

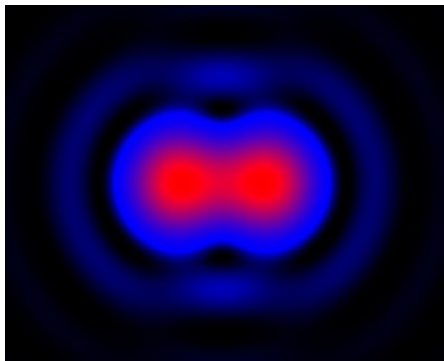
Super-Hochauflösung

Über einen die Auflösung in Lichtmikroskopen betreffenden heuristischen Gesichtspunkt

Dr. rer. nat. Rolf T Borlinghaus, Senior Scientist

Leica Microsystems

Nachdem „super-resolution“, in Deutsch etwa „Super-Auflösung“, sich zu einer der bedeutendsten Methoden in der biomedizinischen Forschung entwickelt hat, wird dieser Begriff auch in weiteren Kreisen zunehmend populärer. Aber es bleibt oft unklar, was Super-Auflösung oder gar Super-Höchstauflösung eigentlich ist, und was man überhaupt unter Auflösung zu verstehen hat. Hier wird das klassische Verständnis mikroskopischer Auflösung diskutiert, und es werden einige Techniken kurz vorgestellt, die höher als klassisch auflösen. Die untenstehende Abbildung zeigt die Intensitätsverteilung eines Bildes von zwei Punkten, deren Abstand gerade dem Rayleigh-Kriterium entspricht (in Falschfarbendarstellung).



Was ist Auflösung?

In unserem Kontext ist Auflösung das Gegenteil von Verschmelzung. Wenn etwas aufgelöst erscheint, können wir diskrete Komponenten unterscheiden. In der Mikroskopie werden üblicherweise drei Ansätze verwendet, um Auflösung zu beschreiben. Eine davon ist die Abbe-Formel, benannt nach Ernst Karl Abbe. Er untersuchte lineare Strukturen im Durchlicht [1].

Bei Beleuchtung mit einem Kondensator (also nicht nur „centrale Beleuchtung“), ist die kleinste Distanz, die aufgelöst werden kann:

$$d_A = \frac{0.5 \times \lambda}{NA}$$

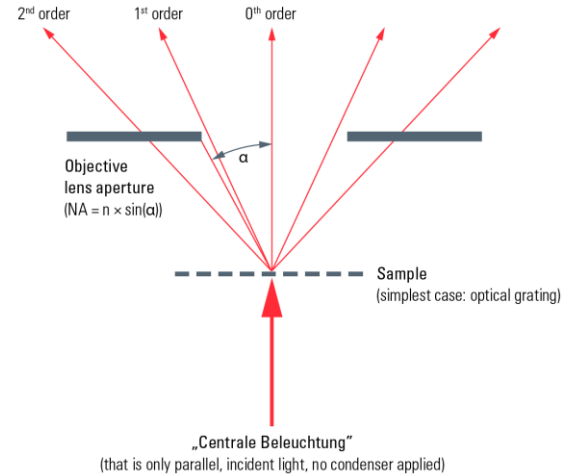
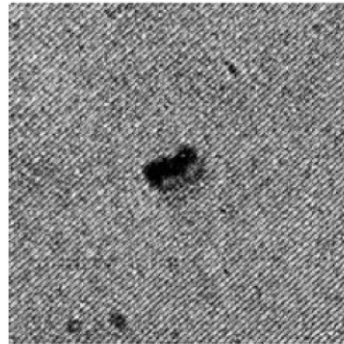


Abb. 2: Ernst Abbes Definition der Auflösung. Wenn man davon ausgeht, dass das Präparat (Sample) eine periodische Struktur (optical grating) enthält, dann ist es nötig, wenigstens die erste Beugungsordnung (1st order) neben der nullten Ordnung (0th order) einzufangen, damit ein Bild entstehen kann. Deshalb muss die Apertur des Objektivs hinreichend groß sein: $n \times \sin \alpha = NA \geq \lambda/d$, wobei d die Periode der Struktur sein soll. Das Bild links zeigt ein optisches Gitter (mit reichlich Staub darauf), aufgenommen mit einem Objektiv, dessen Apertur verstellbar ist. Sie wurde so eingestellt, dass die Struktur gerade eben zu sehen ist.

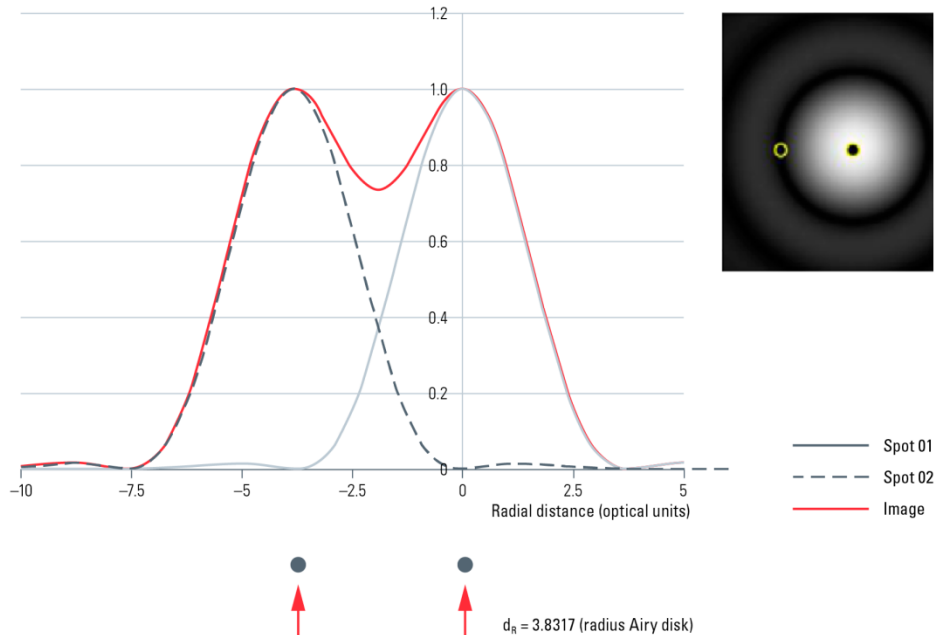


Abb. 1: Rayleigh-Kriterium. Zwei Punkte werden als aufgelöst betrachtet, wenn das Zentrum des einen Punktmusters mit der ersten Nullstelle der Punktverwaschungsfunktion (PSF) des anderen Punktes zusammenfällt. Dieses Kriterium kann nur für Airy-ähnliche PSFs angewandt werden. Ein Gauß-Profil etwa hat gar keine Nullstellen, und das Kriterium ist daher nicht sinnvoll. Andere Kriterien, beispielsweise das Sparrow-Kriterium, können auf beliebige Profile angewendet werden, da sie sich auf jenen Abstand beziehen, bei dem die erste Ableitung in der Mitte zwischen den beiden Punkten verschwindet (Plateau-Kriterium).

Ein weiterer Ansatz ist das Rayleigh-Kriterium, nach John W. Strutt, der punktförmige Emittoren (Sterne) untersucht hat, und zwei Punkte dann als optisch aufgelöst definiert hat, wenn das Maximum des Beugungsmusters des einen Emitters mit dem ersten Minimum des Beugungsmusters des anderen Emitters zusammenfällt [2]. So erhält man:

$$d_R = \frac{0.61 \times \lambda}{NA}$$

In diesem Falle findet man ein Helligkeitsminimum zwischen den beiden Maxima bei etwa $\frac{3}{4}$ der Maximalintensität.

Natürlich kann man Punkte auch dann noch unterscheiden, wenn dieser Helligkeitsabfall weniger deutlich ist. Üblicherweise benutzte Werte für „Auflösung“ basieren also immer auf einer willkürlich festgelegten Grenze und „die“ Auflösung lässt sich nicht aus einem Naturgesetz herleiten, ganz egal wieviel Mathematik und Beugungsoptik man hineinsteckt.

Der dritte, eher aus der Praxis stammende Ansatz ist die „volle Halbwertsbreite“ (full width half maximum FWHM) [3], einer optisch nicht aufgelösten Struktur. Dieser Wert lässt sich einfach mit jedem Mikroskop bestimmen und wurde daher zu einem beliebigen Vergleichsparameter. Der theoretische Wert ist

$$d_H = \frac{0.51 \times \lambda}{NA}$$

Zu Kalibrationszwecken oder zur Messung der tatsächlichen Auflösungsgrenze eines Gerätes werden üblicherweise fluoreszenzgefärbte Latex-beads unterschiedlicher Größe abgebildet und deren Halbwertsbreiten vermessen.

Wie man sieht, weichen alle diese Werte – obwohl unter ganz unterschiedlichen Annahmen gewonnen – weniger als 10% von einem mittleren Wert ab. Das macht das Leben sehr viel einfacher: wir wissen, dass wir keinen groben Fehler machen, wenn wir einfach die FWHM als den beobachtbaren Parameter für Auflösung benutzen. Dieser ist einfach zu messen und liegt nahe genug bei der simplen Formel:

$$d = \frac{\lambda}{2 \times NA}$$

Alle Auflösungsparameter, die aus physikalischen und mathematischen Annahmen abgeleitet werden, sind theoretische Näherungen. Sie unterstellen perfekte Bildaufnahmesysteme und einen Lichtpunkt im Vakuum oder einem völlig homogenen Substrat als mikroskopisches Objekt. Freilich ist das im wirklichen Leben niemals der Fall, und schon gar nicht in der täglichen Laborpraxis. Eine besonders wichtige Annahme ist, dass Licht

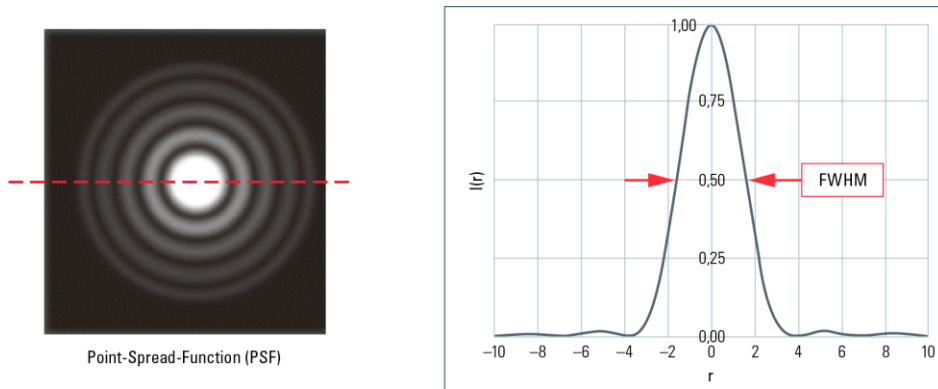


Abb. 3: Links: Punktverwaschungsfunktion durch eine kreisförmige Apertur (die Intensitäten sind hier nichtlinear dargestellt, damit die schwachen Ringe um die zentrale Scheibe sichtbar bleiben). Der zentrale Fleck wird „Airy-Scheibchen“ genannt. Rechts: Helligkeitsprofil durch das Zentrum des kreisförmigen Beugungsmusters. Ein gut messbarer Parameter ist die volle Halbwertsbreite (FWHM =: d).

in beliebiger Menge verfügbar ist. Das ist natürlich nicht so, und die tatsächlich messbare Auflösung hängt signifikant vom Signal-Rausch Verhältnis (SNR, signal/noise ratio) ab. Es ist auch offensichtlich, dass typische biologische Präparate – etwa Gehirnschnitte – sich optisch nicht so freundlich verhalten wie ein Vakuum!

Die Messergebnisse sind daher immer „schlechter“ als die (theoretische) optische Auflösung eines Mikroskopes – ganz unabhängig davon, welches Kriterium betrachtet wird. Das ist besonders dann zu beachten, wenn man etwa dicke und schwach gefärbte Gewebeschnitte untersucht. Darüber hinaus wird das mikroskopische Bild ja durch Interferenz sehr vieler Beugungsmuster erzeugt, nicht nur aus einem oder zweien. Ernsthaften Auflösungs-messungen liegt daher immer eine große Zahl von Messungen an verschiedenen Positionen und, wenn möglich, in verschiedenen Präparaten zugrunde, aus denen dann ein Mittelwert und ein mittlerer Fehler berechnet werden. Es ist auch klar, dass Behauptungen wie „wir haben eine Auflösung von 197,48 nm erreicht“ eine Flunkerei ist,

und wohl besser „200 nm“ genannt werden sollte.

Und was ist dann Super-Auflösung?

Das Präfix „super“ kommt aus dem Lateinischen und bedeutet „darüber“ oder „jenseits von“. Super-Auflösung wird daher benutzt, um Techniken zu beschreiben, die die Auflösung in der Mikroskopie verbessert. Und das führt sofort zu Konfusionen: ist damit die (theoretische) optische Auflösung gemeint? Oder eine Verbesserung der messbaren Auflösung in einem aufgenommenen Bild? Oder beides? Oder bezieht es sich auf gänzlich verschiedene Techniken, die höhere Auflösung durch andere Methoden erreichen als jene, die sich mit der klassischen optischen Theorie beschreiben lassen? In gewisser Weise kann man alle diese Ansätze guten Gewissens als „Super-Auflösung“ bezeichnen. Ob eine Technik tatsächlich „Super-Auflösung“ genannt wird, ist dann manchmal eher eine Frage der Philosophie – oder folgt dem Wunsch, dem Werk eine höhere Bedeutung beizulegen. Die Grenzen sind ebenso fließend und unbestimmt wie bei der Definition der Auflösung selbst. Super-

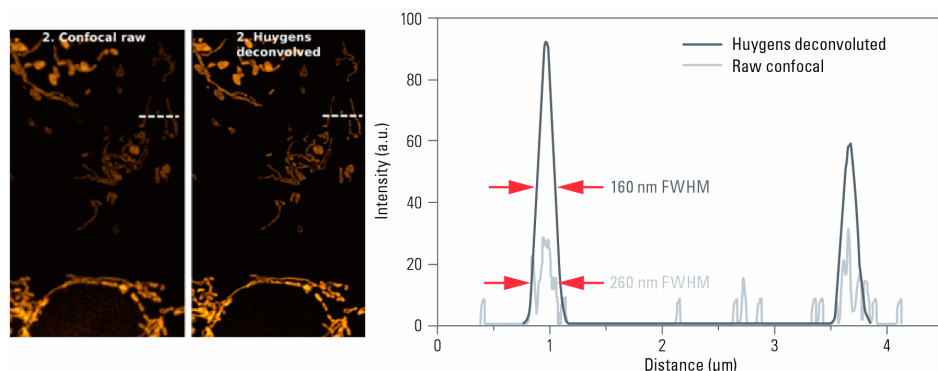


Abb. 4: Vergleich eines konfokalen optischen Schnittes mit zellulären Kompartimenten mit dem aus diesem Bild gewonnenen restaurierten Bild. Die gestrichelte Linie in den linken Vergleichsbildern deutet an, wo die Profile gemessen wurden, die rechts dargestellt sind. Die apparente Verbesserung der Auflösung, wenn die FWHMs verglichen werden, ist hier etwa 1,6-fach. Man beachte auch das geringere Rauschen und die höheren Spitzenintensitäten im restaurierten Bild.

Auflösung kann man einigermaßen stringent definieren als Ergebnis jeden Verfahrens, das eine bessere Auflösung liefert, als die durch optische Beugung begrenzte Auflösung. Wir wollen diese Frage hier aber nicht weiter vertiefen und uns lieber die verschiedenen Techniken einmal ansehen.

Bildrestauration (Dekonvolution)

Ein optisches Gerät, beispielsweise ein Mikroskop, stellt ein Objekt in abgewandelter Form dar. Der Zweck des Mikroskops ist, kleine Strukturen, die nicht mit dem bloßen Auge wahrgenommen werden können, so zu vergrößern, dass wir sie erkennen können. Unglücklicherweise geht bei so einer Prozedur immer etwas verloren. Wir können nicht hoffen, dass wir immer kleinere Strukturen erkennen können, wenn wir die optische Vergrößerung immer weiter verstärken. Das ist so, weil die mikroskopische Darstellung von Objekten – wie klein auch immer sie sind – prinzipiell durch die Regeln der Beugung bestimmt ist.

Ein punktförmiges Objekt wird daher als Beugungsmuster dargestellt. Dieses Beugungsmuster ist die „Punktverwaschungsfunktion“ (PSF, point spread function), eine dreidimensionale Beschreibung dessen, was das Mikroskop aus diesem Punkt gemacht hat. Die Verwaschung durch das optische System wird „Faltung“ genannt (engl.: con-

volution). Der Punkt wird mit dem optischen System „gefaltet“. Es ist möglich, solche PSFs zu berechnen. Unter der Annahme idealer Bedingungen errechnete PSFs sehen sehr brillant aus. Es ist aber vorteilhafter, die PSF in einem passenden Objekt zu vermessen, weil dann auch alle Beeinflussungen durch das Präparat und durch das abbildende System (mit seinen optischen Fehlern) mit berücksichtigt werden. Die Idee der Dekonvolution (also „Entfaltung“) ist, das Wissen über die PSF auf ein dreidimensional aufgenommenes Bild anzuwenden, um die ursprüngliche Lichtverteilung im Objekt zu berechnen.

Da diese Methode in der Tat die Trennbarkeit der zunächst optisch und elektronisch aufgezeichneten Bilder verbessert, wird sie gelegentlich schon als Super-Auflösungsmethode bezeichnet. Verbesserungen von knapp unter zweifach in lateraler Richtung, und etwas besser als zweifach in axialer Richtung werden beschrieben [4].

Konfokale Mikroskopie

Bei der konfokalen Mikroskopie wird immer nur ein einzelner Punkt beleuchtet, und das emittierte Licht von diesem Punkt wird durch eine sehr kleine Blende (Pinhole) auf einen Detektor gefädelt. Dabei wirkt das Pinhole wie ein punktförmiger Detektor. Ganz grob kann man schon aus diesem Ansatz vermuten, dass so ein System inhärent weniger anfällig für Störungen durch Konvolution ist: wenn das ganze Feld gleichzeitig beleuchtet und betrachtet wird, dann können die Daten, die in einem Pixel aufgezeichnet werden, auch Information von anderen Raumelementen enthalten. Und tatsächlich liefert die konfokale Mikroskopie extrem dünne optische Schnitte, die nur noch von Beugungseffekten begrenzt sind. Unter typischen Laborbedingungen ist die Halbwertsbreite lateral etwa halb so groß wie die axiale. Das ist ein enormer Gewinn, denn ein konventionelles Mikroskop – so groß und teuer es auch sein mag – hat vereinfacht gesagt keine Möglichkeit Informationen in der z-Richtung zu separieren, das Licht wird nur durch Defokussierung „verdünnt“.

Um die besten Ergebnisse mit einem konfokalen Mikroskop zu erzielen, benutzt man ein Pinhole, dessen Durchmesser ungefähr so groß wie das Airy-Scheibchen, also die innere Struktur des Beugungsmusters ist – multipliziert mit den Vergrößerungsfaktoren des abbildenden Systems. Damit erhält man optische Schnitte nahe an der Beugungsgrenze ohne allzu viel Licht zu verlieren. Unter diesen Bedingungen wird die laterale Auflösung nicht verbessert.

Also: Bilder mit klassischer konfokaler Mikroskopie sind bezüglich der lateralen Auflösung keine super-aufgelösten Bilder. Allerdings kann die laterale Auflösung verbessert werden, wenn die Pinhole-Blende über das übliche Maß hinaus verkleinert wird. Für den – zugegebenermaßen theoretischen – Fall eines Pinholes mit dem Durchmesser null, kann man eine Verbesserung um den

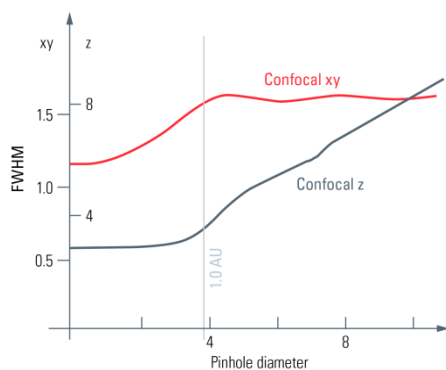


Abb. 5: Auflösungsverhalten im wahren konfokalen Mikroskop (singuläres Punktfeld), in Abhängigkeit des Pinhole-Durchmessers (Kurven nach [5]). Die Güte des optischen Schnittes ist in schwarz dargestellt, die laterale Auflösung in rot. Wenn das Pinhole mit dem Airy-Scheibchen übereinstimmt (angedeutet durch die graue Linie bei 1,0 AU), führt eine weitere Einengung nicht zur Verbesserung der optischen Schnitte, aber zu höherer lateraler Auflösung. Bei einem Blendendurchmesser von Null erreichen die Halbwertsbreiten die Beugungsgrenze, und die laterale Auflösung ist um den Faktor $\sqrt{2}$ besser im Vergleich zur Beugungsgrenze in der Weitfeld-Situation.

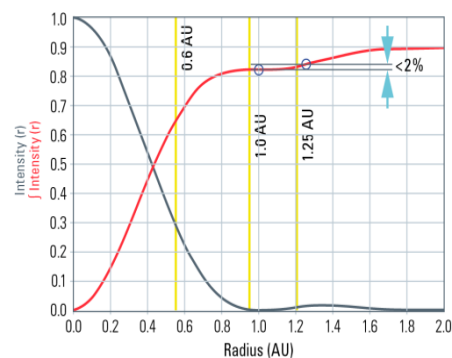
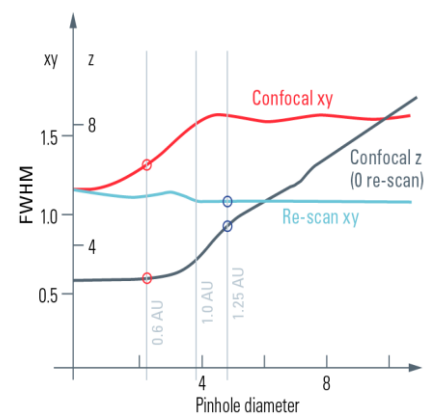


Abb. 6: oben: Vergleich der lateralen und axialen Auflösungen für konfokale Mikroskopie (rot: lateral, schwarz: axial) und für Photonen-Neuzuordnung (blau: lateral, schwarz: axial). PNZ-Daten nach [6]. Wird ein Anteil von 1,25 AU für die Photonen-Neuzuordnung benutzt (markiert durch die blauen Kringle), dann ist die laterale Auflösung etwas besser als im beugungsbegrenzt-konfokalen Fall, aber die Schichtschnittgüte wird deutlich schlechter. Bei konfokaler Mikroskopie mit einem Pinhole von 0,6 AU (rote Kringle), wird die laterale Auflösung gegenüber der Weitfeld-Mikroskopie deutlich verbessert und die Schichtschnittgüte liegt dennoch fast an der Beugungsgrenze. unten: radiale Helligkeitsverteilung in einer kreisförmigen Punktverwaschungsfunktion (schwarze Kurve) und das Helligkeitsintegral innerhalb der Fläche mit dem Radius, der mit dem Pinhole-Durchmesser korrespondiert (rote Kurve). Die Energie im Fokus unterscheidet sich von 1,0 AU zu 1,25 AU lediglich um etwa 2%.

Faktor von etwa 1,4 erwarten [5], wie man aus Abbildung 5 entnehmen kann. Im sub-1 AU Bereich sind also höhere Auflösungen möglich. Da Fluoreszenzpräparate notoriously sehr empfindlich sind, braucht man hier hohe Durchlässigkeiten der optischen Komponenten, beispielsweise einen akustooptischen Teiler (AOBS) und einen Spektraldetektor mit ausschließlich prismatischer Dispersion (SP-Detektor). Weiter muss der Sensor hohe Empfindlichkeit und geringe Hintergrundhelligkeit aufweisen; hier ist ein Hybrid-Detektor (HyD) die beste Wahl. Die Auflösung im hier beschriebenen Sinne kann durch nachfolgende Entfaltung weiter erhöht werden. Auch hier haben hohe Transmission der optischen Teile und hohe Empfindlichkeit des Sensors positive Wirkung, da die Entfaltungsalgorithmen ebenfalls ein hinreichend gutes Signal-Rausch Verhältnis erwarten lassen.

Für den Einsatz eines Punktfeld-Mikroskops mit anschließender Entfaltung der Bilddaten spricht, dass keine Modifikationen am Gerät notwendig sind und man daher gleichzeitig das System als normales konfokales Mikroskop verwenden kann (vorausgesetzt das Design erfüllt die oben genannten Kriterien). Das ist kostengünstig und ermöglicht super-Auflösung für alle Techniken und Methoden die das konfokale Mikroskop bietet.

Photonen-Neuzuordnungsmikroskopie

Eine weitere Idee zur Verbesserung der Auflösung in konfokalen Mikroskopen wurde "image scanning microscopy", „photon reassignment microscopy“ oder auch „re-scan confocal microscopy [6]“ genannt und soll hier Photon-Neuzuordnungsmikroskopie heißen. Dieses Verfahren nutzt die Tatsache, dass die Halbwertsbreite eines Punktbildes in einem konfokalen Mikroskop am Rand des Beugungsmusters ein wenig schmaler ist, als im Zentrum. Im Wesentlichen entspricht dies der Beobachtung, dass ein schlecht zentriertes Pinhole zu ein bisschen mehr Auflösung führt – allerdings nur auf immense Kosten der Helligkeit.

Theoretisch kann man eine 1,5fache Erhöhung der lateralen Auflösung erwarten, wenn man das ganze Beugungsbildchen in viele Einzelmessungen aufteilt und anschließend die Intensitäten in die „korrekten“ Pixel des mikroskopischen Bildes zurückverteilt. Dieser Wert trifft aber nur für eine beliebig hohe Zahl von Einzelmessungen über eine beliebig große Fläche zu. In der Praxis ist dieser Wert deutlich kleiner. Falls also die Behauptung vertreten wird, mit diesem Verfahren ein Zugewinn bei der Auflösung von mehr als dem 1,5-fachen zu erzielen



Abb. 7: Lokalisierungsgenauigkeit eines singulären Emitters. a) theoretische Punktverwaschungsfunktion eines singulären Emitters, der sich in der Mitte des Bildes befindet (rotes Kreuz). b) Aufnahme einer Serie einzelner Emissionen. c) Koordinaten des Mittelpunktes der am besten passenden PSF (grünes Kreuz). d) Darstellung des Fehlers beim hier betrachteten Beispiel. Der mittlere Fehler ist umgekehrt proportional zur Wurzel aus der Zahl der Photonen, die zur Messung beitragen.

(beispielsweise 1,7-fach), dann handelt es sich immer um eine Kombination von Photonen-Neuzuordnung mit Entfaltung (ähnlich wie oben für konfokale Mikroskopie und Entfaltung beschrieben). Im Übrigen verliert man mit solch einem Mikroskop die Güte der optischen Schnitte, weil diese vom verwendeten Anteil des Beugungsmusters abhängt – und bei weitreichenden Umverteilungen nicht mehr eingeschränkt wird. Will man das optische Messer wieder schärfen, dann muss man den Bereich wieder begrenzen, beispielsweise auf 1,25 AU. Das ist dann aber nahezu dasselbe wie in einem gewöhnlichen konfokalen Mikroskop bei 1,0 AU. Bemerkenswerterweise ist die Differenz der gesamten Helligkeit zwischen 1,0 und 1,25 AU nur 2%, weil bei 1 AU das Beugungsmuster ja eine Nullstelle aufweist, und darüber und darunter die Intensität natürlich sehr gering ausfällt.

Hinzu kommt, dass Geräte mit optischer Neuzuordnung (OPRA) oft mit Verlusten behaftet sind, die durch die Umverteilungsoptik unvermeidlich sind. Solche Verluste können leicht ein Drittel der gesamten Helligkeit ausmachen und sind deshalb größer als die Helligkeitseinbußen durch einen kleineren Pinhole-Durchmesser in einem gewöhnlichen konfokalen Mikroskop, betrieben etwa bei 0,6 AU!

Strukturierte Beleuchtung

Eine weitere Möglichkeit zur Auflösungsverbesserung kann mit strukturierter Beleuchtung ausgeschöpft werden. Man kann sich das an Moiré-Mustern klar machen, die entstehen, wenn zwei Streifenmuster verdreht überlagert werden. Ihre Wohnzimmergardine mag als leicht zugängliches Beispiel dienen. Wenn man eines der Streifenmuster kennt und das Moiré-Muster vermisst, dann

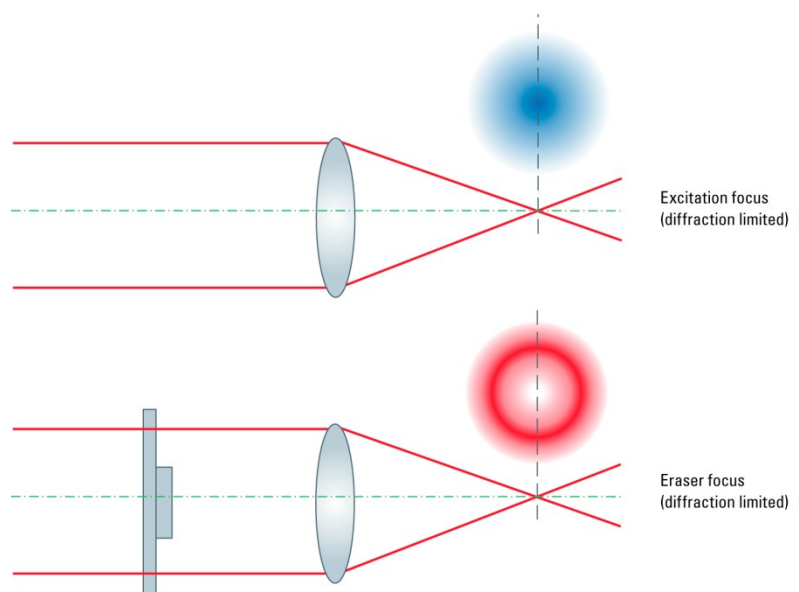


Abb. 8: Anregung in einem beugungsbegrenzten Fleck (obere Zeichnung) in einem STED Mikroskop. Das Präparat wird beugungsbegrenzt mit kreisförmiger optik beleuchtet und erzeugt so eine Fläche angeregter Moleküle (blau). Beleuchtung mit einem toroiden Beugungsmuster bei einer Wellenlänge, die die stimulierte Emission auslöst (rot), löscht die äußeren Bereiche der angeregten Fläche und lässt eine kleinere Fläche zurück, aus der anschließend Emission stattfindet. Daher ist die Auflösung erhöht.

kann man das andere Streifenmuster berechnen. Genau dieses tut die Mikroskopie mit strukturierter Beleuchtung. Das bekannte Streifenmuster ist die Beleuchtung. Das Muster, das sich bildet, wenn die Beleuchtungsstruktur mit Objektstrukturen gefaltet wird, ist das Bild, das man mit der Kamera aufnehmen („messen“) kann. Diese zwei Informationen werden dann benutzt, um die Objektstrukturen zu rekonstruieren. Allerdings muss man dazu Bilder mit wenigstens drei Orientierungen des Beleuchtungsmusters bei jeweils drei Phasen aufnehmen. Bessere Ergebnisse bekommt man mit fünf Orientierungen und fünf Phasen, was dann 25 Aufnahmen ergibt. Natürlich dauert das einige Zeit und es führt auch zu einer starken Belastung der Probe. Der Gewinn an Auflösung ist etwa eine Verdoppelung [7].

Super-Höchstaufklärung?

Die bisher beschriebenen Methoden erlauben alle eine Verbesserung der Detail-Sichtbarkeit, wobei aber höchstens etwa eine Verdoppelung der Auflösung möglich ist. Wenn man als Auflösungsgrenze gewöhnlicher Lichtmikroskopie 200 nm festlegt, dann kann man mit diesen Methoden auf 100 nm Auflösung hoffen.

Die im Folgenden vorgestellten Methoden sind prinzipiell (beugungs-)unbegrenzt. Die tatsächlich erreichte Auflösung hängt nur noch von den Einstellungen am Gerät ab, von der Effizienz des Emitters und schließlich von dessen Größe, aber nicht mehr von der Wellenlänge des Lichtes und nicht von der Apertur des Objektivs.

Lokalisations-Mikroskopie

Das Bild eines Punktes wird durch das Beugungsmuster beschrieben. Im Falle eines Mikroskops mit runden Blenden ist dies das Airy-Muster. Wenn man sich hinreichend sicher sein kann, dass ein Punktbild von einem einzelnen Emitter stammt („Einzelmolekülmikroskopie“), kann man das entstandene Airy-Muster messen und den Mittelpunkt daraus ableiten, man bestimmt also das Zentrum des fluoreszierenden Elektronensystems.

Es gibt verschiedene Verfahren mit denen man sicherstellen kann, dass wirklich separate einzelne Emitter gemessen werden. Falls die Beugungsmuster überlappen aber noch als solche erkennbar sind, kann man sie immer noch mit Separationsalgorithmen auftrennen und lokalisieren. Dass es sich um getrennte Objekte handelt, kann man beispielsweise an unterschiedlichen Farben oder Blinkfrequenzen erkennen. Am häufigsten wird aber eine zeitauflösende Trennung benutzt, wozu man die Emitter an-

oder abschalten muss. Es gibt verschiedene Möglichkeiten Moleküle zu schalten: ausbleichen (das wäre nur ausschalten), stochastische Rückkehr aus einem Dunkelzustand [8], stochastisches Zusammentreffen zweier nicht-fluoreszierender Molekülteile, Löschung durch ein weiteres Fluoreszenzmolekül [9], aktives Umschalten mit verschiedenen Lichtfarben [10] und so weiter. Das Ergebnis ist immer eine Ansammlung von (zumindest vorübergehend) isolierten Emittieren, deren Fluoreszenzen trennbare Airy-Muster auf dem Kamerasensor erzeugen.

Die Genauigkeit mit der das Zentrum der Beugungsfigur ausgemacht werden kann, hängt von der Größe r des Beugungsmusters selbst ab (es wird durch die Emissionswellenlänge und die numerische Apertur des Objektivs bestimmt) und von der Anzahl N der Photonen, die zur Aufnahme dieses Musters beigetragen haben [11]. Je höher die Zahl der Photonen, desto höher die Genauigkeit. Theoretisch ist die Menge der Photonen aber nicht begrenzt, und deshalb ist auch die Auflösung unbegrenzt:

$$d_{xy} \approx \frac{r}{\sqrt{N}}$$

Die Koordinaten solcher Positionsmessungen werden in einen Bildspeicher übertragen. Dann wird das Experiment sehr oft wiederholt (mehrere Tausend Bilder), wobei die Emitter

in zufälliger Weise geschaltet werden. So erhält man ein zusammenhängendes Bild der Verteilung der Fluoreszenzmoleküle. Mehrfache Messung desselben Emitters (mit unterschiedlichen Koordinaten) kann man natürlich nicht ausschließen. Die Auflösung in solch einem Bild ist dann die oben genannte Positionierungsgenauigkeit.

STED Mikroskopie

Die erste Methode mit der man theoretisch unbegrenzt auflösen kann, benutzt ein Phänomen namens „stimulierte Emission“ [13]. Hier löst ein Triggerphoton den Übergang in einem Fluoreszenzmolekül vom angeregten in den Grundzustand aus. Jeder Laser macht von diesem Phänomen Gebrauch. Wie im Abschnitt über konfokale Mikroskopie beschrieben, beleuchtet ein Rastermikroskop in jedem Moment nur eine beugungsbegrenzte Fläche. Diese Fläche wird dann Photonen emittieren und ist deshalb für die erreichbare Auflösung bestimmend. Mit der Technik der stimulierten Emission kann die Anregung gelöscht werden, bevor die Emission stattfindet. Leuchtet man mit Licht, dessen Farbe für die stimulierte Emission geeignet ist, auf die Fläche mit den angeregten Molekülen, dann werden die angeregten Zustände in diesem Bereich gelöscht oder von vornherein vermieden. Um aus diesem Verfahren etwas zu gewinnen muss man sicher stellen, dass

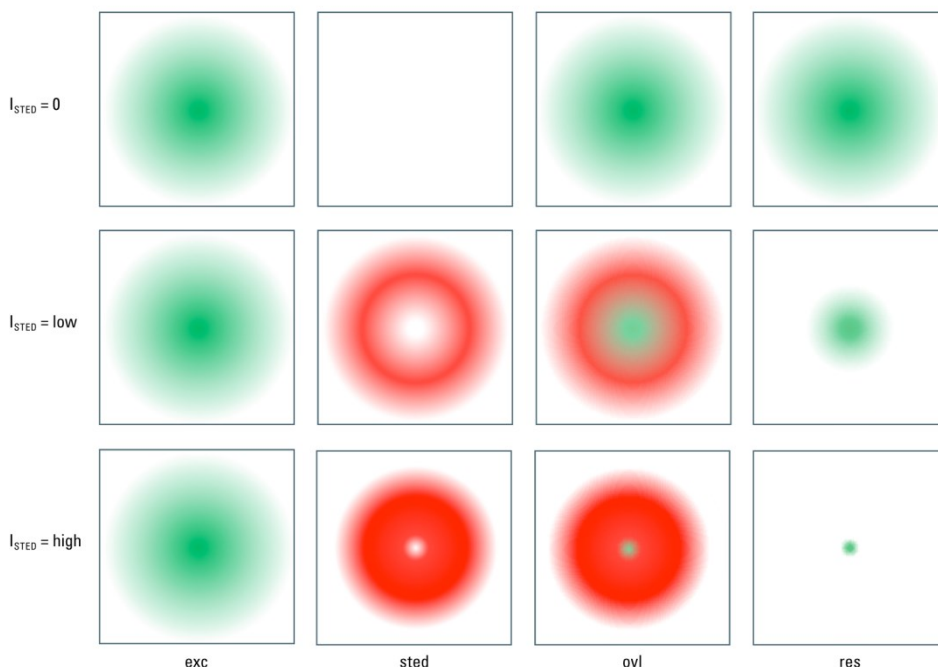


Abb. 9: Auswirkung der Intensität des Depletionslasers in einem STED Mikroskop. Erste Spalte: Anregungsmuster (grün). Dies ist für alle Beispiele identisch, da die Anregungsintensität nicht verändert wurde. Zweite Spalte: Darstellung des Beugungsmusters des Depletionslasers (rot) bei von oben nach unten zunehmender Intensität. Dritte Spalte: Überlagerung von Anregung und Depletion (stimulierter Emission). Vierte Spalte: verbleibende angeregte Fläche, die mit zunehmender Energie des Depletionslasers immer kleiner wird. Theoretisch bis zu einer unbegrenzt kleinen Fläche.

der Stimulationslaser ringförmig um das Zentrum des Airy-Musters fokussiert wird. Andernfalls wären alle Moleküle im Grundzustand und man könnte gar kein Bild aufnehmen. Ringförmige Beugungsmuster sind vergleichsweise einfach zu erzeugen, indem man eine passende Phasenplatte in den Strahlengang einbringt [13].

$$d = \frac{\lambda}{2 \times NA \times \sqrt{1 + \frac{I}{I_{sat}}}}$$

Die verbleibende Fläche angeregter Moleküle hängt vom Verhältnis der ursprünglich angeregten Fläche und von der "Dicke" des löschenden Ringes ab. Diese Dimensionen sind wieder von den Beugungsparametern Wellenlänge und numerischer Apertur abhängig. Zusätzlich wird die Ringstärke aber auch von der Intensität I bestimmt, die in dem toroiden Fokus ankommt. Diese Intensität wird mit der Leistung des STED-Lasers eingestellt. Theoretisch kann man die Leistung beliebig hoch einstellen – sie wird nur durch die momentan mögliche Technologie begrenzt. Die STED Mikroskopie ist deshalb nicht durch Beugung begrenzt.

Der Parameter, der schließlich die Effizienz der Auflösungsverbesserung bei einer gegebenen STED-Laser Energie bestimmt, ist die Sättigungsintensität I_{sat} . Diese ist eine Eigenschaft des Fluorochromes und wird durch dessen Photophysik bestimmt. Das Verhältnis I/I_{sat} sorgt im Nenner der Abbe-Formel für eine passende Beschreibung des Depletionseffektes.

STED hat eine Reihe von Vorteilen, was es zum idealen Werkzeug in der modernen biomedizinischen Forschung macht. Zunächst: es ist eine instantane Methode. Die super-aufgelösten Bilder entstehen in einem einzigen Durchgang, ohne tausende von Bildern aufnehmen zu müssen, die anschließend aufwändig verrechnet werden müssen, wie das bei der Lokalisierungsmikroskopie der Fall ist. Das ist wichtig für lebende Präparate bei hohen Bildfrequenzen, ein Muss für physiologisch relevante Experimente. Weiter ist es möglich, eine Serie von unterschiedlichen Fluoreszenzfarbstoffen zu kombinieren; eine Voraussetzung um Signale in Raum und Zeit korrelieren zu können. Zwar handelt es sich nicht um ein „kleines“ Mikroskop, aber das mit gutem Grund: als ein Derivat des konfokalen Mikroskops, bekommt man konfokale Mikroskopie als alternative Aufnahmemethode gleich mitgeliefert.

Literatur

[1] Abbe EK: *Beiträge zur Theorie des Mikroskops und der mikroskopischen Wahrnehmung*. *Archiv für Mikroskopische Anatomie* 9 (1): 413–68 (1873).

[2] Rayleigh Lord FRS: *Investigations in optics, with special reference to the spectroscopy*. *Philosophical magazine series 5 – 8* (49): 261–74 (1879).

[3] *Wikipedia*, retrieved Oct. 10th, 2014.

[4] *Scientific Volume Imaging*, retrieved Oct. 10th, 2014.

[5] Wilson T: *Confocal Microscopy*. Academic Press (1990).

[6] de Luca GMR et al.: *Re-scan confocal microscopy scanning twice for better resolution*. *Optics Express* 4: 2644–56 (2013).

[7] Gustafsson MGL: *Surpassing the lateral resolution limit by a factor of two using structured illumination microscopy*. *Journal of Microscopy* 198 (2): 82–87 (2000).

[8] Hell SW, and Kroug M: *Ground-state-depletion fluorescence microscopy: a concept for breaking the diffraction resolution limit*. *Appl. Phys. B* 60: 495–97 (1995).

[9] Rust MJ, Bates M, and Zhuang X: *Sub diffraction-limit imaging by stochastic optical reconstruction microscopy (STORM)*. *Nature Methods* 3 (20): 793–96 (2006).

[10] Betzig E et al.: *Imaging Intracellular Fluorescent Proteins at Nanometer Resolution*. *Science* 313 (5793): 1642–45 (2006).

[11] Thompson RE, Larson DR, and Webb WW: *Precise Nanometer Localization Analysis for Individual Fluorescent Probes*. *Biophysical Journal* 82: 2775–83 (2002).

[12] Mortensen KI et al.: *Optimized localization analysis for single-molecule tracking and super-resolution microscopy*. *Nature Methods* 7 (5): 377–81 (2010).

[13] Hell SW, and Wichmann J: *Breaking the diffraction resolution limit by stimulated emission*. *Opt. Lett.* 19 (11): 780–82 (1994).

Buchtipps:

Rolf Theodor Borlinghaus: *Unbegrenzte Lichtmikroskopie - über Auflösung und Super-Hochauflösung und die Frage, ob man Moleküle sehen kann*.

Springer essentials, Springer Fachmedien Wiesbaden, 2015