

Strukturierte Beleuchtung in der Hochauflösungsmikroskopie

In der Weite des Feldes die Grashalmstruktur erkennen

• Wer als Zellbiologe hätte sich nicht schon immer gewünscht, mit seinem Lichtmikroskop feinste Details in der Zelle aufzulösen? Denn die Struktur einer biologischen Einheit sagt viel über ihre Funktionsweise und Dynamik aus. Den Strich durch die Rechnung macht nicht die biologische Probe selbst, sondern ein physikalisches Gesetz, welches Ernst Abbe bereits 1873 formulierte [1]. Es besagt, dass die Auflösung eines Weitfeld Lichtmikroskops durch die Beugung fundamental begrenzt ist. Es gibt aber mittlerweile erfolgreiche Ansätze, das Mikroskop und die mikroskopische Abbildung so zu modifizieren, dass eine Auflösung jenseits des Abbeschen Gesetzes möglich wird. Eines dieser Verfahren ist die strukturierte Beleuchtungsmikroskopie (SIM; engl. „Structured Illumination Microscopy“).

Die Limitierung der optischen Auflösungsgrenze

Durch die Beugung bedingt wird ein Objektpunkt immer nur als verwaschener Fleck durch ein optisches System übertragen (Info 1). Dies bedingt, dass zwei Punkte im Objektraum sich nicht beliebig nahe kommen können, um im Bildraum immer noch als getrennte Objekte erkannt zu werden. Diesem minimalen Abstand im Ortsraum entspricht eine Grenzfrequenz im Ortsfrequenzraum, die vom System noch übertragen werden kann. Je nach System und zugrunde liegendem Trennungskriterium kommt man zu verschiedenen Aussagen über diesen minimalen Abstand, aber als Faustregel kann gelten, dass die laterale Auflösung ca. der halben Anregungswellenlänge entspricht und die der axialen um einen Faktor 3 schlechter ist (Info 2). Damit ergeben sich für das Lichtmikroskop laterale und axiale Auflösungen von maximal 200 nm bzw. 600 nm. Auch die konfokale Mikroskopie kann diese Grenzen nicht signifikant verbessern. Ziel biologischer Untersuchungen ist aber gerade die Komplexität

DIE AUTOREN

KLAUS WEISSHART

Klaus Weißhart ist Produktmanager bei der Carl Zeiss MicroImaging GmbH. Er promovierte am Deutschen Krebsforschungszentrum in Heidelberg und führte seine Arbeiten auf dem Gebiet der DNA Replikation bei Forschungsaufenthalten an der Harvard Medical School Boston, und der LMU München fort. Im Jahr 2000 nahm er seine Tätigkeit bei der Carl Zeiss MicroImaging GmbH auf und betreut hier Produktlinien für die Korrelationspektroskopie und die Hochauflösungsmikroskopie.



GERHARD KRAMPERT

Gerhard Krampert studierte Physik in Austin, USA, wo er 2000 einen M.A. in Physics von der University of Texas erhielt, und Würzburg, wo er 2004 mit einer Doktorarbeit zur Quantenkontrolle und Ultrakurzzeitspektroskopie promovierte. Nach einem Postdoc-Aufenthalt an der University of British Columbia in Vancouver, Canada, ist er seit 2005 im Forschungszentrum der Carl Zeiss AG tätig mit einem Schwerpunkt auf mikroskopischer Bildgebung.



YAUHENI NOVIKAU

Yauheni Novikau arbeitet seit 2008 als Softwareentwickler bei der Carl Zeiss MicroImaging GmbH. Er promovierte 1991 über das Thema „Mathematische Modellierung“ an der Staatsuniversität von Weißrussland in Minsk. Vor seinem Engagement bei Carl Zeiss entwickelte er Software für Bildgebung und Spektroskopie an der Landwirtschaftlichen Universität Wageningen, Niederlande, der Katholischen Universität Leuven, Belgien und dem Curie Institut, Paris.



MICHAEL KEMPE

Michael Kempe ist seit 1999 Mitarbeiter des Forschungszentrums der Carl Zeiss AG in Jena. Er studierte Physik in Jena und Albuquerque, USA, wo er 1994 einen PhD in Optical Sciences von der University of New Mexico erhielt. Vor seinem Eintritt bei Carl Zeiss arbeitete er wissenschaftlich an verschiedenen Themen der biomedizinischen Bildgebung an der City University of New York, der Harvard University und der Physikalisch-technischen Bundesanstalt in Berlin.



Dr. Klaus Weißhart
Tel.: +49 (0)3641 64-22 68
Fax: +49 (0)3641 64-31 44
E-Mail: weisshart@zeiss.de

Dr. Yauheni Novikau
Tel.: +49 (0)3641 64-33 96
Fax: +49 (0)3641 64-31 44
E-Mail: y.novikau@zeiss.de

Dr. Gerhard Krampert
Tel.: +49 (0)3641 64-29 68
Fax: +49 (0)3641 64-2075
E-Mail: g.krampert@zeiss.de

Dr. Michael Kempe
Tel.: +49 (0)3641 64-38 52
Fax: +49 (0)3641 64-2075
E-Mail: m.kempe@zeiss.de

Carl Zeiss MicroImaging GmbH
Carl-Zeiss-Promenade 10, 07745 Jena
Website: www.zeiss.de/micro

Carl Zeiss AG Corporate Research & Technology
Carl-Zeiss-Promenade 10, 07745 Jena
Website: www.zeiss.de

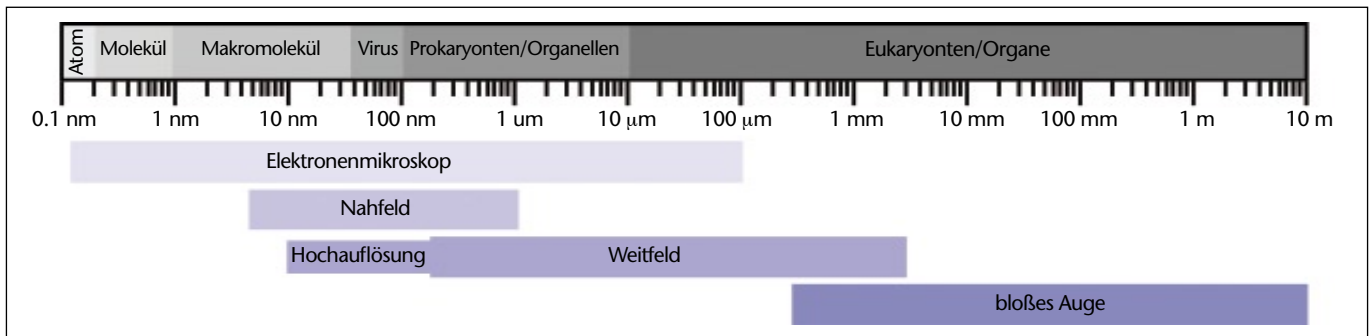


ABB. 1: Einsatzbereich mikroskopischer Verfahren in der Zellbiologie. Das Diagramm zeigt auf, welche Strukturen mit welcher Mikroskopietechnik untersucht werden können. Die verschiedenen Hochauflösungsverfahren erweitern die räumliche Auflösung in der Weitfeldmikroskopie um die Faktoren 2–10.

einzelner Strukturen zu erfassen; im Bestfall bis in die molekulare Dimension und am Lebzellpräparat (Abbildung 1). Zwar bieten Nahfeld- und elektronenmikroskopische Techniken bereits solche gewünschten Auflösungen, allerdings sind die ersteren Verfahren nur auf Oberflächen einsetzbar und letztere dadurch sehr stark eingeschränkt, dass sie nur für dehydrierte Proben verwendet werden können [2, 3]. Darüber hinaus bieten beide Methoden nur einen mäßigen Kontrast. Und gerade diesem molekülspezifischen Kontrast verdanken fluoreszenzbasierte Techniken ihre Popularität. Hochauflösung mit Fluoreszenz zu verheiraten würde geradezu ein ideales Werkzeug schaffen, mit dem man Lokalisationen von Proteinen in ihrem nativen Kontext zu anderen Proteinen exakt bestimmen könnte.

Konzepte zur Steigerung der Auflösung

In jüngster Zeit ist im Zusammenhang mit Auflösungssteigerung in der Mikroskopie bzw. der im Anglikanischen Sprachgebrauch spektakulärer klingenden „Superresolution“ die Rede davon gewesen, die Beugungsbegrenzung gebrochen zu haben. Das ist so physikalisch gesehen nicht richtig. Das Beugungsgesetz ist nicht nur in der Stadt Jena in Gedenken an das Wirken von Ernst Abbe in Stein gemeißelt, sondern bleibt in der Tat ein fundamentales Prinzip in der Lichtmikroskopie (Abbildung 2). Betrachtet man aber einmal die Abhängigkeit der Auflösung von der Punktverbreiterungsfunktion (PSF; engl. „point spread function“) bzw. der optischen Transferfunktion (OTF; engl. „optical transfer function“), so wird deutlich, dass man unmittelbar drei Ansatzpunkte zur Verfügung hat, Auflösung zu erhöhen, ohne das Abbesche Gesetz aushebeln zu müssen. Zum einen kann man versuchen, die PSF durch (nichtlineare) Probenwechselwirkung zu verengen, zum anderen, die Form der PSF durch eine Maximumbestimmung zur genauen Lokali-



ABB. 2: Abbe Denkmal der Universität zu Jena. Das in der Weitfeldmikroskopie fundamentale Gesetz der beugungsbegrenzten Auflösung ist vergrößert dargestellt. (Quelle: Wikipedia)

lierung zu nutzen, und schließlich kann man versuchen, durch spezielle Mikroskopanordnungen und evtl. zusätzlich nichtlineare Probenwechselwirkung die OTF zu erweitern. Das erstere Prinzip kommt z. B. bei der Stimulierten Emissions-Abregungs-Mikroskopie (STED; engl. „Stimulated Emission Depletion“) zum Einsatz [4]. Hierbei wird die Probe mit einer Laserlichtquelle punktförmig angeregt. Ein zweiter unmittelbar folgender Laserpuls einer längeren Wellenlänge wird über eine Phasenmaske so in die Probe gelenkt, dass er nur die in den Außenbereichen der PSF angeregten Moleküle abregt und somit die sichtbare PSF lateral verkleinert. Mit speziellen Phasenmasken kann dies auch in axialer Richtung erfolgen [5]. Das zweite Prinzip wird in der Photoaktivierten Lokalisationsmikroskopie (PALM; engl. für „Photoactivated Localization Microscopy“) genutzt, wobei durch Schaltprozesse in Molekülen Lokalisierung in Bildgebung transformiert werden kann [6]. Hier bestrahlt man die Probe dergestalt, dass

immer nur wenige Moleküle auf einmal für die Fluoreszenzanregung angeschaltet werden und sich deren PSF nicht überlagern. Über Schwerpunktsbestimmung können dann alle über eine bestimmte Zeitspanne detektierten Moleküle hoch präzise lokalisiert werden. Das dritte Prinzip stellt einen gänzlich anderen Ansatz dar und besteht darin, über spezielle Mikroskopanordnungen die OTF Region über die klassische Grenze hinaus zu erweitern und dadurch die PSF auch bei linearer Probenwechselwirkung effektiv zu verkleinern. In axialer Richtung geschieht dies in der 4Pi- und I⁵-Mikroskopie durch die Anordnung von zwei identischen Objektiven gegeneinander [7]. Bei der strukturierten Beleuchtung wird die axiale und laterale Ausdehnung der OTF erweitert. Dabei moduliert man die Objektfrequenzen derart, dass höhere Frequenzbänder in niedere Frequenzbereiche verschoben werden und damit übertragbar sind [8, 9]. Dieses Konzept wurde in seinen Grundzügen bereits 1963 von Lukosz entwickelt und demonstriert [10].

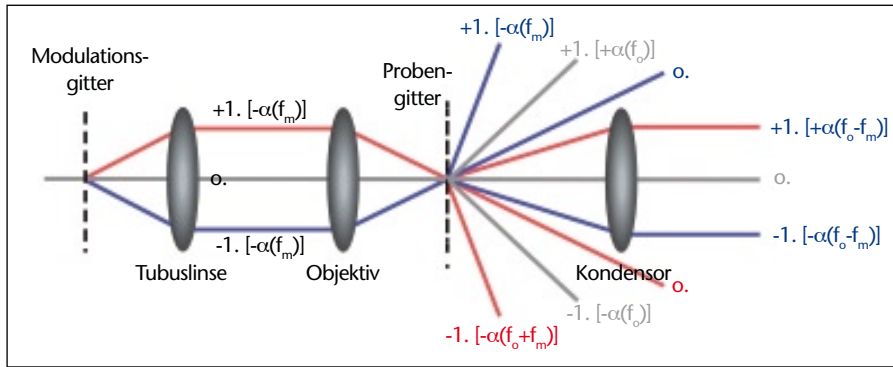


ABB. 3: Schematischer Aufbau der strukturierten Beleuchtung. Die Beugungsordnungen des Modulationsgitters erzeugen durch Interferenz mit Probenstrukturen Beugungsordnungen, die einen um den Modulationsfrequenzwinkel verringerten Betrag haben und daher vom System übertragen werden können. Die Maxima und Winkelverhältnisse (in eckigen Klammern) rechts vom Probengitter sind den Ordnungen im Objekt zugeordnet.

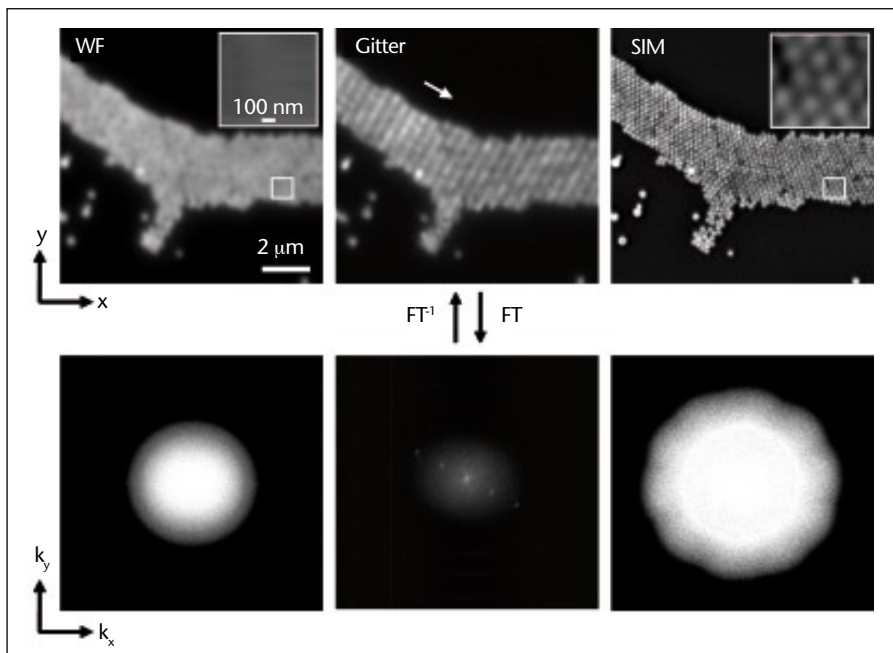


ABB. 4: Verfahren der strukturierten Beleuchtung am Beispiel von 200 nm Kügelchen. Weitfeldbild (WF), die Strukturierung der Probe (Gitter); und das hoch aufgelöste Bild (SIM) dargestellt im Ortsraum (obere Reihe) und dem Ortsfrequenzraum (untere Reihe). Deutlich sind die Strukturierung mit den zugehörigen Frequenzordnungen in den Gitterbildern sowie die Auflösungssteigerung bzw. die Übertragung des erweiterten Frequenzspektrums in den SIM Bildern zu erkennen. (Probe: 200 nm Tetraspecs von Molecular Probes).

Prinzip von SIM

Bei der strukturierten Beleuchtung wird ein Gitter mit einem definierten periodischen, vorzugsweise sinusförmigen Muster in einer zur Bildebene konjugierten Ebene im Anregungsstrahlengang positioniert (Abbildung 3). Dadurch wird die Anregungsintensität in der Probe entlang des Musters moduliert und damit auch die emittierte Fluoreszenz. Den höchsten Modulationskontrast erhält man in der Fokusebene. Der Kontrast nimmt mit Abstand zur Fokusebene ab, so dass eine Tiefendiskriminierung in axialer Richtung erfolgen kann. Dies wird beim optischen Schneiden in der Lichtmikroskopie genutzt, bei dem es wie in der konfokalen

Mikroskopie weniger um Hocho Auflösung als um die Entfernung von Licht außerhalb der Fokusebene geht [11, 12].

Will man strukturierte Beleuchtung für eine Auflösungssteigerung nutzen, dann bedarf es des Einsatzes von Gittern höherer Frequenz, idealerweise Gittern mit einer Gitterkonstante, die der Grenzfrequenz der OTF des Systems entspricht. Man nutzt dabei die Interferenzen der am Gitter erzeugten Beugungsordnungen in der Probe zur axialen und lateralen Strukturierung des Beleuchtungslichtes. Um konstruktive Interferenz zu erhalten, muss zumindest ein Anteil des Lichtes in der Anregung kohärent sein. Betrachten wir zunächst einmal die Ab-

DIE FIRMA

Carl Zeiss GmbH

Die Carl Zeiss Microlmaging GmbH ist ein 100-prozentiges Tochterunternehmen der Carl Zeiss AG. Der führende Hersteller von Mikroskopsystemen bietet Komplettlösungen für die biomedizinische Forschung, das Gesundheitswesen und die Hightech-Industrie an. Das Produktspektrum reicht von Lichtmikroskopen über Systeme für die Laser Scanning Mikroskopie und Spektrometrie bis hin zu Hard- und Software für die Bildbearbeitung und -dokumentation. Hauptsitz der Carl Zeiss Microlmaging GmbH ist Jena. Weitere Produktions- und Entwicklungsstandorte sind in Göttingen und München.

www.zeiss.de/mikro

bildung eines Gitters mit der strukturierten Beleuchtung. Durch Überlagerung des strukturierten Lichtes mit den Objektivstrukturen entsteht ein sogenanntes Moiré Muster. Eine wichtige Eigenschaft des Moiré-Effektes ist, dass sein Muster eine längere Periodizität bzw. niedrigere Raumfrequenz aufweist als die das Muster erzeugende Objekt- und die Beleuchtungslichtstruktur. Jede Objektstruktur kann man sich nun aus der Überlagerung vieler Gitter zusammengesetzt denken, deren Amplitude durch das Objektfrequenzspektrum gegeben ist. Durch die strukturierte Beleuchtung werden aufgrund des Moiré Effektes die Objektfrequenzen zu niederen Frequenzbändern verschoben. Dadurch wird es ermöglicht, dass hohe Frequenzen, die normalerweise nicht durch das optische System erfassbar sind, durch Verschiebung in ein niederes Frequenzband übertragen werden können. Die Abbildung des Modulationsgittermusters der Beleuchtung auf die Probe unterliegt aber wie die Abbildung des Objektes selbst den Abbeschen Beugungsgesetzen. Daher kann das Modulationsgitter keine Periode haben die kleiner ist als die halbe Wellenlänge des Anregungslichtes, was die Auflösungssteigerung auf einen maximalen Faktor 2 beschränkt (Abbildung 3). Jedoch werden auch Objektfrequenzen knapp unterhalb der Grenzfrequenz, die ansonsten nur schwach übertragen werden, durch strukturierte Beleuchtung, die ja das ganze Objektspektrum verschiebt, stärker übertragen, was zusätzlich zu einer verbesserten Sichtbarkeit feiner Objektstrukturen, z.B. gegenüber der konfokalen Mikroskopie führt.

Die Verschiebung bedingt aber, dass sich die Bildfrequenzen aus nichtverschobenen und verschobenen Objektfrequenzinformationen zusammensetzen und daher den Objektfrequenzen nicht mehr entsprechen. In anderen Worten: das Bild ist dem Objekt unähnlich. Im Rohbild wird man daher vergebens nach einer Auflösungssteigerung suchen und erst eine nachträgliche Verrechnung kann eine objektgetreue mikroskopische Abbildung erzielen [8].

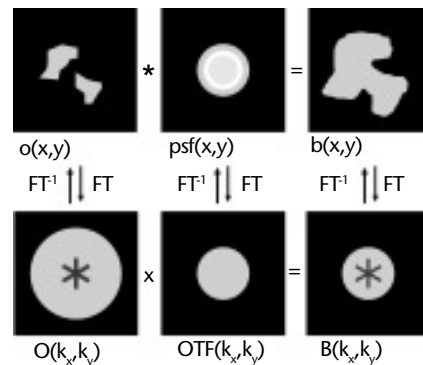
Die Rekonstruktion des Hochauflösungsbildes

Alle vom Objektiv detektierbaren Raumfrequenzen liegen im Frequenzraum innerhalb einer Kreisscheibe und das übertragene strukturierte Beleuchtungsmuster muss demnach zwangsläufig auch innerhalb dieser Kreisscheibe liegen (Info 3). Für eine kohärente Abbildung eines sinusförmigen Gitters ergeben sich i.A. 5 Fourier Komponenten (Ordnungen), die Nullfrequenz (0) und vier, jeweils um die halbe ($\pm f_m/2$) bzw. ganze ($\pm f_m$) Frequenz des Periodenmusters verschobene Raumfrequenzen. Die Richtung des Beleuchtungsmusters ist dabei mit der Achse der 5 Punkte identisch. Um nun das mit jeder der

INFO 1

Abbildungseigenschaften eines optischen Systems

Ein Objekt $o(x,y)$ erfährt in einem optischen System eine Verbreiterung seiner Ausdehnung im Bild $b(x,y)$ bedingt durch seine Faltung (*) mit der Punktverbreiterungsfunktion $psf(x,y)$ (PSF, engl. für „Point Spread Function“). Im Fourierraum entspricht dies einer Multiplikation (x) des Ortsfrequenzspektrums $O(k_x,k_y)$ mit der optischen Transferfunktion OTF (k_x,k_y) (OTF, engl. „Optical Transfer Function“) zum Bildfrequenzspektrum $B(k_x,k_y)$. Hieraus resultiert ein minimaler Abstand (d) bzw. eine maximale Frequenz (f), die das optische System gerade noch auflösen bzw. transferieren kann. Ort und Frequenz können über Fourier-(FT) bzw. reverser Fourier-Transformation (FT^{-1}) ineinander



der umgewandelt werden. Der Ortsraum ist durch kleine, der Ortsfrequenzraum durch große Buchstaben gekennzeichnet.

5 Ordnungen assoziierte Bildspektrum separiert zu erhalten, muss ein lineares Gleichungssystem gelöst werden, welches sich aus fünf, in ihrer Beleuchtungsgitterphase verschobenen Bildern pixelweise lösen lässt. Sind die Ordnungen getrennt, wird der Anteil der OTF durch Entfaltung eliminiert, die

Ordnungen an den korrekten Platz im Spektrum verschoben und diese dann wieder zu einem Spektrum zusammengesetzt. Um Bildartefakte zu vermeiden, kommen hierbei spezielle Glättungsverfahren zum Einsatz. Da die Auflösung nur in der Richtung der Strukturierung erfolgt, müssen zu einer gleichfö-

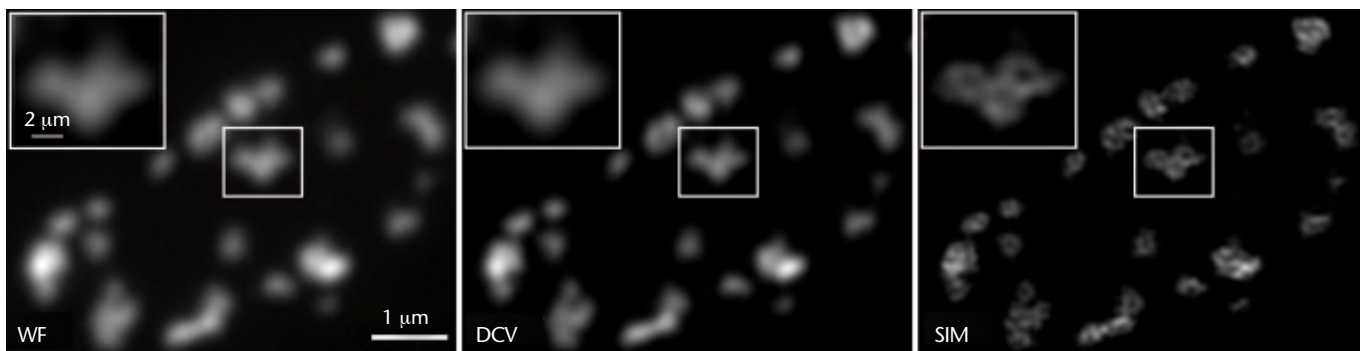


ABB. 5: Bruchpilot an synaptischen Nervenendigungen von *D. melanogaster*. Gezeigt sind das Weitfeldbild (WF), das entfaltete Weitfeldbild (DCV) und die strukturierte Beleuchtung (SIM). Der markierte Bereich in der Mitte eines jeden Bildes ist in seiner linken oberen Ecke vergrößert dargestellt. (Probe: Professor Klämbt, Universität Münster; Färbung: Alexa 488 gekoppelter Antikörper gegen Bruchpilot).

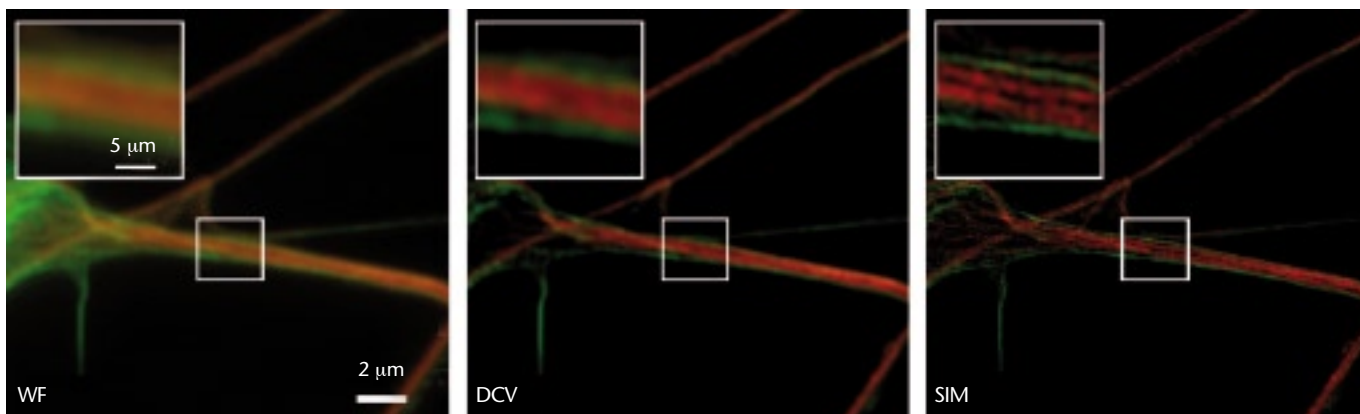
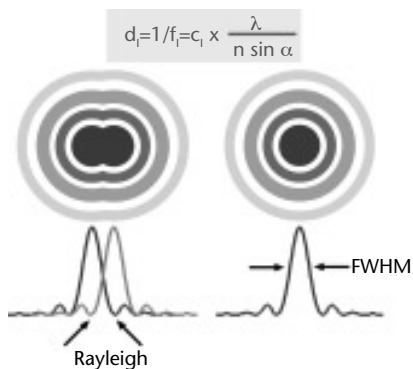


ABB. 6: Mikrotubuli (rot) und Actinfilamente (grün) in Dendriten neuronaler Zellen. Gezeigt sind das Weitfeldbild (WF), das entfaltete Weitfeldbild (DCV) und die strukturierte Beleuchtung (SIM). Der markierte Bereich in der Mitte eines jeden Bildes ist in seiner linken oberen Ecke vergrößert dargestellt. (Probe: Professor Bastmeyer, Universität Karlsruhe; Färbung: Alexa 488 markiertes Phalloidin sowie Alexa 561 markierte Antikörper gegen Tubulin).

INFO 2

Die Auflösungsbegrenzung durch Beugung



Jeder einzelne Objektpunkt erzeugt einen Bildpunkt in der Bildebene, dessen Helligkeitsverteilung in der x,y-Ebene einer Scheibe mit einem zentralen hellen Kreis, umgeben von konzentrischen Ringen abnehmender Helligkeit ähnelt. Sie wird als Beugungs- bzw. Airy-Scheibe (englisch „Airy-disc“) bezeichnet. Je nach Definition und des betrachteten Systems ergeben sich verschiedene laterale Auflösungen. Nach dem Rayleigh Kriterium können zwei Punkte noch aufgelöst werden, wenn das Maximum der ersten Airy-Scheibe noch im ersten Minimum der zweiten Scheibe liegt ($c_1 = 0.61$). Andererseits kann auch die Halbwertsbreite (FWHM, engl. „Full Width at Half Maximum“) der Airy-Scheibe als Auflösungsgrenze angesehen werden ($c_1 = 0.51$). Zu einem ähnlichen Resultat führt die klassische Betrachtungsweise der Auflösung über Beugung nach Abbe ($c_1 = 0.5$). [λ = Wellenlänge des Lichtes, n = Brechzahl des Mediums zwischen dem Objektiv und dem Gegenstand, α = halber Öffnungswinkel des Objektivs].

migen Verbesserung alle Raumrichtungen durch Rotation der Beleuchtungsstrukturierung erfasst werden. Im Allgemeinen sind drei Rotationen ausreichend. Zur Erzeugung eines isotrop hoch aufgelösten Bildes sind demnach die Aufnahmen von $5 \times 3 = 15$ Bildern nötig. Schließlich erfolgt eine Rücktransformation in den Ortsraum, um das Hochauflösungsbild zu erhalten (Abbildung 4).

Einsatz von SIM in der Fluoreszenzmikroskopie

Die meisten zellulären Prozesse sind zeitlich und räumlich streng reguliert [13]. Um die zugrunde liegenden molekularen Netzwerke zu beschreiben, bedarf es spezieller Inst-

umente, die hinsichtlich Sensitivität, Geschwindigkeit und Auflösung optimiert sind. Während zunächst ausreichend sensitive und schnelle Verfahren auf Fluoreszenz Basis entwickelt wurden, hat Hochauflösung erst in jüngster Zeit als quantitative Technik in der Fluoreszenzmikroskopie Fuß gefasst [14, 15]. Dazu trägt im Wesentlichen auch die Entwicklung von Fluoreszenz-Proteinen im Allgemeinen und ihrer schaltbaren Versionen im Besonderen bei [16]. Während die meisten Hochauflöschungstechniken auf diese besondere Schaltfähigkeit oder nichtlineare Wechselwirkungen angewiesen sind und daher in ihrem Einsatz, was die Farbstoffwahl angeht, beträchtliche Einschränkungen haben, bleibt SIM wie klassische Fluoreszenzbildgebung universell verwendbar und kommt mit physiologisch kompatiblen Lichtintensitäten aus [17]. Und schon die mit ihr mögliche zweifache Auflösungssteigerung fördert faszinierende strukturelle Details zutage, die mit bisherigen lichtmikroskopischen Methoden nicht zugänglich sind. Die folgenden zwei Beispiele zeigen, wie SIM zur Aufklärung der Struktur von biologischen Organisationseinheiten beitragen kann.

Im ersten Fall geht es um das Protein Bruchpilot. Bruchpilot kommt im Nervensystem der Taufliege *Drosophila melanogaster* an den Synapsen vor, die die Kontaktstellen zwischen Nerven untereinander bzw. Nerven- und Muskelzellen darstellen. Das Protein ist dabei an der Ausschüttung von Botenstoffen beteiligt, die von einem ankommenden Nervenpuls ausgelöst wird [18]. Mit gängigen lichtmikroskopischen Verfahren einschließlich Entfaltungsalgorithmen beobachtet man eine lokale Anhäufung des Proteins an speziellen Orten in der Synapse (Abbildung 5). Erst die SIM Aufnahme zeigt, dass die Proteine nicht homogen verteilt sind, sondern spezifische Strukturen ausbilden, die auch mit der STED Mikroskopie gezeigt wurden [19]. Solche Anordnungen geben den Forschern weitere Aufschlussmöglichkeiten bezüglich der Funktion.

Unser zweites Beispiel behandelt die Organisation des Zytoskeletts der Zelle. Dieses besteht zum größten Teil aus Actin und Tubulin, erhält die Zellform aufrecht und ist für die Fortbewegung unentbehrlich [20]. Speziell interessant ist das Zusammenspiel der Actin-Filamente mit den Mikrotubuli bei der Ausbildung von Wachstumskegeln und Dendriten neuronaler Zellen [21]. Mit bisherigen lichtmikroskopischen Verfahren war eine Trennung beider Strukturen in den feinen Dendriten kaum möglich. Über die strukturierte Beleuchtung können jedoch die Actin-Filamente klar von den Mikrutu-

buli getrennt wahrgenommen und so Aussagen über deren Wechselwirkung getroffen werden (Abbildung 6).

Und über den Faktor 2 hinaus

Genau wie in der STED und PAL Mikroskopie können auch bei SIM nichtlineare Effekte in der Probe zu einer Erhöhung der Auflösungssteigerung herangezogen werden. Nichtlineare Effekte können z.B. die Sättigung der Probe sein, aber auch, da schonender, die Verwendung von schaltbaren Fluorophoren. Weicht die strukturierte Emissionsverteilung nämlich von der Beleuchtungsmodulation ab, werden weitere und höhere Strukturierungsfrequenzen in der Probe selbst erzeugt. Diese stellen höhere harmonische Schwingungen zur Modulationsfrequenz, also $\pm 3/2 f_m, \pm 2 f_m, \dots$ dar und das Ortsfrequenzspektrum wird um die entsprechenden Beiträge verschoben. Die Rekonstruktion verläuft analog zur linearen Strukturierung, wobei zu beachten ist, dass pro Strukturierungsrichtung so viele Phasen verschobene Modulationsbilder aufgenommen werden müssen, wie Verschiebungsfrequenzen im Bild vorhanden sind. Um Artefakten vorzubeugen, geht man aber meist sogar über die minimal geforderte Anzahl an Bildern hinaus. Da sich die Frequenzbänder weiter nach außen verschieben, muss auch in mehr Raumrichtungen strukturiert werden, um eine isotrope Auflösung über das ganze Ortsfrequenzspektrum zu erhalten. So kann es leicht sein, dass 100 und mehr Bilder aufgenommen werden müssen. Der nichtlineare Effekt wurde zuerst von Heintzmann *et al.* beschrieben und eindrucksvoll von Gustaffson mit einer erzielten Auflösung von 50 nm demonstriert [22, 23].

Ausblick

Hochauflösungstechniken haben ohne Zweifel ein großes Potential, biologische Vorgänge besser verstehen zu lernen. Ein zentrales Thema wird dabei die Entwicklung geeigneter Farbstoffe einnehmen, die entweder hohen Laserleistungen standhalten oder besonders gut schaltbar sind. Aber auch dann wird sich Hochauflösung in der Weitfeldmikroskopie nicht atomaren Grenzen nähern können. Deshalb gibt es schon jetzt Anstrengungen in der korrelativen Mikroskopie, Hochauflösungsbilder mit elektronenmikroskopischen Aufnahmen zu überlagern, um so die Position eines Proteins in einer noch höher aufgelösten Zellstruktur zu bestimmen [24]. Auf diesem Gebiet werden vor allem hohe Anstrengungen nötig sein, Fixierungsverfahren zu entwickeln, die beiden Technologien gerecht werden.

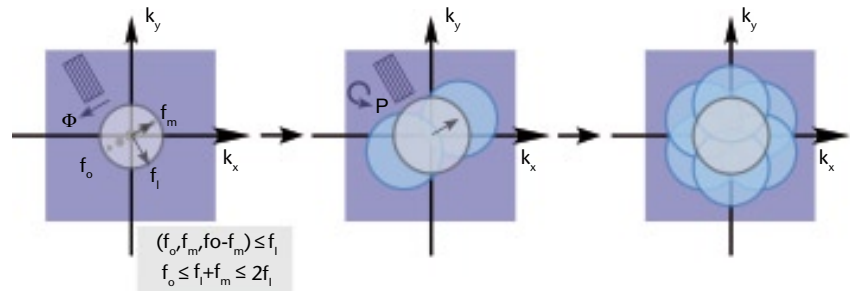
Der große Vorteil der Hochauflösungstechniken in der Weitfeldmikroskopie liegt aber zweifelsfrei an ihrem hohen Kontrast und ihrem möglichen Einsatz bei Lebendzellen. Schon jetzt ist es Routine, zwei oder mehr unterschiedlich gefärbte Proteine in ihrem Zusammenspiel simultan zu untersuchen. Um dies auch hochauflösend zu tun, bedarf es jedoch noch weiterer technischer Verbesserungen, die es erlauben, schneller Daten aufzunehmen. Dann wird es auch gelingen, einzigartige Struktur- und Funktionseinblicke zu gewinnen und dem Objekt ganz nah zu sein, auch wenn das Feld noch so weit erscheint.

Referenzen

[1] Abbe E. „Beiträge zur Theorie des Mikroskops und der mikroskopischen Wahrnehmung.“ Archiv Mikroskop. Anat.. 9: 413–468, 1873.
 [2] Dunn RC. „Near-field scanning optical microscopy.“ Chem. Rev. 99(10): 2891–2928, 1999.
 [3] Stirling JW. „Immuno- and affinity probes for electron microscopy: a review of labeling and preparation techniques“. J. Histochem. Cytochem. 38(2):145–157, 1990
 [4] Hell SW. „Far-field optical nanoscopy. Science 316(5828):1153–1158, 2007.
 [5] Wildanger D, Rittweger E, Kastrop L, Hell SW. „STED microscopy with a supercontinuum laser source.“ Opt. Express 16(13):9614–9621, 2008.
 [6] Betzig E, Patterson GH, Sougrat R, Lindwasser OW, Olenych S, Bonifacino JS, et al. „Imaging intracellular fluorescent proteins at nanometer resolution.“ Science 313(5793):1642–1645, 2006.
 [7] Bewersdorf J, Schmidt R, Hell SW. „Comparison of ISM and 4Pi-microscopy. J. Microsc. 222(Pt 2):105–117, 2006.
 [8] Heintzmann R, Cremer C. „Lateral modulated excitation microscopy: Improvement of resolution by using a diffraction grating.“ Proc. SPIE 2568:185–196, 1999.
 [9] Gustafsson MG. „Surpassing the lateral resolution limit by a factor of two using structured illumination microscopy.“ J. Microsc. 198(Pt 2):82–87, 2000.
 [10] Lukosz M, Marchand M. „Optischen Abbildung Unter Überschreitung der Beugungsbedingten Auflösungsgrenze. Opt. Acta 10(3):241–255, 1963.
 [11] Neil MA, Juskaitis R, Wilson T. „Method of obtaining optical sectioning by using structured light in a conventional microscope.“ Opt. Lett. 22(24):1905–1907, 1997.
 [12] Langhorst MF, Schaffer J, Goetze B. „Structure brings clarity: structured illumination microscopy in cell biology.“ Biotechnol. J. 4(6):858–865, 2009.
 [13] Ridley AJ, Schwartz MA, Burridge K, Firtel RA, Ginsberg MH, Borisy G, et al. „Cell migration:

INFO 3

Auflösungssteigerung bei SIM betrachtet im Frequenzraum



Den Frequenzraum erhält man durch Fourier Transformation des Ortsraumes. Vom Objektfrequenzspektrum können nur solche Frequenzen f_o übertragen werden, die kleiner als die Grenzfrequenz, bestimmt durch die OTF des Systems, sind. Bei der strukturierten Beleuchtung muss auch die Gitterfrequenz f_m kleiner als die Grenzfrequenz f_i sein, um übertragen werden zu können. Hieraus folgt, dass bei Verwendung eines Modulationsgitters die Ortsfrequenzen f_o kleiner als zweimal die Grenzfrequenz f_i sein müssen, was die Auflösungssteigerung auf maximal das Zweifache beschränkt. Je näher die Gitterfrequenz der Grenzfrequenz kommt, desto näher kommt die Auflösungssteigerung an den Idealwert 2 heran. Die am Gitter erzeugten Beugungsordnungen erzeugen durch Interferenz mit den Probenstrukturen höhere Ordnungen im Frequenzraum bei 0 (0. Ordnung), $\pm f_m/2$ (1. Ordnung) und $\pm f_m$ (2. Ordnung). Die Frequenzen

dieser Ordnungen sind allerdings gemischt, da sich ihre Frequenzspektren überlappen. Um die Ordnungen zu trennen, bedarf es der Berechnung der korrekten Phasen. Bei fünf unbekanntenen Phasen der fünf Ordnungen muss man daher fünf Gleichungen, die durch die Aufnahme von fünf Bildern mit verschobenem Gitter gewonnen werden, lösen (linkes Diagramm). Sind die Ordnungen getrennt, d.h. ist ihr Frequenzspektrum bekannt, wird durch Entfaltung der Einfluss der OTF auf das Frequenzspektrum eliminiert. Dann werden die den Ordnungen „angehefteten“ Bildfrequenzen an ihren richtigen Platz geschoben (mittleres Diagramm). Da die Auflösungssteigerung nur in der Richtung der Strukturierung erfolgt, muss über Rotation des Gitters der ganze Frequenzraum erfasst werden (rechtes Diagramm). Durch Rücktransformation der Bildfrequenzen ergibt sich schließlich das hochauflösende Bild im Ortsraum.

integrating signals from front to back.“ Science 302(5651):1704–1709, 2003.
 [14] Michalet X, Kapanidis AN, Laurence T, Pinaud F, Doose S, Pflughoeft M, et al. „The power and prospects of fluorescence microscopies and spectroscopies.“ Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct. 32:161–182, 2003
 [15] Esposito A, Schlachter S, Schierle GS, Elder AD, Diaspro A, Wouters FS, et al. „Quantitative fluorescence microscopy techniques.“ Methods Mol. Biol.;586:117–142, 2009.
 [16] Davidson MW, Campbell RE. „Engineered fluorescent proteins: innovations and applications.“ Nat. Methods 6(10):713–717, 2009
 [17] Heintzmann R, Ficz G. „Breaking the resolution limit in light microscopy.“ Brief Funct. Genomic Proteomic 5(4):289–301, 2006.
 [18] Kittel RJ, Hallermann S, Thomsen S, Wichmann C, Sigrist SJ, Heckmann M. „Active zone assembly and synaptic release.“ Biochem. Soc. Trans. 34(Pt 5):939–941, 2006.
 [19] Kittel RJ, Wichmann C, Rasse TM, Fouquet W, Schmidt M, Schmid A, et al. „Bruchpilot promotes active zone assembly, Ca²⁺ channel clustering, and vesicle release.“ Science 312(5776):1051–1054, 2006.
 [20] Pollard TD, Cooper JA. „Actin, a central player in cell shape and movement. Science 326(5957): 1208–1212, 2009.
 [21] Georges PC, Hadzichalichis NM, Sweet ES, Firestein BL. „The yin-yang of dendrite morphology: unity of actin and microtubules.“ Mol. Neurobiol. 38(3):270–284, 2008.
 [22] Heintzmann R, Jovin TM, Cremer C. „Saturated patterned excitation microscopy—a concept for optical resolution improvement.“ J. Opt. Soc. Am. A Opt. Image Sci. Vis. 2002; 19(8):1599–1609.
 [23] Gustafsson MG. „Nonlinear structured-illumination microscopy: wide-field fluorescence imaging with theoretically unlimited resolution.“ Proc. Natl. Acad. Sci U.S.A. 102(37):13081–13086, 2005.
 [24] Mironov AA, Beznoussenko GV. „Correlative microscopy: a potent tool for the study of rare or unique cellular and tissue events.“ J. Microsc. 235(3):308–321, 2009.