langlebige inaktive Zustände, wie den Triplettzustand.<sup>17)</sup> Dies kann nicht nur photophysikalisch, sondern auch chemisch erfolgen.<sup>18)</sup> Mit der Menge an Chromophoren ist es nun auch möglich, verschiedene Farbstoffe simultan abzubilden.<sup>19)</sup>

### Dreidimensionale Abbildung

◆ Die Schwierigkeiten beim Einsatz der hochauflösenden optischen Mikroskopie mit stochastischer Photoaktivierung sind im Wesentlichen gelöst. Allerdings waren die bisher beschriebenen Experimente auf die Abbildung in einer Ebene begrenzt. Für dreidimensionale Abbildungen hat im letzten Jahr die Gruppe von Zhuang eine Lösung präsentiert. Dabei erzeugt eine schwache Zylinderlinse im Strahlengang einen Astigmatismus. Damit liegt die minimale Breite der Photonverteilung für die Emission einzelner Moleküle entlang der optischen Achse in verschiedenen Ebenen für die zwei Richtungen senkrecht zur optischen Achse. Eine einfache Kalibrierung erlaubt dann die Bestimmung der Position entlang der optischen Achse mit einer Genauigkeit von etwa 20 nm.<sup>20)</sup>

Die beschriebenen Entwicklungen haben in kurzer Zeit dazu geführt, dass mehrere Methoden zur optischen Mikroskopie mit einer räumlichen Auflösung weit unterhalb der Beugungsgrenze zur Verfügung stehen. Es ist zu erwarten, dass diese Techniken die Grundlage liefern, um Neuland vor allem in den Lebenswissenschaften, aber auch in den Materialwissenschaften zu erschließen.

**Andreas Zumbusch**, Jahrgang 1966, studierte Chemie an der Ludwig-Maximilians-Universität München (LMU) und in Bordeaux und promovierte in Karlsruhe. Während eines Postdocs bei X. Sunney Xie in Richland/USA entwickelte er die CARS-Mikroskopie. Im Jahr 2003 habilitierte er sich an der LMU. Nach einem Readership in Biophysics am University College London wurde er 2006 Professor für physikalische Chemie an der Universität Konstanz. Seine Forschungsschwerpunkte sind optische Einzelmolekülspektroskopie und nicht-lineare Mikroskopie für biophysikalische Fragen.



### Literatur

- 1) S. W. Hell, J. Wichmann, *Opt. Lett.* 1994, 19, 780.
- 2) V. Westpahl, S. O. Rizzoli, M. A. Lauterbach, D. Kamin, R. Jahn, S. W. Hell, *Science* 2008, 320, 246.
- 3) B. Hein, K. I. Willig, S. W. Hell, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2008, 105, 14271.
- 4) B. Harke, C. K. Ullal, J. Keller, S. W. Hell, *Nano Lett.* 2008, 8, 1309.
- 5) E. Betzig, G. H. Patterson, R. Sougrat et al., *Science* 2006, 313, 1642.
- 6) M. J. Rust, M. Bates, X. Zhuang, *Nat. Methods* 2006, 3, 793.
- 7) S. T. Hess, T. P. Girirajan, M. D. Mason, *Biophys. J.* 2006, 91, 4258.
- 8) E. Betzig, *Opt. Lett.* 1995, 20, 237.
- 9) A. M. van Oijen, J. Köhler, J. Schmidt, M. Müller, G. J. Brakenhoff, *Chem. Phys. Lett.* 1998, 292, 183.
- 10) R. E. Thompson, D. R. Larson, W. W. Webb, *Biophys. J.* 2002, 82, 2775.
- 11) R. Bausinger, K. von Gersdorff, K. Braeckmans, M. Ogris, E. Wagner, C. Bräuchle, A. Zumbusch, *Angew. Chem.* 2006, 118, 1598.
- 12) A. Egner, C. Geisler, C. von Middendorff et al., *Biophys. J.* 2007, 93, 3285.
- 13) J. Fölling, V. Belov, R. Kunetsky et al., *Angew. Chem.* 2007, 119, 6382.
- 14) C. Flors, J. Hotta, H. Hiji-i et al., *J. Am. Chem. Soc.* 2007, 129, 13970.
- 15) S. Manley, J. M. Gillette, G. H. Patterson, H. Shroff, H. F. Hess, E. Betzig, J. Lippincott-Schwartz, *Nat. Methods* 2008, 5, 155.
- 16) M. Heilemann, S. van de Linde, M. Schützel et al., *Angew. Chem.* 2008, 120, 6266.
- 17) J. Fölling, M. Bossi, H. Bock et al., *Nat. Methods* 2008, 5, 943.
- 18) C. Steinhauer, C. Forthmann, J. Vogelsang, P. Tinnefeld, *J. Am. Chem. Soc.* 2008, 130, 16840.
- 19) M. Bates, B. Huang, G. T. Dempsey, X. Zhuang, *Science* 2007, 317, 1749.
- 20) B. Huang, W. Wang, M. Bates, X. Zhuang, *Science* 2007, 319, 810.

**GDCh-Kurs**  
**Elektrochemie - theoretische Grundlagen und Problemlösungsstrategien für Praktiker**  
 Grundlagen, Messmethodik, Kombination modernster Methoden, praktische Anwendungen (250/09)  
 18. - 19. Mai 2009, Frankfurt am Main  
 Leitung: Dr. Thomas Lehmann

**Highlights:**  
 Moderne Elektrochemie  
 Voltammetrie  
 Mikroelektrochemie  
 Festkörperelektrochemie  
 Praxisprobleme

**Anmeldung/Information:**  
 Gesellschaft Deutscher Chemiker e.V.  
 Fortbildung  
 Tel.: 069/7917-291, Fax: 069/7917-475  
 fb@gdch.de, www.gdch.de/fortbildung2009