

STEFAN W. HELL

## Fluoreszenzmikroskopie in ungekannter Schärfe

(Vortrag in der Plenarsitzung am 25. Mai 2007)

Nach dem Abitur in Ludwigshafen am Rhein im Jahre 1981 studierte ich Physik in Heidelberg und kam gegen Ende meiner Promotion (1990) zu der Ansicht, daß sich Abbes Beugungsgrenze im Fernfeldmikroskop überwinden ließe – worauf ich mich im Anschluß diesem Problem verschrieb. Nach kurzer Zeit als freier Erfinder forschte ich für zwei Jahre am Europäischen Molekularlaboratorium und, von einem halbjährigen Aufenthalt in Oxford abgesehen, fast vier Jahre an der Universität Turku in Finnland. 1997 kam ich als Leiter einer selbständigen Nachwuchsgruppe ans MPI für Biophysikalische Chemie, wo ich 2002 zum wissenschaftlichen Mitglied und Leiter einer Abteilung berufen wurde.



Stefan W. Hell, Direktor am Max-Planck-Institut für Biophysikalische Chemie in Göttingen, O. Mitglied der Göttinger Akademie seit 2007

„Ein Bild sagt mehr als tausend Worte . . .“ – das gilt nicht nur im Alltag, sondern auch in der Wissenschaft. Es ist daher nicht überraschend, daß das Lichtmikroskop wie kaum ein anderes Instrument zum Symbol wissenschaftlicher Forschung wurde. Doch die herkömmliche Lichtmikroskopie steht vor einem grundsätzlichen Problem, das 1873 von Ernst Abbe beschrieben wurde: Beugung verhindert die Trennung von Details, die in der Fokalebene ( $x, y$ ) weniger als  $d = \lambda/2n \sin \alpha$  voneinander entfernt sind, denn Licht breitet sich als Welle aus und wird gebeugt, und das Beugungshauptmaximum in der Brennebene des Objektivs kann im Durchmesser nicht schärfer als  $d$  sein. Dabei bezeichnet  $\lambda$  die Lichtwellenlänge,  $n$  den

Brechungsindex und  $\alpha$  den halben Öffnungswinkel des Lichtkegels. Da  $\lambda$  für sichtbares Licht zwischen 400 nm and 700 nm rangiert, schien es unmöglich, Objekte die feiner als 200 nm sind, mit sich frei ausbreitenden Lichtwellen abzubilden.

Abbes Beugungsgrenze veranlaßte die Erfindung des Elektronenmikroskops, das aufgrund seiner 10–10000maligen Auflösung enorm zum wissenschaftlich-technischen Fortschritt beigetragen hat. Doch die Abkehr vom Licht führte zu anderen Einschränkungen. Elektronstrahlen können nur ein paar Mikrometer in die Probe vordringen, was die Abbildung auf Oberflächen oder dünne Proben beschränkt; lebende Zellen lassen sich damit sowieso nicht betrachten. Die Rastertunnel- und die Rasterkraftmikroskopie haben fraglos eine neue Welt erschlossen, aber auch sie sind auf Oberflächen begrenzt. Letzteres gilt auch für ihr optisches Pendant, das Raster-Nahfeldmikroskop, das mit einer feinen Spitze die Licht-Objekt-Wechselwirkung auf einen Bruchteil von  $\lambda$  einengt [1]. Das Abrastern einer – lebenden – Zelle läßt sich damit kaum bewerkstelligen und läßt sich erst recht nichts bewerkstelligen in ihrem Inneren. Eine Lösung wäre, sehr kurze Wellenlängen zu verwenden: die Röntgenmikroskopie ( $\lambda = 2\text{--}5$  nm) liefert heute Auflösungen von  $\sim 30$  nm in der Fokalebene [2]. Doch Röntgenlicht ist schwer zu fokussieren, und die erste Belichtung einer Zelle führt zum Stillstand. Damit liegt auf der Hand: Hochauflösendes 3D-Abbildern von intakten oder sogar lebenden Zellen geht nur mit fokussiertem Licht.

Die Fluoreszenzmikroskopie spielt dabei eine herausragende Rolle, denn heftet man ein Markermolekül an die interessierenden Zellbestandteile an, so läßt sich dieses anhand der Markerfluoreszenz erkennen. Man kann sogar die Zelle genetisch dazu bringen, ihre eigenen Marker zu produzieren. Vergleichbare Möglichkeiten gibt es in keinem anderen Mikroskopieverfahren. Es ist daher nicht überraschend, daß ca. 80 % aller Mikroskopieaufnahmen der Lebenswissenschaften im Fluoreszenzkontrast durchgeführt werden. Die Überwindung der Beugungsgrenze in einem „Fernfeld“-Fluoreszenzmikroskop ist daher nicht nur physikalisch spannend, sondern auch von eminenter praktischer Bedeutung.

Ich werde nun berichten, daß man die Beugungsgrenze im Fluoreszenzmikroskop aufheben kann, ohne die Beugung selbst aufheben zu müssen. Der Schlüssel hierfür ist die Einbeziehung der Zustände des Markermoleküls in die Bildentstehung. In der Tat liefen bisher alle fernfeldoptischen „nanoskopischen“ Verfahren darauf hinaus, die Markermoleküle transient zwischen einem fluoreszierenden (hellen) Zustand  $A$  und einem dunklen Zustand  $B$  oder umgekehrt zu überführen, und zwar so, daß der räumliche Bereich (zumeist) des hellen Zustands  $A$  auf  $\ll \lambda/2$  eingengt wird [3–5].

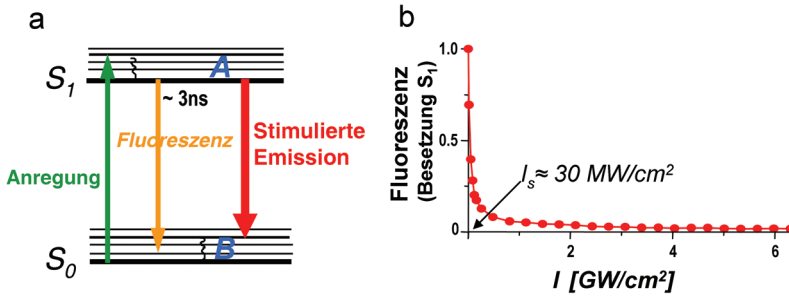


Abbildung 1: (a) Vereinfachtes Energieschema (Jablonski-Diagramm) eines fluoreszenten organischen Moleküls und die wichtigsten Übergänge. (b) Die Fluoreszenz (oder die Besetzung des  $S_1$ ) nimmt fast exponentiell mit der Intensität des stimulierenden Strahls  $I$  ab. Die Rate der stimulierten Emission ist durch  $I\sigma/(\hbar\omega)$  gegeben, wobei  $\sigma$  den molekularen Wirkungsquerschnitt und  $\hbar\omega$  die Photonenenergie bezeichnet. Bei der „Sättigungsintensität“  $I_s = \hbar\omega/(\tau_{fl}\sigma)$  hat die Fluoreszenz zur Hälfte abgenommen, wobei  $\tau_{fl}$  die Lebensdauer des  $S_1$  bezeichnet.

Die Bilderfassung erfolgt dabei durch zeitlich sequentielles Auslesen dieser transient geschaffenen ultrascharfen (hellen) Bereiche. Weil sich mehrere geeignete Hell-Dunkel-Paare  $A, B$  in Markermolekülen finden lassen, ist dieser Ansatz erstaunlich generell und im Grunde genommen auch nicht auf Fluoreszenz beschränkt [5,6].

Wie läßt sich ein Molekülzustand  $A$  mit frei laufenden Lichtwellen auf Bruchteile von  $\lambda$  eingrenzen? Das erste Verfahren, mit dem dies gelungen ist, ist die Stimulated Emission Depletion (STED)-Mikroskopie [3]. In seiner einfachsten Ausführung verwendet ein rasterndes STED-Mikroskop einen fokussierten Laserstrahl, der den Fluoreszenzmarker durch die Absorption eines Photons aus dem Grundzustand  $S_0$  in den fluoreszenten elektronischen Zustand  $S_1$  anregt (Fig. 1). Das angeregte Molekül emittiert innert  $\tau_{fl} \approx 3 \text{ ns}$  ein Photon einer längeren Wellenlänge und kehrt in den  $S_0$  zurück (Fig. 1). Der  $S_1$  ist somit der helle Zustand  $A$ , und der Grundzustand  $S_0$  ist sein dunkles Pendant  $B$ . Doch alle Moleküle, die sich innerhalb der Beugungsscheibe mit Durchmesser  $d = 200\text{--}350 \text{ nm}$  befinden, können in den  $S_1$  angeregt werden. Im STED-Mikroskop (Fig. 2) wird nun die effektive Anregung in den  $S_1$  räumlich eingeschränkt. Dazu verwendet man einen zweiten, „doughnut“-förmigen Strahl mit einer mittigen Nullstelle, der über die Beugungsscheibe gelegt wird. Die Wellenlänge dieses „STED-Strahls“ ist so stark rotverschoben, daß seine Photonenenergie nicht ausreichen würde, um Moleküle anzuregen, aber genau paßt, um angeregte Moleküle durch stimulierte Emission abzuregen. Der Doughnut sorgt da-

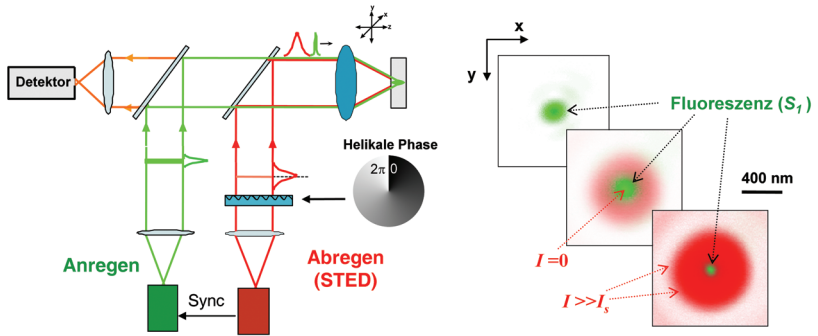


Abbildung 2: In einem typischen STED-Mikroskop werden das Anregungslicht und das Abregungslicht für die stimulierte Emission (STED-Strahl) gleichzeitig in das Mikroskopobjektiv eingekoppelt: (a) Während der Anregungsstrahl einen Beugungsfleck von  $> 250$  nm im Durchmesser hervorbringt, wird der STED-Strahl so modifiziert, daß er im Fokalbereich einen Doughnut ausbildet. (b) Im Randbereich des Anregungs-Spots wird die Fluoreszenz verhindert ( $I \gg I_s$ ), während sie in der Nullstelle des Doughnuts ( $I = 0$ ) erhalten bleibt. Der Bereich, in dem die Fluoreszenz noch möglich ist, wird aufgrund des nahezu exponentiellen Abbaus des  $S_1$  (Fig. 1b) mit zunehmendem intensiverem STED-Strahl immer weiter eingeschnürt (b) – prinzipiell bis auf ein Molekül, was bedeutet, daß es mit Hilfe der STED-Mikroskopie prinzipiell möglich ist, molekulare Auflösung mit fokussiertem Licht zu erhalten.

für, daß ein Molekül, das im Außenbereich der Beugungsscheibe angeregt wurde, abgeregt und damit effektiv im  $S_0$  – also im dunklen Zustand  $B$  – gehalten wird. Damit können nur Moleküle aus dem Doughnut-Minimum ausreichend im  $S_1$  (also in  $A$ ) verweilen.

Anregung und Abregung lassen sich gut mit synchronisierten Lichtpulsen von  $< 100$  ps bzw.  $> 300$  ps bewerkstelligen [3]. Die Energie des ehemals angeregten Moleküls wird größtenteils als ein weiteres Photon des STED-Strahls mitgeführt, der spektral scharf und gerichtet ist, so daß man ihn leicht von der breit und ungerichtet emittierten Fluoreszenz trennen kann. Nun liegt auf der Hand: Je enger das Minimum des Doughnuts, desto schärfer ist der  $S_1$  eingengt, d. h., desto schärfer wird der Fluoreszenz-Spot, der die Auflösung bestimmt (Fig. 2). Doch auch der Doughnut unterliegt der Beugungsgrenze, und seine Halbwertsbreite (FWHM) kann nicht ohne weiteres  $\sim 150$  nm unterschreiten. Um den  $S_1$  noch stärker einzugrenzen, nutzt die STED-Mikroskopie nun den Umstand, daß die Besetzung des  $S_1$  nahezu exponentiell mit der Intensität  $I$  des STED-Strahls abnimmt (Fig. 1b) [7].  $I_s$  sei hier als der „Schwellwert“ definiert, bei dem die Besetzung des  $S_1$  halbiert ist, und  $I$  ist die Intensität des Doughnuts. Für  $I \leq I_s$  ist die Eingrenzung

gering, falls jedoch  $I \gg I_s$ , so ist der runde Fleck, in dem die Fluoreszenz zugelassen ist, deutlich kleiner, weil dann ein größerer Teil des Doughnuts weit über  $I_s$  liegt und so den  $S_1$  unterdrückt. Damit drängt die Fluoreszenzverhinderung immer stärker an die Nullstelle heran, und der Spot, in dem die Fluoreszenz noch zugelassen ist, wird immer kleiner (Fig. 2). Doch ganz gleich, wie hoch  $I$  auch ist, an der Nullstelle ( $I = 0$ ) kann ein Molekül immer fluoreszieren, denn dort gibt es keine Abregung. Rastert man die Nullstelle durch die Probe, dann liefert das punktweise gemessene und in einem Rechner aufgetragene Signal automatisch Strukturen unterhalb der Beugungsgrenze, denn eng benachbarte Punkte werden jetzt hintereinander erfaßt. Das gemeinsame Rastern der Anrege- und der Abregestrahlen läßt sich mit Strahlraster-Techniken durchführen, etwa durch Ablenken mit einem beweglichen Spiegel. Einfache Rechnungen zeigen [4, 6, 8], daß die Auflösung einem neuen Gesetz folgt:

$$d = \frac{\lambda}{2n \sin \alpha \sqrt{1 + I/I_s}}$$

$I_s$  ist charakteristisch für das verwendete Fluoreszenzmolekül und die Wellenlänge für STED. Die Auflösung nimmt mit der Intensität  $I$  des STED-Strahls zu. Läßt man ihn weg ( $I = 0$ ), so erhält man Abbes Formel. Das grundsätzlich Neue an dem STED-Konzept ist aber, daß man durch  $I/I_s \rightarrow \infty$  prinzipiell  $d \rightarrow 0$  erzielen kann, d. h., die Auflösung ist grundsätzlich bis auf Molekülgröße steigerbar, obwohl alle Strahlen gebeugt sind. Die Beugungsgrenze ist also nicht „verschoben“, sondern „aufgehoben“. Daß es sich dabei aber um ein Fernfeldmikroskop handelt, zeigt sich darin, daß die Auflösung  $d$  mit  $\lambda$  skaliert. Das Wurzelverhalten rührt letztlich daher, daß der Intensitätsverlauf an der Nullstelle in erster Näherung parabolisch ist.

Kombiniert mit einem konfokalen Mikroskop, behält das STED-Mikroskop die Vorteile des ersteren bei. Es ist 3D-fähig und funktioniert unter normalen Umgebungsbedingungen. Anwendungen finden sich sowohl in der Zellbiologie [9] als auch in den Materialwissenschaften [10], sofern Fluoreszenzmarkierungen eingesetzt werden können.

Das Charakteristikum des STED-Mikroskops ist natürlich nicht der Doughnut an sich, sondern die Lichtverteilung mit einer Nullstelle, welche den Übergang  $S_1 \rightarrow S_0$  übersättigt, so daß sich der signalgebende Zustand  $S_1$  nur an der Nullstelle einstellen kann. Damit ist klar, daß die STED-Mikroskopie nur der Modellfall eines viel allgemeineren Konzepts zum Durchbrechen der Beugungsgrenze ist; denn es läuft ja darauf hinaus, einen – signalgebenden – Zustand  $A$  mit einer Intensitätsnullstelle räum-

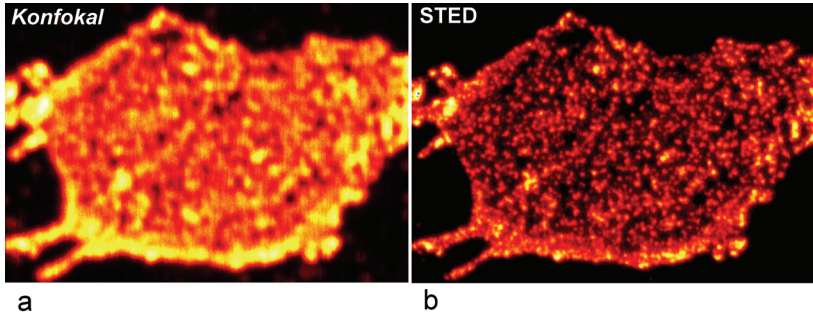


Abbildung 3: Verteilung eines fluoreszenzmarkierten Proteins (SNAP-25) auf einer Zellmembran. Im Gegensatz zu ihrem konfokalen Pendant löst die STED-Aufnahme (rechts) einzelne Proteincluster mit einer Auflösung von  $\sim 60$  nm auf und erlaubt deren Größenbestimmung. SNAP-25 spielt bei der Verschmelzung von synaptischen Vesikeln mit der Zellmembran eine wichtige Rolle.

lich einzugrenzen und den Marker außerhalb der Nullstelle vorübergehend in einem dunklen Zustand  $B$  zu parken. Es muß daher auch andere Hell-Dunkel-Paare  $A$  und  $B$  geben, die für diese Zwecke geeignet sind [4, 5]. Solche Zustände sind zum Beispiel konformationelle Zustände von Molekülen, bei denen sich die Atome nach Lichtabsorption so umlagern, daß in dem einen Fall Fluoreszenz stattfinden kann und in dem anderen Fall nicht, also cis-trans Photoisomerisationen zwischen einem fluoreszenten und einem nicht-fluoreszenten konformationellen Zustand.

Zusammenfassend läßt sich feststellen, daß alle nanoskopischen Verfahren bisher darauf hinausliefen, vorübergehend einen signalgebenden Markerzustand  $A$  zu schaffen, der deutlich enger lokalisiert ist als  $\lambda/2$ . Der Ansatz, die Zustände des Markers in die Bildentstehung einzubeziehen, war der Schlüssel zum Durchbruch der Beugungsgrenze [3]. Daher stellt sich die Frage, ob die hier beschriebenen Verfahren grundsätzlich auf fluoreszente Objekte beschränkt sind? Die Antwort lautet: nein, denn die Fluoreszenz des Zustands  $A$  ist keine Voraussetzung für dessen räumliche Einengung. Ein Zustand  $A$ , der statt Fluoreszenz jedes andere meßbare Signal aussendet, würde sich genauso eignen, Abbes Grenze zu durchbrechen; denn diese Signale zeigen  $A$  nur an, um ihn von  $B$  abzuheben. Es wäre daher nicht überraschend, wenn in naher Zukunft auch für andere Kontrastverfahren der optischen Fernfeldmikroskopie die Beugungsgrenze durchbrochen würde.

Heute steht bereits fest, daß sich im Fluoreszenzkontrast Auflösungen von 15–50 nm realisieren lassen, was unlängst noch der Elektronenmikroskopie vorbehalten zu sein schien. Die Bedeutung, die diese Entwicklung

für die Lebenswissenschaften haben wird, beginnt sich erst abzuzeichnen. Um zwei Beispiele zu nennen: STED-Mikroskopie konnte das neuronale Protein Synaptotagmin aus einzelnen neuronalen Bläschen (Vesikel) erstmals direkt an der Synapse auflösen und eine Debatte über seine Verteilung beenden [9], und man konnte herausfinden, wie viele Syntaxin-1-Proteine an der präsynaptischen Membran zusammenfinden müssen, damit Vesikel mit ihr verschmelzen können [11]. Führt man sich vor Augen, daß die meisten Proteininteraktionen der Zelle auf der Skala  $< 200$  nm stattfinden und daß diese Skala bisher schwer nichtinvasiv zugänglich war, so läßt sich erahnen, daß der fernfeldoptischen „Nanoskopie“ eine Schlüsselrolle in den Lebenswissenschaften zukommen wird. Nach allem, was wir heute wissen, ist davon auszugehen, daß binnen fünf Jahren ein optisches „Nanoskop“ zum instrumentellen Standardrepertoire zellbiologischer Forschung gehören wird.

### Literatur

1. D.W. Pohl, W. Denk, M. Lanz, *Appl. Phys. Lett.* 44, 651 (1984).
2. P. Guttman *et al.*, *J. de* 104, 85 (2003).
3. S.W. Hell, J. Wichmann, *Opt. Lett.* 19, 780 (1994).
4. S.W. Hell, *Nature Biotechnol.* 21, 1347 (2003).
5. S.W. Hell, *Science* 316, 1153 (May 25, 2007).
6. S.W. Hell, *Phys. Lett. A* 326, 140 (2004).
7. M. Dyba, S.W. Hell, *Phys. Rev. Lett.* 88, 163901 (2002).
8. V. Westphal, S.W. Hell, *Phys. Rev. Lett.* 94, 143903 (2005).
9. K.I. Willig, S.O. Rizzoli, V. Westphal, R. Jahn, S.W. Hell, *Nature* 440, 935 (2006).
10. K. Willig, J. Keller, M. Bossi, S.W. Hell, *New J. Phys.* 8, 106 (2006).
11. J.J. Sieber *et al.*, *Science* 317, 1072 (2007).