INAUGURAL-DISSERTATION

zur
Erlangung der Doktorwürde
der
Naturwissenschaftlich-Mathematischen
Gesamtfakultät
der
Ruprecht-Karls-Universität
Heidelberg

vorgelegt von
Dipl.-Phys. Hans Mathée
aus Aschaffenburg

Tag der mündlichen Prüfung: 8. November 2006

Hochpräzisionsmikroskopie mit räumlich strukturierter Beleuchtung und Zweiphotonenanregung

Gutachter: **Prof. Dr. Dr. Christoph Cremer**
Prof. Dr. Josef Bille

Hochpräzisionsmikroskopie mit räumlich strukturierter Beleuchtung und Zweiphotonenanregung

Innovative Methoden der Fluoreszenzmikroskopie liefern die Instrumente für die Analyse der Struktur und Dynamik des menschlichen Genoms auf supramolekularer Ebene. Während dieser Dissertation wurden verschiedene, sich ergänzende Verfahren zur hochpräzisen Größen- und Distanzmessung weiter entwickelt und auf ihre Anwendbarkeit in der Erforschung der Genomnanostruktur untersucht.

Die SMI-Mikroskopie macht durch eine räumlich modulierte Beleuchtung Information über Strukturen zugänglich, die wesentlich kleiner als die optische Auflösung sind. Es wird gezeigt, dass ein SMI-Mikroskop auch mit nur einem Objektiv und einem Spiegel realisiert werden kann. Mit diesem Aufbau können an fluoreszierenden Objekten hochpräzise Größenmessungen bis zu einer kleinsten Ausdehnung von 40nm und Distanzmessungen mit einer Präzision von 4nm durchgeführt werden. Als biologische Anwendung wurden erste Schritte zur Analyse der hypoxieinduzierten Regulation des Erythropoetin-Gens unternommen. Zudem wurden die Kalibrationsalorithmen der spektralen Präzisionsdistanzmikroskopie durch die Berücksichtigung lateraler chromatischer Verschiebungen verbessert. Des Weiteren wurde ein Zweiphotonenmikroskop mit schneller Strahlrasterung entwickelt und aufgebaut. Dabei wird ein Weitfeld-Detektor eingesetzt, sodass große Gesichtsfelder bei gleichzeitiger hoher optischer Auflösung aufgenommen werden können. Dieser Aufbau erschließt zusätzlich die spektrale Signatur der Fluoreszenzlebensdauer.

High precision microscopy with spatially modulated illumination and two-photon excitation

Innovative methods of fluorescence microscopy provide the tools for the analysis of the structure and dynamics of the human genome on the supramolecular level. In this thesis various complementary approaches to measure sizes and positions very accurately were improved and their applicability to biological studies was addressed.

SMI microscopy uses a spatially modulated illumination to access information about structures well below the resolution limit. It is shown that SMI microscopy can also be implemented with only one objective lens and a mirror. With this setup high precision size measurements of fluorescent objects down to a smallest extension of 40nm and distance measurements with a precision of 4nm are feasible. In a biological application first steps towards an analysis of the hypoxia induced regulation of the erythropoietin gene expression were taken. Furthermore, the calibration algorithms of spectral precision distance microscopy were enhanced by considering lateral chromatic shifts. Additionally, a two-photon microscope with very fast beam scanning was developed and assembled. A widefield detection scheme is used to simultaneously record a large field-of-view at very high resolution. This setup gives also access to the spectral signature of the fluorescence lifetime.

Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung **1**

2 Theoretische Grundlagen **5**
2.1 Maxwell-Gleichungen . . . 5
2.2 Punktbildfunktion . . . 6
2.3 Optische Transferfunktion . . . 9

3 Fluoreszenzmikroskopie **11**
3.1 Fluoreszenz . . . 11
3.2 Konfokale Mikroskopie . . . 13
3.3 Zweiphotonenmikroskopie . . . 14
3.3.1 Konfokale Scansysteme . . . 16
3.4 SMI-Mikroskopie . . . 16
3.5 Neuere Methoden . . . 19
3.6 Spektrale Präzisonsdistanzmikroskopie . . . 20

4 Experimenteller Aufbau **23**
4.1 SMI-Mikroskopie . . . 23
4.1.1 Aufbau . . . 23
4.1.2 Justage . . . 27
4.2 Zweiphotonenmikroskopie . . . 29
4.2.1 Aufbau . . . 29
4.2.2 Galvanometeransteuerung . . . 31

5 Analyse der SMI-Mikroskopiedaten **35**
5.1 Theorie . . . 35
5.2 Praxis . . . 36

6 Messungen und Ergebnisse **41**
6.1 SMI-Mikroskopie . . . 41
6.1.1 Durchführung der Messungen . . . 41
6.1.2 Charakterisierung des SMI-Spiegel-Aufbaus . . . 43
6.1.3 Potenzial für Hochdurchsatzmikroskopie . . . 56
6.1.4 Biologische Anwendung . . . 57
6.2 Spektrale Präzisionsdistanzmikroskopie . . . 62
6.2.1 Durchführung der Messungen . . . 62
6.2.2 Bestimmung der chromatischen Verschiebung . . . 63
6.2.3 Chromatische Verschiebung in Zellen . . . 66
6.3 Zweiphotonenmikroskopie . . . 69
6.3.1 Durchführung der Messungen . . . 69

6.3.2 Charakterisierung des Aufbaus 70
6.3.3 Vergleich der Abbildungseigenschafen 72
6.3.4 Anregung verschiedener Fluoreszenzfarbstoffe 77
6.3.5 Fluoreszenzlebensdauern 81

7 Diskussion und Ausblick 83

8 Zusammenfassung 89

A Galvanometeransteuerung 93
A.1 Galvanometerscanner 93
A.2 Mikrocontroller 94
A.2.1 Direkte digitale Synthese 94
A.2.2 Realisierung 95
A.2.3 Elektronischer Aufbau 97
A.2.4 Assemblerquellcode 100

Literaturverzeichnis 103

1 Einleitung

Seit den Arbeiten von Abbe [3, 4] gegen Ende des 19. Jahrhunderts ist bekannt, dass die optische Auflösung in Mikroskopen durch die Welleneigenschaft des Lichts auf etwa die Hälfte der verwendeten Wellenlänge begrenzt wird. Bei der Bestrebung die Auflösung weiter zu erhöhen, ging man deshalb dazu über immer kürzere Wellenlängen zu verwenden. Dies führte weg von der Mikroskopie mit sichtbarem Licht hin zur Röntgen- und Elektronenmikroskopie mit Auflösungen von etwa zehn beziehungsweise einem Nanometer [77]. Die optische Auflösung wird mit diesen Techniken zwar verbessert, aber dadurch, dass in der Elektronenmikroskopie nur dünne Schnitte untersucht werden können und in der Röntgenmikroskopie letale Dosen ionisierender Strahlung verwendet werden, sind diese Verfahren im Normalfall nicht für die Untersuchung lebender Zellen geeignet. Andere Methoden wie die Rasterkraft- und Rastertunnelmikroskopie sind auf die Untersuchung von Oberflächen beschränkt und deshalb nicht fähig, neue Einblicke vom Inneren lebender Zellen zu geben.

In der Fernfeld-Lichtmikroskopie treten diese Probleme nicht auf. Die biologischen Proben können in ihrer natürlichen Umgebung, insbesondere in lebenden Zellen, untersucht werden. Erst damit wird ein umfassender Einblick in biologische Zusammenhänge ermöglicht. Die optische Mikroskopie zählt aus diesen Gründen, trotz der limitierten Auflösung, auch heute noch zu den wichtigsten Instrumenten in der Biologie und Medizin. Vor allem der Fluoreszenzmikroskopie kommt in diesen Anwendungsbereichen eine große Bedeutung zu. Der Fluoreszenzfarbstoff ist dabei natürlich in der Zelle vorhanden oder wird gezielt eingebracht. Durch die Möglichkeit die interessierenden Strukturen des Objekts hoch spezifisch zu markieren, wird der Kontrast der Abbildung erhöht, da nicht markierte Strukturen nicht zur Fluoreszenz angeregt werden und somit auch nicht zum Bild beitragen. So konnte der Informationsgehalt der mikroskopischen Aufnahmen auch ohne Auflösungsverbesserung deutlich erhöht werden.

Der Nachteil der klassischen Fluoreszenzmikroskopie ist, dass die Abbildung nicht dreidimensional ist. Dies führt zu einer Kontrastminderung in der Fokusebene durch unscharf abgebildete fluoreszierende Bereiche des Präparats, die außerhalb des Fokus liegen. Da die gesamte Probe zur Fluoreszenz angeregt wird, liefern in stark fluoreszierenden Proben nur dünne Objekte kontrastreiche Bilder. Der entscheidende Durchbruch für die biologische Forschung gelang mit der Erfindung der konfokalen Laser-Raster-Mikroskopie (engl. *Confocal Laser Scanning Microscopy*, CLSM). Durch fokussierte Beleuchtung und die Unterdrückung von Fluoreszenzlicht mit einem Ursprung außerhalb der Fokusebene wurde die Dreidimensionalität der Abbildung erreicht. Somit wurde erstmals die Untersuchung dreidimensionaler Strukturen in ausgedehnten Proben möglich.

Mit den Weiterentwicklungen der Mikroskope ging die Entwicklung neuer Markierungstechniken einher. Mittels Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH) werden bereits seit längerem Nuclein-Säuren spezifisch mit Fluoreszenzfarbstoffen markiert [83]. Seit der Ent-

deckung fluoreszierender Proteine muss der Farbstoff nicht mehr von außen in die Zelle eingebracht werden. Vielmehr wird die Zelle durch gentechnische Veränderungen dazu gebracht, das fluoreszierende Protein selbst zu produzieren [66]. Dies ist vor allem für in-vivo Anwendungen vorteilhaft. Inzwischen stehen eine Vielzahl von fluoreszierenden Proteinen zur Verfügung, welche das gesamte Spektrum des sichtbaren Lichts abdecken [80]. Auch die Verwendung von Quantenpunkten zur spezifischen Markierung biologischer Präparate lässt in nächster Zeit weitere große Fortschritte bei der Markierung erwarten [14, 69].

Die maximal erreichbare Auflösung mit konfokalen Mikroskopen beträgt unter optimalen Bedingungen etwa 200nm in der Bildebene und etwa 550nm in Richtung der optischen Achse [73]. Für viele moderne Probleme der Biologie ist dies nicht ausreichend. Denn obwohl die Sequenz des menschlichen Genoms entschlüsselt wurde, sind viele Fragestellungen der Epigenetik nicht alleine mit der Kenntnis der Basenpaarsequenz der DNA zu beantworten. Vielmehr scheint die dreidimensionale Topologie des Genoms auf supramolekularer Ebene für die Funktion eine entscheidende Rolle zu spielen [64, 20, 82]. So werden genetisch aktive Regionen des Genoms allgemein als dekondensiert im Vergleich zu ihrem inaktiven Zustand betrachtet. Das heißt, dass sie ein größeres Volumen im Zellkern annehmen [59]. Die Zugänglichkeit dieser Chromatindomänen für makromolekulare Komplexe, die beispielsweise eine Rolle bei der Transkription, Replikation und Aktivierung spielen, könnte durch spezifische Faltungszustände des Chromatins reguliert werden.

Es gibt deshalb ein sehr großes Interesse, neue lichtoptische Mikroskopiemethoden zu entwickeln, mit denen Strukturen im Innern der Zelle weit unterhalb der Auflösungsgrenze analysiert werden können. In der vorliegenden Arbeit wurden dazu verschiedene Ansätze verfolgt und bestehende Techniken weiter entwickelt.

Die optische Auflösung selbst muss nicht unbedingt verbessert werden falls Informationen über die Topologie des Genoms gewonnen werden sollen. Oft ist es ausreichend die Position beziehungsweise die Distanz der markierten Objekte untereinander und deren Größe zu kennen. Bei der vor einigen Jahren entwickelten spektralen Präzisionsdistanzmikroskopie (SPDM) werden Objekte, die im Vergleich zur optischen Auflösung sehr klein sind, mit unterschiedlichen spektralen Signaturen markiert und spektral getrennt aufgenommen [19, 28, 44]. Mit Methoden der digitalen Bildverarbeitung werden die Objektpositionen aus den aufgenommenen Intensitätsverteilungen mit sehr hoher Genauigkeit berechnet. Dazu ist eine präzise Kalibration der bei der optischen Abbildung auftretenden Abberationen nötig. Diese Korrekturverfahren wurden in dieser Arbeit weiter entwickelt und verbessert.

Die neuartige Methode der Mikroskopie mit räumlich modulierter Beleuchtung (engl. *Spatially Modulated Illumination Microscopy*, SMI-Mikroskopie) ermöglicht sehr präzise Größen- und Distanzmessungen weit unterhalb der optischen Auflösungsgrenze [75, 29, 30, 6]. Information über Objektstrukturen, die in konventionellen Mikroskopen nicht aufgelöst werden, macht eine interferometrisch erzeugte, strukturierte Beleuchtung durch zwei Objektive zugänglich. Die SMI-Mikroskopie ergänzt und verbessert durch eine größere Lokalisationsgenauigkeit und Größenauflösung die mittels SPDM gewonnene topologische Information. Bereits eine Reihe von Untersuchungen zeigten die erfolgreiche Anwendung der SMI-Mikroskopie für biologische Fragestellungen [67, 54, 68].Während dieser Arbeit wurde für den zukünftigen, routinemäßigen Einsatz in biologischen Studien ein vereinfachtes SMI-Mikroskop mit nur einem Objektiv aufgebaut, dessen Leistungsfähigkeit mit dem konventionellen Aufbau verglichen und an dem erste Größenmessungen zur Analyse der

hypoxieinduzierten Genexpression durchgeführt wurden.

Diese Verfahren werden durch die Zweiphotonenmikroskopie ergänzt. Dabei wird der nichtlineare Effekt der Fluoreszenzanregung über die Absorption zweier Photonen ausgenutzt. Da für eine effektive Anregung hohe Intensitäten nötig sind, erfolgt die Anregung fokussiert und unter Verwendung gepulster Laser mit hohen Spitzenintensitäten. Dadurch wird die Messung der Fluoreszenzlebensdauer erschlossen, die eine zusätzliche Diskriminierung unterschiedlicher zellulärer Bestandteile ermöglicht. Wegen der fokussierten Anregung muss der Strahl zur Bildaufnahme über das Präparat gerastert werden, was ein limitierender Faktor bezüglich angestrebter schneller Aufnahmegeschwindigkeiten für Mikroskopie in lebenden Zellen ist. Um dennoch kurze Aufnahmezeiten realisieren zu können, wurde im Rahmen dieser Arbeit ein Zweiphotonenmikroskop mit sehr schneller Strahlrasterung und einem Weitfeld-Detektor entwickelt und aufgebaut.

Die vorliegende Dissertation gliedert sich wie folgt: In Kapitel 2 werden die theoretischen Grundlagen für die Abbildung mit einer Linse erläutert, die auch für die in Mikroskopen verwendeten Linsensysteme Bestand haben. Dabei werden von der linearen Systemtheorie ausgehend die für die Mikroskopie wichtigen Begriffe der Punktbildfunktion und optischen Transferfunktion behandelt. Kapitel 3 geht auf die Fluoreszenz mittels Ein- und Zweiphotonenanregung ein und schildert die verwendeten Mikroskopiemethoden der SMI-, Zweiphotonenmikroskopie und SPDM vom theoretischen Standpunkt aus. Zudem werden weitere moderne Verfahren der Fluoreszenzmikroskopie vorgestellt. Im folgenden Kapitel 4 wird der experimentelle Aufbau der neu aufgebauten Mikroskope im Detail beschrieben und auf Besonderheiten bei der jeweiligen Methode eingegangen. Außerdem wird die entwickelte Ansteuerung der Galvanometerscanner zur schnellen Strahlrasterung im Zweiphotonenmikroskop behandelt. Die Analyse der SMI-Mikroskopiedaten erfolgt mit speziellen Auswertealgorithmen. In Kapitel 5 werden deshalb die verwendeten Fitalgorithmen zur Extraktion der Position und Größe der untersuchten Objekte in der Theorie und Praxis erläutert. Die Messungen, die während dieser Arbeit durchgeführt wurden, und die erzielten Ergebnisse sind in Kapitel 6 dargestellt. Dabei wird die Leistungsfähigkeit des aufgebauten SMI-Mikroskops mit einem Objektiv anhand von fluoreszierenden Nanokugeln analysiert. Schließlich wird der neue Aufbau in einer biologischen Studie zur Analyse der Regulation des Erythropoetin-Gen unter Sauerstoffmangel eingesetzt. Die verbesserten Korrekturalgorithmen der SPDM werden sowohl in Präparaten mit multispektralen Testobjekten, als auch in biologischen Proben untersucht. Ferner wird das Zweiphotonenmikroskop bezüglich der erreichbaren Auflösung charakterisiert und die Abbildungseigenschaften werden mit anderen Techniken verglichen. Im darauf folgenden Kapitel 7 werden die Ergebnisse der Arbeit diskutiert und ein Ausblick auf die zukünftige Weiterentwicklung der vorgestellten Techniken gegeben. Das abschließende Kapitel 8 fasst schließlich die Arbeit nochmals zusammen.

2 Theoretische Grundlagen

Im folgenden Kapitel werden die theoretischen Grundlagen der Abbildungseigenschaften eines Mikroskops erläutert. Die Betrachtungen werden vom wellenoptischen Standpunkt aus geführt. Die Gesetze der geometrischen Optik sind in dieser allgemeineren Darstellung enthalten und werden implizit als bekannt vorausgesetzt. Eine ausführliche Abhandlung der geometrischen Optik findet man in der Literatur [43]. Auf eine Herleitung der angegebenen Formeln wird aus Platzgründen verzichtet, da sie für das Verständnis nicht unbedingt nötig ist. Diese kann aber gegebenfalls in der zitierten Literatur nachgeschlagen werden.

2.1 Maxwell-Gleichungen

Die Ausbreitung elektromagnetischer Wellen in einem Mikroskop wird allgemein durch die Maxwell-Gleichungen und die Randbedingungen an den Glas-Luft-Übergängen der Linsenoberflächen beschrieben [57].

Für das elektrisches Feld $\boldsymbol{E}$, die dielektrische Verschiebung $\boldsymbol{D}$, das Magnetfeld $\boldsymbol{H}$ und die magnetische Induktion $\boldsymbol{B}$ gelten mit der makroskopischen, freien Ladungsdichte ρ und makroskopischen, freien Stromdichte $\boldsymbol{j}$ die folgenden Gleichungen:

$$\begin{aligned} \boldsymbol{\nabla D} &= \rho \quad , \quad \boldsymbol{\nabla} \times \boldsymbol{E} = -\frac{\partial \boldsymbol{B}}{\partial t} \\ \boldsymbol{\nabla B} &= 0 \quad , \quad \boldsymbol{\nabla} \times \boldsymbol{H} = \boldsymbol{j} + \frac{\partial \boldsymbol{D}}{\partial t} \quad . \end{aligned} \tag{2.1}$$

In einem isotropen, linearen Medium gilt weiterhin:

$$\boldsymbol{E} = \epsilon\epsilon_0 \boldsymbol{D} \ , \ \boldsymbol{H} = \frac{1}{\mu\mu_0}\boldsymbol{B} \ , \tag{2.2}$$

mit der Dielektrizitätskonstanten im Vakuum ϵ_0 und im Medium ϵ, der magnetischen Permeabilität des Vakuums μ_0 und des Mediums μ.

Die Maxwell-Gleichungen bilden ein gekoppeltes System linearer, partieller Differentialgleichungen erster Ordnung, die die Basis für die Beschreibung aller elektromagnetischer Phänomene bilden. Die Betrachtungen der Optik beziehen sich alle auf ungeladene, nicht leitende Medien, insbesondere Luft und Glas, sodass ρ und $\boldsymbol{j}$ gleich Null sind. Indem man die zweite Ableitung bildet, lassen sich damit die so genannten Wellengleichungen für $\boldsymbol{E}$ und $\boldsymbol{B}$ ableiten, mit denen die Eigenschaften elektromagnetischer Wellen beschrieben werden [57]:

$$\left(\triangle \boldsymbol{E} - \frac{1}{c^2}\frac{\partial^2 \boldsymbol{E}}{\partial t^2}\right)\phi(\boldsymbol{r},t) = 0 \ , \ \left(\triangle \boldsymbol{B} - \frac{1}{c^2}\frac{\partial^2 \boldsymbol{B}}{\partial t^2}\right)\phi(\boldsymbol{r},t) = 0 \ . \tag{2.3}$$

Dabei ist $c = c_0/n$ die Lichtgeschwindigkeit in Materie, c_0 die Lichtgeschwindigkeit im Vakuum und n der Brechungsindex. Ebene Wellen bilden ein Lösungssystem dieser Wellengleichungen. Für die Optik sind außerdem als weitere Lösungen die Kugelwellen und Gaußstrahlen bei paraxialer Näherung von Bedeutung [74]. Aus diesen Lösungen leitet man die Fresnel'schen Formeln ab, die die Gesetzmäßigkeiten für elektromagnetische Wellen an Grenzflächen beschreiben [57].

2.2 Punktbildfunktion

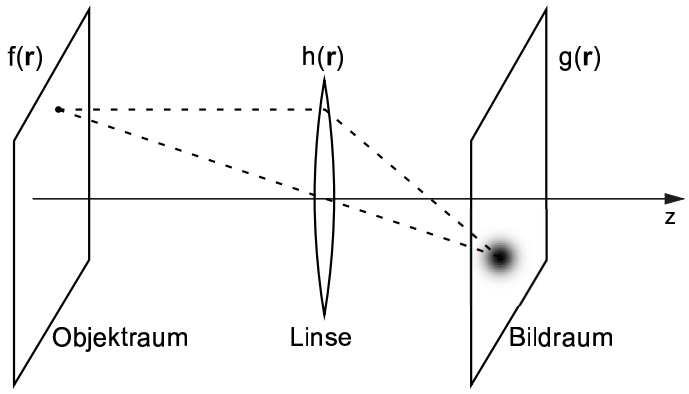


Abbildung 2.1: Abbildung mit einer Linse.

Die optische Abbildung vom Objektraum in den Bildraum wird durch die lineare Systemtheorie charakterisiert. Bei einem linearen, verschiebungsinvarianten System können die Abbildungseigenschaften des Systems mit der Antwort auf eine punktförmige Störung – der so genannten Impulsantwort oder Punktbildfunktion (engl. *Point Spread Function*, PSF) – beschrieben werden [58]. Die Linearität der optischen Abbildung folgt aus der Linearität der Maxwell-Gleichungen. Die Verschiebungsinvarianz bedeutet, das jeder Punkt des Objekts mit der gleichen PSF auf das Bild abgebildet wird. Bei realen, optischen Abbildungen ist dies strenggenommen nicht immer erfüllt, weil Abberationen in der Regel mit der Entfernung zur optischen Achse zunehmen, stellt aber eine sehr gute Näherung dar. Bei den folgenden Überlegungen werden der Einfachheit wegen nur skalare Felder betrachtet. Die Ergebnisse können aber leicht auf nicht-skalare Felder erweitert werden.

In Abbildung 2.1 ist schematisch dargestellt, wie ein Punkt des Objektraumes durch das optische System – hier eine Linse – auf eine Intensitätsverteilung in den Bildraum projiziert wird, die genau der PSF entspricht. Mit der Kenntnis der PSF kann die Abbildung eines beliebigen dreidimensionalen (3D) Bildes berechnet werden. Das 3D Objekt $f(\boldsymbol{r})$, das man sich aus einzelnen Punkten zusammengesetzt vorstellt, wird Punkt für Punkt vom Objektraum in den Bildraum übertragen. Dabei bezeichnet $\boldsymbol{r}$ die Ortskoordinate. Das Gesamtbild $g(\boldsymbol{r})$ erhält man dann aus der Integration der einzelnen Intensitätsverteilungen der Punkte, das heißt, durch eine Faltung des Objekts mit der Punktbildfunktion des Systems $h(\boldsymbol{r})$:

$$g(\boldsymbol{r}) = \int_{-\infty}^{+\infty} f(\boldsymbol{r}') \cdot h(\boldsymbol{r} - \boldsymbol{r}') d\boldsymbol{r}' = f(\boldsymbol{r}) \otimes h(\boldsymbol{r}) \quad . \tag{2.4}$$

Die PSF gibt an, wie stark ein Punkt bei der Abbildung durch das optische System „verwaschen“ wird, wobei die Breite der PSF als Maß für die Auflösung des optischen Systems dient.

Im Rahmen der skalaren Theorie der Abbildung durch eine Linse lässt sich die dreidimensionale Amplituden Punktbildfunktion (A-PSF) h_A berechnen [36]:

$$h_\mathrm{A}(r,z) = \exp(-ikz)\int_0^a P(\theta)J_0(kr\sin(\theta))\exp(-ikz\cos(\theta))\sin(\theta)d\theta \quad . \tag{2.5}$$

Dabei ist J_0 die Besselfunktion erster Art nullter Ordnung, θ der Aperturwinkel, a der maximale Aperturwinkel, $k = \frac{2\pi n}{\lambda}$ die Wellenzahl, $r = \sqrt{x^2+y^2}$ die radiale Koordinate und $P(\theta)$ die Apodisationsfunktion oder Pupillenfunktion der Linse. Falls $P(\theta)$ konstant ist, wird dies als Herschel Bedingung bezeichnet. Die so genannte Sinus-Bedingung gilt, wenn [10]:

$$P(\theta) = \sqrt{\cos(\theta)} \quad . \tag{2.6}$$

Die Sinus-Bedingung muss erfüllt sein damit die A-PSF 3D verschiebungsinvariant ist. Dies ist jedoch gewöhnlich für kommerzielle Mikroskopobjektive erfüllt [36]. Die A-PSF ist identisch mit der Hankel-Transformation, also der Fourier-Transformation in Polar-Koordinaten, der Pupillenfunktion. Die A-PSF beschreibt das elektrische Feld im Fokus der Linse. Da elektronische Detektoren Intensitäten $\boldsymbol{I}(\boldsymbol{r},t) \propto |E(\boldsymbol{r},t)|^2\frac{\boldsymbol{k}}{k}$ detektieren, ist man im Allgemeinen an der (Intensitäts)-Punktbildfunktion $h(\boldsymbol{r})$ interessiert:

$$h(\boldsymbol{r}) = |h_\mathrm{A}(\boldsymbol{r})|^2 \quad . \tag{2.7}$$

Bei der optischen Abbildung muss noch unterschieden werden, ob es sich um eine kohärente oder inkohärente Abbildung handelt. Im kohärenten Fall ist die Abbildung linear in der komplexen Amplitude, das heißt im elektrischen Feld. Im inkohärenten Fall ist die Abbildung linear in der Intensität. Die entsprechenden Impulsantworten h_A beziehungsweise h müssen dann jeweils zur Beschreibung verwendet werden. Bei der Fluoreszenzmikroskopie liegt der inkohärente Fall vor, da das Fluoreszenzlicht inkohärent ist (siehe 3.1). Im Folgenden wird deshalb implizit immer von einer inkohärenten Abbildung ausgegangen.

Die PSF besitzt eine zylindersymmetrische Intensitätsverteilung, deren Maximum an der Stelle des geometrischen Fokus liegt. In Abbildung 2.2 ist dies für die laterale und axiale Richtung dargestellt. Der Bereich der Fokusebene um das Hauptmaximum herum bis zum ersten Minimum wird auch als Airy-Scheibe bezeichnet. Das Rayleigh-Kriterium benutzt den halben Abstand der ersten Minima der Intensitätsverteilung als Maß für die Auflösung. Für Auflösung in lateraler Δx und axialer Richtung Δz gilt dann:

$$\begin{aligned} \Delta x &= 0,61\frac{\lambda}{NA} \quad , \\ \Delta z &= 2,0\frac{n\lambda}{NA^2} \quad , \end{aligned} \tag{2.8}$$

mit der numerischen Apertur $NA = n\sin(\alpha)$, dem Brechungsindex n und dem maximalen Aperturwinkel α.

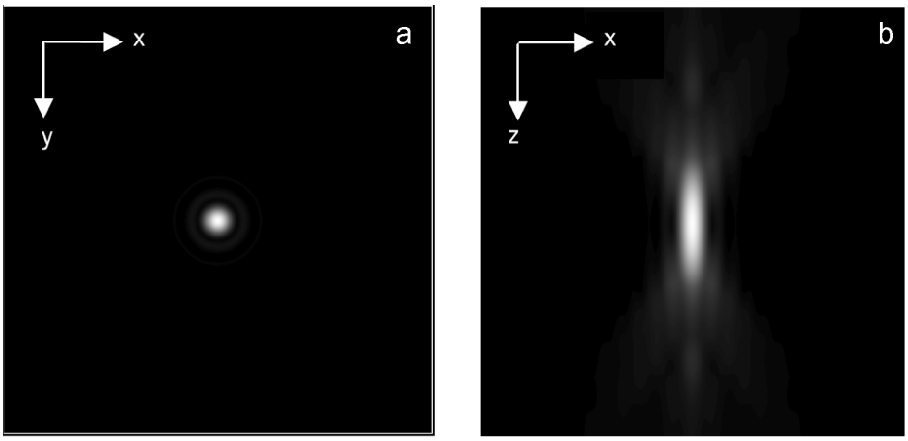


Abbildung 2.2: Intensitätsverteilung im Fokus eines Mikroskopobjektivs in lateraler (a) und axialer Richtung (b). Bildquelle [2].

Ein anderes Kriterium verwendet die Halbwertsbreite der PSF als Maß für die Auflösung:

$$\begin{aligned} \Delta x &= 0,51\frac{\lambda}{NA} \\ \Delta z &= 1,77\frac{n\lambda}{NA^2} \quad . \end{aligned} \tag{2.9}$$

Gleichungen 2.8 und 2.9 gelten eigentlich nur für $NA < 0,7$. Bei größeren numerischen Aperturen sind sie nur noch in guter Näherung gültig [2]. Diese Formeln entsprechen den mittels klassischer Mikroskopie erreichbaren Auflösungen.

In der Praxis spielen Abberationen durch Linsenfehler bei der optischen Abbildung eine Rolle. Sphärische Abberationen ergeben sich daraus, dass sphärisch geschliffene Linsen nur achsnahe Lichtstrahlen, die unter kleinen Winkeln auftreffen, in den Fokuspunkt fokussieren. Weiter von der optischen Achse entfernte Strahlen werden in einen Punkt zwischen Fokuspunkt und Linse fokussiert. Chromatische Abberationen werden durch die Abhängigkeit des Brechungsindex von der Wellenlänge des Lichts, der Dispersion, verursacht. Die Fokusebene liegt dadurch für Licht einer kürzeren Wellenlänge bei den üblicherweise verwendeten Linsenmaterialien näher an der Linse als bei langwelligerem Licht. Um diese Abberationen zu minimieren werden in Mikroskopobjektiven Linsensysteme verwendet, die aus mehreren Linsen unterschiedlichen Materials, und damit unterschiedlichen Brechungsindizes, aufgebaut sind. Trotzdem können diese mit der hier behandelten Theorie, bei der nur eine Linse betrachtet wurde, beschrieben werden.

In modernen Mikroskopen werden telezentrisch korrigierte, so genannte auf unendlich gerechnete, Objektive zur direkten Abbildung der Objekte in der Fokusebene verwendet. Die Eingangs- und Ausgangspupille liegt im Unendlichen. Zudem sind telezentrische Systeme verschiebungsinvariant und linear. Das Bild wird vom Objektiv nicht auf ein reelles Zwischenbild abgebildet, sondern erst mit der so genannten Tubuslinse in deren Fokusebene gebildet. Zwischen Objektiv und Tubuslinse verlaufen die Strahlen parallel zur optischen Achse. Dies hat den Vorteil, dass Strahlteiler, Polarisatoren und andere Komponenten, die in einem kollimierten Strahl einfacher zu verwenden sind, leichter in den optischen Pfad eingebracht werden können.

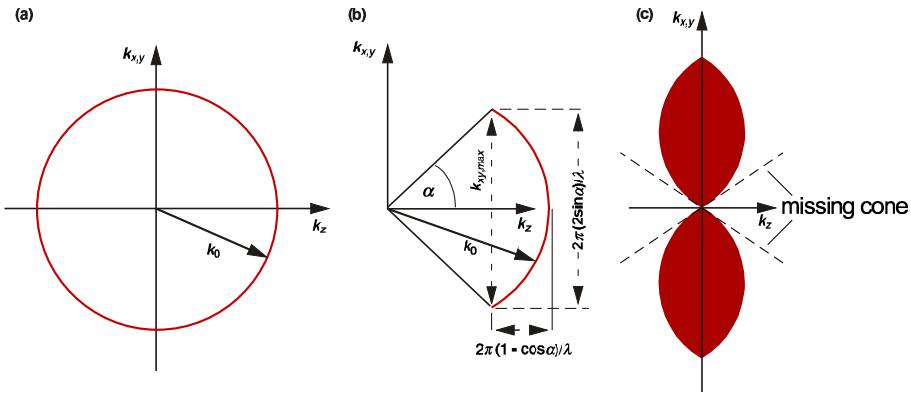


Abbildung 2.3: Herleitung der OTF für die Abbildung mit einer Linse.

2.3 Optische Transferfunktion

Eine weitere Beschreibung der Abbildungseigenschaften eines optischen Systems ist mit der optischen Transferfunktion (engl. *Optical Transfer Function*, OTF) möglich. Da die Faltung des Objektes $f(\boldsymbol{r})$ mit der PSF $h(\boldsymbol{r})$ im Ortsraum eine relativ komplexe Operation ist, geht man über in den Fourierraum. Nach dem Faltungstheorem entspricht die Faltung im Ortsraum einer Multiplikation komplexer Zahlen im Fourierraum. Man erhält also die Fouriertransformierte des Bildes $G(\boldsymbol{k})$ durch die Multiplikation der Fouriertransformierten des Objekts $F(\boldsymbol{k})$ mit der Fouriertransformierten der PSF. Diese ist identisch mit der OTF $H(\boldsymbol{k})$:

$$g(\boldsymbol{r}) = f(\boldsymbol{r}) \otimes h(\boldsymbol{r}) \quad \leftrightarrow \quad G(\boldsymbol{k}) = F(\boldsymbol{k}) \cdot H(\boldsymbol{k}) \ . \tag{2.10}$$

Dabei gilt für den Betrag des Wellenvektors beziehungsweise der Raumfrequenz $|\boldsymbol{k}| = 2\pi/\lambda$. Die OTF gibt an, wie Raumfrequenzen $\boldsymbol{k}$ des Objekts bei der optischen Abbildung übertragen werden. Bei den hier relevanten OTFs ist nur ein kleiner Bereich von $H(\boldsymbol{k}) \neq 0$. Objektstrukturen mit Raumfrequenzen außerhalb dieses Bereichs werden nicht übertragen und sind dadurch im Bild auch nicht vorhanden. Die Größe des Übertragungsbereichs der OTF ist also ein wichtiges Maß für die Auflösung eines optischen Abbildungssystems.

Für die Abbildung mit einer Linse lässt sich die OTF leicht herleiten. Betrachtet werden soll der Fall eines inkohärent emittierenden, punktförmigen Objekts, das quasi-monochromatisches Licht der Wellenlänge λ_0 isotrop im Raum aussendet. Die Fouriertransformierte des elektrischen Feldes $E(\boldsymbol{k})$ ist damit ungleich Null nur auf einer infinitesimal dünnen Kugelschale mit Radius $k_0 = 2\pi/\lambda_0$ (Abbildung 2.3(a)). Bei der Abbildung mit einer Linse können von dieser Kugelschale nur Raumfrequenzen übertragen werden, die innerhalb des doppelten Aperturwinkels α liegen, wie in Abbildung 2.3(b) dargestellt. Es ergeben sich für die maximale übertragene Raumfrequenz in lateraler und in axialer Richtung [40]:

$$k_{\mathrm{r,max}} = \frac{4\pi \sin(\alpha)}{\lambda} \ , \ k_{\mathrm{z,max}} = \frac{2\pi(1-\cos(\alpha))}{\lambda} \ . \tag{2.11}$$

Das bisher betrachtete elektrische Feld entspricht der Amplituden-Transferfunktion analog zur A-PSF. Die OTF erhält man im inkohärenten Fall nach Gleichung 2.7 und Anwendung des Faltungstheorems aus der Autokorrelation von $E(\boldsymbol{k})$:

$$H(\boldsymbol{k}) = E(\boldsymbol{k}) \otimes E^{\star}(-\boldsymbol{k}) \ . \tag{2.12}$$

Für die Abbildung mit einer Linse erhält man dann die in Abbildung 2.3(c) gezeigte OTF. In drei Dimensionen muss man sich die OTF um die k_{z}-Achse rotiert vorstellen. Bei großen k-Werten ist der Wert der OTF gering, sodass die Raumfrequenzen aus diesen Bereichen bei der Übertragung stark abgeschwächt werden. Vorhandenes Rauschen der Detektion kann das Signal bei diesen Raumfrequenzen überdecken und so den effektiven Übertragungsbereich weiter reduzieren. In k_{z}-Richtung ist die OTF in einem kegelförmigen Bereich gleich Null, dem so genannten *missing cone*. Dies führt dazu, dass lateral ausgedehnte Strukturen, die senkrecht zur z-Achse liegen, mit einer Linse nicht abgebildet werden können.

3 Fluoreszenzmikroskopie

Das folgende Kapitel behandelt die Grundlagen der Fluoreszenzmikroskopie. Neben den Mechanismen der Fluoreszenz werden die in dieser Arbeit verwendeten Methoden der konfokalen, Zweiphotonen- und SMI-Mikroskopie ausführlicher beschrieben. Im Anschluss folgt ein kurzer Überblick über weitere, neue Mikroskopietechniken, die alle auf sehr unterschiedliche Art eine Verbesserung der Auflösung erreichen. Im letzten Abschnitt wird schließlich das Prinzip der spektrale Präzisionsdistanzmikroskopie erläutert.

Wie in der Optik üblich werden im Folgenden die Richtung der optischen Achse als z-Richtung und entsprechend die dazu senkrechten lateralen Richtungen in der Bildebene mit x- und y-Richtung bezeichnet. Dabei wird die optische Achse des Mikroskops durch die Blickrichtung durch das Objektiv hindurch festgelegt.

3.1 Fluoreszenz

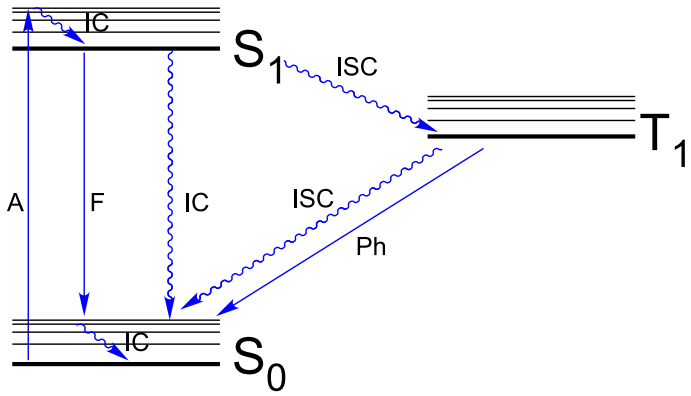


Abbildung 3.1: Schematisches Energiediagramm eines Farbstoffmoleküls. Gerade Pfeile kennzeichnen Strahlungsprozesse, Wellenlinien strahlungslose Übergänge. A Absorption, F Fluoreszenz, Ph Phosphoreszenz, IC innere Konversion, ISC *Inter System Crossing*, nach [53].

In Abbildung 3.1 ist das vereinfachte Energiediagramm eines organischen Farbstoffmoleküls, ein so genanntes Jablonski-Diagramm dargestellt. Der Grundzustand ist mit S_0 und der erste elektronisch angeregte Zustand mit S_1 bezeichnet. Zusätzlich ist noch der Triplett-Zustand T_1 eingezeichnet. Die elektronischen Zustände sind durch Schwingungsenergieniveaus weiter unterteilt. Die Anregung aus dem Grundzustand S_0 in den energetisch höher liegenden Zustand S_1 erfolgt durch Absorption eines Photons mit einer Energie $E = h\nu$, die dem Abstand der Niveaus entspricht. Die direkte Anregung in den Triplettzustand ist wegen der Auswahlregeln verboten. Grundsätzlich ist auch die Anre-

gung in höhere Energieniveaus möglich. Diese gehen jedoch in 10^{-14}s, strahlungslos in den S_1-Zustand über. Da die Zeitdauer von Absorption und Emission eines Photons klein gegenüber einer Umorientierung des Abstands der relativ schweren Atomkerne ist, kann gemäß dem Franck-Condon-Prinzip der Abstand der Atomkerne als konstant betrachtet werden. Deshalb erfolgt die Anregung von S_0 nach S_1 in einen höheren Schwingungsenergiezustand von S_1, da sich der Schwingungsgrundzustand von S_1 bei einem anderen Kernabstand befindet. Bei Zimmertemperatur gibt das Molekül durch Stöße mit anderen Molekülen oder Atomen die Energie ab und relaxiert innerhalb von wenigen Picosekunden in den Schwingungsenergiegrundzustand von S_1. Im Idealfall geht das Molekül von dort unter Aussendung eines Fluorezenzphotons in einen höheren Schwingungszustand von S_0 über mit einer Fluorezenzlebensdauer von einigen Nanosekunden. Die Energie des höheren Schwingungsenergieniveaus wird wiederum über Stöße innerhalb einer Picosekunde abgegeben, sodass das Molekül in den niedrigsten Schwingungsenergiezustand von S_0 übergeht.

Für die Praxis ist der Energieverlust durch Stöße in den S_1- und S_0-Schwingungsenergieniveaus von großer Bedeutung. Denn dadurch werden die Maxima von Absorptions- und Emissionsspektrum des Farbstoffs gegeneinander verschoben und lassen sich mit geeigneten Filtern spektral trennen. Die Größe dieser so genannten Stokes-Verschiebung beträgt etwa 20-50nm.

Die Energie des angeregten Zustands S_1 kann auch strahlungslos durch Stöße als Wärme abgegeben werde, sodass nur ein geringer Bruchteil η der angeregten Moleküle ein Fluoreszenzphoton emittiert. Der als Quantenausbeute bezeichnete Wert von η liegt bei sehr guten Farbstoffen bei $\eta \approx 0,8$, meist jedoch darunter [73].

Die Anregungswahrscheinlichkeit $p_{1\mathrm{P}}$ eines Moleküls für die Absorption eines Photons ist für Intensitäten kleiner als die Sättigungsintensität linear von der Intensität des Anregungslichts I abhängig:

$$p_{1\mathrm{P}} = \sigma_{1P} \frac{I}{h\nu} \quad . \tag{3.1}$$

Dabei ist h das Planck'sche Wirkungsquantum und ν die Frequenz des Photons. Der molekulare Wirkungsquerschnitt der Einphotonenapsorption $\sigma_{1\mathrm{P}}$ lässt sich mithilfe des Lambert-Beer'schen Gesetzes experimentell bestimmen. Der Wert von $\sigma_{1\mathrm{P}}$ ist eine charakteristische Größe und liegt für konventionelle Farbstoffe im Bereich von 2-8$\cdot 10^{-16}$cm^2 [73].

Neben der Absorption eines Photons, kann ein Fluoreszenzfarbstoff auch durch die simultane Absorption zweier Photonen der halben Energie und damit doppelten Wellenlänge angeregt werden. Dazu ist ein sehr hoher Photonenfluss nötig, da dies innerhalb eines sehr kurzen Zeitfensters von weniger als 10^{-15}s geschehen muss, welches durch die Heisenberg'sche Unschärferelation gegeben wird. Die oben angestellten Überlegungen zur Fluoreszenzemission gelten auch bei der Zweiphotonenabsorption. Insbesondere hat die Art der Anregung keinen Einfluss auf das Fluoreszenzemissionsspektrum. Die molekulare Anregungswahrscheinlichkeit $p_{2\mathrm{P}}$ für die simultane Absorption von zwei Photonen besitzt eine quadratische Intensitätsabhängigkeit:

$$p_{2\mathrm{P}} = \sigma_{2\mathrm{P}} \left(\frac{I}{h\nu} \right)^2 \quad . \tag{3.2}$$

Der Zweiphotonenwirkungsquerschnitt $\sigma_{2\mathrm{P}}$ wird in cm^{4}s gemessen, wobei die Bezeichnung

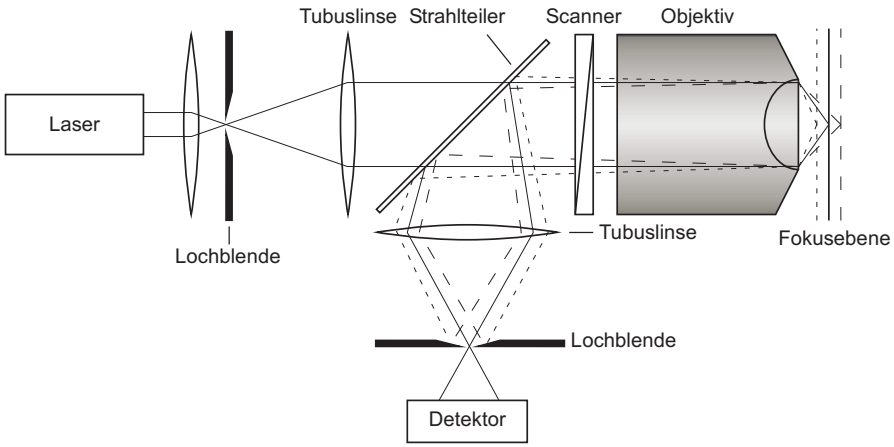


Abbildung 3.2: Das Prinzip der konfokalen Mikroskopie.

$10^{-50}\mathrm{cm}^4\mathrm{s} = 1\mathrm{GM}$ (GM, Göppert-Mayer) eingeführt wurde. Da es schwierig ist $\sigma_{2\mathrm{P}}$ direkt zu messen wird experimentell $\eta \cdot \sigma_{2\mathrm{P}}$ bestimmt. Die üblicherweise verwendeten Farbstoffe haben Werte von $\eta \cdot \sigma_{2\mathrm{P}}$ im Bereich von $1 - 300\mathrm{GM}$ [91, 92]. Die Anregungs- und Emissionspektren für verschiedene, zellbiologisch relevante Farbstoffe und fluoreszierender Proteine können in der Literatur nachgeschlagen werden [8, 84].

Die Lebensdauer des angeregten S_1-Zustandes liegt in der Größenordnung von 1ns und ist damit etwa 6 Größenordnungen länger als die Oszillationsperiode des anregenden Lichts. Deshalb wird bei der Fluorezenzanregung in sehr guter Näherung die Kohärenz der elektromagnetischen Welle zerstört. Die Emission erfolgt also näherungsweise inkohärent und die Fluoreszenzmikroskopie wird durch die Theorie der inkohärenten optischen Abbildung beschrieben.

3.2 Konfokale Mikroskopie

Die konfokale Mikroskopie wurde von Minsky entwickelt und 1961 patentiert [70]. Zuerst experimentell realisiert wurde das konfokale Prinzip 1979 [11]. Durch Fortschritte in der Computer- und Lasertechnologie wurde etwa zur gleichen Zeit das konfokale Laser-Raster-Fluoreszenzmikroskop erfunden [18, 17], welches einige Jahre später zum ersten Mal eingesetzt wurde [13, 16]. Ab den 1990er Jahren war das Konzept soweit ausgereift, dass konfokale Mikroskope auch kommerziell angeboten wurden.

Das Prinzip der konfokalen Mikroskopie wird anhand des schematischen Aufbaus in Abbildung 3.2 erläutert. Im konfokalen Mikroskop wird eine Punktlichtquelle durch das Objektiv in die Bildebene abgebildet. Die erzeugte Intensitätsverteilung entspricht der Beleuchtungs-PSF h_{ill}. Das Fluoreszenzlicht wird mit demselben Objektiv aufgesammelt, mit einem dichroitischen Strahlteiler spektral vom Anregungslicht getrennt und auf einem Detektor nachgewiesen. Als Detektoren kommen Photomultiplier oder Lawinen-Photodioden zum Einsatz. Vor dem Detektor unterdrückt eine Lochblende (engl. *pinhole*) das Licht, welches nicht aus der Fokusebene stammt. Es wird also nur Licht detektiert, das aus dem kleinen Bereich kommt, der durch die beugungsbegrenzte Projektion der Lochblende in die Bilde-

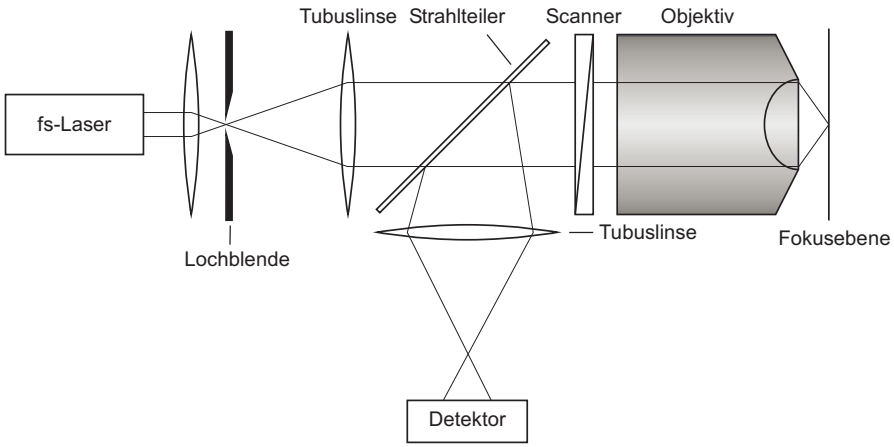


Abbildung 3.3: Prinzipieller Aufbau eines Zweiphotonenmikroskops

bene gegeben ist. Bei einer punktförmigen Lochblende entspricht dies der Detektions-PSF h_{det}, die die Wahrscheinlichkeit ein Photon zu detektieren widerspiegelt. Insgesamt gilt also für das konfokale Mikroskop [36]:

$$h_{\mathrm{konf}}(\boldsymbol{r}) = h_{\mathrm{ill}}(\boldsymbol{r}) \cdot h_{\mathrm{det}}(\boldsymbol{r}) \quad . \tag{3.3}$$

In der Praxis wird im konfokalen Mikroskop im Allgemeinen eine ausgedehnte Lochblende verwendet, um weniger Fluoreszenzlicht zu unterdrücken und so den Photonenfluss am Detektor zu erhöhen. Die effektive Detektions-PSF $h_{\mathrm{det,eff}}$ ist dann durch die Faltung der Lochblendenfunktion $p(\boldsymbol{r})$ mit der Detektions-PSF h_{det} einer Blende mit infinitesimal kleinem Durchmesser gegeben. Insgesamt gilt somit für die konfokale Mikroskopie [36]:

$$h_{\mathrm{konf}}(\boldsymbol{r}) = h_{\mathrm{ill}}(\boldsymbol{r}) \cdot h_{\mathrm{det,eff}}(\boldsymbol{r}) = h_{\mathrm{ill}}(\boldsymbol{r}) \cdot [h_{\mathrm{det}}(\boldsymbol{r}) \otimes p(\boldsymbol{r})] \quad . \tag{3.4}$$

Zur Darstellung eines dreidimensionalen Bildes wird die Probe punktweise vermessen, indem die konfokale PSF relativ zur Probe in einem Raster verfahren wird. Dabei wird entweder das Objekt bewegt oder das Objekt mit dem Fokuspunkt abgetastet. Da als Lichtquellen Laser zu Einsatz kommen spricht man auch von der konfokalen Laser-Raster-Mikroskopie (engl. *Confocal Laser Scanning Microscopy*, CLSM). Der Hauptvorteil der CSLM ist, dass optische Schnitte durch die Probe gelegt werden können, wodurch dreidimensionale Darstellungen der untersuchten Objekte möglich werden.

3.3 Zweiphotonenmikroskopie

Obwohl die Theorie der Zweiphotonenanregung bereits 1931 von Göppert-Mayer [35] aufgestellt wurde, dauerte die experimentelle Realisierung bis 1961 [60], da erst dann Laser für die benötigten hohen Lichtintensitäten zur Verfügung standen. In der Mikroskopie wurde die Zweiphotonenanregung erstmals 1990 angewandt [21].

Abbildung 3.3 zeigt schematisch den Aufbau eines Zweiphotonenmikroskops. Eine punktförmige Lichtquelle, die Licht mit etwa der doppelten Wellenlänge des Fluoreszenzlichts

emittiert, wird durch das Objektiv in die Probe abgebildet. Das Fluoreszenzlicht wird ähnlich wie beim konfokalen Mikroskop mit demselben Objektiv aufgefangen, mit dem dichroitischen Strahlteiler spektral vom Fluoreszenzlicht getrennt und auf einen Detektor fokussiert. Auf die Verwendung einer Lochblende kann verzichtet werden, da wegen der quadratischen Abhängigkeit der Fluoreszenzintensität von der Anregungsintensität (Gleichung 3.2) die Fluoreszenzanregung auf das Fokusvolumen beschränkt ist. Dies erlaubt neben Punkt-Detektoren, wie beispielsweise Photomultiplier und Lawinenphotodioden, auch den Einsatz von Flächendetektoren wie CCD[1]-Kameras. Meist wird trotzdem eine Lochblende verwendet, um die Auflösung zu erhöhen. Für die Beleuchtungs-PSF $h_{\mathrm{ill,2P}}$ des Zweiphotonenmikroskops gilt also [36]:

$$h_{\mathrm{ill,2P}}(\boldsymbol{r}) = (h_{\mathrm{ill}}(\boldsymbol{r}))^2 \quad . \tag{3.5}$$

Wegen der quadratischen Abhängigkeit von der Intensität des Anregungslichts sind für eine signifikante Zweiphotonenabsorption Intensitäten in der Größenordnung GW/cm^2 nötig. Dies wird im Allgemeinen durch durch eine räumliche und zeitliche Konzentration des Laserlichts erreicht, obwohl experimentell demonstriert wurde, dass Zweiphotonenmikroskopie nur mit räumlicher Fokussierung durch ein Objektiv mit hoher numerischer Apertur [55] oder nur durch zeitliche Fokussierung und Weitfeld-Beleuchtung [72] möglich ist. Für Fluoreszenzintensitäten mit annehmbarem Signal-Rausch-Verhältnis und zeiteffizienter Bildaufnahme ist die Benutzung gepulster Lasersysteme und fokussierter Beleuchtung jedoch unumgänglich. Für die mittlere Absorptionsrate k_{2P} pro Farbstoffmolekül und pro Zeiteinheit gilt bei fokussierter Beleuchtung und gepulster Anregung:

$$k_{\mathrm{2P}} = C \cdot \frac{1}{\tau f}\, \sigma_{\mathrm{2P}} \left(\frac{I_{\mathrm{ave}}}{h\nu}\right)^2 \quad . \tag{3.6}$$

C ist eine von der Pulsform abhängigen Konstante, beispielsweise gilt für die sekanshyperbolische Pulsform eines Titan-Saphir-Lasers $C = 0,56$. Die Breite des Laserspulses ist durch τ und die Repetitionsrate des Lasers durch f gegeben. I_{ave} bezeichnet die zeitlich gemittelte Intensität des gepulsten Laserlichts. Bei konstanter mittlerer Intensität kann also die Absorptionsrate und damit die Fluoreszenzintensität gesteigert werden, indem sehr kurze Pulse verwendet werden. Titan-Saphir-Laser, die typischerweise bei der Zweiphotonenmikroskopie eingesetzt werden, emittieren Pulse mit einer Länge von $50-200$fs bei einer Repetitionsrate von etwa 80MHz. Die Emmissions-Wellenlänge liegt im nahen Infrarot bei $\lambda = 700 - 1200$nm.

Die Zweiphotonenmikroskopie hat im Vergleich zur konfokalen Mikroskopie einige Vorteile. Durch die Verwendung von infrarotem Licht zur Anregung können wegen der geringeren Streuung[2] Bilder aus tiefer liegenden Schichten des Präparats aufgenommen werden [12]. Bei der konfokalen Einphotonenmikroskopie wird die gesamte vom Laserlicht durchstrahlte Probe zur Fluoreszenz angeregt, aber nur ein sehr kleiner Teil des Fluoreszenzlichtes wird auch tatsächlich detektiert. Hingegen findet bei der Zweiphotonenmikroskopie die Anregung nur im Fokusvolumen statt. Das Ausbleichen des Farbstoffs und daraus folgende Schädigung der Probe ist dadurch auf diesen Bereich beschränkt. Einphotonen Prozesse können wegen der infraroten Wellenlänge vernachlässigt werden. Lebende Organismen können so wesentlich länger untersucht werden [90].

[1] *Charge Coupled Device*

[2] Der Streuquerschitt ist bei der Rayleigh-Streuung $\propto \lambda^{-4}$

3.3.1 Konfokale Scansysteme

Zum Rastern des Strahls über das Präparat werden verschiedene Techniken eingesetzt. Zum einen kann das Objekt bezüglich des stationären Beleuchtungsstrahls bewegt werden (Objektrasterung). Zum anderen wird der Strahl über das stationäre Objekt gescannt (Strahlrasterung). Eine weitere Möglichkeit lässt Objekt und Strahl in Ruhe und rastert die Probe gleichzeitig mit vielen Strahlen ab, die durch Aperturen einer so genannten Nipkow-Scheibe oder speziell angeordneten Mikrolinsen erzeugt werden.

In dieser Arbeit wurde im experimentellen Aufbau die Strahlrasterung eingesetzt und soll deshalb genauer besprochen werden. Für Details zu den anderen Techniken sei auf die Literatur verwiesen [73]. Die verwendeten Objektive sind telezentrisch korrigiert, das heißt die Eingangs- und Ausgangspupille des Linsensystems liegen im Unendlichen [87]. Eine fundamentale Eigenschaft einer telezentrischen Ebene ist, dass alle Strahlen diese Ebene mit einem Winkel passieren, der charakteristisch ist für die Position des Bildpunktes in der Bildebene. Da ein ebener Spiegel sehr einfach die Ausbreitungsrichtung eines Strahl verändert, liefert die Positionierung eines Spiegels in einer konjugierten telezentrischen Ebene auf der optischen Achse einen einfachen Mechanismus, um durch eine Veränderung des Strahlwinkels eine lineare Bewegung des Fokuspunkts in der Probe zu erreichen. Im einfachsten Fall bildet also ein Spiegel mit einer Drehachse, die in der Mitte einer konjugierten telezentrischen Ebene des Objektivs liegt, einen eindimensionalen Strahlscanner. Die Position des Beleuchtungspunktes in der Fokusebene wird als Funktion des Drehwinkels des Spiegels verändert. Jede konjugierte telezentrische Ebene ist ein Bild der telezentrischen Ebene des Objektivs.

Wenn zwei Spiegel zum Scannen des Strahls in zueinander senkrecht stehenden Richtungen verwendet werden, sollten beide in konjugierten telezentrischen Ebenen positioniert werden. Alternativ können sie sehr nahe zueinander um eine konjugierte telezentische Ebene herum angeordnet werden (*close-coupled*-Konfiguration). Indem der Strahl in orthogonale Richtungen abgelenkt wird, formt ein solches Scansystem ein zweidimensionales Bild.

3.4 SMI-Mikroskopie

Bei der Mikroskopie mit räumlich modulierter Beleuchtung (engl. *Spatially Modulated Illumination Microscopy*, SMI-Mikroskopie) werden im Objektraum des Mikroskops zwei linear polarisierte, kollimierte, kohärente Laserstrahlen gleicher Intensität und Polarisation zur Interferenz gebracht. Dadurch bildet sich eine stehende Lichtwelle aus, die einzelne Objektbereiche selektiv zur Fluorezenz anregt. Die äquidistanten Intensitätsmaxima der stehenden Welle werden im Allgemeinen senkrecht zur optischen Achse des Objektivs ausgerichtet, das zur Detektion des Fluoreszenzsignals benutzt wird. Die Intensität der stehenden Lichtwelle in z-Richtung, entlang der optischen Achse, ist gegeben durch [75]:

$$I(z) = I_0 \cos^2(k_\mathrm{z} z + \frac{\Delta\phi}{2}) \;\; \text{mit} \;\; k_\mathrm{z} = \frac{2\pi n \cos(\theta)}{\lambda_\mathrm{ill}} \quad . \tag{3.7}$$

Dabei bezeichnet n den Brechungsindex, θ den Winkel und $\Delta\phi$ die Phasendifferenz zwischen den interferierenden Strahlen und λ_ill die Vakuumwellenlänge des Laserlichts der

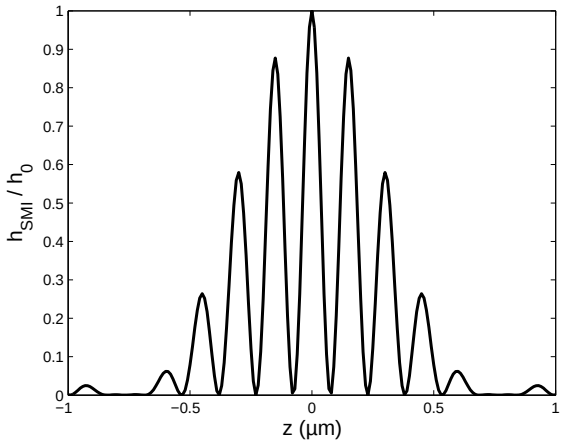


Abbildung 3.4: Die PSF in axialer Richtung des SMI-Mikroskops berechnet für eine Anregungswellenlänge von $\lambda = 458$nm, numerische Apertur (NA) des Objektivs von NA $= 1,4$ und einer Phasendifferenz $\Delta\phi$=0.

Anregung. Damit berechnet sich der Abstand der Intensitätsmaxima d zu:

$$d = \frac{\lambda_{\text{ill}}}{2n\cos(\theta)} \quad . \tag{3.8}$$

Für die PSF der Beleuchtung folgt mit diesen Überlegungen:

$$h_{\text{SMI,ill}}(\boldsymbol{r}) = h_0 \cos^2(k_{\text{z}} z + \frac{\Delta\phi}{2}) \quad , \tag{3.9}$$

mit der Normierungskonstanten h_0. Dies bedeutet, dass sich nur in axialer (z-Richtung) eine $\cos^2$-förmige Modulation der Beleuchtung vorhanden ist. Senkrecht dazu ist die Beleuchtung in der jeweiligen lateralen Ebene wie bei der Epifluoreszenzmikroskopie konstant. Die Gesamt-PSF ergibt sich analog zur konfokalen Mikroskopie aus dem Produkt der Beleuchtungs- und Detektions-PSF:

$$h_{\text{SMI}}(\boldsymbol{r}) = h_{\text{SMI,ill}}(\boldsymbol{r}) \cdot h_{\text{det}}(\boldsymbol{r}) = h_0 \cos^2(k_{\text{z}} z + \frac{\Delta\phi}{2}) \cdot h_{\text{det}}(\boldsymbol{r}) \quad . \tag{3.10}$$

$h_{\text{det}}(\boldsymbol{r})$ ist die bereits aus Gleichung 2.7 bekannte PSF für die Abbildung mit einer Linse. Die Gesamt-PSF ist in lateraler Richtung identisch mit der PSF eines Epifluoreszenzmikroskops. Abbildung 3.4 zeigt die Gesamt-PSF in axialer Richtung. Durch das Stehwellenfeld ist diese stark strukturiert mit Abständen zwischen den Maxima, die durch Gleichung 3.8 gegeben sind.

Die optische Transferfunktion für die SMI-Mikroskopie berechnet sich nach den Überlegungen aus Abschnitt 2.3 recht einfach. Nach dem Faltungstheorem und Gleichung 3.10 folgt für die OTF des SMI-Mikroskops

$$H_{\text{SMI}}(\boldsymbol{k}) = H_{\text{SMI,ill}}(\boldsymbol{k}) \otimes H_{\text{det}}(\boldsymbol{k}) \quad . \tag{3.11}$$

Die Beleuchtungs-OTF $H_{\text{SMI,ill}}(\boldsymbol{k})$ hat als Fouriertransformierte einer $\cos^2$-Funktion eine sehr einfache Struktur und setzt sich aus den drei Delta-Distributionen $\delta(k' = 0)$ und

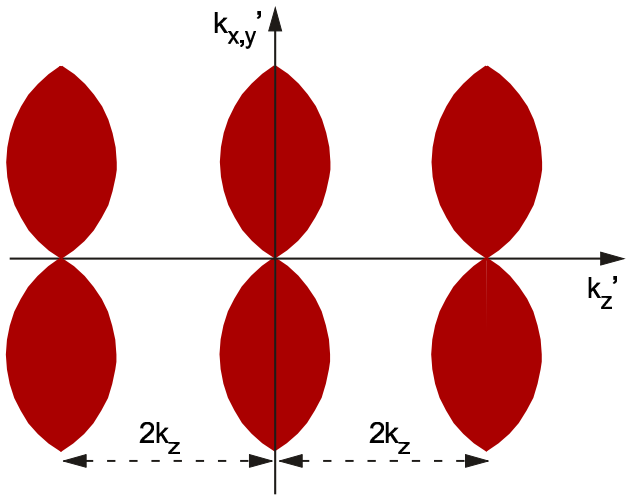


Abbildung 3.5: Die OTF des SMI-Mikroskops.

$\frac{1}{2}\delta(k' = \pm 2k_z)$ zusammen. Durch Faltung mit der Detektions-OTF aus Abbildung 2.3 ergibt sich insgesamt die in Abbildung 3.5 dargestellte OTF des SMI-Mikroskops. Sie besteht aus der OFT des konventionellen Mikroskops mit zwei Kopien, die nach $k' = \pm 2k_z$ verschoben sind. Dabei ist zu beachten, dass der Wert der OTF im mittleren Teil doppelt so groß ist wie in den beiden äußeren Bereichen. Dadurch werden die Raumfrequenzen $\boldsymbol{k'}$ aus dem mittleren Bereich doppelt so stark abgebildet wie aus dem äußeren Bereich. Zudem fällt auf, dass es zwischen dem mittleren Teil und den beiden äußeren Teilen eine Lücke gibt, für die die OTF Null ist und somit auch keine Raumfrequenzen für diese k'-Werte übertragen werden [63]. Diese Lücken in der OTF bleiben auch bestehen wenn k_z über den Winkel θ zwischen den beiden interferierenden Strahlen oder die Anregungswellenlänge verändert wird [75]. Obwohl die Außenbereiche mit dem mittleren Bereich überlappen, bleiben vom *missing cone* der Detektions-OTF Lücken bestehen.

Die Bereiche, für welche die OTF identisch Null ist, stellen ein großes Problem für die Analyse der Bilddaten dar, weil keinerlei Information über diese Raumfrequenzbereiche des Objekts in den Daten vorhanden sind. Um trotzdem die zusätzliche Information, die in den Bilddaten steckt, zugänglich zu machen und damit die Auflösung zu erhöhen, müssen Methoden der Bildverarbeitung angewandt werden und a-priori Annahmen über das untersuchte Objekt gemacht werden. Nur so kann der fehlende Raumfrequenzbereich überbrückt werden.

Bei der ursprünglichen Technik [65, 7] wurde deshalb angenommen, beziehungsweise das Präparat so gewählt, dass sich nur ein Objekt in axialer Richtung befindet, dessen Ausdehnung kleiner ist als der Abstand der Intensitätsmaxima, also etwa 200nm. Auf diese Weise werden Vieldeutigkeiten bei der Zuordung der Wellenfronten zur Position des Objekts und damit so genannte Geisterbilder vermieden. Durch eine digitale Weiterverarbeitung der Bilddaten konnte so die axiale optische Auflösung gesteigert werden [63]. Diese Beschränkungen können mit der SMI-Mikroskopie zumindest für optisch isolierte Objekte überwunden werden [76, 29, 30, 6]. Für die in dieser Arbeit benutzen Datenanalysemethoden sei auf Kapitel 5 verwiesen.

3.5 Neuere Methoden

Um die optische Auflösung der Fluoreszenzmikroskopie weiter zu erhöhen, wurden in den letzten Jahren verschiedene Methoden entwickelt, die hier kurz aufgezählt werden sollen.

Wie in Abschnitt 2.3 erläutert wird bei der Abbildung durch *eine* Linse nur ein kleiner Teil des vom Objekt emittierten Fluoreszenzlichts aufgesammelt. Da technisch nur Objektive mit einem maximalen Aperturwinkel von etwa 70° realisiert werden können, müssen zur weiteren Erhöhung der effektiven Apertur *zwei* Objektive verwendet werden. Weil auch die Beleuchtung entscheidend für die Auflösung und der Lichtweg umkehrbar ist, kann auf diese Weise ebenso die Beleuchtungs-PSF modifiziert werden.

Bei der I^5M-Mikroskopie [40, 41, 42] erfolgt die Beleuchtung mit ebenen Wellenfronten. Das Fluoreszenzlicht wird kohärent mit zwei Objektiven auf einer CCD-Kamera detektiert. Damit konnte experimentell eine Auflösung von etwa 100nm in axialer Richtung erreicht werden. Im Gegensatz dazu werden im 4Pi-Mikroskop [51, 50] sphärische Wellenfronten zur Fluoreszenzanregung (Typ A), Detektion (Typ B) oder zu beidem (Typ C) verwendet. Der Fokuspunkt muss, wie bei allen Techniken mit Punktanregung, über das Präparat gerastert werden. In Kombination mit Wasserimmersionsobjektiven und Zweiphotonenanregung wurden mit 4Pi-Mikroskopie experimentell in lebenden Präparaten eine axiale Auflösung bis zu 80nm erreicht [26, 27, 37]. Das 4Pi-Mikroskop ist inzwischen auch als 4Pi-Typ A kommerziell erhältlich[3]. Strukturierte Beleuchtung kombiniert mit Methoden der digitalen Bildverarbeitung ermöglicht Auflösungen von bis zu 70nm in lateraler und in axialer Richtung [71, 46, 38, 33, 34].

Mit all diesen Methoden kann die Auflösung nicht über ein gewisses Limit erhöht werden, da letztendlich Beugungseffekte des Lichts die Ursache für die begrenzte Auflösung sind. Dies kann unter Ausnutzung nicht-linearer Effekte wie beispielsweise Sättigung, Anregung spezieller photoschaltbarer Farbstoffe oder Fluoreszenzlöschung mittels stimulierter Emission (engl. *Stimulated Emission Depletion*, STED) umgangen werden, sodass, zumindest theoretisch, unbegrenzte Auflösungen möglich scheinen [48]. Dies kann mit strukturierter Beleuchtung und Sättigung kombiniert als Weitfeld-Mikroskopie [47, 39] erfolgen. Oder wie bei STED durch ein Abrastern mit einem sehr kleinen Fokus. Mit Sättigung und strukturierter Beleuchtung wurde bisher eine maximale Auflösung von 59nm [39] und mit STED ein Auflösung von bis zu 16nm erreicht [52, 61, 89].

Die kürzlich entwickelte Methode PALM (*Photoactivated Localization Microscopy*) [9] erreicht eine räumliche Auflösung im Bereich weniger Nanometer. Das zu untersuchende Objekt wird dabei mit einem photoaktivierbaren, fluoreszierenden Protein markiert. Pro Datensatz werden nur wenige Proteine aktiviert, aufgenommen, genau lokalisiert und ausgebleicht, sodass jedes Protein nur einmal zum Gesamtbild beitragen kann. Aus sehr vielen dieser Datensätze wird schließlich im Rechner ein hochaufgelöstes Bild des Objekts berechnet.

Zudem sei noch die Nahfeld Optik erwähnt, bei der das Licht überhaupt nicht fokussiert wird und die dadurch keinem Auflösungslimit durch Beugungsbegrenzung unterliegt [22].

[3] Leica, Bensheim, `http://www.leica-microsystems.com`

3.6 Spektrale Präzisonsdistanzmikroskopie

Das Ziel der spektralen Präzisonsdistanzmikroskopie (SPDM) ist, die Abstände und Winkel zwischen quasi punktförmigen fluoreszierenden Objekten sehr genau zu bestimmen. Wenn zur Fluoreszenzmarkierung unterschiedliche spektrale Signaturen verwendet werden, beispielsweise unterschiedliche, vom Detektionssystem trennbare Emissionsspektren des Farbstoffs, sind die messbaren Distanzen wesentlich kleiner als die Auflösungsgrenze. Alternativ können auch Fluoreszenzlebensdauern als spektrale Signatur verwendet werden. Grundsätzlich ist die Methode für jedes Mikroskop mit verschiedenen Detektionskanälen einsetzbar. Die folgenden Überlegungen beziehen sich ausschließlich auf quasi punktförmige Objekte mit einer Ausdehnung, die unterhalb der Lichtwellenlänge λ liegt, da derartig markierte Objekte bei dreidimensionalen topologischen Untersuchungen des Zellkerns eingesetzt werden.

Zur Distanzbestimmung muss eine präzise Lokalisation der einzelnen Signale, das heißt eine Positionsbestimmung der Objekte, erfolgen. Als Ort des Objekts wird dabei die Lage des beugungsbegrenzten Intensitätsmaximums des Fluoreszenzsignals angenommen. Falls keine Abberationen die Abbildung stören ist dies sehr gut erfüllt. Mit dieser Annahme sind Distanzmessungen unterhalb der Auflösungsgrenze möglich [15], da mit Methoden der digitalen Bildverarbeitung die Lage des Maximums des Intensitätssignals mit einer Präzision bestimmt werden kann, die deutlich besser ist als die Auflösung des Mikroskops. Zur Berechnung der Lage des Intensitätsmaximum werden modell- und schwerpunktbasierte Lokalisationsmethoden verwendet. Modellbasierte Methoden beinhalten eine Annahme über die Form der Intensitätsverteilung und besitzen eine sehr hohe Präzision, wenn die tatsächliche Verteilung dem angenommenen Modell ähnlich ist. In der Praxis können Brechungsindexvariationen in der Mikroumgebung des Objekts dazu führen, dass sich die Form der Intensitätsverteilung in unvorhersehbarer Weise verändert und das Modell nicht mehr die Wirklichkeit widerspiegelt [45]. Dies führt dazu, dass die Modellfunktion nicht mehr an die Bilddaten angepasst werden kann und eine Auswertung unmöglich ist.

Diese Anfälligkeit besitzt die schwerpunktsbasierte Methode nicht. Bei dieser werden die aufgenommenen Bilddaten zuerst segmentiert, das bedeutet es wird ein Schwellwert g_{thresh} für die Grauwerte (Intensitäten) g_{i} des Bildes festgelegt und Voxel[4] mit Grauwerten größer als dieser Schwellwert zum Objekt gehörend definiert. Voxel mit Werten $g_{\text{i}} < g_{\text{thresh}}$ werden nicht weiter berücksichtigt. Analog zum Massenschwerpunkt der Mechanik berechnet sich der Intensitätsschwerpunkt $\boldsymbol{S}$ der Fluoreszenzverteilung zu:

$$\boldsymbol{S} = (s_{\text{x}}, s_{\text{y}}, s_{\text{z}}) = \frac{1}{M}\sum_{i=1}^{n}(g_i - g_{\text{thresh}}) \cdot \boldsymbol{r_i} \text{ und } M = \sum_{i=1}^{n}(g_i - g_{\text{thresh}}) \ . \tag{3.12}$$

n ist die Zahl der zum Objekt gehörenden Voxel und g_{i} bezeichnet den Grauwert des Voxels i an den Koordinaten $\boldsymbol{r_i} = (x_i, y_i, z_i)$. Diese Art der Lokalisation ist zulässig, falls die zugrundeliegende Intensitätsverteilung symmetrisch ist. Für quasi punktförmige Objekte ist dies in der Regel sehr gut erfüllt. Berücksichtigt man nur das Photonenrauschen ist die Lokalisationsgenauigkeit $\sigma_{x,y,z}$ für Punktobjekte gegeben durch [24]:

$$\sigma_{x,y,z} = \frac{1}{\sqrt{8\ln 2}}\frac{FWHM_{x,y,z}}{\sqrt{N}} \ , \tag{3.13}$$

[4] dreidimensionales Volumenelement, abgeleitet von *volumetric* und *pixel*

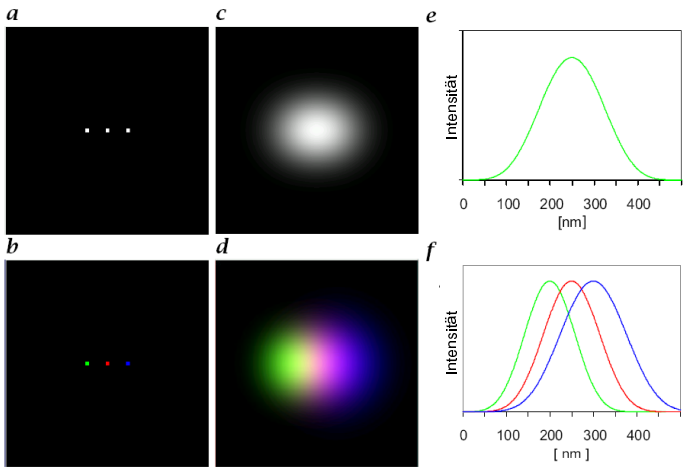


Abbildung 3.6: Das Prinzip der spektralen Präzisionsdistanzmikroskopie. Drei Punktobjekte befinden sich in einem gegenseitigen Abstand von jeweils 50nm. In (a) sind die Objekte mit der selben in (b) mit drei unterschiedlichen spektralen Signaturen markiert. (c) und (d) zeigen eine Simulation der Abbildung mit dem CLSM. Linienprofile durch die Objekte aus (c) und (d) sind in (e) und (f) dargestellt. Bildquelle [19].

falls insgesamt N Photonen detektiert werden und mit $FWHM_{x,y,z}$ die Halbwertsbreite der gemessenen PSF in x-, y- und z-Richtung bezeichnet wird. Durch die Abtastung und Digitalisierung verursachte Fehler sind in Gleichung 3.13 noch nicht berücksichtigt. Diese Fehler sind vernachlässigbar, falls mit einem Voxelabstand $\Delta x = \frac{1}{4}FWHM$ abgetastet wird [45]. In der praktischen Anwendung ist meist schon eine Abtastung nach dem Nyquist-Theorem mit $\Delta x \leq \frac{1}{2}FWHM$ ausreichend [58]. Gleichung 3.13 zeigt die Bedeutung der Auflösung für die Lokalisationsgenauigkeit. Denn je besser die Auflösung und damit je kleiner die Halbwertsbreite der PSF ist, desto besser ist die Lokalisationsgenauigkeit. Der Vorteil der schwerpunktsbasierten Lokalisation liegt darin, dass keine Annahmen über die Intensitätsverteilung gemacht werden müssen. Die Genauigkeit erreicht allerdings nicht ganz das Niveau der modellbasierten Methode.

Die Distanz zwischen zwei punktförmigen Objekten ergibt sich zu $d = |\boldsymbol{S_1} - \boldsymbol{S_2}|$. Die Intensitätsschwerpunkte $\boldsymbol{S_1}$ und $\boldsymbol{S_2}$ können mit den beschriebenen Methoden aber nur berechnet werden, wenn sich die Intensitätsverteilungen nicht überlagern. Dies bedeutet, dass die Objekte mindestens die doppelte Halbwertsbreite als Abstand haben müssen. Dieses Problem kann mit der SPDM umgangen werden [24]. Abbildung 3.6 zeigt das Prinzip schematisch. Verwendet man nur eine spektrale Signatur kann bei einem Abstand d, der kleiner als die Auflösungsgrenze ist, keine Information gewonnen werden über die Anzahl und Position der fluoreszierenden Objekte. Verwendet man jedoch unterschiedliche spektrale Signaturen und detektiert das Fluoreszenzsignal für jede Signatur in einem eigenen Kanal, können die Intensitätsschwerpunkte und Distanzen der Objekte untereinander berechnet werden.

Theoretisch können beliebig viele spektrale Signaturen verwendet werden, in der Praxis wird die maximale Anzahl durch das Trennvermögen des Mikroskops beschränkt. Moderne kommerzielle CLSM können bis zu sechs verschieden Farbstoffe trennen.

Neben bereits erwähnten Effekten, die die Lokalisationsgenauigkeit beeinträchtigen, kommen bei Distanzmessungen als systematische Fehlerquellen noch monochromatische und chromatische Abberationen des optischen Systems hinzu [49]. Während monochromatische Abberationen wie eine unterschiedliche tatsächliche Voxelgröße, eine untergeordnete Rolle spielen, sind chromatische Abberationen die Hauptfehlerquelle [25, 62]. Die durch Dispersion verursachte chromatische Verschiebung des Fokuspunktes in unterschiedlichen Farbkanälen kann selbst bei Hochleistungsobjektiven 50nm in lateraler und 250nm in axialer Richtung betragen. Mit Kalibrationsmessungen an multispektralen Objekten wird diese bestimmt und die Position des Objekts korrigiert. Dabei ist jedoch besonders darauf zu achten, dass die Kalibration unter den gleichen optischen Bedingungen durchgeführt wird wie die eigentliche Abstandsmessung. Ein Übersprechen von einem Detektionskanal in den anderen führt ebenfalls dazu, dass die Position des Objekts verfälscht wird. Durch geeignet gewählte Farbstoffe kann dies minimiert werden. Auch eine Korrektur mit digitaler Bildverarbeitung ist möglich [45]. Mechanische Instabilitäten des Mikroskops wie Verschiebungen des Objekttischs während der Messung müssen selbstverständlich ebenfalls ausgeschlossen werden.

4 Experimenteller Aufbau

In diesem Kapitel werden die experimentellen Realisierungen des SMI-Mikroskops und des Zweiphotonenmikroskops beschrieben. Bei beiden Mikroskopen handelt es sich um Prototypen, die im Rahmen dieser Arbeit aufgebaut wurden.

4.1 SMI-Mikroskopie

Während dieser Arbeit wurde ein SMI-Mikroskop grundlegend modifiziert und komplett neu aufgebaut, da der bestehende Aufbau den Anforderungen eines routinemäßigen Einsatzes in der biologischen Forschung nicht gerecht wurde. Der Unterschied zu den früher beschriebenen SMI-Mikroskopen [75, 5, 79, 85] liegt in der Erzeugung der räumlich modulierten Beleuchtung. In dieser konventionellen Geometrie wird die Beleuchtungsstruktur im Objektraum durch Interferenz zweier kollimierter Laserstrahlen erreicht, die in die hinteren Fokusebenen einander gegenüberstehender Objektive fokussiert werden. Der hier beschriebene vereinfachte Aufbau verwendet stattdessen nur ein Objektiv. Das andere Objektiv wird durch einen Spiegel ersetzt, der das Laserlicht reflektiert und so zur Interferenz bringt.

4.1.1 Aufbau

Der vorher bestehende SMI-Mikroskop [79] wurde komplett demontiert. Für den Neuaufbau wurden nur der Laser und die einzelnen Komponenten des Mikroskops verwendet. Vor allem war es nötig, Vibrationen auf dem optischen Tisch zu vermeiden. Dazu wurde der Lüfter der CCD-Kamera durch eine selbst gebaute Wasserkühlung ersetzt und der Laser, der wegen des großen Kühlwasserdurchflusses ebenfalls für Vibrationen verantwortlich war, auf einem separaten optischen Tisch betrieben. Der Mikroskopaufbau selbst befindet sich auf einem quadratischen Breadboard mit 60cm Kantenlänge aus Super-Invar (M-XI-22, Newport[1]), um bezüglich der Anordnung der Komponenten möglichst flexibel zu sein und die Anforderungen an sehr gute mechanische und thermische Stabilität zu erfüllen.

Einen schematischen Überblick über den gesamten Aufbau des SMI-Mikroskops mit Spiegel gibt Abbildung 4.1. Zudem zeigt Abbildung 4.2 eine Fotografie des Objektraums, in dem das Stehwellenfeld zur Beleuchtung erzeugt wird. Als Lichtquelle diente ein auf mehreren Linien emittierender Argon-Ionen-Laser (Innova 310, Coherent Inc.[2]), der auf der TEM_{00}-Mode betrieben wurde. Im Laserresonantor befindet sich kein wellenlängenselektives Element, sodass mehrere Wellenlängen anschwingen. Mit einem Dispersionsprisma aus N-SF10 (Linos Photonics[3]) wird das austretende Laserlicht spektral aufgespalten und die

[1] Darmstadt, `http://www.newport.com`
[2] Santa Clara, USA, `http://www.coherent.com`
[3] Göttingen, `http://www.linos.de`

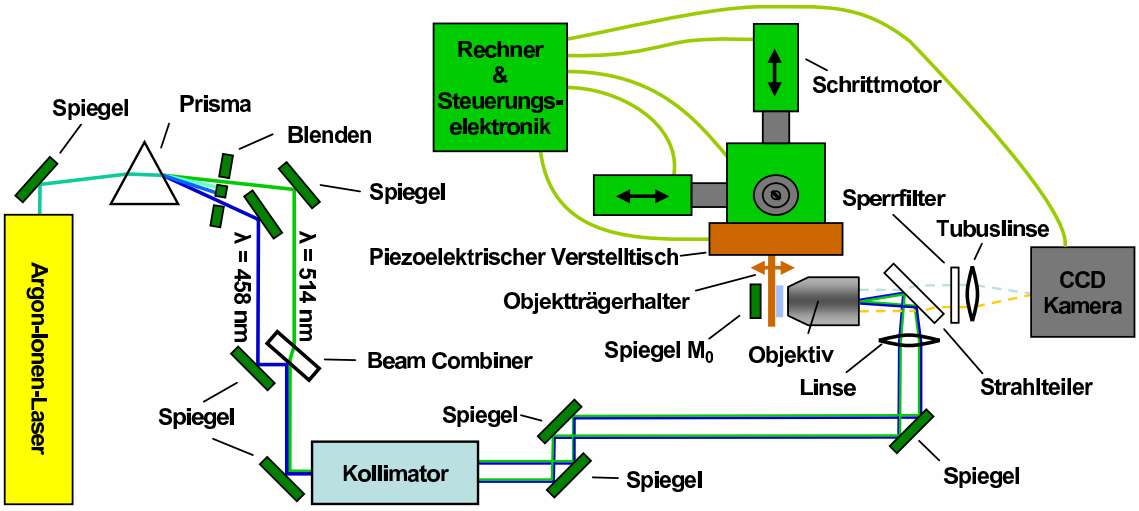


Abbildung 4.1: Aufbau des SMI-Mikroskops mit Spiegel.

Laserlinien mit den Wellenlängen $\lambda = 458$nm und $\lambda = 514$nm selektiert. Die übrigen Linien werden nach dem Prisma abgeschirmt. Die Leistung $P > 1$W bei $\lambda = 514$nm ist wesentlich größer ist als $P \approx 20$mW bei $\lambda = 458$nm. Um die Intensität in beiden Farbkanälen anzupassen wird ein Teil des Lichts mit 514nm Wellenlänge an der Oberfläche eines Prismas reflektiert. Während der andere, größere durchgehende Teil abgeschirmt wird. Dadurch ergeben sich die für die Durchführung der Messungen verwendeten Leistungen von 150mW für $\lambda = 514$nm und 20mW für die 458nm Wellenlänge. Mit einem selbstgebauten elektronischen *Shutter* können beide Wellenlängen separat geschaltet werden (Aufbau siehe [81]). Die beiden Laserlinien werden mit einem *Beam Combiner* (Z457/514bc, AHF Analysentechnik AG[4]) zu einem Strahl überlagert. Um das Gesichtsfeld homogen auszuleuchten, wird der Strahl mit einem Kollimator von etwa 2mm auf etwa 10mm $1/e^2$-Durchmesser aufgeweitet. Dazu werden zwei konvexe Linsen (Best.-Nr: G322201000, G322345000, Linos Photonics) mit Brennweiten $f = 20$mm und $f = 100$mm im Abstand 120mm verwendet, die wegen der einfacheren Justage in einer Mikrobank (Linos Photonics) angebracht werden. Am Ausgang des Kollimators kann mit einer Irisblende der Strahldurchmesser zur Justage des Mikroskops verkleinern werden. Die Kollimation des aufgeweiteten Strahls wird mittels einer *Shearing Plate* (Melles Griot[5]) überprüft und kann durch eine Veränderung des Linsenabstands eingestellt werden.

Zwei Irisblenden in einem Abstand von etwa 40cm trennen das eigentliche Mikroskop vom Lasersystem mit Kollimator. Sie dienen zur leichteren Justage, falls Änderungen am Lasersystem vorgenommen werden müssen. Das Licht wird über zwei metallbeschichtete Spiegel mit 25mm Durchmesser (Typ 10Z40ER.2, Newport), die auf kinematische Spiegelhalter (Typ U50-P, Newport) geklebt sind, zum Mikroskopaufbau geführt. Die Planarität der Spiegel beträgt $\lambda/20$ und das Reflexionsvermögen liegt für $\lambda = 450 - 700$nm bei über 90%. Der kollimierte, aufgeweitete Laserstrahl wird mit einer achromatischen Duplettlinse (PAC368, Newport) mit Brennweite $f = 80$mm in die hintere Fokusebene des Objektivs

[4]Tübingen, `http://www.ahf.de`
[5]Bensheim, `http://www.mellesgriot.com`

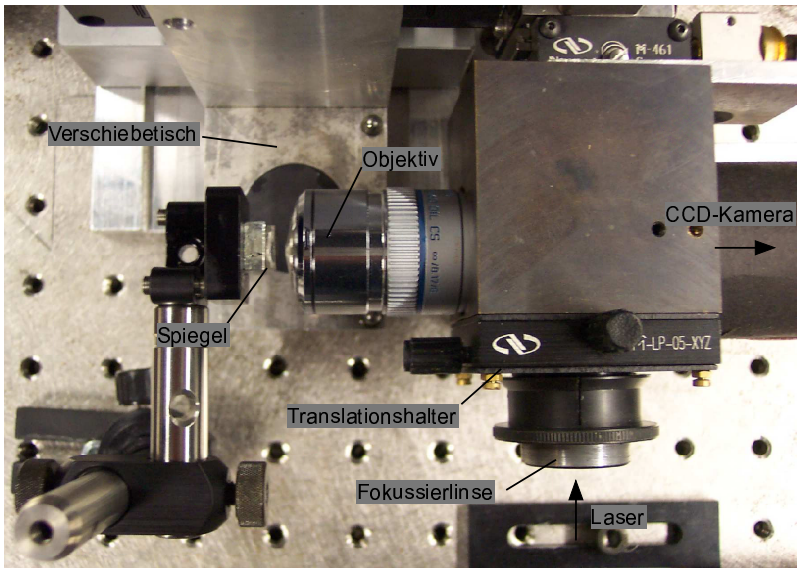


Abbildung 4.2: Fotografie des Objektraums des SMI-Mikroskops mit Spiegel.

(HCX PL APO, 63x, NA $= 0,7 - 1,4$, Leica[6]) fokussiert. Die numerische Apertur NA des Objektivs kann über einen Rändelring von NA $= 0,7 - 1,4$ variiert werden. Der Abstand zur hinteren Fokusebene und die laterale Position der Linse wird mit einem Drei-Achsen-Translationshalter (M-LP-05-XYZ, Newport) justiert. Das Objektiv und die Linsenhalterung werden in eine eigens angefertigte Halterung geschraubt, die mit drei übereinander angebrachten Verschiebetischen (M-461, Newport) in den drei Raumrichtungen verschiebbar ist. Bei den verwendeten Objektivhaltern befindet sich zwischen Objektiv und Linse zusätzlich ein dichroitischer Strahlteiler, der den Beleuchtungsstrahl umlenkt. Linse und Objektiv bilden einen Kollimator, sodass der Laserstrahl bei der entsprechenden Justage nach dem Durchlaufen der Linse und des Objektivs wieder kollimiert ist. Dieser Strahl wird mit dem Spiegel M_0 (Durchmesser 10mm, Metallbeschichtung, Linos Photonics) in das Objektiv reflektiert, sodass sich im Objektbereich zwischen Spiegel und Objektiv durch Interferenz ein stehendes Wellenfeld ausbildet. Die mittlere Intensität des stehenden Wellenfeldes beträgt bei den verwendeten Leistungen 75W/cm^2 für $\lambda = 514$nm und 10W/cm^2 für $\lambda = 458$nm. Um störende Reflexionen zu vermeiden wird zwischen Objektiv, Objektträger und Spiegel Immersionsöl (Brechungsindex n = 1,52, Zeiss[7]) zur Anpassung des Brechungsindex verwendet.

Der Detektionsstrahlengang ist einem konventionellen Epifluoreszenzmikroskop ähnlich. Das Fluoreszenzlicht wird mit dem Objektiv aufgesammelt und durch den dichroitischen Strahlteiler (Z457/514rpc, AHF Analysentechik) vom Anregungslicht getrennt. Ein Sperrfilter (Z457/514DBM, AHF Analysentechik) unterdrückt das in den Detektionsstrahlengang gelangte Licht der Anregung. Die Tubuslinse (Typ E00, 1x, Brennweite $f = 160$mm, Leica) fokussiert das Fluoreszenzlicht auf die CCD-Kamera (Imager3, LaVision[8]). Tubus-

[6]Bensheim, `http://www.leica-microsystems.com`
[7]Oberkochen, `http://www.zeiss.de`
[8]Göttingen, `http://www.lavision.de`

Pixelanzahl	1280 × 1024
Pixelgröße	6,7μm × 6,7μm
Digitalisierungstiefe	12 Bit
Spektrale Empfindlichkeit	400 - 900nm
Maximale Quanteneffizienz	56% bei 340nm
Größe des CCD-Chip	8,6mm × 6,9mm
CCD-Temperatur	-12°C
Frequenz A/D-Wandler	12,5 MHz
A/D-Konversionsfaktor	5 e^-/count
full well capacity	25000 e^-
Mittlerer Dunkelstrom	< 0,1 e^-/(pixel·s)
Maximale Bildwiderholrate (Vollbild)	8/s
Maximale Bildwiderholrate (Teilbild)	32/s
Integrationszeit	0,001 - 1000s
Binning horizontal	1 - 8
Binning vertikal	1 - 128

Tabelle 4.1: Technische Daten zur CCD-Kamera Imager3 von LaVison.

linse und Objektiv sind aufeinander abgestimmt, um sphärische und chromatische Abberationen zu minimieren. Die Spezifikationen der Kamera sind in Tabelle 4.1 zusammengefasst. Es handelt sich um eine 12 Bit Schwarz-Weiß-CCD-Kamera mit 1280 × 1024 Pixeln und einer maximalen Quanteneffizienz von 56%.

Der Objektträgerhalter ist für die Verwendung von Objektträgern mit den Standardmaßen (L×B×H = 76mm×25mm×1mm) vorgesehen. Auf dem Halter wird der Objektträger mit zwei Blattfedern arretiert. Eine spezielle Dreipunktlagerung auf einer Magnethalterplatte ermöglicht einen schnellen und einfachen Wechsel des Objektträgers, da der Halter nach dem Wiedereinsetzen in die Lagerung präzise die vorherige Position einnimmt [56]. Der Magnethalter ist fest mit einem piezoelektrischen Verstelltisch (Typ P-915.723, Physik Instrumente[9]) verbunden. Dabei wurde die Richtung der Verstellung parallel zur optischen Achse des Objektivs angeordnet, um den Objektträger für die Messung senkrecht zur optischen Achse verfahren zu können. Der maximale Stellweg beträgt 200μm. Durch kapazitive Sensoren wird eine hohe Positionsauflösung bei einer Wiederholbarkeit von einigen Nanometern erreicht. Zum makroskopischen Verfahren der Probe ist die gesamte Objektträgerhalterung bestehend aus Magnethalter und piezoelektrischem Verstelltisch auf einem temperaturstabilisierten Verschiebetisch befestigt, der mit drei Schrittmotoren (Typ ZSS422-200-1.2, Pytron-Elektronik GmbH[10]) angetrieben wird [56]. Die Ansteuerung erfolgt mit der Schrittmotorsteuerung mc compact (ITK Dr. Kassen GmbH [11]). Über einen Joystick lässt sich damit der Objektträger bequem in den Bereich zwischen Objektiv und Spiegel fahren. Bei der Datennahme bleiben die Schrittmotoren inaktiv.

Zusätzlich zur Beleuchtung mit dem Laser ist eine quasi[12] Durchlichtbeleuchtung mit einer Superhellen-LED (Luxeon Star/O, LXHL-NM98 green, dominante Wellenlänge 530nm, Lu-

[9] Waldbronn, `www.physikinstrumente.com`
[10] Gröbenzell
[11] Lahnau, `http://www.itknet.de`
[12] quasi, weil das Licht der LED erst am Spiegel reflektiert wird

mileds Lighting[13]) realisiert. Die Verwendung ist vor allem bei der Suche nach biologischen Objekten hilfreich, die bei Beleuchtung mit einem Laser schnell ausbleichen.

Für Vergleichsmessungen wurde der konventionelle Aufbau des SMI-Mikroskops mit zwei Objektiven verwendet, wie er in [85] beschrieben wurde. Allerdings wurden am Aufbau im Laufe der Zeit einige Veränderungen vorgenommen von denen die wichtigsten hier kurz geschildert sollen. Zu den Lasern mit Wellenlänge $\lambda = 488$nm und $\lambda = 647$nm wurde ein weiterer Krypton-Ionen-Laser in den Aufbau integriert, der bei $\lambda = 568$nm betrieben wird (Typ Lexel 95-K, Cambridge Lasers Laboratories[14]). Die Farb-CCD-Kamera wurde durch eine mindestens viermal empfindlichere Schwarz-Weiß-CCD-Kamera (Sensicam, PCO[15]) ersetzt. In diesem konventionellen Aufbau werden zwei 100x-Objektive von Leica verwendet (100x, NA $= 1,4$, PlanApo, Ölimmersion). Eine genaue Beschreibung findet man in [85]. Für einige Messungen mit der Wellenlänge $\lambda = 568$nm – insbesondere zum Vergleich des konventionellen und des Spiegel-Aufbaus – wurde dieses SMI-Mikroskop umgebaut und die strukturierte Beleuchtung mit einem Spiegel wie oben beschrieben erzeugt. Dabei wurde das 100x-Objektiv durch das 63x-Objektiv ersetzt und der Aufbau neu justiert.

Beim Spiegel-Aufbau wurde bis auf Ausnahmen, bei denen darauf hingewiesen wird, das 63x-Objektiv von Leica eingesetzt. Wenn das andere Objektiv (MIC100, 100x, NA $= 1,25$, Ölimmersion, Euromex Microscopen BV[16]) verwendet wurde, das im Folgenden mit DIN-Objektiv bezeichnet wird, musste die Fokussierlinse ausgetauscht werden. Die neue Brennweite betrug $f = 60$mm (PAC366, Newport). Das DIN-Objektiv ist nicht dafür ausgelegt in Mikroskopen verwendet zu werden, die im Tubus einen parallelem Strahlengang besitzen, das heißt, auf unendlich korrigiert sind. Dennoch konnte es problemlos zusammen mit der Tubuslinse benutzt werden.

4.1.2 Justage

Der Beleuchtungsstrahlengang des Mikroskops wird mit den beiden Spiegeln vor der Fokussierlinse justiert. Der dritte Spiegel davor sollte im Allgemeinen in seiner Position verbleiben. Zur Justage wird die Blende nach dem Kollimator auf den kleinsten Strahldurchmesser eingestellt. Den Strahl mit jetzt etwa 1mm Durchmesser positioniert man in der Mitte der beiden Spiegel. Fokussierlinse und Objektiv werden aus dem Halter entfernt. An die Stelle des Objektivs wird eine Justierhilfe [85] geschraubt, die zentrisch mit zwei Öffnungen mit 0,5mm Durchmesser versehen ist. Mithilfe der beiden Spiegel wird der Strahl so justiert, dass er die Öffnungen passieren kann. Dabei wird jeweils der Strahl mit dem ersten (weiter vom Objektivhalter entfernten) Spiegel auf die erste Öffnung und mit dem zweiten (näheren) Spiegel auf die zweite zentriert. Danach wird die Fokussierlinse eingesetzt und in lateraler Richtung so positioniert, dass der Strahl die Justierhilfe passiert. Ist dies erfolgt, wird das Objektiv wieder in den Halter eingesetzt und der Abstand der Fokussierlinse zur hinteren Fokusebene eingestellt. Der richtige Abstand ist erreicht, wenn im Objektraum ein kollimierter Strahl vorliegt.

Das verwendete Leica-Objektiv ist telezentrisch korrigiert. Die Lichtstrahlen zwischen Objektiv und Tubuslinse verlaufen also parallel. Um Bilder aus dem Objektbereich scharf

[13] San Jose, USA, `http://www.lumileds.com`
[14] Fremont, USA, `www.cambridgelasers.com`
[15] Kelheim, Deutschland, `www.pco.de`
[16] Arnheim, Niederlande, `http://www.euromex.nl`

aufnehmen zu können, muss der Abstand zwischen dem CCD-Chip der Kamera und der Tubuslinse sehr präzise eingestellt werden. Dies erfolgt, indem nur mit der Tubuslinse ein möglichst weit entferntes Objekt – idealerweise sollte es *unendlich* weit entfernt sein – mit der CCD-Kamera aufgenommen wird. Der Abstand Tubuslinse-Kamera wird nun so lange verändert, bis das Objekt scharf abgebildet wird. Eine noch präzisere Justage des Abstands erfolgt mit dem komplett aufgebauten Mikroskop. Die Halbwertsbreite in axialer Richtung von fluoreszierenden Nanokugeln mit einem Durchmesser von 100nm (vgl. Abschnitt 6.1.1) wird dabei gemessen und minimiert, indem der Abstand Tubuslinse CCD-Chip im Bereich weniger Zentimeter verändert wird.

Zur Justage des Spiegels, der das stehende Wellenfeld der Fluoreszenzanregung erzeugt, wird ein Objektträger mit dicht liegenden fluoreszierenden Nanokugeln mit Durchmesser <100nm verwendet (vgl. Abschnitt 6.1.1). Ohne dass der Spiegel eingebaut ist, wird die Fokusebene des Objektivs gesucht und der Objektträger in dieser Position belassen. Der Spiegel wird nun so angebracht, dass der Objektträger zwischen Objektiv und Spiegel liegt, und im Abstand 1mm vom Objektträger befestigt. Um störende Reflexionen zu vermeiden, wird zwischen Spiegel und Objektträger ein Immersionsöl (Zeiss) eingebracht. Im Allgemeinen sollte man bereits ohne weitere Justageschritte ein Interferenzmuster in Form von Streifen auf dem Bildschirm des Steuerrechners sehen. Falls dies nicht der Fall ist genügt es meist den Spiegel senkrecht zur optischen Achse des Objektivs auszurichten. Dazu werden die Einstellschrauben des Spiegelhalters leicht verdreht, was zu einer Verkippung des Spiegels führt. Falls die Interferenzstreifen schließlich sichtbar sind, wird der Spiegel leicht weiter verkippt, sodass die Zahl der Streifen kleiner wird. Wenn nur noch ein Interferenzstreifen – entweder ein Maximum oder ein Minimum der Intensität – sichtbar ist, liegt die Interferenzstruktur parallel zu den fluoreszierenden Nanopartikeln auf dem Objektträger und die Justage ist abgeschlossen.

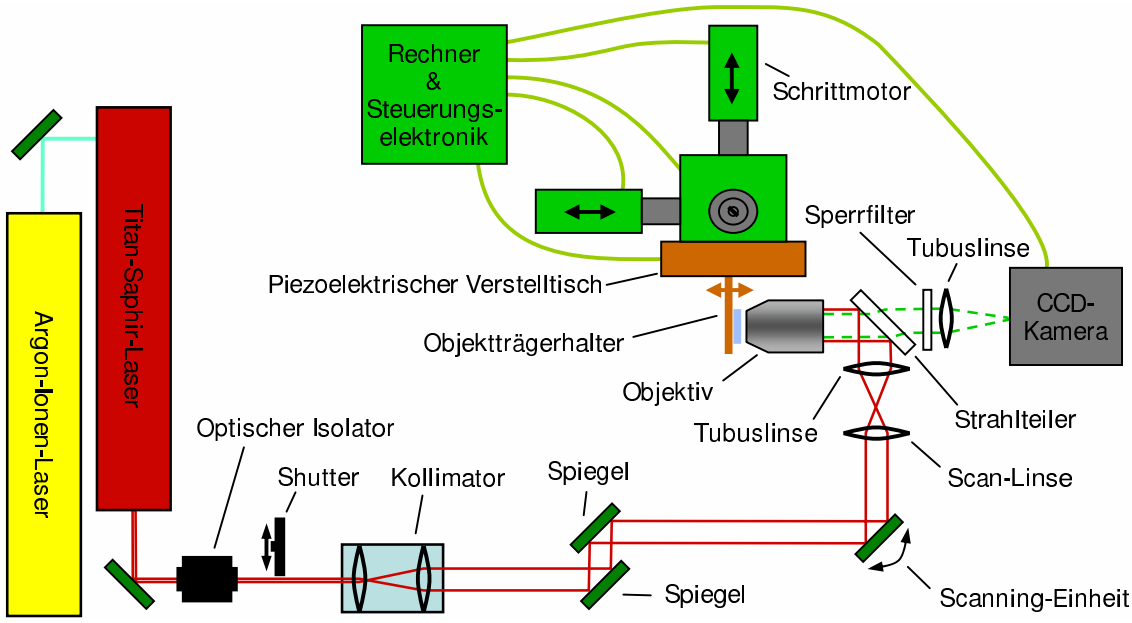


Abbildung 4.3: Schematischer Aufbau des Zweiphotonenmikroskops.

4.2 Zweiphotonenmikroskopie

Nachdem in Abschnitt 3.3 die theoretischen Grundlagen dargestellt wurden, beschreibt dieses Kapitel den im Rahmen dieser Arbeit entwickelten Aufbau eines Zweiphotonenmikroskops. Das Fluoreszenzlicht wird hierbei nicht punktweise mit einem Photomultiplier detektiert, wie häufig in kommerziellen Systemen realisiert, sondern eine komplette zweidimensionale Ebene wird mit einer CCD-Kamera oder einem bildverstärkenden Detektionssystem aufgenommen. Dazu wird der beugungsbegrenzte Fokuspunkt sehr schnell mit Galvanometerscannern über die Probe gerastert, um während der Aufnahmezeit der Kamera die gesamte Probe gleichmäßig abzutasten.

4.2.1 Aufbau

Abbildung 4.3 zeigt einen schematischen Überblick des Aufbaus. Fluoreszenz im sichtbaren Wellenlängenbereich wird über die Zweiphotonenanregung durch Licht im nahen Infrarot ($\lambda = 700 - 1000$nm) erzeugt. Da für eine effektive Anregung sehr hohe Intensitäten nötig sind, verwendet man bei der Zweiphotonenmikroskopie im Allgemeinen Laser, die ultra-kurze Pulse mit Pulsdauern von etwa $50 - 200$fs emittieren. Dadurch eröffnet sich auch die Möglichkeit Fluorezenzlebensdauern zu messen. Im Experiment kommt ein modengekoppelter Titan-Saphir-Femtosekundenlaser (Mira 900F, Coherent[17]) zum Einsatz, der von einem Argon-Ionen-Laser (Innova 310, Coherent) gepumpt wird. Bei einer Pumpleistung von 8W beträgt die mittlere Ausgangsleistung des Titan-Saphir-Lasers etwa 0,6W. Die Pulsdauer ist dabei <200fs und die Zentralwellenlänge liegt bei $\lambda = 773$nm. Ein optischer Isolator (Isowave I-7090-CM, $\lambda = 780$nm, Döhrer Elektrooptik[18]) verhindert,

[17] Santa Clara, USA, `http://www.coherent.com`
[18] Karlsbad, `http://www.döhrer.com`

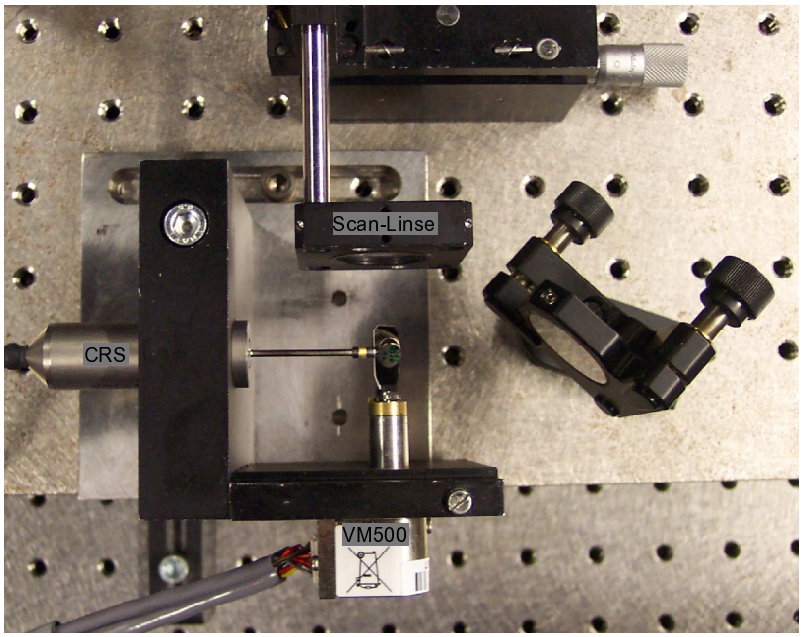


Abbildung 4.4: Fotografie der Galvanometerscanner.

dass Reflexionen an den optischen Elementen des Aufbaus zurück in den Laserresonator gelangen, die zu einem instabilen Betrieb des Lasers führen würden. Mit einem elektronischen Shutter lässt sich das Licht wahlweise über einen mechanischen Schalter oder computergesteuert ausschalten. Zum Aufbau des Shutters siehe [81]. Der Laserstrahl wird mit auf einer Mikrobank (Linos Photonics) im Abstand von 100mm positionierten Linsen (Best.-Nr: G322201000, G322345000, Linos Photonics) mit Brennweiten $f = 20$mm und $f = 80$mm auf 15mm $1/e^2$-Durchmesser aufgeweitet. Danach wird der Durchmesser des Strahls mit einer Irisblende auf 6mm verringert. Drei weitere Spiegel sorgen für die nötigen Freiheitsgrade, um den Strahl bezüglich der Scan-Einheit zu justieren. Die beiden Spiegel der Galvanometerscanner rastern den Strahl in x- und in y-Richtung, die jeweils in senkrechter Richtung zueinander und senkrecht zur Strahlrichtung liegen, über die Probe. Um Abberationen durch den Scan-Prozess zu minimieren, sind die Galvanometerspiegel in möglichst geringem Abstand voneinander angebracht. Ferner ist die Scan-Linse (Brennweite $f_{\mathrm{SL}} = 40$mm, Best.-Nr: G322337000, Linos Photonics) so positioniert, dass ihre Fokusebene zwischen den beiden Galvanometerspiegeln liegt (*close-coupled*-Konfiguration, siehe Abschnitt 3.3.1). Abbildung 4.4 zeigt eine Fotografie der beiden Scanner und ihre Anordnung bezüglich der Scan-Linse. Details zum Aufbau und zur Steuerung der Scan-Einheit werden in Abschnitt 4.2.2 und Anhang A beschrieben.

Mit der Scan-Linse und der Tubuslinse im Beleuchtungsstrahlengang (PAC368, Newport) mit Brennweite $f_{\mathrm{TL}} = 80$mm wird der Strahldurchmesser von etwa 6mm auf 12mm vergrößert, damit die Rückapertur des Objektivs (HCX PL APO, 63x, NA$= 0,7 - 1,4$, Ölimmersion, Leica) mit 11mm Durchmesser möglichst homogen ausgeleuchtet wird. Dies ist nötig, um den Strahl beugungsbegrenzt fokussieren zu können (Abschnitt 2.2). Die Scan-Linse ist auf einer Mikrobank montiert, sodass der Abstand in Strahlrichtung präzise variiert werden kann. Zur Positionierung senkrecht dazu wird ein Verstelltisch eingesetzt.

Die Tubuslinse lässt sich mithilfe eines Drei-Achsen-Translationshalters (M-LP-05-XYZ, Newport) justieren. Der Abstand d der Scan-Linse zur Tubuslinse ist so gewählt, dass $d = f_{\mathrm{SL}} + f_{\mathrm{TL}} = 120\mathrm{mm}$.

Zur Detektion wird das Anregungslicht vom Fluoreszenzlicht mit einem dichroitischen Strahlteiler (680DCSPXR, AHF Analysentechnik) getrennt. Ein Sperrfilter (E700SP, AHF Analysentechnik) filtert eventuell in den Detektionsstrahlengang gelangtes Licht des Lasers heraus. Das Objektiv und die Tubuslinse im Detektionsstrahlengang (1,25x, Brennweite $f = 200\mathrm{mm}$, Leica) sammeln das Fluoreszenzlicht auf und bilden es auf die CCD-Kamera (Imager3, LaVison, Spezifikationen siehe Abbildung 4.1) ab. Wie bereits vorher erwähnt, bilden beide Komponenten zusammen ein bezüglich sphärischer und chromatischer Abberationen korrigiertes System.

Anstelle der CCD-Kamera kann auch das Detektionssystem PicoStar HR12 (LaVision), bestehend aus einem Bildverstärker, einem Picosekunden-Verzögerungsgenerator und der CCD-Kamera (Imager3, LaVision), eingesetzt werden. Das gesamte System wird mit der kommerziellen Software DAVIS (LaVison) vom Rechner aus gesteuert. Der Bildverstärker ist aufgebaut aus einer S20 Photokathode (Durchmesser 18mm), einer einstufigen Micro-Channel-Plate (MCP) und einem P47 Phosphorschirm. Die Photokathode besitzt bei $\lambda = 500\mathrm{nm}$ eine Quanteneffizienz von etwa 12%. Mit einem schnellen Spannungspulser wird die Photokathode des Bildverstärkers für Zeiten zwischen 0,2ns und 1,0ns frei geschaltet. Die Wiederholrate beträgt maximal 100MHz. Da die Pulsrepetitionsrate des verwendeten Titan-Saphir-Lasers mit 76MHz kleiner ist, kann der Bildverstärker synchron zum Laser für jeden Puls geöffnet werden. Durch kontinuierliches Triggern der Photokathode mit 76MHz werden Instabilitäten und Drifts vermieden. Die Steuerelektronik besitzt dafür einen TTL-Eingang. Auf einem elektronischen Ausgang des Lasers liegt das Signal einer schnellen Photodiode an, auf die ein kleiner Teil des austretenden Lichts gelenkt wird. Dieses Signal kann als Triggersignal verwendet werden, indem es mit einem Hochfrequenzverstärker verstärkt wird. Der Bildverstärker lässt sich über eine Hochspannung ($260 - 800\mathrm{V}$) an die MCP an- und ausschalten. Die von der MCP beschleunigten Elektronen treffen auf den Phosphorschirm und erzeugen dort Photonen. Über ein Linsensystem wird dieses Licht auf den CCD-Chip der Kamera abgebildet. Am Picosekunden-Verzögerungsgenerator lassen sich Verzögerungszeiten von $0 - 20\mathrm{ns}$ in Schritten von 25ps einstellen. Bei den Messungen wird der Bildverstärker im COMB-Modus betrieben. Dabei wird für jedes Triggersignal ein Zeitfenster (*gate*) generiert, während dessen die Hochspannung an der MCP und damit der Bildverstärker zur Detektion angeschaltet wird.

Das Rastern der Probe in z-Richtung entlang der optischen Achse des Objektivs, erfolgt mit dem piezoelektischen Verstelltisch, der in Abschnitt 4.1.1 beschrieben wurde. Auch die Objektträgerhalterung und makroskopische Positionierung mit einem schrittmotorgesteuerten Verschiebetisch wurde vom in 4.1.1 beschriebenen Aufbau übernommen.

4.2.2 Galvanometeransteuerung

Zum Scannen des Laserstrahls über die Probe werden zwei kommerzielle Galvanometer verwendet, die mittels einer eigens entwickelten Steuerung über den Steuer-Rechner bedient werden. Folgender Abschnitt beschreibt den prinzipiellen elektronischen Aufbau. Eine detaillierte Beschreibung findet sich in Anhang A.

Da der Strahl sehr schnell über die Probe gerastert werden muss, um die Detektion mit der CCD-Kamera zu ermöglichen, wurden ein resonanter Hochfrequenzscanner vom Typ CRS (*Counter Rotating Scanner*) mit etwa 8kHz Resonanzfrequenz und ein Galvanometer Typ VM500 (beide von GSI Group[19]) verwendet, das mit variabler Signalform gesteuert werden kann.

Der resonante Hochfrequenzscanner wird mittels eines Steuerungsboards bei der mechanischen Resonanz von 7075±50Hz des Galvanometers betrieben. Die Amplitude und damit der Scan-Winkel (maximal 24°) wird über eine angelegte Spannung zwischen 0 und 5V eingestellt. Wegen der hohen mechanischen Kräfte, die bei diesen Frequenzen auftreten, wird ein Spiegel aus Beryllium verwendet. Die Apertur ist durch die Spiegelgröße auf 4,7mm begrenzt. Mit zwei Eingängen für TTL-Signale (Bits 00 bis 11) sind zusätzlich Vergrößerungsfaktoren zwischen 1 und 4 möglich. Da die Winkelauslenkung des Scanners sinusförmig mit einer Frequenz gleich der Resonanzfrequenz des Scanners ist, wurde die Amplitude des Scanners so eingestellt, dass der gesamte Scan-Bereich deutlich den aktiven Scan-Bereich übersteigt. Die Winkelauslenkung ist dann näherungsweise linear über das Gesichtsfeld und die Beleuchtungsintensität pro Pixel konstant.

Der Galvanometerscanner VM500 ist ein Ein-Achsen-Scanner mit variabler Signalform. Die Apertur des Spiegels beträgt wegen der rechteckigen Form $4-6$mm. Maximal wird ein Scan-Winkel von 50° erreicht. Die Steuerung des VM500 erfolgt über das mitgelieferte MiniSAX Board (Miniature Single Axis Controller). Dieses beinhaltet neben der Spannungsversorgung des Galvanometers und einer Temperaturregelung für die thermische Stabilität, auch ein Filtermodul mit einem Kerb-Filter (engl. *Notch Filter*) für die Anwendung bei sehr schnellen Scan-Prozessen oder steilen Signalformen. Das Galvanometer wird über ein differentielles Eingangssignal von $U=\pm 3$V betrieben und besitzt abhängig von der Signalform eine typische Bandbreite >3500Hz. Die Spannungsversorgung der beiden Galvanometerscanner erfolgt über ein lineares Labornetzteil mit geringer Restwelligkeit (Voltcraft PS-2403-D[20]).

Zur rechnergestützten Steuerung beider Galvanometer und zur Erzeugung der Signalform für den VM500 Scanner wurde ein Mikrocontroller (ATmega16, Atmel Corporation[21]) programmiert. Die Signalform für das VM500 Galvanometer wird mittels direkter digitaler Synthese (DDS) erzeugt. Dazu wird eine 12Bit Wertetabelle eines Dreieckssignals im Speicher des Mikrocontrollers ausgelesen und mittels eines parallelen 12Bit Digital-Analog-Wandlers (MAX530, Maxim Integrated Products[22]) in eine analoge Spannung konvertiert. Aus Speicherplatzgründen kann nur eine Wertetabelle auf dem Mikrocontroller gespeichert werden, sodass ein Dreieckssignal gewählt wurde. Die Frequenz des Dreieckssignals kann variabel über den Rechner eingestellt werden. Das Ausgangssignal wird mit einer analogen Schaltung zur manuellen Einstellung des Offset und der Amplitude weiterverarbeitet und dann auf den Eingang des MiniSAX-Controllers gegeben. Die TTL-Steuersignale werden direkt vom Mikrocontroller auf die entsprechenden Eingänge des MiniSAX geschaltet. Die Amplitude des CRS Galvanometerscanners lässt sich ebenfalls manuell über ein Potentiometer in einer analogen Schaltung einstellen. Auch die Steuersignale des CRS werden direkt vom Mikrocontroller auf den Eingang des Controller-Boards gegeben.

[19] München, Deutschland, `http://www.gsigrp.com`
[20] Bezugsquelle Conrad Electronic, `www.conrad.de`
[21] San Jose,USA, `http://www.atmel.com`
[22] Sunnyvale, USA, `http://www.maxim-ic.com`

Zur Steuerung über die serielle RS232-Schnittstelle wurde mit der Programmiersprache *Python*[23] eine graphische Benutzeroberfläche realisiert. Mit ihr lassen sich beide Scanner ein- beziehungsweise ausschalten, die Frequenzen 0Hz, 30Hz, 50Hz und 100Hz des Steuersignals für den VM500 wählen, sowie der Vergrößerungsfaktor des CRS zwischen 1 und 4 festlegen.

[23] Version 2.3.5, `http://www.python.org`

5 Analyse der SMI-Mikroskopiedaten

Aus den mittels SMI-Mikroskopie aufgenommenen Datensätzen lässt sich mit sehr hoher Präzision die Größe und die Position des untersuchten Objekts bestimmen. Die dazu verwendeten Analysealgorithmen werden in diesem Kapitel näher beschrieben. Ausgehend von der Theorie der Abbildung im SMI-Mikroskop wird erläutert, wie man aus der zusätzlichen Information über das Objekt, die in den axialen Intensitätsprofilen vorhanden ist, die Größe und Position extrahiert. Schließlich wird die praktische Vorgehensweise bei der Auswertung der Daten behandelt.

5.1 Theorie

Wie bereits in Abschnitt 3.4 beschrieben wurde, zeichnet sich die SMI-Mikroskopie durch ein Stehwellenfeld senkrecht zur optischen Achse aus, mit dem das untersuchte Objekt zur Fluoreszenz angeregt wird. Da das Stehwellenfeld die Beleuchtung in axialer Richtung moduliert, wird nur die Abbildung in dieser Richtung betrachtet. Aus den Gleichungen 2.4 und 3.10 folgt für die im SMI-Mikroskop gemessene Intensitätsverteilung in z-Richtung :

$$I_{\mathrm{det}}(z) = h_{\mathrm{SMI}}(z) \otimes f(z) \;\; \text{mit} \;\; f(z) = \int_{-\infty}^{+\infty} \int_{+\infty}^{-\infty} f(x,y,z)\, dx\, dy \;\; . \tag{5.1}$$

Dabei ist $f(x,y,z)$ die dreidimensionale Verteilung des Fluoreszenzfarbstoffes und $f(z)$ deren Projektion auf die z-Richtung. Im SMI-Mikroskop werden im Allgemeinen sehr kleine fluoreszierende Objekte untersucht, die axiale Ausdehnungen <200nm besitzen, da es sonst bei der Interpretation der Daten zu Mehrdeutigkeiten wegen der in der OTF fehlenden Raumfrequenzbereiche kommen kann (vgl. Abschnitt 3.4). Falls derartige Objekte analysiert werden, gilt Gleichung 5.1 allgemein für beliebige Farbstoffverteilungen. Bei der dreidimensionalen Bildaufnahme werden die fluoreszierenden Objekte durch den Fokus des Detektionsobjektivs verfahren und an jeder axialen Position wird ein zweidimensionales Bild mit der CCD-Kamera aufgenommen. Abbildung 5.1 zeigt die so gemessene Intensitätsverteilung in axialer Richtung (*Axial Intensity Distribution*, AID) eines optisch isolierten liegenden Objekts, dessen maximale axiale Ausdehnung kleiner ist als etwa 200nm. Optisch isoliert bedeutet in diesem Zusammenhang, dass die Objekte einen gegenseitigen Abstand besitzen, der größer ist als die optische Auflösung. Insbesondere heißt das, dass sich die Intensitätsverteilungen unterschiedlicher Objekte in der Bildebene nicht überlagern.

Der in der AID vorhandene Modulationskontrast $R = A_1/A_2$, enthält Information über Raumfrequenzbereiche, die durch Aliasing des Stehwellenfelds in den Transmissionsbereich des Objektivs verschoben werden. Dabei bezeichnen A_1 und A_2 die Amplituden der inneren und äußeren Einhüllenden der AID. Ohne die strukturierte Beleuchtung wären diese Raumfrequenzbereiche überhaupt nicht zugänglich. Macht man nun Annahmen über die Form der Farbstoffverteilung f, ist es möglich diese zusätzliche Information in der AID

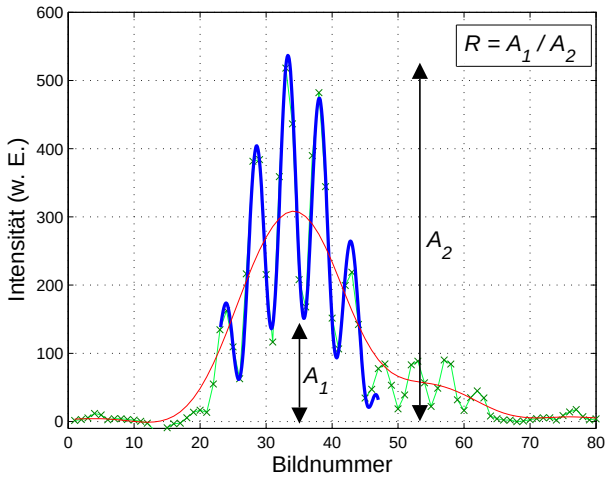


Abbildung 5.1: Die axiale Intensitätsverteilung eines Objekts, das kleiner als 200nm ist und optisch isoliert liegt. Die grüne Kurve gibt die mit einem × angegebenen Messwerte wieder. Die Fitkurve ist blau dargestellt. In roter Farbe ist die geglättete AID I_{smooth} gezeigt. Der Modulationskontrast R berechnet sich aus der Amplitude der inneren A_1 und äußeren Einhüllenden A_2 der AID.

zu interpretieren. Der Abbildungsprozess wird nach Gleichung 5.1 im Computer simuliert – so genannte virtuelle Mikroskopie. Daraus erhält man Kurven die bei gegebener Form von f und gegebener Anregungswellenlänge λ_{ill} den Modulationskontrast R mit der Objektgröße S in Zusammenhang setzen. Für verschiedene einfache Farbstoffverteilungen ist dies in Abbildung 5.2 dargestellt. Anhand der Kurven erkennt man, dass der Wert von R abhängig von der Form des Objekts deutlich unterschiedliche Größe besitzen kann. Dies kann zu Fehlinterpretationen der Objektgröße führen, falls falsche Annahmen über die Farbstoffverteilung gemacht werden.

Aus der AID kann zusätzlich die Position des Objekts mit erhöhter Genauigkeit im Vergleich zur Epifluoreszenz- oder konfokalen Mikroskopie bestimmt werden. Dies wird über die schmale Breite der Interferenzstruktur in der PSF von $\approx \lambda/(4n) \approx 90$nm und der damit höheren Lokalisationsgenauigkeit nach Gleichung 3.13 erreicht. Allerdings ergeben sich dabei Mehrdeutigkeiten, falls die Objektposition nicht genau einem Maximum des Stehwellenfeldes zugeordnet werden kann.

5.2 Praxis

Die AID wird aus dem dreidimensionalen Datensatz bestimmt, indem für jede axiale Position über eine laterale 3Pixel × 3Pixel große Region ($\approx$300×300nm^2) gemittelt und ein konstanter Hintergrund abgezogen wird. Dies erhöht die Zahl der Photonen, die pro Objekt detektiert werden, und damit das Signal-Rausch-Verhältnis.

Um die Objektgröße und Position zu bestimmen, muss der Modulationskontrast R und die Position des Objekts aus der AID extrahiert werden. Dabei bietet sich ein heuristischer,

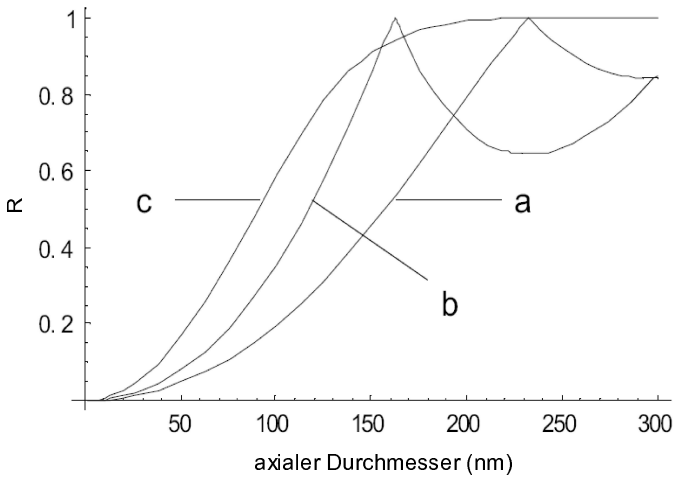


Abbildung 5.2: Der Modulationskontrast R in Abhängigkeit von der Objektgröße S bei einer Anregungswellenlänge von λ_{ill}=488nm für verschiedene Fluorezenzverteilungen (a) homogene Vollkugel, (b) Kugelschale, (c) gaußförmige Verteilung. Bildquelle [88].

möglichst einfacher Ansatz für eine Fitfunktion an, wodurch das Konvergenzverhalten des Fits in der Praxis, vor allem bei stark verrauschten AIDs, entscheidend verbessert wird. Die folgende Funktion wurde an die AID angepasst:

$$\mathrm{I}(z) = A[(1-r) + r \cdot \cos^2(k(z-z_0))] \cdot \mathrm{I}_{\text{smooth}}(z) + b \quad . \tag{5.2}$$

A ist die Amplitude, k die Wellenzahl, z_0 die Verschiebung des Stehwellenfeldes bezüglich des Ursprungs und b ein konstanter Hintergrundterm. $\mathrm{I}_{\text{smooth}}(z)$ beschreibt den Verlauf der geglätteten AID. Der Modulationskontrast R ist definiert als $R = A_1/A_2 = 1-r$ (siehe Abbildung 5.1). Zu beachten ist, dass die z-Koordinate hier der Position des Objektträgers entspricht. Der Ursprung liegt nicht wie bisher in der Fokusebene des Objektivs, sondern bei jeder Aufnahme wird dem ersten Bild des dreidimensionalen Datenstapels die Position z=0 zugewiesen. Die Positionen der folgenden Bilder berechnen sich aus der Bildnummer und der axialen Schrittweite bei der Datenaufnahme, die im Allgemeinen 40nm betrug.

Der durch den Fit bestimmte Wert von R wird mit den $R(S)$-Kurven aus Abbildung 5.2 in eine Objektgröße umgerechnet. In dieser Arbeit wurden sphärische fluoreszierende Nanokugeln zur Kalibration des Mikroskops und fluoreszenzmarkierte Genregionen untersucht, die in kondensierter Form vorlagen. Für die Farbstoffverteilung wurde deshalb eine homogen gefärbte Kugel zugrunde gelegt.

Die bisherigen Überlegungen gehen von idealen optischen Bedingungen aus. Insbesondere wird angenommen, dass das Stehwellenfeld von Laserstrahlen gleicher Intensität erzeugt wird. In der Realität ist dies meist nicht der Fall. Die Ursachen sind vielfältig wie beispielsweise Streuung im Präparat, Brechungsindexvariationen in der Mikroumgebung der Objekte oder ungleichmäßig teilende Strahlteiler bei der Erzeugung der beiden Strahlen. Falls einer der interferierenden Strahlen eine höhere Intensität besitzt, löschen sich diese an den Knoten des Stehwellenfeldes nicht mehr komplett aus. Dies hat zur Folge, dass die theoretische Beleuchtungs-PSF nun mit einer $\cos^2$-Funktion mit einem konstanten Zusatzterm beschrieben wird. Durch diesen nicht modulierenden Anteil *unmod* wird der Modula-

tionskontrast R systematisch zu groß bestimmt, was zu einer falschen Objektgröße führt. Um diese Probleme zu umgehen wird die Referenzobjektmethode angewandt [88]. Dabei wird der Wert von *unmod* anhand von Referenzobjekten definierter Größe und Form in einer separaten Messung bestimmt und bei der Auswertung der eigentlich interessierenden Objekte berücksichtigt. Diese Methode wurde auch in der vorliegenden Arbeit angewandt.

Im Allgemeinen liegt in der Fokusebene nicht notwendigerweise ein Maximum des Stehwellenfeldes, sondern beide sind gegeneinander um den konstanten Wert z_ϕ verschoben. Dies bedeutet für die AID, dass im Maximum der Einhüllenden kein Maximum der Interferenzstruktur liegt. Die Position eines Objektes mit axialer Ausdehnung kleiner etwa 200nm wird durch das Maximum der Einhüllenden z_1 bestimmt, falls keine Abberationen im Abbildungssysten vorliegen. Um nun die Positionsinformation der Interferenzstruktur auszunutzen, definiert man die Position des Objekts als das Maximum der Interferenzstruktur der PSF, das dem Maximum der Einhüllenden am nächsten liegt, also $z_{\mathrm{SMI}} = z_1 + z_\phi$. Obwohl es möglich wäre den Wert von z_ϕ experimentell zu bestimmen ist es für Distanzmessung unerheblich, da sich z_ϕ weghebt. In der Praxis hat es sich wegen Asymmetrien der AID durch Abberationen des optischen Systems als günstiger erwiesen, nicht das Maximum der Einhüllenden zu verwenden, sondern das gewichtete Maximum $z_{\max}$ der geglätteten AID $\mathrm{I}_{\mathrm{smooth}}$. Mit den Fitparametern z_0 und k aus Gleichung 5.2 folgt dann für die Position des Objekts:

$$z_{\mathrm{SMI}} = \mathrm{round}(\frac{k}{\pi}(z_{\max} - z_0)) \cdot \frac{\pi}{k} + z_0 \;\; \text{mit} \;\; z_{\max} = \frac{\sum_i z_i \cdot \mathrm{I}_{\mathrm{smooth}}(z_i)}{\sum_i \mathrm{I}_{\mathrm{smooth}}(z_i)} \quad . \tag{5.3}$$

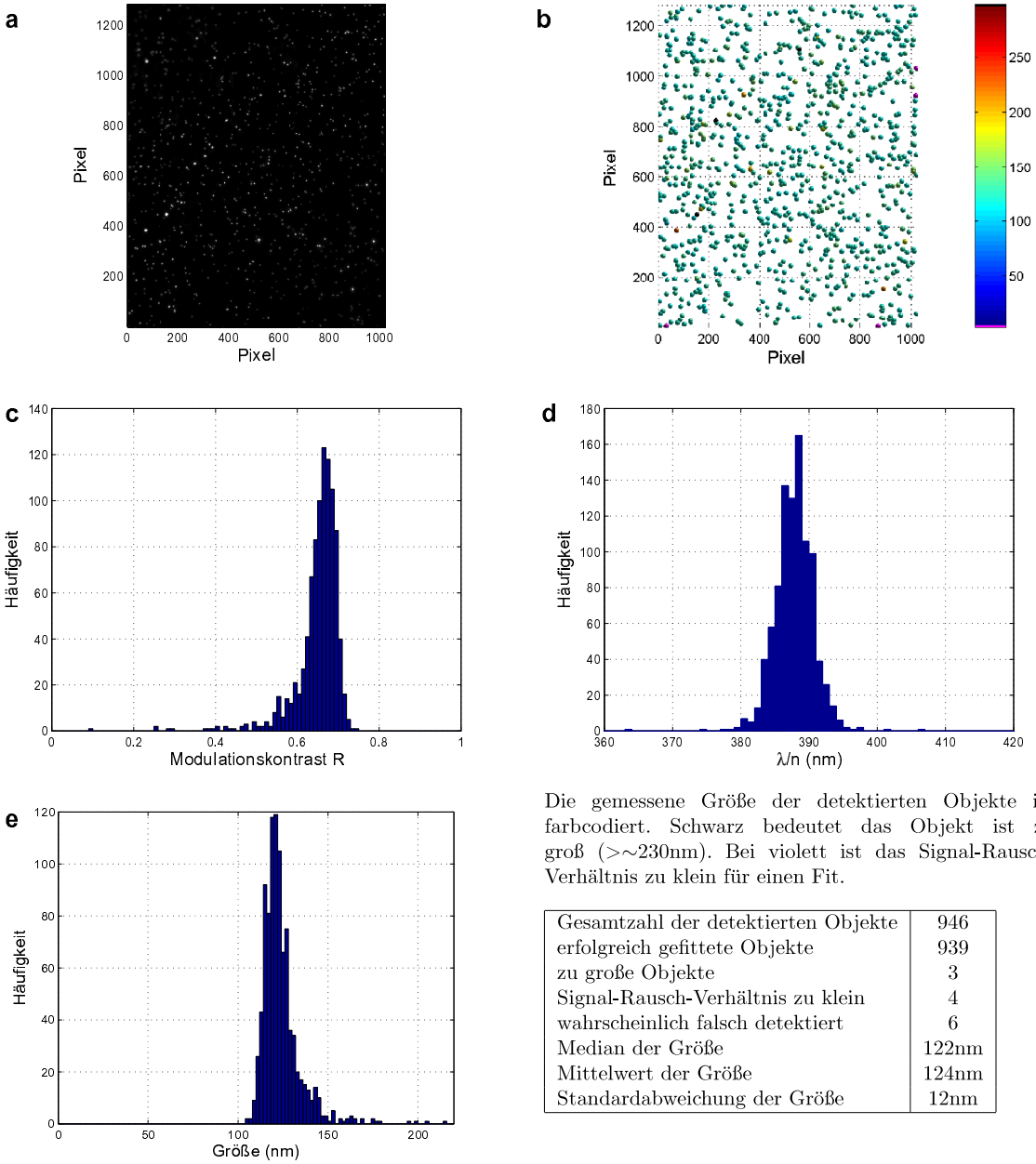
Dabei ist $\frac{\pi}{k} = \frac{\lambda_{\mathrm{eff}}}{2}$ der Abstand der Maxima der AID und $\mathrm{round}(x)$ die Rundungsfunktion. Trotz sorgfältiger Justage sind die Wellenfronten leicht gegen die Fokusebene verkippt, sodass z_ϕ nicht mehr als konstant betrachtet werden kann, sondern von der lateralen Position des Objekts abhängt. Da die Verkippung nur wenige Nanometer über das gesamte Gesichtsfeld beträgt, kann z_ϕ näherungsweise als lokal konstant betrachtet werden. Dies ist für die meisten Probleme ausreichend, da man an kleinen Distanzen interessiert ist.

Die Verteilung des aufgenommenen Fluoreszenzsignals in lateraler Richtung entspricht dem eines Epifluoreszenzmikroskops und wird in der Fokusebene in sehr guter Näherung durch eine Gauß-Funktion beschrieben. Um die laterale Halbwertsbreite $\mathrm{FWHM}_{\mathrm{lat}}$ der Intensitätsverteilung und die laterale Position des Objekts zu bestimmen, wird in der Fokusebene eine zweidimensionale Gauß-Funktion angepasst:

$$f(x,y) = I_0 \cdot \exp(-\frac{(x-x_0)^2 + (y-y_0)^2}{a}) + b \quad . \tag{5.4}$$

I_0 ist der maximale Intensitätswert, b ein konstanter Hintergrund und x_0 und y_0 die lateralen Koordinaten des Objekts. Die Halbwertsbreite berechnet sich aus $\mathrm{FWHM}_{\mathrm{lat}}$=8,33$\cdot a$.

Die Auswertung erfolgt voll automatisiert am Rechner. Der dreidimensionale Bildstapel wird in den Arbeitsspeicher des Computers gelesen und visualisiert. Ein Algorithmus sucht automatisch die Intensitätsverteilungen der fluoreszierenden Objekte, extrahiert wie oben beschrieben die AID und führt den Fit durch. Die gesamten Daten werden dann automatisch in Diagrammen dargestellt. Abbildung 5.3 zeigt dies anhand einer Kalibrationsmessung mit fluoreszierenden Nanokugeln. Neben einem zweidimensionalen Bild der aufgenommen Objekte werden die automatisch bestimmten Größen farbcodiert an der jeweiligen Position des Objekts im Gesichtsfeld wiedergegeben. In dieser Darstellung wird jeder



Die gemessene Größe der detektierten Objekte ist farbcodiert. Schwarz bedeutet das Objekt ist zu groß (>∼230nm). Bei violett ist das Signal-Rausch-Verhältnis zu klein für einen Fit.

Gesamtzahl der detektierten Objekte	946
erfolgreich gefittete Objekte	939
zu große Objekte	3
Signal-Rausch-Verhältnis zu klein	4
wahrscheinlich falsch detektiert	6
Median der Größe	122nm
Mittelwert der Größe	124nm
Standardabweichung der Größe	12nm

Abbildung 5.3: Diagramme, die bei der automatischen Auswertung generiert werden: (a) zweidimensionale Projektion eines Bildes der untersuchten Objekte; (b) die gemessenen Größen von jedem Objekt im Gesichtsfeld in einer farbcodierten Darstellung; (c,d,e) Histogramme des Modulationskontrastes R, der effektiven Wellenlänge λ/n und der berechneten Größe. Die Anregungswellenlänge betrug bei dieser typischen Messung von fluoreszierenden Testpartikeln $\lambda = 568$nm .

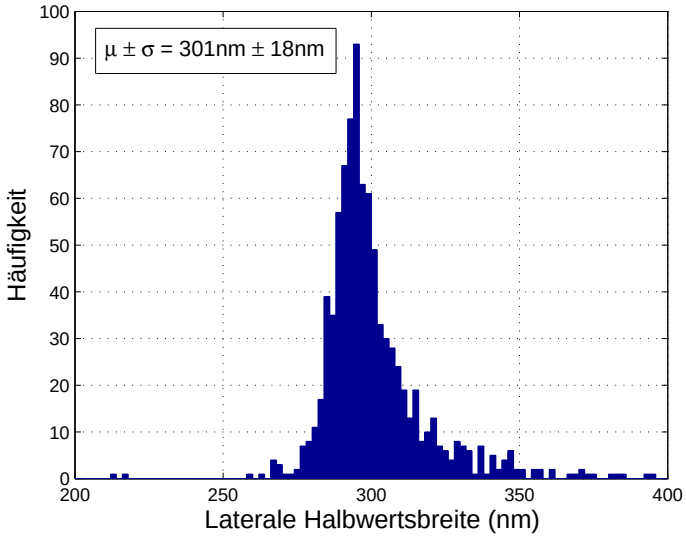


Abbildung 5.4: Laterale Halbwertsbreite der Fluoreszenzverteilung bestimmt über den Fit einer zweidimensionalen Gauß-Funktion. Verwendet wurden für die Messungen fluoreszierende Nanokugeln mit 110nm Durchmesser und die 568nm Anregungswellenlänge. Insgesamt wurden 946 Objekte untersucht. Der Mittelwert und die Standardabweichung der Verteilung sind mit μ und σ bezeichnet.

gemessenen Größe eine unterschiedliche Farbe zugeordnet. Zudem werden Histogramme des gemessenen Modulationskontrastes R, der effektiven Wellenlänge λ/n und die daraus berechneten Objektgröße angegeben. Ferner werden Mittelwert, Standardabweichung und Median der gemessenen Größenverteilung berechnet. Außerdem wird noch die Zahl der detektierten Objekte, die Zahl der Objekte, bei denen der Fit erfolgreich war, und die möglicherweise irrtümlich detektierten Objekte angegeben. Auch die laterale Halbwertsbreite der Intensitätsverteilung wird für jedes fluoreszierende Objekt im Datensatz bestimmt und in einem Histogramm dargestellt (siehe Abbildung 5.4).

6 Messungen und Ergebnisse

Die während dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen zur Genauigkeit von Positions- und Größenmessungen mit verschiedenen modernen Techniken der Fluoreszenzmikroskopie werden in diesem Kapitel dargestellt. Hierbei liegt der Schwerpunkt auf der Einsetzbarkeit für die Analyse der dreidimensionalen Genomnanostruktur. Bei den hier untersuchten Methoden handelt es sich um die SMI-, die spektrale Präzisionsdistanz- und die Zweiphotonenmikroskopie.

6.1 SMI-Mikroskopie

Folgender Abschnitt beinhaltet die Messungen und Ergebnisse, die mittels SMI-Mikroskopie vorgenommen wurden. Der Aufbau des Spiegel-SMI-Mikroskops wird durch Untersuchungen von fluoreszierenden Testobjekten charakterisiert und mit dem SMI-Mikroskop in der konventionellen Geometrie mit zwei Objektiven verglichen. Im Anschluss wird die Anwendbarkeit des Mikroskops für biologische Fragestellungen betrachtet. Dazu werden erste Messungen zur Analyse hypoxieinduzierter Genexpression vorgestellt. Im Folgenden wird die axiale Ausdehnung der untersuchten fluoreszierenden Nanokugeln auch synonym als Größe oder Durchmesser bezeichnet. Bei der Berechnung der Objektgröße aus dem Modulationskontrast wurde immer eine sphärische Farbstoffverteilung angenommen (vgl. Kapitel 5).

6.1.1 Durchführung der Messungen

Als physikalische Probekörper für die Untersuchung der Abbildungseigenschaften eines Mikroskops eignen sich Polystyrol-Kügelchen, in die ein Fluoreszenzfarbstoff eingelagert ist. Diese fluoreszierenden Kalibrationspartikel werden auch als *Beads*, *Nanospheres* oder Nanokugeln bezeichnet und sind in verschieden Größen und mit unterschiedlich Farbstoffen erhältlich. Der Farbstoff wird laut Dokumentation der Herstellers während des Herstellungsprozesses in die Polymermatrix eingebaut. Das Ergebnis ist eine komplett durchgefärbte Kugel mit zufällig verteilten Farbstoffmolekülen. Der Hersteller gibt zusätzlich noch eine mittlere Größe und eine Größenuniformität ($5 - 15\%$) der Nanokugeln an. Informationen mit welchen Methoden diese bestimmt wurden waren leider nicht erhältlich und mussten daher als korrekt angesehen werden. Für die Messungen dieser Arbeit wurden Polystyrol-Nanokugeln mit Durchmessern von $44 - 390$nm von Duke Scientific[1] oder MolecularProbes[2] verwendet. Das Maximum der Anregungs- und der Emissionswellenlänge für die verschiedenen Nanokugeln liegt bei: Grün fluoreszierend: 468nm/508nm; rot fluoreszierend: 542nm/612nm; TransFluoSpheres: 488nm/685nm.

[1] Palo Alto, USA, `http://www.dukescientific.com`
[2] Invitrogen GmbH, Karlsruhe,`http://www.probes.com`

Die Nanokugeln befinden sich in einer wässrigen Suspension, die vor der Präparation noch verdünnt werden muss. Die Objekte werden für einige Minuten in ein Ultrasschallbad gegeben, damit Beadcluster aufgelöst werden, die sich eventuell durch die Lagerung gebildet haben. Auf einen Standardobjektträger oder ein Standarddeckglas mit 170μm Dicke werden zirka 5μl der Suspension aufgetropft und mithilfe eines weiteren Deckglases gleichmäßig auf der Oberfläche verteilt. Wegen der hydrophoben Oberfläche des Deckglases wurde die Nanokugelsuspension mit Ethanol verdünnt. Nachdem die Suspension eingetrocknet ist, wird ein Tropfen des Einbettungsmediums Vectashield[3] (Brechungsindex $n \approx 1,47$) auf den Objektträger aufgebracht, das Deckglas darauf gelegt und mit Nagellack an den Rändern fixiert.

Der so präparierte Objektträger wird anschließend ins Mikroskop eingebracht. Mithilfe der Schrittmotoren lässt sich der Objektträger zwischen die Objektive beziehungsweise Objektiv und Spiegel fahren und grob positionieren. Zwischen den Objektiven und dem Objektträger beziehungsweise dem Spiegel wurde Immersionsöl[4] zur Verminderung störender Reflexionen durch Fehlanpassungen des Brechungsindex verwendet. Die Fokusebene wird ebenfalls mit den Schrittmotoren eingestellt. Um ein Ausbleichen der Fluoreszenz zu verhindern, insbesondere in schwach fluoreszierenden biologischen Päparaten, ist es zudem möglich, die LED-Durchlichtbeleuchtung zu verwenden. In dieser Anordnung können kurze Integrationszeiten gewählt werden, sodass die Suche der Fokusebene und auch die laterale Positionierung enorm erleichtert wird.

Zur eigentlichen Messung wird dann der Laser verwendet. Der Objektträger wird durch die Fokusebene des Detektionsobjektivs mit einem hochpräzisen Piezoverfahrtisch in 40nm Schritten verfahren und für jede Position wird ein zweidimensionales Bild mit der CCD-Kamera aufgenommen. Die Integrationszeiten der Kamera lagen bei den Messungen typischerweise zwischen 0,1s und 0,8s. Ein typischer dreidimensionaler Datensatz bestand aus etwa 80 zweidimensionalen Aufnahmen, sodass die Gesamtaufnahmezeit etwa 8s bis 1min betrug. Bei den Messungen wurde im Allgemeinen das Leica-Objektiv (HCX PL APO, 63x, NA= $0,7 - 1,4$, Ölimmersion) verwendet. Falls andere Objektive eingesetzt wurden, wird darauf gesondert hingewiesen. Die Größe des Gesichtsfeldes ergibt sich dann maximal zu 136μm$\times$109μm.

Für Messungen bei denen eine absolute Größenangabe relevant ist wurde die Referenzobjektmethode angewandt (Kapitel 5). Dazu wurde ein Objektträger mit einem Nanokugelpräparat bekannter Größe vor den eigentlich interessierenden Objekten untersucht und der unmodulierende Anteil der AID *unmod* bestimmt. Der gemessene Wert von *unmod* wird im jeweiligen Ergebnisteil angegeben. Bei Vergleichsmessungen ist die absolute Größe nicht wichtig und auf die Bestimmung kann verzichtet werden. Im Folgenden bezeichnet μ den Mittelwert und σ die Standardabweichung der gemessenen Verteilungen.

[3] Vectorlabs, Burlingame, USA, `http://www.vectorlabs.com`

[4] Brechungsindex n=1,52, Zeiss, Oberkochen, `http://www.zeiss.de`

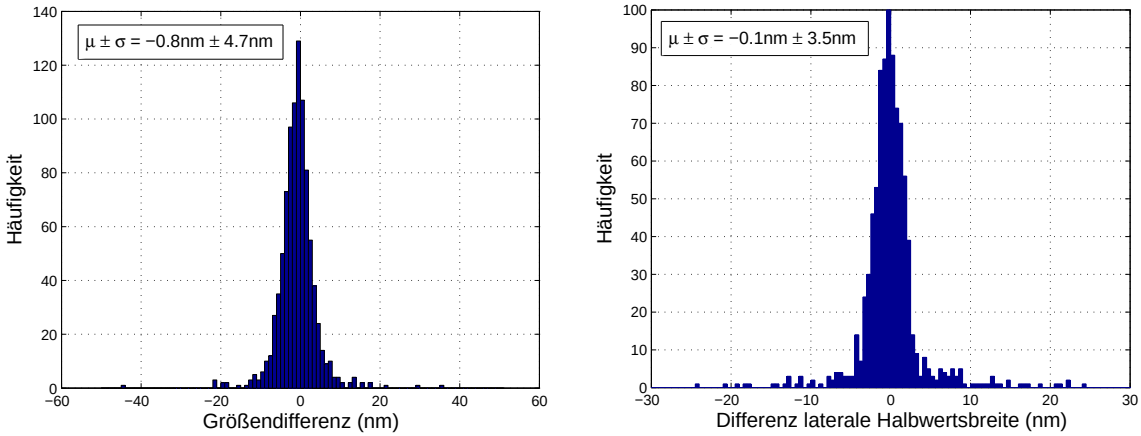


Abbildung 6.1: Ergebnis zweier nacheinander durchgeführter Messungen desselben Gesichtsfeldes. Aufgetragen ist der Mittelwert μ und die Standardabweichung σ von 939 analysierten Objekten. Linke Seite: Größenunterschied mit SMI-Mikroskopie gemessen. Rechte Seite: Unterschied der lateralen Halbwertsbreite.

6.1.2 Charakterisierung des SMI-Spiegel-Aufbaus

Verfahrbereich des Piezotischs

Der genaue Verfahrweg des Piezotischs wurde mit einem Michelson-Interferometer vermessen. Dazu wird das Objektiv entfernt und anstelle des Objektträgers ein Spiegel auf dem Objektträgerhalter platziert. Der kollimierte Strahl eines Helium-Neon-Lasers mit einer Wellenlänge von $\lambda = 632,8$nm wird mittels eines Strahlteilerwürfels in zwei Strahlen gleicher Intensität aufgeteilt. Ein Strahl wird in das Mikroskop eingekoppelt und vom Spiegel auf dem beweglichen Objektträgerhalter reflektiert. Der andere Strahl durchläuft eine etwa gleich lange Referenzstrecke und wird mit einem feststehenden Spiegel in sich reflektiert. Die beiden zurück laufenden Strahlen werden auf einem geeigneten Schirm (Papier) überlagert und zur Interferenz gebracht. Bei entsprechender Justierung bildet sich ein Muster aus, dessen Interferenzstreifen gerade den Abstand einer halben Wellenlänge also 632,8nm/2=316,4nm besitzen. Verändert man mit dem Piezotisch die Position des Objektträgers längs der optischen Achse, lässt sich der Verfahrweg kalibrieren, indem man für einen bekannten Weg die Zahl der Streifen zählt und mit dem Streifenabstand multipliziert.

Bei der Messung wurde der Piezotisch in 40nm Schritten um insgesamt 12,00μm verfahren. Der Mittelwert der Streifenanzahl aus vier unabhängigen Messungen betrug 38,25±0,96. Damit folgt für den gemessenen Weg 12,10±0,15μm. Die Ungenauigkeit des Verfahrbereichs des Piezotisches kann somit mit 0,9% angegeben werden, was für die hier relevanten Anwendungen ausreichend ist.

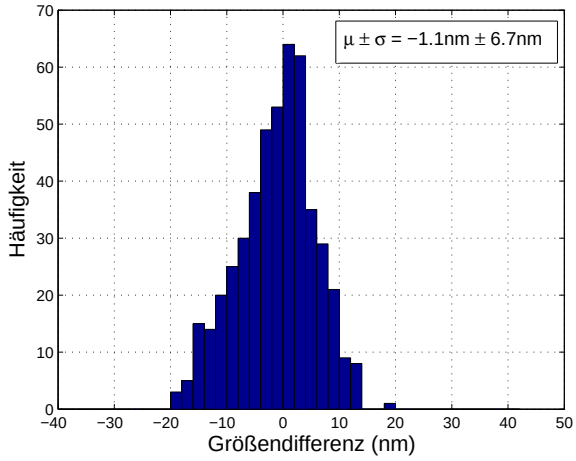


Abbildung 6.2: Größendifferenz zweier aufeinander folgender Messungen derselben Objekte mit konventioneller SMI-Mikroskopie.

Größenmessungen

Um einen genaueren Einfluss statistischer Fehler bei der Größenbestimmung zu untersuchen wurde dasselbe Gesichtsfeld direkt nacheinander zweimal aufgenommen. Dabei wurden TransFluoSpheres mit 110nm Durchmesser und die 568nm Anregungswellenlänge verwendet. Während der Auswertung wurde die automatische Objektsuche nur auf den ersten Datensatz angewandt, um sicher zu gehen, dass dieselbe Anzahl Objekte ausgewertet wird. Für jedes gefundene und in beiden Datensätzen erfolgreich gefittete Objekt wird die Differenz der gemessenen Größe gebildet. Die resultierenden Verteilungen der Größen und lateralen Halbwertsbreiten zeigt Abbildung 6.1 als Histogramme. Der Mittelwert und die Standardabweichung der gemessenen Größendifferenz wurde zu -0,8±4,7nm bestimmt. Die Differenz der lateralen Halbwertsbreite aus beiden Messungen beträgt -0,1±3,5nm. Die statistischen Fehler sind somit sehr klein und können vernachlässigt werden.

Vergleich mit konventioneller SMI-Mikroskopie: Prinzipiell sollte das SMI-Mikroskop mit einem Spiegel anstelle des zweiten Objektivs genauso gut wie der konventionelle Aufbau funktionieren. Größenmessungen an Nanokugeln zeigen unter optimalen Bedingungen dieselben Ergebnisse für beide Konfigurationen. Abbildung 6.3 (links) zeigt die Größenverteilung von Nanokugeln mit 110nm Durchmesser gemessen mit 568nm Laserwellenlänge und dem konventionellen SMI-Aufbau. Der Mittelwert von 124nm stimmt sehr gut mit dem Wert von 122nm überein, der für diese Sorte Nanokugeln mit dem Spiegel-Aufbau und derselben Wellenlänge bestimmt wurde (vgl. Abbildung 5.3). Die Standardabweichung ist mit 9nm etwas geringer als die 12nm, die mit dem Spiegel gemessen wurde. Auch der Einfluss statistischer Schwankungen bei der Größenbestimmung, der in zwei aufeinander folgenden Messungen des gleichen Gesichtsfeldes bestimmt wurde, liegt mit -1,1±6,7nm in derselben Größenordnung (siehe Abbildungen 6.2 und 6.1).

Aus allgemeinen optischen Überlegungen würde man jedoch vermuten, dass der Spiegelaufbau wesentlich empfindlicher auf nicht optimale optische Eigenschaften des zu unter-

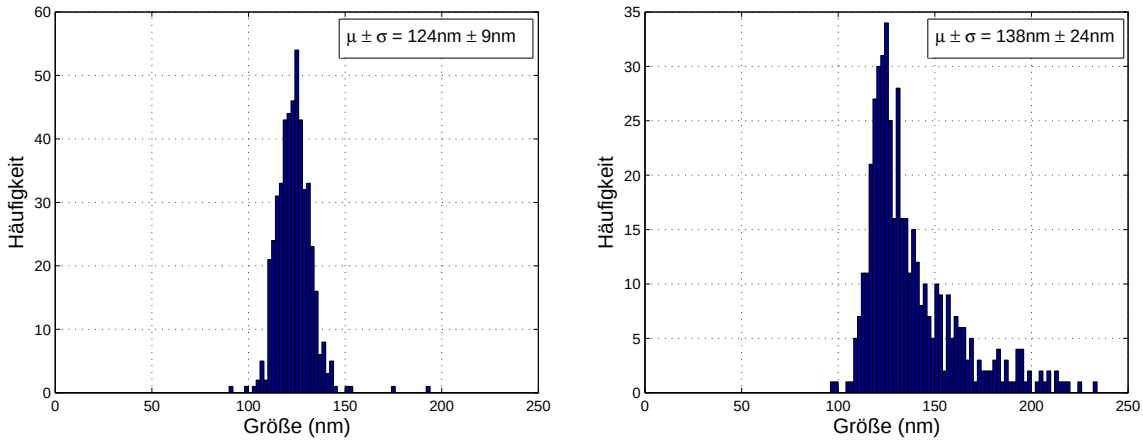


Abbildung 6.3: Histogramme der gemessenen Größen aufgenommen mit konventioneller SMI-Mikroskopie und mit dem Spiegel-Aufbau, bei dem jedoch die Fokussierlinse in Strahlrichtung dejustiert wurde. Verwendet wurden Nanokugeln mit 110nm Durchmesser und die 568nm Laserlinie. Der Mittelwert der gemessen Größe ist mit μ und die Standardabweichung mit σ bezeichnet.

suchenden Objekts reagieren könnte. Denn der am Spiegel reflektierte Strahl muss das komplette Präparat im ungünstigsten Fall zweimal durchlaufen, wenn sich die zu untersuchenden Objekte auf dem Deckglas befinden, bevor er am Ort der Objekte interferiert. Während im konventionellen Aufbau beide Teilstrahlen zusammen die Probe nur einmal durchlaufen müssen. Bei dünnen Präparaten ist dies sicher vernachlässigbar. Jedoch könnte dadurch in dicken Proben das Strahlprofil negativ beeinflusst und damit die Interferenzstruktur gestört werden. Um dies im Detail zu untersuchen wurde die Linse, die das Licht in die hintere Fokusebene des Objektivs fokussiert, absichtlich leicht in Strahlrichtung dejustiert. Daraus ergibt sich ein nicht kollimierter Strahl im Objektraum zwischen Objektiv und Spiegel. Durch die Aperturen im Objektiv kommt es immer zu einer geringen Ablenkung des Strahls an den Randbereichen. Durch die schlechte Justierung wird dies noch verstärkt. Diese Effekte führen in einigen Regionen zu einer nicht perfekten, inhomogenen Beleuchtungsstruktur. Dies ist in näherungsweise vergleichbar mit Abberationen wie Absorption, Beugung oder Streuung, die durch die zu untersuchenden Präparate verursacht werden können. Beispielsweise könnte eine Zelle im Strahl in etwa den gleichen Effekt auf die Beleuchtungsstruktur haben. Denn wegen der unterschiedlichen Brechungsindizes des Einbettungsmediums und der zellulären Strukturen hat sie einen ähnlichen Einfluss wie eine Linse. Im Experiment wurde dasselbe Gesichtsfeld eines Präparats mit Nanokugeln von 110nm Durchmesser untersucht. Zuerst mit dem Spiegel-Aufbau und dann mit dem SMI-Mikroskop in der konventionellen Anordnung mit zwei Objektiven. In Abbildung 6.3 sind die Histogramme der ermittelten Größen dargestellt. Der Mittelwert und die Standardabweichung von 124±9nm sind für den konventionellen Aufbau geringer als die mit dem Spiegel-Aufbau gemessenen 138±24nm. Beide Verteilungen besitzen ein Maximum bei etwa 125nm. Für den konventionellen Aufbau jedoch sind die gemessenen Größen symmetrisch um den Mittelwert verteilt. Hingegen wurde mit dem Spiegel eine unsymmetrische, etwas breitere Verteilung bestimmt, die vom Mittelwert bis hin zu 220nm abfällt.

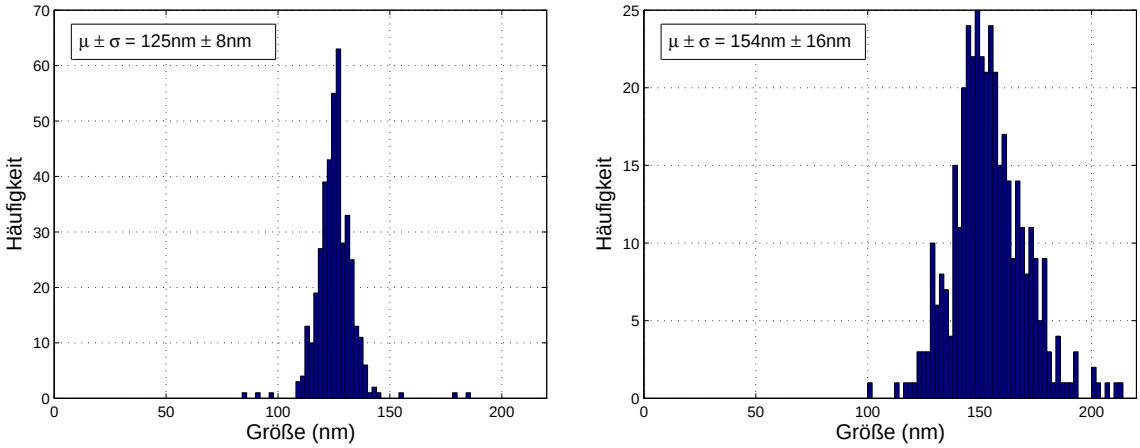


Abbildung 6.4: Histogramme der gemessenen Größen. (Links): Gemessen mit konventioneller SMI-Mikroskopie. (Rechts): Ein Spiegel, der das Anregungslicht reflektiert, wurde **nach** dem Beleuchtungsobjektiv angebracht und so das Stehwellenfeld erzeugt. Es wurde zweimal dasselbe Gesichtsfeld aufgenommen. Insgesamt wurden 405 Objekte untersucht.

In einem weiteren Experiment sollte versucht werden den Einfluss eines stark streuenden oder absorbierenden Präparats zu simulieren. Zunächst wurde die Probe mit dem konventionellen Aufbau mit zwei Objektiven vermessen. Danach wurde der Strahl des Interferometers abgeschirmt, der durch das nur zur Beleuchtung verwendete Objektiv läuft. Ein Spiegel vor der Fokussierlinse dieses Objektivs reflektiert das Licht des anderen Interferometerarms, welches das Präparat passiert und durch die Frontlinse in das Objektiv gelangt. Bei ausreichender Kohärenzlänge des Lasers – dies ist bei der verwendeten 568nm Laserlinie gegeben – interferieren hin und zurück laufender Strahl, sodass sich die Beleuchtungsstruktur ausbildet. Allerdings sind bei dieser Konfiguration deutliche Abberationen zu erwarten, da das Licht die Fokussierlinse, das Beleuchtungsobjektiv und das Präparat zweimal durchlaufen muss. Abbildung 6.4 zeigt die Histogramme der Größen, die unter diesen Bedingungen gemessen wurden. Der Mittelwert von 125nm und die Standardabweichung von 8nm, die für den konventionellen Aufbau gemessen wurden, stimmen gut mit den vorher für diese Konfiguration gemessenen Werten überein. Wird der Spiegel wie beschrieben nach dem Beleuchtungsobjektiv angebracht ist der Mittelwert mit 154nm deutlich größer. Auch die Standardabweichung ist bei diesem Aufbau mit 16nm doppelt so groß. Die Verteilung ist auch unter diesen optisch ungünstigen Bedingungen noch symmetrisch.

Vergleich verschiedener Objektive: Gemäß der Theorie der SMI-Größenbestimmung (Kapitel 5) sollte die Größenmessung eines fluoreszierenden Objekts unabhängig sein von der Gesamtbreite der SMI-PSF und damit von der numerischen Apertur (NA) des verwendeten Detektionsobjektivs. Um diese Hypothese zu untersuchen, wurden für die folgenden Messungen zwei verschiedene Objektive verwendet: Zum einen ein 100x-DIN-Objektiv (MIC100, 100x, NA=1,25, Ölimmersion, Euromex Microscopen). Zum anderen ein Hochleistungsobjektiv von Leica (HCX PL APO, 63x, NA= $0,7 - 1,4$). Für eine genaue Charakterisierung wurden mit der 458nm Wellenlänge grün fluoreszierende Nanokugeln mit 44nm, 71nm, 88nm, 100nm, 140nm und 200nm Durchmesser untersucht. Als Referenzob-

DIN-Objektiv

Nominelle Größe (nm)	Gemessene Größe (nm) Mittelwert ± Standardabweichung	Zahl der Objekte
71 ± 7	62 ± 14	115
88 ± 9	94 ± 11	94
100 ± 10	96 ± 16	73
140 ± 14	131 ± 10	78
200 ± 20	205 ± 24	36

Leica-Objektiv

Nominelle Größe (nm)	Gemessene Größe (nm) Mittelwert ± Standardabweichung	Zahl der Objekte
44 ± 7	51 ± 16	604
71 ± 7	86 ± 11	1932
88 ± 9	77 ± 11	1126
100 ± 10	99 ± 11	515
140 ± 14	130 ± 9	629
200 ± 20	188 ± 10	75

Tabelle 6.1: Die Größe der Nanokugeln, wie sie mit dem DIN- und dem Leica-Objektiv gemessen wurde. Es wurde die Anregungswellenlänge 458nm verwendet. In der ersten Spalte sind die nominellen Größen und die Abweichungen von der Uniformität dargestellt, wie sie vom Hersteller angegeben werden.

jekte wurden Beads mit 100nm Durchmesser verwendet. Der Wert des nicht modulierenden Anteils *unmod* betrug 0,14 für das Leica-Objektiv und 0,00 für das DIN-Objektiv.

Abbildung 6.5 zeigt die axialen Intensitätsverteilungen (AIDs) der beiden Objektive für die jeweilige Nanokugelgröße. Dies illustriert die Abhängigkeit des Modulationskontrastes R von der Größe des aufgenommenen Objekts. Je kleiner die Größe des fluoreszierenden Partikels, desto ausgeprägter wird die vorhandene Modulation und desto kleiner R. Für die 44nm Kugeln konnten wegen des sehr geringen detektierten Fluoreszenzsignals keine auswertbaren Datensätze und damit auch keine AID aufgenommen werden. Die Halbwertsbreiten der Intensitätsverteilungen des DIN-Objektivs sind mit 2,5μm etwa drei mal breiter als die des Leica-Objektivs mit 0,8μm. Die Histogramme der gemessenen Größe für die analysierten Nanokugelsorte sind in Abbildung 6.6 für das DIN-Objektiv und in Abbildung 6.7 für das Leica-Objektiv zusammengestellt. Tabelle 6.1 fasst die Ergebnisse für den Vergleich der Größenmessungen mit DIN- und Leica-Objektiv nochmals zusammen.

Die gemessenen Größen stimmen für beide Objektive innerhalb der Fehlergrenzen gut mit den nominellen Werten laut Herstellerangabe überein. Wie bereits in Abschnitt 6.1.1 bemerkt, unterliegt auch die nominelle Größe einer gewissen Schwankung. Für die Genauigkeit der SMI-Größenbestimmung wurde kein signifikanter Unterschied zwischen DIN- und Leica-Objektiv gefunden, wie man auch aus theoretischen Überlegungen folgert. Denn die Größenbestimmung über den Modulationskontrast R wie sie in Kapitel 5 beschrieben wurde ist in erster Näherung unabhängig von der Breite der Detektions-PSF, vorausgesetzt die untersuchten Objekte sind entsprechend klein ($\lesssim$200nm). Die Objektgröße wird nur

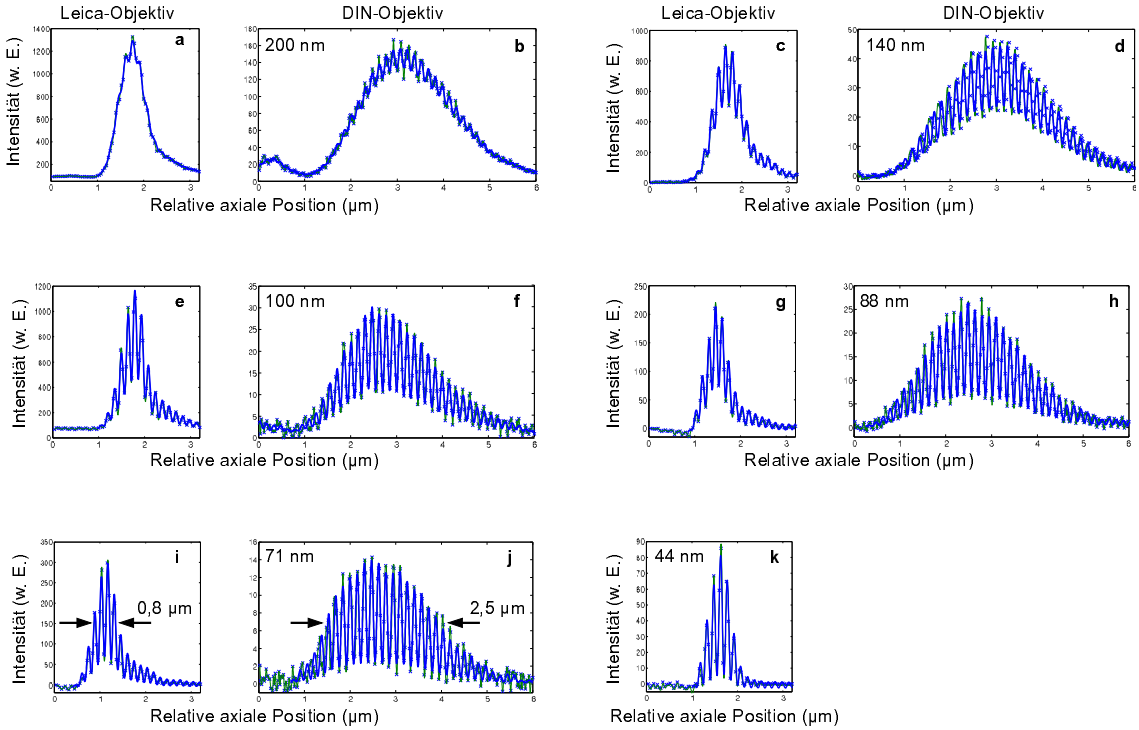


Abbildung 6.5: Vergleich der gemessen axialen Intensitätsverteilungen für DIN-(Bilder **b**, **d**, **f**, **h** und **j**) und Leica-Objektiv (Bilder **a**, **c**, **e**, **g**, **i** und **k**) bei Größen der Nanokugeln von $44 - 200$nm. In den Intensitätsprofilen ist die Abhängigkeit des vorhandenen Modulationskontrasts R von der Größe der untersuchten Objekte gut erkennbar. Die Halbwertsbreite der Einhüllenden der axialen Intensitätsverteilung des DIN-Objektivs ist wegen der geringeren effektiven numerischen Apertur etwa drei mal so groß wie die des Leica-Objektivs. Das Fluoreszenzsignal der Kugeln mit 44nm Durchmesser konnte mit dem DIN-Objektiv nicht detektiert werden. Bei diesen Experimenten wurde die Anregungswellenlänge $\lambda = 458$nm verwendet.

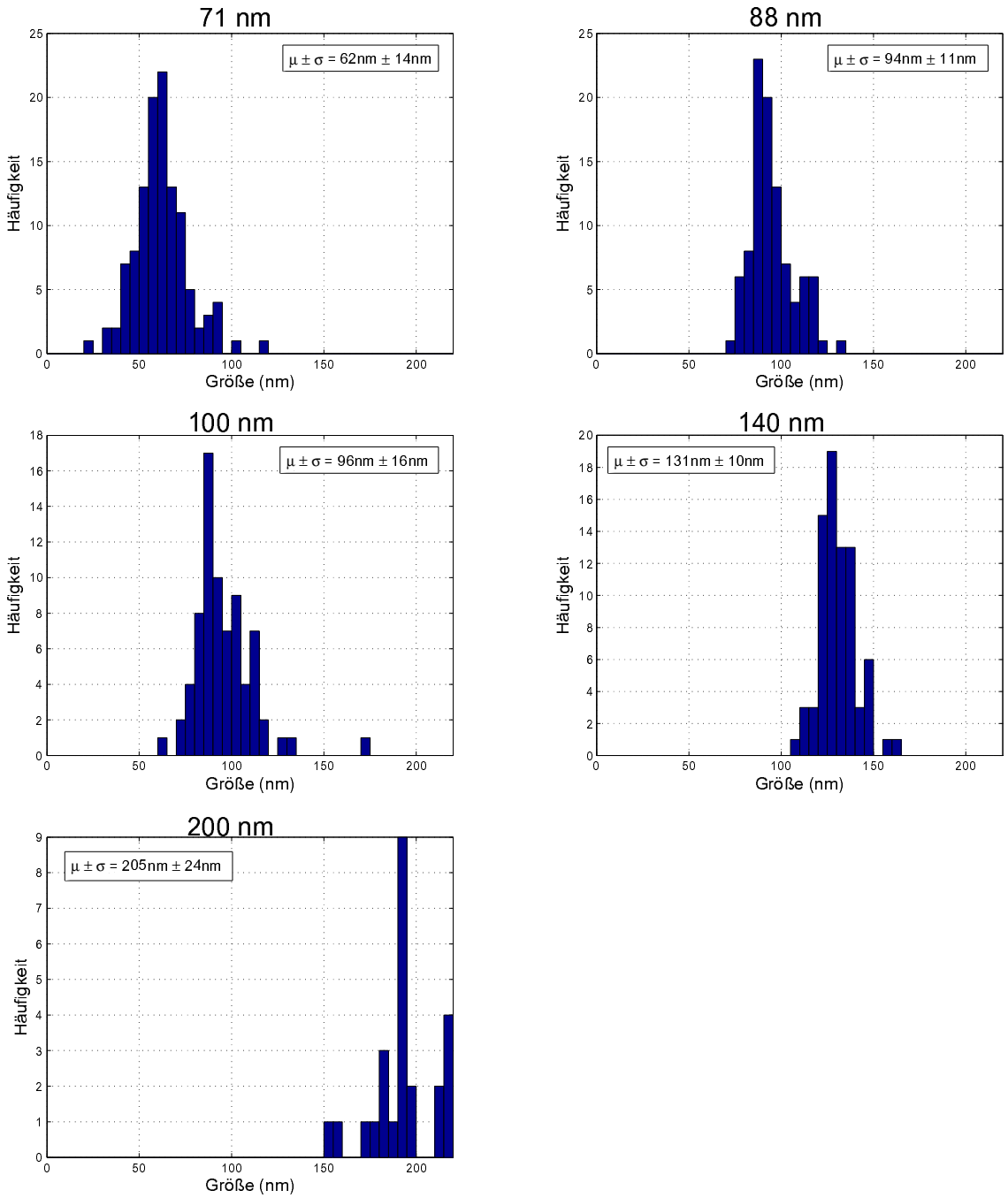


Abbildung 6.6: Histogramme der mit dem DIN-Objektiv gemessenen Größen für fluoreszierende Nanokugeln mit Durchmessern von $71 - 200$nm bei einer Anregungswellenlänge von $\lambda = 458$nm. In den Histogrammen werden die Mittelwerte μ und Standardabweichungen σ der Größenverteilungen angegeben.

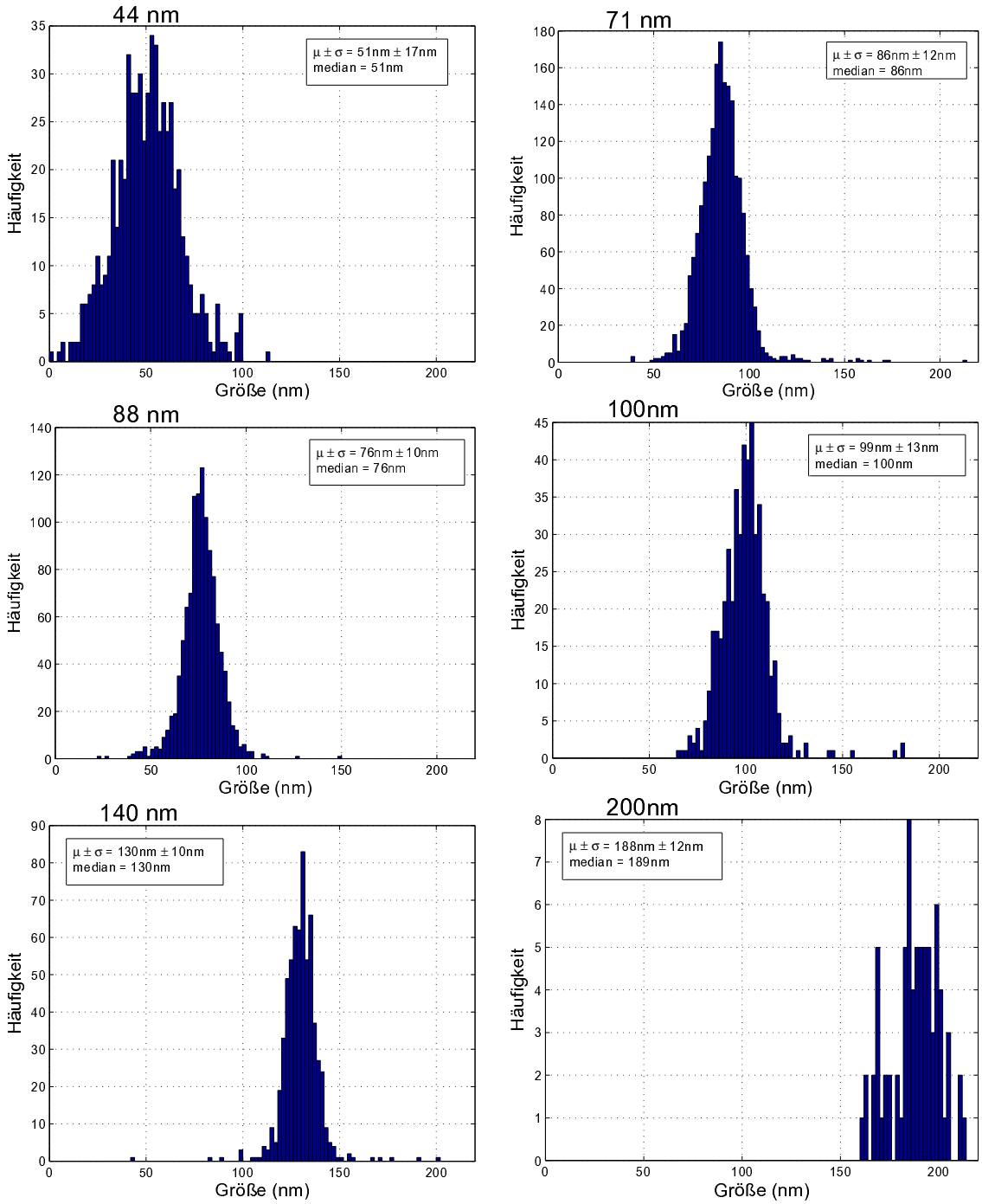


Abbildung 6.7: Histogramme der mit dem Leica-Objektiv gemessenen Größen für fluoreszierende Nanokugeln mit Durchmessern von 44 − 200nm bei einer Anregungswellenlänge von $\lambda = 458$nm. In den Histogrammen werden die Mittelwerte μ und Standardabweichungen σ der Größenverteilungen angegeben.

Obj. det.	Obj. gefit.	NA	Größe (nm)	$FWHM_{lat}$ (nm)	Intensität (counts)
575	405	0,6	110 ± 20	595 ± 52	21 ± 11
741	738	0,9	109 ± 12	394 ± 28	94 ± 51
735	733	1,0	112 ± 11	351 ± 26	148 ± 87
738	733	1,1	126 ± 11	319 ± 38	300 ± 164
753	749	1,2	125 ± 10	302 ± 36	344 ± 180

Tabelle 6.2: Einfluss der numerischen Apertur auf die Größenbestimmung.

aus dem Modulationskontrast R bestimmt, der in den axialen Intensitätsprofilen vorhanden ist. Damit hat die wegen der kleineren effektiven numerischen Apertur etwas breitere Detektions-PSF des DIN-Objektivs keinen Einfluss auf die Größenmessungen. Im folgenden Abschnitt wird dieser Aspekt nochmals genauer untersucht.

Einfluss der numerischen Apertur: Um den Einfluss der numerischen Apertur des Objektivs auf die Größenmessungen noch detaillierter zu untersuchen, wurde bei den folgenden Messungen dasselbe Objektiv (HCX PL APO, 63x, NA= $0,7 - 1,4$, Leica) verwendet und die numerische Apertur am Rändelring des Objektivs verstellt. Um die Ergebnisse der unterschiedliche Einstellungen präzise vergleichen zu können, wurde immer das gleiche Gesichtsfeld aufgenommen. Bei diesen Experimenten wurden Nanokugeln (TransFluoSpheres) mit 110nm Durchmesser verwendet und das Mikroskop mit der 568nm Laserlinie betrieben.

Beispiele für AIDs bei unterschiedlichen Einstellungen der numerischen Apertur sind in Abbildung 6.8 dargestellt. Zusätzlich wird ein Histogramm der lateralen Halbwertsbreiten der Intensitätsverteilung gezeigt. Aus dem Mittelwert dieser Verteilung wurde nach Formel 2.9 eine genäherte, mittlere effektive numerische Apertur für die jeweilige Einstellung des Rändelrings berechnet.

In Tabelle 6.2 ist die Zahl der detektierten Objekte, die Zahl der Objekte, bei denen der Fit erfolgreich war, die numerische Apertur (NA), die Halbwertsbreite in lateraler Richtung $FWHM_{lat}$, der Mittelwert und die Standardabweichung der gemessenen Objektgrößen und die mittlere Intensität des Fluoreszenzsignals angegeben. Die unterschiedliche Zahl der detektierten Objekte bei den Messungen ergibt sich aus der Tatsache, dass beim Drehen des Rändelrings ein leichter Druck auf die Objektiv-Halterung ausgeübt wird. Dadurch wird das Gesichtsfeld leicht verschoben und einige Objekte in den Randbereichen werden zusätzlich detektiert oder liegen nun außerhalb des Detektionsbereichs. Bei NA $= 0,6$ resultiert die geringe Anzahl der detektierten Objekte auch aus der großen Halbwertsbreite in axialer Richtung. Dadurch war es nötig 200 Bilder aufzunehmen – im Gegensatz zu 100 Bildern üblicherweise. Wegen des begrenzten Speichers des Auswerte-Rechners mussten die Daten aufgeteilt und separat ausgewertet werden, weshalb Objekte aus den Randbereichen der Teildatensätze heraus fielen. Zudem spielt sicherlich die geringe numerische Apertur und damit geringe Detektionsempfindlichkeit eine Rolle.

Bei allen Aufnahmen wurde für die Integrationszeit der CCD-Kamera 0,2s gewählt. Dadurch können die mittleren detektierten Intensitäten des Maximums des Fluoreszenzsignals direkt verglichen werden. Die Werte steigen erwartungsgemäß für höhere numerische Aperturen stark an. Beispielsweise steigt die detektierte Intensität zwischen NA $= 0,6$

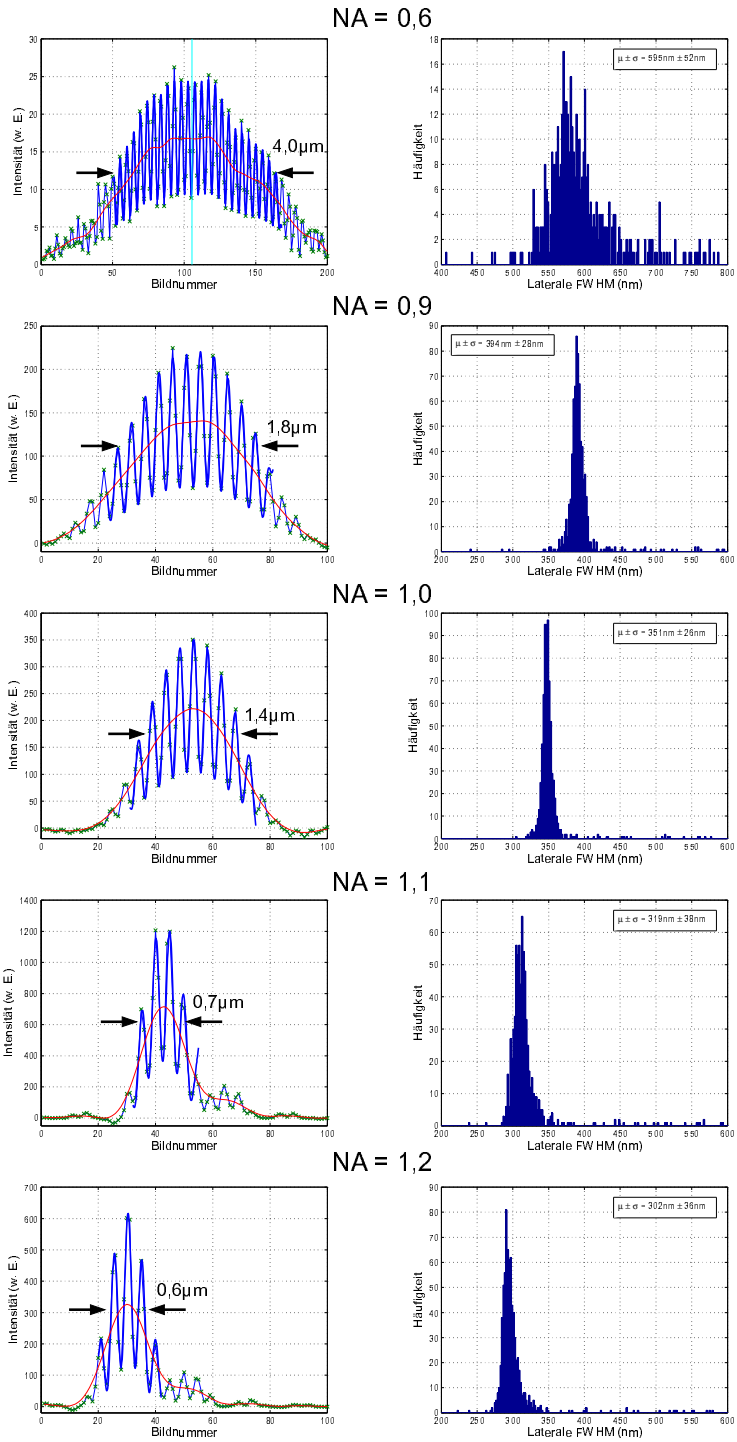


Abbildung 6.8: Gemessene axiale Intensitätsverteilungen und laterale Halbwertsbreiten für fluoreszierende Nanokugeln mit nominal 110nm Durchmesser bei verschiedenen numerischen Aperturen (NA) und einer Anregungswellenlänge von $\lambda = 568$nm. Man beachte die unterschiedliche Skalierung bei NA=0,6.

Wellenlänge 458nm

Nominelle Größe (nm)	Gemessene Größe (nm) Mittelwert ± Standardabweichung	Zahl der Objekte
63 ± 6	70 ± 15	679
100 ± 10	107 ± 10	148

Wellenlänge 514nm

Nominelle Größe (nm)	Gemessene Größe (nm) Mittelwert ± Standardabweichung	Zahl der Objekte
63 ± 6	78 ± 19	1268
100 ± 10	103 ± 12	174

Wellenlänge 568nm

Nominelle Größe (nm)	Gemessene Größe (nm) Mittelwert ± Standardabweichung	Zahl der Objekte
63 ± 6	66 ± 10	440
100 ± 10	104 ± 10	1322

Tabelle 6.3: Gemessene Größen der Nanokugeln mit Anregungswellenlängen $\lambda_{\text{ex}} = 458\text{nm}$, $\lambda_{\text{ex}} = 514\text{nm}$ und $\lambda_{\text{ex}} = 568\text{nm}$. In der ersten Spalten wurden die nominellen Größen laut Hersteller angegeben. Verwendetes Objektiv: Leica, 63x, NA $= 1,4$.

und NA $= 1,2$ um das 16-fache. Dies ist auch anhand der in Abbildung 6.8 dargestellten AIDs erkennbar. Allerdings wurde für NA $= 1,1$ zufälligerweise ein sehr helles Objekt ausgewählt.

Die Mittelwerte der gemessenen Größen werden für kleinere numerische Aperturen kleiner und liegen dichter am nominellen Wert. Insbesondere die beiden Werte von NA $= 1,1$ und NA $= 1,2$ liegen relativ weit weg vom erwarteten Durchmesser von 110nm. Eine mögliche Ursache könnte die Breite der AID sein. Denn bei geringeren Aperturen ist die AID wegen der breiteren Detektions-PSF breiter, sodass mehr Maxima beziehungsweise Minima der Modulationsstruktur im Fit berücksichtigt werden. Dadurch sollte sich insbesondere der Einfluss einer Asymmetrie bei einer schmaleren AID stärker bemerkbar machen.

Einfluss unterschiedlicher Wellenlängen: Auch bei der Verwendung unterschiedlicher Wellenlängen zur Fluoreszenzanregung sollten sich die Eigenschaften der Größenbestimmung mittels SMI-Mikroskopie gemäß theoretischer Betrachtungen nicht unterscheiden. Um dies zu überprüfen wurden rot fluoreszierende Nanokugeln mit 63nm und 100nm Durchmesser im Mikroskop bei 458nm, 514nm und 568nm Anregungswellenlänge analysiert. Der nicht modulierende Anteil der AID *unmod* wurde in separaten Messungen bestimmt zu $unmod(458\text{nm}) = 0,10$; $unmod(514\text{nm}) = 0,10$; $unmod(568\text{nm}) = 0,16$. Bei diesen Messungen wurde jeweils ein unterschiedliches Gesichtsfeld aufgenommen, sodass ein Vergleich der Wellenlängen nur über den Mittelwert der gemessenen Größenverteilung erfolgen kann. Die Ergebnisse sind zusammengefasst in Tabelle 6.3. Die Messwerte stimmen mit den nominellen Größen im Rahmen der durch die Standardabweichungen gegebenen Messgenauigkeit für die drei Wellenlängen überein.

458nm/514nm

Nanokugel	Größe (nm) $\mu \pm \sigma$ 458nm/514nm	Δ-Größe (nm) $\mu \pm \sigma$	Zahl gefit./det. Objekte 458nm/514nm/beide/det.
R63	69±16/83±17	-16 ± 20	791/922/755/965
R100-1	109±8/99±8	4 ± 10	152/152/149/155
R100-2	107±7/103±8	-2 ± 9	177/148/147/178

488nm/568nm

Nanokugel	Größe (nm) $\mu \pm \sigma$ 488nm/568nm	Δ-Größe (nm) $\mu \pm \sigma$	Zahl gefit./det. Objekte 488nm/568nm/beide/det.
T110	118±13/123±11	-5±17	992/1036/960/1080

Tabelle 6.4: SMI-Größenbestimmung derselben Objekte mit verschiedenen Wellenlängen. Es wurde jeweils dasselbe Gesichtsfeld direkt hintereinander aufgenommen, die gefundenen Objekte ausgewertet und die Größendifferenz Δ aus den Signalen der beiden Kanäle gebildet. Untersucht wurden rot fluoreszierende Nanokugeln mit 63nm (R63) und 100nm (R100) Durchmesser und TransFluoSheres (T110) mit 110nm Durchmesser. Der jeweilige Mittelwert ist mit μ und die Standardabweichung mit σ bezeichnet. Zusätzlich ist noch die Zahl der Objekte angegeben, die in den jeweiligen Farbkanälen separat und in beiden Farbkanälen erfolgreich gefittet werden konnten. Die Gesamtzahl der detektierten Objekte ist ebenfalls angegeben. Die Wellenlängenkombinationen waren $\lambda_{\text{ex}} = 458$nm, $\lambda_{\text{ex}} = 514$nm und $\lambda_{\text{ex}} = 488$nm, $\lambda_{\text{ex}} = 568$nm. Verwendetes Objektiv: Leica, 63x, NA $= 1,4$.

Eine genauere Analyse der Wellenlängenabhängigkeit wurde in einem weiteren Experiment unternommen, bei dem dasselbe Gesichtsfeld mit unterschiedlichen Anregungswellenlängen direkt hintereinander aufgenommen wurde. Als Testobjekte dienten rot fluoreszierende Nanokugeln mit 63nm (R63) und 100nm (R100) Größe für die Wellenlängenkombination 458nm/514nm und TransFluoSpheres mit Durchmesser 110nm (T110) für die 488nm/568nm Kombination. Die Datensätze für jede Wellenlänge wurden ausgewertet und dann die gemessene Größe eines jeden Objekts im einen Farbkanal von der entsprechenden Größe im anderen Farbkanal abgezogen.

Die Ergebnisse aller Messungen sind zusammengefasst in Tabelle 6.4. Die Mittelwerte der gemessenen Größen stimmen für die 458nm/514nm-Wellenlängenkombination für die beiden unabhängig voneinander untersuchten Präparate mit 100nm Kugeln gut überein. Die Mittelwerte und Standardabweichungen der Größendifferenzen der einzelnen Objekte sind mit 4±10nm beziehungsweise -2±9nm sehr gering. Für die 63nm Kugeln allerdings ergibt sich bereits eine große Abweichung beim Vergleich der Mittelwerte: 69±16nm (458nm) verglichen mit 83±17nm (514nm). Der Mittelwert und die Standardabweichung der Größendifferenz der einzelnen Objekte ergibt sich zu -16nm±20nm. Im Rahmen der Messgenauigkeit kann jedoch Übereinstimmung bei den Größenmessungen in beiden Farbkanälen erzielt werden. Die zu groß gemessenen Werte der 63nm Kugeln bei 514nm Wellenlänge sind konsistent mit den Werten aus unabhängigen Messungen, die bereits in Tabelle 6.3 gezeigt wurden. Für die Wellenlängenkombination 488nm/514nm stimmen die Mittelwerte der gemessen Größen gut überein. Die gemessenen Größendifferenzen besitzen einen Mittelwert von -5nm. Die große Standardabweichung der Größendifferenz ist wahrscheinlich

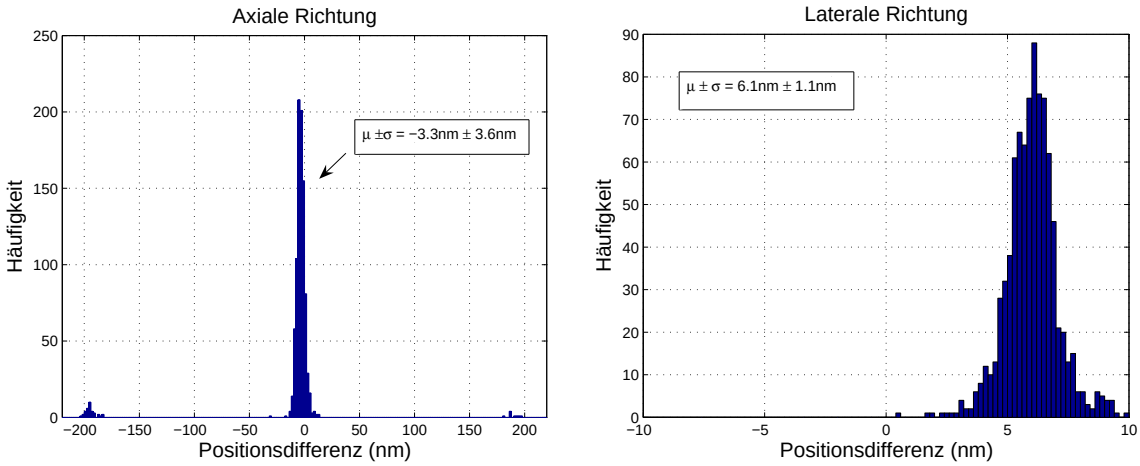


Abbildung 6.9: Linke Seite: Positionsunterschied in axialer Richtung bei zwei aufeinander folgenden Messungen. Rechte Seite: Positionsunterschied in lateraler Richtung. Anregungswellenlänge 568nm, 110nm Nanokugeln, 939 Objekte analysiert. Mittelwert μ und Standardabweichung σ.

auf ein nicht gaußförmiges Strahlprofil des 488nm Lasers zurückzuführen. Denn während der Messungen war die optische Faser defekt, mit der der Strahl in das Mikroskop eingekoppelt wurde. Dies äußerte sich an einem ringförmigen Strahlquerschnitt. Unter diesen Umständen könnte eine inhomogene Beleuchtungsstruktur für die großen Abweichungen verantwortlich sein. Gegen diese These spricht allerdings die nicht wesentlich erhöhte Standardabweichung des Mittelwerts der gemessenen Größen bei 488nm Wellenlänge.

Distanzmessungen am SMI-Spiegel-Aufbau

Neben einer genauen Größenbestimmung erlaubt die für SMI-Mikroskopie typische Modulation der axialen Intensitätsverteilung sehr präzise Positions- und Distanzmessungen.

Zur Messung der Lokalisierungsgenauigkeit wurde eine Präparation mit 110nm Nanokugeln (TransFluoSpheres) bei 568nm zweimal direkt hintereinander mit dem Spiegel-Aufbau aufgenommen. Bei der automatischen Auswertung wurden 939 Objekte in beiden Datensätzen erfolgreich an die detektierten Intensitätsverteilungen angepasst. Für jedes Objekt lässt sich die Position in axialer Richtung sehr präzise bestimmen, indem die Information, die das Stehwellenfeld liefert, ausgenutzt wird (siehe Kapitel 5). Die Differenz der axialen Position in beiden Aufnahmen zeigt Abbildung 6.9 als Histogramm. Der Mittelwert und die Standardabweichung der Positionsdifferenz beträgt -3±4nm. Einige Werte liegen bei etwa ±190nm. Dies entspricht gerade dem Abstand der Maxima des Stehwellenfeldes. Bei diesen Werten wurde die Position in den beiden Datensätzen jeweils einem anderen Maximum des Stehwellenfeldes zugeordnet. Als mögliche Ursache dafür kommt Rauschen oder eine Lage genau zwischen zwei Maxima des Stehwellenfeldes in Frage. Für die laterale Richtung ist die Reproduzierbarkeit der Positionsbestimmung ebenfalls dargestellt in Abbildung 6.9. Es ergibt sich ein Mittelwert und eine Standardabweichung von 6±1nm. Betrachtet man nur die x-Richtung beträgt der Mittelwert 2±1nm und 6±1nm nur in y-Richtung. Da die

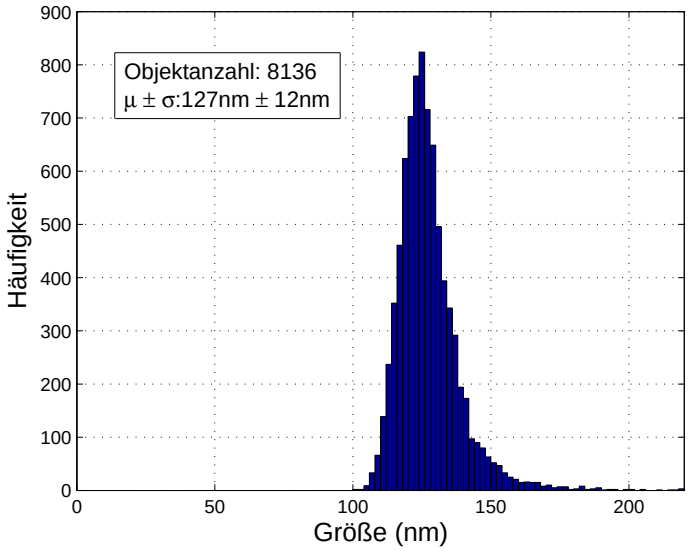


Abbildung 6.10: Schnelle Analyse vieler Objekte. 12 unterschiedliche Gesichtsfelder wurden aufgenommen, analysiert und die Gesamtdaten in einem Histogramm dargestellt. Die Gesamdauer der Messung betrug 40 Minuten. Verwendet wurden 110nm Nanokugeln und die Anregungswellenlänge 568nm.

Gravitation in y-Richtung auf den Objektträger wirkt, ist die Abweichung vermutlich auf ein Absinken des Objektträger zwischen den Messungen zurückzuführen.

6.1.3 Potenzial für Hochdurchsatzmikroskopie

Für die praktische Anwendbarkeit dreidimensionaler Mikroskopietechniken ist die Aufnahmezeit für einen Datensatz ein entscheidender Parameter.

Hier werden Betrachtungen zur SMI-Mikroskopie im Bezug auf eine schnelle Analyse vieler Objekte am Beispiel der Größenmessung an fluoreszierenden Nanokugeln bei einer Anregungwellenlänge von 568nm dargestellt. Verwendet wurde für diese Messungen der Spiegel-Aufbau. Jeder dreidimensionalen Datensatz, der aus 80 zweidimensionalen Aufnahmen besteht, wurde in etwa 20s aufgenommen. Insgesamt wurden 12 unterschiedliche Gesichtsfelder vermessen. Die Gesamtdauer der Datennahme am Mikroskop, die das Einlegen des Objektträgers in den Halter, das Positionieren zwischen Objektiv und Spiegel, das Anbringen des Immersionsöls und die Suche der Fokusebene beinhaltet, war in 40min abgeschlossen. Die weitgehend automatisierte Auswertung der Daten dauerte zirka zwei Stunden. Insgesamt konnten so 8136 fluoreszierende Objekte in kurzer Zeit gemessen werden. Der Mittelwert μ und die Standardabweichung σ wurden zu 127±12nm bestimmt, was mit den Messungen am konventionellen SMI-Mikroskop übereinstimmt. Die Gesamtdaten der gemessenen Größen sind als Histogramm in Abbildung 6.10 dargestellt. Damit ist eine mittlere Größenbestimmungsrate von 1 Objekt pro Sekunde inklusive Auswertung möglich.

6.1.4 Biologische Anwendung

Im folgenden Abschnitt wird die Anwendbarkeit der SMI-Mikroskopie mit Spiegel im Hinblick auf biologische Fragestellungen untersucht. Dabei wurden die Ergebnisse von Größenmessungen des Spiegel-Aufbaus mit denen des konventionellen Aufbaus in biologischen Präparaten verglichen. Da die Messungen mit dem Spiegel-Aufbau durchgeführt werden sollten, musste zunächst gezeigt werden, dass auch in biologischen Präparaten beide Aufbauten zu identischen Ergebnissen kommen. Im weiteren Verlauf der Messungen wurden erste Schritte auf dem Weg zu einer genauen Analyse hypoxieinduzierter Genexpression unternommen. Bei diesen Messungen wurde, sofern nicht explizit darauf hingewiesen, der SMI-Spiegel-Aufbau und die 458nm Wellenlänge verwendet. Die Präparate wurden im Rahmen eines Kollaborationsprojekts von Christoph Wotzlaw aus der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Joachim Fandrey am Institut für Physiologie der Universität Duisburg-Essen hergestellt.

7q22 Genregion

Erythropoetin (EPO) ist ein Glykoprotein-Hormon, welches als Wachstumsfaktor bei der Bildung roter Blutkörperchen (Erythrozyten) eine entscheidende Rolle spielt. Bei einer sich verändernden Sauerstoffverfügbarkeit wird das EPO-Niveau im Blut durch die Expression des EPO-Gens gesteuert [23]. Auf diese Weise liefert die Regulation des EPO-Gens einen präzisen Mechanismus, um die Zahl der Erythrozyten an Sauerstoffschwankungen anzupassen. Bei Hypoxie (Sauerstoffmangel) ist die EPO-Synthese bis zu 100-fach erhöht. Zudem unterliegt sie gewebespezifischer Regulierung [31]. Das EPO-Gen ist sehr gut charakterisiert und eine Unterscheidung zwischen dem aktiven und inaktiven Zustand lässt sich mit den entsprechenden biochemischen Methoden relativ leicht treffen. Da die hypoxieinduzierte erhöhte Transkription des EPO-Gens größer ist als für jedes andere bekannte Gen, das über den Sauerstoff Partialdruck im Blut reguliert wird, stellt die hypoxieinduzierte Regulation des EPO-Gens ein ideales Modellsystem dar, um eine Korrelation zwischen Chromatin-Kompaktierung und Transkriptionsaktivität zu untersuchen.

Das EPO-Gen befindet sich beim Menschen auf dem Chromosom 7 (Position 7q21-7q22). In einem ersten Schritt wurde deshalb die 7q22 Chromatinregion untersucht, die etwa 1,4Mbp distal zum EPO-Gen liegt. Diese wurde mit Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH) fluoreszenzmarkiert und im konventionellen und Spiegel-SMI-Mikroskop untersucht. Die Wahl fiel auf die 7q22-Region, da eine kommerzielle FISH-Sonde erhältlich ist, die diese Region markiert. Die Untersuchungen der 7q22 Chromatinregion sind vorläufige Messungen, die die Basis für eine genauere Untersuchung der Regulation der sauerstoffabhängigen Expression des EPO-Gens bilden.

Präparation der Proben: Für die Messungen wurden menschliche Osteosarkom-Zellen (U2SOS) auf einem Deckglas, das mit Poly-D-Lysin beschichtet wurde, bis 60% Dichte anwachsen gelassen. Daraufhin wurden die Zellen den experimentellen Bedingungen unterworfen. Die Hypoxieinkubationen wurden in einer Atmosphäre von 1% Sauerstoff in einem Hypoxieinkubator (Heracell 240, Heraeus) oder mit einem CO_2-Inkubator (Sanyo) durchgeführt. Die FISH-Sonde für die 7q22 Genregion ist laut Hersteller etwa 100kbp lang und mit dem Farbstoff *dGreen* markiert. Der Hersteller gab auf Anfrage eine Distanz von etwa

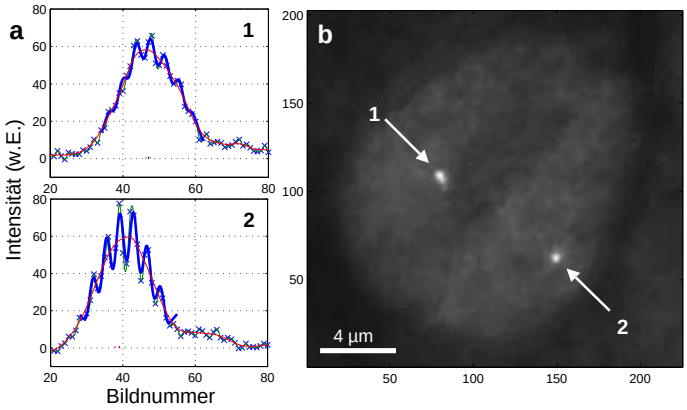


Abbildung 6.11: a: Axiale Intensitätsverteilungen der mit Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung fluoreszenzmarkierten 7q22 Chromatinregion im Kern einer Zelle. Die gemessenen Größen betrugen hier 171nm (1) und 156nm (2). **b:** Zweidimensionale Aufnahme der Chromatinregion in der Fokusebene des Objektivs. Bei der Präparation wurde keine Gegenfärbung verwendet. Wegen einer geringen unspezifischen Hybridisierung ist der Zellkern dennoch sichtbar. Bei der Aufnahme wurde die Anregungswellenlänge 458nm und der Spiegel-Aufbau verwendet.

1,4Mbp zum EPO-Gen an. Es war nicht möglich darüber hinaus gehende Informationen bezüglich der Sonde zu erhalten, insbesondere die genaue Lokalisation auf der DNA.

Zur FISH wurden die Zellen einmal mit einem Phosphatpuffer (PBS) gewaschen. Darauf bei Zimmertemperatur in 70%, 80% und 90% Ethanol dehydriert. Nach dem Trocknen der Deckgläser über Nacht wurden 5μl der Sonde auf den Objektträger aufgebracht. Die Deckgläser wurden in eine Glasschale gelegt und mit Fixogum (Marabu, Tamm, Deutschland) versiegelt. Die Zellpräparate und die Sonde wurden 7min auf einer heißen Platte bei 75°C denaturiert. Es schloss sich eine Inkubation bei 37°C in einer feuchten Kammer an. Die Deckgläser wurden mit mit 1x Waschpufferlösung (0,5x SSC / 0,1% SDS) für 5min bei 65°C gewaschen und dann bei Zimmertemperatur für 5min in 1x PBD gelegt. Schließlich wurde als Einbettungsmedium ProLong Gold (Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland) verwendet um ein Ausbleichen der Präparate zu verringern.

Vergleich beider Mikroskope in biologischen Präparaten: Wie bereits in Abschnitt 6.1.2 gezeigt wurde sind die SMI-Größenmessungen unabhängig von der verwendeten Wellenlänge möglich. Für Nanokugeln wurde zusätzlich bereits gezeigt, dass der bisher verwendete Aufbau mit zwei Objektiven und der Spiegel-Aufbau annähernd die gleichen Eigenschaften hinsichtlich der Größenbestimmung haben. Im Folgenden werden Messungen vorgestellt, die die Leistungsfähigkeit des Spiegel-Aufbaus bei biologischen Präparaten überprüfen. Dazu wurde derselbe Objektträger zuerst bei 458nm Wellenlänge mit dem Spiegel-Aufbau untersucht, und dann mit 488nm Anregung im konventionellen SMI-Mikroskop aufgenommen. Aus praktischen Gründen war es nicht möglich dieselbe Wellenlänge für beide Aufbauten zu verwenden, und so einen noch direkteren Vergleich zu ermöglichen.

Abbildung 6.11 zeigt eine typische zweidimensionale Aufnahme im Fokus des Objektivs

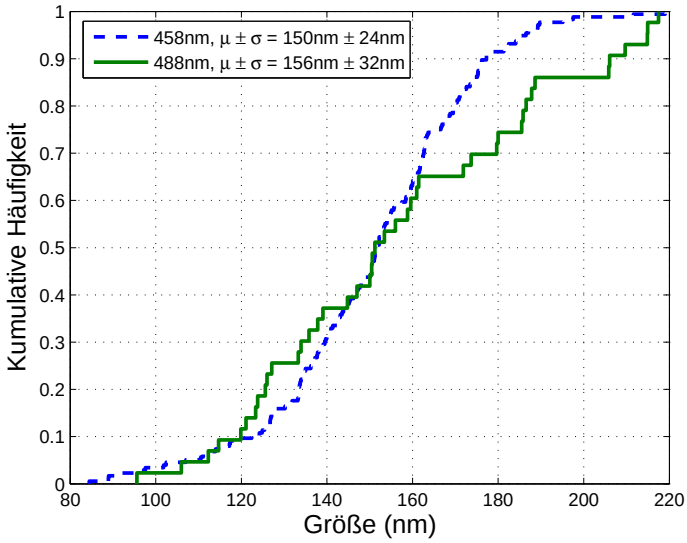


Abbildung 6.12: Kumulative Häufigkeitsverteilung der für die 7q22 Chromatinregion gemessen Größen bei 458nm Anregungswellenlänge und Spiegel-Aufbau verglichen mit 488nm Anregungswellenlänge und konventioneller SMI-Mikroskopie. Die Mittelwerte μ und Standardabweichungen σ der Verteilungen sind ebenfalls angegeben.

und die entsprechenden axialen Intensitätverteilungen der markierten Chromatinregionen. Mit dem in Kapitel 5 erläuterten Verfahren wurde der Modulationskontrast R bestimmt, der wiederum in eine Größe umgerechnet wurde. Bei dieser Berechnung wurde eine kugelförmige Farbstoffverteilung zugrunde gelegt. Das Signal-Rausch-Verhältnis der axialen Intensitätsverteilung in diesem biologischen Präparat ist vergleichbar mit den Werten, die in Testpräparaten mit Nanokugeln gewonnen wurden.

Die Größen, die bei der Auswertung bestimmt wurden, sind in Abbildung 6.12 in einer kumulativen Häufigkeitsverteilung dargestellt. Für $\lambda = 458$nm und Spiegel-Aufbau wurden 203 Fluoreszenzsignale analysiert, die in 90 verschiedenen Zellkernen lagen. Dabei kam es je nach Zellzyklus vor, dass neben zwei auch drei oder vier Signale pro Zelle detektiert wurden. Ferner war der Fit nicht bei allen detektierten Signalen erfolgreich. Der Mittelwert und die Standardabweichung der gemessenen Größenverteilung wurde zu 150±24nm bestimmt. Bei 488nm Anregung und dem konventionellen Aufbau wurden 43 Objekte erfolgreich ausgewertet. Der Mittelwert und die Standardabweichung betragen hier 156±32nm. Die Bewertung der beiden Größenverteilungen und der Test auf einen Unterschied der Mittelwerte erfolgt mit dem t-Test. Dies ist ein Hypothesentest aus der mathematischen Statistik zum Vergleich der Mittelwerte zweier normalverteilter Grundgesamtheiten. Ein zweiseitiger t-Test angewandt auf die gemessenen Verteilungen liefert ein 95% Konfidenzintervall für die Differenz des Mittelwertes der Größe bei 458nm- und 488nm-Anregung von $I = [-16\text{nm}, 5\text{nm}]$. Damit ist kein statistisch signifikanter Unterschied messbar.

Aus dem Mittelwert der bestimmten Größe der 7q22 Chromatin-Region kann man näherungsweise die Kompaktierung des Chromatins im Zellkern während der Interphase abschätzen. Denn die Länge von 1kbp des linearen, nicht weiter gefalteten DNA-Doppelstranges entspricht etwa 340nm. Berücksichtigt man die Sondenlänge von 100kbp erhält

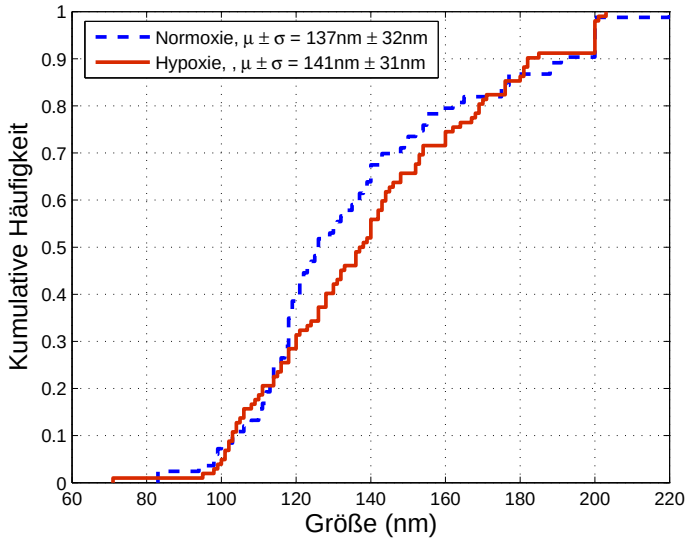


Abbildung 6.13: Kumulative Häufigkeitsverteilung der gemessenen Größen für die 7q22 Chromatinregion bei Hypoxie und normalen Sauerstoffbedingungen.

man für die bei 458nm Anregung gemessene mittlere Größe eine Kompaktierung verglichen zum linearem DNA-Strang von 1:227.

Bei der Auswertung der Daten für die Beleuchtungswellenlänge 458nm wurden insgesamt 203 Objekte detektiert. Davon konnten 176 erfolgreich ausgewertet werden. Die Zahl der verworfenen Signale setzt sich folgendermaßen zusammen: Bei 10 Objekten konvergierte die Fit-Routine nicht; bei 14 Objekten wich die effektive Wellenlänge des Modulationssignals um mehr als 50nm von der mittleren effektiven Wellenlänge $\lambda_{\text{eff}} = \lambda_{\text{ill}}/n = 301\text{nm}$ aller Messungen ab; bei 3 Objekten war die lateraler Halbwertsbreite der Intensitätsverteilung größer als 800nm. Bei der 488nm-Anregung wurden 50 Objekte detektiert und 43 erfolgreich ausgewertet. Hier wurden Objekte mit einer zu großen Abweichung der effektiven Wellenlänge bereits bei der Auswertung verworfen. 7 Objekte wurden wegen einer lateralen Halbwertsbreite der Intensitätsverteilung größer als 800nm verworfen.

Einfluss der Präparation: Zur geplanten Untersuchung der hypoxieinduzierten Genexpression ist es nötig die Zellen, die für die Präparation verwendet werden, vor der Fluoreszenzmarkierung in einer speziellen Hypoxiekammer zu halten,in welcher der Sauerstoffanteil der Luft geregelt werden kann. Die Präparate wurden fluoreszenzmarkiert für normale Sauerstoffbedingungen und Hypoxie. Obwohl im verwendeten Zelltyp U2OS bei Sauerstoffmangel keine erhöhte Transkription des EPO-Gens auftritt, lässt sich mit diesem Experiment die Präparationsmethode für eine spätere, genauere Untersuchung in einem anderen Zelltyp überprüfen, der EPO unter Hypoxie überexprimiert.

Das Ergebnis dieser Untersuchung zeigt Abbildung 6.13 als kumulative Häufigkeitsverteilung. Für Normoxie wurden 102 Fluoreszenzsignale ausgewertet. Der Mittelwert und die Standardabweichung der Größenverteilung sind 137±32nm. Im Falle der Präparate, die unter hypoxischen Bedingungen präpariert wurden, konnten 83 Fluoreszenzsignale ausgewer-

tet werden. Der Mittelwert der Größe und die Standardabweichung betragen 141±31nm. Für einen Vergleich beider Verteilungen wurde wieder der zweiseitige t-Test verwendet. Das 95% Konfidenzintervall für die Differenz der Mittelwerte von Hypoxie und Normoxie ist $I = [-5\text{nm}, 13\text{nm}]$. Auch hier konnte kein statistisch signifikanter Unterschied der beiden Verteilungen gefunden werden.

Bei diesen Messungen konnten für Hypoxie 111 Objekte detektiert werden und 102 erfolgreich ausgewertet werden. Bei Normoxie ergab sich ein Verhältnis detektiert zu auswertbar von 85:83 Objekten. Die Kriterien für das Verwerfen eines detektierten Objekts wurden analog zu oben angewendet.

6.2 Spektrale Präzisionsdistanzmikroskopie

In diesem Abschnitt werden die Messungen und Ergebnisse zur spektralen Präzisionsdistanzmikroskopie (SPDM) vorgestellt, die an einem konfokalen Laserscanningmikroskop (CLSM) durchgeführt wurden. Wie in Abschnitt 3.6 erläutert, ist eine genaue Bestimmung der chromatischen Verschiebung die wichtigste Voraussetzung für reproduzierbare Distanzmessungen, weshalb hierauf der Schwerpunkt dieses Abschnitts liegt.

6.2.1 Durchführung der Messungen

Die chromatische Verschiebung wird an multispektralen Nanokugeln (TetraSpeck[5] Beads) mit 200nm Durchmesser bestimmt. Es handelt sich dabei um Polystyrol Nanokugeln, in deren Polymermatrix zufällig verteilt vier verschiedene Typen von Farbstoff-Molekülen mit unterschiedlichen Anregungs- und Emissionsspektren eingebaut sind. Die Maxima der Anregungswellenlänge liegen bei oder nahe bei den Wellenlängen 351nm, 488nm, 568nm und 647nm wie sie ein Argon-Ionen-Laser oder Argon-Krypton-Mischgaslaser liefert. Da die Schwerpunkte der Farbstoffverteilung koinzidieren, sind diese multispektralen Nanokugeln ein geeignetes Objekt, um die chromatische Verschiebung zu kalibrieren. Noch kleinere Kalibrationsobjekte wären nach theoretischen Überlegungen von Vorteil, da der Durchmesser von 200nm bereits im Bereich der lateralen optischen Auflösung liegt. Dadurch wird die aufgenommene Intensitätsverteilung verbreitert und damit die Lokalisationsgenauigkeit verringert. Versuche mit 100nm TetraSpeck Nanokugeln zeigen aber ein wesentlich schlechteres Signal-Rausch-Verhältnis, das die Lokalisationsgenauigkeit stärker negativ beeinflusst. Es wurden deshalb keine weiteren Untersuchungen in dieser Richtung vorgenommen.

Die Nanokugeln wurden analog zu Abschnitt 6.1.1 auf ein Deckglas mit 170μm Dicke oder einen Standardobjektträger präpariert. Auch hier wurde als Einbettungsmedium gegen Ausbleichen und zur Anpassung des Brechungsindex n VectaShield mit $n = 1,47$ verwendet. Bei den Aufnahmen am CLSM[6] wurden folgende Einstellungen gewählt: Objektiv 63x, NA=1,4, PlanApo, Ölimmersion, Leica; Lochblende: $0,70 \cdot d_{\text{Airy}}$; Voxelgröße x/y: 78nm; Voxelgröße z: 161nm. In jeder Ebene wurde mehrere, 4 oder 8 je nach Messung, Aufnahmen überlagert und gemittelt, um das Signal-Rausch-Verhältnis zu verbessern. Mit diesen Einstellungen ist das beobachtbare Gesichtsfeld 40μm$\times$40μm groß.

Für die Datenauswertung werden die Bilder zuerst in jeder lateralen Ebene des dreidimensionalen Datensatzes mit einem Gauß-Filter (Größe: 3Pixel $\times$ 3Pixel, σ = 1Pixel) gefiltert. Danach wird für jede Ebene ein mittlerer Hintergrundwert abgezogen. Die Intensitätsschwerpunkte der detektierten Fluoreszenzsignale werden nach Gleichung 3.12 bestimmt. Dabei wird g_{thresh} in der Regel gleich 10% der maximalen Intensität des Fluoreszenzsignals gewählt, dessen Intensitätsschwerpunkt bestimmt wird.

Die Implementierung des Algorithmus auf einem Rechner erfolgte mit der betriebssystemunabhängig einsetzbaren Software *Matlab* (The MathWorks[7]). Der dreidimensionale Datensatz wird dabei für jeden Farbkanal in den Speicher des Rechners gelesen, visuali-

[5] Molecular Probes, Invitrogen GmbH, Karlsruhe, `http://www.probes.com`
[6] TCS NT, Leica, `http://www.leica-microsystems.com`
[7] Natick, USA,`http://www.mathworks.com`

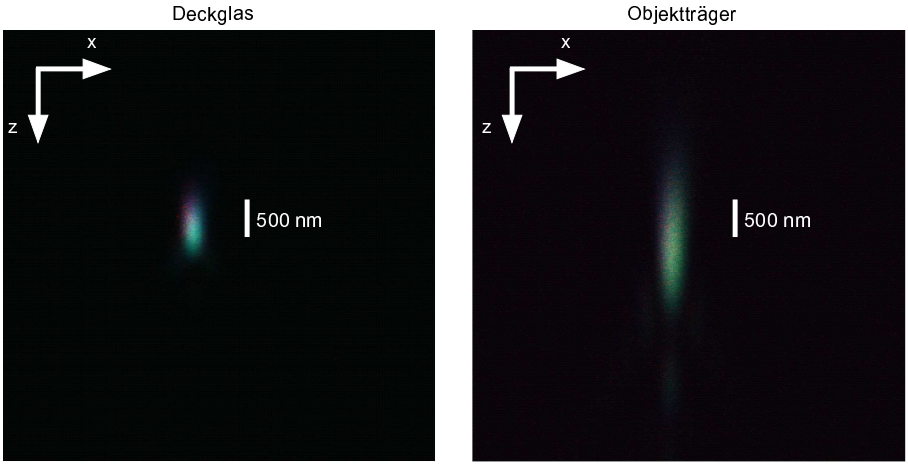


Abbildung 6.14: xz-Aufnahme eines multispektralen Beads mit 200nm Durchmesser auf dem Deckglas und dem Objektträger bei einer Eindringtiefe 70μm.

siert und der Hintergrund wird korrigiert. Die Koordinaten des Intensitätsschwerpunkts in den jeweiligen Farbkanälen werden durch Klicken mit der Maus auf das betreffende Objekt berechnet. Die Koordinaten der jeweiligen Objekte werden in *Matlab*-Variablen gespeichert und stehen für die Weiterverarbeitung, wie die Korrektur der chromatischen Verschiebung, zur Verfügung. In Kombination mit dem automatischen Objektdetektions-Algorithmus, der auch bei der Auswertung der SMI-Mikroskopdaten eingesetzt wird, können große Mengen an Daten in kurzer Zeit ausgewertet werden.

6.2.2 Bestimmung der chromatischen Verschiebung

Um die Problematik der chromatischen Verschiebung zu veranschaulichen, zeigt Abbildung 6.14 Aufnahmen eines xz-Scans eines multispektralen TetraSpeck-Beads. Die untersuchten Objekte befanden sich dabei auf dem Deckglas oder auf dem Objektträger eingebettet mit einer etwa 70μm dicken Schicht Vectashield. In Abbildung 6.14 wurde den Intensitätsverteilungen eines jeden der drei Farbkanäle eine Farbe aus dem RGB-Farbraum (rot, grün, blau) zugewiesen. Falls die aufgenommenen Intensitätsverteilungen koinzidieren, also keine chromatische Verschiebung auftritt, erscheint die resultierende Verteilung in weißer Farbe. Hier erkennt man allerdings bereits für Objekte auf dem Deckglas, dass der obere Rand der Verteilung blau und rot und der untere grün erscheint. Nur in der Mitte ist das Bild des TetraSpeck Beads weiß. Dies macht den Einfluss der chromatischen Verschiebung deutlich sichtbar. Bei Objekten, die sich auf dem Objektträger befinden, tritt derselbe Effekt auf. Zusätzlich zur chromatischen Verschiebung spielt in diesem Falle die effektive PSF, die in axialer Richtung von etwa 500nm auf 2,5μm verbreitert wird, eine Rolle. Dadurch wird ebenfalls die Lokalisationsgenauigkeit der Bestimmung des Intensitätsschwerpunkts beeinträchtigt und so die Korrektur des chromatischen Shifts wesentlich unpräziser. Als Folgerung ergibt sich aus diesen Betrachtungen, dass die zu untersuchenden Objekte für präzise Messungen auf das Deckglas präpariert werden sollten.

Da durch mechanische Instabilitaten beim Abrastern des Päparats im CLSM die Intensi-

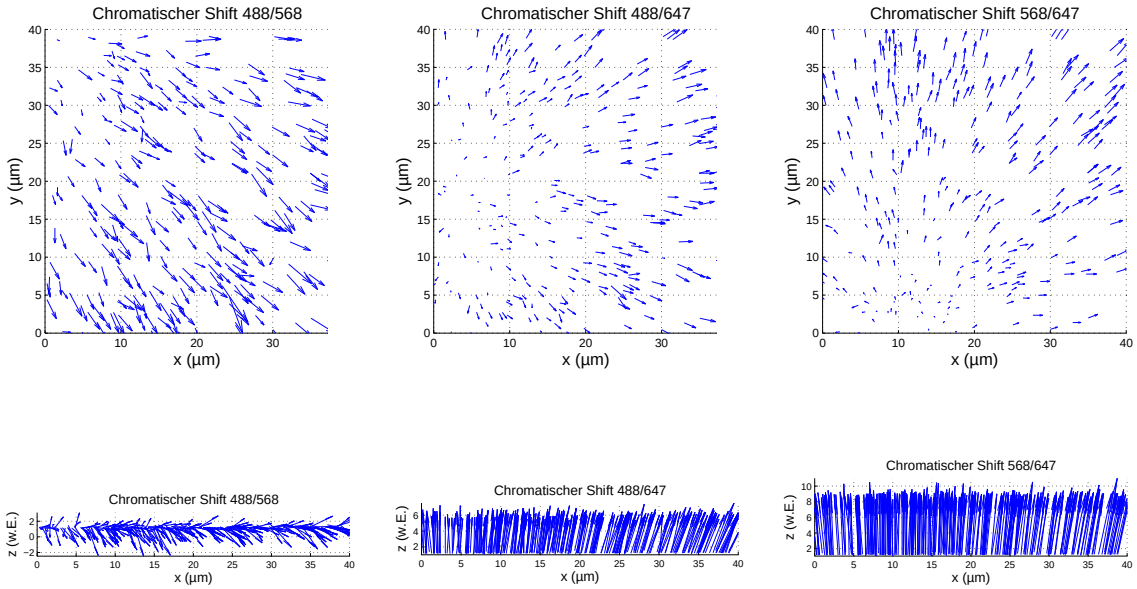


Abbildung 6.15: Vektordiagramme zur Darstellung der chromatischen Verschiebung in lateraler (oben) und axialer Richtung (unten). Eingezeichnet ist die chromatische Verschiebung der Position, die aus den in zwei verschiedenen Farbkanälen detektierten Signalen bestimmt wurde. Die Vektoren geben die Richtung der Verschiebung an, nicht jedoch den absoluten Wert.

tätsschwerpunkte verschoben werden können, wird zuerst überprüft wie groß die Verschiebung im gleichen Farbkanal bei zwei aufeinander folgenden Messungen ist. Dazu wurden die Schwerpunkte von 13 Objekten in den Farbkanälen 488nm, 568nm und 647nm untersucht. Es ergeben sich als Mittelwerte der euklidischen dreidimensionalen Distanzen zwischen den Schwerpunkten der aufeinander folgenden Messungen: -2,1±7,9nm (488nm); 1,0±2,0nm (568nm); 1,2±4,3nm (647nm). Die Fehler der Messungen entsprechen den Standardabweichungen. Das Signal-Rausch-Verhältnis im 488nm-Farbkanal ist verglichen mit den beiden anderen wesentlich schlechter, was sich auch in den Resultaten widerspiegelt. Die Ursache ist vermutlich eine schlechtere Anregbarkeit der TetraSpeck Beads bei der Wellenlänge 488nm oder eine geringe Konzentration des entsprechenden Fluoreszenzfarbstoffs.

Für eine genaue Analyse der chromatischen Verschiebung wurden mehrere Datensätze mit den Koordinaten der Intensitätsschwerpunkte zusammengefasst, die jeweils in der Mitte des Gesichtsfeldes aufgenommen wurden. Die Richtungsabhängigkeit der chromatischen Verschiebung ist in Abbildung 6.15 sowohl für die laterale, als auf für die axiale Richtung, dargestellt. Die Länge eines Vektors gibt die Richtung und die Größe der Verschiebung an, jedoch nicht deren absoluten Wert.

Die Abhängigkeit der chromatischen Verschiebung von der Position im Gesichtsfeld des Objektivs ist offensichtlich. Die lateralen Verschiebungen steigen ausgehend von einer optischen Achse, für welche die Verschiebung verschwindet, linear nach außen an. Für 488nm-568nm liegt diese optische Achse außerhalb des aufgenommenen Gesichtsfeldes. Im linken, oberen Bild in Abbildung 6.15 erkennt man wie die Verschiebung in der oberen linken Ecke

	Chromatische Verschiebung $\mu \pm \sigma$		
Farbkanal	x	y	z
488-568	22±11	-20±12	-10±15
488-647	33±24	2±22	173±17
568-647	11±15	22±14	183±9

Tabelle 6.5: Die chromatische Verschiebung gemessen an 200nm TetraSpeck Beads, die auf das Deckglas präpariert wurden. Insgesamt wurden 291 Objekte aufgenommen. Der Mittelwert der Messungen ist mit μ und die Standardabweichung mit σ bezeichnet.

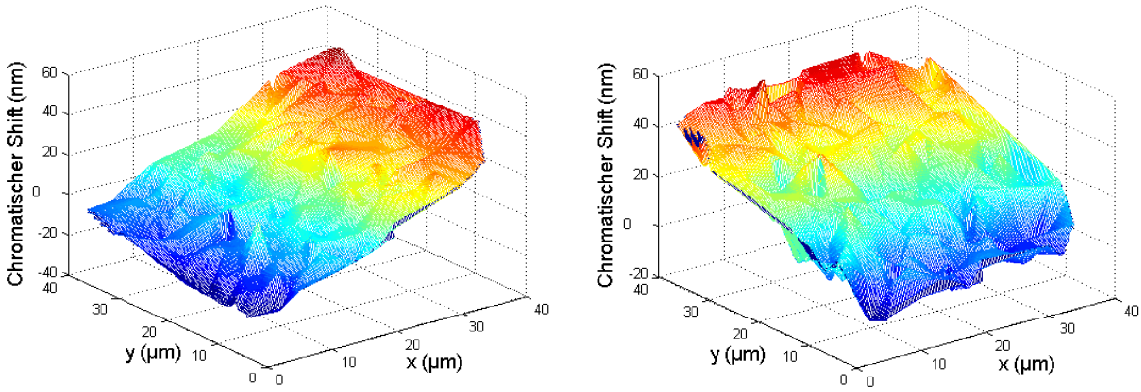


Abbildung 6.16: Laterale chromatische Verschiebungen am Beispiel des 568-647-Farbkanals. Zur Visualisierung wird die Verschiebung in der dritten Dimension dargestellt. Mit dieser interpolierten Korrekturebene wird die chromatische Verschiebung korrigiert.

des Bildes kleiner wird und vermutet die optische Achse dort. Das gesamte Gesichtsfeld des Objektivs ist wesentlich größer als der hier betrachtete Bereich. Die axiale Verschiebung hingegen besitzt nur eine geringe Richtungsabhängigkeit und der Betrag bleibt näherungsweise konstant über das Gesichtsfeld. Tabelle 6.5 fasst die Werte der chromatischen Verschiebung zusammen. Die Verschiebung für die jeweilige Kombination der Farbkanäle wurde dabei aus der Differenz der Position in beiden Kanälen berechnet. So bezeichnet beispielsweise 488-568 den chromatischen Shift zwischen dem 488nm- und dem 568nm-Farbkanal. Die Mittelwerte sind in lateraler Richtung <35nm mit Standardabweichungen von etwa 20nm. In axialer Richtung verschwindet im Rahmen der Messungenauigkeit von 15nm die chromatische Verschiebung für den 488-568-Farbkanal. Für die Kanäle 488-647 und 568-647 beträgt der Mittelwert etwa 180nm. Negative Werte in axialer Richtung bedeuten, dass der Intensitätsschwerpunkt des an zweiter Stelle genannten Farbkanals näher am Objektiv liegt.

Diese gemessenen chromatischen Verschiebungen bildeten die Basis für die Methode zur Korrektur der Intensitätsschwerpunkte. Für die axiale Richtung ist die Annahme eines konstanten Shifts über das gesamte Gesichtsfeld gerechtfertigt. Die gemessenen Schwerpunkte werden korrigiert, indem der mittlere Wert der Verschiebung für den entsprechenden Farbkanal zu den gemessenen Koordinaten addiert wird. In lateraler Richtung wird die lineare Abhängigkeit der Verschiebung dadurch berücksichtigt, dass für die x- und

y-Richtung jeweils eine Ebene an die Werte des Shifts angepasst wird. Mit diesen Korrekturebenen werden die lateralen Intensitätsschwerpunkte berichtigt. In Abbildung 6.16 sind diese interpolierten Korrekturebenen für die Verschiebung zwischen dem 568nm- und 647nm-Farbkanal gezeigt. Der chromatische Shift ist hier anders als in Abbildung 6.15 nicht durch die Länge eines Vektors, sondern durch eine weitere, dritte Dimension dargestellt. Die Korrekturebenen für die laterale Richtung werden zusammen mit der axialen Verschiebung auf dem Auswerterechner gespeichert und kann dann zur Korrektur der betreffenden Messungen benutzt werden.

	Chrom. Verschiebung $\mu \pm \sigma$ (nm)		
Farbkanal	x	y	z
488-568	7±6	4±5	4±11
488-647	7±6	1±7	-22±13
568-647	-1±4	-3±5	-27±8

Tabelle 6.6: Der Mittelwert μ und die Standardabweichung σ der chromatischen Verschiebungen nach Korrektur mit den gespeicherten der Kalibrationsfunktionen. Die 28 auf dem Deckglas präparierten TetraSpeck Beads mit 200nm Durchmesser wurden drei Monate nach der Kalibrationsmessung untersucht.

Die SPDM-Kalibrierung geht davon aus, dass sich der chromatische Shift im Laufe der Zeit nicht oder nur wenig ändert. Um diese Annahme zu überprüfen, wurden drei Monate später Messungen an multispektralen Nanokugeln vorgenommen und die Intensitätsschwerpunkte mit den gespeicherten Kalibrationsfunktionen korrigiert. Die Ergebnisse aus Tabelle 6.6 zeigen, dass die chromatischen Abberationen lateral bis auf wenige Nanometer Abweichung korrigiert werden. Axial wird die chromatische Verschiebung auf wenige zehn Nanometern verringert. Die schlechtere Korrektur in axialer Richtung liegt möglicherweise an der geringeren optischen Auflösung in dieser Richtung und damit größeren Intensitätsverteilung der fluoreszierenden Objekte.

Weiterhin wurde die Abhängigkeit der Shifts von der Eindringtiefe in das Präparat untersucht. TetraSpeck Beads, die mit VectaShield (Brechungsindex $n \approx 1,47$) als Einbettungsmedium präpariert wurden, wurden dazu bei 0μm, 8μm, 14μm und 20μm Eindringtiefe in das Medium aufgenommen. Wie Tabelle 6.7 zeigt, ändern sich die lateralen Verschiebungen nicht signifikant und können sehr gut korrigiert werden. Der resultierende Fehler beträgt etwa 10nm. Hingegen sind die Werte in axialer Richtung größer und besitzen einen maximalen Unterschied von etwa 50nm bei 20μm Eindringtiefe. Die Korrektur führt aber immer noch zu sehr viel besseren Ergebnissen.

6.2.3 Chromatische Verschiebung in Zellen

Zum Test der Methode in biologischen Präparaten wurde ein biologisches, zweifarbigmarkiertes Kalibrationsobjekt verwendet. In Lymphozyten, die auf dem Objektträger fixiert wurden, wurde die RP11-447A7 Genregion auf Chromosom 9 mit Alexa488 und Cy5 doppelt fluoreszenzmarkiert. Als DNA-Sonde kam ein mit Nick-Translation doppelt markierter BAC (*bacterial artificial chromosome*) -Klon mit 69kbp Länge zum Einsatz. Die Präparati-

	Chrom. Verschiebung $\mu \pm \sigma$ (nm)			
Eindringtiefe	Farbkanal	x	y	z
8μm	488-568	19±9	-21±10	-25±25
104 Objekte	488-647	27±21	0±18	183±29
	568-647	8±15	21±11	209±22
14μm	488-568	18±13	-24±12	-3±11
34 Objekte	488-647	31±25	-12±22	205±13
	568-647	13±15	12±13	208±8
20μm	488-568	19±10	-25±11	4±35
64 Objekte	488-647	35±27	-6±23	220±38
	568-647	16±21	20±15	225±14

Tabelle 6.7: Der Mittelwert μ und die Standardabweichung σ der nicht korrigierten chromatischen Verschiebung für verschiedene Eindringtiefen.

	Chrom. Verschiebung $\mu \pm \sigma$ (nm)		
Farbkanal	x	y	z
Alexa488-Cy5	37±34	-41±15	129±48
	Korr. chrom. Verschiebung $\mu \pm \sigma$ (nm)		
Alexa488-Cy5	2±39	19±41	-2±48

Tabelle 6.8: Der Mittelwert μ und die Standardabweichung σ der chromatische Verschiebungen in doppelt markierten biologischen Kalibrationsobjekten nicht korrigiert und nachdem die Korrektur durchgeführt wurde.

on wurde von Dipl.-Phys. Susanne Fenz durchgeführt. Weitere Informationen hierzu finden sich in [32]. Bei der Aufnahme der Zellen wurden am CLSM der grüne ($\lambda_{\text{ex}} = 488$nm) und der rote ($\lambda_{\text{ex}} = 647$nm) Farbkanal mit den oben beschriebenen Einstellungen verwendet. Besonders wurde darauf geachtet, dass sich das aufzunehmende Objekt in der Mitte des Gesichtsfeldes befand. Der Schwellwert bei der schwerpunktsbasierten Lokalisation wurde zu $g_{\text{thresh}} = 0,3$ gewählt.

Um die Kalibrationsfunktion zu ermitteln wurden 16 Zellen, beziehungsweise 32 Fluoreszenzsignale, aufgenommen, die Intensitätsschwerpunkte bestimmt und die Funktionen für die axiale und laterale Richtung berechnet. Eine Woche darauf wurden erneut 12 Signale der doppelt markierten Probe aufgenommen und ausgewertet. Die chromatischen Verschiebungen vor und nach der Korrektur sind in Tabelle 6.8 dargestellt. In lateraler Richtung betrug die Verschiebung zwischen den Farbkanälen 37±34nm in x- und -41±15nm in y-Richtung. Durch die Korrektur mit den Kalibrationsfunktionen konnten die Shifts zwischen Alexa488 und Cy5 auf 2±39nm für die x- und 19±41nm für die y-Richtung verringert werden. In axialer Richtung wurde die chromatische Verschiebung von 129±48nm

auf -2±48nm erniedrigt. Für alle drei Raumrichtungen konnte also der Shift innerhalb der Fehlergrenzen erfolgreich korrigiert werden. Die Präzision wie sie mit multispektralen Nanokugeln erreicht wurde, konnte in diesen biologischen Proben nicht reproduziert werden. Dies liegt unter anderem daran, dass Brechungsindexvariationen in biologischen Präparaten durch unterschiedliche Brechungsindizes von biologischen Strukturen und Einbettungsmedium auftreten können. Dadurch wird zum einen die Lokalisationsgenauigkeit allgemein verringert, zum anderen werden die chromatischen Verschiebungen der Objekte weiter vergrößert.

6.3 Zweiphotonenmikroskopie

Das neu entwickelte und aufgebaute Zweiphotonenmikroskop wurde anhand der folgenden Messungen bezüglich axialer und lateraler Auflösung charakterisiert. Die Abbildungseigenschaften von CLSM, SMI-, und Zweiphotonenmikroskopie werden mit Aufnahmen von Pollenkörnern demonstriert. Anschließend wird die Anregbarkeit verschiedener Fluoreszenzfarbstoffe in biologischen Präparaten untersucht. Messungen der Fuoreszenzlebensdauer wurden mit dem triggerbaren Bildverstärker als Detektor realisiert.

6.3.1 Durchführung der Messungen

Zur Analyse des Aufbaus wurde ein Objektträger verwendet, auf dem sich eine dünne, etwa $1,5-2\mu$m dicke Schicht des Farbstoffs Fluorescein (Absorptionsmaximum $\lambda = 496$nm, Emissionsmaximum $\lambda = 525$nm) befand. Die Markierung mit dem Farbstoff wurde von Dipl.-Ing. Heiz Eipel durchgeführt. Bei der Charakterisierung des Auflösungsvermögens des Zweiphotonenmikroskops kamen Nanokugeln mit 140nm, 290nm und 390nm Durchmesser von Duke Scientific[8] zum Einsatz. Die Präparation erfolgte auf dem Deckglas analog zu Abschnitt 6.1.1. Die Pollenkörner eines Gänseblümchens (*Bellis perennis*) von der Institutswiese wurden aus den Röhrenblüten extrahiert und auf einen Objektträger aufgebracht. Glyzerin (Brechungsindex $n \approx 1,47$) diente als Einbettungsmedium. Auf das Präparat wurde ein Deckglas gelegt, das an den Rändern mit Nagellack fixiert wurde.

Der Pumplaser wurde bei den Messungen bei einer Leistung von 8W betrieben. Der Titan-Saphir-Laser emittiert dann Laserlicht mit einer mittleren Leistung von 0,6W. Ein großer Teil dieser Leistung gelangt nicht bis ins Objektiv und geht im Aufbau verloren. Da die Gesamtleistung aber ausreichend ist, musste das Mikroskop in dieser Richtung nicht optimiert werden. Direkt vor dem Objektiv beträgt die mittlere Leistung nur noch 24mW, was für die relevanten Anwendungen ausreichend ist. Höhere Leistungen führen zu Schädigungen des Präparats durch Erwärmung und Bleichen des Fluoreszenzfarbstoffs.

Bei den Aufnahmen wurden folgende Parameter gewählt: Integrationszeit der CCD-Kamera 0,8s, laterale Voxelgröße 80nm oder 160nm (binnig=1), axiale Voxelgröße 200nm. Bei der Aufnahme der Pollenkörner wurde wegen der Größe der Objekte eine axiale Voxelgröße von 400nm gewählt. Der y-Scanner wird bei etwa 8kHz betrieben. Da in beiden Richtungen gescannt wird beträgt die effektive Linienscanrate 16kHz. Das bedeutet, dass eine Line in $\approx$62,5μs abgerastert wird. Damit bestimmt sich die Verweildauer des Fokus pro Pixel zu $\approx$49ns/Pixel. Die Repetitionsrate des Lasers beträgt 76MHz, also wird alle 13,2ns ein Puls emittiert. Pro Pixel und Scan treffen folglich $\approx$3,8Pulse auf die Probe. Der x-Scanner rastert das Präparat mit 30Hz ab. Um von einer Line zur anderen zu gelangen benötigt der Fokus also $\approx$33μs/Pixel. Pro y-Linienscan wird der Fokus damit um $\approx$2 Pixel in x-Richtung verfahren. Da die laterale Ausdehnung des Fokuspunkts größer als 2 Pixel (160nm) ist, wird dadurch sichergestellt, dass das Gesichtsfeld homogen ausgeleuchtet wird. Die Größe des gesamten Gesichtsfelds beträgt $102\times82\mu\text{m}^2$.

Für die Datenauswertung wurde zuerst für jede Ebene ein konstanter mittlerer Hintergrundwert abgezogen. Bei stark verrauschten Datensätzen wurden die Aufnahmen für jede Ebene des Datensatzes mit einem 3Pixel $\times$ 3Pixel großen Gauß-Filter mit Standardabwei-

[8] Palo Alto, USA, `http://www.dukescientific.com`

chung $\sigma = 1$Pixel gefiltert. An die Intensitätsverteilungen des Fluoreszenzsignals wurde in lateraler Richtung eine zweidimensionale Gauß-Funktion angepasst. In axialer Richtung wurde im Mittelpunkt der lateralen Verteilung ein Intensitätsprofil extrahiert und eine eindimensionale Gauß-Funktion für den Fit verwendet. Die Gauß-Funktionen geben in sehr guter Näherung die gemessenen Intensitätsverteilungen wieder und zeichnen sich zusätzlich durch einen gut konvergierenden Fit aus.

6.3.2 Charakterisierung des Aufbaus

Abbildung 6.17 zeigt das mit einem Spektrometer (Coherent) gemessene Emissionsspektrum des Titan-Saphir-Lasers. Die Zentralwellenlänge liegt bei $\lambda = 773$nm. Die Halbwertsbreite des Spektrums des Lasers wurde durch einen Fit mit einer Gauß-Funktion zu $\Delta\lambda = 3,35 \pm 0,02$nm bestimmt. Unter der Annahme eines chirpfreien Pulses, das heißt eines Pulses mit einer Trägerfrequenz ohne zeitliche Abhängigkeit, gilt für die Pulsdauer beziehungsweise die spektrale Bandbreite $\tau_{1/2}$ [74]:

$$\tau_{1/2} = 0,315 \frac{\lambda^2}{c \cdot \Delta\lambda} \quad . \tag{6.1}$$

Damit berechnet sich die Pulslänge zu $\tau_{1/2} = 187 \pm 35$fs.

Die Pulslänge wurde zusätzlich mit einem Autokorrelator (Micro$cor near IR, NT&C[9]) direkt nach der Austrittsöffnung des Lasers gemessen. Die Halbwertsbreite des Autokorrelationssignals betrug $\tau_{\text{akorr}} = 258 \pm 9$fs. Pulse, die von Titan-Saphir-Lasern emittiert werden, besitzen im Allgemeinen eine sech^2-Form[10]. Aus dem Autokorrelationssignal berechnet sich damit die Pulsbreite zu $\tau_{1/2} = \tau_{\text{akorr}}/1,55 = 166 \pm 6$fs. Die beiden Werte für die Pulsbreite stimmen im Rahmen des Messfehlers überein, wobei der über die Breite des Spektrums gemessene Wert eine wesentlich geringere Genauigkeit besitzt, weshalb eine Messung über die Autokorrelation zu bevorzugen ist.

Die homogene Ausleuchtung des gesamten Gesichtsfeldes der CCD-Kamera wurde anhand eines Präparats überprüft, bei dem sich auf dem Objektträger eine dünne Schicht des Fluoreszenzfarbstoffs Fluorescein befand. Abbildung 6.18 zeigt eine laterale Ebene der Schicht wie sie im Mikroskop aufgenommen wurde. Im Zentrum ist die Fluoreszenzintensität homogen, jedoch größer als in den Randbereichen. Vor allem in den Ecken des Gesichtsfeldes ist die Intensität niedriger. Diese Abweichungen sind jedoch relativ gering, sodass die Anregung näherungsweise gleichmäßig über das Gesichtsfeld erfolgt.

Um die Auflösung des Mikroskops zu untersuchen, wurden fluoreszierende Nanokugeln mit 140nm, 290nm und 390nm Durchmesser aufgenommen. Tabelle 6.9 zeigt die bestimmten Werte für die laterale FWHM_{lat} und die axiale Halbwertsbreite $\text{FWHM}_{\text{axial}}$, die sich aus den an die Daten angepassten Gauß-Funktionen ergeben. Angegeben sind die Mittelwerte mehrerer gemessener Halbwertsbreiten und die Standardabweichungen der Einzelmessungen als Fehlerabschätzung. Für die Halbwertsbreite der Intensitätsverteilung wurde bei Nanokugeln mit 140nm Durchmesser $\text{FWHM}_{\text{lat}} = 352 \pm 76$nm und $\text{FWHM}_{\text{axial}} = 922 \pm 76$nm gemessen. Diese Werte sind größer als die bei den 290nm-Kugeln gemessenen $\text{FWHM}_{\text{lat}} = 284 \pm 20$nm und $\text{FWHM}_{\text{axial}} = 843 \pm 80$nm. Die Ursache dafür liegt am schlechteren

[9] Marnheim, `http://www.ntandc.de`

[10] sech steht für die Hyperbelfunktion Sekans Hyperbolicus

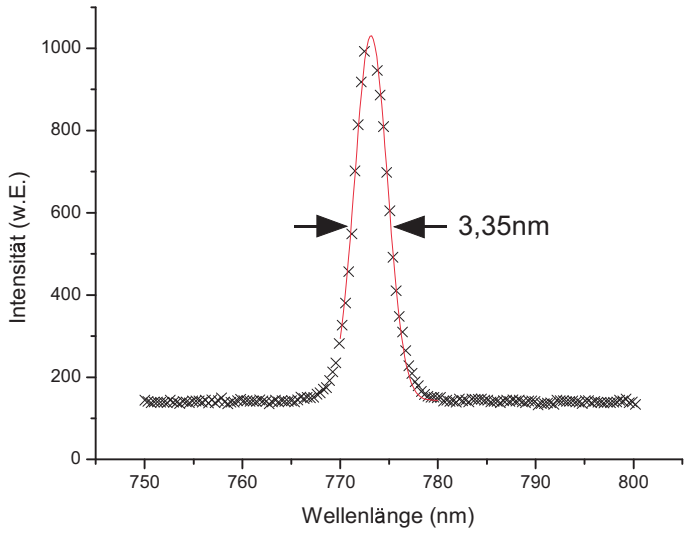


Abbildung 6.17: Das Emissionsspektrum des Titan-Saphir-Lasers.

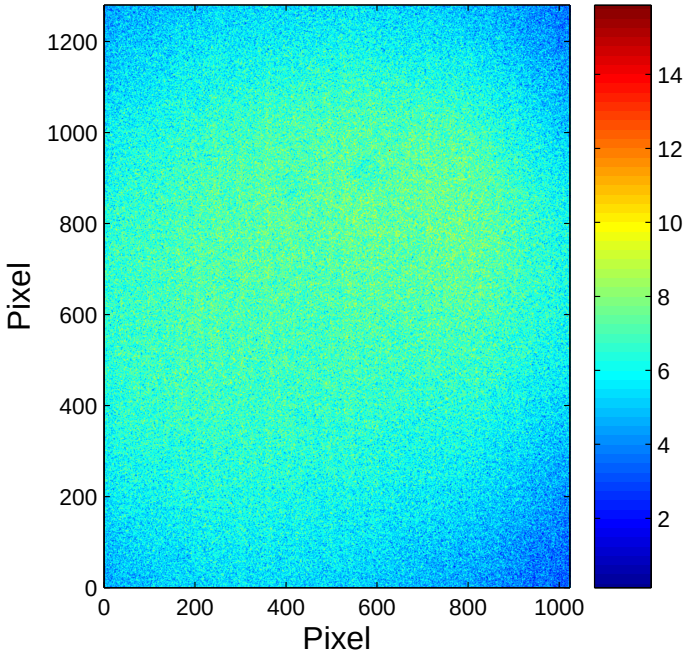


Abbildung 6.18: Aufnahme einer dünnen Schicht Fluorescein auf dem Objektträger, um die homogene Ausleuchtung des gesamten Gesichtsfeldes im Zweiphotonenmikroskop zu überprüfen.

Größe	$FWHM_{lat}$	$FWHM_{axial}$	Objekte
140nm	353±76	922±76	26
290nm	284±20	843±80	52
390nm	435±35	757±76	57

Tabelle 6.9: Mit Zweiphotonenmikroskopie an Nanokugeln gemessene laterale und axiale Halbwertsbreiten des Fluoreszenzsignals.

Signal-Rausch-Verhältnis für die 140nm Nanokugeln. Die axiale Halbwertsbreite bei den 390nm-Beads ist mit $FWHM_{axial} = 757 \pm 76$nm geringer als bei den 290nm-Kugeln. Der Grund hierfür liegt eventuell an der Präparation der 290nm Beads auf dem Objektträger, sodass die PSF durch nicht optimal angepassten Brechungsindex Abberationen unterliegt. In lateraler Richtung wurde für die 390nm-Nanokugeln $FWHM_{lat} = 435 \pm 35$nm gemessen. Hier macht sich bereits eine Verbreiterung der Intensitätsverteilung durch die Größe der Nanokugeln bemerkbar. Insgesamt betrachtet liegt die erreichbare Auflösung mit dem Zweiphotonenmikroskop also bei etwa 300nm in lateraler und 800nm in axialer Richtung. Diese Werte sind etwas schlechter als die Theoriewerte von etwa 220nm lateral und 600nm axial, die man für ein Objektiv mit numerischer Apertur 1,3 berechnet [93]. Die Ursache hierfür könnte eine etwas geringere effektive numerische Apertur des Objektivs sein, die durch nicht optimal angepassten Brechungsindex hervorgerufen wird. Ferner könnte die Rückapertur des Objektivs nicht vollständig homogen ausgeleuchtet sein. Dennoch liegen die experimentellen nahe an den theoretischen Werten, die in der Praxis im Allgemeinen nur unter optimalen Bedingungen erreicht werden.

6.3.3 Vergleich der Abbildungseigenschafen

Zur Demonstration der Abbildungseigenschaften von CLSM, SMI-, und Zweiphotonenmikroskopie wurde ein Pollenkorn eines Gänseblümchens (*Bellis perennis*) aufgenommen. Um die Fähigkeit des jeweiligen Mikroskops optische Schnitte durch die Probe zu legen zu demonstrieren, eignet sich solch ein ausgedehntes Objekt mit feinen Spitzen sehr gut. Zudem ist eine Fluorezenzmarkierung nicht notwendig, da eine effektive Fluoreszenzanregung von Substanzen im Pollenkorn mit Einphotonenanregung im blauen/grünen Spektralbereich beziehungsweise nahen Infrarot bei der Zweiphotonenanregung möglich ist. Dieser Prozess wird als Autofluoreszenz bezeichnet.

Bei der Durchführung der Messungen wurden während der Aufnahme folgende Parameter gewählt: Zweiphotonenmikroskop: Voxelgröße x/y: 160nm, Voxelgröße z: 400nm, Integrationszeit 0,8s, Binning: 1, Gesichtsfeld gesamt $102 \times 82 \mu m^2$. CLSM: Voxelgröße x/y: 78nm, Voxelgröße z: 405nm, Lochblende: $0{,}71 \cdot d_{Airy}$, Gesichtsfeld $40 \times 40 \mu m^2$, Mittelungen pro Ebene: 3. SMI-Mikroskop: Voxelgröße x/y: 53nm, Voxelgröße z: 400nm, Integrationszeit: 0,24s, Binning: 0.

Abbildung 6.19 zeigt eine Galerie von Aufnahmen des Pollenkorns mit dem Zweiphotonenmikroskop bei denen der Objektträger in 400nm Schritten durch den Fokus des Objektivs gefahren wurde. Aus Platzgründen ist nur jede zweite Aufnahme abgebildet. Da durch die quadratische Intensitätsabhängigkeit die Zweiphotonenanregung auf die Fokusebene beschränkt ist, können optische Schnitte durch die Probe gelegt werden. Indem man das

Objekt durch den Fokus des Objektivs bewegt, wird eine echte dreidimensionale Darstellung des aufgenommenen Objekts ermöglicht. In den Aufnahmen sind die Spitzen des Pollenkorns sowohl in lateraler als auch in axialer Richtung gut erkennbar. An den ersten und letzten Bildern erkennt man, dass nur Strukturen des Objekts angeregt werden, die sich in der Nähe der Fokusebene befinden.

Bei der CLSM mit Einphotonenanregung wird die Probe entlang des gesamten vom Laser durchstrahlten Bereichs zur Fluoreszenz angeregt. Das Fluoreszenzlicht aus Ebenen, die außerhalb des Fokus liegen, wird durch eine Lochblende vor dem Detektor unterdrückt. Dadurch wird jeweils nur eine Ebene des untersuchten Objekts abgebildet. Durch Rasterung entlang der optischen Achse wird eine dreidimensionale Abbildung aufgenommen. Abbildung 6.20 zeigt Abbildungen aus unterschiedlichen Ebenen des Präparats. Es wurde nur jede dritte Aufnahme dargestellt, sodass der Abstand zwischen den einzelnen Bildern 1,2μm beträgt. Die Abbildungseigenschaften entsprechen im Wesentlichen denen des Zweiphotonenmikroskops.

Abbildung 6.21 zeigt die Aufnahmen aus verschiedenen axialen Ebenen, die mit dem SMI-Mikroskop gemessen wurden. Der Abstand zwischen den Ebenen beträgt 1,6μm, da nur jede vierte Aufnahme dargestellt wurde. Wie bereits in Kapitel 5 besprochen eignet sich ein solches Objekt eigentlich nicht zur Untersuchung im SMI-Mikroskop, da die Ausdehnung zu groß ist. Allerdings kann das SMI-Mikroskop unter diesen Bedingungen näherungsweise als Epifluoreszenzmikroskop mit Laseranregung betrachtet werden. Da die gesamte Probe zu Fluoreszenz angeregt wird, gibt es in jeder Ebene eine diffuse Hintergrundfluoreszenz aus anderen Schichten, die sich mit dem eigentlichen Signal überlagert. Insbesondere detektiert man noch Fluoreszenz, wenn sich das Objekt bereits außerhalb der Fokusebene befindet (letzte Aufnahmen in Abbildung 6.21). Die einzelnen Spitzen des Pollenkorns sind nur in der lateralen Richtung erkennbar. Axial sind diese in den Bildern nicht zu identifizieren. Die Möglichkeit optische Schnitte durch die Probe zu legen ist demzufolge nicht gegeben.

Der Datensatz des Zweiphotonenmikroskops wurde mit *Matlab* (The MathWorks[11]) dreidimensional visualisiert. Dabei werden Voxel mit gleichem Intensitätswert durch eine interpolierte Oberfläche verbunden. Eine auf diese Weise erzeugte Volumendarstellung des Pollenkorns zeigt Abbildung 6.22. Die einzelnen Spitzen des Pollenkorns, welche Ausdehnungen unter einem Mikrometer besitzen, sind in allen Raumrichtungen gut erkennbar. Für eine genauere Analyse der untersuchten Objekte kann das Bild in den drei Raumrichtungen rotiert werden.

[11] Natick, USA, `http://www.mathworks.com`

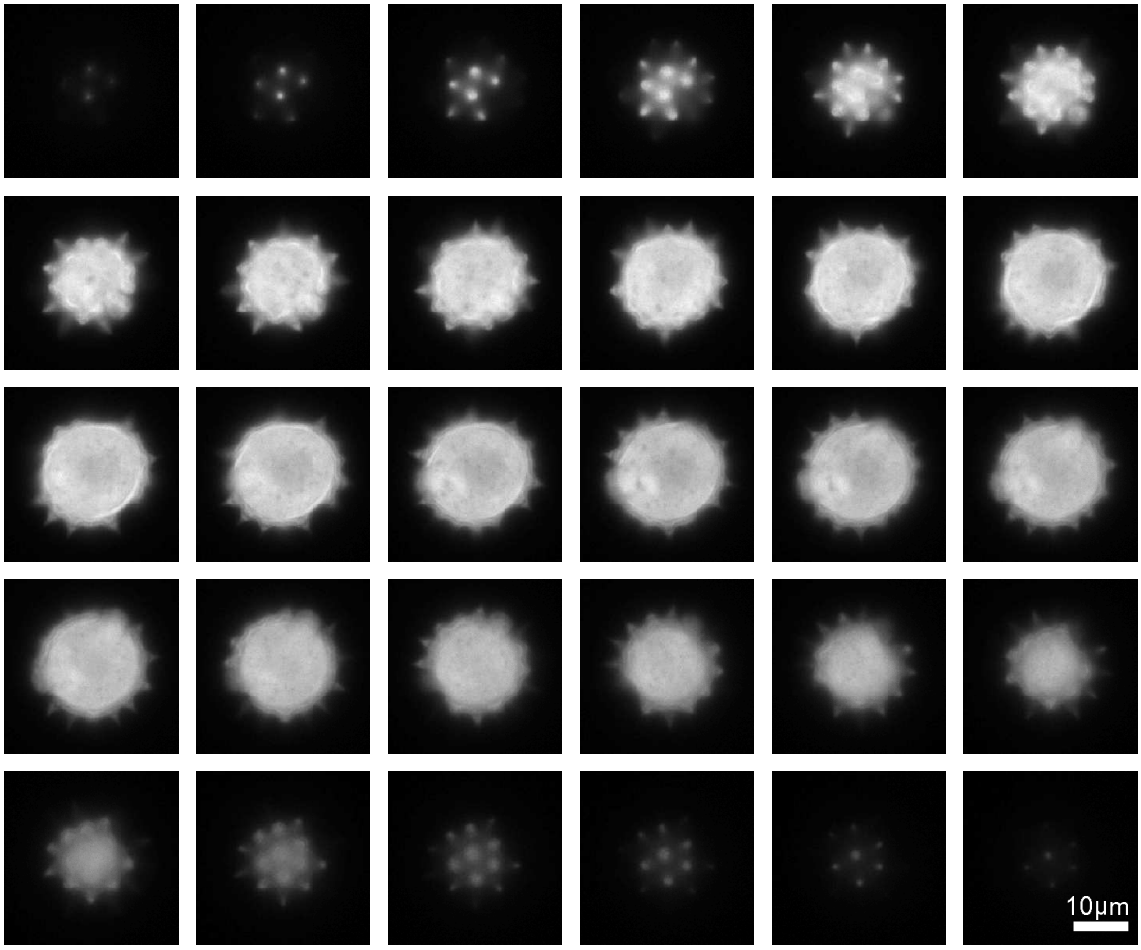


Abbildung 6.19: Demonstration der optischen Schnitte im Zweiphotonenmikroskop anhand eines Pollenkorns eines Gänseblümchens (*Bellis perennis*). Die Schrittweite zwischen den einzelnen axialen Ebenen beträgt 800nm, d. h. jeder zweite optische Schnitt ist gezeigt (Reihenfolge der Bilder von links oben nach rechts unten).

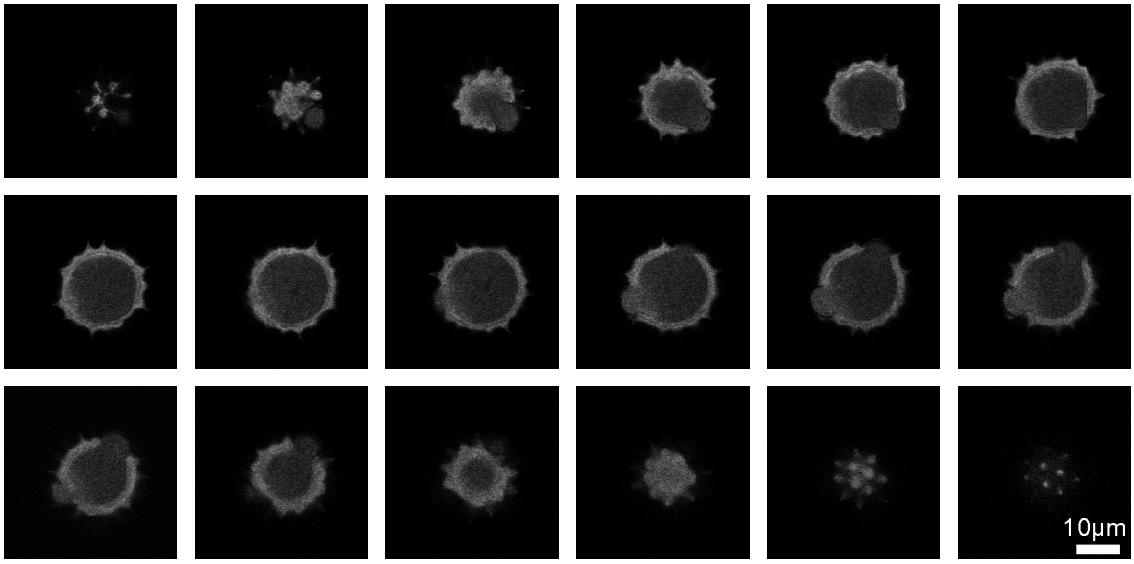


Abbildung 6.20: Demonstration der optischen Schnitte mit CLSM. Durch die Verwendung der Lochblende wird nur das Fluoreszenzlicht aus der Fokusebene detektiert. Die Schrittweite zwischen den einzelnen axialen Ebenen beträgt 1,2μm, d. h. jedes dritte Bild ist gezeigt (Reihenfolge der Bilder von links oben nach rechts unten).

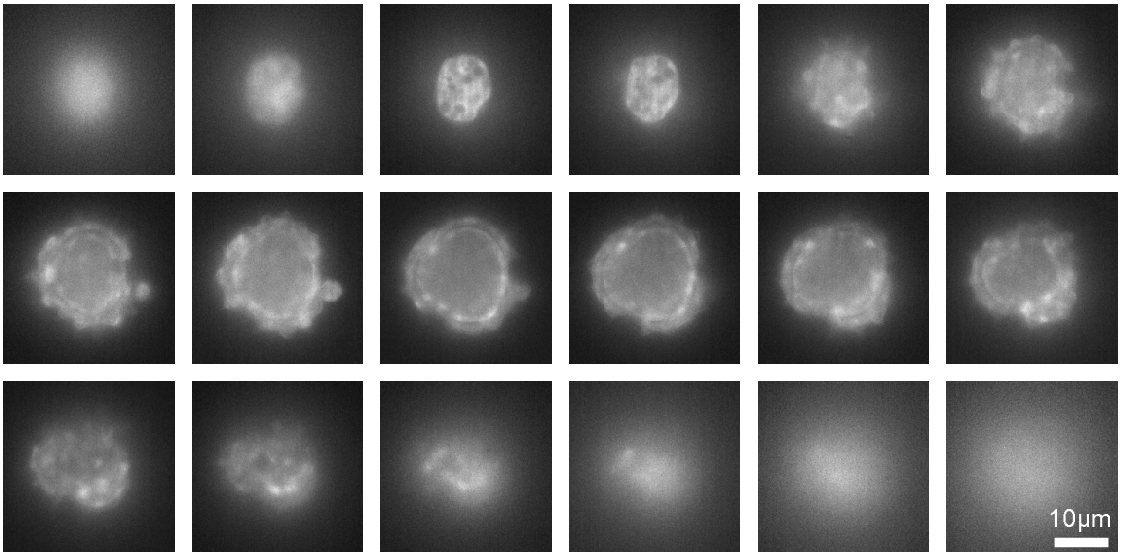


Abbildung 6.21: Aufnahme des Pollenkorns im SMI-Mikroskop. Der Abstand der axialen Ebenen beträgt 1,6μm, d. h. jede vierte Aufnahme ist gezeigt (Reihenfolge der Bilder von links oben nach rechts unten).

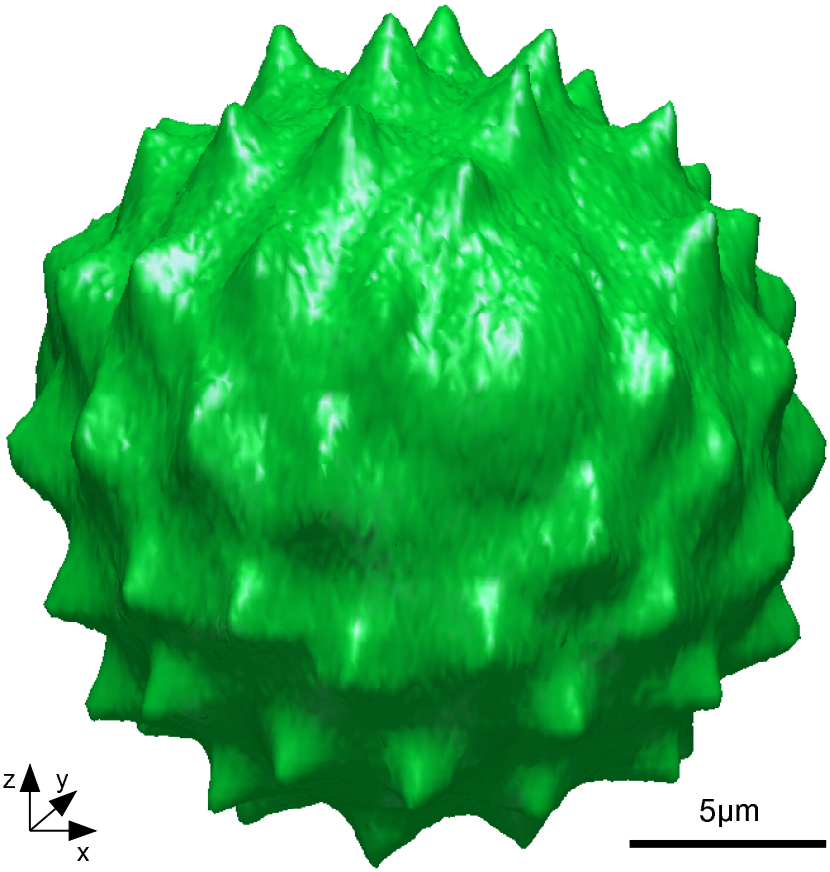


Abbildung 6.22: Dreidimensionale Visualisisierung des Pollenkorns eines Gänseblümchens (*Bellis perennis*), das mit dem Zweiphotonenmikroskop aufgenommen wurde. Die einzelnen Spitzen des Korns mit Ausdehnungen $<1\mu$m sind deutlich zu erkennen. Das dreidimensionale Bild kann auf dem Rechner beliebig rotiert werden und liefert dadurch einen visuellen, dreidimensionalen Gesamteindruck des untersuchten Objekts, der aus den einzelnen optischen Schnitten (vgl. Abbildung 6.19) nicht gewonnen werden kann.

6.3.4 Anregung verschiedener Fluoreszenzfarbstoffe

Die Anwendbarkeit des Zweiphotonenmikroskops für biologische Fragestellungen hängt hauptsächlich von der Wahl des Farbstoffs ab. Zum einen sollte dieser sehr gut über die Zweiphotonenabsorption anregbar sein, um ein möglichst großes Signal detektieren zu können. Zum anderen sollte er über einen längeren Zeitraum möglichst wenig ausbleichen. Um die Anregbarkeit verschiedener Farbstoffe über die Absorption zweier Photonen in biologischen Präparaten zu untersuchen, wurde das Zentromer von Chromosom 11 oder 1 in menschlichen Lymphozyten mit Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH) nach einem Standardprotokoll fluoreszenzmarkiert. Die Präparation wurde von Dr. Marion Cremer in München durchgeführt. In Tabelle 6.10 sind die analysierten Farbstoffe zusammengestellt. Das „+“ in der Tabelle deutet an, dass die Anregung möglich war. Das „−“ bedeutet, dass nur ein unzureichendes Fluoreszenzsignal detektiert werden konnte.

Farbstoff	Markierung	Signal
Alexa488	Chr11, Zentromer	+
Alexa514	Chr11, Zentromer	+
Atto495	Chr11, Zentromer	-
Cy3	Chr1, Zentromer	-
Cy5	Chr11, Zentromer	-

Tabelle 6.10: Zweiphotonenmikroskopie am Zentromer von Chromosom 11 in Lymphozyten, das mit verschiedenen Farbstoffen markiert wurde.

Im Allgemeinen liegt das Maximum der Zweiphotonenabsorption näherungsweise bei der doppelten Wellenlänge des Einphotonen Absorptionsmaximums. Viele Fluoreszenzfarbstoffe weichen aber von dieser Regel ab, da die Auswahlregeln für den Zweiphotonenübergang andere sind als im Einphotonenfall. Die beiden Alexa-Farbstoffe mit Maxima der Einphotonenabsorpion bei 488nm und 514nm lassen sich sehr gut mit der verwendeten Wellenlänge 773nm anregen. Abbildung 6.23 zeigt eine Projektion der maximalen Intensität der dreidimensionalen Aufnahmen. Neben den Zentromeren, die als beugungsbegrenzte Punkte abgebildet werden, ist in den Bildern der Zellkern erkennbar. Dies kommt durch Autofluoreszenz einzelner Bestandteile des Zellkerns oder durch eine Hintergrundhybridisierung bei der FISH zustande. Man erwartet wegen der Maxima der Absorptionsspektren für Alexa488 eine bessere Anregbarkeit als für Alexa514 bei der verwendeten Wellenlänge. In der Praxis zeigte jedoch Alexa514 ein sehr viel größeres Fluoreszenzsignal. Dies könnte durch die Präparation verursacht worden sein. Atto495, von dem man wegen des Maximums der Einphotonenanregung bei 495nm ebenfalls eine gute Anregbarkeit erwarten würde, konnte nicht detektiert werden. Vermutlich liegt die Ursache hierfür an einem Fehler bei der Präparation, da auch bei einer Überprüfung am CLSM nur ein sehr schwaches Signal bei Einphotonenanregung gefunden werden konnte. Für die Farbstoffe Cy3 und Cy5 war es nicht möglich mit dem untersuchten Aufbau ein Fluoreszenzsignal aufzunehmen. Dies entspricht auch den Erwartungen, da die Absorptionsmaxima der Einphotonenanregung bei 552nm und 649nm für Cy3 beziehungsweise Cy5 liegen und damit erst ab etwa 900nm Anregungswellenlänge effektive Zweiphotonenanregung möglich ist [8].

Die fluoreszenzmarkierten Zentromere werden mit dem Zweiphotonenmikroskop als beugungsbegrenzte Intensitätsverteilungen abgebildet. Deren Halbwertsbreite ist deshalb ein

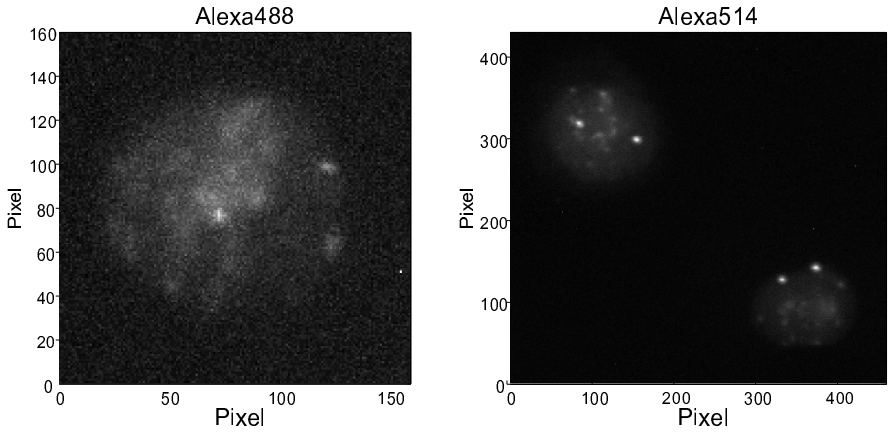


Abbildung 6.23: Zweiphotonenanregung von Lymphozyten, bei denen das Zentromer des Chromosom 11 mit Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung markiert wurde. Dargestellt sind typische Aufnahmen für die beiden Farbstoffe Alexa488 und Alexa514, für die eine effektive Zweiphotonenanregung möglich war.

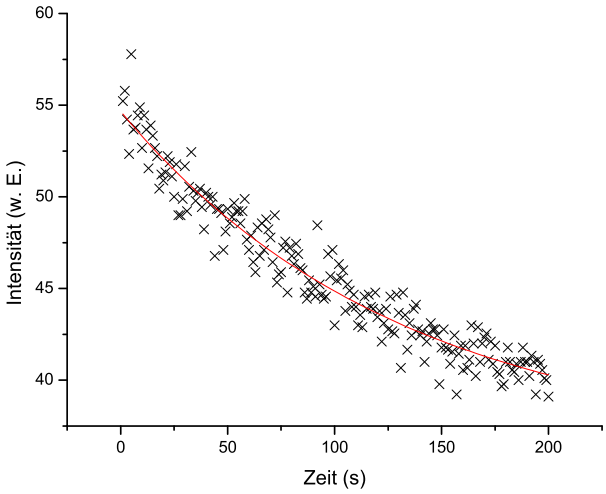


Abbildung 6.24: Die Abnahme des Fluoreszenzsignals in Abhängigkeit von der Zeit durch das Bleichen des Alexa514 Farbstoffs.

geeignetes Maß für die Auflösung des Mikroskops in biologischen Präparaten. Für die Alexa514-Präparate wurden 11 Lymphozyten aufgenommen und die Halbwertsbreiten über eine angepasste Gauß-Funktion bestimmt. Der Mittelwert und die Standardabweichung aus 22 Messungen beträgt in lateraler Richtung $\mathrm{FWHM}_{\mathrm{lat}} = 486 \pm 76\mathrm{nm}$ und axial $\mathrm{FWHM}_{\mathrm{axial}} = 1138 \pm 192\mathrm{nm}$. Diese Werte sind etwas schlechter als die für fluoreszierende Nanokugeln gemessenen Auflösungen. Die schlechtere Auflösung im biologischen Präparat wird möglicherweise durch ungüstigere Brechungsindexanpassung und schlechteres Signal-Rausch-Verhältnis verursacht.

Um das Bleichverhalten von Alexa514 genauer zu untersuchen, wurde mit einer Integrationszeit der CCD-Kamera von 1s 200 Bilder der Ebene aufgenommen, in der die Zentromersignale lagen. Die Position des Objektträgers blieb dabei konstant, sodass das Abnehmen des Signals auf Bleichen zurück zu führen ist. Abbildung 6.24 zeigt die gemessenen Intensitätswerte I, an die eine Exponentialfunktion angepasst wurde:

$$I(t) = I_0 \cdot \mathrm{e}^{-t/\tau} + b \ . \tag{6.2}$$

Dabei bezeichnet I_0 die Anfangsintensität, t die Zeit, b einen konstanten Hintergrund und τ die Zeitkonstante des Bleichens. Aus den Parametern der Fitfunktion ergibt sich eine Intensitätabfall auf 1/e des ursprünglichen Wertes mit $\tau = 131 \pm 13\mathrm{s}$.

In einer weiteren Untersuchung wurde der nukleare Porenkomplex in HeLa-Zellen mit Alexa488 markiert und am Zweiphotonenmikroskop aufgenommen. Die Präparation wurde von Kathrin Mäcken, Karlsruhe, durchgeführt. Die Kernporen haben in diesem Zelltyp einen Abstand, der mit dem verwendeten Mikroskop nicht aufgelöst werden kann, und sind über die gesamte Kernmembran verteilt. Auf diese Weise wird quasi die gesamte Kernmembran homogen fluoreszenzmarkiert. Diese Objekte wurden als weitere Testobjekte im Zweiphotonenmikroskop untersucht. In Abbildung 6.25 sind eine Ebene des Zellkerns und eine Projektion der maximalen Intensität des dreidimensionalen Datensatzes dargestellt. Eine obere Abschätzung der Dicke der Kernmembran wurde aus der Halbwertsbreite der Fluoreszenzverteilung in axialer Richtung zu 1,2μm bestimmt. Abbildung 6.26 zeigt eine dreidimensionale Visualisierung des Datensatzes mit *Matlab*.

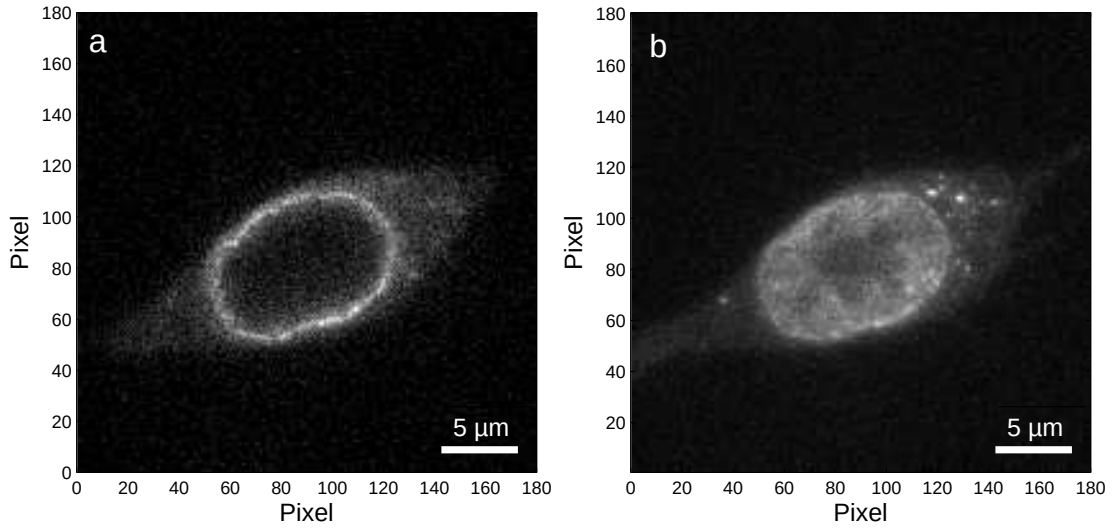


Abbildung 6.25: Nuklearer Porenkomplex von HeLa-Zellen markiert mit Alexa488. (a) Ebene des Zellkerns. (b) Projektion der maximalen Intensität des dreidimensionalen Datensatzes auf eine Ebene.

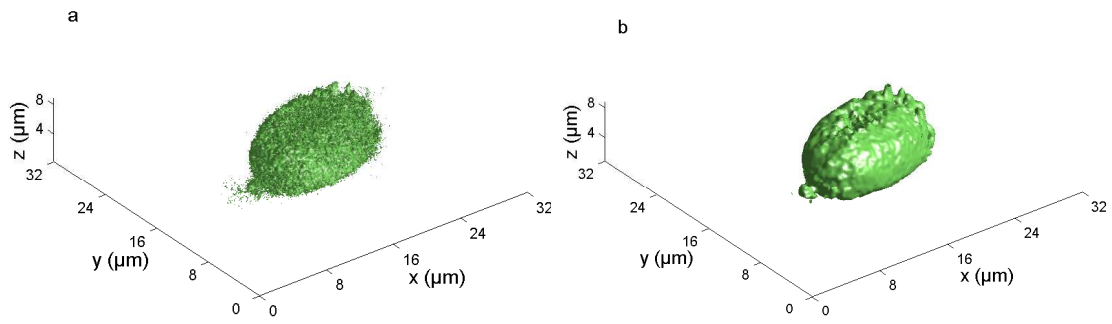


Abbildung 6.26: Visualisierung des mit Alexa488 markierten nuklearer Porenkomplexes in HeLa-Zellen. (a) ohne Filterung der Rohdaten. (b) nach Anwendung eines Gauß-Filters.

6.3.5 Fluoreszenzlebensdauern

Verwendet man als Detektor das triggerbare Bildverstärkersystem können Fluoreszenzlebensdauern gemessen werden (siehe Abschnitt 4.2). Der Bildverstärker wird dazu mit einem Triggersignal für jeden Laserpuls ein einstellbares Zeitfenster lang zur Detektion angeschaltet. Über variable Verzögerungszeiten kann die gesamte Abklingkurve eines Fluoreszenzsignals aufgenommen werden.

Aus den zweidimensionalen Bildern der abfallenden Fluoreszenzintensität zu unterschiedlichen Verzögerungszeiten werden mit einem Algorithmus, der in die kommerzielle Steuerungssoftware DAVIS implementiert ist, die Fluoreszenzlebensdauern berechnet. Dabei wird für jedes Pixel die Intensität über eine benachbarte 5Pixel $\times$ 5Pixel große Region gemittelt und an das abfallende Intensitätsprofil eine Exponentialfunktion angepasst. Die Lebensdauer τ ist durch ein Abklingen der Intensität auf 1/e definiert. Die berechneten Lebensdauern werden dann pixelweise in einer zweidimensionalen, farbcodierten Lebensdauerkarte aufgetragen, in der unterschiedlichen Lebensdauern eine unterschiedliche Farbe zugeordnet wird.

Bei den Messungen wurden die Verzögerungszeiten von $0 - 14000$ps in Schritten von 200ps für Aufnahmen der Nanokugeln mit 390nm Durchmesser und in Schritten von 500ps für die Pollenkörner variiert. Die Hochspannung an der MCP betrug bei den Messungen 700V. Als Zeitfenster (*gate*) für die Detektion wurden 500ps gewählt.

Abbildung 6.27 zeigt die Lebensdauerkarten der Fluoreszenz für Nanokugeln mit 390nm Durchmesser und Pollenkörner. Die gemessen Fluoreszenlebensdauern τ betragen bei den Nanokugeln mit 390nm Durchmessern $\tau = 2,7 \pm 1,4$ns, bei den Pollenkörnern $\tau = 9,4 \pm 2,4$ns. Der Fehler ergibt sich aus der Mittelung der berechneten Lebensdauer über einen gewissen Bereich des Objekts.

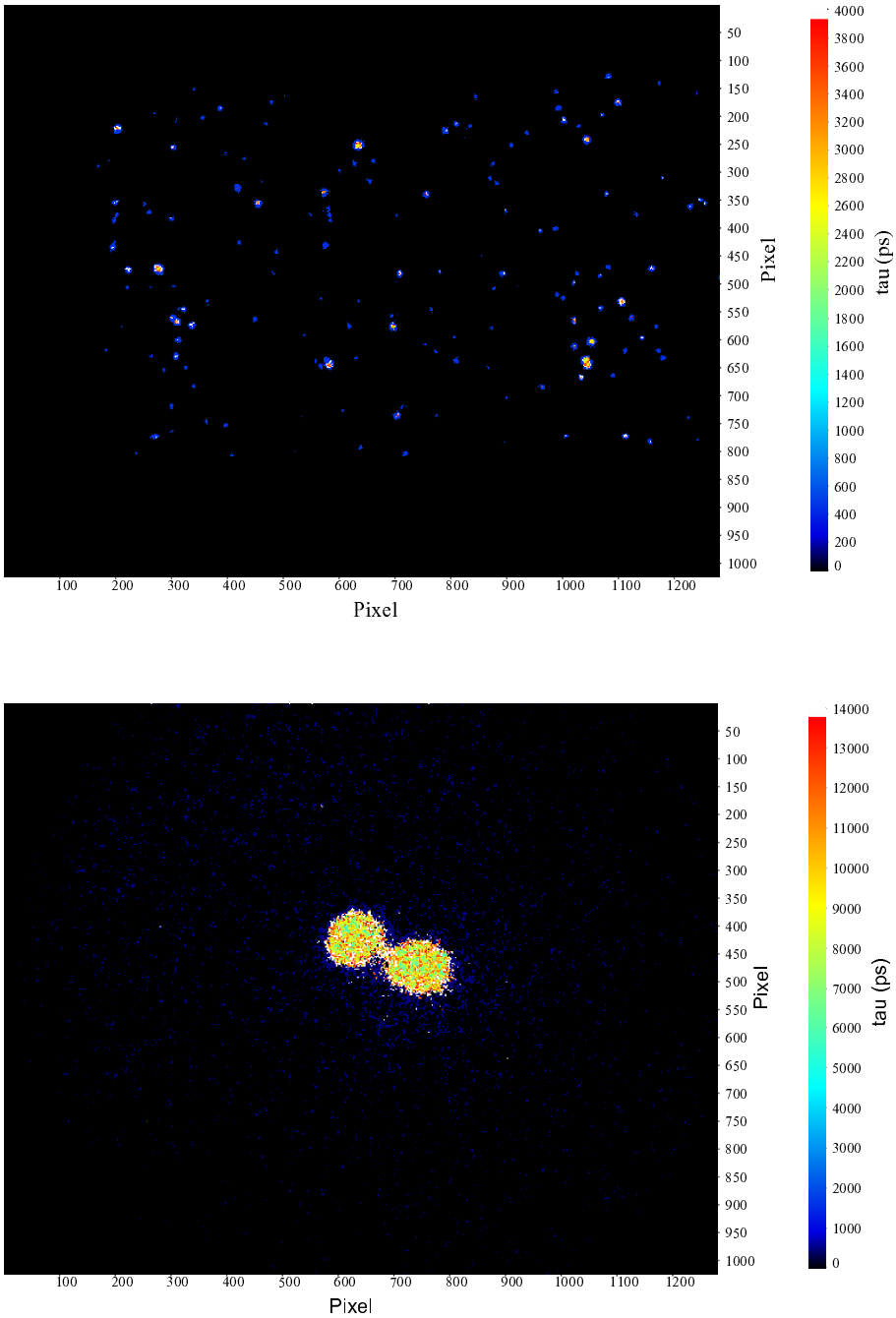


Abbildung 6.27: Zweidimensionale Darstellung der gemessenen Lebensdauern des Fluoreszenzfarbstoffs in Nanokugeln mit Durchmesser 390nm (oben) und der Autofluoreszenz von Pollenkörnern eines Gänseblümchens (*Bellis perennis*) (unten). Die berechneten Lebensdauern werden pixelweise in einer Farbcodierung aufgetragen. Dabei werden unterschiedlichen Lebensdauern unterschiedliche Farben zugeordnet. Anhand der Farbskala auf der rechten Seite der Bilder kann die zu einer Farbe gehörige Fluoreszenzlebensdauer abgelesen werden.

7 Diskussion und Ausblick

Der Hauptvorteil der SMI-Mikroskopie mit einem Spiegel zur Erzeugung der räumlich modulierten Beleuchtung liegt in der signifikant geringeren Komplexität des Aufbaus bei annähernd gleicher Leistungsfähigkeit. Verglichen zum SMI-Mikroskop in der konventionellen Ausführung ist die Justage stark vereinfacht. Denn anstatt zwei Strahlen präzise überlagern zu müssen, ist es ausreichend, einen Strahl zu reflektieren und mit sich selbst zu überlagern. Der Spiegel-Aufbau kann leicht als Erweiterung eines kommerziellen Mikroskopsystems implementiert werden. Prinzipiell müssen dazu nur ein sehr präziser piezoelektrischer Objektverfahrtisch, der Spiegel und eine Laserquelle zu einem herkömmlichen Epifluoreszenzmikroskop hinzugefügt werden. Die gute Leistungsfähigkeit des sehr preiswerten DIN-Objektivs, die in den Messungen gezeigt wurde, könnte für eine Kommerzialisierung der SMI-Mikroskopie ebenfalls eine Rolle spielen. Allerdings konnten schwach fluoreszierende Objekte nur mit einem Hochpräzisionsobjektiv aufgenommen werden, weil durch die größere (effektive) numerische Apertur mehr Licht detektiert wird. Um das maximale Signal-Rausch-Verhältnis und die höchste Sensitivität zu erreichen, gibt es daher keine Alternative zu sehr gut korrigierten Objektiven.

Für transparente oder sehr dünne Präparate mit geringer Absorption und Streuung sind die Intensitäten der interferierenden Strahlen innerhalb kleiner Abweichungen gleich. Dies ist von sehr großer Bedeutung, da die in den axialen Intensitätsprofilen vorhandene Modulation und die damit gemessene Größe abhängig ist von gleichen Intensitäten der Teilstrahlen. Nach allgemeinen optischen Überlegungen ist zu erwarten, dass die Anwendbarkeit des Spiegel-Aufbaus durch die Objektdicke und dessen Eigenschaften bezüglich Streuung, Absorption und Brechungsindex begrenzt wird. Diese Beschränkungen sind vergleichbar mit denjenigen, die für gute Aufnahmen am CLSM nötig sind. Im Gegensatz dazu stellen andere interferometrische Techniken wie 4Pi- oder I^5M-Mikroskopie wesentlich strengere Bedingungen an die zu untersuchenden Präparate. Die Messungen zeigen, dass das SMI-Mikroskop mit Spiegel im Vergleich zum konventionellen Aufbau empfindlicher auf eine unpräzise Justage und ungünstige optische Eigenschaften der Präparate reagiert, wodurch etwas größere Ungenauigkeiten bei der Größenbestimmung hervorgerufen werden.

Durch das neu aufgebaute SMI-Mikroskop mit Spiegel stehen nun auch die 458nm und 514nm Wellenlängen für einen routinemäßigen Einsatz in der biologischen Anwendung zur Verfügung. Dies ist eine entscheidende Verbesserung, da diese neuen Wellenlängen die Fluoreszenzanregung sehr vieler Farbstoffe oder fluoreszierender Proteine erlaubt, die sehr verbreitet in biologischen Laboren verwendet werden. Die Entwicklung neuer Fluoreszenzfarbstoffe für biologische Markierungen ist sehr zeitaufwendig und kann mehrere Jahre dauern. Insbesondere können mit den Wellenlängen 458nm und 514nm *Cyan Fluorescent Protein* (CFP) und *Yellow Fluorescent Protein* (YFP) im selben Aufbau angeregt und getrennt voneinander detektiert werden.

Sowohl für die Halbwertsbreite und Position in lateraler Richtung, als auch für die Größen-

und Positionsmessung über die axiale Modulationsstruktur sind die statistischen Fehler, die durch aufeinander folgende Messungen der gleichen Objekte bestimmt wurden, bei genügend gutem Signal-Rausch-Verhältnis vernachlässigbar. Die Entwicklung des Mikroskops und der Auswertealgorithmen sind so weit fortgeschritten, dass der statistische Messfehler im Wesentlichen durch die Photonenstatistik bestimmt wird. Systematische Fehlerquellen können allerdings nicht ausgeschlossen werden. Sicherlich haben die optischen Eigenschaften des Präparats einen Einfluss auf die Größenbestimmung. Diese werden durch die Kalibration mit Referenzobjekten weitgehend kompensiert [88]. Eine weitere Fehlerquelle der Größenmessungen sind die a-priori Annahmen über die Objektstruktur. In erster Näherung geht man von einer sphärischen Form der Objekte aus. Für die untersuchten Nanokugeln ist die Annahme einer sphärischen Farbstoffverteilung sicherlich gerechtfertigt und führte auch zu guter Übereinstimmung mit den Größen nach Herstellerangabe. Die Ungenauigkeiten der Messungen waren dabei mit etwa 10nm etwa so groß wie die angegebene Uniformität der Nanokugeln. Für viele makromolekulare biologische Komplexe, beispielsweise *Transcription Factories*, Ribosomen, Kernporenkomplexe, ..., ist aus elektronenmikroskopischen Studien bekannt, dass sie diese Bedingung einer sphärischen Form – wenigstens näherungsweise – erfüllen. Die Analyse derartiger Objekte stellt somit ein typisches Anwendungsfeld der SMI-Mikrokopie dar.

Falls die Ausdehnung der untersuchten Objekte in lateraler und axialer Richtung größer ist als etwa 200nm, ist die Größenbestimmung mittels SMI-Mikroskopie nicht mehr möglich. Jedoch tritt unter Umständen bei solchen Objekten eine von der Form abhängige axiale Modulationsstruktur auf, die irrtümlicherweise als Größe <200nm interpretiert werden könnte. Diese Objekte sind aber so groß, dass sie in lateraler Richtung durch das Mikroskop aufgelöst werden. Wird diese laterale Information bei der Größenbestimmung mit SMI-Mikroskopie berücksichtigt und werden diese Objekte bei der Auswertung verworfen, können Fehlinterpretationen vermieden werden. Die Zahl der verworfenen Objektgrößen spielen in den untersuchten Nanokugelpräparaten keine Rolle. Der relativ kleine Anteil von maximal 5% ist auf Cluster aus mehreren Kugeln zurück zu führen. Bei den hier vorgestellten biologischen Messungen ist dieser Anteil mit ungefähr 10% größer. Die Ursache hierfür könnten biologische Variationen des Präparats sein.

Die an der 7q22 Chromatinregion durchgeführten Messungen bilden die Grundlage für die weitere, detaillierte Untersuchung der Aktivierung des EPO-Gens unter Sauerstoffmangel. Die schmale Verteilung der gemessenen Größen und die starke Korrelation der Größen in den Präparaten, die unter Hypoxie und Normoxie präpariert wurden, deutet an, dass eine Messung der Dekondensation möglich ist, sollte sie in einer entsprechenden Größenordnung vorhanden sein. Der nächste Schritt zur Untersuchung hypoxieinduzierter Genexpression ist die Analyse der EPO-Genregion mittels Sonden, die aus BAC (*bacterial artificial chromosome*) -Klonen hergestellt werden. Dabei ist es von Vorteil, dass man die markierte Sequenz auf der DNA genau kennt und dadurch sicherstellen kann welcher Abschnitt markiert wird. Der biologische Teil dieser Experimente wurde in den Laboren des Kollaborationspartners bereits begonnen, konnte aber wegen Problemen bei der Präparation im Rahmen dieser Arbeit nicht mehr fertig gestellt werden.

Wie die Ergebnisse zeigen, kann die SMI-Mikroskopie in zukünftigen biologischen Untersuchungen routinemäßig eingesetzt werden – wegen des einfachen Aufbaus insbesondere auch mit einem Spiegel. Durch die intrinsische Parallelisierung als Weitfeldtechnik besitzt die SMI-Mikroskopie einen entscheidenden Vorteil gegenüber Punkt-Raster-Techniken wie

CLSM oder 4Pi-Mikroskopie, falls eine große Zahl fluoreszierender Objekte sehr schnell analysiert werden soll. Dieser Vorteil könnte besonders in Experimenten mit lebenden Zellen ausgenutzt werden. Ein SMI-Mikroskop für zukünftige in-vivo Experimente wird deshalb momentan aufgebaut.

Durch einige Umbauten und Verbesserungen ließe sich mit SMI-Mikroskopie in Zukunft auch die tatsächliche optische Auflösung erhöhen. Dabei bietet der herkömmliche Aufbau mit zwei Objektiven für die nötigen Veränderungen die größere Flexibilität. Denn eine strukturierte Beleuchtung in axialer Richtung ist mittels des Spiegels leicht zu realisieren. Um aber die optische Auflösung zu erhöhen, müsste axial und lateral strukturierte Beleuchtung kombiniert werden und/oder die Detektion durch beide Objektive kohärent erfolgen.

Zusammenfassend stellt die SMI-Mikroskopie mit einem Spiegel und nur einem Objektiv eine einfache, kostengünstige und schnelle Methode für hochpräzise Größen- und Distanzmessungen zur Analyse dreidimensionaler biologischer Nanostrukturen dar.

Durch die Implementierung der Auswertealgorithmen für die spektrale Präzisionsdistanzmikroskopie in der Software *Matlab*, die vom Betriebssystem unabhängig einsetzbar ist, und der erstellten graphischen Benutzeroberfläche der Auswertesoftware sind die verwendeten Algorithmen einer größeren Zahl von Nutzern zugänglich, als dies vorher der Fall war. Kombiniert mit den automatischen Objekterkennungsmethoden, die für die SMI-Mikroskopie von M. Sc. David Baddeley geschrieben wurden, erlaubt die neue Auswertesoftware nun ebenfalls eine schnelle Analyse sehr vieler Objekte.

Die neuen Algorithmen ermöglichen eine sehr viel präzisere Korrektur der lateralen chromatischen Verschiebungen. Diese bleiben über Monate hinweg konstant, falls der Aufbau des Mikroskops nicht wesentlich verändert wird. Die gemessenen Korrekturfunktionen können auf dem Auswerterechner gespeichert und über einen längeren Zeitraum eingesetzt werden. Die chromatischen Verschiebungen verändern sich nicht, falls der Objektivrevolver gedreht wird. Jedoch kann das Herausschrauben des Objektivs zu anderen Verschiebungen, insbesondere in lateraler Richtung führen.

Die Korrektur in biologischen Präparaten ist nicht mit der Genauigkeit möglich, die in Präparaten mit multispektralen Testobjekten erreicht wird. Die Ursache hierfür liegt unter anderem an der etwas schlechteren Photonenstatistik im biologischen Präparat. Zudem sind die optischen Eigenschaften ungünstiger, insbesondere im Bezug auf die Brechungsindexhomogenität, wodurch Abberationen induziert werden. Eventuell spielen auch Variationen bei der Präparation des biologischen Testobjekts selbst eine Rolle. Die Ergebnisse zeigen, dass eine Korrektur der chromatischen Verschiebung in biologischen Präparaten, die eine wesentliche Voraussetzung für Präzisionsdistanzmessungen ist, mit einer Präzision von etwa 40nm in lateraler und 50nm in axialer Richtung erreicht wird.

Indem man die höhere Lokalisationsgenauigkeit der SMI-Mikroskopie ausnutzt, werden durch die Kombination von SMI-Mikroskopie und SPDM noch präzisere Distanzmessungen möglich [32]. Auch eine Kombination mit der 4Pi-Mikroskopie ist denkbar. Falls Fluoreszenzlebensdauern als spektrale Signatur verwendet werden, ist SPDM ohne Korrektur der chromatischen Verschiebung möglich. Bei der Entwicklung neuer Fluoreszenzmarkierungstechniken wurden in den letzten Jahren große Fortschritte durch den Einsatz von Quantenpunkten erzielt, die ideal zur Markierung für SPDM einsetzbar sind. Diese be-

sitzen je nach Größe unterschiedliche, sehr schmale und damit spektral leicht trennbare Emissionsspektren. Die Anregungsspektren sind breit, sodass möglicherweise nur eine Wellenlänge nötig ist, um mehrere Quantenpunkte mit unterschiedlichen Emissionsspektren zur Fluoreszenz anzuregen.

Die in der Zweiphotonenmikroskopie realisierte Art der parallelen Detektion mit einer CCD-Kamera erlaubt es ein sehr großes Gesichtsfeld von $102\mu m \times 82\mu m$ bei gleichzeitig sehr hoher Auflösung und Zweiphotonenanregung aufzunehmen. Die gemessene Auflösung des Mikroskops stimmt näherungsweise mit den Werten überein, die man aus der Theorie ableitet. In biologischen Präparaten werden diese optimalen Auflösungen nicht gemessen, da das Präparat im Allgemeinen ungünstigere Brechungsindexeigenschaften besitzt, was zu einer Verbreiterung der Punktbildfunktion führt. Die Möglichkeit optische Schnitte durch das Präparat zu legen ist für viele praktische biologische Anwendungen oft schon ausreichend. Denn in biologischen Laboren werden konfokale Laserscanningmikroskope meist nur zur dreidimensionalen Darstellung der untersuchten Proben verwendet und die eigentliche Auflösung ist weniger relevant. Durch die größere Wellenlänge der Zweiphotonenanregung können zudem tiefer liegende Strukuren in dicken und stark streuenden Präparaten abgebildet werden. Die Fluoreszenzlebensdauer der Farbstoffe liefert eine weitere Möglichkeit Objektstrukturen zu diskriminieren, die in konventionellen konfokalen Mikroskopen nicht standardmäßig verfügbar ist.

Grundsätzlich bietet die Fluoreszenzlebensdauer als zusätzliche spektrale Signatur die Möglichkeit, spektrale Präzisionsdistanzmikroskopie durchzuführen, ohne dass die chromatische Verschiebung berücksichtigt werden muss. Die großen Unsicherheiten bei der Messung der Lebensdauer erschweren jedoch die Diskriminierung von Objekten, die sich nur durch die Fluoreszenzlebensdauer unterscheiden und haben bislang die Realisierung in diesem Aufbau verhindert. Die großen Unsicherheiten bei den Messungen der Lebensdauer liegen vor allem an der im Vergleich zur CCD-Kamera geringen Detektionsempfindlichkeit des Bildverstärkersystems. Denn die Photokathode des Bildverstärkers besitzt nur eine Quanteneffizienz von maximal 12%, die damit etwa drei mal geringer ist als die der CCD-Kamera. Zudem wird durch die kurze Öffnungsdauer nicht das gesamte Fluoreszenzsignal aufgenommen, was zu einer weiteren Reduktion des Signals führt. Wenn auf die Messung von Fluoreszenzlebensdauern verzichtet werden kann, ist für die Detektion die CCD-Kamera vorzuziehen.

Bislang erfolgt die Steuerung des Bildverstärkersystems über die kommerzielle Software DAVIS. Während die Schrittmotoren und piezoelektrischen Verfahrtische zur Objektpositionierung und Scanner mittels einer in der Programmiersprache *Python* selbst entwickelten Software gesteuert werden. Der Betrieb ist zwar problemlos parallel möglich, jedoch kann die Bildaufnahme nur mit DAVIS erfolgen, was Fluoreszenzlebensdauermessungen nur aus einer Objektebene erlaubt. Durch eine Erweiterung der Steuersoftware zur Ansteuerung des Bildverstärkers ließen sich zukünftig über die Messung der drei Raumdimensionen plus der Fluoreszenzlebensdauer sogar vierdimensionale Aufnahmen der Objekte realisieren.

Bei den durchgeführten Messungen wurde mit 0,8s eine relativ lange Integrationszeit der Kamera gewählt. Da es sich um fixierte Proben handelte war das Signal-Rausch-Verhältnis und nicht die Schnelligkeit von Belang. Im Prinzip kann die Integrationszeit der Kamera für das beschriebene Mikroskop auf 33ms verringert werden. Die größte Beschränkung bil-

det momentan nur die Empfindlichkeit des Detektors beziehungsweise der CCD-Kamera. Durch die Verwendung einer so genannten *back illuminated* CCD-Kamera ließe sich die Quanteneffizienz und damit die Empfindlichkeit des Detektionssystems steigern. Eine Zukunftsperspektive ist die Realisierung schneller in-vivo Zweiphotonenmikroskopie mit einem sehr großen Gesichtsfeld bei gleichzeitiger hoher Auflösung. Durch den resonanten Galvanometerscanner ist ein sehr schnelles Rastern des Fokus über das Präparat und damit eine schnelle Datenaufnahme möglich. Mit geeigneten Fluoreszenzmarkierungen, die beispielsweise mittels Quantenpunkten realisiert werden könnten, und einer empfindlicheren Detektion sind mit dem bestehenden Aufbau Bildraten von bis zu 30 Bildern pro Sekunde möglich.

Eine weitere Erhöhung des detektierbaren Fluoreszenzsignals bei gleicher Laserleistung könnte durch die Verwendung einer Dispersionskompensation erreicht werden. Der Laserpuls wird auf dem Weg vom Laser in die Probe durch die Gruppengeschwindigkeitsdispersion in den optischen Elementen des Aufbaus – vor allem im Objektiv – zeitlich verlängert [74, 86]. Im Fokus des Objektivs besitzt der Puls also nicht die minimale Breite wie beim Verlassen des Lasers. Da die Pulslänge indirekt proportional zum Wirkungsquerschnitt der Zweiphotonenanregung ist, kann das detektierbare Fluoreszenzsignal durch eine Kompensation der Dispersion vergrößert werden. Dazu lässt man den Strahl direkt nach dem Laser zwei Prismen aus einer geeigneten Glassorte passieren. Dem Puls wird dadurch eine Dispersion aufgeprägt, die der durch den Aufbau verursachten Dispersion genau entgegengesetzt ist. Im Fokus des Objektivs wird diese dann gerade kompensiert, sodass die Pulsbreite optimiert wird.

Zweiphotonenmikroskopie ließe sich in Zukunft mit der kürzlich entwickelten Methode PALM (*Photoactivated Localization Microscopy* [9]) kombinieren. Dabei werden so genannte photoaktivierbare Proteine eingesetzt. Durch die Beleuchtung mit einer bestimmten Wellenlänge werden diese modifiziert und zur Fluoreszenz anregbar. Die Photoaktivierung erfolgt stochastisch, sodass bei entsprechend geringen Lichtintensitäten nur ein kleiner Teil der vorhandenen Proteine aktiviert wird. Dadurch liegen diese „angeschalteten“ Proteine mit großer Wahrscheinlichkeit optisch isoliert und deren Position kann aus dem beugungsbegrenzten Bild über den Intensitätsschwerpunkt – analog zu den Methoden der SPDM – bestimmt werden. Nach der Aufnahme bleicht man die „angeschalteten“ Proteine aus, was verhindert, dass sie erneut zur Fluoreszenz angeregt werden und dadurch zum Bild beitragen können. Dieser Prozess wird solange iteriert bis das gesamte markierte Objekt aufgenommen wurde. Bislang wurde diese Methode nur zweidimensional kombiniert mit Detektion via TIRF (*Total Internal Reflection Fluorescence Microscopy*) angewandt. Dadurch konnte das störende Fluoreszenzsignal des Hintergrunds reduziert werden. Denn die Photoaktivierung erfolgte über Einphotonenanregung durch einen im Ultravioletten emittierenden Laser und damit im gesamten durchstrahlten Präparat. Durch die Beschränkung der Photoaktivierung auf die Fokusebene ließe sich mit der Zweiphotonenmikroskopie PALM auf drei Dimensionen erweitern, falls geeignete photoaktivierbare Proteine zur Verfügung stünden. Für ein Variante des grün fluoreszierenden Proteins (GFP) wurde die Photoaktivierung unter Zweiphotonenanregung bereits experimentell nachgewiesen [78]. Nutzt man zusätzlich die höhere Lokalisationsgenauigkeit der SMI-Mikroskopie in axialer Richtung aus, ist durch eine Kombination der drei in dieser Arbeit vorgestellten Techniken eine optische Auflösung im Bereich weniger Nanometer realisierbar.

8 Zusammenfassung

In dieser Arbeit wurden unterschiedliche, innovative Methoden der Fluoreszenzmikroskopie weiter entwickelt und auf ihre Anwendbarkeit für Hochpräzisionsmessungen zur quantitativen Analyse der funktionellen Topologie des Genoms untersucht. Bei den betrachteten Verfahren handelt es sich um die Mikroskopie mit räumlich modulierter Beleuchtung (SMI-Mikroskopie), die spektrale Präzisionsdistanz- und die Zweiphotonenmikroskopie. Diese Techniken wurden zur präzisen Messung von Größen und Distanzen fluoreszierender Objekte unterhalb der optischen Auflösungsgrenze eingesetzt.

Die SMI-Mikroskopie ist eine neuartige Methode der Fernfeld-Lichtmikroskopie, um die Ausdehnung in axialer Richtung und die Position von optisch isolierten, fluoreszierenden Objekten mit sehr hoher Präzision zu bestimmen. Die kleinste messbare Ausdehnung beträgt etwa 40nm, was ungefähr $1/12$ der verwendeten Wellenlänge entspricht. Bei der Positionsbestimmung wird eine Genauigkeit von zirka 4nm erreicht. Während die bisherigen SMI-Mikroskope immer zwei Objektive umfassten, wurde in der vorliegenden Arbeit gezeigt, dass SMI-Mikroskopie auch mit nur einem Objektiv und einem Spiegel realisiert werden kann.

Der vorher bestehende Aufbau des SMI-Mikroskops, der nur begrenzt für die biologische Forschung einsetzbar war, wurde grundlegend modifiziert und in wesentlichen Punkten verbessert. Zusätzlich zur vorhanden 458nm Anregungswellenlänge wurde die 514nm Laserlinie in das Mikroskop implementiert. Als Hauptunterschied zum konventionellen Aufbau des SMI-Mikroskops wurde die Interferenzstruktur der Beleuchtung mit einem Spiegel erzeugt. Die Charakterisierung der Eigenschaften erfolgte durch systematische Untersuchungen von fluoreszierenden Nanokugeln bekannten Durchmessers. Die Reproduzierbarkeit der Größenmessungen wurde anhand von direkt aufeinander folgenden Aufnahmen zu $-0,8 \pm 4,7$nm bestimmt. Ein Vergleich mit konventioneller SMI-Mikroskopie zeigte in etwa die gleiche Präzision. Jedoch scheint unter ungünstigen optischen Bedingungen der Spiegel-Aufbau dem konventionellen Aufbau unterlegen zu sein. Die Leistungsfähigkeit der Größenbestimmung wurde an Nanokugeln mit Durchmessern von $44 - 200$nm mit einem Standard-DIN-Objektiv und einem Präzisionsobjektiv untersucht. Die gemessenen Größen stimmen mit den nominellen Größen nach Herstellerangabe innerhalb der Messgenauigkeit von $10-14$nm für das DIN- und $9-16$nm für das Präzisionsobjektiv gut überein. Außerdem konnte ein geringer Einfluss der numerischen Apertur auf die Größenmessung festgestellt werden. Die Messwerte für größere numerische Aperturen waren größer als der nominelle Wert laut Hersteller. Eine Analyse derselben Objekte, die bei verschiedenen Wellenlängen anregbar sind, zeigte, dass die Größenmessung unabhängig von der Wellenlänge mit einer Präzision von $8 - 20$nm möglich ist. Die Lokalisationsgenauigkeit für aufeinander folgende Messungen beträgt am Spiegel-SMI-Mikroskop 4nm in axialer Richtung und 6nm in lateraler Richtung. Als Hochdurchsatzmethode kann mittels SMI-Mikroskopie im Mittel die Größe eines fluoreszierenden Objekts pro Sekunde inklusive Auswertung analysiert werden.

Zur biologischen Anwendung bei der Analyse hypoxieinduzierter Genexpression wurde die axiale Ausdehnung der 7q22 Chromatinregion untersucht. Mit diesem Testobjekt wurden die Eigenschaften des Spiegel-Aufbaus mit dem konventionellen SMI-Mikroskop in biologischen Präparaten verglichen. Für die gemessenen Größenverteilungen in beiden Mikroskopen wurde kein signifikanter Unterschied gefunden. Aus dem Mittelwert der Größe ließ sich die Kompaktierung der 7q22 Chromatinregion im Vergleich zum linearen DNA-Doppelstrang zu 1:227 abschätzen.

Die spektrale Präzisionsdistanzmikroskopie (SPDM) ist eine Methode der Fluoreszenzmikroskopie, die Winkel- und Abstandsmessungen zwischen spektral unterschiedlich markierten Objekten weit unterhalb der optischen Auflösungsgrenze ermöglicht. Auftretende Abberationen des Abbildungssystems wie beispielsweise die chromatische Verschiebung müssen mit geeigneten dreidimensionalen Bildverarbeitungsmethoden korrigiert werden. Diese Auswertealgorithmen wurden während dieser Arbeit neu in *Matlab* implementiert. Der Einfluss mechanischer Instabilitäten durch die Scanner des konfokalen Laserscanningmikroskops wurde im Experiment untersucht. Die induzierten Ungenauigkeiten sind bei entsprechend guter Photonenstatistik <5nm. Messungen der chromatischen Verschiebungen für die verwendeten Objektive zeigten in lateraler Richtung eine lineare Abhängigkeit von der Position des Objekts im Gesichtsfeld des Objektivs. In axialer Richtung konnte keine Positionsabhängigkeit festgestellt werden. Um eine verbesserte Korrektur der Verschiebung zu erreichen, wurden an die in einer Kalibrationsmessung aufgenommenen Intensitätsschwerpunktskoordinaten für die x- und y-Richtung zwei Korrekturebenen angepasst. Mit diesen Korrekturfunktionen konnten die chromatischen Verschiebungen in Präparaten mit multispektralen fluoreszierenden Testobjekten bis auf <7nm in lateraler und <13nm in axialer Richtung verringert werden. Eine Untersuchung der Abhängigkeit von der Eindringtiefe ergab, dass die chromatischen Verschiebungen im betrachteten Bereich von $0 - 20\mu$m Eindringtiefe lateral und axial maximal um etwa 10nm beziehungsweise 50nm anwachsen. Die chromatischen Verschiebungen in biologischen Präparaten wurden anhand der RP11-447A7 Genregion auf Chromosom 9 analysiert, die mit einem 69kbp großen, zweifarbig markierten BAC (*bacterial artificial chromosome*) -Klon fluoreszenzmarkiert wurde. Dazu wurden Kalibrationsmessungen durchgeführt, um die Korrekturfunktionen zu bestimmen. Die Werte der eigentlichen Messung wurden mit diesen auf 2 ± 30nm in x-, 19 ± 41nm in y- und -2 ± 48nm in z-Richtung korrigiert. Die Genauigkeit der Korrektur der chromatischen Verschiebung für spektrale Präzisionsdistanzmessungen beträgt damit in lateraler Richtung etwa 40nm und in axialer Richtung etwa 50nm.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde ein Zweiphotonenmikroskop mit schneller Punktrasterung durch einen resonanten Galvanometerscanner entwickelt und komplett aufgebaut. Die Detektion des Fluoreszenzsignals erfolgt ohne die Verwendung einer Lochblende direkt mittels einer CCD-Kamera oder mittels eines Bildverstärkersystems im Falle der Fluoreszenzlebendauermessungen.

Die Rasterung des Fokus über die Probe wurde in lateraler Richtung mit einem schnellen, resonanten Galvanometerscanner und einem langsameren Galvanometerscanner mit variabler Signalform realisiert. Zu deren Steuerung durch einen Rechner wurde eine elektronische Schaltung entworfen, die einen Mikrocontroller und einen 12-Bit Digital-Analog-Wandler umfasste. Der Mikrocontroller wurde in Assembler programmiert. Neben einfachen Steuerbefehlen für beide Galvanometer enthält das Programm einen Algorithmus zur Erzeugung eines Dreieckssignals über direkte digitale Synthese als Signalform für eines

der Galvanometer. Zur komfortablen Steuerung wurde in der Programmiersprache *Python* eine graphische Benutzeroberfläche erstellt. Das Zweiphotonenmikroskop wurde anhand systematischer Messungen bezüglich Auflösung, Abbildungseigenschaften und verwendbarer Farbstoffe charakterisiert. Die annähernd homogene Ausleuchtung des Gesichtsfeldes wurde mit Aufnahmen einer dünnen fluoreszierenden Schicht gezeigt. Durch Messungen an fluoreszierenden Nanokugeln mit 140nm, 290nm und 390nm Durchmesser konnte die erreichbare Auflösung des Mikroskops lateral zu etwa 300nm und axial zu etwa 800nm bestimmt werden. Die Abbildungseigenschaften von Einphoton-CLSM, SMI- und Zweiphotonenmikroskopie wurden durch Aufnahmen von Pollenkörnern eines Gänseblümchens (*Bellis perennis*) verglichen. Mittels einer Volumendarstellung des Pollenkorns für die Zweiphotonenmikroskopie konnten die Vorteile der echten dreidimensionalen Abbildung durch optische Schnitte veranschaulicht werden. Zudem wurde die Anregbarkeit unterschiedlicher Farbstoffe zur Fluoreszenzmarkierung in biologischen Präparaten untersucht. Dabei zeigten die Fluoreszenzfarbstoffe Alexa488 und Alexa514 ein sehr gutes Signal und relativ geringes Bleichen. In Lymphozyten, bei denen das Zentromer von Chromosom 11 mit Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung markiert wurde, konnten für beide Farbstoffe Signale mit gutem Signal-Rausch-Verhältnis detektiert werden. Durch Messungen an den fluoreszenzmarkierten Zentromeren, die wegen ihrer geringen Größe geeignete Testobjekte darstellen, wurde die Auflösung in biologischen Präparaten zu lateral 486nm und axial 1138nm bestimmt. Die dreidimensionalen Abbildungseigenschaften des Zweiphotonenmikroskops wurden ebenfalls an Hela-Zellen demonstriert, deren nuklearer Porenkomplex mit Alexa488 markiert war. Setzt man das triggerbare Bildverstärkersystem als Detektor ein, können mit dem Zweiphotonenmikroskop die Lebensdauern der Fluoreszenz gemessen werden. Dies wurde an Nanokugeln mit 390nm Durchmessern und Pollenkörnern gezeigt. Die gemessen Werte für die Lebensdauern ergaben sich zu $2,7 \pm 1,4$ns für die Nanokugeln und $9,4 \pm 2,4$ns für die Pollenkörner.

Durch die erzielten Fortschritte bei der Weiterentwicklung der SPDM und den neuen Aufbauten der SMI- und Zweiphotonenmikroskopie steht nun einem Routineeinsatz dieser Techniken für die Analyse der funktionellen Genomnanostruktur nichts mehr im Wege. Zudem wurde der Grundstein gelegt für die Kombination von PALM (*Photoactivated Localization Microscopy*), Zweiphotonen- und SMI-Mikroskopie, wodurch eine lichtmikroskopische optische Auflösung im Bereich weniger Nanometer erreichbar wird.

A Galvanometeransteuerung

In diesem Kapitel wird der elektronische Aufbau der Computeransteuerung der Galvanometerscanner im Detail beschrieben. Die Steuerung erfolgt mittels eines selbst programmierten Mikrocontrollers über die RS232-Schnittstelle des Rechners.

A.1 Galvanometerscanner

Der resonante Hochfrequenzscanner CRS wird mit dem mitgelieferten Steuerungsboard angesteuert und mit Strom und Spannung versorgt (Pins 9-16). Die Belegung der Anschlusspins ist in Tabelle A.1 zusammengefasst. Die Amplitude wird mit einer Spannung an *Zoom high* ($U = 0 - 5$V) und *Zoom return* ($U = 0$V) eingestellt. Pin 4 *relay shutoff* schaltet den Scanner über ein TTL-Signal ein ($U = 0$V) oder aus ($U = 5$V). Mit den *scaling bits 0* und *1* lässt sich die Amplitude um die Faktoren 1 bis 4 verringern beziehungsweise der Vergrößerungsfaktor entsprechend erhöhen. Das *CRS sync* Signal liefert ein Trigger-Signal der so genannten *Pixel Clock* des Boards für die Aufnahme eines Pixels. Es dient dazu den Pixel-Abstand über den Scan-Bereich zu linearisieren. Denn die Winkelauslenkung des Scanners ist sinusförmig mit einer Frequenz gleich der Resonanzfrequenz des Scanners. Dadurch liegen, bei fester Frequenz der *Pixel Clock*, die einzelnen Pixel in der Mitte des Scan-Bereichs weiter auseinander als außen. Um gleiche Pixel-Abstände zu erhalten benutzt man die *Pixel Clock* des Steuerungsboards. Die Masse-(*ground*)Anschlüsse wurden alle zusammengeschlossen. Es wurden dadurch keine negativen Effekte wie erhöhtes Rauschen beobachtet.

Pin	Funktion
1	Zoom high (0-5V)
2	Zoom return
3	Signal ground, digital
4	Relay shutoff (active low)
5	SEL0 (Scaling bit 0)
6	SEL1 (Scaling bit 1)
7	Analog ground
8	CRS sync
9,10	+5V DC
11,12	Analog ground
13,14	+15V DC
15,16	-15V DC

Tabelle A.1: Pinbelegung der Steuerung und Spannungsversorgung des CRS.

Pin	Funktion
1	Command +
2	Command -
3	Ground
4	Temperature status
5	Servo enable
6	Servo ready
7	Scanner Pos. +
8	Scanner Pos. -

Tabelle A.2: Pinbelegung der Steuerungsschnittstelle des MiniSAX Board zur Steuerung des VM500 Galvanometerscanners.

Der Galvanometerscanner VM500 wird über das MiniSAX Board (Miniature Single Axis Controller) mit Strom und Spannung versorgt und gesteuert. Die Pinbelegung der Steuerungssignalschnittstelle zeigt Tabelle A.2. Die Signalform des Scanners wird in differentieller Form ($U = 0 - 3$V) auf die Pins 1-3 gegeben. Die Temperaturregelung liefert auf Pin 4 ein Statussignal, das allerdings nicht ausgelesen wurde. Das *servo enable* Signal muss auf 0V gelegt werden, damit der Scanner startet. Pin 6 *servo ready* wurde ebenfalls nicht ausgelesen. Das differentielle Positionssignal des Scanners auf Pins 7 und 8 wurde auf eine externe Buchse geführt, um die Kontrolle mit dem Oszilloskop zu ermöglichen.

A.2 Mikrocontroller

Folgender Abschnitt beschreibt die elektronische Schaltung und die Programmierung des Mikrocontrollers (ATmega16[1]) für die Steuerung der beiden Galvanometerscanner, sowie die Erzeugung der Signalform für den VM500 Scanner über direkte digitale Synthese (DDS) [1].

A.2.1 Direkte digitale Synthese

Mit DDS lassen sich analoge Signale mit (fast) beliebiger Signalform und Frequenz mit digitaler Hardware erzeugen, die auf einer festen Frequenz läuft. In der einfachsten Realisierung wird dazu eine Periode einer beliebigen Signalform in Form einer Wertetabelle im Speicher des Mikrocontrollers abgelegt. Ein Zeiger auf diesen Speicherbereich wird mit einem einfachen Zähler hochgezählt, auf den gespeicherten Wert wird zugegriffen und als Spannung auf einem Digital-Analog-Wandler (DAC) ausgegeben. So durchläuft der Zeiger den gesamten Speicherbereich der Wertetabelle. Die Frequenz des analogen Ausgangssignals ist abhängig von der Frequenz des Mikrocontrollers und der Bit-Tiefe der gespeicherten Wertetabelle. Dieses Verfahren ist so nur wenig flexibel und eine erneute Programmierung ist erforderlich, falls die Frequenz verändert werden soll. Das Problem wird umgangen, indem das direkte Hochzählen des Zeigers ersetzt wird mit einem Phasenakkumulator. Dieser setzt sich aus einem Modulo-N-Zähler und einem Phasenregister

[1] 8 Bit, 16kByte Flash-Speicher, Atmel Corporation, `http://www.atmel.com`

zusammen. Zu dem im Modulo-N-Zähler gespeicherten Wert wird bei jedem Takt ein digitales Wort ϕ addiert, das im Phasenregister gespeichert ist und der Schrittweite der Phase pro Takt entspricht. Der aktuelle Wert der Phase beziehungsweise des Zählers wird dann in eine Amplitude beziehungsweise einen Zeiger auf die gespeicherte Wertetabelle konvertiert und der entsprechende Wert über den DAC ausgegeben. Die Größe von ϕ bestimmt die Schrittweite zwischen den einzelnen gespeicherten Werten und damit auch wann der Modulo-N-Zähler überläuft. Dies entspricht gerade der Frequenz f des analogen Ausgangssignals. Es gilt:

$$f = \frac{\phi \cdot f_{\text{clock}}}{2^N} \quad , \tag{A.1}$$

wobei f_{clock} die Frequenz ist, mit der ϕ zum Phasenakkumulator addiert wird.

A.2.2 Realisierung

Bei der praktischen Realisierung wurde mit dem ATmega16 ein 8-Bit-Mikrocontroller und 12-Bit-DAC (MAX530[2]) mit parallelem Eingang verwendet. Die Programmierung des Mikrocontrollers erfolgt direkt auf dem Atmel-Evaluations-Board[3] über die ISP-(*In System Programming*) Schnittstelle, indem der Mikrocontroller über eine serielle RS232-Schnittstelle mit einem Rechner verbunden wird. Standardmäßig ist der interne Oszillator des Mikrocontrollers für die Taktfrequenz aktiviert. Da diese für einige Anwendungen zu ungenau ist, ist es vorzuziehen den 8MHz Quarz-Oszillator, der sich auf dem Atmel-Evaluations-Board befindet, zu verwenden. Dazu müssen die so genannten *fusebits* des Mikrocontrollers so gesetzt werden, dass die Taktfrequenz aus einer externen Quelle bezogen wird. Dies lässt sich mit dem Programm PonyProg2000 Serial Device Programmer[4] durchführen. Die Belegung der einzelnen *fusebits* nach der Einstellung zeigt Abbildung A.1.

Der Mikrocontroller wird in Assembler mit der Programmierumgebung AVR Studio 4[5] programmiert. Der compilierte Code wird in eine *.hex*-Datei geschrieben und mit PonyProg2000 in den Mikrocontroller programmiert.

Bei der Programmierung wurde das oben beschriebene Verfahren DDS mit einem Phasenakkumulator implementiert. Auf der Hardwareseite musste insbesondere das Zusammenspiel des Mikrocontrollers mit 8-Bit-Registern und des 12-Bit-DAC berücksichtigt werden. Die Wertetabelle besteht aus einer Periode des zu erzeugenden Signals mit 12 Bit, also 4096 Werten, die im Speicher als 16-Bit-Worte in 2 Byte abgelegt werden. Die Assembler Programmiersprache stellt den Zeiger Z mit 16 Bit auf den Speicher zur Verfügung, der sich aus den zwei 8-Bit-Zeigern ZL und ZH zusammensetzt. Die Werte von ZL und ZH werden in separaten Registern gespeichert. Mit zwei weiteren Registern z1 und z2 wurde ein Modulo-Zähler programmiert, dessen Länge so gewählt wurde, dass ZH maximal auf den letzten Wert der Wertetabelle zeigt und dann überläuft. Das bedeutet, dass ZH maximal den Wert $2 \cdot 2^4 = 2^5$ annehmen kann. Der Faktor 2^4 resultiert aus den 4 Bit der Wertetabelle, die in ZH gespeichert werden, der zusätzliche Faktor 2 aus der Speicherung als 16-Bit-Wort. Die Länge N des Modulo-Zählers ergibt sich damit zu $N = 3 \cdot 8 + 5 = 29$

[2] Maxim `http://www.maxim-ic.com`
[3] Pollin Electronic GmbH, Pförring, Deutschland, `http://www.pollin.de`
[4] Version 2.05a Beta `http://www.lancos.com`
[5] Atmel Corporation, `http://www.atmel.com`

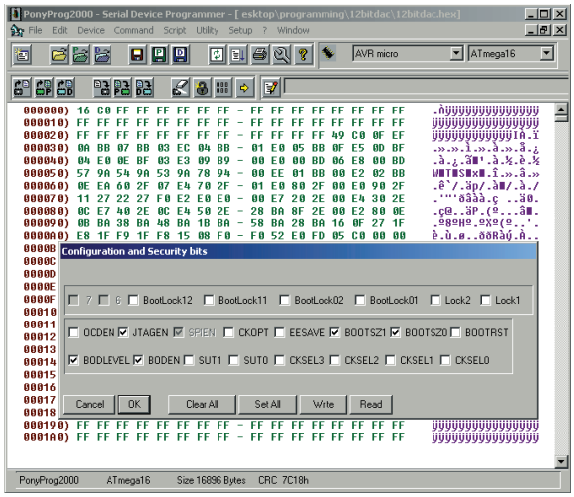


Abbildung A.1: Mit PonyProg2000 gesetzte *fusebits*, sodass die Frequenz des externen Quarz-Oszillators als Taktfrequenz des Mikrocontrollers verwendet wird.

(Register: z1, z2, ZL + ZH). Das Phasenregister mit der Schrittweite ϕ wurde mit vier Registern angelegt. Dabei wurde das Register mit den führenden Stellen, das zu ZH addiert wird, nur für den Übertrag bei der Addition verwendet, selbst aber nicht mit Werten belegt.

Da die Werte der Tabelle jeweils in zwei Bytes gespeichert werden, muss unterschieden werden, ob beim Auslesen ZL auf das niedrige Byte zeigt oder auf das höhere. Im ersten Fall wird der zu ZL gehörige Wert ausgelesen, ZL inkrementiert, das höhere Byte ausgelesen und schließlich ZL dekrementiert. Im zweiten Fall muss ZL erst dekrementiert werden, bevor ZL ausgelesen, inkrementiert und nochmals ausgelesen wird. Die beiden Werte werden in zwei Registern zwischengespeichert, bevor sie auf den DAC ausgegeben werden.

Abschnitt A.2.4 beinhaltet einen Auszug aus dem Quellcode des Assembler Programms. Im Hauptprogramm `main` wird der Mikrocontroller initialisiert, unter anderem die Ports, die Kommunikation über die serielle Schnittstelle und der Phasenakkumulator. Port C dient der Steuerung des resonanten Scanners. Port B steuert den DAC und das VM500 Galvanometer. Nach der Initialisierung wird die Schleife `loop` durchlaufen. Dabei werden die in zwei Registern zwischengespeicherten Tabellenwerte über Port A an den DAC ausgegeben, die Schrittweite ϕ zum Modulo-Zähler addiert, die Werte im Speicher gelesen und in zwei Registern zwischengespeichert. Danach beginnt der nächste Schleifendurchlauf. Pro Schleifendurchlauf werden 25 Takte des Mikrocontrollers benötigt. Nach Formel A.1 gilt dann für die Frequenz des analogen Ausgangssignals:

$$f = \frac{\phi \cdot f_{\text{cpu}}}{n_{\text{cy}} \cdot 2^N} \quad . \tag{A.2}$$

Dabei ist $f_{\text{cpu}} = 8\text{MHz}$ die Frequenz des Mikrocontrollers und n_{cy} die Anzahl der Takte pro Schleifendurchlauf. Mit dieser Formel kann man nun die gewünschte Frequenz des Ausgangssignals berechnen. Für die Verwendung mit dem VM500 Galvanometer wurde ein Dreieckssignal auf dem Mikrocontroller gespeichert. Prinzipiell ist es möglich meh-

Befehl	Funktion
o	CRS anschalten
f	CRS ausschalten
z	CRS Vergrößerung 4
u	CRS Vergrößerung 1
n	VM500, Frequenz 0Hz, Amplitude 0
s *hexadezimal Wert*	die durch ϕ bestimmte Frequenz setzen

Tabelle A.3: Kommunikation des Rechners mit dem Mikrocontrollers.

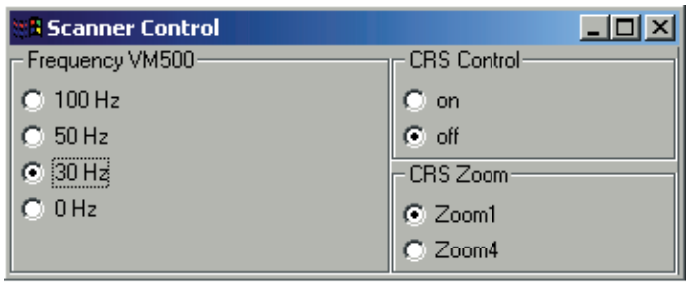


Abbildung A.2: Die graphische Benutzeroberfläche der Scannersteuerung.

rere Wertetabellen zu speichern, praktisch aus Platzgründen jedoch nicht. Denn die 12-Bit-Wertetabelle belegt bereits 8192 Byte, was der Hälfte des Speichers des verwendeten Mikrocontrollers entspricht.

Die Kommunikation über die RS232-Schnittstelle verwendet *interrupt* Routinen, bei denen der Mikrocontroller aus der Schleife `loop` springt und Daten über die Schnittstelle sendet oder empfängt. Tabelle A.3 fasst die programmierten Befehle zusammen, die als Zeichenketten gesendet werden. Damit lässt sich insbesondere die Frequenz des Dreieckssignals festlegen. Die neue Schrittweite ϕ wird als hexadezimaler Wert übertragen mit den führenden Stellen zuerst. Die Kommunikation zwischen Rechner und Mikrocontroller zur Steuerung der Galvanometerscanner erfolgt mit einer in *Python* programmierten graphischen Benutzeroberfläche (vgl. Abbildung A.2).

Die genaue Belegung der Ports des Mikrocontrollers und die Verwendung bei der Steuerung der Galvanometer ist in Tabelle A.4 zusammengefasst.

A.2.3 Elektronischer Aufbau

In Abbildung A.3 ist der genaue elektronische Aufbau dargestellt. Das Ausgangssignal des DAC liegt zwischen 0 und 2,048V. Da das Dreieckssignal aber symmetrisch um 0V herum liegen soll, wird mit der Schaltung in Abbildung A.3 der 1,024V große Gleichspannungsanteil nach dem DAC subtrahiert. Die Amplitude des Signals lässt sich mit der darauf folgenden Schaltung einstellen. Dabei wird ein als invertierender Verstärker beschalteter Operationsverstärker verwendet, bei dem der Verstärkungsfaktor über ein Potentiometer geregelt wird. Da der Eingang des VM500 Galvanometers ein differentielles Signal benötigt,

	Nummer	Verwendung	Gerät
Port A	0-7	8+4 Bit Werte	MAX530
Port B	0	-	-
	1	Servo enable	VM500
	2	A0	MAX530 12 Bit DAC
	3	A1	
	4	$\overline{\text{WR}}$	
	5	$\overline{\text{CS}}$	
	6	$\overline{\text{CLR}}$	
	7	$\overline{\text{LDAC}}$	
Port C	0	Zoom high	CRS
	1	Zoom return	
	2	belegt durch Jtag auf dem Board	
	3		
	4		
	5		
	6	Relay shutoff	CRS
	7	SEL0/SEL1	
Port D	0-7	belegt durch Board	

Tabelle A.4: Portbelegung des ATmega16 Mikrocontrollers.

wird das Signal nach der Amplitudeneinstellung aufgeteilt. Der eine Teil wird direkt auf den positiven Eingang gegeben. Der andere Teil wird davor noch mit einem invertierenden Verstärker invertiert.

Die Amplitude des CRS Scanners wird über eine konstante Spannung zwischen 0 und 5V eingestellt. Dazu wird ein Signal direkt von einem Ausgang des Mikrocontrollers verwendet, der auf digital 1 und damit auf die analoge Spannung $U = 5\text{V}$ geschaltet wird. Mit einem invertierenden Verstärker mit variablem Verstärkungsfaktor V, der sich über ein Potentiometer regulieren lässt, lässt sich die gewünschte, allerdings negative, Spannung einstellen. Ein weiterer invertierender Verstärker mit $V = 1$ erzeugt daraus wieder eine positive Spannung, die auf den *Zoom high* Eingang des CRS gegeben wird.

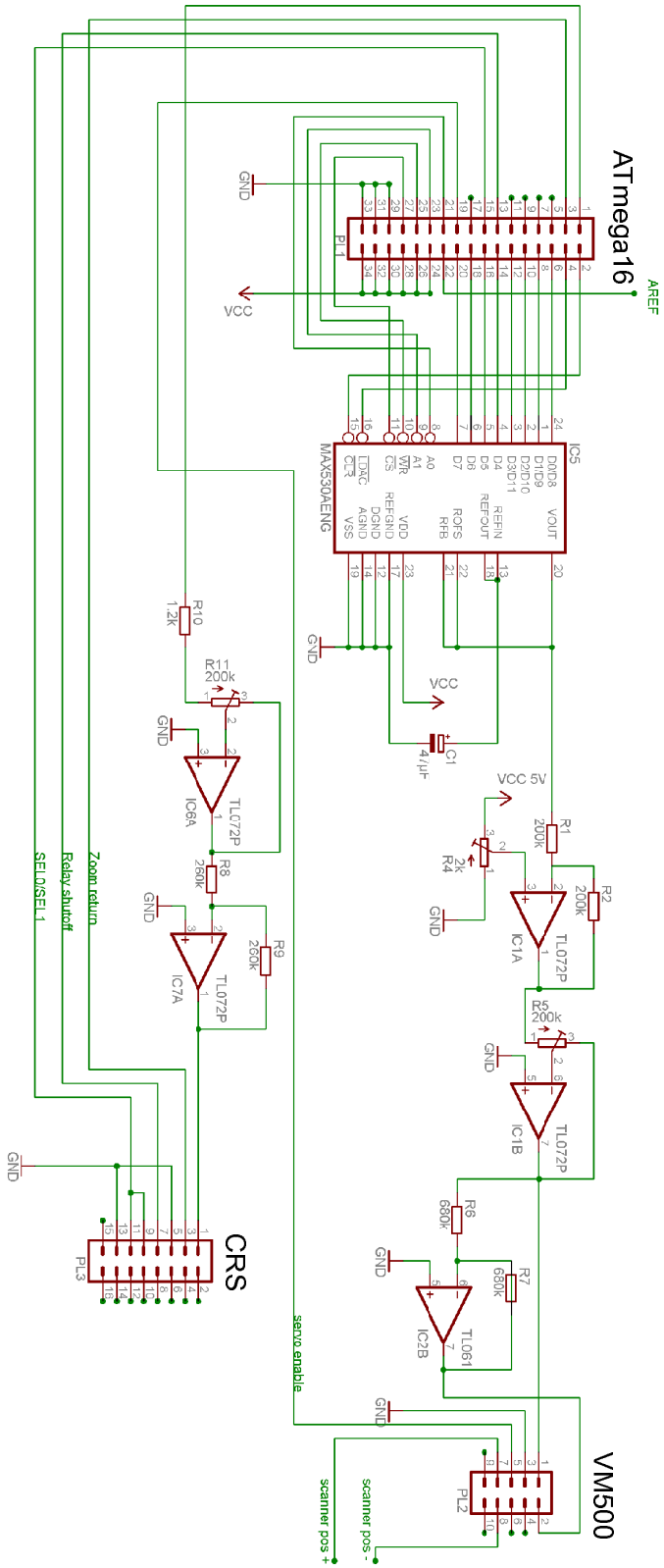


Abbildung A.3: Elektronischer Schaltplan der Scannersteuerung mittels ATmega16 Mikrocontroller und MAX530 DAC.

A.2.4 Assemblerquellcode

Ein Auszug aus dem Quellcode des Assembler-Programms auf dem Mikrocontroller:

```
main:

;Set all Pins of Port A and Port B to output
    ldi tmp1, 0xFF
    out DDRA, tmp1  ;Data Port A
    out DDRB, tmp1  ;Control Port B


;initialize Control Port B
;ldi tmp1,0b01110000

; Initialize PortC / CRS
    ldi tmp1, 0b11000011
    out DDRC, tmp1 ;set bits 0,1,6,7 Port C as output
    ldi tmp1, 0b00000001
    out PORTC,tmp1  ;set default values for CRS
                    ; bit7=0 scaling 1, bit6=0 relay shutoff active, bit1=1 Zoom High

;*********************************************************************
;*********************************************************************

;set start frequency to 50Hz
    ldi tmp1,0xAE
    mov change1,tmp1
    ldi tmp1, 0x47
    mov change2,tmp1
    ldi tmp1,0x01
    mov change3,tmp1
    ldi tmp1,0x00
    mov change4,tmp1
;set phase position to zero
    clr z1
    clr z2

;set Z pointer on data table in ROM
    ldi ZH,high(2*triangle)
    ldi ZL,low(2*triangle)


;initialize Control Port B
    ldi tmp1,0b01110000 ;LDAC,CLR,CS=WR=1,A1=A0=0,Servo enable,not used
    mov R2,tmp1
    ldi tmp1,0b01000000 ;LDAC,CLR,CS=WR=0,A1=A0=0,Servo enable,not used
    mov R3, tmp1
    ldi tmp1,0b01111100 ;LDAC,CLR,CS=WR=1,A1=A0=1,Servo enable,not used
    mov R4,tmp1
    ldi tmp1,0b01001100 ;LDAC,CLR,CS=WR=1,A1=A0=1,Servo enable,not used
    mov R5,tmp1

    out PORTB,R2; initialize PORTB

;store ZH
    mov R8,ZH
    ldi tmp1,0x20
    add R8,tmp1

;*********************************************************************
;*********************************************************************
loop:


    out PORTA,R0    ; output data bits 0-7
```

```
    out PORTB,R3    ; DAC control
    out PORTB,R4

    out PORTA,R1    ; output data bits 8-11

    out PORTB,R5    ; DAC control
    out PORTB,R2

    add z1,change1  ; add adder values to phase accumulator
    adc z2,change2
    adc ZL,change3
    adc ZH,change4


    cp ZH,R8        ; Compare present ZH with (ZH start value + 0x20), i.e Z>0x0FFF
    brlo continue   ; branch if lower
    subi ZH,0x20    ; reset ZH to start value


continue:
    sbrc  ZL,0      ; Skip if bit 0 in Register ZL is cleared
    rjmp gethigh    ; Z pointer on high or low byte of the data word

;getlow
    nop             ; do nothing, 1 cycle
    lpm R0,Z+       ; read data from ROM, low byte and increase ZL
    lpm R1,Z        ; read data from ROM, high byte
    dec ZL          ; restore ZL

    rjmp loop       ; loop

gethigh:
    dec ZL          ; decrease ZL
    lpm R0,Z+       ; read data from ROM, low byte and increase ZL
    lpm R1,Z        ; data from ROM, high byte

    rjmp loop       ; loop
```

Literaturverzeichnis

[1] *A technical tutorial on digital signal syntesis.* Analog Devices, 1999

[2] *Die konfokale Laser Scanning Mikroskopie - Grundlagen.* Zeiss-Broschüre, 2003

[3] Abbe, E.: Beiträge zur Theorie des Mikroskops und der mikroskopischen Wahrnehmung. In: *Arch. f. mikr. Anat.* 8 (1873), Nr. 9, S. 413–468

[4] Abbe, E.: Die Leistungfähigkeit der Mikroskope und ihre Grenzen. In: *Naturforsch.* 8 (1873), Nr. 39

[5] Albrecht, B.: *Hochpräzisions-Fluoreszenzmessungen mit Räumlich Modulierter Anregung*, Universität Heidelberg, Dissertation, 2002

[6] Albrecht, B. ; Failla, A.V. ; Schweitzer, A. ; Cremer, C.: Spatially modulated illumination microscopy allows axial distance resolution in the nanometer range. In: *Appl. Opt.* 41 (2002), Nr. 1, S. 80–87

[7] Bailey, B. ; Farkas, D. L. ; Taylor, D. L. ; Lanni, F.: Enhancement of axial resolution in fluorescence microscopy by standing-wave excitation. In: *Nature* 366 (1993), S. 44–48

[8] Bestvater, F. ; Spiess, E. ; Strobrawa, G. ; Hacker, M. ; Feurer, T. ; Porwol, T. ; Berchner-Pfannschmidt, U. ; Wotzlaw, C. ; Acker, H.: Two-photon fluorescence absorption and emission spectra of dyes relevant for cell imaging. In: *J. Microsc.* 208 (2002), S. 108–115

[9] Betzig, E. ; Patterson, G.H. ; Lindwasser, O. W. ; Olenych, S. ; Bonifacino, J. S. ; Davidson, M. W. ; Lippincott-Schwartz, J. ; Hess, H. F.: Imaging intracellular fluorescent proteins at nanometer resolution. In: *Science* DOI: 10.1126/science.1127344 (2006)

[10] Born, M. ; Wolf, E.: *Principles of Optics.* 6. Aufl. Oxford : A. Wheaton, Co., 1983

[11] Brakenhoff, G. J. ; Blom, P. ; Barends, P.: Confocal scanning light microscopy with aperture immersion lenses. In: *J. Microsc.* 117 (1979), S. 219–232

[12] Brakenhoff, G. J. ; Müller, M. ; Gauharali, R. I.: Analysis of efficiency of two-photon versus single-photon absorption for fluorescence generation in biological objects. In: *J. Microsc.* 183 (1996), Nr. 2, S. 140–144

[13] Brakenhoff, G. J. ; van der Voort, H. T. M. ; van Spronson, E. A. ; Linnemans, W. A. M. ; Nanninga, N.: Three-dimensional chromatin distribution in neuroblastoma nuclei shown by confocal scanning laser microscopy. In: *Nature* 317 (1985), S. 748–749

[14] Bruchez, J. M. ; Moronne, M. ; Gin, P. ; Weiss, S. ; Alivisatos, A. P.: Semiconductor nanocrystals as fluorescent biological labels. In: *Science* 281 (1998), Nr. 5385, S. 2013–2016

[15] Burns, D. H. ; Callis, J.B. ; Christian, G.D. ; Davidson, E.R.: Strategies for attaining superresolution using spectroscopic data as constraints. In: *Appl. Opt.* 24 (1985), Nr. 2, S. 154–161

[16] Carlsson, K. ; Danielsson, P. ; Lenz, R. ; Liljeborg, A. ; Majlof, L. ; Åslund, N.: Three-dimensional microscopy using a confocal laser scanning microscope. In: *Opt. Lett.* 10 (1985), S. 53–55

[17] Cox, I. J. ; Sheppard, C. J. R. ; Wilson, T.: Super-resolution by confocal fluorescent microscopy. In: *Optik* 60 (1982), Nr. 4, S. 391–396

[18] Cremer, C. ; Cremer, T.: Considerations on a laser-scanning-microscope with high resolution and depth of field. In: *Microscopica Acta* 81 (1978), Nr. 1, S. 31–44

[19] Cremer, C. ; Edelmann, P. ; Bornfleth, H. ; Luz, H. ; Kreth, G. ; Münch, H. ; Hausmann, M.: Principles of spectral precision distance confocal microscopy of molecular nuclear structure. In: Jähne, B. (Hrsg.) ; Haussecker, H. (Hrsg.) ; Geissler, P. (Hrsg.): *Handbook of Computer Vision and Applications* Bd. 3. San Diego, New York : Academic Press, 1999, S. 839–857

[20] Cremer, T. ; Cremer, C.: Chromosome territories, nuclear architecture and gene regulation in mammalian cells. In: *Nature Rev. Genet.* 2 (2001), S. 292–301

[21] Denk, W. ; Strickler, J. H. ; Webb, W. W.: 2-photon laser scanning fluorescence microscopy. In: *Science* 248 (1990), S. 73–76

[22] Dunn, R. C.: Near-field scanning optical microscopy. In: *Chem. Rev.* 99 (1999), S. 2891–2927

[23] Ebert, B. L. ; Bunn, H. F.: Regulation of the Erythropoietin Gene. In: *Blood* 94 (1999), Nr. 6, S. 1864–1877

[24] Edelmann, P.: *Confocal spectral precision distance microscopy for the investigation of the functional 3D structure of the human genome*, Universität Heidelberg, Dissertation, 1999

[25] Edelmann, P. ; Cremer, C.: Improvement of confocal spectral precision distance microscopy (SPDM). In: *Optical Diagnostics of Living Cells III, Proc. SPIE* Bd. 3921. 2000, S. 313–320

[26] Egner, A. ; Jakobs, S. ; Hell, S. W.: Fast 100-nm resolution three-dimensional microscope reveals structural plasticity of mitochondria in live yeast. In: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99 (2002), Nr. 6, S. 3370–3375

[27] Egner, A. ; Verrier, S. ; Goroshkov, A. ; Soling, H. D. ; Hell, S. W.: 4Pi-microscopy of the Golgi apparatus in live mammalian cells. In: *J. Struct. Biol.* 147 (2004), Nr. 1, S. 70–76

[28] Esa, A. ; Edelmann, P. ; Kreth, G. ; Trakhtenbrot, L. ; Amariglio, N. ; Rechavi, G. ; Hausmann, M. ; Cremer, C.: Three-dimensional spectral precision distance microscopy of chromatin nanostructures after triple-colour DNA labelling: a study of the BCR region on chromosome 22 and the Philadelphia chromosome. In: *J. Microsc.* 199 (2000), S. 96–105

[29] Failla, A. V. ; Cavallo, A. ; Cremer, C.: Subwavelength size determination using spatially modulated illumination virtual microscopy. In: *Appl. Opt.* 41 (2002), Nr. 31, S. 6651–6659

[30] Failla, A. V. ; Spöri, U. ; Albrecht, B. ; Kroll, A. ; Cremer, C.: Nanosizing of fluorescent objects by spatially modulated illumination microscopy. In: *Appl. Opt.* 41 (2002), Nr. 34, S. 7275–7283

[31] Fandrey, J.: Oxygen-dependent and tissue-specific regulation of erythropoietin gene expression. In: *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 286 (2004), S. R977–R988

[32] Fenz, S.: *Zwei-Farbenhochpräzisionsdistanzmessungen mit dem SMI-Mikroskop*, Universität Heidelberg, Diplomarbeit, 2005

[33] Frohn, J. T. ; Knapp, H. F. ; Stemmer, A.: True optical resolution beyond the Rayleigh limit achieved by standing wave illumination. In: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97 (2000), Nr. 13, S. 7232–7236

[34] Frohn, J. T. ; Knapp, H. F. ; Stemmer, A.: Three-dimensional resolution enhancement in fluorescence microscopy by harmonic excitation. In: *Opt. Lett.* 26 (2001), Nr. 11, S. 828–830

[35] Göppert-Mayer, M.: Über Elementarakte mit zwei Quantensprüngen. In: *Annalen der Physik* 9 (1931), S. 273–294

[36] Gu, M.: *Principles of three-dimensional imaging in confocal microscopes.* 1. Auflage. World Scientific Publishing, Singapore, 1996

[37] Gugel, H. ; Bewersdorf, J. ; Jakobs, S. ; Engelhardt, J. ; Storz, R. ; Hell, S. W.: Cooperative 4Pi excitation and detection yields 7-fold sharper optical sections in live cell microscopy. In: *Biophys. J.* 87 (2004), S. 4146–4152

[38] Gustafsson, M. G. L.: Surpassing the lateral resolution limit by a factor of two using structured illumination microscopy. In: *J. Microsc.* 198 (2000), Nr. 2, S. 82–87

[39] Gustafsson, M. G. L.: Nonlinear structured-illumination microscopy: Wide-field fluorescence imaging with theoretically unlimited resolution. In: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 102 (2005), Nr. 37, S. 13081–13086

[40] Gustafsson, M. G. L. ; Agard, D. A. ; Sedat, J. W.: Sevenfold improvement of axial resolution in 3D widefield microscopy using two objective lenses. In: *Proc. SPIE* 2412 (1995), S. 147–156

[41] Gustafsson, M. G. L. ; Agard, D. A. ; Sedat, J. W.: 3D widefield microscopy with two objective lenses: experimental verification of improved axial resolution. In: *Proc. SPIE* 2655 (1996), S. 62–65

[42] Gustafsson, M. G. L. ; Agard, D. A. ; Sedat, J. W.: I5M: 3D widefield light microscopy with better than 100nm axial resolution. In: *J. Microsc.* 195 (1999), S. 10–16

[43] Hecht, E.: *Optik.* 2. Aufl. München, Wien : R. Oldenbourg Verlag, 1999

[44] Heilemann, M. ; Herten, D. P. ; Heintzmann, R. ; Cremer, C. ; Müller, C. ; Tinnefeld, P. ; Weston, W. D. ; Wolfrum, J. ; Sauer, M.: High-resolution colocalization of single dye molecules by fluorescence lifetime imaging microscopy. In: *Anal. Chem.* 74 (2002), S. 3511–3517

[45] Heintzmann, R.: *Resolution enhancement of biological light microscopic data*, Universität Heidelberg, Dissertation, 1999

[46] Heintzmann, R. ; Cremer, C.: Laterally modulated excitation microscopy: improvement of resolution by using a diffraction grating. In: *Proc. SPIE* 3568 (1998), S. 185–196

[47] Heintzmann, R. ; Jovin, T. M. ; Cremer, C.: Saturated patterned excitation microscopy - a concept for optical resolution improvement. In: *J. Opt. Soc. Am. A* 19 (2002), Nr. 8, S. 1599–1609

[48] Hell, S. W.: Strategy for far-field optical imaging and writing without diffraction limit. In: *Phys. Lett. A* 326 (2004), S. 140–145

[49] Hell, S. W. ; Reiner, G. ; Cremer, C. ; Stelzer, E. H. K.: Aberrations in confocal fluorescence microscopy induced by mismatches in refractive index. In: *J. Microsc.* 169 (1993), S. 391–405

[50] Hell, S. W. ; Stelzer, E. H. K.: Fundamental improvement of resolution with a 4pi-confocal fluorescence microscope using two-photon excitation. In: *Opt. Commun.* 93 (1992), S. 277–282

[51] Hell, S. W. ; Stelzer, E. H. K.: Properties of a 4Pi-confocal fluorescence microscope. In: *J. Opt. Soc. Am. A* 9 (1992), S. 2159–2166

[52] Hell, S. W. ; Wichmann, J.: Breaking the diffraction resolution limit by stimulated emission: stimulated-emission-depletion fluorescence microscopy. In: *Opt. Lett.* 19 (1994), S. 780–782

[53] Hesse, M. ; Meier, H. ; Zeeh, B.: *Spektroskopische Methoden in der organischen Chemie.* Stuttgart, New York : Thieme Verlag, 1995

[54] Hildenbrand, G. ; Rapp, A. ; Spoeri, U. ; Wagner, C. ; Cremer, C. ; Hausmann, M.: Nano-sizing of specific gene domains in intact human cell nuclei by Spatially Modulated Illumination light microscopy. In: *Biophys. J.* 88 (2005), S. 4312–4318

[55] Hänninen, P. E. ; Soini, E. ; Hell, S. W.: Continuous wave excitation two-photon flourescence microscopy. In: *J. Microsc.* 176 (1994), S. 222–225

[56] Jäckle, P.: *Temperaturstabilisierte Objekthalterung und chromatisches Korrekturelement zur Optimierung eines Zwei-Laser-Wellenfeld Mikroskops*, Universität Heidelberg, Diplomarbeit, 1999

[57] Jackson, J. D.: *Classical Elektrodynamics.* New York : Wiley, 1962

[58] Jähne, B.: *Digitale Bildverarbeitung.* Berlin, New York : Springer-Verlag, 2002

[59] Jenuwein, T. ; Allis, C.D.: Translating the histone code. In: *Science* 293 (2001), S. 1074–1080

[60] Kaiser, W. ; Garret, C. G. B.: Two-Photon excitation in CaF2:Eu2+. In: *Phys. Rev. Lett.* 7 (1961), Nr. 6, S. 229–231

[61] Klar, T. A. ; Jakobs, S. ; Dyba, M. ; Egner, A. ; Hell, S. W.: Fluorescence microscopy with diffraction resolution barrier broken by stimulated emission. In: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97 (2000), Nr. 15, S. 8206–8210

[62] Kozubek, M. ; Matula, P.: An efficient algorithm for measurement and correction of chromatic aberrations in fluorescence microscopy. In: *J. Microsc.* 200 (2000), Nr. 3, S. 206–217

[63] Krishnamurthi, V. ; Bailey, B. ; Lanni, F.: Image processing in 3D standing-wave fluorescence microscopy. In: *Proc. SPIE* 2655 (1996), S. 18–25

[64] Lamond, A. I. ; Earnshaw, W. C.: Structure and function in the nucleus. In: *Science* 280 (1998), S. 547–553

[65] Lanni, F.: Standing-wave fluorescence microscopy. In: Taylor, D. L. (Hrsg.) ; Waggoner, A. S. (Hrsg.) ; Lanni, F. (Hrsg.) ; Murphy, R. F. (Hrsg.) ; Birge, R. R. (Hrsg.): *Applications of Fluorescence in the Biomedical Sciences.* New York : A. R. Liss. Inc., 1986, S. 505–521

[66] Lippincott-Schwartz, J. ; Patterson, G. H.: Development and use of fluorescent protein markers in living cells. In: *Science* 300 (2003), S. 87–91

[67] Martin, S. ; Failla, A. V. ; Spöri, U. ; Cremer, C. ; Pombo, A.: Measuring the size of biological nanostructures with spatially modulated illumination microscopy. In: *Mol. Biol. Cell* 15 (2004), Nr. 5, S. 2449–2455

[68] Mathée, H. ; Baddeley, D. ; Wotzlaw, C. ; Fandrey, J. ; Cremer, C. ; Birk, U.: Nanostructure of specific chromatin regions and nuclear complexes. In: *Histochem. Cell Biol.* 125 (2006), S. 75–82

[69] Michalet, X. ; Pinaud, F. F. ; Bentolila, L. A. ; Tsay, J. M. ; Doose, S. ; Li, J. J. ; Sundaresan, G. ; Wu, A. M. ; Gambir, S. S. ; Weiss, S.: Quantum dots for live cells, in vivo imaging, and diagnostics. In: *Science* 307 (2005), S. 538–544

[70] Minsky, M.: *Microscopy Apparatus.* US Patent 3013467, 1961

[71] Neil, M. A. A. ; Juskaitis, R. ; T.Wilson: Method of obtaining optical sectioning by using structured light in a conventional microscope. In: *Opt. Lett.* 22 (1997), S. 1905–1907

[72] Oron, D. ; Tal, E. ; Silberberg, Y.: Scanningless depth-resolved microscopy. In: *Opt. Exp.* 13 (2005), Nr. 5, S. 1468–1476

[73] Pawley, J. B.: *Handbook of Biological Confocal Microscopy.* New York, London : Plenum Press, 1995

[74] Saleh, B. E. A. ; Teich, M. C.: *Fundamentals of Photonics.* New York : Wiley, 1991

[75] Schneider, B.: *Spatially modulated illumination microscopy*, Universität Heidelberg, Dissertation, 1999

[76] Schneider , B. ; Albrecht , B. ; Jaeckle , P. ; Neofotistos , D. ; Söding, S. ; Jäger, T. ; Cremer, C.: Nanolocalization measurements in spatially modulated illumination microscopy using two coherent illumination beams. In: *Optical Diagnostics of Living Cells III, Proc. SPIE* Bd. 3921. 2000, S. 321–330

[77] Schneider, G. ; Anderson, E. ; Vogt, S. ; Knöchel, C. ; Weiss, D. ; Legros, M. ; Larabell, C.: Computed tomography of cryogenic cells. In: *Surface Rev. Let.* 9 (2002), Nr. 1, S. 177–183

[78] Schneider, M. ; Barozzi, S. ; Testa, I. ; Faretta, M. ; Diaspro, A.: Two-photon activation and excitation properties of PA-GFP in the 720–920-nm region. In: *Biophys. J.* 89 (2005), S. 1346–1352

[79] Schweitzer, A.: *Größen- und Distanzmessungen unter Verwendung von Ein- und Zweiphotonen-Anregung mittels räumlich modulierter Beleuchtung*, Universität Heidelberg, Dissertation, 2003

[80] Shaner, N. C. ; Steinbach, P. A. ; Tsien, R. Y.: A guide to choosing fluorescent proteins. In: *Nat. Methods* 2 (2005), Nr. 12, S. 905–909

[81] Singer, K. ; Jochim, S. ; Mudrich, M. ; Mosk, A. ; Weidemüller, M.: Low-cost mechanical shutter for light beams. In: *Rev. Sci. Instrum.* 73 (2002), S. 4402–4404

[82] Spector, D. L.: The dynamics of chromosome organization and gene regulation. In: *Ann. Rev. Biochem.* 72 (2003), S. 573–608

[83] Speicher, M. R. ; Ballard, S. G. ; Ward, D. C.: Karyotyping human chromosomes by combinatorial multi-fluor FISH. In: *Nat. Genet.* 12 (1996), S. 368–375

[84] Spiess, E. ; Bestvater, F. ; Heckel-Pompey, A. ; Toth, K. ; Hacker, M. ; Strobrawa, G. ; Feurer, T. ; Wotzlaw, C. ; Berchner-Pfannschmidt, U. ; Porwol, T. ; Acker, H.: Two-photon excitation and emission spectra of the green fluorescent protein variants ECFP, EGFP and EYFP. In: *J. Microsc.* 217 (2005), S. 200–204

[85] Spöri, U.: *Messungen mit dem SMI-Mikroskop*, Universität Heidelberg, Dissertation, 2004

[86] Squier, J. ; Müller, M.: High resolution nonlinear microscopy: A review of sources and methods for achieving optimal imaging. In: *Rev. Sci. Instrum.* 72 (2001), Nr. 7, S. 2855–2867

[87] Stelzer, E. H. K.: The intermediate optical system of laser-scanning confocal microscopes. In: Pawley, J. B. (Hrsg.): *Handbook of Biological Confocal Microscopy.* New York, London : Plenum Press, 1995, S. 139–153

[88] Wagner, C.: *Neue Methoden zur Größen- und Formbestimmung von fluoreszierenden Nanostrukturen unter Verwendung der SMI-Mikroskopie*, Universität Heideberg, Dissertation, 2004

[89] Westphal, V. ; Hell, S. W.: Nanoscale resolution in the focal plane of an optical microscope. In: *Phys. Rev. Lett.* 94 (2005), S. 143903

[90] Wokosin, D. L. ; Centonze, V. E. ; White, J. G. ; Hird, S. N. ; Sepsenwol, S. ; Malcolm, G. P. A. ; Maker, G. T. ; Ferguson, A. I.: Multiple-photon excitation imaging with an all-solid-state laser. In: *SPIE* 2678 (1996), S. 38–49

[91] Xu, C. ; Webb, W. W.: Measurement of two-photon excitation cross sections of molecular fluorophores with data from 690 to 1050 nm. In: *J. Opt. Soc. Am. B* 13 (1996), S. 481–491

[92] Xu, C. ; Zipfel, W. ; Shear, J. B. ; Williams, R. M. ; Webb, W. W.: Multiphoton fluorescence excitation: new spectral windows for biological nonlinear microscopy. In: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93 (1996), Nr. 20, S. 10763–19768

[93] Zipfel, W. R. ; Williams, R. M. ; Webb, W. W.: Nonlinear magic: multiphoton microscopy in the biosciences. In: *Nat. Biotechnol.* 21 (2003), Nr. 11, S. 1369–1377

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich all denen ganz herzlich danken, die zum Zustandekommen dieser Arbeit beigetragen haben und die mich während dieser Zeit unterstützt haben.

Prof. Dr. Dr. Christoph Cremer danke ich für die Möglichkeit diese Dissertation durchführen zu können, die wissenschaftliche Betreuung und sein stetes Interesse am Fortgang meiner Arbeit.

Prof. Dr. Josef Bille möchte ich für die freundliche Übernahme des Zweitgutachtens danken.

Dr. Udo Birk gilt ein ganz herzlicher Dank für die stets freundliche und geduldige Hilfe bei allen Fragen und Problemen, für die er immer eine passende Antwort oder Lösung parat hatte. Außerdem möchte ich ihm für die kritische Durchsicht meiner Dissertation danken.

Bei Jürgen Reymann bedanke ich mich für das sorgfältige Korrekturlesen dieser Arbeit.

David Baddeley danke ich für seine vielen guten Ideen und zahlreichen hilfreichen Diskussionen rund um die Mikroskopie.

Roman Amberger möchte ich für die kompetente Hilfe in Fragen der Elektronik und Mechanik danken.

Yanina Weiland und Claudia Batram danke ich für die kompetente Auskunft bei allen biologischen Fragen.

Bei Dr. Gregor Kreth und Dr. Jutta Schwarz-Finsterle möchte ich mich für die sehr angenehme Atmosphäre im Büro und ihre Unterstützung bei allen anfallenden Fragen und Problemen bedanken.

Susanne Fenz, Dr. Marion Cremer, Kathrin Mäcken, Heinz Eipel und Christoph Wotzlaw danke ich für die Bereitstellung der Präparate.

Prof. Dr. Iring Bender und Prof. Dr. Markus Oberthaler gilt mein Dank für die Teilnahme an der Disputation.

Bei allen Mitgliedern und ehemaligen Mitgliedern der Arbeitsgruppe Cremer bedanke ich mich für die sehr angenehme Atmosphäre und gute Zusammenarbeit.

Meiner Freundin Lucía Cespón Torrado danke ich von Herzen dafür, dass sie in guten wie in schlechten Momenten an meiner Seite war.

Meinen Eltern und meiner Familie gilt ein ganz besonders herzlicher Dank, da ohne ihre kontinuierliche Unterstützung diese Arbeit sicherlich nicht möglich gewesen wäre.