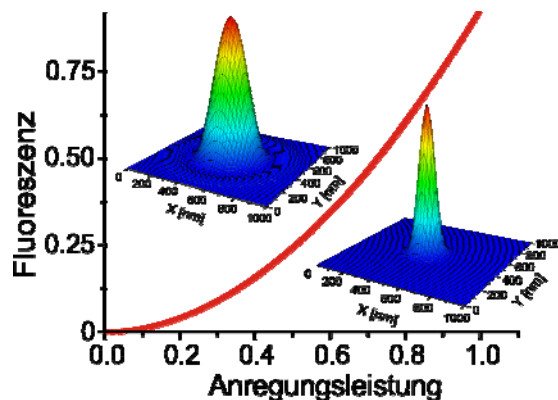


## Fluoreszenzmikroskopie goes High Definition:

### Neue Farbstoffsonden erhöhen selbstständig die Auflösung<sup>1</sup>

Innerhalb des letzten Jahrzehnts wurden verschiedene Ansätze und Verfahren entwickelt, um die Fluoreszenzmikroskopie von den Fesseln des beugungslimitierten Auflösungsvermögens zu befreien.

Ein sehr erfolgreicher Ansatz beruht darauf, die Fluoreszenz der Farbstoffe räumlich einzuschränken, um die Farbstoffe bis auf wenige Nanometer genau zu lokalisieren. Dies wird erreicht indem die Fluoreszenz der zu untersuchende Probe nicht parallel sondern sequentiell mit Hilfe eines konfokalen Rastermikroskops aufgenommen wird. In der bekanntesten Ausführung dieses Ansatzes, der „stimulated emission depletion (STED) microscopy“ wird dem Anregungsfokus des konfokalen Mikroskops zusätzlich ein weiterer Lichtstrahl überlagert, der die Aufgabe hat, die Fluoreszenz aus den äußeren Bereichen des Anregungsfokus zu unterdrücken. Der Nachteil der verschiedenen Methoden zur Auflösungserhöhung liegt in der Tatsache, dass entweder ausgeklügelte physikalische Modifikationen der Anregung (wie es z.B. bei STED) und/oder computergestützte Nachbearbeitungen notwendig sind.



*Fluoreszenzsonden erhöhen durch eine superlineare Fluoreszenzabhängigkeit von der Anregungsenergie selbstständig die Auflösung.*

Der Forschergruppe um Professor Philip Tinnefeld an der Ludwig-Maximilians-Universität (LMU) ist es gelungen, fluoreszente Sonden zu entwickeln, die weder eine ausgeklügelte Anregung noch eine Nachbearbeitung nötig machen. Einsatz dieser Sonden in einem konfokalen Mikroskop erhöht quasi automatisch die Auflösung. Dazu nutzen die Forscher das photophysikalische Verständnis, um eine fluoreszente Sonde zu entwickeln, bei der die Fluoreszenz nicht – wie sonst bei geringen Anregungsintensitäten üblich – linear mit der Anregungsintensität ansteigt, sondern stärker als linear ansteigt (superlinear). Diese Superlinearität

der fluoreszenten Sonden erzeugt in jedem normalen konfokalen Rastermikroskop eine Auflösung unterhalb des Beugungslimits. Dies liegt darin, dass die Fluoreszenz der Sonden im äußeren Bereich des Anregungsfokus nur schwach leuchten und erst im Zentrum des Fokus stark leuchten.

In diesem Zusammenhang wurde der komplette Entwicklungsprozess dieser Sonden aufgezeigt. Zunächst wurde das Prinzip, um Sonden mit einem superlinearem Fluoreszenzanstieg zu designen, erarbeitet. Die Sonden bestehen aus einem zentralen Donorfarbstoff, der von ein bis mehreren Akzeptoren umgeben ist. Diese Akzeptoren löschen die Fluoreszenz des Donors bei schwacher Anregungsintensität über Energietransfer, zeigen aber aufgrund der Population metastabiler Auszustände rasch eine Sättigung bei höheren Anregungsleistungen. Daher können sie bei höheren Anregungsleistungen nicht mehr als Akzeptor fungieren, so dass der Donorfarbstoff selbst leuchtet. Die Durchführbarkeit der Auflösungserhöhung wurde anhand der Verschmälerung der Punktabbildungsfunktion einzelner Sonden mit bis zu zwei Akzeptoren demonstriert. Ein theoretisches Modell zur Beschreibung des Fluoreszenzverhaltens dieser sogenannten „energy transfer blockade probes“ (ETBPs) zeigt die kritischen Parameter wie die Anzahl der Akzeptoren sowie die Energietransfereffizienz auf. Somit stellt diese Arbeit einen Grundstein für die Entwicklung neuer fluoreszenter Sonden dar, die selbstständig die Auflösung konfokaler Mikroskopie erhöhen.