

## Optische Mikroskopie jenseits der Beugungsgrenze: STED und verwandte Methoden

Der Nobelpreis für Chemie 2014 an drei Physiker würdigt das Überwinden der beugungsbedingten Auflösungsgrenze in der Fluoreszenzmikroskopie. Diese Grenze wurde im 19. Jahrhundert u. a. von Ernst Abbe beschrieben und galt lange Zeit für alle Lichtmikroskope, die herkömmliche Linsensysteme verwenden: Demnach lässt sich Licht nicht schärfer als bis auf die halbe Lichtwellenlänge – also minimal rund 200 Nanometer (nm; Millionstel Millimeter) – fokussieren. Alle Details, die enger beieinander liegen, erscheinen verschwommen.

Das STED-Verfahren (engl. **ST**imulated **E**mission **D**epletion) [1] überwand als erstes radikal diese Grenze. Obwohl es fokussiertes Licht verwendet, liefert es Auflösungen auf der Nanoskala [2 – 4], und somit bedeutsame Erkenntnisse in der Biomedizin [5].

Was ist nun fundamental anders? In herkömmlichen Mikroskopen erfolgt die Tren-

Der Schlüssel zur optischen Trennung liegt nun darin, einen Teil dieser Moleküle zeitweise in einen „dunklen“, nicht signalgebenden, Molekülzustand zu überführen. Misst man während dieses Zeitraums das Fluoreszenz-Signal, so lassen sich die hellen Moleküle von den dunklen unterscheiden. Im STED-Mikroskop erfolgt dieses Ausschalten der Moleküle ebenfalls durch Licht, und zwar mittels stimulierter Emission. Dabei wird ein angeregtes Molekül sofort in den dunklen Grundzustand überführt, damit es nicht fluoreszieren kann. Dazu verwendet man im Vergleich zur Anregung röteres Licht (Abb. 1 unten). Dieses ist räumlich mit einer Intensitätsnullstelle ausgebildet. Zudem ist die Intensität des Lichts so gewählt, dass Moleküle den fluoreszenten Zustand nur in einem engen Bereich um die Nullstelle annehmen können. Dieser Bereich ist deutlich kleiner als die Beugungsgrenze ( $d \ll 200$  nm). Die anderen Moleküle befinden sich gezwungenermaßen im Grundzustand. Das macht die Moleküle unterscheidbar. Im Rasterverfahren werden nun Bilder der Probe erzeugt, die eine Auflösung von  $d$  besitzen



**„Mit der Auflösung jenseits der lichtmikroskopischen Beugungsgrenze ergeben sich viele neue Anwendungsgebiete. Oft bieten scheinbar verstandene Gebiete der Physik noch Raum für grundlegende Entdeckungen.“**

Edward G. Krubasik, Präsident der Deutschen Physikalischen Gesellschaft

STORM [7] machen sich das gleiche An-/Aus-Prinzip zur Trennung zunutze, schalten aber jeweils nur ein einzelnes Molekül innerhalb des Beugungsbereichs an.

Abb. 1

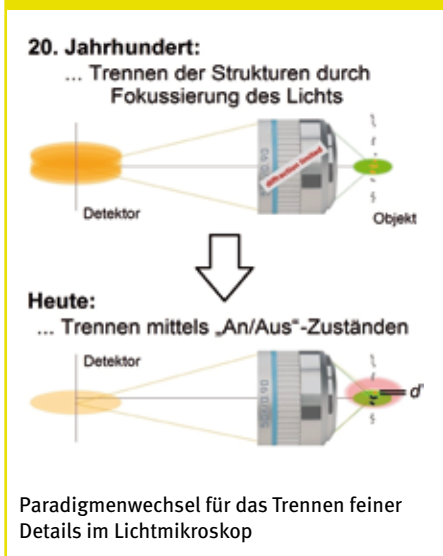
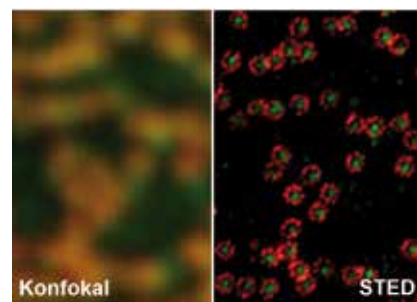
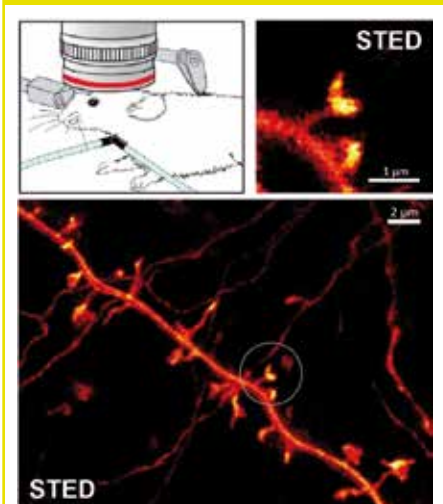


Abb. 2



Poren in der Hülle eines Zellkerns im Vergleich beugungsbegrenzter (konfokal) vs. STED-Mikroskopie.

Abb. 3



Dendrit mit Dornenfortsätzen im Gehirn einer lebenden Maus.

nung benachbarter Strukturen durch das Bündeln von Licht (Abb. 1 oben). Je schärfer es fokussiert ist, desto feinere Strukturen lassen sich erkennen. Dem setzt die Beugung Grenzen. Alle fluoreszenzfähigen Moleküle, die innerhalb des Beugungsbereichs (grün) liegen, werden beleuchtet und de facto gleichzeitig zur Fluoreszenz angeregt. Ihre Signale überlagern sich am Detektor in der Bildebene. Die Moleküle innerhalb des Beugungsbereichs von minimal 200 nm lassen sich daher nicht ohne weiteres unterscheiden.

(Abb. 2 und 3). Auflösungen bis hinunter zu 20 nm sind mittlerweile Routine; die prinzipielle Grenze ist allein durch die Größe der Moleküle gegeben.

Man kann auch mehrere Nullstellen gleichzeitig einsetzen, solange diese weiter entfernt sind als die Beugungsgrenze. Ferner lassen sich andere Dunkelzustände als der Grundzustand einsetzen, was das Verfahren genereller macht [2,3] (RESOLFT-Verfahren). Komplementäre Ansätze wie PALM [6] oder

### Literatur:

- [1] Hell, S.W. & Wichmann J. Opt. Lett. 19, 780 (1994)
  - [2] Hell, S.W. & Krug, M. Appl. Phys. B 60, 495 (1995)
  - [3] Hell, S.W. Nat. Biotechnol. 21, 1347 (2003)
  - [4] Hell, S. W. Physik Journal 6, Nr.12 (2007)
  - [5] Berning, S. et al. Science 335, 551 (2012)
  - [6] Betzig, E. et al. Science 313, 1642 (2006)
  - [7] Rust, M. et al. Nat. Methods 3, 793 (2006).
- Weitere Informationen auf [www.nanoscopy.de](http://www.nanoscopy.de) (Abb. 2 mit freundlicher Genehmigung von Abberior Instruments GmbH; Abb. 3 aus [5]).

# Deutsche **Physikalische** Gesellschaft

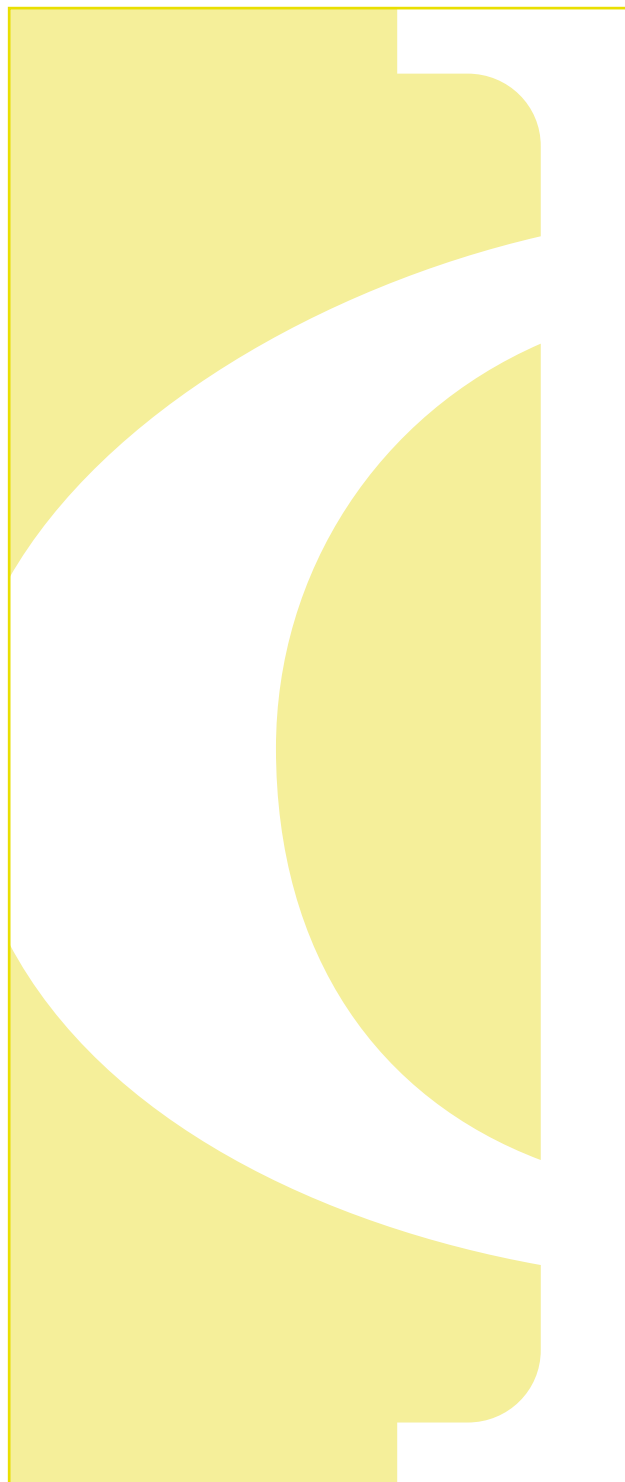
**Die Deutsche Physikalische Gesellschaft e. V. (DPG)**, deren Tradition bis in das Jahr 1845 zurückreicht, ist die älteste nationale und mit mehr als 62.000 Mitgliedern auch die größte physikalische Fachgesellschaft weltweit. Sie versteht sich als Forum und Sprachrohr der Physik und verfolgt als gemeinnütziger Verein keine wirtschaftlichen Interessen. Die DPG unterstützt den Gedankenaustausch innerhalb der wissenschaftlichen Gemeinschaft mit Tagungen und Publikationen. Sie engagiert sich in der gesellschaftspolitischen Diskussion zu Themen wie Nachwuchsförderung, Chancengleichheit, Klimaschutz, Energieversorgung und Rüstungskontrolle. Sie fördert den Physikunterricht und möchte darüber hinaus allen Neugierigen ein Fenster zur Physik öffnen.

In der DPG sind Wissenschaftlerinnen und Wissenschaftler, Studierende, Lehrerinnen und Lehrer, in der Industrie tätige oder einfach nur an Physik interessierte Personen ebenso vertreten wie Patentanwälte und Wissenschaftsjournalisten. Gegenwärtig hat die DPG neun Nobelpreisträger in ihren Reihen. Weltberühmte Mitglieder hatte die DPG immer schon. So waren Albert Einstein, Hermann von Helmholtz und Max Planck einst Präsidenten der DPG.

Die DPG finanziert sich im Wesentlichen aus Mitgliedsbeiträgen. Ihre Aktivitäten werden außerdem von Bundes- und Landesseite sowie von gemeinnützigen Organisationen gefördert. Besonders eng kooperiert die DPG mit der Wilhelm und Else Heraeus-Stiftung.

**Die DPG-Geschäftsstelle** hat ihren Sitz im Physikzentrum Bad Honnef in unmittelbarer Nähe zur Universitäts- und Bundesstadt Bonn. Das Physikzentrum ist nicht nur ein Begegnungs- und Diskussionsforum von herausragender Bedeutung für die Physik in Deutschland, sondern auch Markenzeichen der Physik auf internationalem Niveau. Hier treffen sich Studierende und Spitzenwissenschaftler bis hin zum Nobelpreisträger zum wissenschaftlichen Gedankenaustausch. Auch Lehrerinnen und Lehrer reisen immer wieder gerne nach Bad Honnef, um sich in den Seminaren der DPG fachlich und didaktisch fortzubilden.

In der Bundeshauptstadt ist die DPG ebenfalls präsent. Denn seit ihrer Vereinigung mit der Physikalischen Gesellschaft der DDR im Jahre 1990 unterhält sie das Berliner Magnus-Haus. Dieses 1760 vollendete Stadtpalais, das den Namen des Naturforschers Gustav Magnus trägt, ist eng mit der Geschichte der DPG verbunden: Aus einem Gelehrtentreffen, das hier regelmäßig stattfand, ging im Jahre 1845 die „Physikalische Gesellschaft zu Berlin“, später die DPG hervor. Heute finden hier Kolloquien und Vorträge zu physikalischen und gesellschaftspolitischen Themen statt. Gleichzeitig befindet sich im Magnus-Haus auch das historische Archiv der DPG.



## **Deutsche Physikalische Gesellschaft e. V.**

Geschäftsstelle      Tel.: 02224 / 92 32 - 0  
Hauptstraße 5      Fax: 02224 / 92 32 - 50  
53604 Bad Honnef      E-Mail: [dpg@dpg-physik.de](mailto:dpg@dpg-physik.de)

Die Deutsche Physikalische Gesellschaft  
dankt ihren Autoren  
Steffen J. Sahl und Stefan W. Hell  
Max-Planck-Institut für biophysikalische Chemie,  
Göttingen