

Lokalisationsmikroskopie

Lichtmikroskopie unterhalb des Abbe-Limits

CHRISTOPH CREMER

Ein Jahrhundert lang galt die von Ernst Abbe und Baron Rayleigh postulierte Grenze der lichtmikroskopischen Auflösung bei etwa 200 nm als unüberwindlich. Neue physikalische und optoelektronische Verfahren haben sie durchbrochen. Mit sichtbarem Licht können sie Nanostrukturen bis ins molekulare Detail abbilden.

Die Erforschung von Nanostrukturen gehört zu den großen wissenschaftlichen Themen. Ihre Abmessungen liegen zwischen wenigen Nanometern und einigen 100 nm. Sie sind allgegenwärtig, von der Materialforschung über Viren und Bakterien bis zu den molekularen Maschinen, die in unserem Körper die Lebensvorgänge steuern. Zu ihrer Analyse gibt es heute ein breites Spektrum physikalischer Verfahren; zu den wichtigsten zählen Methoden der Röntgenstreuung, der Neutronenstreuung, vor allem aber der Elektronenmikroskopie.

Alle diese Verfahren zeichnen sich dadurch aus, dass sie Teilchen oder Photonen verwenden, deren Wellenlänge wesentlich kleiner ist als die Abmessungen der zu untersuchenden Objekte. Damit erfüllen sie die von Ernst Abbe und Baron Rayleigh vor mehr als einem Jahrhundert aufgestellte Bedingung für die mit einem optischen Verfahren realisierbare optische Auflösung. Diese ist über den kleinsten Abstand d zwischen zwei „punktförmigen“ Objekten definiert, der noch erfasst wird.

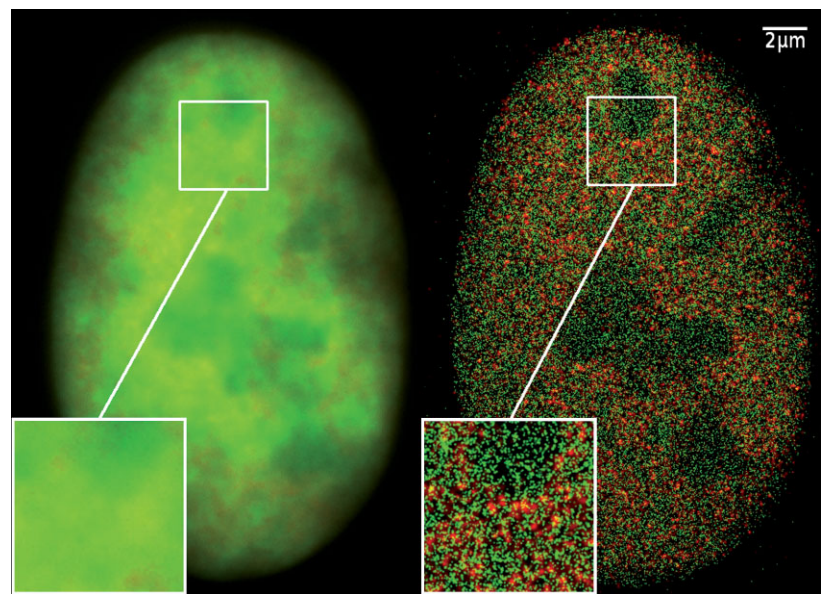
Abbes Auflösungsgrenze

Abbe stellte in seiner berühmten Abhandlung „Beiträge zur Theorie des Mikroskops und ihrer mikroskopischen Wahrnehmung“ von 1873 fest, „dass...die Unterscheidungsgrenze [beim Mikroskop]...doch niemals über [den Betrag] der halben Wellenlänge des blauen Lichts um ein Nennenswertes hinausgehen wird“ [1]. Obwohl Abbe Professor für Physik an der Universität Jena und Direktor der dortigen Sternwarte war, wählte er diese rein verbale Formulierung. Sie führte später zu der berühmten Formel:

$$d = 0,5 \cdot \frac{\lambda}{n \sin \alpha},$$

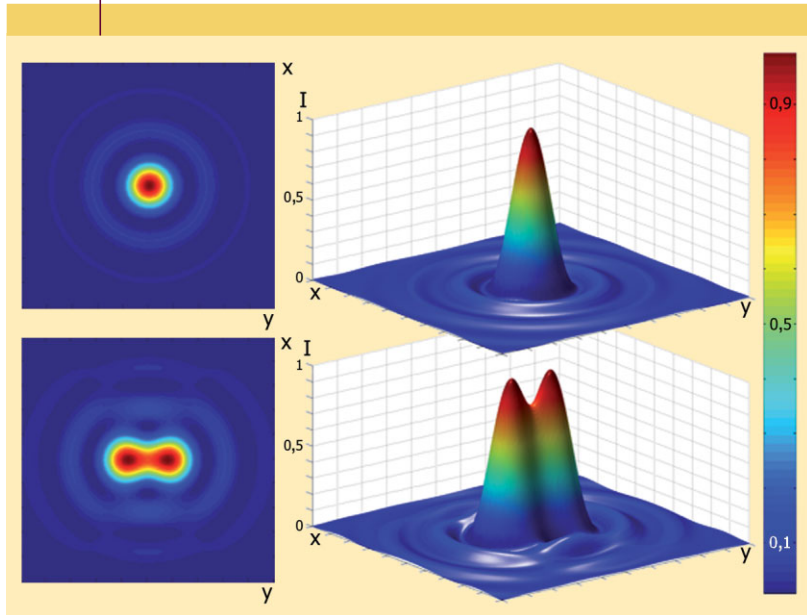
λ ist dabei die Vakuumwellenlänge des verwendeten Lichts, n der Brechungsindex des Mediums zwischen Objektiv (Frontlinse) sowie Objekt und α der maximale halbe Öffnungswinkel zwischen einem Objektpunkt und dem Objektiv.

Abbe leitete seine Folgerungen zur absoluten Grenze der bildgebenden Analyse von Nanostrukturen aus Untersuchungen der Beugung von Licht an Strichgittern ab. Die Beugung des Lichts hängt dabei vom Abstand der Beugungselemente ab. So wird Licht an einem Gitter mit 5000 Linien pro Millimetern stärker gebeugt als an einem



Lichtmikroskopische Bilder des Kerns einer Knochenmarks-Krebszelle [12]. Links: Die konventionelle hochauflösende Fluoreszenzmikroskopie kann die einzelnen fluoreszenzmarkierten Molekültypen in ihrer räumlichen Verteilung nicht voneinander trennen, da ihre Auflösungsgrenze bei etwa 200 nm liegt. Rechts: Der Lokalisationsmikroskopie (hier im SPDM_{PHYMOD}-Verfahren) gelingt dies. Im Zweifarbenmodus lassen sich in dem gezeigten „optischen Schnitt“ mit einer Kernschicht von etwa 600 nm Dicke rund 70 000 einzelne Histonmoleküle (rot) und etwa 50 000 individuelle Proteine zur Regulation der Genomstruktur (grün) lokalisieren. Das Gesichtsfeld ist etwa 470 µm² groß.

ABB. 1 AUFLÖSUNGSGRENZE



Grenzen der Auflösung in der konventionellen Fluoreszenzmikroskopie. Der einzelne Intensitätspeak (oben) entspricht einer Airy-Funktion, seine Basis dem Streuscheibchen.

Gitter mit nur 1000 Linien/mm. Damit es eine Information über das Objekt – hier der Abstand d zwischen zwei Gitterlinien – übertragen kann, muss mindestens das erste Beugungsmaximum noch in das optische System eintreten. Bei Lichtmikroskopen ergibt sich daraus bei sichtbarem Licht eine Begrenzung der Auflösung auf 5000 Linien/mm oder 1 Linie pro 200 nm, also einen minimalen Linienabstand von 200 nm.

Rayleighs Limit

Zu einem sehr ähnlichen Ergebnis kam in England Baron Rayleigh durch ganz andere Überlegungen [2]. Er ging von „punktförmigen“ selbstleuchtenden Objekten aus, bei denen zwischen den einzelnen emittierten Wellenzügen keine festen Phasenbeziehungen bestehen. Daher addieren sich an einem bestimmten Ort im Raum im Allgemeinen nicht die Feldstärken, sondern die Intensitäten. In der Mikroskopie ist dies insbesondere bei fluoreszierenden Objekten der Fall, bei denen das emittierte Licht eine andere Frequenz hat als das absorbierte.

Wegen der Wellennatur der Lichtausbreitung wird ein Punkt nicht als Punkt abgebildet, sondern er erscheint als kleines Beugungsscheibchen (Abbildung 1). Dieses kann man aus der Überlagerung der an der Objektivöffnung gebeugten Wellen berechnen. Dabei erzeugt jeder einzelne Objektpunkt in der Bildebene ein Scheibchen, dessen Helligkeit nach außen abnimmt. Dieses sogenannte Airy-Scheibchen besteht aus einem hellen Zentrum, das von konzentrischen Ringen umgeben ist. Abbildung 1 stellt es oben als dreidimensionalen Intensitätspeak (Airy-Funktion) dar. An seiner Basis hat der einzelne Peak einen Durchmesser von

etwa $2 \cdot 0,6 \cdot [\lambda / (n \sin \alpha)] \cdot M$ (M : Vergrößerungsfaktor des optischen Systems). Im Unterschied zu Abbes Ansatz ist λ hier nicht die Wellenlänge des am Objekt gebeugten Lichts, sondern des vom selbstleuchtenden Objekt ausgehenden Lichts.

Solange im Gesichtsfeld nur einziges punktförmiges Objekt leuchtet (Abbildung 1 oben), kann man seine Lage (x_b , y_b) im Bild eindeutig feststellen, sofern man genügend viele Photonen des Emitters empfängt. Dazu braucht man nur das Maximum zu bestimmen; die Lage des Punktes in der Objektebene ergibt sich dann aus $X_b = x_b/M$, $Y_b = y_b/M$. Rayleigh selbst hat bereits 1895 darauf hingewiesen.

Normalerweise besteht ein Objekt aber aus sehr vielen einzelnen „Punkten“. Zum Beispiel können viele organische Moleküle durch chemische Prozesse oder durch Absorption von Photonen zur Aussendung von Fluoreszenzphotonen angeregt werden. Solange der Abstand d zwischen den Objektpunkten so groß ist, dass die von ihnen gebildeten Beugungsscheibchen sich nicht überlappen, kann das Maximum jedes Beugungsscheibchens und damit die Lage der zugehörigen Quelle im Objekt getrennt von den anderen bestimmt werden. Alle Objektpunkte zusammen ergeben ein maximal aufgelöstes Bild des Objekts, also die Information über die räumlichen Beziehungen der Objektpunkte zueinander. Was geschieht aber, wenn die Objektpunkte einander so nahe kommen, dass die vom abbildenden Mikroskopsystem erzeugten Beugungsscheibchen einander zu überlagern beginnen?

Rayleigh argumentierte, dass zwei solche selbstleuchtende Objektpunkte nur dann noch voneinander unterscheidbar sind und man damit ihre Positionen bestimmen kann, wenn man die Maxima der beiden Beugungsscheibchen noch getrennt voneinander erfassen kann. Dies gilt zum Beispiel dann, wenn das Maximum des zweiten Beugungsscheibchens in das Minimum des ersten fällt (Abbildung 1 unten).

Hieraus ergibt sich wieder eine sehr ähnliche Beziehung wie bei Abbe. Der kleinste detektierbare Abstand, also die optische Auflösung, zwischen zwei selbstleuchtenden – beispielsweise fluoreszierenden – Objektpunkten ist nach Rayleigh $d_{\min} = 0,61 \cdot \lambda / (n \sin \alpha)$. Dabei stellt $n \sin \alpha$ wie bei Abbe die numerische Apertur des Mikroskopsystems dar, und λ ist die emittierte Wellenlänge. Die von Rayleigh gefundene Auflösung ist minimal geringer als beim modernen Ansatz auf Basis seiner Theorie, der sogenannten Punktverwaschungsfunktion oder Punktspreizfunktion (Point Spread Function, PSF). Die Breite der PSF auf der halben Höhe des Intensitätsmaximums (Full-Width-at-half-Maximum, FWHM) beträgt etwa $0,51 \cdot \lambda / (n \sin \alpha)$. Sie entspricht nach der heute meist gebräuchlichen Definition dem minimalen Abstand, bei dem zwei Objektpunkte mit ihren Beugungsscheibchen gerade noch optisch getrennt erscheinen (Abbildung 1 unten). Die PSF kommt praktisch zu genau dem gleichen Ergebnis wie einst Abbe.

Kurze Wellenlängen zwingend?

In beiden Theorien der optischen Auflösung ergab sich die lichtoptische Begrenzung der Erforschung von Nanostrukturen aus der Wellennatur des Lichts, also einer physikalischen Grundgegebenheit unseres Universums. Eine Überwindung dieses Limits schien damit ebenso ausgeschlossen wie die Entwicklung eines Perpetuum Mobile. Um die Auflösung über die von Abbe gegebene Grenze von „einer halben Wellenlänge des blauen Lichts“ hinaus zu überwinden, gab es nur zwei Möglichkeiten: die Vergrößerung der numerischen Apertur $NA = n \sin \alpha$ oder die Verkleinerung der Wellenlänge λ .

Bei einem (einzelnen) Mikroskopobjektiv ist aber der maximale halbe Aperturwinkel $180/2 = 90^\circ$. Damit ergibt sich $\sin 90^\circ = 1$, die numerische Apertur kann also maximal den Wert n erreichen. Der Brechungsindex der heute in der Mikroskopie verwendeten optischen Materialien kann aus praktischen Gründen nicht wesentlich über $n = 1,5$ gesteigert werden. Daraus ergibt sich eine maximal mögliche numerische Apertur um etwa 1,5. Für wesentliche Verbesserungen der optischen Auflösung blieb in beiden Theorien daher nur die Verkürzung der Wellenlänge übrig. Bereits Rayleigh schlug die Verwendung von ultraviolettem Licht vor, was auch realisiert wurde. Allerdings wird Glas im UV-Bereich bei kürzeren Wellenlängen schnell undurchsichtig, so dass dieser Weg nur wenig Auflösungsverbesserung brachte.

Wesentlich vielversprechender waren zwei fundamentale Neuerungen der Physik am Ende des 19. Jahrhunderts, noch zu Lebzeiten von Abbe und Rayleigh: die Entdeckung des Elektrons und die technische Möglichkeit, Hochvakua zu erzeugen. In den 1920er Jahren kam dann die Entdeckung der Welleneigenschaften von Materie hinzu. Für Elektronen ergeben sich hieraus aus $\lambda = h/p$ mit der Planck-Konstanten h und dem Impuls p sehr kleine Wellenlängen. Bei einer Beschleunigungsspannung von beispielsweise 10 000 Volt ist $\lambda_{\text{elektron}} \approx 0,01 \text{ nm}$.

Damit ergab sich die Möglichkeit der Konstruktion von Elektronenmikroskopen, mit denen heute in den Materialwissenschaften optische Auflösungen bis in den atomaren Bereich möglich sind – und bis zu molekularen Dimensionen von wenigen Nanometern bei Biostrukturen. Außer Teilchenstrahlung kommen auch der Röntgenstreuung und der Röntgenmikroskopie eine große Bedeutung für die Nanostrukturanalyse zu.

Dank diesen auf energiereicher (ionisierender) Strahlung basierenden Methoden konnten viele Geheimnisse der Nanowelt aufgedeckt werden. Dennoch blieb eine Verbesserung der lichtoptischen Auflösung von größtem Interesse. Dafür gibt es eine große Zahl praktischer Gründe. Die Elektronenmikroskopie zum Beispiel benötigt typischerweise metallbedampfte oder mit Schwermetallen versetzte Proben im Vakuum, erlaubt also keine Beobachtung lebender (*in vivo*) oder lebensnaher biologischer Nanostrukturen.

Bereits Abbe hielt es für grundsätzlich möglich, dass eines Tages neue Methoden gefunden würden, die eine licht-

optische Abbildung weit jenseits der von ihm formulierten Erkenntnisgrenze möglich machen könnten. In seiner berühmten Arbeit [1] schrieb er schon 1873, die Grenze von etwa einer halben Wellenlänge sei nur gültig, „... so lange nicht Momente geltend gemacht werden, die ganz außerhalb der Tragweite der aufgestellten Theorie liegen...“. Fundamentale neue Entdeckungen in Physik, Optoelektronik, Informationstechnologie und Molekularbiologie ermöglichen heute die Überwindung der Abbeschen Grenze der lichtoptischen Naturerkenntnis.

In der Physik sind dies insbesondere die Entwicklung von kohärenten Strahlungsquellen im sichtbaren Spektralbereich, den Lasern, seit den 1960er Jahren, von hochsensitiven optischen Detektoren seit den 1980ern und seit den 1990ern die digitale Bildverarbeitung durch leistungsfähige Computer sowie die wachsenden Einsichten in die optische Physik von organischen Molekülen. In den Lebenswissenschaften waren für die supraauflösende Lichtmikroskopie oder Nanoskopie wesentlich die molekulare Zellbiologie, die Entdeckung der DNS-Struktur, des genetischen Codes und die Möglichkeit gezielter Änderungen des Erbgutes in Zellen. Hinzu kommen Techniken zur molekül-spezifischen optischen Markierung.

In den letzten beiden Jahrzehnten wurden dabei Methoden entwickelt, die die bislang für absolut gehaltene Grenze der optischen Auflösung in der Fernfeldfluoreszenzmikroskopie in dramatischer Weise überwinden. Fernfeldmikroskopie bedeutet, dass zwischen dem Objekt und der Frontlinse des Mikroskopobjektivs eine Mindestdistanz von mehreren hundert Wellenlängen liegt (typisch: um die 500 nm bei sichtbarem Licht). Ferner beruhen alle bisher entwickelten Methoden der lichtoptischen Nanoskopie bei solchen Fernfeldmikroskopen auf photophysikalischen Wechselwirkungen des anregenden Lichts mit dem Objekt. Damit lässt sich die Auflösung steigern. Es bedeutet aber auch, dass die Rayleigh-Theorie mit ihren selbst leuchtenden „Punkten“ nicht wie lange angenommen äquivalent zu der auf dem Gitter basierenden Theorie von Abbe ist. Diese Fehlinterpretation ist der Grund, dass sich derart neue Perspektiven erst während der letzten Jahrzehnte durchsetzten.

Spektrale Präzisionsdistanzmikroskopie

Als Beispiel für eine solche „nanoskopische“ Überwindung der konventionellen Grenze der optischen Auflösung stelle ich die Spectrally Assigned Localization Microscopy (SALM) näher vor. Die Grundidee dieser sich derzeit rasch in verschiedenen Varianten entwickelnden Methode ist die von unserer Arbeitsgruppe am Heidelberger Kirchhoff-Institut für Physik seit den 1990er Jahren entwickelte spektrale Präzisionsdistanzmikroskopie (Spectral Position Determination Microscopy, SPDMM), auch spektrale Lokalisationsmikroskopie [3] genannt. Diese Methode ermöglicht es, zelluläre Nanostrukturen fluoreszenzoptisch zu analysieren und damit wesentliche Fragen der molekularen Biophysik, Zellbiologie und molekularmedizinischen Forschung mit

wichtigen biologischen und medizinischen Anwendungen zu bearbeiten (Abbildungen auf S. 21 und 28).

Abbildung 2 zeigt das SPDM-Prinzip [3, 10]. Sie ist numerisch auf Grundlage der skalaren Wellentheorie errechnet. Dabei nahmen wir eine numerische Apertur $NA = n \sin \alpha = 1,4$ und eine Emissionswellenlänge von 488 nm an. Zunächst stellen wir uns drei „punktförmige“, mit derselben spektralen Signatur selbst leuchtende Punkte vor, zum Beispiel Moleküle (Abbildung 2a). Sie sind nur 50 nm voneinander entfernt, ihr Abstand ist also viermal kürzer als die konventionelle Grenze der optischen Auflösung von etwa 200 nm.

Die (virtuelle) Mikroskopoptik erzeugt von jedem dieser drei Moleküle wegen der Wellennatur des Lichts ein Beugungsscheibchen mit einem Durchmesser von etwa $200 \text{ nm} \cdot M$, wobei M der Vergrößerungsfaktor ist. Bei derselben spektralen Signatur der Moleküle überlagern diese sich in der Bildebene (Abbildung 2b). Ein Intensitätsquerschnitt durch die Mitte dieses „Beugungsbildes“ ergibt eine Helligkeitskurve (Abbildung 2c, nach Division durch M). Diese entsteht durch die Überlagerung der drei einzelnen,

von den drei Molekülen gebildeten Beugungsscheibchen und ist fast identisch mit der von einem einzigen Molekül erzeugten Kurve. Es ist also hier nicht mehr möglich festzustellen, wo die drei Moleküle im Bildfeld genau lokalisiert sind und welchen Abstand sie voneinander haben.

Hat jedes der eng benachbarten Moleküle jedoch eine *verschiedene* spektrale Signatur, die wir B, G, R nennen wollen (Abbildung 2d), so können wir die Orte der einzelnen Moleküle und ihre Abstände untereinander bestimmen. Abbildung 2e zeigt oben das Beugungsscheibchen des Lichts vom in Abbildung 2d links gelegenen Molekül mit der spektralen Signatur B. Dabei nehmen wir an, dass die Emissionen der beiden Moleküle mit Markierung G, R nicht zu dem Beugungsscheibchen von B beitragen, für den in diesem Falle verwendeten Detektor also „dunkel“ sind. Es ist offensichtlich, dass sich der Mittelpunkt (x_B, y_B) dieser Beugungsverteilung mit einem Lokalisierungsfehler (σ_{xy}) bestimmen lässt, der wesentlich kleiner ist als der Durchmesser $D \approx 200 \cdot M \text{ nm}$ der Beugungsverteilung. Selbst mit bloßem Auge ist eine Lokalisierung in der Bildebene mit einem Fehler $\sigma_{xy} \approx D/8 = 25 \cdot M \text{ nm}$ leicht zu erreichen.

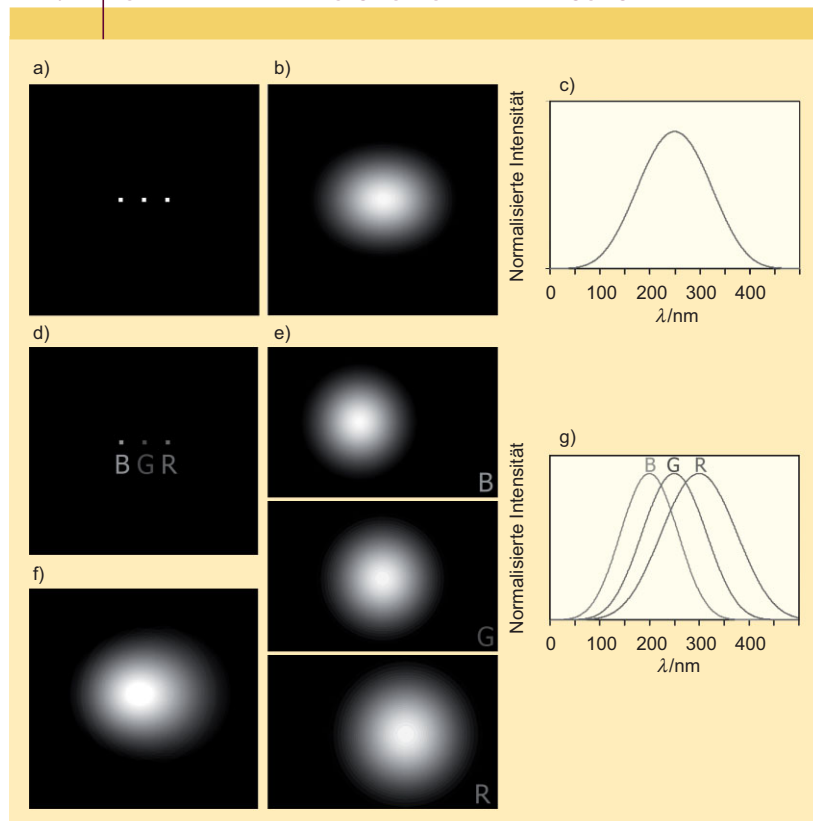
Eine quantitative Auswertung der Intensitätsverteilung durch das von B gebildete Beugungsscheibchen (Abbildung 2g) kann jedoch noch wesentlich genauere Werte ergeben. Bei guter Photonstatistik sind experimentell Positionsbestimmungen mit einem Lokalisierungsfehler $\sigma_{xy} < 1 \text{ nm} \cdot M$ erreichbar. Bereits 1895 wies Baron Rayleigh darauf hin, dass die so bestimmte Bildposition (x_B, y_B) eines punktförmigen selbst leuchtenden Objekts dem Fall der geometrischen Optik entspricht, also „unendlich guter“ optischer Auflösung für $\lambda \rightarrow 0$. Dies bedeutet, dass die Koordinaten ($X_B = x_B/M; Y_B = y_B/M$) die Koordinaten des punktförmigen Objekts (Moleküls) B in der Objektebene angeben.

Diese Überlegungen lassen sich nun für die „optisch isolierten“ Beugungsbilder der beiden anderen Moleküle mit den spektralen Signaturen G und R wiederholen, wobei der Detektor wieder jeweils bei den zwei anderen Signaturen dunkel bleibt (Abbildung 2e Mitte und unten). Von den beiden optisch isolierten Beugungsbildern für G und R können wir damit die Mittelpunkte (x_G, y_G) und (x_R, y_R) und damit die Koordinaten ($X_G = x_G/M; Y_G = y_G/M$) sowie ($X_R = x_R/M; Y_R = y_R/M$) mit einem Fehler $\sigma = \sigma_{xy}/M \ll 200 \text{ nm}$ in der Objektebene bestimmen.

Da wir nun die Einzelkoordinaten der drei Objekte (beispielsweise Moleküle) B, G, R in der Objektebene kennen, können wir daraus zum Beispiel die Abstände in der Objektebene nach Pythagoras berechnen – selbst wenn diese erheblich kleiner sind als D/M , also wesentlich unter der konventionellen Auflösungsgrenze der Fluoreszenzmikroskopie von $d_{\min} \approx 0,6 \cdot \lambda / (n \sin \alpha) \approx D/M$ liegen.

Man kann also mit diesem Verfahren Objekteinheiten „auflösen“, das heißt voneinander unterscheiden, die wesentlich kleiner sind als die konventionelle Grenze der lichtoptischen Auflösung. Bezieht man die dritte Dimension ein (Koordinate z längs der optischen Achse), so ergeben sich zusätzliche messtechnische Probleme, die jedoch lösbar

ABB. 2 | SPEKTRALE PRÄZISIONSDISTANZMIKROSKOPIE



Prinzip der Spektralen Präzisionsdistanzmikroskopie (SPDM). a) Drei im Abstand von jeweils 50 nm liegende „punktförmige“ Objekte derselben spektralen Signatur; **b)** das von ihnen erzeugte Beugungsbild; **c)** Intensitätsverteilung durch das Zentrum von **b)**; **d)** drei im Abstand von jeweils 50 nm liegende Objekte mit verschiedenen spektralen Signaturen B, G, R; **e)** optisch isolierte Beugungsbilder von B, G, R; **g)** Intensitätsverteilung durch das Zentrum der einzelnen, optisch isolierten Beugungsbilder von B, G, R; **f)** überlagertes Beugungsbild von B, G, R (Bilder: aus [9], nach [3]).

sind; das Grundkonzept bleibt unverändert. Da das Verfahren Präzisionsdistanzmessungen von Objekten geeigneter spektraler Signatur ermöglicht, haben wir es wie schon erwähnt spektrale Präzisionsdistanzmikroskopie genannt.

Die erreichbare optische Auflösung kann man in diesem Fall durch die Lokalisationsgenauigkeit σ in der Objektebene abschätzen: Der kleinste detektierbare Abstand zwischen zwei Objekten verschiedener spektraler Signatur beträgt hier etwa 2σ . Abbildung 3 zeigt hierzu eine Computersimulation, die unter der Annahme entstand, dass eine geeignet (sehr) hohe Zahl von spektralen Signaturen realisiert werden kann. Bei 5 nm Lokalisationsgenauigkeit könnten sogar Ringstrukturen mit Abständen im 10-nm-Bereich noch klar voneinander unterschieden werden. Der Kontrast ($[\text{Maximum} - \text{Minimum}]/[\text{Maximum} + \text{Minimum}]$) ist selbst in diesem Fall noch um die 0,5 und übertrifft damit immer noch deutlich denjenigen der konventionellen Auflösungs-grenze.

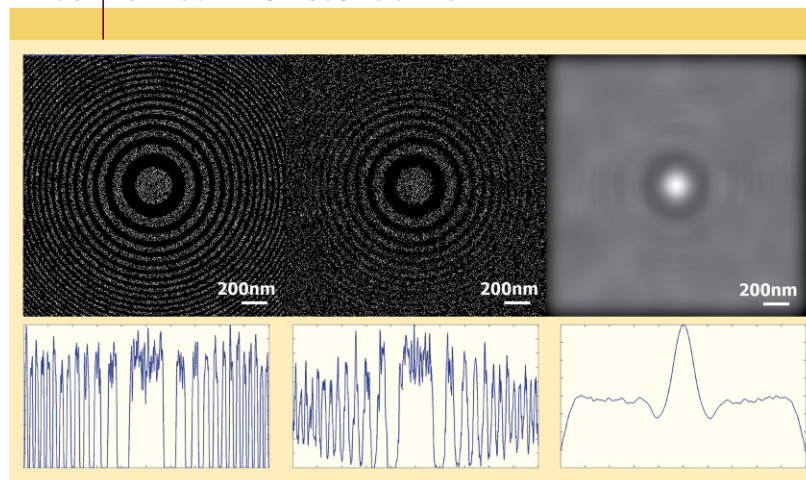
Verschiedene spektrale Signaturen

In den bisherigen Überlegungen zur Überwindung der konventionellen Auflösungsgrenze haben wir eine „spektrale Signatur“ operational als eine Objekteigenschaft definiert, die es erlaubt, die für das SPDM-Verfahren erforderliche optische Isolation der Beugungsbilder (Abbildung 2) durchzuführen. Man kann dies zum Beispiel mithilfe von verschiedenen Fluoreszenzemissionsspektren (Spektralfarben) realisieren. Zum Beispiel kann man annehmen, dass jedes der zu trennenden eng benachbarten Moleküle eine andere „Farbe“ trägt, etwa Grün (G), Rot (R) und Blau (B). Trennt man bei der Aufnahme mit optischen Filtern das grüne, rote und blaue Licht voneinander, so erhält man drei gegeneinander leicht versetzte Beugungsscheibchen in den entsprechenden Farben. Dies führt dazu, dass bei spektral getrennter Registrierung von G die Moleküle R, B nicht zur Detektion beitragen, also für den Detektor dunkel sind, usw.

Wir konnten bereits vor über zehn Jahren mit fluoreszenzmarkierten Zellkernen zeigen, dass die SPDM in der Fernfeldfluoreszenzmikroskopie bei Temperaturen um 300 K grundsätzlich realisierbar ist [3]. Dabei verwendeten wir drei molekulare Farbmärker (Fluorochromtypen), wobei die spektralen Signaturen sich im Absorptions- und Emissionsspektrum unterschieden. In der Objektebene (x, y) konnten wir Distanzen bis zu einem Abstand von circa 30 nm, etwa 1/16 der Anregungswellenlänge, vermessen; in drei Dimensionen (x, y, z) waren es rund 50 nm.

In anderen Proof-of-Principle-Experimenten zeigten wir [3, 13], dass nahe benachbarte einzelne Moleküle ($d \ll 0,5 \cdot \lambda/(n \sin \alpha)$) auch dann getrennt voneinander lokalisierbar sind, wenn sie sich weder im Absorptions- noch im Emissionsspektrum voneinander unterscheiden. Als spektrale Signaturen zogen wir hier Unterschiede in der Fluoreszenzlebensdauer von angeregten Zuständen im Nanosekundenbereich heran, wobei wir die Fluoreszenzlebensdauern der einzelnen Moleküle durch zeitlich korreliertes Zählen einzelner Photonen bestimmten (Time-Correlated Single-Pho-

ABB. 3 | OPTISCHE AUFLÖSUNG STEIGERN



Computersimulierte (virtuelle) SPDM zur Verbesserung der optischen Auflösung (numerische Apertur $NA = 1,4$; $\lambda \approx 500$ nm). Oben: Bilder von virtuellen, ringförmigen Nanostrukturen. Links: Ausgangsobjekt aus einer zentralen Kreisfläche von etwa 200 nm Durchmesser und ringförmigen Strukturen mit immer kleineren Dicken und Abständen, die aus einer großen Zahl „punktförmiger“ fluoreszierender Objekte (Moleküle) bestehen. Rechts: Bild des Ausgangsobjekts durch Abbildung nach konventionellen Auflösungskriterien (alle Objekte haben dieselbe spektrale Signatur). Mitte: Die Nanostruktur nach Abbildung im SPDM-Modus (alle Objekte mit einer Distanz von mehr als $0,6 \cdot \lambda/\sin \alpha$ haben verschiedene spektrale Signaturen). Unten: Horizontale Intensitätsverteilungen durch die Bildzentren [13].

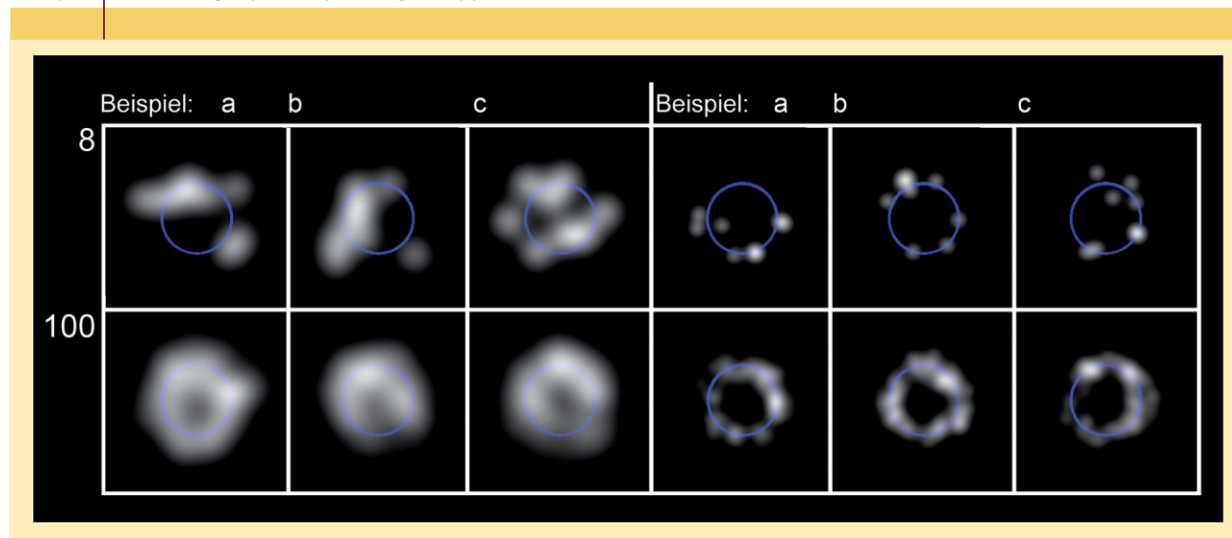
ton-Counting) [4]. In diesem Falle nutzten wir also die zeitliche Variation in der Fluoreszenzemission dazu, die von den nahe benachbarten Molekülen einzeln emittierten Photonen nach ihrer Quelle zu „sortieren“ und so die Moleküle „optisch“ voneinander zu isolieren. Zu ihrer Positionsbestimmung nach dem SPDM-Konzept verwendeten wir die aus den Photonen errechneten Beugungsscheibchen (Abbildung 2).

Nanostrukturen

Sofern diese wesentliche Grundbedingung der „optischen“ Isolation erfüllt ist, kann man mit dem SPDM-Verfahren im Prinzip auch molekular aufgelöste, optische Abbildungen von Nanostrukturen gewinnen [3, 8–14]. Dies bedeutet, dass der Abstand zwischen zwei Molekülen derselben spektralen Signatur mindestens so groß sein muss wie der Durchmesser D des Beugungsscheibchens dividiert durch den Vergrößerungsfaktor M . Er muss also mindestens so groß wie die Halbwertsbreite (FWHM) der das optische System beschreibenden Punktabbildungsfunktion (PSF) sein – oder mindestens so groß wie $d = 0,51 \cdot \lambda/(n \sin \alpha)$.

Allerdings ist die Anzahl der innerhalb eines Beugungsscheibchens befindlichen Moleküle, die wegen Differenzen im Fluoreszenzemissionsspektrum oder in der Fluoreszenzlebensdauer im Nanosekundenbereich gleichzeitig getrennt von einander detektiert werden können, relativ gering (derzeit weniger als zehn). Eine große Anzahl von spektralen Signaturen ist jedoch in vielen Fällen erforderlich, um zum Beispiel Informationen über die Gestalt von Na-

ABB. 4 | ABBILDUNG EINES NANORINGS



Virtuelle SPDM einer ringförmigen Nanostruktur mit einer begrenzten Anzahl unterscheidbarer spektraler Signaturen. Annahme: Der Ring (blau, 100 nm Ø) besteht aus vielen, gleichmäßig angeordneten Objekten (Molekülen). Je 8 bis 100 zufällig ausgewählte Moleküle tragen mit jeweils verschiedenen spektralen Signaturen zum Lokalisationsbild bei, wobei die Lokalisationsgenauigkeit entweder 20 nm (linke Bildhälfte) oder 10 nm (rechte Bildhälfte) beträgt. Für jede dieser Bedingungen sind Lokalisationsbilder von drei verschiedenen Nanostrukturen dargestellt (Bilder: R. Kaufmann/KIP).

nostrukturen zu erhalten. Die Computersimulation in Abbildung 4 (virtuelle SPDM) zeigt am Beispiel einer ringförmigen Nanostruktur von 100 nm Durchmesser, dass in einem einzelnen Ring 15–100 Moleküle optisch isoliert und mit hoher Genauigkeit lokalisiert werden müssen, um das einzelne Objekt als Ring zu identifizieren.

Über die bisher genannten spektralen Signaturen hinaus gibt es jedoch noch weitere Möglichkeiten, auch eng benachbarte Moleküle voneinander lichtoptisch zu unterscheiden. Im Folgenden stelle ich eine neuere Methode vor, die es ermöglicht, bis zu viele tausend spektrale Signaturen für die Lokalisationsmikroskopie nutzbar zu machen. Die Grundidee ist eine noch viel konsequentere Ausnutzung der zeitlichen Dimension als bei der schon vorgestellten Lokalisationsmikroskopie mit unterschiedlichen Lebensdauern einzelner Moleküle im Nanosekundenbereich.

Man könnte beispielsweise die Beugungsscheibchen von eng zusammen liegenden, nur in einer einzigen Spektralfarbe leuchtenden Molekülen auch dann voneinander trennen, wenn diese wie kleine Leuchttürme ihre Leuchtkraft zeitlich verändern würden. Auch dies ist eine spektrale Signatur [3, 4]. Diese Veränderung der von Fluorochromen emittierten Lichtemission kann auf verschiedene Weise geschehen. Zum Beispiel kann man das von zwei nahe beieinander befindlichen Molekülen M_1, M_2 ausgehende Lichtsignal S_1, S_2 (und damit ihre räumliche Position) auch dann getrennt voneinander detektieren, wenn diese Lichtsignale dieselbe spektrale Emission haben, sich jedoch in ihrer Blinkfrequenz unterscheiden (M_1 blinkt beispielsweise ein Mal pro 100 ms, M_2 drei Mal pro 100 ms usw.). Eine Gruppe am King's College in London zeigte am Beispiel fluoreszierender Quantenpunkte, dass im Falle weniger Ob-

jekte die Blinkfrequenzen sogar statistisch verteilt sein können [5].

Die Lichtsignale nahe benachbarter Objekte (Moleküle) können aber auch dann bereits voneinander getrennt registriert werden, wenn in einem ersten Zeitabschnitt Δt_1 M_1 ein einziges Mal aufleuchtet, während M_2 dunkel ist; und in einem darauf folgenden Zeitabschnitt Δt_2 M_2 ein einziges Mal aufleuchtet während M_1 dunkel ist. Bei ausreichender Anzahl der detektierten Photonen (Größenordnung tausend) und guten optoelektronischen Aufnahmebedingungen genügt ein einziger Lichtblitz (Flash) bereits zur nanometergenauen Lokalisation des Moleküls. Welches Signal als erstes und welches als zweites detektiert wird, spielt dabei keine Rolle: Die unabhängig voneinander aufgrund von S_1 für M_1 und von S_2 für M_2 erhaltenen Positionen trägt man in dieselbe „Karte“ ein. Ob diese Reihenfolge festgelegt oder zufällig ist, ist für das Gesamtergebnis unerheblich: Unabhängige Messungen sehr vieler Positionen von $M_{1,2,3}$ usw. ergeben nach Eintragung in die Positionskarte das Bild, ähnlich wie bei den neoimpressionistischen Gemälden des Pointillismus.

Da jedes aufgenommene Einzelbild die Grundbedingung der optischen Isolation erfüllen muss, muss man je nach Fragestellung bis zu mehreren tausend (unter Umständen bis zu 100 000) Einzelbilder aufnehmen und auswerten. Dies setzt geeignete Software für die automatische Bildaufnahme und Analyse voraus.

Weiterentwicklungen des Konzepts

In den letzten Jahren realisierten verschiedene Gruppen erstmals experimentell Ideen, die auf dem SPDM-Grundkonzept beruhen – unter anderem an der Harvard Univer-

sity, der Universität Heidelberg, dem Howard Hughes Medical Institute, der Maine University und dem Max-Planck-Institut für Biophysikalische Chemie in Göttingen. Dabei führen unterschiedliche Markierungs- und Aufnahmemethoden zum selben Ziel [10–13].

Auf der Grundlage unserer langjährigen Erfahrungen in der Entwicklung supraauflösender lichtmikroskopischer Methoden, insbesondere auch der ersten experimentellen Realisierung des SPDM-Konzepts, konnten wir in Heidelberg erstmals zeigen, dass die Lokalisationsmikroskopie durch Induktion einmaliger Lichtblitze auch für viele „gewöhnliche“ Farbstoffmoleküle realisiert werden kann. Dabei nutzten wir aus, dass wir unter bestimmten photo-physikalischen und physikochemischen Bedingungen (Intensität, Ionenkonzentrationen etc.) solche Moleküle typischerweise in einen langlebigen reversiblen Dunkelzustand versetzen können. Aus diesem können sie stochastisch wieder in einen fluoreszierenden Zustand übergehen, in dem sie in wenigen zehn Millisekunden Lichtblitze von vielen tausend Photonen emittieren können. Danach gehen sie in einen – zumindest für die Dauer der Messung – irreversiblen Dunkelzustand über.

Spektroskopische Untersuchungen einer Berliner Arbeitsgruppe an Moleküllösungen von fluoreszierenden Proteinen [7] haben gezeigt, dass diese Vorgänge einer Fluoreszenzlebensdauer des Molekülensembles von vielen Sekunden bis in den Minutenbereich entsprechen. Auf der Ebene der einzelnen Moleküle ist dies mit der Lebensdauer der individuellen metastabilen Dunkelzustände korreliert. In diesem Fall kann man die spektrale Signatur eines bestimmten Moleküls als die Zeit vom Beginn der Laseranregung bis zum Beginn der Emission eines Lichtblitzes definieren – oder alternativ als die Zeit vom Beginn der Anregung bis zum Ende der Fluoreszenzemission, also dem Übergang in den „irreversiblen“ Dunkelzustand.

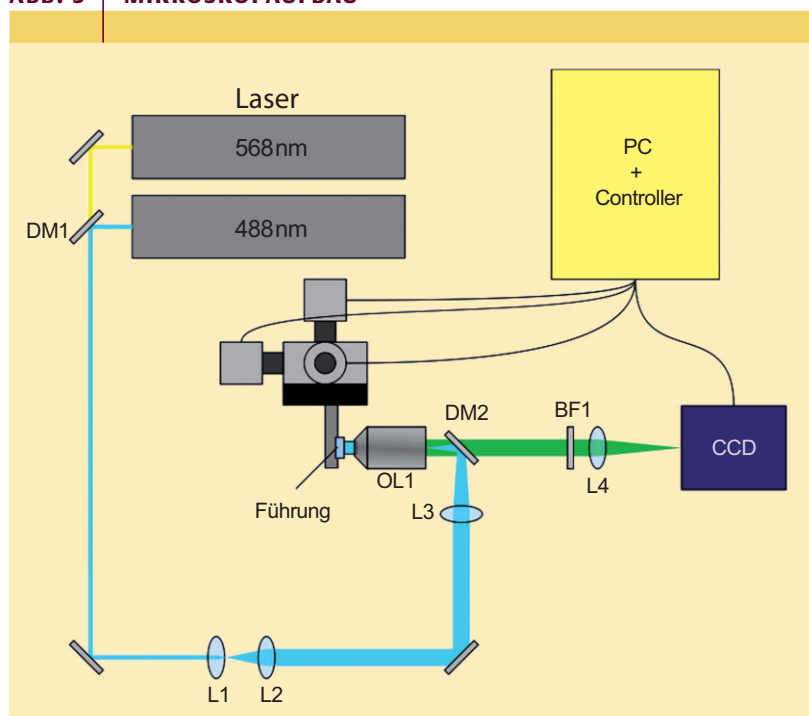
Die so definierten individuellen Lebensdauern haben eine große Spannbreite von wenigen Millisekunden bis in den Minutenbereich. Theoretisch lassen sie sich analog zum radioaktiven Zerfall betrachten:

$$N = N_0 e^{-t/\tau},$$

wobei N die Anzahl der zur Zeit t nach Beginn der Laseranregung verbliebenen metastabilen Dunkelzustände in einem großen Ensemble bedeuten. Dabei zeigt sich, dass Zeitkonstanten τ im Bereich von vielen Sekunden bis Minuten es ermöglichen sollten, die Grundvoraussetzung der optischen Isolation bis zu einer Dichte von mehreren tausend Objekten (Molekülen) pro μm^2 zu jedem Aufnahmezeitpunkt eines Einzelbilds zu erfüllen.

Außerdem fanden wir, dass für das so vorgenommene Photoschalten eines bestimmten Molekültyps eine einzige Laserwellenlänge geeigneter Intensität ausreichend ist. Diese SPDM mit physikalisch modifizierten Fluorochromen (SPDM_{PHYMOD}) [8–12] ermöglicht es, auch mit relativ einfachen optischen Konfigurationen (Abbildung 5) und präpa-

ABB. 5 MIKROSKOPAUFBAU



Aufbau eines Lokalisationsmikroskops nach dem SPDM-Konzept für die Nanoskopie von zwei verschiedenen Molekültypen, hier für Laseranregung bei 488 nm für Molekültyp A und 568 nm für Molekültyp B [8]. Die Laserstrahlen werden über dichroitische Spiegel (DM1/2) und Linsen (L1–L3) durch ein Objektiv OL1 hoher numerischer Apertur ($NA \approx 1,4$) in die Objektebene bei geeigneter Intensität kollimiert. Das beleuchtete Gesichtsfeld ist typischerweise $(30 \mu\text{m})^2$ groß. Die Fluoreszenzemission des Objekts wird durch einen Sperrfilter (BF1) über eine Linse (L4) auf den Chip einer empfindlichen CCD-Kamera (Quantenausbeute 60–90 %) abgebildet und für die weitere Auswertung gespeichert. Pro Sekunde werden 15 bis 50 Bilder registriert.

rativen Vorbereitungen eine hohe lokalisationsmikroskopische Auflösung mit sichtbarem Licht zu realisieren. Derzeit erreichen wir in Heidelberg mit SPDM in zwei Dimensionen eine Auflösung zellulärer Nanostrukturen von etwa 10–20 nm, bei erfassten Moleküldichten bis zu 300 000 pro Zellfläche oder etwa 50 aufgelösten Molekülen pro Beugungsscheibchenfläche [12]. Die Bestauflösung von Bistrukturen entspricht etwa 1/100 der eingesetzten Laserwellenlänge λ , also dem Durchmesser eines einzelnen Proteins oder 1/2000 Durchmesser eines Zellkerns.

Nanolandschaften in Zellen

Die Abbildung auf S. 21 demonstriert das Potenzial der SPDM eindrucksvoll. Während die konventionelle Fluoreszenzmikroskopie mit einer optischen Auflösung um die 200 nm eine eher gleichmäßige Färbung des Zellkerns ergibt, konnten wir mit SPDM_{PHYMOD} im gezeigten optischen Schnitt ebene rund 120 000 einzelne Proteine lokalisieren. Die so gewonnene Information über die Molekülverteilung können wir nun mit Mitteln der Polymerphysik quantitativ analysieren und mit numerischen Modellvorstellungen vergleichen [14].

**Abb. 6 Dichte-
verteilung von
fluoreszenzmar-
kiertem Chroma-
tin (DNS und
Histonproteine) in
einem menschi-
chen Zellkern mit
einem Durchmes-
ser von etwa
25 μm . Zum
Vergleich zeigen
die beiden kleinen
roten Markierun-
gen (Pfeile) die
Größe von mole-
kularen Maschi-
nen des Zellkerns
oder von Tumovri-
ren an [14].**

Abbildung 6 zeigt die Dichteverteilung des sogenannten Chromatins in einem anderen menschlichen Zellkern [14]. Chromatin ist das Baumaterial der Chromosomen und besteht aus einem Gerüst aus Histonproteinen, um das sich die DNS schraubenartig windet. Statt der weitgehend homogen erscheinenden Verteilung des Chromatins in der konventionellen Mikroskopie (Abbildung auf S. 21 links) zeigt sich hier eine hochstrukturierte „Nationalpark“-Landschaft. Die ausgeprägten Höhen entsprechen einer hohen Dichte an Histonen und damit DNS, die Tiefen einer niedrigen Dichte. In den darin eingebetteten blauen Zonen befindet sich sehr wenig Chromatin, zellbiologisch zeigen sie den Ort der Nucleoli (Kernkörperchen eukaryotischer Zellen).

Es gibt viele Hinweise darauf, dass diese Nanolandschaft der Genomstruktur größte Bedeutung für die Regulation der rund zweimal 25 000 Gene im menschlichen Zellkern hat. Diese Regulation ermöglicht erst die Entwicklung des menschlichen Organismus mit seiner Vielzahl von Geweben und Reaktionsfähigkeiten. Das Gleiche gilt für Tiere und Pflanzen. Die Kenntnis der Chromatinverteilung auf der Nanoskala lässt auch Voraussagen über die Folge von Umwelteinflüssen durch ionisierende Strahlung oder andere Umweltschäden zu. Auch die Verteilung von Tumoviren kann man erstmals mit lichtmikroskopischen Verfahren im Detail analysieren.

Nanoskopische Bilder lebender Zellen

Gegenwärtig können wir derartige Bilder mit fast molekularer Auflösung von ganzen Zellen in etwa einer Minute gewinnen (Abbildung 7), was auch erste SPDM-Aufnahmen

von lebenden Zellen erlaubt hat. Kameras mit höherer Aufnahme Frequenz sollten eine Reduktion der für mehrere tausend Einzelbilder benötigten Gesamtaufnahmezeiten auf wenige Sekunden ermöglichen. Durch Kombination von SPDM mit einem weiteren von uns entwickelten Nanoskopieverfahren, der räumlich strukturierten Beleuchtungsmikroskopie (Spatially Modulated Illumination, SMI) [8], gelang es uns kürzlich, zelluläre Nanostrukturen von etwa 40–50 nm dreidimensional aufzulösen [11].

Das Anwendungsspektrum der SPDM_{PHYMOD}-Verfahren reicht derzeit von der Lokalisationsmikroskopie von menschlichen und tierischen Zellen (Zellkern, Zytoplasma, Zellmembran, Zell-Zell-Interaktionen) und Pflanzenzellen bis zur supraaufgelösten Abbildung einzelner Bakterien und Viren – also Objekten, deren Struktur bis vor

kurzem nur mit der Elektronenmikroskopie zugänglich war. Der alte Traum von einer korrelativen Verbindung der Vorteile von Licht- und Elektronenmikroskopie ist damit in greifbare Nähe gerückt. Zum Beispiel sind die Kontrastmechanismen bei Elektronen- und Lichtmikroskopie sehr unterschiedlich: Selbst bei gleicher optischer Auflösung „sehen“ sie verschiedene Eigenschaften des Objekts. Beide Methoden zusammen geben daher ein wesentlich detaillierteres Gesamtbild. Insbesondere aber erlauben lichtoptische Methoden die schädigungsarme Analyse ganzer intakter, sogar lebender Zellen. Ähnliches gilt für die Kombination mit der Röntgenmikroskopie. Beim derzeitigen Stand der supraauflösenden Lichtmikroskopie können „lebensechte“ Situationen mit einer Auflösung bis hinunter in den Bereich von 10 nm (etwa 1/50 der verwendeten Wellenlänge) abgebildet werden. Die Elektronenmikroskopie derselben, allerdings dann toten Zelle kann noch sehr viel feinere Struktureinzelheiten auflösen, zum Beispiel sogar von einzelnen biomolekularen Maschinen.

Die lokalisationsmikroskopischen Methoden haben die lichtoptische Auflösung schon jetzt um ein Vielfaches verbessert im Vergleich zu allen konventionellen Lichtmikroskopieverfahren. Mit ihnen ist eine effiziente fernfeldlichtmikroskopische Abbildung der räumlichen Verteilung einzelner, nahe benachbarter Moleküle desselben Typs möglich geworden. Bereits in wenigen Jahren sollte damit routinemäßig eine dreidimensionale Auflösung im Bereich von 10 nm erreichbar sein.

Theoretische Überlegungen lassen sogar erwarten, dass eine noch viel bessere optische Auflösung möglich ist. Die physikalisch bedingte Grenze der lichtoptischen Auflösung sollte bei der Lokalisationsmikroskopie im Bereich von wenigen Atomdurchmessern liegen, also bei etwa 1/1000 der eingesetzten Wellenlänge. Neueste Ergebnisse der Stanford-Gruppe von Stephan Chu belegen dies experimentell [15]. Dies würde über die Biophysik und Biomedizin hinaus weitere interessante Anwendungen in den Material- und Geowissenschaften eröffnen.

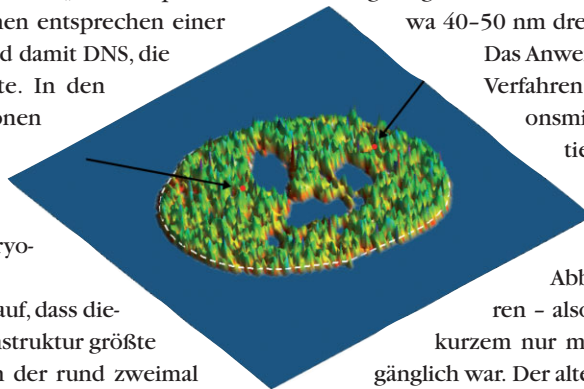
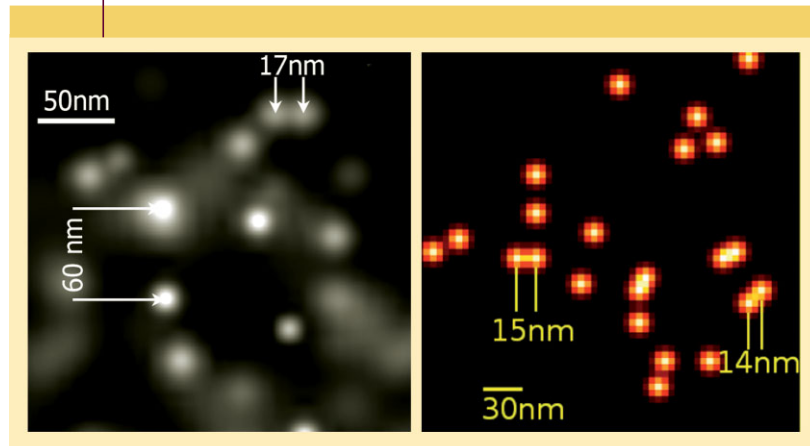


ABB. 7 | PROTEINE IM ZELLKERN



Links: Lokalisationsmikroskopie (SPDM_{PHYMOD}) von einzelnen Histonmolekülen in einem menschlichen Zellkern (Detail). Rechts: SPDM_{PHYMOD} von einzelnen Proteinmolekülen in einer menschlichen Zellmembran (Detail). Die für die Anregung verwendete Wellenlänge ist 488 nm, die Fluoreszenzmarker sind Standard. Einzelne Moleküle mit demselben Absorptions- und Emissionsspektrum sind selbst bei wenigen 10 nm Abstand klar voneinander getrennt [8, 9].

Zusammenfassung

Ein Jahrhundert lang galt die von Ernst Abbe und Lord Rayleigh postulierte Grenze der lichtmikroskopischen Auflösung bei etwa 200 nm als unüberwindlich. Neue physikalische und optoelektronische Verfahren haben sie durchbrochen. Das ihnen zugrunde liegende Prinzip der Lokalisationsmikroskopie nutzt aus, dass näher zusammen liegende Lichtpunkte, etwa zur Fluoreszenz angeregte Moleküle, durch ihre unterschiedlichen spektralen Signaturen räumlich trennbar sind. Solche Signaturen können zum Beispiel verschiedene Fluoreszenzfarben sein oder zeitlich differierende und damit trennbare Fluoreszenzübergänge. Inzwischen sind mehrere Varianten experimentell realisiert. Diese Verfahren können mit sichtbarem Licht Nanostrukturen bis ins molekulare Detail abbilden. Dies gelingt zunehmend auch an lebenden Zellen.

Stichworte

Lichtmikroskopie, Auflösungsgrenze, Superauflösung, Abbe-Limit, Rayleigh-Limit, spektrale Lokalisationsmikroskopie, spektrale Präzisionsdistanzmikroskopie (SPDM), räumlich strukturierte Beleuchtung (SMB), Fluoreszenz, Nanostruktur, Zellkern, DNS, Histon, Chromatin.

Danksagung

Bei der Entwicklung der hier vorgestellten laseroptischen Entwicklungen am Kirchhoff-Institut für Physik haben zahlreiche Diplomanden, Doktoranden, wissenschaftliche Mitarbeiter sowie weitere Kooperationspartner mitgewirkt, denen hier sehr herzlich gedankt sei. Diese Forschung wurde unterstützt vom Land Baden-Württemberg, der DFG, dem BMBF und der EU.

Literatur

- [1] E. Abbe, *Archiv f. mikroskopische Anatomie* **1873**, 9, 411.
- [2] L. Rayleigh, *Philos. Mag.* **1896**, 42, 167.
- [3] C. Cremer, et al., in: *Handbook of Computer Vision and Applications* (Hrsg. B. Jähne, H. Haußecker, P. Geißler), Vol. 3, Academic Press San Diego, New York 1999, 839.

- [4] M. Heilemann et al., *Anal. Chem.* **2002**, 74, 3511.
- [5] K. A. Lidke et al., *Opt. Express* **2005**, 13, 7052.
- [6] E. Betzig et al., *Science* **2006**, 313, 1642.
- [7] D. Sinnecker et al., *Biochemistry* **2005**, 44 (18), 7085.
- [8] J. Reymann et al., *Chromosome Res.* **2008**, 16, 367.
- [9] P. Lemmer et al., *J. Microsc.* **2009**, 235, 163.
- [10] R. Kaufmann et al., *Proc. SPIE* **2009**, 7185, 71850J-1.
- [11] P. Lemmer et al., *Appl. Phys. B* **2008**, 93, 1.
- [12] M. Gunkel et al., *Biotech. J.* **2009**, 4, 927.
- [13] C. Cremer et al., in: *Nanoscopy and Multidimensional Optical Fluorescence Microscopy* (Hrsg. A. Diaspro), Kap. 3, Taylor & Francis, London 2010.
- [14] M. Bohn et al., *Biophys. J.* **2010**, 99, 1358.
- [15] A. Pertsinidis, *Nature* **2010**, 466, 647.

Der Autor



Christoph Cremer studierte an der LMU München Physik und promovierte in Biophysik an der Universität Freiburg. Mehrere Jahre an der University of California, Habilitation an der Medizinischen Fakultät der Universität Freiburg. Seit 1983 Professor (2004 Ordinarius) für Angewandte Optik und Informationsverarbeitung an der Universität Heidelberg. Wissenschaftliches Mitglied verschiedener Institutionen in Deutschland und USA. In den 1970er Jahren Entwicklung von Lasermikrobestrahlungsmethoden sowie von Konzepten der konfokalen Laserscanning-Fluoreszenzmikroskopie und der 4Pi-Mikroskopie; seit 1996 Entwicklung der spektralen Lokalisationsmikroskopie (SPDM) sowie der räumlich strukturierten Beleuchtung.

Anschrift

Prof. Dr. Christoph Cremer, Kirchhoff-Institut für Physik, Universität Heidelberg, Im Neuenheimer Feld 227, D-69120 Heidelberg. Cremer@kip.uni-heidelberg.de www.kip.uni-heidelberg.de/AG_Cremer