

Detaillierte Information mit Abbildungen

Auflösung jenseits der Beugungsgrenze

Die Fluoreszenzmikroskopie spielt in den Lebenswissenschaften eine herausragende Rolle. Die Gründe dafür sind vielfach. Die charakteristische Fluoreszenzwellenlänge eignet sich hervorragend, die abzubildenden Bestandteile der Probe, wie zum Beispiel einer Zelle, spezifisch zu markieren und daher untergrundfrei abzubilden. Fluoreszenzmarkierungen spielen auch eine große Rolle bei der Untersuchung der Reaktionsdynamik größerer organischer Moleküle in Lösung. Daher ist es nicht verwunderlich, daß ca. 80 % aller Mikroskopie-Untersuchungen in der Biologie auf die Fluoreszenzmikroskopie fallen.

Gerade aber die Interaktion von Licht und Fluoreszenzmarker bietet eine Reihe von Angriffsflächen, an denen die Göttinger Physiker ansetzen, um die Beugungsgrenze zu überwinden. In der Fluoreszenzmikroskopie werden nämlich die Markermoleküle in einen energetisch höheren Zustand angeregt, der bei der Rückkehr in den Grundzustand Fluoreszenzlicht emittiert. Weil das anregende Licht aber der Beugung unterliegt, kann der kleinste Fleck fluoreszierender Moleküle (Spot) nicht kleiner sein als Δd . Es sei denn, man verwendet einen neuen physikalischen Trick.

Der Trick besteht nun darin, daß der Fluoreszenzmarker mit Licht einer zweiten fokalen Licht-Intensitätsverteilung I transient in einen nichtfluoreszierenden Zustand überführt wird, wobei diese Licht-Intensitätsverteilung nicht homogen ist, sondern an mindestens einem Punkt eine Nullstelle hat. Das Fluoreszenzsignal, das somit noch übrig bleibt, stammt damit fast ausschließlich aus der Nullstelle der Licht-Intensitätsverteilung oder deren unmittelbaren Umgebung. Mehr noch: Je größer der absolute Wert der Intensität I , desto enger wird der Bereich um die Nullstelle, in dem noch Fluoreszenz möglich ist. Wächst I sogar ins Unendliche, so wird die Scheibe mehr und mehr zu einem Punkt. Es liegt damit auf der Hand, dass man mit übersättigten reversiblen Überführungen und einer Nullstelle einen beliebig feinen Fluoreszenz-Spot schaffen kann. Hochaufgelöste Bilder erhält man nun indem man das Objekt mit diesem scharfen Spot Punkt für Punkt abrastert und im Rechner darstellt. Ist die Überführung in den anderen Zustand nur transient, so hinterläßt diese Verfahren keine Spuren und eine getreue Abbildung der Probe ist möglich.

Dieses allgemeine Konzept ist in verschiedenen Realisierungen denkbar, denn für das transiente Versetzen eines Fluoreszenzmoleküls in einen nichtfluoreszierenden Zustand eignen sich grundsätzlich optisch sättigbare Übergänge, die an der Fluoreszenz beteiligt sind. Reversibel heißt, dass der Marker wieder in seinen Ausgangszustand zurückkehrt. Diesem RESOLFT (von engl. *reversible saturable optical fluorescent transitions*) genannten neuen Konzept sind prinzipiell keine Auflösungsgrenzen gesetzt. Kreiert man die Nullstelle durch das Objektiv- was üblicherweise der Fall ist- so folgt die Größe des Fluoreszenz-Spots dem folgenden Gesetz:

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

I_{sat} ist die charakteristische Sättigungsintensität, d.h. eine Art Schwelle bei der die Fluoreszenz eines Moleküls mit einer gewissen Wahrscheinlichkeit (~ 65%) in den nichtfluoreszierenden Zustand überführt ist. I_{sat} ist charakteristisch für den verwendeten Marker. Ohne sättigende Überführung (d.h. $I=0$) erhält man Abbes klassische Auflösungsgrenze. Doch im Gegensatz zu

bisher ist Δd jetzt nicht mehr nach unten begrenzt: für unendlich große Werte von I/I_{sat} folgt $\Delta d \rightarrow 0$. Somit ist klar, dass auch mit herkömmlichen Objektiven und fokussiertem Licht es prinzipiell möglich ist, Bilder zu erstellen, die über molekulare Auflösung verfügen.

Der erste Repräsentant des RESOLFT Konzepts ist die STED-Mikroskopie (von engl.: *stimulated emission depletion*), die in den genannten Arbeiten verwendet wurde und im Folgenden kurz erklärt wird.

STED-Mikroskopie

Mit Licht kann man ein Molekül nicht nur anregen, sondern auch schlagartig abregen, und zwar durch stimulierte Emission. Bei diesem von Einstein vorhergesagten in Abbildung 2a skizzierten Prozeß wird die Energie des angeregten Moleküls größtenteils als ein weiteres (und hier nicht weiter wichtiges) Photon abgeführt. Abgeregte Moleküle können sofort wieder angeregt und von neuem abgeregt werden; der Prozeß ist also im vorherigen Sinne reversibel und transient. Entscheidend für die Überwindung der Auflösungsgrenze ist aber nicht das Abregen an sich, sondern dessen Sättigung. Wenn nun eine bestimmte Schwellenintensität (=Sättigungsintensität) des stimulierenden Lichts überschritten ist, so ist die Fluoreszenz vernachlässigbar gering und das Abregen quasi komplett (Abbildung 2 b). Dies ist in der in Abbildung 2 gezeigten Messung bei Intensitätswerten über 1 GW/cm^2 der Fall.

In einem typischen STED-Mikroskop wird nun das Anregungslicht und das Abregungslicht gleichzeitig in das Mikroskopobjektiv eingekoppelt (Abbildung 3a). Während das Anregungslicht (grün) erwartungsgemäß einen Spot von $> 200 \text{ nm}$ im Durchmesser hervorbringt, wird das zur Abregung stimulierende Licht so modifiziert, dass es einen Ring im Außenbereich des Anregungsspot ausbildet, der in der Mitte über eine Nullstelle verfügt (roter Ring in Abb. 3b). Fluoreszenz aus dem Randbereich des beugungsbegrenzten Anregungs-Spot wird durch den Abregungslichtpuls verhindert, während sie in der Nullstelle und deren Nähe erhalten bleibt.

Im Grunde genommen wünscht man sich für die Abregung einen möglichst engen Ring, d.h. ein enges lokales Intensitätsminimum mit Nullstelle. Doch auch die Erzeugung zentraler Minima unterliegt Abbes Gesetz der Beugung. Einen Durchmesser kleiner als Δd läßt sich auch für das lokale Minimum de facto nicht bewerkstelligen. Weil aber die Abregung des Moleküls übersättigt wird, wird der Bereich in dem die Fluoreszenz noch möglich ist, bei zunehmend intensiverem Licht immer weiter eingeschnürt (Abbildung 3b). Rastert man den derart verkleinerten Spot durch die Probe, dann liefert das sequentiell registrierte Fluoreszenzlicht ein deutlich schärferes Bild als ein Mikroskop, das mit einem beugungsbegrenzten und daher größeren Spot abbilden würde. Jüngste Messungen, durchgeführt mit einzelnen Fluoreszenzmolekülen als Meßsonde, zeigen in der Tat, dass die Größe des Spots dem neuen Gesetz folgt.

Dabei behält das STED-Mikroskop im Grunde genommen so gut wie alle Vorteile eines fokussierenden Fluoreszenzmikroskops bei. Es ist grundsätzlich 3D-fähig und funktioniert unter normalen Umgebungsbedingungen. Anwendungen finden sich sowohl bei der Erforschung nanoskaliger Bestandteile der Zelle, als auch bei künstlich nanostrukturierten Materialien. Ein Beispiel für die vielseitige Anwendbarkeit zeigt Abbildung 4. Die beiden oberen Bilder verdeutlichen den Gewinn an Auflösung bei der Abbildung fluoreszenzgefärbter Poren. Während

man im herkömmlichen (im sogenannten konfokalen Modus) aufgenommenen Bild der Probe die Ringe als solche nicht erkennen kann, sind sie im STED-Vergleichsbild aufgelöst.

Die beiden anderen Bilder demonstrieren den Auflösungsgewinn an einer lithographischen Nanostruktur, wie sie als Zwischenschritt bei der Herstellung von Computerschaltkreisen üblich ist. Die in Kollaboration mit dem Institut für Röntgenphysik der Universität Göttingen mit einem Elektronenstrahl hergestellten Photolack-Linienmuster können selbst bei Strukturfeinheiten < 80 nm getrennt wahrgenommen werden, während die herkömmliche optische Abbildung keine Details mehr aufzulösen vermag. Sowohl im herkömmlich aufgelösten (links) als auch im STED-Bild wurde in diesem Vergleichsbeispiel zusätzlich ein mathematisches Bildbearbeitungsverfahren (lineare Entfaltung) eingesetzt, welche die Auflösung jeweils noch einmal geringfügig steigerten. Mathematische Bildverarbeitung ist aber in der STED-Mikroskopie nicht erforderlich, sondern nur optional.

Da prinzipiell nichts gegen eine weitere Auflösungssteigerung durch Optimierung der Abbildungsparameter spricht, kann in Zukunft mit noch schärferen Bildern der STED-Mikroskopie gerechnet werden. In der Tat ist es kürzlich gelungen zu zeigen, daß unter realistischen experimentellen Bedingungen die Spotgröße sogar bis zu $\lambda/50$ reduziert werden kann, was in diesem Falle nur 16 nm betrug. Die Fähigkeit Auflösungen dieser Größenordnung zu erzielen, wurden bisher fast nur der Elektronenmikroskopie und der Rastersondenmikroskopie zugeschrieben.

STED ist aber nur eine – wenn auch die erste und zurzeit die am besten erforschte-Variante des RESOLFT Konzepts. Andere vielversprechende Varianten, die etwa den Farbstoff sättigend in einen Dunkelzustand überführen, z. B. in einen Triplet-Zustand oder in einen dunklen Konformationszustand, zeigen laut Berechnungen ein ebenso hohes Potential die Beugungsgrenze zu durchbrechen. Das Gleiche gilt auch für Varianten, die optisch bistabile Moleküle reversibel von einem ersten in einen zweiten Zustand schalten. Mehr noch, weil ihre zu erwartenden I_{sat} Werte um Größenordnungen niedriger sind als bei STED, sind selbst bei um 4-8 Größenordnungen geringeren Intensitäten Auflösungen von einigen wenigen Nanometern zu erwarten. Damit ist ein Tor für die Lichtmikroskopie und ihre Anwendungen aufgestoßen worden, die noch vor wenigen Jahren kaum denkbar gewesen wäre.



Abb. 1: Formel von Ernst Abbe (1840-1905), dessen 100. Todestag sich kürzlich jährte, zur maximalen Auflösung eines Lichtmikroskops an einem von der Universität Jena zu seinen Ehren errichteten Denkmal in Jena.

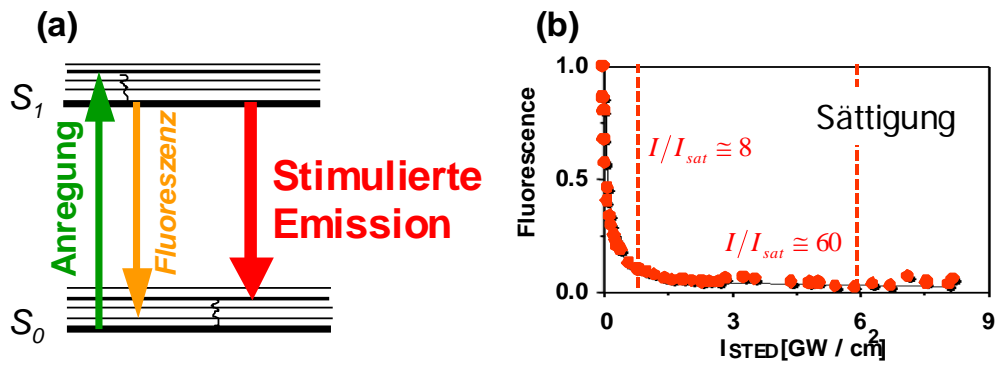


Abb. 2: Fluoreszenzlöschung durch stimulierte Emission. (a) Energieschema eines Fluoreszenzmoleküls: Licht geeigneter Wellenlänge kann den ansonsten fluoreszierenden, angeregten Zustand S_1 mittels stimulierter Emission in den Grundzustand S_0 abregen. (b) Mit zunehmender Intensität I_{STED} des stimulierenden Lichts verringert sich die Fluoreszenz aus S_1 exponentiell. Über der ersten eingezeichneten Schwelle ist die Abregung fast komplett, d.h. gesättigt, und die Fluoreszenz weitgehend gelöscht (STED, engl.: *stimulated emission depletion*). Höhere Intensität des stimulierenden Lichts bedeutet einen höheren Sättigungsgrad I/I_{sat} .

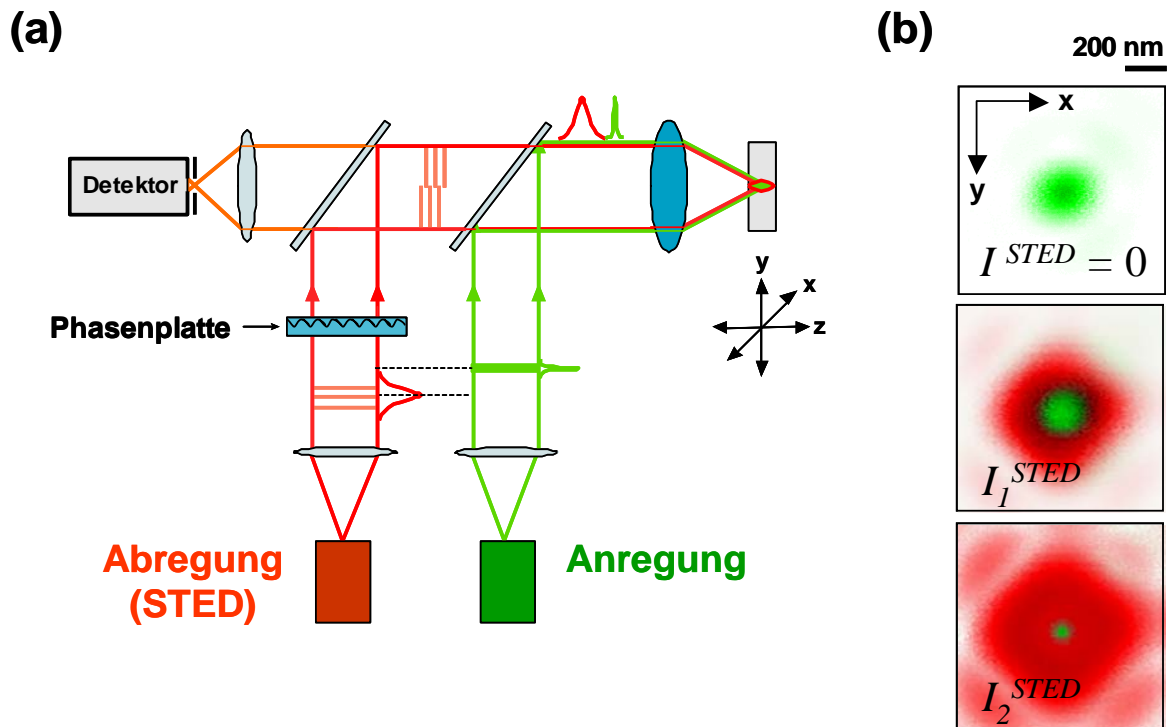


Abb. 3: STED-Mikroskopie: (a) Typisches Schema eines STED-Mikroskops mit Anregungs-, Abregungsstrahl, Phasenplatte, Detektor und Objektiv. In der Fokalebene (x,y) des Objektivs bildet der Anregunglichtpuls (grün) eine Scheibe mit ca. 250 nm Durchmesser aus (b, rechts oben), die mit dem zeitlich synchronisierten Abregungslichtpuls überlappt (b, rechts mittig). Die Phasenplatte bildet den stimulierenden Abregestrahls so um, daß er nicht ebenfalls eine Scheibe, sondern eine zentrale Nullstelle ausbildet. Das Abregungslicht wird bei niedriger STED-Sättigung nur im äußeren Bereich des Anregungsfokus wirksam. Mit zunehmender Intensität bleibt jedoch nur ein immer kleinerer Bereich von der Abregung durch stimulierte Emission ausgenommen (b, rechts unten), so dass der Fokalbereich in dem Fluoreszenz noch möglich ist, also der Fluoreszenzspot, weit unterhalb die Beugungsgrenze gedrückt wird. (a) Abrastern in x,y eines fluoreszenzmarkierten Objekts mit diesem kleineren Spot liefert Bilder mit Auflösungen weit unterhalb der Beugungsgrenze.

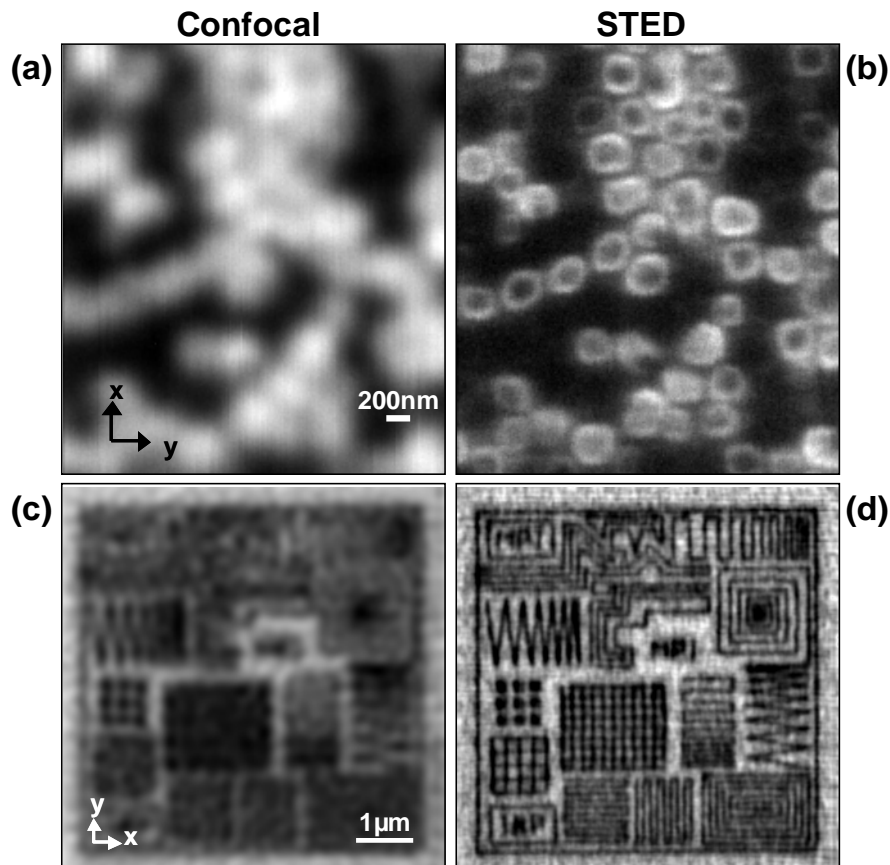


Abb. 4: Bilder jenseits der Beugungsgrenze. Obere Reihe: (a) Fluoreszenzgefärbte Poren einer porösen Membran sind mit herkömmlicher Auflösung als solche nicht zu erkennen. (b) Parallel dazu ausgeführte Abbildung durch STED-Mikroskopie fördert ihre Struktur zutage. *Confocal* bedeutet, daß die herkömmlich aufgelösten Bilder in der linken Spalte mit einem *state of the art* Confocal-Lichtmikroskopieverfahren aufgenommen wurde, was zur Zeit das beste beugungsbegrenzte Standardverfahren der Lichtmikroskopie ist. Untere Reihe: Mit einem Elektronenstrahl gefertigte Nanostrukturen in fluoreszenzgefärbtem PMMA zunächst mit herkömmlicher (confocal) Auflösung (c) und dann mit STED aufgenommen (d). Die Rohdaten von (c) und (d) wurden nach der Bildaufnahme durch eine lineare mathematische Entfaltung auf gleiche Weise geringfügig verbessert. Trotzdem kann das herkömmlich aufgenommene Bild in (c) nicht die Linienstruktur der Probe zutage fördern, während das STED-Mikroskop Linien mit bis zu 80 nm Breite und 40 nm Zwischenräumen auflöst (d). Damit rückt die optische Abbildung in Bereiche vor, die bislang dem Elektronenmikroskop vorbehalten waren. Daten entnommen aus Referenzen [2] bzw. aus [3].