

STED-Nanoskopie

Fluoreszenzmikroskopie ohne Beugungsgrenze

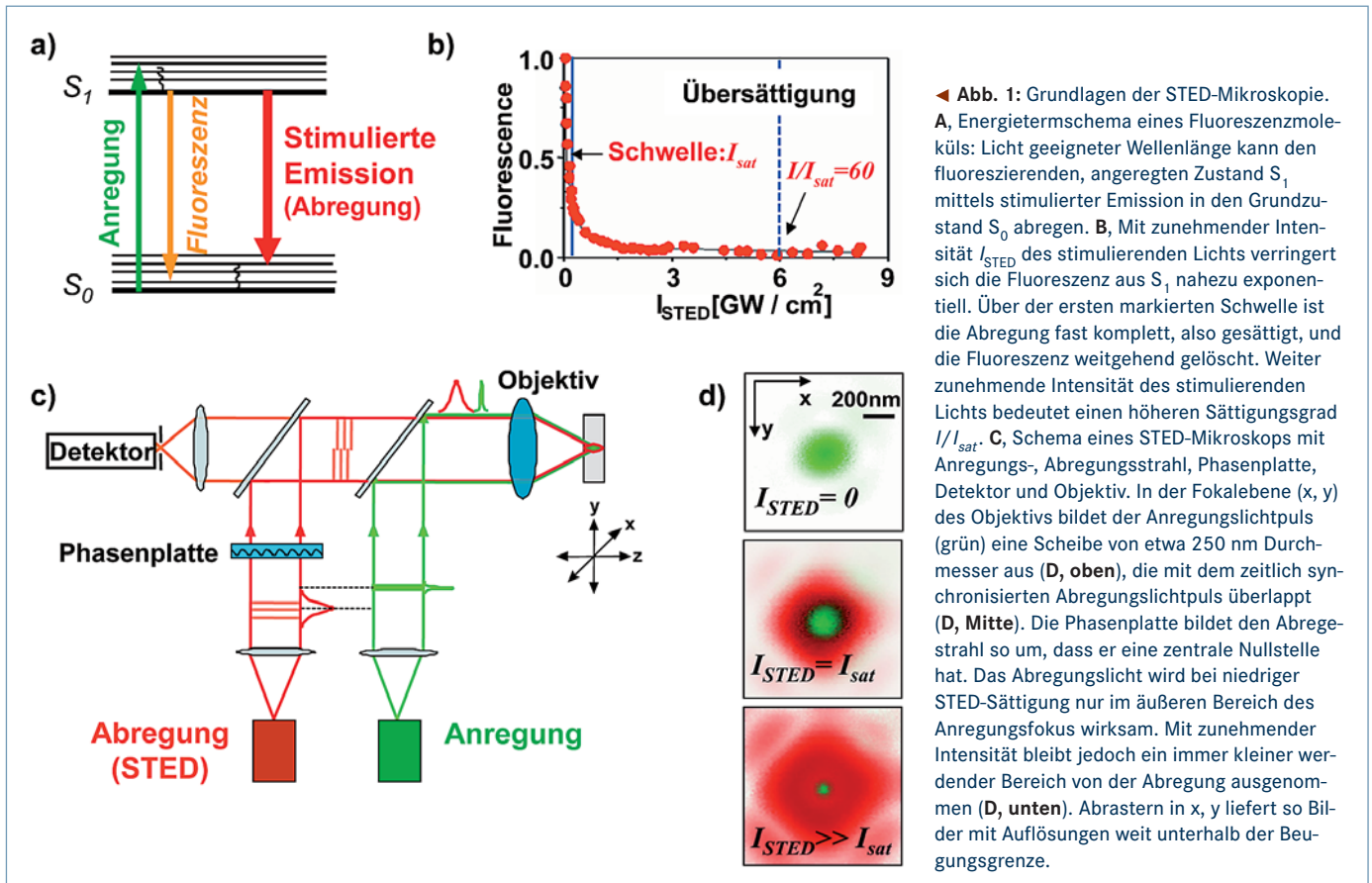
STEFAN W. HELL, KATRIN I. WILLIG, VOLKER WESTPHAL
 MAX-PLANCK-INSTITUT FÜR BIOPHYSIKALISCHE CHEMIE, GÖTTINGEN

Mikroskopie mit fokussiertem Licht unterliegt der Beugungsgrenze, was bisher bedeutete, dass Strukturen feiner als etwa die halbe Lichtwellenlänge nicht aufgelöst werden. Mit neuen physikalischen Ansätzen gelingt es aber, die Beugungsgrenze in der Fluoreszenzmikroskopie aufzuheben.

■ Die erste erfolgreiche Technik ist die Stimulated Emission Depletion (STED-) Mikroskopie, die Auflösungen von 50 nm mit biologischen Proben liefert und in physikalischen Experimenten sogar unter 20 nm erreicht. STED ist eine Variante des grundlegenden

Konzepts, das sättigbare, reversibel optische Übergänge zwischen zwei Zuständen eines Fluorophors nutzt. Dieses Konzept, RESOLFT genannt, kann mit sichtbarem Licht und normalen Objektiven prinzipiell molekulare Auflösungen erzielen.

Seit dem 17. Jahrhundert war das Lichtmikroskop wie kaum ein anderes Instrument ein Schlüssel zur wissenschaftlichen Erkenntnis. Das gilt insbesondere für die Biologie, die zur 3D-Beobachtung von intakten Zellen auf nicht-invasive optische Verfahren angewiesen ist. Doch die Verwendung fokussierten Lichts unterliegt der Beugungsgrenze, die von Ernst Abbe entdeckt wurde^[1]. Sie besagt, dass sich in der Bildebene nur Objekte unterscheiden lassen, die mindestens um $\Delta d = \lambda / (2n \sin \alpha)$ getrennt sind, weil der am Fokuspunkt entstehende Lichtfleck (Spot) nicht kleiner als Δd sein kann. Dabei ist λ die Wellenlänge des Lichts, n der Brechungsindex der Probe und α der halbe Öffnungswinkel des Lichtkegels. Da λ auf 400–700 nm und α auf



◀ **Abb. 1:** Grundlagen der STED-Mikroskopie. **A**, Energiediagramm eines Fluoreszenzmoleküls: Licht geeigneter Wellenlänge kann den 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 nahezu exponentiell. Über der ersten markierten Schwelle ist die Abregung fast komplett, also gesättigt, und die Fluoreszenz weitgehend gelöscht. Weiter zunehmende Intensität des stimulierenden Lichts bedeutet einen höheren Sättigungsgrad I/I_{sat} . **C**, Schema eines STED-Mikroskops mit Anregungs-, Abregungsstrahl, Phasenplatte, Detektor und Objektiv. In der Fokalebene (x, y) des Objektivs bildet der Anregungslichtpuls (grün) eine Scheibe von etwa 250 nm Durchmesser aus (**D, oben**), die mit dem zeitlich synchronisierten Abregungslichtpuls überlappt (**D, Mitte**). Die Phasenplatte bildet den Abregungsstrahl so um, dass er eine zentrale Nullstelle hat. Das Abregungslicht wird bei niedriger STED-Sättigung nur im äußeren Bereich des Anregungsfokus wirksam. Mit zunehmender Intensität bleibt jedoch ein immer kleiner werdender Bereich von der Abregung ausgenommen (**D, unten**). Abrastern in x, y liefert so Bilder mit Auflösungen weit unterhalb der Beugungsgrenze.

< 70° begrenzt sind, erschien es unmöglich, gleichartige Objekte unterhalb von 200 nm zu trennen. Abbes Formel galt über 100 Jahre lang als unüberwindbar. Eine markante Auflösungserhöhung können also nur physikalische Konzepte leisten, die sich radikal von bisherigen absetzen.

Auflösung jenseits der Beugungsgrenze

Gewöhnlich wird ein Fluorophor so angeregt, dass er bei der Rückkehr in den Grundzustand Fluoreszenzlicht emittiert. Weil das anregende Licht der Beugung unterliegt, kann der räumliche Fleck fluoreszierender Moleküle nicht feiner als $\Delta d = 200$ nm werden. Es sei denn, man sendet den Fluoreszenzmarker vorübergehend in einen nichtfluoreszierenden Zustand, und zwar so, dass Fluoreszenz nur noch in einem engeren Bereich des Spots zugelassen wird^[2, 3].

Zur Überführung in einen nichtfluoreszierenden Zustand eignen sich optisch sättigbare Übergänge, die am Fluoreszenzprozess beteiligt sind. Sie müssen reversibel sein, damit der Marker nicht unwiderbringlich verändert wird und das entstehende Bild verfälscht. Bei diesem RESOLFT (*Reversible Saturable Optical Fluorescent Transitions*) genannten Konzept sind der Auflösung keine prinzipiellen Grenzen gesetzt. Sie hängt nur von dem erreichbaren Sättigungsgrad ab^[4, 5] und lässt molekulare Auflösung zu. Der erste Repräsentant des RESOLFT-Konzepts ist die STED-Mikroskopie.

STED-Mikroskopie

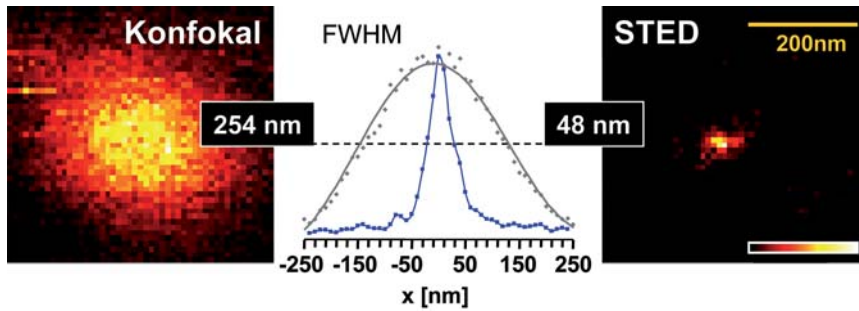
Licht kann ein Molekül nicht nur schlagartig anregen, sondern auch ein angeregtes mit gleicher Effizienz wieder abregen. Bei stimulierter Emission (**Abb. 1A**) wird die abgestrahlte Energie als ein weiteres Photon des stimulierenden Lichtstrahls mitgeführt, was keine weitere Rolle spielt. Abgeregte Moleküle können

sofort wieder angeregt werden, es handelt sich also nicht um „Bleichen“.

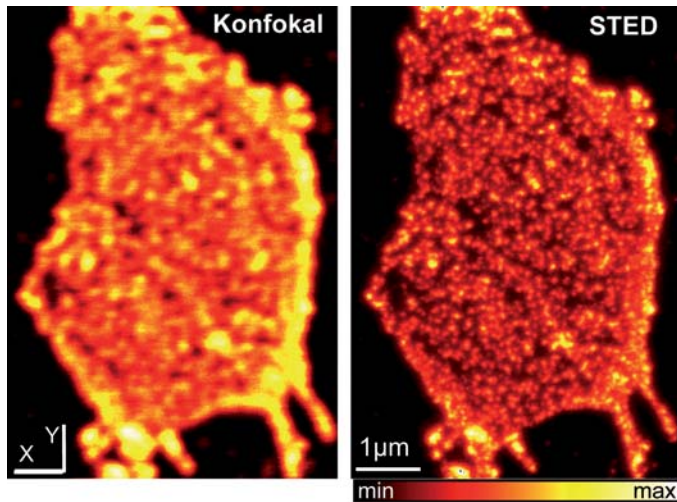
Entscheidend für die Überwindung der Auflösungsgrenze ist die Übersättigung der stimulierten Emission. Sie ist möglich, weil es zum fast gänzlichen Abregen eines Moleküls nur einer endlichen Intensität bedarf. Übersättigen bedeutet also, dass eine höhere Intensität verwendet wird, als zu einer weitgehenden Abregung des Markers gebraucht wird. Es zeigt sich, dass die Population des angeregten Zustands und somit die Fluoreszenz etwa exponentiell mit der Intensität des stimulierenden Lichtstrahls abnimmt. Wenn eine bestimmte Schwellenintensität überschritten ist, so ist der Restterm vernachlässigbar und das Abregen quasi komplett (**Abb. 1B**). Dies ist in der gezeigten Messung bei Intensitätswerten über 0,1 GW/cm² der Fall.

An- und Abregung lassen sich am besten mit Lichtpulsen von 1 ps oder 300 ps bewerkstelligen. So wird im STED-Mikroskop^[2, 6] das gepulste Anregungs- und Abregungslicht gleichzeitig in das Objektiv eingekoppelt (**Abb. 1C**). Während das Anregungslicht erwartungsgemäß einen Spot von über 200 nm erzeugt, wird das Abregungslicht so modifiziert, dass es in der Mitte über eine Nullstelle verfügt und den Spot ringförmig überlagert (**Abb. 1D**). So wird Fluoreszenz (grün) im Randbereich des Spots verhindert, während sie in der Nullstelle erhalten bleibt. Der fluoreszierende Bereich wird bei intensiverem Licht weiter eingeschnürt (**Abb. 1D**). Rastert man den verkleinerten Spot durch die Probe, dann liefert das punktweise registrierte Fluoreszenzlicht ein deutlich schärferes Bild. Die Größe des Spots und damit die Auflösung folgt einem neuen Gesetz:

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



▲ **Abb. 2:** Gemessene Fluoreszenzspots mit beugungsbedingter Standardgröße (links) und im STED-Verfahren (rechts). Die Verringerung des Spots von 254 nm auf 48 nm Durchmesser bedeutet einen Faktor 25 in der Fläche. Das Messprofil in der Mitte belegt die Verschärfung des effektiven Fokus.



▲ **Abb. 3:** Bilder mit Schärfe jenseits der Beugungsgrenze. Verteilung des Proteins SNAP 25 in der Membran einer Säugerzelle mit normaler Auflösung (links) und mit Überauflösung durch STED (rechts). Die durch STED erzielte Auflösung von 65 nm ermöglicht eine viel aussagekräftigere Erfassung der lokalen Verteilung von Syntaxin-Clustern. (Proben von J. Sieber, T. Lang aus der Abteilung Jahn des MPI für Biophys. Chemie).

Dabei ist I_{sat} die Sättigungsintensität, also die Schwelle, bei der die Fluoreszenz eines Moleküls mit einer gewissen Wahrscheinlichkeit (~63 %) verhindert wird^[5, 7]. I_{sat} ist charakteristisch für den verwendeten Farbstoff. Erhöht man den Wert I/I_{sat} , so verbessert sich auch die Auflösung: $\Delta d \rightarrow 0$.

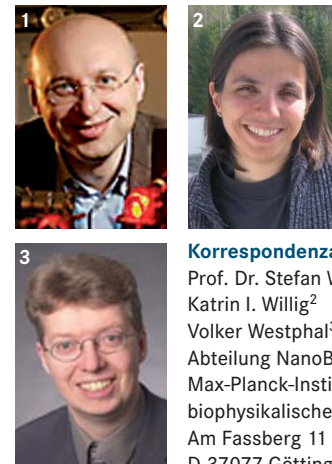
Abbildung 2 vergleicht den herkömmlichen Fluoreszenz-Spot mit einem durch STED verschärften. Bei der hier verwendeten Intensität I wurde der Durchmesser Δd des Spots von 254 nm auf 48 nm verkleinert. Der Vergleich zeigt eindrucksvoll, wie die Beugungsgrenze mit Hilfe der stimulierten Emission überwunden wird.

Dabei bewahrt das STED-Mikroskop die Vorteile des konfokalen Fluoreszenzmikroskops. Es ist grundsätzlich 3D-fähig und funktioniert unter normalen Umgebungsbedingungen. Auch lassen sich abregende Lichtfelder generieren, welche den Spot in axialer Richtung einengen und feinere optische Schnitte als die Konfokalmikroskopie erlauben.

Abbildung 3 zeigt die räumliche Verteilung eines fluoreszenzmarkierten Proteins (SNAP 25) auf der Zellmembran, das bei der Fusion von Vesikeln eine Rolle spielt^[8]. Die STED-Aufnahme weist eine wesentlich größere Detailfülle auf als das herkömmlich aufgelöste Referenzbild. So ist es auch möglich, Proteine von einzelnen Vesikeln darzustellen^[9]. Die gegenwärtige Auflösung ist im Wesentlichen durch technische Parameter begrenzt, wie die Bleichresistenz der Farbstoffe und die Tiefe der Nullstelle. Da prinzipiell nichts gegen eine weitere Optimierung der Abbildungsparameter spricht, kann in Zukunft mit noch schärferen Bildern gerechnet werden. In der Tat ist es uns kürzlich gelungen, die Spotgröße sogar auf 16 nm ($\lambda/50$) zu reduzieren^[7]. Die Fähigkeit, Auflösungen dieser Größenordnung zu erzielen, wurden bisher nur der Elektronen- und Rastersondenmikroskopie zugeschrieben. Heute steht fest, dass es in der Fluoreszenzmikroskopie keine feste Auflösungsgrenze mehr gibt. ■

Literatur

[1] Abbe, E. (1873): Beiträge zur Theorie des Mikroskops und der mikroskopischen Wahrnehmung. *Arch. Mikr. Anat.* 9: 413–420.
 [2] Hell, S. W., & Wichmann, J. (1994): Breaking the diffraction resolution limit by stimulated emission: stimulated emission depletion microscopy. *Opt. Lett.* 19: 780–782.
 [3] Hell, S. W. (1997): in *Topics in Fluorescence Spectroscopy*. Plenum Press, New York (ed. Lakowicz, J. R.) 5: 361–422.
 [4] Hell, S. W., Dyba, M., & Jakobs, S. (2004): Concepts for nanoscale resolution in fluorescence microscopy. *Curr. Opin. Neurobiol.* 14: 599–609.
 [5] Hell, S. W. (2003): Toward fluorescence nanoscopy. *Nature Biotechnol.* 21: 1347–1355.
 [6] Klar, T. A., Jakobs, S., Dyba, M., Egner, A., & Hell, S. W. (2000): Fluorescence microscopy with diffraction resolution limit broken by stimulated emission. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97: 8206–8210.
 [7] Westphal, V., & Hell, S. W. (2005): Nanoscale Resolution in the Focal Plane of an Optical Microscope. *Phys. Rev. Lett.* 94: 143903.
 [8] Sieber, J. J., Willig, K. I., Heintzmann, R., Hell, S. W., & Lang, T. (2006): The SNARE-motif is essential for the formation of syntaxin clusters in the plasma membrane. *Biophys. J.* 90: 2843–2851.
 [9] Willig, K. I., Rizzoli, S. O., Westphal, V., Jahn, R., & Hell, S. W. (2006): STED-microscopy reveals that synaptotagmin remains clustered after synaptic vesicle exocytosis. *Nature* 440: 935–939.



Korrespondenzadresse:
 Prof. Dr. Stefan W. Hell¹
 Katrin I. Willig²
 Volker Westphal³
 Abteilung NanoBiophotonik
 Max-Planck-Institut für
 biophysikalische Chemie
 Am Fassberg 11
 D-37077 Göttingen
 Tel.: 0551-2012500
 Fax.: 0551-2012506
 shell@gwdg.de
 www.4pi.de