

INAUGURAL – DISSERTATION  
zur  
Erlangung der Doktorwürde  
der  
Naturwissenschaftlich – Mathematischen  
Gesamtfakultät  
der Ruprecht – Karls – Universität  
Heidelberg

vorgelegt von

Dipl.-Phys. Marion Christine Lang  
aus Ellwangen

Tag der mündl. Prüfung: 04.07.2007



# 4Pi-Mikroskopie mit ultra-hohen Aperturwinkeln

Gutachter: Prof. Dr. Stefan W. Hell  
Prof. Dr. Josef Bille



**4Pi-Mikroskopie mit ultra-hohen Aperturwinkeln** Durch kohärente Superposition der sphärischen Wellenfronten des Anregungs- bzw. Fluoreszenzlichts mittels zweier hochaperturiger Objektive wird in der 4Pi-Mikroskopie ein schmales Hauptmaximum mit Nebenmaxima erzeugt. Dadurch kann die axiale Auflösung auf 100 nm gesteigert werden. Die Nebenmaxima müssen durch Entfaltung entfernt werden. Kritikpunkte sind die notwendige Entfaltung, sowie die geringe Signaleffizienz aufgrund der 2-Photonen-Anregung, die bislang notwendig war, um entfaltbare Daten zu erzielen. In dieser Arbeit wird gezeigt, daß durch Vergrößerung des Öffnungswinkels der Objektive diese Probleme gelöst werden können: In einem 2-Photonen 4Pi-Mikroskop mit kohärenter Detektion des Fluoreszenzlichts (Typ C) werden Daten erzielt, die quasi frei von Nebenmaxima sind und nicht entfaltet werden müssen. Bei effizienter 1-Photonen-Anregung werden die Nebenmaxima so weit reduziert, daß eine Entfaltung der 4Pi-Daten möglich ist. Zusätzlicher Verzicht auf Interferenz des Fluoreszenzlichts (Typ A) ermöglicht zudem ein effizientes, vereinfachtes und kostengünstiges 4Pi-Mikroskop. Die hochaufgelöste 3D-Messung von Telomeren im Zellkern ist eine Fragestellung, die derzeit nur durch Verwendung von 4Pi-Mikroskopie mit 1-Photonen-Anregung mit einer axialen Auflösung von 100 nm beantwortet werden kann. Weiterhin konnte die Effizienz eines 2-Photonen 4Pi-Mikroskops gesteigert werden, indem ein Aufbau realisiert wurde, mit dem das Signal am zweiten Ausgang des Strahlteilers genutzt werden kann. Dadurch kann das detektierte Fluoreszenzsignal nahezu verdoppelt werden.

**4Pi-Microscopy with ultra-high aperture angles** In 4Pi-Microscopy an axial resolution of 100 nm is achieved by the coherent superposition of the spherical excitation and detection fields from two opposing high-aperture objectives. A narrow central maximum and accompanying sidelobes are formed. In order to form a useful image, these sidelobes have to be removed by deconvolution. Drawbacks of this method are the necessity of deconvolution and poor signal efficiency due to the 2-photon-excitation so far needed to provide sufficiently low sidelobes. The present thesis addresses these problems by increasing the aperture angle of the lenses. It is shown that an increased aperture angle can yield virtually sidelobe-free data in 2-photon 4Pi Type C Microscopy, thus rendering deconvolution unnecessary. Alternatively, it is shown that the sidelobes generated in 1-photon 4Pi-Microscopy can be reduced to the point where deconvolution is possible. Furthermore, the ultra-high aperture angles enable an efficient, simple and inexpensive 4Pi-Microscope, as it is possible to obtain data that can be successfully deconvolved, even in a Type A arrangement (i. e. without coherent detection of the emitted fluorescence light). The high-resolution (100 nm) 3D-measurement of telomeres in the nucleus serves as an example of an application that is currently only possible with 1-photon 4Pi-Microscopy. Additionally, a setup is presented which allows the concurrent detection of the signal at the second output of the beam-splitter, almost doubling the detected signal.



# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung</b>	<b>1</b>
<b>2</b>	<b>Grundlagen</b>	<b>5</b>
2.1	Punktbildfunktion einer Linse mit hoher numerischer Apertur . . .	5
2.2	Auflösungserhöhung durch 4Pi-Mikroskopie . . . . .	7
2.3	Optische Transferfunktion . . . . .	8
2.4	Entfaltungsalgorithmen . . . . .	9
2.4.1	Punktentfaltung . . . . .	10
2.4.2	Lineare Entfaltung . . . . .	11
2.4.3	Nichtlineare Entfaltung . . . . .	11
<b>3</b>	<b>Material und Methoden</b>	<b>13</b>
3.1	Der 4Pi-Aufbau . . . . .	13
3.2	Die Objektive . . . . .	17
3.3	Einbettung in Thiodiethanol (TDE) . . . . .	18
3.4	Justage des 4Pi-Moduls . . . . .	21
3.5	Regelung der Objektivposition . . . . .	25
3.6	Dispersionsabgleich . . . . .	26
3.7	Fehlerbetrachtung . . . . .	28
<b>4</b>	<b>1-Photonen 4Pi-Mikroskopie im Typ C</b>	<b>31</b>
4.1	Eigenschaften von 1-Photonen 4Pi Typ C . . . . .	32

4.2	Messungen an technischen und biologischen Proben . . . . .	37
4.3	Empfindlichkeit . . . . .	43
<b>5</b>	<b>1-Photonen 4Pi-Mikroskopie im Typ A</b>	<b>45</b>
5.1	Eigenschaften von 1-Photonen 4Pi-Typ A . . . . .	45
5.2	Messungen an technischen Proben . . . . .	49
5.3	Messungen an biologischen Proben . . . . .	50
5.3.1	Mehrfarben-Messungen . . . . .	52
<b>6</b>	<b>2-Photonen 4Pi-Mikroskopie</b>	<b>59</b>
6.1	Konfokales 2-Photonen 4Pi Typ C . . . . .	59
6.2	Messungen an technischen und biologischen Proben . . . . .	64
<b>7</b>	<b>2-Kanal 4Pi-Mikroskopie</b>	<b>73</b>
7.1	Phasenverhalten am Strahlteiler . . . . .	73
7.2	Nicht-konfokales 2-Photonen 4Pi-Mikroskop im Typ C . . . . .	75
7.3	Detektion des Signals an beiden Ausgängen des 4Pi-Moduls . . . . .	77
7.4	2-Kanal-Messungen an technischen und biologischen Proben . . . . .	79
<b>8</b>	<b>Biologische Anwendungen</b>	<b>85</b>
8.1	Chromatinverteilung im Zellkern . . . . .	85
8.2	Verteilung der Telomere im Zellkern . . . . .	87
8.3	Fibronectin in Knochenschnitten . . . . .	90
<b>9</b>	<b>Diskussion und Zusammenfassung</b>	<b>95</b>
<b>10</b>	<b>Ausblick</b>	<b>105</b>



## Verwendete Abkürzungen

APD ..	Avalanche Photo Diode
AU ....	Airy Einheit (Airy Unit)
(c/c) ..	konstruktive Anregung, konstruktive Detektion
(c/d) ..	konstruktive Anregung, destruktive Detektion
(d/c) ..	destruktive Anregung, konstruktive Detektion
(d/d) ..	destruktive Anregung, destruktive Detektion
FWHM	Halbwertsbreite (Full-Width at Half-Maximum)
$k_c$ .....	kritische Frequenz, erstes Minimum der OTF
$\lambda_{exc}$ ...	Anregungswellenlänge
$\lambda_{det}$ ...	zentrale Fluoreszenzwellenlänge
NA ....	numerische Apertur
OPD ..	optischer Weglängenunterschied (Optical Path Difference)
OTF ..	optische Transferfunktion (Optical Transfer Function)
PMT ..	Photomultiplier Tube
PSF ...	Punktbildfunktion (Point Spread Function)
$\rho$ .....	Radius der Detektionslochblende
TDE ..	2,2'-Thiodiethanol
SNR ..	Signal-zu-Rausch Verhältnis (Signal-to-Noise Ratio)



# Kapitel 1

## Einleitung

In der Biologie werden große Anstrengungen unternommen, um mehr über die Funktionsweise von Zellen, sowie deren Organellen zu erfahren. Die Mikroskopie spielt dabei zur Untersuchung von Strukturen eine große Rolle. Eine besondere Stellung nimmt die Lichtmikroskopie ein, da sie es ermöglicht, Zellen *in-vivo* zu beobachten. Die entscheidende Eigenschaft eines Mikroskops ist das Auflösungsvermögen. Auflösung beschreibt den Abstand zweier gleichartiger Objekte, die noch getrennt dargestellt werden können. Für viele biologische Fragestellungen ist die konventionelle optische Mikroskopie an ihre Grenzen gelangt. Die Entwicklung neuer Mikroskopietechniken mit höherer Auflösung ist aus diesem Grund ein sehr aktives Forschungsgebiet.

Ernst Abbe beschrieb bereits im Jahr 1873 [1], daß das Auflösungsvermögen eines Mikroskops proportional zur halben Lichtwellenlänge und reziprok zur numerischen Apertur ist. Objekte, die sich näher als die halbe Wellenlänge des verwendeten Lichts sind, können nicht aufgelöst werden. Für eine Wellenlänge im sichtbaren Bereich des optischen Spektrums (400 nm – 750 nm) ergibt sich damit eine laterale Auflösung von bestenfalls 200 nm. Kürzere Wellenlängen erlauben zwar eine höhere Auflösung (die Elektronenmikroskopie beispielsweise ermöglicht eine Auflösung von etwa 0,1 nm in biologischen Proben), jedoch schädigt die energiereichere Strahlung die Zelle. Daher zielen neuere Methoden auf die Erhöhung des Auflösungsvermögens von Lichtmikroskopen.

Eine besondere Rolle innerhalb der Lichtmikroskopie kommt der Fluoreszenzmikroskopie zu: Strukturen innerhalb der Zelle werden mit Fluoreszenzmolekülen markiert und können so mit hohem Kontrast und hoher Spezifität visualisiert werden. Die Entdeckung von fluoreszenten Proteinen ermöglicht die Markierung von lebenden Zellen und damit die Visualisierung dynamischer Prozesse in der Zelle.

Eine große Verbesserung erfuhr die Fluoreszenzmikroskopie durch die Entwick-

lung des konfokalen Mikroskops im Jahr 1957 [37]: Durch eine Lochblende im Detektionspfad eines strahlrasternden Mikroskops wurde es möglich, Strukturen auch axial zu diskriminieren und damit erstmalig dreidimensionale Datensätze von ganzen Zellen aufzunehmen. Allerdings ist die axiale Auflösung eines Konfokalmikroskops mit 500 nm um etwa einen Faktor drei geringer als die laterale Auflösung.

Um die Auflösung eines Fluoreszenzmikroskops weiter zu steigern, wurden in den letzten Jahren verschiedene Methoden vorgestellt. Ein Ansatz ist die Nutzung nicht-linearer Effekte, wie beispielsweise der stimulierten Emission in der STED-Mikroskopie [23, 49]. Hiermit wurden Auflösungen bis zu 30 nm in biologischen Proben erreicht, allerdings erhöht diese Methode nur die laterale Auflösung und läßt die axiale Auflösung unverändert.

Methoden, die auf die Steigerung insbesondere der axialen Auflösung abzielen, sind beispielsweise das Stehwellenmikroskop (SWM) [30, 2, 31] oder das I<sup>5</sup>M [18, 20]. Diese basieren auf der Erzeugung eines Interferenzmusters durch Superposition zweier gegenläufiger, ebener Wellen. Dadurch entsteht ein schmales Hauptmaximum und axial verschobene Nebenmaxima. Um die gemessenen Daten interpretieren zu können, müssen diese Nebenmaxima durch Entfaltungsalgorithmen entfernt werden. Aufgrund zu hoher Nebenmaxima kann jedoch in einem SWM keine axiale Auflösung erzielt werden. Im I<sup>5</sup>M ist die Rekonstruktion gemessener 3D-Daten kritisch.

In der 4Pi-Mikroskopie werden zwei Objektive hoher numerischer Apertur verwendet, um das Anregungs- bzw. Fluoreszenzlicht kohärent zu überlagern. Der Unterschied zu den beiden oben genannten Techniken besteht darin, daß die Probe *fokussiert* beleuchtet wird und somit nicht ebene Wellen, sondern Wellen in Form von Kugelkalotten überlagert werden. Dadurch werden die Nebenmaxima reduziert und die Daten entfaltbar. Die Superposition der fokussierten Wellen entspricht einer Verdopplung des Raumwinkels und resultiert in einer höheren axialen Auflösung. 4Pi-Mikroskopie wurde zwar zunächst mit 1-Photonen-Anregung vorgeschlagen [21], jedoch mußte aufgrund zu hoher Nebenmaxima auf 2-Photonen-Anregung zurückgegriffen werden, um die Intensität der Nebenmaxima zu reduzieren und entfaltbare Daten zu erzielen. Dadurch konnten beispielsweise Mitochondrien mit einer axialen Auflösung von 100 nm aufgenommen werden [17].

Seit dem Jahr 2005 ist ein 2-Photonen 4Pi-Mikroskop (TCS 4Pi, Leica Microsystems, Mannheim) kommerziell erhältlich und es liegen erste, damit erzielte, biologische Ergebnisse vor [4].

Ungeachtet dieser Erfolge sind Kritikpunkte an der 4Pi-Mikroskopie die geringe Effizienz aufgrund der 2-Photonen-Anregung, sowie die Notwendigkeit der Entfaltung der Meßdaten. Obwohl ein 4Pi-Mikroskop eine deutlich höhere axiale Auflösung im Vergleich zu einem Konfokalmikroskop besitzt, hat es aus diesen

---

Gründen noch keine weite Verbreitung gefunden.

Da die Vergrößerung der Apertur das entscheidende Prinzip der 4Pi-Mikroskopie ist, sollte in dieser Arbeit theoretisch und experimentell untersucht werden, welche Möglichkeiten sich bieten, wenn die Apertur des Systems durch Verwendung von Objektiven mit ultra-hohem Winkel weiter vergrößert wird. Die theoretischen Erwartungen werden in dieser Arbeit berechnet und die experimentellen Probleme, die mit der Verwendung dieser Objektive einhergehen, werden gelöst. Es wird nachgewiesen, daß durch die hochaperturigen Objektive und die hier entwickelten Methoden entscheidende Fortschritte in der 4Pi-Mikroskopie erzielt werden können: Die Nebenmaxima werden nahezu eliminiert und die 4Pi-Daten müssen nicht mehr entfaltet werden. Weiterhin ermöglichen die hochaperturigen Objektive eine Effizienzsteigerung, die über die Zunahme der Sammeleffizienz aufgrund des größeren Öffnungswinkels hinausgeht. Zum Einen liefern sie entfaltbare Daten mit effizienter 1-Photonen-Anregung. Zum anderen kann die Effizienz eines 4Pi-Mikroskops durch einen hier vorgestellten Aufbau nahezu verdoppelt werden.



# Kapitel 2

## Grundlagen

### 2.1 Punktbildfunktion einer Linse mit hoher numerischer Apertur

Das Bild eines punktförmigen Objektes bei Abbildung durch ein beugungsbegrenztes System wird durch seine Punktbildfunktion  $h(\vec{r})$  (PSF, Point Spread Function) beschrieben. Sie enthält die vollständige Information über das Auflösungsvermögen eines optischen Systems. Das gemessene Bild  $b(\vec{r})$  ergibt sich aus der Faltung der Punktbildfunktion mit dem Objekt  $o(\vec{r})$ :

$$b(\vec{r}) = h(\vec{r}) \otimes o(\vec{r}). \quad (2.1)$$

Die Punktbildfunktion eines optischen Systems ist das Betragsquadrat des elektrischen Feldes in der Umgebung des geometrischen Fokus:

$$h(\vec{r}) = |E(\vec{r})|^2. \quad (2.2)$$

Für hohe numerische Aperturen ist die paraxiale Beugungstheorie nicht mehr gültig. Eine vektorielle Theorie für das elektrische Feld im Fokus eines aplanatischen Systems wurde von Richards und Wolf [51, 42] hergeleitet. Das elektrische Feld an einem Punkt  $\vec{r}$  in der Bildebene (der Ursprung  $\vec{r} = 0$  entspricht dem geometrischen Fokus) wird beschrieben durch

$$\vec{E}(\vec{r}) = -\text{const} \cdot \begin{pmatrix} i(I_0(\vec{r}) + I_2(\vec{r}) \cos 2\phi) \\ iI_2(\vec{r}) \sin 2\phi \\ 2I_2(\vec{r}) \cos \phi \end{pmatrix} \quad (2.3)$$

dabei sind  $I_0$ ,  $I_1$  und  $I_2$  Beugungsintegrale über den Öffnungswinkel des verwendeten Objektivs  $\alpha$ . Sie sind gegeben durch:

$$\begin{aligned} I_0(\vec{r}) &= \int_0^\alpha \sqrt{\cos \theta} \sin \theta (1 + \cos \theta) J_0(k\sqrt{(x^2 + y^2) \sin \theta}) \exp(ikz \cos \theta) d\theta \\ I_1(\vec{r}) &= \int_0^\alpha \sqrt{\cos \theta} \sin^2 \theta J_1(k\sqrt{(x^2 + y^2) \sin \theta}) \exp(ikz \cos \theta) d\theta \\ I_2(\vec{r}) &= \int_0^\alpha \sqrt{\cos \theta} \sin \theta (1 - \cos \theta) J_2(k\sqrt{(x^2 + y^2) \sin \theta}) \exp(ikz \cos \theta) d\theta. \end{aligned} \quad (2.4)$$

Der Azimutwinkel des Ortsvektors  $\vec{r}$  wird dabei durch  $\phi$ , der Polarwinkel durch  $\theta$  beschrieben. Der Öffnungswinkel des Objektivs ist  $\alpha$ , die Wellenlänge des Lichts ist  $\lambda$ , der Brechungsindex ist gegeben durch  $n$ ,  $k = 2\pi n/\lambda$  ist die Wellenzahl und  $J_\nu$  sind Besselfunktionen der Ordnung  $\nu$ .

Diese Gleichungen beschreiben das im Fokus und seiner näheren Umgebung erzeugte elektrische Feld. Die Intensitätsverteilung, mit der Fluoreszenzmoleküle im Fokus angeregt werden, ist durch die Anregungs-PSF  $h_{\text{exc}}(\vec{r}) = |E(\vec{r})|^2$  gegeben.

Um nicht nur in lateraler, sondern auch in axialer Richtung orts aufgelöste Bilder zu erzeugen, wird in einem konfokalen Mikroskop [37] das Fluoreszenzlicht auf eine Detektionslochblende fokussiert, d. h. sowohl Beleuchtung als auch Detektion sind punktförmig. In diesem Fall läßt sich die Detektions-PSF des Fluoreszenzlichts  $h_{\text{det},0}$  analog zu  $h_{\text{exc}}$  beschreiben. Dabei ist die Fluoreszenzwellenlänge bei 1-Photonen-Prozessen größer als die Anregungswellenlänge, es gilt damit  $\lambda_{\text{exc}} \neq \lambda_{\text{det}}$ .

Eine Lochblende mit Radius  $\rho$  läßt sich durch Faltung von  $h_{\text{det},0}$  mit der Lochblendenfunktion  $l(x, y, z = 0)$ , die 1 ist für  $|\vec{r}| < \rho$  und 0 sonst, berücksichtigen:

$$h_{\text{det}}(\vec{r}) = h_{\text{det},0}(\vec{r}) \otimes l(\vec{r}). \quad (2.5)$$

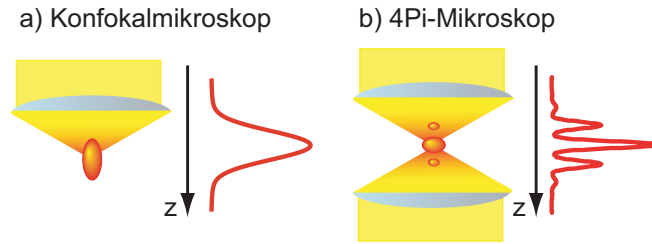
Der Durchmesser der Detektionslochblende ( $2\rho$ ) wird üblicherweise in Airy-Einheiten [AU] angegeben. Eine Airy-Einheit entspricht dem Durchmesser des Maximums 0. Ordnung des Beugungsmusters, das entsteht, wenn eine Apertur beleuchtet wird. Die Airy-Einheit ist abhängig von der Wellenlänge  $\lambda$  des Lichts und dem Semiaperturwinkel  $\alpha$  der Öffnung und es gilt:

$$1 \text{ AU} = 1,22 \frac{\lambda}{n \sin \alpha}. \quad (2.6)$$

Unter der Annahme, daß es sich bei Fluoreszenz um einen nicht kohärenten Prozess handelt, kann die effektive PSF eines konfokalen Mikroskops als Produkt aus Anregungs- und Detektions-PSF beschrieben werden und es ergibt sich somit:

$$h_{\text{konf}}(\vec{r}) = h_{\text{exc}}(\vec{r}) \cdot h_{\text{det}}(\vec{r}). \quad (2.7)$$





**Abbildung 2.1.** Vergleich eines konfokalen Mikroskops (a) und eines 4Pi-Mikroskops (b). In einem 4Pi-Mikroskop wird die Probe kohärent durch zwei gegenüberliegende Objektive beleuchtet. Die Superposition des Beleuchtungslichtes führt zu einem schmalen Hauptmaximum, das von axial verschobenen Nebenmaxima begleitet wird.

## 2.2 Auflösungserhöhung durch 4Pi-Mikroskopie

Für die laterale Auflösung eines konventionellen konfokalen Mikroskops gilt nach dem Rayleigh-Kriterium [7]:

$$d_{x,y} = \frac{0,61\lambda}{\text{NA}}. \quad (2.8)$$

Für die axiale Auflösung gilt [27]:

$$d_z = \frac{0,22\lambda}{n \sin^2(\alpha/2)}. \quad (2.9)$$

Die numerische Apertur (NA) ist gegeben durch den Sinus des halben Aperturwinkels multipliziert mit dem Brechungsindex  $n$ , d. h. es gilt  $\text{NA} = n \cdot \sin \alpha$ . Aus Gleichungen 2.8 und 2.9 geht hervor, daß das Auflösungsvermögen eines Mikroskops mit zunehmender Wellenlänge abnimmt. Ein größerer Öffnungswinkel  $\alpha$  der Objektivlinse reduziert dagegen die Ausdehnung der PSF. In einem Konfokalmikroskop ergeben sich Auflösungen von etwa 180 nm in lateraler Richtung und von etwa 500 nm in axialer Richtung.

Um das 3D-Auflösungsvermögen eines Mikroskops zu erhöhen, gibt es daher einerseits die Möglichkeit, die verwendete Wellenlänge zu verringern. Dies geschieht z. B. in der Elektronenmikroskopie, jedoch müssen die Experimente unter, für lebende Zellen, ungeeigneten Bedingungen (Vakuum, energiereiche Strahlung) stattfinden. Zudem ist eine spezifische Färbung wie in der Fluoreszenzmikroskopie kaum möglich. Für die Beobachtung von Zellen *in-vivo* bleibt nur das sichtbare Fenster mit Wellenlängen von 400 nm bis 800 nm.

Alternativ kann die numerische Apertur vergrößert werden. Dieser Ansatz wird in der 4Pi-Mikroskopie verfolgt. Die NA wird vergrößert, indem das Objekt von zwei sich gegenüberstehenden Objektiven mit hoher numerischer Apertur fokussiert beleuchtet wird. Durch die kohärente Superposition der sphärischen Kugelkalotten wird entlang der optischen Achse ein schmales Hauptmaximum, begleitet von niedrigeren Nebenmaxima, erzeugt. Das Hauptmaximum besitzt eine kleinere

Halbwertsbreite als die konfokale Einhüllende (Abb. 2.1). Die Auflösung kann dadurch, verglichen mit einem Konfokalmikroskop, um den Faktor 5–7 erhöht werden [17]. Die zusätzlichen Nebenmaxima oberhalb und unterhalb des Fokus, müssen durch Entfaltungsalgorithmen entfernt werden.

Die Superposition der elektrischen Felder wird durch  $|\vec{E}_{\text{exc}}(\vec{r}) + \hat{M}\vec{E}_{\text{exc}}(\hat{M}\vec{r})|$  beschrieben. Das Beleuchtungsfeld  $E_{\text{exc}}$  berechnet sich dabei gemäß Gleichung 2.3.  $\hat{M}$  ist eine Transformationsmatrix, die berücksichtigt, daß die  $z$ -Komponenten der elektrischen Felder antiparallel sind:

$$\hat{M} = \begin{pmatrix} 1 & 0 & 0 \\ 0 & 1 & 0 \\ 0 & 0 & -1 \end{pmatrix}. \quad (2.10)$$

Wird nur das Anregungslicht kohärent überlagert, so wird der Aufbau als 4Pi-Mikroskop vom Typ A bezeichnet. Die Gesamt-PSF im Typ A  $h_{4\text{PiTypA}}^{m\text{Ph}}(\vec{r})$  ergibt sich als Produkt aus Anregungs- und Detektions-PSF:

$$\begin{aligned} h_{4\text{PiTypA}}^{m\text{Ph}}(\vec{r}) &= h_{\text{exc}4\text{Pi}}(\vec{r}) \cdot h_{\text{det}4\text{Pi}}(\vec{r}) \\ &= |\vec{E}_{\text{exc}}(\vec{r}) + \hat{M}\vec{E}_{\text{exc}}(\hat{M}\vec{r})|^{2m} \cdot |\vec{E}_{\text{det}}(\vec{r})|^2 \otimes \vec{l}(\vec{r}) \end{aligned} \quad (2.11)$$

Wird bei einem 4Pi-Mikroskop zusätzlich auch das Fluoreszenzlicht zur Interferenz gebracht, spricht man von einem 4Pi-Mikroskop vom Typ C. (Von eher akademischem Interesse ist das 4Pi-Mikroskop vom Typ B, bei dem nur das Fluoreszenzlicht interferiert.)

Für ein 4Pi-Mikroskop vom Typ C enthält die Gesamt-PSF  $h_{4\text{PiTypC}}^{m\text{Ph}}(\vec{r})$  einen Interferenzterm, sowohl in der Beleuchtungs-PSF  $h_{\text{exc}4\text{Pi}}(\vec{r})$ , als auch in der Detektions-PSF  $h_{\text{det}4\text{Pi}}(\vec{r})$ :

$$\begin{aligned} h_{4\text{PiTypC}}^{m\text{Ph}}(\vec{r}) &= h_{\text{exc}4\text{Pi}}(\vec{r}) \cdot h_{\text{det}4\text{Pi}}(\vec{r}) \\ &= |\vec{E}_{\text{exc}}(\vec{r}) + \hat{M}\vec{E}_{\text{exc}}(\hat{M}\vec{r})|^{2m} \cdot |\vec{E}_{\text{det}}(\vec{r}) + \hat{M}\vec{E}_{\text{det}}(\hat{M}\vec{r})|^2 \otimes \vec{l}(\vec{r}). \end{aligned} \quad (2.12)$$

Die Anregung der Fluoreszenz durch Mehrphotonenprozesse wird durch den Exponenten  $m$  berücksichtigt: für 1-Photonen-Prozesse ist  $m = 1$ , für 2-Photonen-Anregung gilt  $m = 2$ .

## 2.3 Optische Transferfunktion

Die Güte mit der verschiedene Ortsfrequenzen von einem abbildenden System übertragen werden, wird durch die optische Übertragungsfunktion OTF (Optical Transfer Function)  $H(\vec{k})$  beschrieben. Sie ist die Fouriertransformierte der PSF:

$$H(\vec{k}) = \mathcal{FT}\{h(\vec{r})\}. \quad (2.13)$$

Aufgrund der näherungsweise Zylindersymmetrie (dies gilt strenggenommen nur bei zirkular polarisierter Beleuchtung und unpolarisierter Detektion) ist es in den meisten Fällen ausreichend,  $|H(k_x)|$  oder  $|H(k_y)|$  zu betrachten, um Aufschluß über das Verhalten in lateraler Richtung zu erhalten, bzw.  $|H(k_z)|$  für das Verhalten in axialer Richtung. Bei gutem Signal-zu-Rausch Verhältnis können Strukturen mit einem Abstand von  $2\pi/k_{\max}$  noch aufgelöst werden. Als Wert für die „maximale Frequenz“  $k_{\max}$ , die von einem optischen System übertragen wird, wird in dieser Arbeit der Wert angegeben, bei dem die OTF auf 3% ihres ursprünglichen Werts abgesunken ist.

Um verschiedene Ansätze zur Auflösungserhöhung zu vergleichen, ist es nicht ausreichend, die Halbwertsbreiten der PSFs zu untersuchen. Es ist entscheidend, daß die Artefakte, die durch die Nebenmaxima der PSF in den Bilddaten entstehen, entfernt werden können. Zur Beurteilung einer Methode kann ihre OTF untersucht werden: Die Halbwertsbreite FWHM (full-width at half-maximum) des zentralen Maximums eines Mikroskops ist umso kleiner, je größer die Ortsfrequenzen sind, die übertragen werden. D.h. eine breite OTF ist gleichbedeutend mit einer kleinen Halbwertsbreite. Durch Superposition des Anregungs- bzw. Detektionslichtes werden bei SWM (standing-wave microscopy) [30, 2, 31], dem I<sup>5</sup>M (incoherent illumination interference image interference microscopy) [19] und auch beim 4Pi-Mikroskop Ortsfrequenzen  $k_z$  übertragen, die über der maximalen Ortsfrequenz eines Konfokalmikroskops liegen [38]. Dies stellt sich in der OTF durch zusätzliche, nicht verschwindende, Bereiche entlang  $k_z$  dar.

Ist die OTF nicht überall konkav, sondern werden ganze Frequenzbereiche nur schwach oder gar nicht übertragen, so führt das zu Nebenmaxima in der PSF. Je ausgeprägter ein Minimum in der OTF ist, umso höher sind die entsprechenden Nebenmaxima in der PSF. Wird eine kritische, vom Signal-zu-Rausch-Verhältnis abhängige, Schwelle in der OTF unterschritten, können diese Frequenzen nicht mehr restauriert und die Artefakte in der Abbildung nicht entfernt werden. Bei der Beurteilung der OTF ist insbesondere der Wert am ersten Minimum der OTF, der sog. „kritischen“ Frequenz  $k_c$ , von Interesse. Das SWM besitzt keine zusammenhängende OTF und bei einem I<sup>5</sup>M werden Frequenzen über weite Bereiche nur schwach übertragen [5]. Wie später gezeigt wird, besitzt ein 4Pi-Mikroskop mit 2-Photonen-Anregung dagegen eine breite OTF, mit einem hohen Wert an  $k_c$ .

## 2.4 Entfaltungsalgorithmen

Um die aufgenommenen 4Pi-Bilddaten interpretieren zu können, müssen die Artefakte, die durch die Nebenmaxima in der PSF hervorgerufen werden, durch geeignete Bildverarbeitung entfernt werden. Das aufgenommene Bild  $b(\vec{r})$  ergibt sich durch die Faltung des Objekts  $o(\vec{r})$  mit der OTF  $h(\vec{r})$  (Gl. 2.1). Um das ursprüngliche Objekt  $o(\vec{r})$  wieder herzustellen, stehen mehrere Methoden zur Verfügung.

Generell lässt sich jedoch sagen, daß alle Entfaltungsmethoden nur dann artefaktfreie Daten liefern, wenn die Nebenmaxima eine kritische Höhe von ca. 50 % des zentralen Maximums unterschreiten. In dieser Arbeit wurden je nach Problemstellung Punktentfaltung, lineare Entfaltung oder die iterative Richardson-Lucy Entfaltung verwendet. Diese Methoden werden für die 4Pi-Mikroskopie in [39] ausführlich vorgestellt.

### 2.4.1 Punktentfaltung

Die 4Pi-PSF läßt sich näherungsweise in einen Radialteil  $c(r)$  und einen axialen Teil  $h_z(z)$  zerlegen:

$$h_{4\text{Pi}}(r, z) \cong c(r)h_z(z). \quad (2.14)$$

In diesem Fall ist es möglich, eine eindimensionale Punktenfaltung durchzuführen, um den Effekt der Nebenmaxima zu eliminieren [45]. Der Axialteil lässt sich näherungsweise schreiben als Kreuzprodukt aus einer Funktion  $h_{\text{Gauss}}$ , die die Form der Maxima beschreibt und einer Kammfunktion  $K(z)$ , die Position und relative Höhe der betrachteten Maxima angibt:

$$h_z(z) = h_{\text{Gauss}} \otimes K(z). \quad (2.15)$$

Die Nebenmaxima lassen sich entfernen, indem  $h_z(z)$  mit der inversen Funktion  $K^{-1}(z)$  gefaltet wird. Bei dieser Entfaltungsmethode ist zu beachten, daß nur die Nebenmaxima entfernt, jedoch schwach übertragene Ortsfrequenzen nicht restauriert werden. Das bedeutet, die Auflösung wird durch diese Methode nicht verbessert. Der Vorteil dieser Methode ist, daß sie aufgrund der eindimensionalen Entfaltung sehr schnell durchgeführt werden kann.

In den meisten Fällen zeigte es sich als ausreichend, eine Dreipunktenfaltung zu verwenden (d. h. neben dem Hauptmaximum wird nur das Nebenmaximum 1. Ordnung berücksichtigt), um die Nebenmaxima zu entfernen. Bei höheren Nebenmaxima, insbesondere bei 1-Photonen 4Pi-Mikroskopie, sind die Maxima 2. Ordnung deutlich von Null verschieden, so daß in diesen Fällen eine 5-Punkt-Entfaltung verwendet wurde. Die Höhe der Peaks wird aus den relativen Höhen der Nebenmaxima zum zentralen Maximum ermittelt. Bei linearer Fluoreszenzanregung im Typ A wurden zur 5-Punkt-Entfaltung der 4Pi-Daten beispielsweise die Werte 0,1; 0,4; 1; 0,4; 0,1 eingesetzt. Interferieren die Wellen nicht exakt konstruktiv, so müssen die Höhen der Nebenmaxima entsprechend asymmetrisch angepaßt werden. Die residualen Nebenmaxima betragen nach Entfaltung <10 % der Intensität des Hauptmaximums und können vernachlässigt werden.

### 2.4.2 Lineare Entfaltung

Im Fourierraum ergibt sich das gemessene Bild  $B(\vec{k})$  als Multiplikation der Übertragungsfunktion  $H(\vec{k})$  mit der Fouriertransformierten des Objekts  $O(\vec{k})$ . In der Abwesenheit von Rauschen ergibt sich das Objekt durch:

$$O(\vec{k}) = \frac{B(\vec{k})}{H(\vec{k})} \quad (2.16)$$

Ist die PSF  $h(\vec{r})$  des optischen Systems bekannt, so liefert diese Invertierung bei rauschfreien Bildern eine perfekte Rekonstruktion des Objekts. Für rauschbehaftete Bilder zeigt sich, daß der optimale Filter ein Wiener Filter ist [41] und es ergibt sich:

$$O(\vec{k}) = \frac{H^*(\vec{k}) \cdot B(\vec{k})}{|H(k)|^2 + \mu} \quad (2.17)$$

Der Regularisierungsparameter  $\mu$  verhindert das Auftreten von Singularitäten bei der Rekonstruktion. Eine Verstärkung des Rauschens in den Bereichen der OTF, für die  $|H(k)|^2 \rightarrow 0$  geht, wird verhindert. Das ist vor allem bei hohen Nebenmaxima wichtig, wenn die Frequenzen um  $k_c$  nur schwach übertragen werden und das Rauschen dominiert.

Zur Entfaltung kann entweder eine berechnete PSF oder eine gemessene PSF verwendet werden. Durch lineare Entfaltung kann in der Praxis die Auflösung einer Aufnahme um etwa 50 % gesteigert werden.

### 2.4.3 Nichtlineare Entfaltung

In dieser Arbeit wurde als nichtlinearer Algorithmus die Richardson-Lucy Entfaltung [43, 33] verwendet. Dies ist ein Maximum-Likelihood Algorithmus, der die Differenz von geschätztem und gemessenem Objekt, bei vorgegebener PSF, minimiert und dadurch iterativ das Objekt mit der höchsten Wahrscheinlichkeit bestimmt. Das Rauschen wird im Richardson-Lucy Algorithmus durch die Poisson-Statistik beschrieben. Der Algorithmus verstärkt das Rauschen nach wenigen Iterationen und führt ohne Regularisierung zu einer Lösung, die von Rauschen dominiert wird. Damit der Richardson-Lucy Algorithmus zu einer geeigneten Lösung kommt, muß hier ebenfalls ein Regularisierungsparameter eingeführt werden, der sicherstellt, daß die Entfaltung stabil gegenüber Rauschen ist. Für den Richardson-Lucy Algorithmus wird vorausgesetzt, daß die PSF bekannt ist (es existieren auch „Blind Deconvolution“-Varianten, die Objekt und PSF schätzen [34]). Zur Entfaltung der Bilddaten können vektoriell berechnete 3D-PSFs oder an einzelnen Punktobjekten (z. B. Fluoreszenzbeads mit einem Durchmesser von  $\leq 100$  nm) im Datensatz gemessene 3D-PSFs verwendet werden.

Der Algorithmus ermöglicht es ebenfalls, Ortsfrequenzen, die von einem bildgebenden System nur schwach übertragen werden, wieder zu verstärken und damit die Auflösung zu erhöhen.

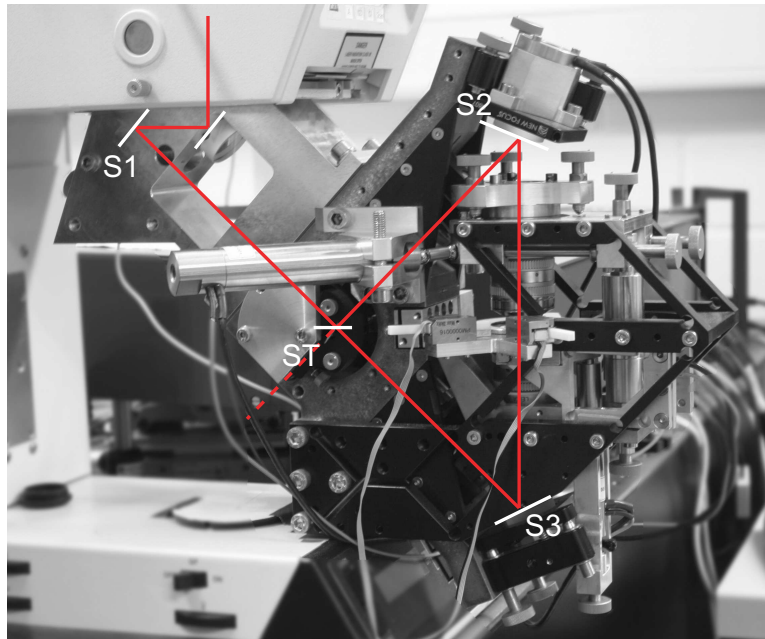
# Kapitel 3

## Material und Methoden

In diesem Kapitel wird zunächst das im Rahmen dieser Arbeit am Deutschen Krebsforschungszentrum (DKFZ) aufgebaute 4Pi-Mikroskop beschrieben. Das zentrale Element dieser Arbeit sind Ölimmersionsobjektive, die den bislang höchsten gefertigten Öffnungswinkel von  $74^\circ$  besitzen. Um die Vorteile des hohen Öffnungswinkels nutzen zu können, müssen hohe Anforderungen an die optischen Eigenschaften der Probe erfüllt werden. Dies wird vor allem durch ein Einbettmedium mit geeignetem Brechungsindex erreicht. Deshalb wird auf diese Punkte gesondert eingegangen. Die notwendigen Einstellungen zur einmaligen Grundjustage des 4Pi-Moduls und die Einstellungen, die bei jedem Probenwechsel erforderlich sind, werden vorgestellt. Anschließend wird gezeigt, wie das 4Pi-Modul teilweise automatisiert werden kann, um die Justage beim Wechsel der Probe zu vereinfachen und zu beschleunigen. Da die automatische Regelung die Strehlheligkeit optimiert, ist sie genauer als eine manuelle Einstellung. Während einer Messung wird eine optimale Einstellung der Objektive durch die automatische Regelung gewährleistet. Auf den Dispersionsabgleich, der erforderlich ist, damit das Fluoreszenzlicht am Strahlteiler konstruktiv interferiert (für 4Pi-Mikroskopie vom Typ C), wird im letzten Abschnitt genauer eingegangen.

### 3.1 Der 4Pi-Aufbau

Das im Zuge dieser Arbeit aufgebaute 4Pi-Mikroskop besteht aus einem kommerziell erhältlichen Konfokalmikroskop (TCS SP2, Leica Microsystems, Mannheim) dessen Objektivrevolver durch ein am DKFZ gebautes 4Pi-Modul ersetzt wurde. Der optische Strahlengang ist identisch dem in [17] beschriebenen Aufbau. Bei der Konzeption des in dieser Arbeit verwendeten 4Pi-Moduls wurde darauf geachtet, daß es eine hohe Steifigkeit besitzt und wenig anfällig für äußere Störungen, wie z. B. Gebäudeschwingungen ist. Durch einen symmetrischen Aufbau wurde ver-



**Abbildung 3.1.** Das 4Pi-Modul ist anstelle eines Objektivrevolvers an einem Konfokalmikroskop angebracht. Der Strahlengang im 4Pi-Modul ist rot eingezeichnet. Der Strahl verläßt den Scanner, wird am Strahlteiler (ST) aufgespalten und über die Spiegel S2 bzw. S3 in die sich gegenüber stehenden Objektive gelenkt. S1 – S3 und der Strahlteiler sind beweglich gelagert, um eine Justage des Moduls zu ermöglichen.

sucht, den Einfluß von Temperaturänderungen zu minimieren. Die verschiedenen Achsen zur Justage des 4Pi-Moduls sind bei diesem Aufbau weitestgehend entkoppelt, so daß sie unabhängig voneinander eingestellt werden können.

Abbildung 3.1 zeigt den Strahlengang im 4Pi-Modul. Der Strahl verläßt den konfokalen Scanner, wird an Spiegel S1 reflektiert und am Strahlteiler (ST) in zwei Teilstrahlen aufgeteilt. Diese werden an den Spiegeln S2 bzw. S3 reflektiert und mit den Objektiven auf die Probe fokussiert. Um eine genaue Justage zu ermöglichen, sind die Spiegel S1 – S3 kippbar gelagert und können mittels Feingewindeschrauben justiert werden. Der Strahlteiler kann ebenfalls verschoben und geneigt werden. S2 ist zusätzlich auf einem Dreiaachsen-Piezokippsystem (S-316, PI, Karlsruhe) angebracht, das eine genaue Einstellung der Phasenebene bei Probenwechsel ermöglicht.

Objektive und Objektivtisch können mit einem Picomotor (8301, NewFocus, USA) relativ zum Strahlteilerwürfel gehoben oder gesenkt werden. Damit können die Weglängen im oberen und unteren Arm des 4Pi-Moduls abgeglichen werden. Um die Glasdickenunterschiede der optischen Elemente in beiden Armen des Strahlengangs auszugleichen, ist in einem Arm ein Dispersionskeil angebracht und im anderen Arm eine planparallele Platte gleicher mittlerer Dicke.

Das untere Objektiv ist fest im 4Pi-Modul eingeschraubt, während das obere



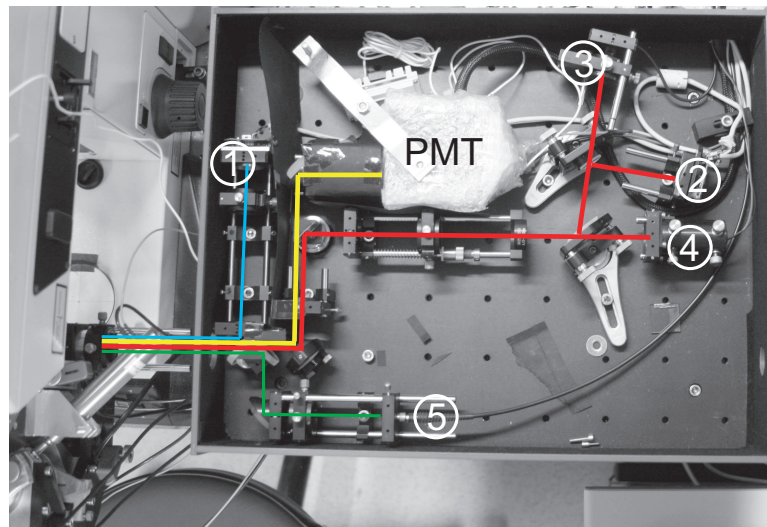
durch Feingewindeschrauben für die Grobeinstellung und Piezoaktoren (P-841, PI, Karlsruhe) zur Feinjustage in allen drei Raumrichtungen verschoben werden kann. Der Probenstisch kann mit einer Feingewindeschraube und einem Piezoaktor in  $z$ -Richtung verschoben werden. Dieser Piezoaktor sorgt ebenfalls für den Hub der Probe in axialer Richtung während  $xz$ -Aufnahmen oder bei Aufnahmen von dreidimensionalen Datenstapeln. Um eine mögliche Verkipfung der Probe zu korrigieren, sind an der Seite des Probenstisches Feingewindeschrauben angebracht. Diese erlauben die Kippung in zwei weitgehend unabhängigen Richtungen. Die Probe selbst kann mit einer Handsteuerung (Motion Commander, Nanos-Instruments GmbH, Hamburg), die zwei Schrittmotoren (PiezoLEGS<sup>®</sup>, PiezoMotor AB, Schweden), ansteuert, in  $x$ - und  $y$ -Richtung bewegt werden. So kann das zu messende Objekt in die Mitte des Bildfeldes geschoben werden.

Zur Anregung der Fluoreszenz steht ein Argon-Krypton-Laser (Melles Griot, USA) für 1-Photonen-Prozesse und ein Titan:Saphir-Laser (Mai Tai, Spectra Physics, Californien, USA) zur 2-Photonen-Anregung zur Verfügung. Der Titan:Saphir-Laser wird über den IR-Eingang des TCS in den Konfokalscanner eingekoppelt.

Das Konfokalmikroskop wird mit der mitgelieferten TCS-Steuersoftware bedient. Zur Steuerung des 4Pi-Moduls (d. h. Positionierung der Objektive, Scan der Probe in axialer Richtung, Einstellung des Spiegels S2, ...) wurde im Zuge dieser Arbeit eine Ansteuerelektronik aufgebaut, die mit dem Konfokalmikroskop synchronisiert ist. Die Programmierung der Ansteuerung erfolgte mit der Software LabVIEW (National Instruments, Texas, USA).

Das Fluoreszenzsignal wird durch die gegenüberstehenden Objektive gesammelt. Am Strahlteiler werden die beiden Teilstrahlen des Fluoreszenzlichtes zusammengeführt, wobei etwa die Hälfte des Signals nach oben in den Konfokalscanner gelangt. Die andere Hälfte verläßt das 4Pi-Modul nach unten (gestrichelte Linie in Abb. 3.1). Der Strahl, der in den Konfokalscanner gelangt, wird dort am Scanspiegel „de-scanned“ und anschließend auf eine Detektionslochblende fokussiert. Zur Detektion des Signals im Konfokalscanner stehen jeweils zwei analoge (im Konfokalscanner integrierte) PMTs (Photo Multiplier Tube) und zwei externe APDs (Avalanche Photo Dioden) (PerkinElmer Optoelectronics, Fremont, USA) im Counting-Modus zur Verfügung.

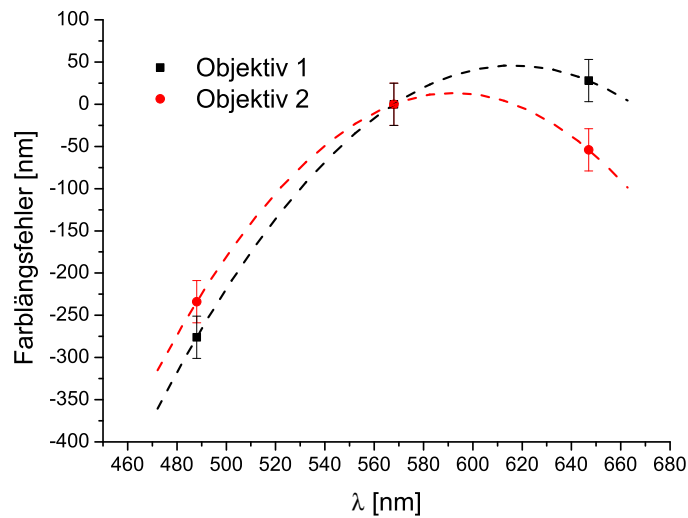
Das Fluoreszenzlicht, welches das 4Pi-Modul am Strahlteilerwürfel nach unten verläßt, geht bei den bisherigen 4Pi-Aufbauten verloren. In dieser Arbeit wurde ein Aufbau realisiert, der es erlaubt dieses Licht ebenfalls zu detektieren. Das Fluoreszenzlicht wird nach dem Strahlteilerwürfel in den in Abbildung 3.2 dargestellten Aufbau umgelenkt. Es wird dort nicht „de-scanned“, aus diesem Grund wird zur Detektion des Signals eine größere Detektionsfläche benötigt. Hierzu wurde an diesem Ausgang ein analoger PMT angebracht. Um den Dunkelstrom des PMTs zu reduzieren, wird dieser mit Peltierelementen auf ca. 10°C gekühlt. Der Strahlengang zur Detektion des Fluoreszenzlichtes ist in Abbildung 3.2 gelb



**Abbildung 3.2.** Strahlengang der automatischen Regelung (rot) und des Detektionspfades (gelb) für den zweiten Ausgang des 4Pi-Moduls. Das Fluoreszenzlicht wird mit einem gekühlten PMT detektiert. An zwei planparallelen Platten wird jeweils ein Teil des Lichts reflektiert und gelangt auf einen CCD-Sensor ① (blau) bzw. ein Spektrometer ⑤ (grün). ① und ② sind CCD-Sensoren, anhand derer sich die Justage der Objektive visuell beurteilen läßt. ① befindet sich in einer Pupillenlage, ② im Fokus des Strahls. Ein Hilfslaser ④ zur Automatisierung der Justage des 4Pi-Moduls wird über den roten Strahlengang in das 4Pi-Modul eingekoppelt. Der rücklaufende Strahl trifft auf den CCD-Sensor ② und eine Photodiode ③.

dargestellt. Der Strahl wird aus dem 4Pi-Modul ausgekoppelt, gelangt in den Aufbau und passiert zwei planparallele Platten, die in einem Winkel von  $45^\circ$  relativ zum Strahl angebracht sind. An diesen Platten wird jeweils ca. 4% des Lichts reflektiert und auf einen CCD-Sensor ① (ToUCam Pro, Philips, Hamburg) bzw. ein Spektrometer ④ (EPP2000, StellarNet Inc, Florida) gelenkt. Der Großteil des Strahls passiert die planparallelen Platten. Danach wird er durch einen Spiegel um  $90^\circ$  umgelenkt und trifft auf einen Dichroid (700DCSX, Chroma, USA), der langwelliges Licht reflektiert und kurzwelliges Licht transmittiert (Trennwellenlänge  $\lambda = 750 \text{ nm}$ ). Das kürzerwellige Fluoreszenzlicht wird transmittiert, auf den PMT gelenkt und dort detektiert. Vor dem PMT ist ein Kurzpaßfilter (E700sp, Chroma, USA) angebracht, so daß das Anregungslicht des 2-Photonen-Lasers und der Strahl des Justagelasers ⑤ blockiert werden.

Zur Überprüfung der Justage stehen zwei CCD-Sensoren ① und ② zur Verfügung, die in der Pupillenlage bzw. im Fokus des Strahls angebracht sind. Das Spektrometer ④ dient zum Dispersionsabgleich für Aufnahmen im Typ C. Dazu wird Weißlicht in das 4Pi-Modul eingekoppelt und mit dem Spektrometer detektiert. Abbildung 3.2 zeigt zudem noch den Strahlengang (rot) des Hilfslasers ④ für die automatische Regelung, auf die später ausführlicher eingegangen wird.



**Abbildung 3.3.** Experimentell bestimmter Farblängsfehler der verwendeten Objektivs im sichtbaren Wellenlängenbereich. Die Objektivs wurden so ausgewählt, daß sie einen ähnlichen Verlauf des Farblängsfehlers zeigen. Absolut gesehen ist der Farblängsfehler zwischen Anregung bei  $\lambda_{\text{exc}} = 568 \text{ nm}$  und Detektion bei  $\lambda_{\text{det}} = 605 \text{ nm}$  vernachlässigbar, während er zwischen  $\lambda_{\text{exc}} = 488 \text{ nm}$  und  $\lambda_{\text{det}} = 580 \text{ nm}$  etwa  $275 \text{ nm}$  beträgt.

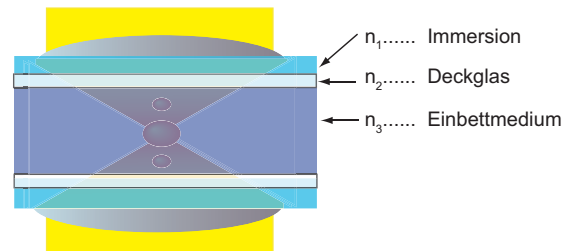
## 3.2 Die Objektivs

Für diese Arbeit wurden neu entwickelte ultra-hochaperturige Öl-Immersionsobjektivs (HCX PL APO CS 100/1,46 Oil, Leica Microsystems, Mannheim) verwendet. Sie besitzen mit einer numerischen Apertur von 1,46 und einem Semiaperturwinkel von  $74^\circ$  den bislang größten gefertigten Öffnungswinkel. Der Semiaperturwinkel  $\alpha$  ist um  $6^\circ$  größer, als bei den Objektivs mit dem zuvor größten Aperturwinkel. Ein größerer Öffnungswinkel führt in einem Konfokalmikroskop zu einer axial und lateral erhöhten Auflösung. In einem 4Pi-Mikroskop wird die axiale Auflösung nur in einem geringen Maße vom Semiaperturwinkel beeinflusst. Stattdessen reduziert ein größerer Öffnungswinkel in einem 4Pi-Mikroskop die Nebenmaxima.

Es kommen hochwertige Objektivs zum Einsatz, die enge Spezifikationen bezüglich Farblängsfehler<sup>1</sup> und Strehlhelligkeit<sup>2</sup> erfüllen. In einem 4Pi-Aufbau ist es wichtig, daß die verwendeten Objektivs einen ähnlichen Verlauf des Farblängsfehlers aufweisen. Die Objektivs, die in einem 4Pi-Mikroskop zusammen ver-

<sup>1</sup>Die Abhängigkeit der Fokusslage von der Wellenlänge in axialer Richtung wird als Farblängsfehler bezeichnet.

<sup>2</sup>Als Strehlverhältnis eines optischen Systems wird der Quotient aus der Lichtenergie, die innerhalb und der Energie die außerhalb der Airy-Scheibe auftritt, bezeichnet.



**Abbildung 3.4.** Um gute optische Eigenschaften der Probe zu gewährleisten, müssen die Brechzahlen von Immersion, Deckglas ( $n_2 = 1,515$ ) und Einbettmedium angepaßt werden. Die verwendeten Objektive sind für Deckgläser der Dicke  $170\ \mu\text{m}$  optimiert. Das Immersionsöl besitzt einen Brechungsindex von  $n_e = 1,518$ .

wendet werden, werden deshalb speziell ausgesucht. Dadurch ist gewährleistet, daß der Farblängsfehler zwischen der Anregungswellenlänge, die für 2-Photonen-Anregung im Infrarotbereich liegt und der Detektionswellenlänge im sichtbaren Wellenlängenbereich für beide Objektive gleichzeitig korrigiert werden kann.

Abbildung 3.3 zeigt den Verlauf des Farblängsfehlers der verwendete Objektive bei Wellenlängen im sichtbaren Bereich. Die gemessenen Kurven der beiden Objektive stimmen sehr gut überein. Sie zeigen eine schwache Abhängigkeit des Fokus von der Wellenlänge zwischen  $\lambda = 568\ \text{nm}$  und  $\lambda = 647\ \text{nm}$ . Bei kurzen Wellenlängen (zwischen  $\lambda = 488\ \text{nm}$  und  $\lambda = 568\ \text{nm}$ ) jedoch besitzen sie eine starke Wellenlängenabhängigkeit.

Die Objektive besitzen einen Korrektur-Ring (Corr-Ring), der es ermöglicht, sphärische Aberrationen, die aufgrund von Temperaturschwankungen, nicht angepaßtem Brechungsindex des Einbettmediums und/oder Variation der Deckglasdicke hervorgerufen werden, in gewissem Maße auszugleichen. Der sphärische Restfehler der Objektive ist für eine Raumtemperatur von  $23^\circ\text{C}$  und für Deckglasdicken von  $170\ \mu\text{m}$  optimal korrigiert, jedoch können die Objektive durch geeignete Einstellung des Corr-Rings auch bei geringfügig anderen Temperaturen eingesetzt werden.

Diese Korrekturmöglichkeit ist essentiell für die in dieser Arbeit vorgestellten Methoden, da sie alle auf der Erzielung möglichst niedriger Nebenmaxima basieren.

### 3.3 Einbettung in Thiodiethanol (TDE)

In der Mikroskopie muß der Brechungsindex des Immersionsmediums und des Einbettmediums an das verwendete Objektiv (Wasser, Glycerin oder Öl) angepaßt sein, d. h. in Abbildung 3.4 müsse  $n_1$  und  $n_3$  übereinstimmen. Bei der Einbettung von biologischen Proben muß ein Einbettmedium verwendet werden,

das zusätzlich noch mit dem biologischen Material und den Fluoreszenzfarbstoffen kompatibel ist. Eine Fehlanpassung des Brechungsindex führt in einem Konfokalmikroskop zu sphärischer Abberation und damit zu Abnahme der Signalintensität, einer Verringerung der axialen Auflösung sowie zu einer Verschiebung des Fokus mit zunehmender Eindringtiefe. Eine theoretische Beschreibung der in einem Konfokalmikroskop hervorgerufenen Aberrationen ist in [22] zu finden.

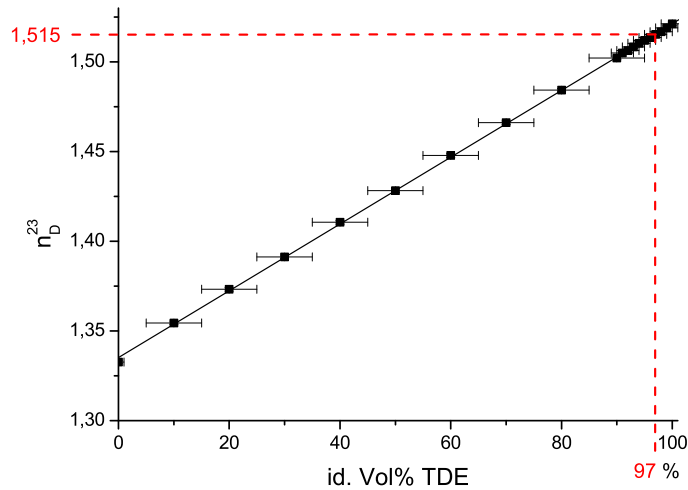
Die Anpassung des Brechungsindex ist kritischer bei Verwendung von Objektiven mit hoher numerischer Apertur: Bei Abweichung des Brechungsindex des Einbettmediums um 1 ‰ verfehlen die Strahlen der äußeren Aperturwinkel bei einem Öffnungswinkel von  $\alpha = 74^\circ$  den Fokus axial bereits um etwa eine Wellenlänge [48]. Bei Ölimmersionsobjektiven mit  $NA = 1,3$  und einem Öffnungswinkel von  $59^\circ$  beträgt die Abweichung nur eine viertel Wellenlänge und entsprechend weniger kritisch ist die Einstellung des Brechungsindex.

In einem 4Pi-Mikroskop steigen durch die verbreiterte konfokale  $z$ -Antwort die Nebenmaxima relativ zum Hauptmaximum an. Bei 2-Photonen-Anregung ist der Effekt aufgrund des nichtlinearen Prozesses weniger kritisch. Bei linearer Fluoreszenzanregung besitzen die Nebenmaxima im 4Pi-Mikroskop per se eine hohe Intensität, daher ist eine Anpassung des Brechungsindex hier besonders wichtig, um entfaltbare Daten zu erzielen. Eine gute Anpassung des Brechungsindex ist aber auch bei 2-Photonen-Anregung entscheidend, wenn auf Entfaltungsalgorithmen komplett verzichtet werden soll. Dazu muß die Intensität der Nebenmaxima weniger als ca. 10 % des Hauptmaximums betragen.

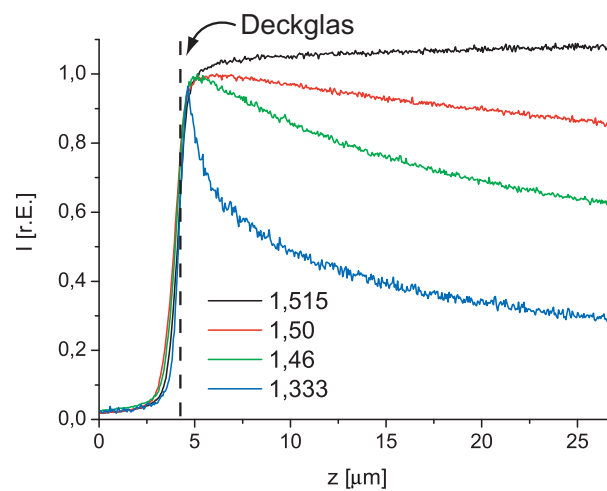
Bei axialem Scan ändert sich die relative Phase beider Foci bei Brechungsindexfehlanpassung mit zunehmender Eindringtiefe in das Einbettmedium [15]. Dies kann durch eine Phasenkompensation während des Scans ausgeglichen werden, so daß in jeder Tiefe konstruktive Interferenz erzielt wird. Dazu wird eine von der  $z$ -Position linear abhängige Phasenkorrektur auf die eingestellte Phase addiert. Es ist allerdings auch möglich die von der axialen Position abhängige Phase erst bei der Entfaltung der Daten zu berücksichtigen.

Der Zellkern hat aufgrund der hohen DNA- und Proteindichte, die mit einem niedrigen Wassergehalt einhergehen, einen Brechungsindex nahe dem von Öl ( $n = 1,38 - 1,41$  [13]). Bei Verwendung von Wasser- oder Glycerinobjektiven führt das zu einer ortsabhängigen Phase. Strukturen, die innerhalb, oder ober- bzw. unterhalb des Zellkerns liegen, besitzen eine PSF mit ortsabhängiger Phase. Durch die Verwendung von Ölobjektiven und geeignetem Brechungsindex des Einbettmediums ist es möglich, auch im Zellkern Strukturen ohne Phasenverschiebung zu messen.

Aus diesen Gründen ist es notwendig, den Brechungsindex des Einbettmediums an den von Öl anzupassen um die Vorteile des hohen Öffnungswinkels voll nutzen zu können. Bei einer Temperatur von  $23^\circ\text{C}$  ist der Brechungsindex des verwendeten Immersionsöls  $n_e = 1,518$  bzw.  $n_D = 1,515$  (Immersion Oil, Leica Microsystems, Mannheim). Die Einbettmedien, mit denen bislang versucht wurde den



**Abbildung 3.5.** Brechungsindex des Einbettmediums in Abhängigkeit von der TDE-Konzentration. Es lassen sich durch entsprechende Verdünnung Brechungsindizes zwischen  $n_{\text{Wasser}} = 1,333$  und  $n_{\text{TDE}} = 1,52$  einstellen.



**Abbildung 3.6.** Messung der Signalintensität von Rhodamin mit Ölimmersionsobjektiven ( $NA = 1,46$ ) bei zunehmender Eindringtiefe für Einbettmedien mit unterschiedlichen Brechungsindizes:  $n = 1,333$  (Wasser),  $n = 1,46$  entspricht Mowiol bzw. Glycerin,  $n = 1,50$  für Harze und  $n = 1,515$  für Öl. Bei niedrigerem Brechungsindex nimmt die Signalintensität schon nach wenigen  $\mu\text{m}$  ab (die gemessenen Kurven wurden normiert).

Brechungsindex anzupassen sind z. B. Glycerin ( $n = 1,45$ ), Mowiol ( $n \sim 1,46$ ) oder Harze ( $n = 1,5$ ), die alle einen zu niedrigen Brechungsindex aufweisen. Ein weiterer Nachteil dieser Medien ist, daß ihr Brechungsindex nicht kontrolliert eingestellt werden kann. Als geeignetes Medium zur Einbettung wurde TDE (2,2'-Thiodiethanol, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) gefunden [48]. Es ist in jedem Verhältnis mit Wasser mischbar. Dadurch läßt sich der Brechungsindex zwischen  $n_{\text{Wasser}} = 1,333$  und  $n_{\text{TDE}} = 1,52$  einstellen. Abbildung 3.3 zeigt die Abhängigkeit des Brechungsindex von der TDE-Konzentration in Wasser. Um den gewünschten Brechungsindex von  $n_{\text{Öl}} = 1,515$  einzustellen, wird 97% TDE mit 3% Wasser gemischt. Zellmembranen sind für TDE durchlässig und es ist mit den meisten getesteten Fluorophoren kompatibel, sofern der pH-Wert geeignet eingestellt ist.

Um den Verlauf der Signalintensität mit zunehmender Eindringtiefe für verschiedene Brechungsindizes zu messen, wurde Rhodamin in verschiedenen TDE-Konzentrationen gelöst. Der Brechungsindex der Proben wurde durch Zugabe von Wasser auf 1,515; 1,5; 1,46 und 1,333 eingestellt. Die in Abbildung 3.3 dargestellte Messung zeigt eine deutliche Abnahme der Signalintensität bei zunehmender Eindringtiefe in das Medium. Selbst bei kleiner Fehlanpassung von  $\Delta n = 0,015$  ist eine Abnahme der Intensität um 8% schon nach  $10 \mu\text{m}$  sichtbar. Wird Mowiol als Einbettmedium verwendet, beträgt der Verlußt an Signalintensität bereits etwa 20%.

### 3.4 Justage des 4Pi-Moduls

Restungenauigkeiten erfordern beim Aufbau des 4Pi-Systems bestimmte Grundjustagen, die nur einmalig durchgeführt werden müssen. Durch den Wechsel der Probe und durch die Probe selbst werden weitere optische Ungenauigkeiten verursacht, die bei jedem Probenwechsel korrigiert werden müssen. Die am 4Pi-Aufbau selbst durchzuführenden Einstellungen, werden unter dem Abschnitt *Interne Justagen* beschrieben. Probeneigenschaften, die berücksichtigt werden müssen, um eine möglichst aberrationsfreie optische Abbildung zu erzielen, sind unter *Externe Einstellungen* aufgeführt.

#### **Interne Justage des 4Pi-Aufbaus:**

Die internen Einstellungen, bis auf Corr-Ring, Phasenebene und Dispersion bzw. Zeitachse, sind einmalig bei einer Grundjustage des 4Pi-Mikroskops notwendig. Dagegen können die optimalen Einstellungen für Phasenebene, Dispersion und Corr-Ring von Probe zu Probe variieren und müssen daher bei jedem Probenwechsel korrigiert werden.

**Farbquerfehler** Eine Tubuslinse mit entgegengesetztem Verlauf des Farbquerfehlers korrigiert den Farbquerfehler der Objektive [6]. Wenn die Objektive jedoch gegenüber der Tubuslinse verkippt sind, wird ein Farbquerfehler eingeführt, der korrigiert werden muß. Er wird in einem Wellenlängenbereich zwischen 488 nm und 647 nm eingestellt, damit die Foci von Anregung und Fluoreszenz lateral übereinstimmen. Zur Einstellung können Goldbeads verwendet werden, die das eingestrahlte Laserlicht reflektieren. Die Goldbeads werden mit zwei verschiedenen Wellenlängen simultan beleuchtet. Zur Detektion des reflektierten Signals wird mit einem AOTF (acusto-optical tunable filter) für die zwei Detektionskanäle des Mikroskops der Frequenzbereich je einer Laserlinie ausgewählt. Der Farbquerfehler läßt sich durch einen Vergleich der Detektionskanäle ermitteln.

Der Farbquerfehler am unteren Objektiv wird korrigiert, indem der Strahl am Spiegel S1 (vergl. Abb. 3.1) entsprechend gekippt wird. Der residuale Farbquerfehler des oberen Objektivs wird korrigiert, indem der Strahl am Spiegel S2 verkippt wird und die daraus resultierende Verschiebung der Phasenebene am Strahlteilerwürfel rückgängig gemacht wird. Diese Einstellung wird iterativ so lange wiederholt, bis Farbquerfehler und Phasenebene gleichzeitig justiert sind.

**Farblängsfehler** Im sichtbaren Wellenlängenbereich ist der Farblängsfehler der Objektive weitestgehend korrigiert. Außerhalb des korrigierten Bereiches nimmt der Farblängsfehler jedoch stark zu. Er ist deshalb vor allem bei 2-Photonen-Anregung relevant, da die Probe mit Wellenlängen im infraroten Bereich beleuchtet wird, für den die Objektive nicht optimiert sind. Der Farblängsfehler für 2-Photonen-Anregung kann eingestellt werden, indem der IR-Strahl vor der Einkopplung in den Scanner vorfokussiert wird. Dadurch kann der Farblängsfehler so eingestellt werden, daß er beispielsweise für eine Anregung bei 820 nm und eine Emission bei 530 nm verschwindet.

**Zeitachse** Ein genauer Abgleich der Weglängen in beiden Armen des 4Pi-Moduls ist notwendig, damit die Pulse des 2-Photonen-Lasers gleichzeitig im Fokus eintreffen. Eine noch genauere Justage ist für ein 4Pi-Mikroskop im Typ C aufgrund der kurzen Kohärenzlänge des Fluoreszenzlichts von wenigen  $\mu\text{m}$  notwendig. Ein verspiegeltes Deckglas wird mit Weißlicht einer Hg-Lampe bestrahlt und die Weglänge zwischen beiden Interferometerarmen angepaßt, bis Weißlichtinterferenz auftritt.

**Corr-Ring** Zur Einstellung des Corr-Rings wird eine Probe mit einem verspiegelten Deckglas verwendet. Der Corr-Ring jedes Objektivs wird für die Anregungswellenlänge (bzw. bei 2-Photonen-Anregung für 647 nm) so eingestellt, daß der Spiegelreflex eine möglichst kleine Halbwertsbreite und eine hohe Intensität zeigt. Damit können probenabhängige Restabweichungen von Brechungsindex und Deckglasdicke, aber auch der Einfluß der



Raumtemperatur, so weit ausgeglichen werden, daß der dadurch verursachte sphärische Fehler möglichst klein ist.

**Phasenebene** Eine laterale Verschiebung der Pupillenlagen führt dazu, daß die Phase im Bildfeld vom Ort abhängig ist. Zur Einstellung wird ebenfalls ein verspiegeltes Deckglas verwendet. Der Spiegel S2 wird dabei so eingestellt, daß die Phase über ein möglichst großes Bildfeld hinweg konstant ist. Dadurch ergibt sich auch bei großen 3D-Datensätzen über den gesamten Datensatz eine ortsunabhängige Phase.

**Vergrößerungsdifferenz** Der Vergrößerungsunterschied der Objektive liegt im Bereich von wenigen ‰. In einem regulären oder konfokalen Mikroskop ist dieser Vergrößerungsunterschied kaum bemerkbar, jedoch bei der Verwendung zweier gegenüberliegender Objektive führt er dazu, daß bei großen Rasterwinkeln die Foci der Objektive nicht mehr übereinstimmen. Im 4Pi-Mikroskop darf die axiale Abweichung höchstens die Halbwertsbreite der PSF, also 100 nm betragen. Ohne Korrektur konnten nur in einem Bildfeld von etwa  $10\ \mu\text{m} \times 10\ \mu\text{m}$  Aufnahmen gemacht werden. Um die Vergrößerungsdifferenz auszugleichen, wurde in beide Interferometerarme ein Linsensystem, bestehend aus zwei Achromaten ( $f = +76\ \text{nm}$  und  $f = -250\ \text{nm}$ , effektive Fokusslänge 88 mm) eingefügt, mit denen ein Zwischenbild erzeugt wird. Das nutzbare Bildfeld beträgt nach dieser Korrektur etwa  $46\ \mu\text{m} \times 46\ \mu\text{m}$ . Diese Einstellung muß für jede Objektivkombination vorgenommen werden.

**Dispersion** Die Glasdickenunterschiede der optischen Elemente in beiden Armen des 4Pi-Moduls, rufen aufgrund der unterschiedlichen Dispersion von Glas und Luft eine stark wellenlängenabhängige Phase hervor. Um kohärente Detektion zu gewährleisten, muß die Phase über die Bandbreite der Fluoreszenz hinweg konstant sein. Um die Glasdickenunterschiede auszugleichen, ist in einem 4Pi-Arm ein Dispersionskeil und im zweiten eine planparallele Platte gleicher mittlerer Dicke, angebracht. Zur Einstellung wird ein verspiegeltes Deckglas mit einer Hg-Lampe beleuchtet und die Weglänge zwischen beiden Armen des 4Pi-Moduls so eingestellt, daß Weißlichtinterferenz zu sehen ist. Ein Spektrometer, das am zweiten Ausgang des Strahlteilerwürfels angebracht ist (vgl. Abb. 3.2), stellt die Abhängigkeit der Phase von der Wellenlänge dar. Der Dispersionskeil wird so eingestellt, daß die Phase über einen möglichst großen Wellenlängenbereich konstant ist. Die Einstellung am Dispersionskeil wird üblicherweise nur einmalig vorgenommen. Für unterschiedliche Proben ist es ausreichend, den Verlauf der Phase mittels des Picomotors an der Zeitachse einzustellen und die Einstellung des Dispersionskeils unverändert zu lassen.

### Externe Einstellungen:

Zusätzlich zur Justage des 4Pi-Mikroskops ist eine optisch gute Probenpräparation essentiell für niedrige Nebenmaxima. Insbesondere muß auf den richtigen Brechungsindex des Einbettmediums und auf die richtige Deckglasdicke geachtet werden. Während der Aufnahme von größeren Datensätzen muß außerdem eine konstante Raumtemperatur gewährleistet sein.

**Glasdicke** Die Deckgläser wurden mit einer Mikrometerschraube vermessen. Es werden nur Deckgläser der Dicke  $150 \pm 5 \mu\text{m}$  verwendet. Nominell sind die Objektive für eine Deckglasdicke von  $170 \mu\text{m}$  korrigiert, jedoch hat sich gezeigt, daß bei einer Deckglasdicke von  $150 \mu\text{m}$  der Einstellbereich des Corr-Rings besser genutzt werden kann. Werden dickere Gläser verwendet, reicht der Einstellbereich des Corr-Rings nicht aus, um am Spiegel eine  $z$ -Antwort mit möglichst geringer Halbwertsbreite zu erzielen.

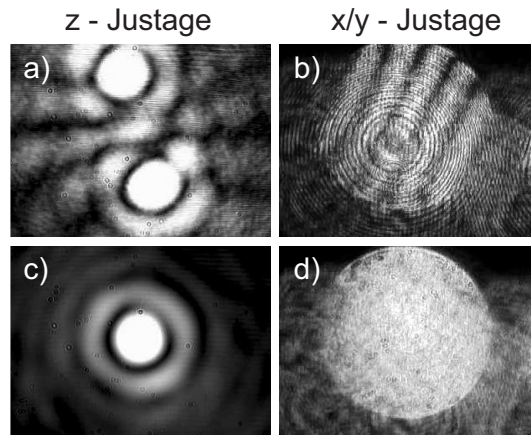
**Einbettmedium** Als Einbettmedium wurde Thiodiethanol (TDE) [48] verwendet. Der Brechungsindex des Einbettmediums wird auf  $n_e = 1,518$  eingestellt. Dazu wird eine Mischung aus 97 % TDE und 3 % Phosphatpuffer verwendet. Der Brechungsindex des Einbettmediums wird mit einem Refraktometer (AR200, Reichert, USA) kontrolliert.<sup>3</sup> Für technische Proben kann 97 %-iges TDE direkt verwendet werden; für biologische Proben wird ein langsamer Austausch vorgenommen, um zu verhindern, daß die 3D-Struktur der Zelle aufgrund des unterschiedlichen osmotischen Drucks von TDE außerhalb der Zelle und PBS innerhalb der Zelle gestört wird. Es hat sich eine Verdünnungsreihe von 10 %, 20 %, 40 %, 60 %, 80 % und  $3 \times 97 \%$  (jeweils für etwa 10–20 min) als geeignet erwiesen, um die 3D-Struktur zu erhalten.

Um Bleichen zu reduzieren, wurde dem Einbettmedium in einigen Fällen noch Dabco (1,4-Diazabicyclo[2.2.2]octane, Alfa Aesar GmbH, Deutschland) und/oder Cysteamin (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) beigegeben. Cysteamin wirkt als Triplett-Quencher und reduziert bei ausreichender Konzentration (etwa mM) das Bleichen bei 1-Photonen-Messungen. 2-Photonen-Bleichprozesse werden wahrscheinlich durch die Bildung von Radikalen verursacht [12], daher hilft in diesem Fall die Zugabe von „Radikalfängern“ wie Dabco.

**Temperatur** Schwankungen der Umgebungstemperatur verursachen nicht nur einen Temperatur-Drift, sondern führen aufgrund der Abhängigkeit des Brechungsindex von der Temperatur auch zu sphärischen Aberrationen. Deshalb muß bei sich ändernder Raumtemperatur die Corr-Ring-Einstellung für die vorherrschende Temperatur angepaßt werden. Um diese Störquellen

---

<sup>3</sup>Der Brechungsindex wird mit dem Refraktometer bei 586 nm ( $n_D$ ) gemessen.



**Abbildung 3.7.** Die Abbildungen a) und c) zeigen die Signale am CCD-Sensor im Fokus des Strahls ② für die  $z$ -Justage der Objektivse und b) und d) zeigen die Signale des CCD-Sensors in der Pupillenebene ① für die Justage in lateraler Richtung. a) und c) zeigt den Zustand vor der Justage durch die automatische Regelung, b) und d) zeigen das Ergebnis bei aktiver Nachregelung.

zu vermeiden, bietet sich eine abgeschlossene und aktiv temperaturregulierende Kammer um das 4Pi-Modul an. Zusätzlich lassen sich dadurch Störungen durch Luftströmung vermeiden.

### 3.5 Regelung der Objektivposition

Unterschiedliche Fehler, wie z. B. Dejustage der Objektivse in axialer und/oder lateraler Richtung oder Verkippung der Probe führen zu einem Verlust an Signalintensität und zu höheren Nebenmaxima. Um die Qualität der Justage beurteilen zu können, wurden zwei CCD-Sensoren angebracht (vgl. Abbildung 3.2). Einer der CCD-Sensoren ① ist in der Pupillenebene angebracht, ein weiterer ② im Fokus. Anhand des Interferenzmusters in der Pupillenebene läßt sich überprüfen, ob der Fokus der Objektivse lateral übereinstimmt. An der Krümmung der Interferenzstreifen lassen sich weitere Abbildungsfehler erkennen, beispielsweise ob die Probe verkippert ist. Ein abweichender Brechungsindex führt am äußeren Pupilleneband zu einem weißen Ring. Ob die Foci der Objektivse auch in axialer Richtung übereinstimmen, läßt sich anhand der Abbildung am CCD-Sensor ② beurteilen. Um größere Datensätze z. B. für 3D-Messungen mit Meßzeiten bis zu 45 min oder Phasenserien aufzunehmen, ist es wichtig, daß die Justage der Objektivse über diesen Zeitraum hinweg stabil bleibt. Temperaturschwankungen und Erschütterungen führen dazu, daß die Objektivse auseinander driften. Bislang mußten diese Verschiebungen während der Messung manuell nachkorrigiert werden. Um

eine Dejustage der Objektive während einer Messung zu verhindern, wurde eine automatische Regelung aufgebaut. Eine Laserdiode ④ der Wellenlänge  $\lambda = 780\text{ nm}$  wird verwendet, um einen Hilfsstrahl in das 4Pi-Modul einzukoppeln. Der Strahlengang ist in Abbildung 3.2 rot dargestellt. Der IR-Strahl wird am Dichroid reflektiert und über den Strahlteilerwürfel in das 4Pi-Modul eingekoppelt. Der Strahl, der das 4Pi-Modul durchlaufen hat und wieder in den gezeigten Aufbau gelangt, wird auf eine Photodiode ③ gelenkt, vor der eine Lochblende angebracht ist. Der Aufbau wurde so justiert, daß das Licht, welches auf die Photodiode trifft, maximal wird, wenn die Foci der Objektive in allen drei Raumrichtungen übereinstimmen. Während einer Messung gewährleistet kontinuierliches Nachregeln, daß sich der 4Pi-Aufbau während der Dauer der Messung nicht dejustiert. Die Genauigkeit, mit der die Regelung die optimale Position hält, beträgt etwa 20 nm und ist damit genauer als eine manuelle Einstellung anhand des Interferenzmusters in der Pupille ④.

Für Messungen mit 1-Photonen-Anregung ist es aufgrund des Farblängsfehlers der eingesetzten Objektive insbesondere bei kurzen Wellenlängen notwendig, die Regelung für die entsprechende Anregungswellenlänge zu optimieren. Der Fokus wird in  $z$ -Richtung so eingestellt, daß eine PSF mit möglichst niedrigen Nebenmaxima erzielt wird.

Während einer 3D-Messung muß zusätzlich noch sichergestellt werden, daß sich die Phase nicht ändert, da sonst eine Entfaltung mit einer ortsunabhängigen PSF fehlschlägt. Dazu wird die Phase während der Aufnahme an Strukturen, die kleiner als die Auflösungsgrenze sind, manuell eingestellt.

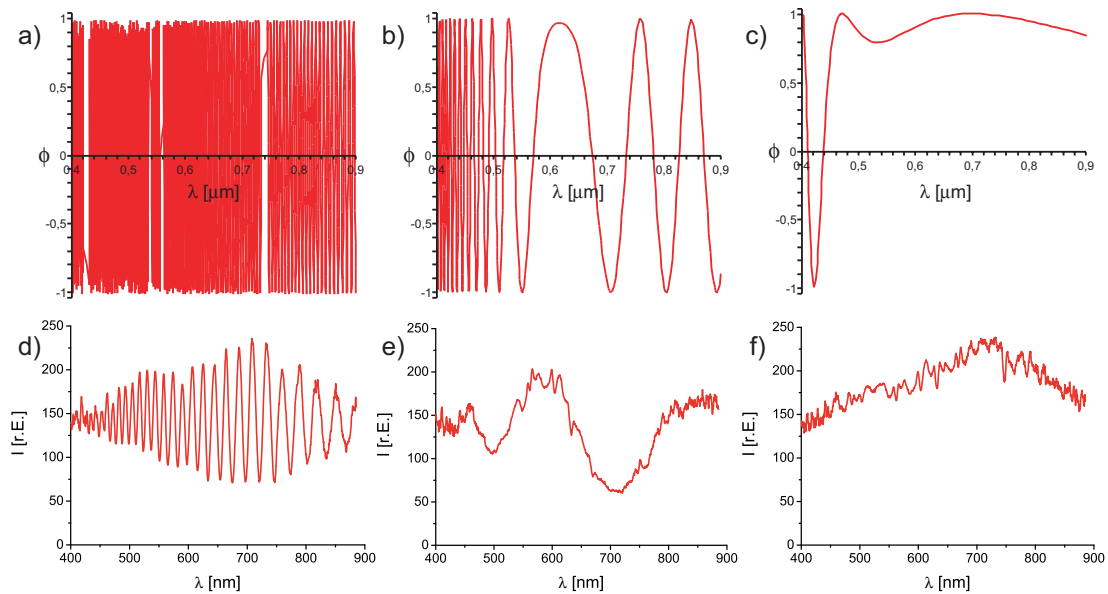
Eine Möglichkeit, den 4Pi-Aufbau zukünftig weiter zu vereinfachen, indem auch die Phaseneinstellungen für 2-Photonen-Anregung im Typ C automatisch vorgenommen wird, ist in Kap. 6.2 aufgezeigt.

## 3.6 Dispersionsabgleich

Für Messungen im Typ C-Modus, d.h. kohärente Superposition des Fluoreszenzlichts am Strahlteiler, muß die optische Weglänge in beiden Armen des 4Pi-Moduls auf wenige  $\mu\text{m}$  genau abgeglichen werden. Der optische Weglängenunterschied OPD, der aufgrund der Dispersion wellenlängenabhängig ist, ergibt sich als Summe der Luft- und Glaswege in beiden Armen:

$$\text{OPD}(\lambda) = \sum n_i(\lambda)d_i. \quad (3.1)$$

Die in beiden Armen eingebauten Objektive bzw. Linsen besitzen aufgrund von Fertigungstoleranzen geringfügig unterschiedliche Glasdicken. Die Glasdickendifferenz kann durch Verschieben eines Spiegels in einem Interferometerarm ausgeglichen werden, d.h. die unterschiedliche Weglänge, die im Glas durchlaufen wird, wird durch Änderung der Luftweglänge,  $n_{\text{Luft}}(\lambda)\Delta_{\text{Luft}}$ , korrigiert. Dadurch



**Abbildung 3.8.** a) Berechneter Phasengang für einen Wellenlängenbereich von  $\lambda = 400 \text{ nm}$  bis  $\lambda = 900 \text{ nm}$  bei nicht abgeglicherer Dispersion. Die Phase zeigt starke Oszillationen, so daß sich bei Superposition benachbarter Wellenlängen verschiedene Phasen überlagern. b) Phasenverhalten für teilweisen Dispersionsabgleich um  $600 \text{ nm}$ . Die Frequenz der Oszillationen nimmt ab. c) Phasenverhalten für abgeglichene Dispersion. Die Phase ist über einen Wellenlängenbereich von  $450 \text{ nm}$  bis über  $850 \text{ nm}$  konstant. Für 2-Photonen-Anregung bei  $\lambda_{\text{exc}} = 820 \text{ nm}$  und einer Fluoreszenz bei  $\lambda_{\text{det}} = 525 \text{ nm}$  besitzen Anregung und Emission dieselbe Phase. d)–f) zeigen am Spektrometer gemessene Werte für verschiedene Einstellungen des Dispersionskeils.

wird die optische Weglänge aber nur für eine bestimmte Wellenlänge angepasst, da die Dispersion in Luft und Glas unterschiedlich ist.

Für Messungen im Typ C-Modus muss die optische Weglänge jedoch für die Bandbreite der Fluoreszenz angepasst werden. Andernfalls werden konstruktive und destruktive Phasen am Strahlteiler aufaddiert. Um die Phasen von Anregung und Detektion gezielt kontrollieren zu können, ist es von Vorteil, wenn die Dispersion für den kompletten Wellenlängenbereich abgeglichen ist. Insbesondere für 2-Photonen-Anregung können die entsprechenden Wellenlängen weit auseinander liegen (z. B.  $\lambda_{\text{exc}} = 820 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{\text{det}} = 525 \text{ nm}$ ).

Um die Dispersion abgleichen zu können, wurden in einen Interferometerarm zwei gegeneinander verschiebbare Glaskerle (hier BK7-Glas) eingesetzt. Die Gesamtdicke  $D$  ist die Summe aus Luftweg und Dicke  $d$  der verschiebbaren Kerle. In den zweiten Arm des 4Pi-Moduls wurde eine planparallele Glasplatte aus demselben Material mit gleicher mittlerer Dicke,  $d_{\text{platte}}$ , eingebaut. Dadurch kann die Dispersion für ein breites Band von mehreren  $100 \text{ nm}$  abgeglichen werden. Der dabei zu kompensierende Weglängenunterschied  $\text{OPD}_1$  (optical path difference) setzt sich aus der Differenz der Linsendicken in einem Arm und der Dicke der

planparallelen Platte im anderen Arm zusammen:

$$\text{OPD}_1 = \Delta_{\text{Linsen}} \cdot n_{\text{Linsen}} + d_{\text{Platte}} \cdot n_{\text{BK7}}. \quad (3.2)$$

Kompensiert wird dieser Fehler durch Verschieben eines Spiegels (S2 in Abbildung 3.1) in einem Arm des 4Pi-Moduls und Änderung der BK7-Glasdicke und es ergibt sich der Korrekturterm  $\text{OPD}_2$ :

$$\text{OPD}_2 = n_{\text{Luft}}(D - d) + n_{\text{BK7}} \cdot d_{\text{BK7}} + n_{\text{Luft}} \cdot \Delta_{\text{Luft}}. \quad (3.3)$$

Der gesamte optische Weglängenunterschied OPD ist gegeben durch die Differenz der beiden Terme. Die Phasenänderung beträgt:

$$\Phi = \sin\left(\frac{\text{OPD}}{\lambda}\right). \quad (3.4)$$

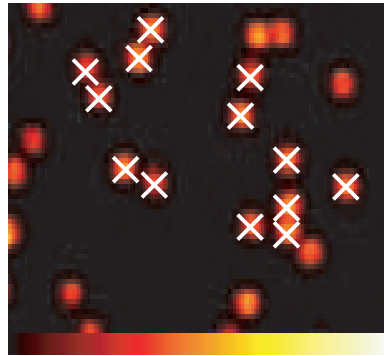
Ohne Dispersionsabgleich oszilliert die Phase für kleine Änderungen der Wellenlänge sehr stark. Es ist kein Interferenzmuster an am CCD-Sensor ① (vgl. Abb. 3.2) sichtbar, da sich konstruktive und destruktive Phasen innerhalb der Fluoreszenzbandbreite aufheben. Abbildung 3.8a zeigt das Phasenverhalten für einen Wellenlängenbereich von 400 nm bis 900 nm ohne Korrektur der Glasdickenunterschiede durch den Dispersionskeil.

Mit zunehmend besserem Dispersionsabgleich nimmt die Frequenz der Oszillationen ab. Abbildung 3.8b zeigt einen Dispersionsabgleich für Wellenlängen um 600 nm. Für Laserlicht und ausreichend schmalbandiges Fluoreszenzlicht wird ein Interferenzmuster sichtbar. Für kürzere Wellenlängen oszilliert die Phase deutlich schneller, da der Brechungsindex in diesem Bereich stärker ansteigt. Abbildung 3.8c zeigt einen Dispersionsabgleich für einen Bereich von 450 nm bis 900 nm. Auch bei 2-Photonen-Anregung besitzen Anregungslicht und Fluoreszenzlicht die selbe Phase.

Zur experimentellen Bestätigung der Theorie wurden Messungen für verschiedene Einstellungen des Dispersionskeils Spektrometer ⑤ durchgeführt (Abb. 3.8d–f). Das gemessene Verhalten stimmt mit den theoretischen Erwartungen sehr gut überein.

### 3.7 Fehlerbetrachtung

Beispielhaft wurden die Fehler, die sich bei der Auswertung der Nebenmaxima und der Halbwertsbreiten ergeben, an einer 3D-Messung von Yellow-Green Beads bestimmt. Die Beads besitzen laut Herstellerangaben einen Durchmesser von  $(100 \pm 5)$  nm. Theoretisch werden bei einer Anregungswellenlänge von 780 nm und einer Fluoreszenz bei 525 nm eine Halbwertsbreite von  $(105 \pm 4)$  nm und



**Abbildung 3.9.** 3D-Messung an Yellow-Green Beads mit einem Durchmesser von 100 nm.

Nebenmaxima von 2,6% im Linienprofil erwartet. Aus den Messungen an 13 Beads in Abbildung 3.9 ergibt sich eine Halbwertsbreite von  $(113 \pm 5)$  nm und eine Höhe der Nebenmaxima von  $(5,4 \pm 0,7)$  %. Die Abweichung der Halbwertsbreite wird durch verschiedene Ursachen hervorgerufen wie z. B. Ungenauigkeiten in der  $z$ -Kalibrierung, mechanische Schwingungen, usw. Im Gegensatz dazu sind residuale Aberrationen die Hauptursache dafür, daß die Intensitäten der Nebenmaxima höher sind, als in der Theorie. Die Standardabweichung beträgt für die Halbwertsbreite etwa 5 % und für die Nebenmaxima knapp über 10 %. Diese Schwankungen erklären sich durch Rauschen des Signals und des Detektors sowie durch Einflüsse aufgrund des Meßrasters etc. Bei den in dieser Arbeit vorgestellten Messungen werden die Fehler im allgemeinen ebenfalls etwa 10 % der angegebenen Werte betragen, diese sind jedoch für die Bildgebung unbedeutend. Aus diesem Grund wird im Folgenden auf weitere Fehlerbetrachtungen verzichtet.





# Kapitel 4

## 1-Photonen 4Pi-Mikroskopie im Typ C

Bislang mußte in der 4Pi-Mikroskopie 2-Photonen-Anregung verwendet werden, um die Nebenmaxima unter 50 % zu reduzieren und entfaltbare Daten zu erzielen. 2-Photonen-Anregung führt, aufgrund von Prozessen höherer Ordnung, deren Wahrscheinlichkeit mit der Laserintensität stark zunimmt, zu stärkerem Bleichen, d. h. zur irreversiblen Zerstörung des Fluoreszenzmoleküls [12].<sup>1</sup> Bei 2-Photonen-Anregung ist die Bleichrate etwa zehn Mal höher als bei Anregung der Fluoreszenz durch 1-Photonen-Übergänge, entsprechend höher ist daher die Effizienz der meisten Fluoreszenzfarbstoffe bei 1-Photonen-Anregung [40].<sup>2</sup> Aufgrund der höheren Effizienz und des vereinfachten Aufbaus (da auf einen kostenintensiven 2-Photonen-Laser verzichtet werden kann), ist es wünschenswert, wenn 4Pi-Mikroskopie mit 1-Photonen-Anregung durchgeführt werden könnte. Allerdings sind die Nebenmaxima in 1-Photonen 4Pi-Mikroskopie vom Typ C aus zweierlei Gründen höher als bei 2-Photonen-Anregung: Der Zweiphotonen-Effekt reduziert die Nebenmaxima aufgrund des nicht-linearen Anregungsprozesses. Hinzu kommt im Typ C das ungünstigere Verhältnis von Anregungs- zu Detektionswellenlänge (Stokes-Verschiebung) bei 1-Photonen-Anregung.

Um dennoch 4Pi-Mikroskopie mit 1-Photonen-Anregung zu ermöglichen, gibt es bereits Vorschläge, die darauf abzielen, die Nebenmaxima im 1-Photonen-Modus zu reduzieren. So wurde von Martínez-Corral vorgeschlagen, Pupillenfilter in der Beleuchtung einzusetzen [35]. Durch die Verwendung eines Phasenfilters im Beleuchtungsstrahlengang können die Nebenmaxima in einem 4Pi-Mikro-

---

<sup>1</sup>In Proben, die mehrere  $\mu\text{m}$  dick sind (z. B. Gewebeschnitte) kann 2-Photonen-Anregung von Vorteil sein, da die Anregung - und damit auch die Bleichprozesse - auf den Focus beschränkt sind. Bei dünnen Proben überwiegen die Nachteile durch die erhöhte Bleichrate.

<sup>2</sup>Eine Ausnahme stellen QDots dar, mit denen auch in 2-Photonen 4Pi-Mikroskopie ein sehr gutes Signal erzielt werden kann [36]. Diese werden jedoch aufgrund ihrer Größe üblicherweise nicht in biologischen Anwendungen eingesetzt.

skop mit 1-Photonen-Anregung theoretisch auf 7% des Hauptmaximums reduziert werden.<sup>3</sup> Der Phasenfilter besteht aus sieben konzentrischen Ringen, die jeweils abwechselnd eine Phasenverschiebung um 0 bzw.  $\pi$  verursachen. Dadurch werden die Nebenmaxima der Anregungs-PSF axial verschoben, so daß bei kohärenter Detektion des Fluoreszenzlichts, die Multiplikation von Anregungs- und Detektions-PSF (analog zum Effekt der Stokes-Verschiebung) zu niedrigen Nebenmaxima führt. Dieser Vorschlag wurde bisher nur für 2-Photonen-Anregung realisiert, da die Pupillenfilter zu einem  $z$ -Profil führen, welches signifikante Beiträge außerhalb des Focus besitzt [6]. Das damit verbundene verstärkte Bleichen außerhalb des Focus kann durch 2-Photonen-Anregung auf ein tolerables Maß reduziert werden. Ein weiterer Vorschlag ist, stimulierte Emission zu verwenden, um die Nebenmaxima zu reduzieren [21]. In STED-4Pi soll der konstruktiven 4Pi-PSF eine zweite PSF mit destruktiver Phase überlagert werden, so daß durch stimulierte Emission die Moleküle in den Bereichen der Nebenmaxima abgeregt werden. Dadurch beschränkt sich der Bereich, aus dem Fluoreszenz detektiert wird, auf das Hauptmaximum. Dieser Vorschlag wurde bisher noch nicht experimentell realisiert. Bislang ist es nur mit den selten verwendeten Glyzerinobjektiven und speziellen Farbstoffen mit hoher Stokes-Verschiebung gelungen, Nebenmaxima in einem 1-Photonen 4Pi-Mikroskop mit kohärenter Detektion des Fluoreszenzlichts (Typ C) unter 50% zu reduzieren [6].

In diesem Kapitel wird untersucht, ob die ultra-hochaperturigen Objektive 4Pi-Mikroskopie mit effizienter 1-Photonen-Anregung ermöglichen. Die hier vorgestellten Ergebnisse wurden in [28] veröffentlicht.

## 4.1 Eigenschaften von 1-Photonen 4Pi Typ C

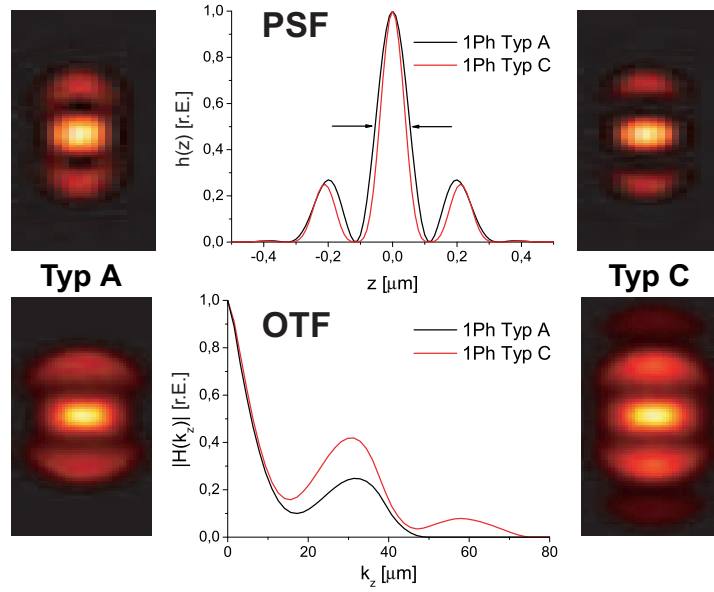
Bei 1-Photonen 4Pi-Mikroskopie vom Typ C wird das Fluoreszenzlicht kohärent detektiert, daher enthält auch die Detektions-PSF den Interferenzterm  $\vec{E}_{\text{det}}(\vec{r}) + \hat{M}\vec{E}_{\text{det}}(\hat{M}\vec{r})$  und es ergibt sich für die Gesamt-PSF:

$$\begin{aligned} h_{4\text{PiTyp C}}^{\text{1ph}}(\vec{r}) &= h_{\text{exc}4\text{Pi}}^{\text{1ph}}(\vec{r}) \cdot h_{\text{det}4\text{Pi}}(\vec{r}) \\ &= |\vec{E}_{\text{exc}}(\vec{r}) + \hat{M}\vec{E}_{\text{exc}}(\hat{M}\vec{r})|^2 \cdot |\vec{E}_{\text{det}}(\vec{r}) + \hat{M}\vec{E}_{\text{det}}(\hat{M}\vec{r})|^2 \otimes \vec{l}(\vec{r}). \end{aligned} \quad (4.1)$$

Der Term für die Detektion unterscheidet sich vom Anregungsterm durch die unterschiedliche Wellenlänge. Diese Wellenlängenverschiebung wird „Stokes-Verschiebung“ genannt. In Abbildung 4.1 werden berechnete PSFs und entsprechende Linienprofile  $h(z)$  in Typ A und in Typ C für  $\lambda_{\text{exc}} = 488 \text{ nm}$  und  $\lambda_{\text{det}} = 520 \text{ nm}$  ( $\text{NA} = 1,46$ ,  $n = 1,518$ ) verglichen. Aufgrund der kleinen Stokes-Verschiebung sind die Nebenmaxima im Typ C nur minimal niedriger als im

---

<sup>3</sup>Die in [35] vorgestellten Berechnungen wurden für  $\lambda_{\text{exc}} = 350 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{\text{det}} = 440 \text{ nm}$  und  $\text{NA} = 1,40$  durchgeführt.



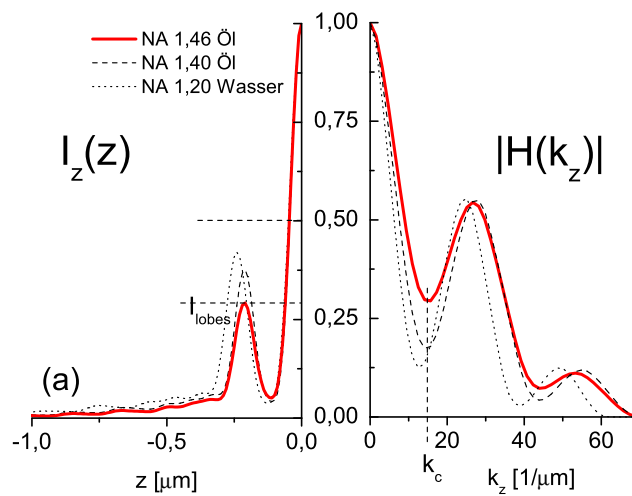
**Abbildung 4.1.** Vergleich der berechneten Linienprofile für 1-Photonen 4Pi Typ A (schwarz) mit 1-Photonen 4Pi-Typ C (rot) bei geringer Stokes-Verschiebung ( $\lambda_{\text{exc}} = 488 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{\text{det}} = 520 \text{ nm}$ ). Die kohärente Detektion führt zu verbreiterten Minima in der PSF und zu einer höheren axialen Auflösung von 86 nm im Vergleich zu 108 nm im Typ A. Dies spiegelt sich in der OTF durch höhere Ortsfrequenzen im Typ C wider. ( $2\rho = 0,5 \text{ AU}$ ,  $NA = 1,46$ ,  $n = 1,515$ ).

Typ A. Jedoch reduziert die kohärente Superposition des Fluoreszenzlichts die axiale Halbwertsbreite des Linienprofils von 108 nm im Typ A, auf 86 nm im Typ C. Die kohärente Detektion des Fluoreszenzlichts führt zu einer etwa 20% höheren axialen Auflösung. Die untere Zeile in Abbildung 4.1 zeigt die zugehörigen OTFs. Entsprechend der höheren Auflösung werden im Typ C höhere Ortsfrequenzen übertragen, als im Typ A. Die OTF ist im Typ C bei  $k_{\text{max}} = 67 \mu\text{m}^{-1}$  auf 3% ihrer ursprünglichen Höhe abgesunken. Im Typ A ist das bereits bei  $k_{\text{max}} = 44 \mu\text{m}^{-1}$  der Fall.

Abbildung 4.2 vergleicht die  $z$ -Profile  $I_z(z)$ , mit

$$I_z = \int h_{4\text{PiTypA}}^{1\text{Ph}}(\vec{r}) \, dx \, dy, \quad (4.2)$$

für Ölimmersionsobjektive mit einer numerischen Apertur von 1,40 bzw. 1,46 und Wasserimmersionsobjektive mit  $NA = 1,20$ . Das Glyzerinobjektiv mit  $NA = 1,35$  verhält sich fast identisch wie das Ölobjektiv mit  $NA = 1,40$ . Für die theoretischen Berechnungen wurde  $n = 1,515$  für Öl und  $n = 1,333$  für Wasser angenommen, sowie 488 nm als Anregungs- und 605 nm als Detektionswellenlänge. Die Abbildung zeigt, daß die Nebenmaxima im  $z$ -Profil bei höherer numerischer Apertur weniger ausgeprägt sind. Ihre Intensität sinkt von 43% des Hauptmaxi-



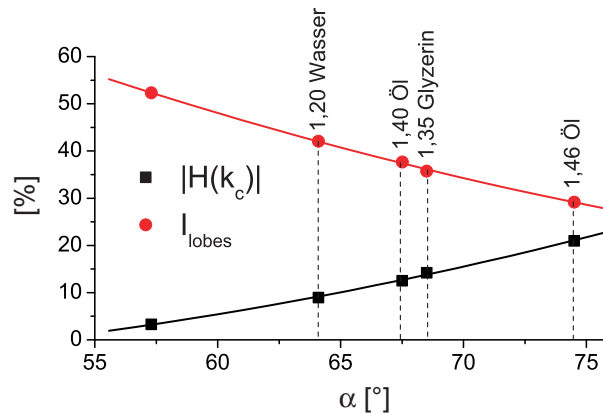
**Abbildung 4.2.** Auf der linken Seite sind die theoretischen  $z$ -Profile  $I_z(z)$  für die Objektive mit  $NA = 1,2$  (Wasser),  $NA = 1,4$  (Öl) und  $NA = 1,46$  (Öl) dargestellt. Mit Zunahme des Öffnungswinkels von  $68^\circ$  auf  $74^\circ$  nimmt die Intensität des ersten Nebenmaximums  $I_{\text{lobes}}$  um 7% ab und liegt bei 30%. Auf der rechten Seite sind die zugehörigen OTFs  $|H(k_z)|$  abgebildet. Die Berechnungen wurden für  $\lambda_{\text{exc}} = 488 \text{ nm}$  und  $\lambda_{\text{det}} = 605 \text{ nm}$  durchgeführt.

mums für Wasserobjektive, auf 29% für Ölobjektive mit  $NA = 1,46$ . Die Nebenmaxima liegen damit theoretisch bereits für Wasserobjektive unterhalb der kritischen 50%-Grenze. Allerdings führen in Experimenten residuale Aberrationen erfahrungsgemäß zu etwa 10–15% höheren Nebenmaxima. Auf der rechten Seite von Abbildung 4.2 sind die dazugehörigen OTFs abgebildet. Hohe Nebenmaxima in der PSF spiegeln sich in niedrigeren Werten der OTF an der „kritischen“ Frequenz  $k_c$  wider. Die OTF kann bei  $k_c$  durch die hochaperturigen Objektive um 7% auf 30% angehoben werden. Dadurch ist die Entfaltbarkeit der gemessenen Daten sichergestellt.

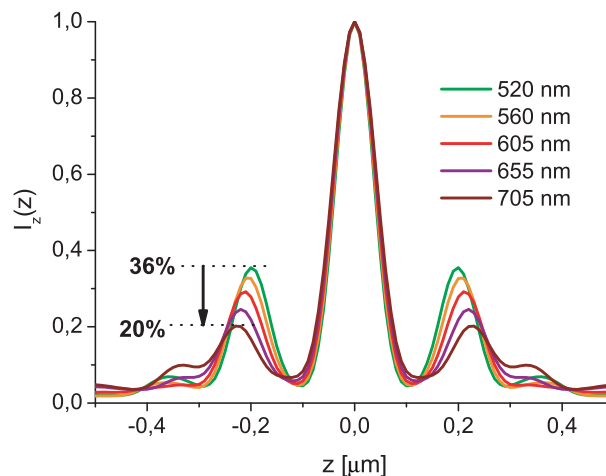
In Abbildung 4.3 sind die Intensität der Nebenmaxima  $I_{\text{lobes}}$  (in % des Hauptmaximums), sowie  $|H(k_c)|$  in Abhängigkeit vom Öffnungswinkel  $\alpha$  der Objektive dargestellt.  $I_{\text{lobes}}$  und  $|H(k_c)|$  zeigen ein gegenläufiges Verhalten. Mit zunehmendem Öffnungswinkel steigt der Wert an der kritischen Frequenz, während die Intensität der Nebenmaxima abnimmt.

In 4Pi-Mikroskopie vom Typ C reduziert die Stokes-Verschiebung zwischen Anregung und Detektion die Nebenmaxima. Das Verhältnis von Anregungs- und Detektionswellenlänge wird mit

$$\kappa = \frac{\lambda_{\text{exc}}}{\lambda_{\text{det}}} \quad (4.3)$$

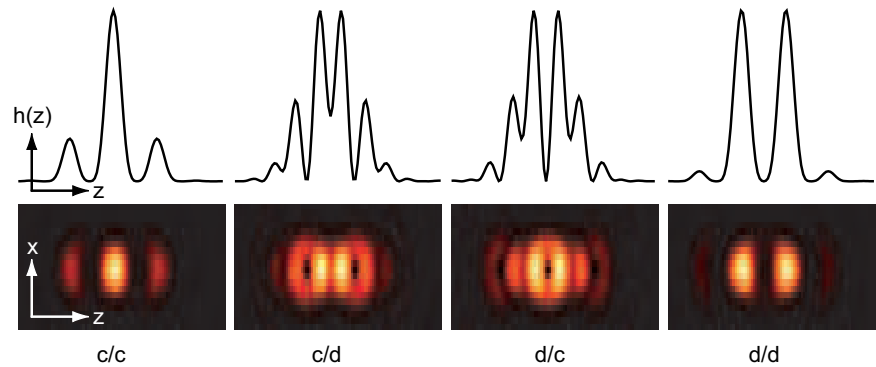


**Abbildung 4.3.** Intensität der Nebenmaxima  $I_{lobes}$  in Abhängigkeit des Semiaperturwinkels  $\alpha$  in % des Hauptmaximums. Erwartungsgemäß nimmt die Höhe der Nebenmaxima mit zunehmendem  $\alpha$  ab. Im Gegenzug steigt der Wert von  $|H(k_c)|$  an der kritischen Frequenz  $k_c$  von 12 % für Wasser auf 30 % für Ölobjektive mit  $NA = 1,46$  an.



**Abbildung 4.4.**  $z$ -Profile  $I_z(z)$  für verschiedene Detektionswellenlängen. Die Anregung findet bei 488 nm statt, für die Emissionswellenlänge wurde 520 nm, 560 nm, 605 nm, 655 nm und 705 nm angenommen. Die Intensität der Nebenmaxima sinkt von etwa 36 % für  $\lambda_{det} = 520$  nm auf 20 % für  $\lambda_{det} = 705$  nm ( $NA = 1,46$ ;  $n = 1,515$ ;  $2\rho = 0,5$  AU).

angegeben. Für typische Fluoreszenzfarbstoffe liegt  $\kappa$  knapp unter 1 bei 1-Photonen-Anregung. Für Rhodamin 6G (525 nm/555 nm) oder FITC (494 nm/518 nm) zum Beispiel beträgt  $\kappa = 0,94$ . Bei 2-Photonen-Anregung mit  $\lambda_{exc} = 820$  nm ist das Verhältnis von Anregungs- zu Detektionswellenlänge für FITC dagegen  $\kappa = 1,6$ , so daß die Nebenmaxima der Anregung besser mit den Minima der Detektion zusammenfallen (vgl. Kapitel 6.1). Aus diesem Grund ist bei kohärenter Detektion die Reduktion der Nebenmaxima für 2-Photonen-Anregung deutlich effektiver als bei 1-Photonen-Anregung. Es gibt jedoch auch

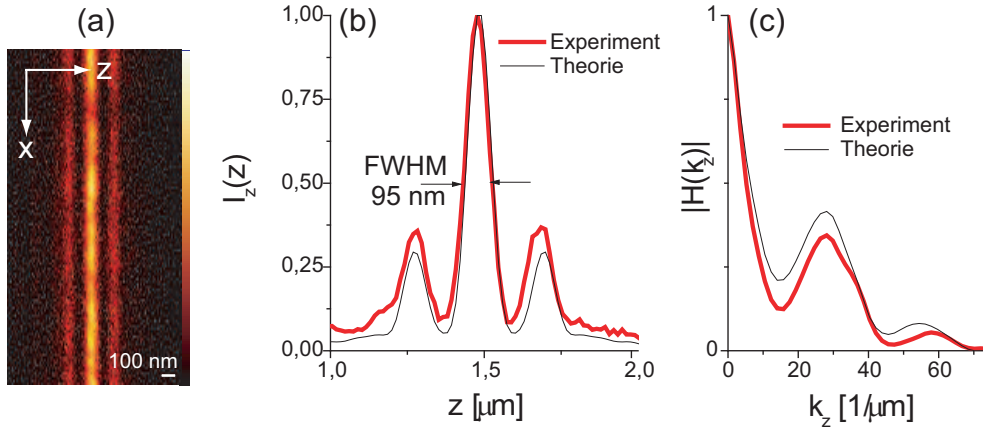


**Abbildung 4.5.** Normierte PSFs und Linienprofile  $h(z)$  für verschiedene Phasen von Anregung und Detektion im 4Pi-Mikroskop (Typ C) mit 1-Photonen-Anregung. ( $\lambda_{\text{exc}} = 488 \text{ nm}$ ;  $\lambda_{\text{det}} = 520 \text{ nm}$ ;  $NA = 1,46$ ;  $n = 1,518$ ;  $2\rho = 0,5 \text{ AU}$ .)

Farbstoffe, die hinsichtlich einer hohen Stokes-Verschiebung bei 1-Photonen-Anregung optimiert wurden. So besitzt der Farbstoff DY485-XL (Dyomics GmbH, Jena) (485 nm/560 nm) ein  $\kappa$  von 0,87. QDots können über einen sehr breiten Bereich angeregt werden und bieten ebenfalls die Möglichkeit, die Nebenmaxima zu reduzieren.

Abbildung 4.4 zeigt den Einfluss der Emissionswellenlänge auf die Höhe der Nebenmaxima im  $z$ -Profil  $I_z(z)$  für Ölimmersionsojektive mit  $NA = 1,46$ . Die Anregungswellenlänge beträgt für alle Kurven 488 nm. Die Nebenmaxima sinken von 36 % für  $\lambda_{\text{det}} = 520 \text{ nm}$  ( $\kappa = 0,9$ ) auf 20 % für eine Emission bei  $\lambda_{\text{det}} = 755 \text{ nm}$  ( $\kappa = 0,6$ ). Abbildung 4.4 zeigt, daß mit den hier verwendeten Objektiven, die Nebenmaxima im  $z$ -Profil auch bei kleinen Stokes-Verschiebungen deutlich unter 50 % liegen, so daß auch konventionelle Fluoreszenzfarbstoffe eingesetzt werden können. Für eine höhere Reserve gegenüber Aberrationen können die Nebenmaxima reduziert werden, indem spezielle Farbstoffe mit hoher Stokes-Verschiebung eingesetzt werden.

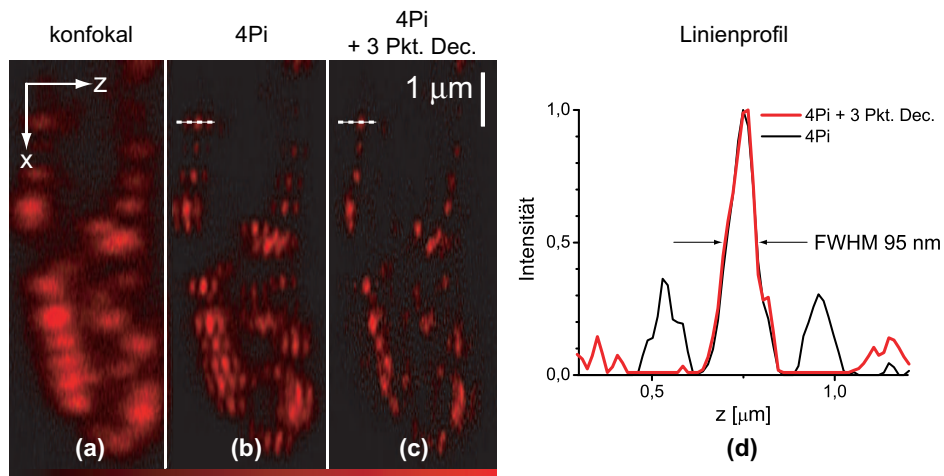
Da Anregung und Detektion kohärent überlagert werden, gibt es in 1-Photonen 4Pi-Mikroskopie vom Typ C verschiedene PSFs, je nach Phasenlage von Anregung und Detektion. Die normierten PSFs und Linienprofile für konstruktive Beleuchtung und konstruktive Detektion (c/c), konstruktive Beleuchtung und destruktive Emission (c/d), destruktive Beleuchtung und konstruktive Emission (d/c) sowie für destruktive Beleuchtung und destruktive Emission (d/d) sind in Abbildung 4.5 dargestellt. Für Messungen mit 1-Photonen 4Pi Typ C müssen Anregungslicht und Detektionslicht jeweils konstruktiv interferieren (c/c), da die OTFs (nicht gezeigt) von (d/c) und (d/d) ausgeprägte Minima aufweisen und daher nur dieser Fall entfaltetbar ist.



**Abbildung 4.6.**  $z$ -Profile gemessen mit 1-Photonen 4Pi Typ C an einem Monolayer aus QDots ( $\lambda_{\text{exc}} = 568 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{\text{det}} = 605 \text{ nm}$ ). (a) zeigt einen  $xz$ -Schnitt durch die QDot-Schicht. Das daran bestimmte  $z$ -Profil (b, rot) zeigt eine gute Übereinstimmung mit der theoretischen Kurve (b, schwarz). Die entsprechenden OTFs sind in (c) gezeigt. An  $k_c$  liegt die aus der Messung ermittelte OTF mit  $|H(k_c)| > 12\%$  deutlich über Null.

## 4.2 Messungen an technischen und biologischen Proben

Zur Überprüfung der im vorherigen Abschnitt vorgestellten theoretischen Erwartungen wurden Messungen zunächst an einer dünnen Schicht aus rot fluoreszierenden QDots (QDot605 Streptavidin, Invitrogen, Karlsruhe) durchgeführt. Die QDots wurden mit einer Wellenlänge von 488 nm angeregt. Abbildung 4.6 zeigt den gemessenen  $xz$ -Schnitt durch die QDot-Schicht (a), an dem das  $z$ -Profil bestimmt wurde. Das experimentelle  $z$ -Profil ist zusammen mit einem für dieselben Werte berechneten theoretischen  $z$ -Profil in (b) dargestellt. Die experimentell ermittelten Nebenmaxima im  $z$ -Profil betragen 37%. Aufgrund von residualen Aberrationen liegen sie 7% über den theoretischen Werten. Die Halbwertsbreite wurde an der QDot-Schicht zu 95 nm bestimmt. Für die verwendeten Wellenlängen ergibt sich eine theoretische Halbwertsbreite von 91 nm. Damit sind Theorie und Messung in guter Übereinstimmung. Die Auflösung ist damit verglichen mit einem Konfokalmikroskop etwa um einen Faktor vier höher. Durch Fouriertransformation wurden die zugehörigen OTFs ermittelt. Die experimentelle OTF liegt erwartungsgemäß knapp unterhalb der theoretischen OTF. An der kritischen Frequenz  $k_c$  ist die theoretische OTF auf 21% des Wertes im Ursprung abgefallen, während der Wert der experimentellen OTF an der kritischen Frequenz 12% beträgt. Da die experimentelle OTF an  $k_c$  damit ausreichend über Null liegt, sind die in Typ C mit 1-Photonen-Anregung gemessenen Daten entfaltbar.



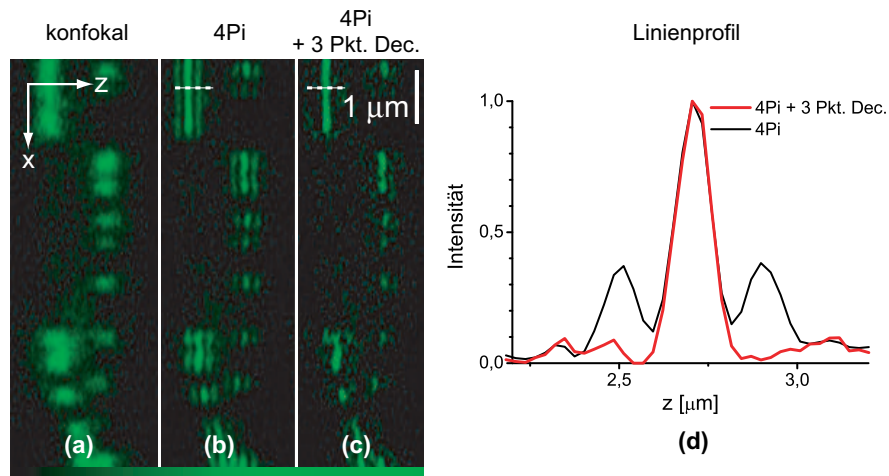
**Abbildung 4.7.** Mit Dy485-XL gefärbte Mikrotubuli, die bei einer Anregungswellenlänge von 488 nm im konfokalen Modus (a) und im 4Pi Typ C Modus (b) aufgenommen wurden. Die Intensität der Nebenmaxima beträgt 35 % des Hauptmaximums. Das Ergebnis nach einer Dreipunktentfaltung ist in (c) gezeigt. Das Liniensprofil durch das markierte Mikrotubuli (d) zeigt eine axiale Auflösung von 95 nm.

Um die Anwendbarkeit von 4Pi Typ C mit linearer Fluoreszenzanregung auch in biologischen Proben zu untersuchen, wurden Mikrotubuli in Säugetierzellen (PtK2-Zellen) mit dem organischen Farbstoff DY485-XL (Dyomics GmbH, Jena, Deutschland) gefärbt und in 97 % TDE eingebettet. Der DY485-XL-Farbstoff zeichnet sich durch seine große Stokes-Verschiebung aus.

Abbildung 4.7 zeigt einen  $xz$ -Schnitt, der zunächst im konfokalen-Modus (a) und anschließend im 4Pi Typ C-Modus aufgenommen wurde (b), sowie das Ergebnis der 4Pi-Messung nach Dreipunktentfaltung (c). Für die konfokale und die 4Pi-Messung wurde eine Anregungswellenlänge von 488 nm verwendet. Die Phase ist über das Bild hinweg konstant und an Stellen, die ober- bzw. unterhalb des Zellkerns liegen, wird keine Phasenverschiebung beobachtet. Durch eine Dreipunktentfaltung können die Nebenmaxima zufriedenstellend entfernt werden. Die Mikrotubuli sind in der 4Pi-Aufnahme deutlich feiner aufgelöst als in der konfokalen Vergleichsmessung. Ein Liniensprofil durch einen Mikrotubulus an der gestrichelt markierten Stelle ist in (d) dargestellt. Die Nebenmaxima liegen bei 35 % und werden durch die Entfaltung vollständig entfernt. Die axiale Halbwertsbreite des zentralen Maximums beträgt 95 nm. Die Auflösung ist, verglichen mit der konfokalen Messung, um einen Faktor 4–5 höher. Werden lineare oder nichtlineare Entfaltungsmethoden eingesetzt, sollte die Auflösung dieser Abbildung auf ca. 70 nm gesteigert werden können.

Um zu überprüfen, ob auch für konventionelle Farbstoffe, d. h. bei kleiner Stokes-Verschiebung, die Nebenmaxima in biologischen Proben im 1-Photonen Typ C-Fall unter 50 % liegen, wurden Messungen an Mikrotubuli durchgeführt, die



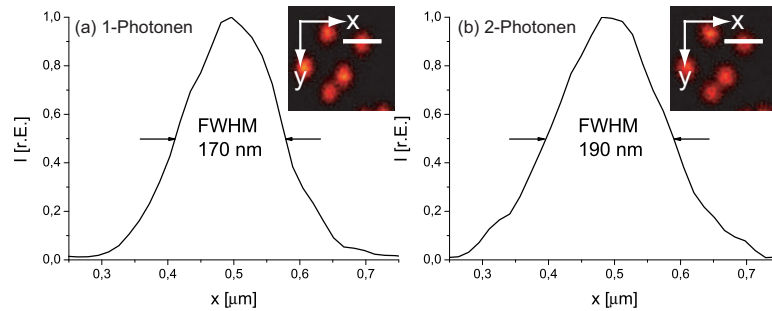


**Abbildung 4.8.** 1-Photonen 4Pi Typ C-Messung bei kleiner Stokes-Verschiebung. Die Mikrotubuli sind mit Alexa488 gefärbt. (a) zeigt die konfokale Vergleichsmessung, in (b) wurde dieselbe Stelle mit 4Pi Typ C aufgenommen. In beiden Fällen beträgt die Anregungswellenlänge 488 nm. Durch Dreipunktentfaltung (c) können die Nebenmaxima komplett entfernt werden. Das Linienprofil (d) besitzt Nebenmaxima von knapp 40 %.

mit Alexa488 fluoreszent markiert wurden. Die Stokes-Verschiebung beträgt für Alexa488  $\kappa = 0,94$  ( $\lambda_{\text{exc}} = 488 \text{ nm}/\lambda_{\text{det}} = 519 \text{ nm}$ ). In Abbildung 4.8 ist die konfokale Aufnahme (a) mit einer 4Pi-Aufnahme vor (b) und nach linearer Dreipunktentfaltung (c) verglichen. Es sind Mikrotubuli oberhalb und unterhalb des Zellkerns zu sehen, die jeweils die selbe Phase aufweisen. Das bedeutet, daß durch die Einbettung in TDE der Brechungsindex so gut angepaßt ist, daß auf der Größenskala der Kerndicke keine merkliche Phasenverschiebung auftritt. Dadurch kann für die Entfaltung der Datensätze eine konstante PSF angenommen werden. Nach Entfaltung (c) sind die Artefakte durch die Nebenmaxima vollständig entfernt. Das Linienprofil im Rohdatensatz durch einen Mikrotubulus (d) besitzt Nebenmaxima von 40 %. Diese liegen trotz geringer Stokes-Verschiebung unterhalb von 50 %. Das Linienprofil nach Dreipunktentfaltung (rot) zeigt, daß die Nebenmaxima zufriedenstellend entfernt werden können. Damit eröffnet sich die Möglichkeit zweifarbige 4Pi-Aufnahmen mit linearer Anregung durchzuführen.

Die theoretischen axialen und lateralen Auflösungen, die sich für ein punktförmiges Objekt ergeben wurden für die verschiedenen 4Pi-Typen mit 2-Photonen-Anregung und 1-Photonen-Anregung sowie für ein Konfokalmikroskop berechnet und in Tabelle 4.1 gegenübergestellt. Für die Berechnungen wurde für 1-Photonen-Anregung eine Anregungswellenlänge von 488 nm und für 2-Photonen-Anregung von 820 nm, sowie eine Detektionswellenlänge von 525 nm angenommen. Die Berechnungen erfolgten für lineare Polarisation der Beleuchtung und für nicht-polarisiertes Fluoreszenzlicht.

Aufgrund der kürzeren Anregungswellenlänge besitzt ein 4Pi-Mikroskop mit

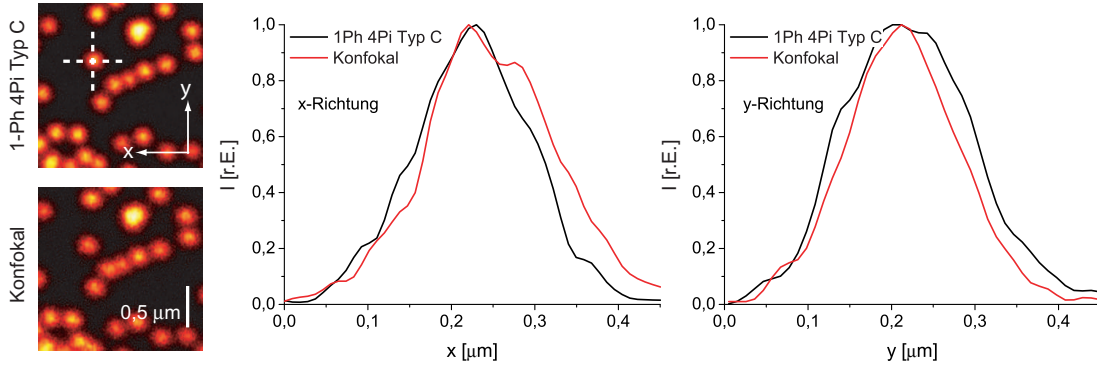


**Abbildung 4.9.** Gemessene Halbwertsbreiten an Yellow-Green-Beads ( $\varnothing = 100 \text{ nm}$ ) mit 1-Photonen Anregung (a) und 2-Photonen-Anregung (b). Die Messung mit 1-Photonen ( $\lambda_{\text{exc}} = 488 \text{ nm}$ ) zeigt eine laterale Auflösung von 170 nm, die Messung mit 2-Photonen ( $\lambda_{\text{exc}} = 780 \text{ nm}$ ) Anregung zeigt eine Auflösung in  $xy$ -Richtung von 190 nm. (Die Messung der Halbwertsbreite erfolgte senkrecht zur Polarisationsrichtung des Anregungslichts.)

linearer Fluoreszenzanregung eine höhere axiale und laterale Auflösung als ein 4Pi-Mikroskop mit 2-Photonen-Anregung des selben Typs. Die theoretische Berechnung ergibt eine laterale Auflösung von 160 nm bei 2-Photonen-Anregung (senkrecht zur Polarisationsrichtung).<sup>4</sup> Die laterale Auflösung eines 1-Photonen 4Pi-Mikroskops im Typ C beträgt 146 nm. Eine Messung zum Vergleich der lateralen Auflösungen für 1-Photonen- und 2-Photonen Anregung ist in Abbildung 4.9 dargestellt. Die Experimente wurden an Yellow-Green-Beads ( $\lambda_{\text{det}} = 520 \text{ nm}$ ) mit einem Durchmesser von 100 nm durchgeführt und zeigen eine laterale Halbwertsbreite von 190 nm bei 2-Photonen-Anregung ( $\lambda_{\text{exc}} = 780 \text{ nm}$ ) (b). Die Messung mit 1-Photonen-Anregung zeigt entsprechend den Erwartungen eine verbesserte laterale Auflösung von 170 nm (a). Die Diskrepanz zu den Theoriewerten ist mit dem Durchmesser der Yellow-Green-Beads und residualen Aberrationen zu erklären.

An den Werten aus Tabelle 4.1 läßt sich ablesen, daß bei linear polarisierter Beleuchtung die lateralen Auflösungen in  $x$ - und  $y$ -Richtung unterschiedlich sind. Senkrecht zur Polarisationsrichtung  $\vec{p}$  (im 4Pi-Aufbau in  $x$ -Richtung) ergeben sich höhere Auflösungen als parallel zur Polarisationsrichtung (in  $y$ -Richtung). Senkrecht zur Polarisationsrichtung sind die lateralen Auflösungen von Konfokalmikroskop und 4Pi-Mikroskop mit 1-Photonen-Anregung aufgrund der kürzeren Anregungswellenlänge erwartungsgemäß höher als die eines 4Pi-Mikroskops mit 2-Photonen-Anregung. Parallel zur Polarisationsrichtung ergeben die Berechnungen jedoch, daß die Auflösung des Konfokalmikroskops trotz der kürzeren Anregungswellenlänge geringer ist, als die eines 2-Photonen 4Pi-Mikroskops und somit alle 4Pi-Modi der konfokalen Messung überlegen sind. Begründen läßt sich dies dadurch, daß sich in einem 4Pi-Mikroskop die  $z$ -Komponenten, aufgrund der ge-

<sup>4</sup>Aufgrund des 2-Photonen-Effekts ist die Auflösung bei 2-Photonen-Anregung, verglichen mit 1-Photonen-Anregung bei derselben Anregungswellenlänge, höher.



**Abbildung 4.10.** Vergleich der lateralen Auflösung in  $x$ - und  $y$ -Richtung für eine konfokale Messung und mit 1-Photonen 4Pi Typ C. In Klammern stehen die Theoriewerte für eine Kugel mit  $\varnothing = 100$  nm. Es ergibt sich eine Halbwertsbreite in  $x$ -Richtung von 153 nm (141 nm) für 1-Photonen 4Pi Typ C und 160 nm (145 nm) für die konfokale Messung. In  $y$ -Richtung ergibt sich 155 nm (155 nm) für 1-Photonen 4Pi Typ C und 189 nm (181 nm) im konfokalen Fall. ( $\lambda_{\text{exc}} = 488$  nm;  $\lambda_{\text{det}} = 520$  nm;  $2\rho = 0,5$  AU)

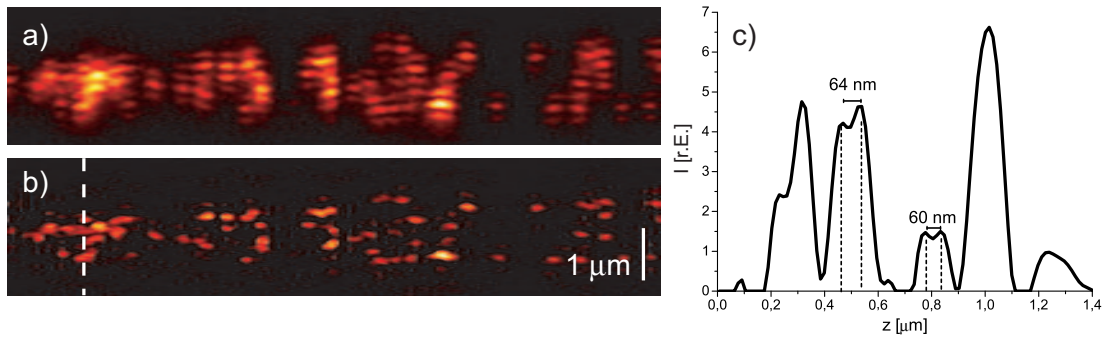
genläufigen Wellen, lateral auch außerhalb des Fokus auslöschen und somit die Halbwertsbreite der PSF reduzieren.

An Yellow-Green-Beads mit einem Durchmesser von 100 nm wurde geprüft, ob sich dieses Ergebnis auch experimentell bestätigen läßt. Dieselbe Stelle wurde zunächst im 4Pi Typ C-Modus und anschließend im konfokalen Modus gemessen. Die in Abbildung 4.10 dargestellten Halbwertsbreiten zeigen eine gute Übereinstimmung von Experiment und Theorie. In Klammern sind jeweils die entsprechenden theoretischen Halbwertsbreiten für einen Durchmesser von 100 nm angegeben. Die Messungen bestätigen, daß die Auflösung eines Konfokalmikroskops senkrecht zur Polarisationsrichtung höher ist, als parallel dazu. Insgesamt ergibt sich eine verbesserte Auflösung für ein 1-Photonen 4Pi-Mikroskop mit kohärenter Detektion (Typ C) nicht nur axial, sondern auch in lateraler Richtung.

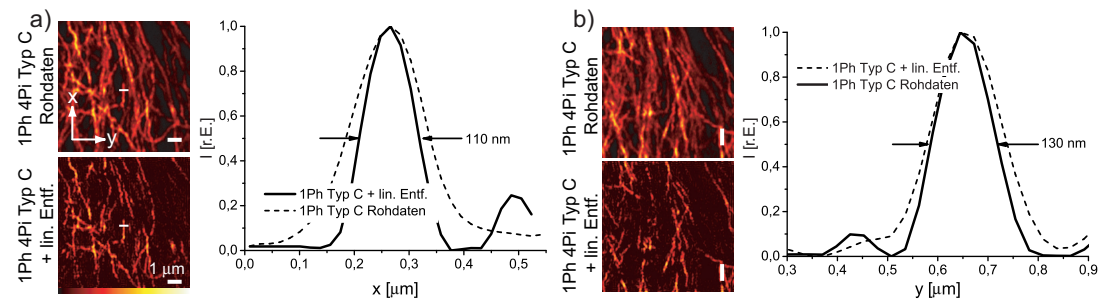
Aus Tabelle 4.1 ergibt sich, daß mit einem 4Pi-Mikroskop bei 1-Photonen An-

4Pi-Modus	axial	$\perp \vec{p}$	$\parallel \vec{p}$
1-Photonen konfokal	313 nm	136 nm	174 nm
1-Photonen 4Pi Typ A	109 nm	136 nm	150 nm
1-Photonen 4Pi Typ C	<b>83 nm</b>	<b>133 nm</b>	<b>146 nm</b>
2-Photonen 4Pi Typ A	131 nm	154 nm	166 nm
2-Photonen 4Pi Typ C	92 nm	149 nm	160 nm

**Tabelle 4.1.** Vergleich der axialen und lateralen Auflösungen für  $\lambda_{\text{exc}} = 488$  nm für 1-Photonen-Anregung, bzw.  $\lambda_{\text{exc}} = 820$  nm für 2-Photonen-Anregung und einer Fluoreszenzwellenlänge von  $\lambda_{\text{det}} = 525$  nm für ein punktförmiges Objekt. Axiale und laterale Auflösung sind für 1-Photonen 4Pi Typ C am höchsten.



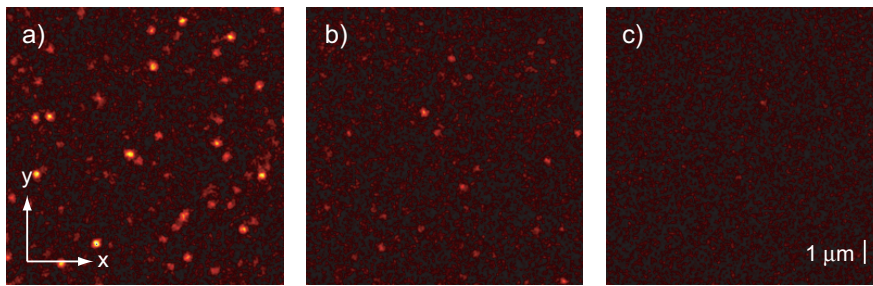
**Abbildung 4.11.** 1-Photonen 4Pi Typ C-Messung an Mikrotubuli, die mit DY485-XL gefärbt wurden, in einer PtK-2 Zelle. Der  $xz$ -Schnitt durch die Rohdaten (a) zeigt Nebenmaxima um 35%. Nach Entfaltung durch einen Wiener-Filter (b) werden die Nebenmaxima entfernt und es können Mikrotubuli mit einem Abstand von ca. 60 nm aufgelöst werden. c) zeigt das Profil durch die entfalteten Daten an der gestrichelt markierten Stelle.



**Abbildung 4.12.**  $xy$ -Schnitte des in Abbildung 4.11 in  $xz$ -Richtung dargestellten Datensatzes. Die Linienprofile wurden senkrecht (a) und parallel (b) zur Polarisationsrichtung an den markierten Stellen gemessen. Es ergibt sich vor Entfaltung eine Halbwertsbreite von 150 nm bzw. 160 nm. Nach Anwendung des Wiener-Filters kann die Auflösung auf 110 nm bzw. 130 nm reduziert werden. Theoretisch wird eine Auflösung von 133 nm in  $x$ -Richtung und 146 nm in  $y$ -Richtung erwartet.

regung im Typ C die höchste axiale Auflösung erzielt werden kann. Die kürzere Wellenlänge und die kohärente Detektion des Fluoreszenzlichts führen theoretisch zu einer axialen Halbwertsbreite von 83 nm im Linienprofil.

Um zu überprüfen, welche Auflösungen in biologischen Proben experimentell erzielt werden können, wurden Experimente an Mikrotubuli in PtK-2 Zellen durchgeführt, die mit DY485-XL gefärbt wurden. Abbildung 4.11 zeigt einen  $xz$ -Schnitt durch eine Zelle, der mit 1-Photonen 4Pi Typ C aufgenommen wurde. Die obere Abbildung (a) zeigt die Rohdaten vor der Entfaltung. Nach einer Entfaltung der Daten mit einem Wiener-Filter (b) sind die Nebenmaxima entfernt. Das Linienprofil durch die in (b) markierte Stelle zeigt, daß Mikrotubuli mit einem Abstand von 60 nm noch getrennt werden können. Dies ist die beste axiale Auflösung, die bisher mit einem 4Pi-Mikroskop erzielt wurde. Somit liefert 1-Photonen 4Pi



**Abbildung 4.13.** Proben mit primärem Antikörper (Anti- $\beta$ -Actin Clone) und sekundärem Antikörper (Carboxyl-Rhodamin) (a), nur mit sekundärem Antikörper (b), und eine Kontrollprobe ohne Sekundärantikörper (c).

Typ C von allen 4Pi-Methoden die höchste Auflösung.

Um die theoretischen Vorhersagen zur lateralen Auflösung in 1-Photonen 4Pi Typ C zu überprüfen, wurden Linienprofile in  $x$ - und  $y$ -Richtung im selben Datensatz ausgewertet. Abbildung 4.12a) zeigt ein Profil in  $x$ -Richtung, d. h. senkrecht zur Polarisationsrichtung. Die theoretische Erwartung beträgt 133 nm, experimentell ergeben sich 150 nm. Nach Entfaltung beträgt die Auflösung 110 nm. In  $y$ -Richtung, d. h. in Polarisationsrichtung ergibt sich eine experimentelle Halbwertsbreite von 160 nm und nach Entfaltung 130 nm. Theoretisch wird eine Halbwertsbreite von 146 nm erwartet.

Die experimentellen Ergebnisse stimmen gut mit den theoretisch erwarteten Werten überein. Durch lineare Entfaltung lässt sich die Auflösung in der Praxis um etwa 20 % – 30 % steigern.

## 4.3 Empfindlichkeit

Um die Empfindlichkeit eines 4Pi-Mikroskops mit linearer Fluoreszenzanregung zu prüfen, wurden Proben mit einzelnen Farbstoffmolekülen hergestellt. Dazu wurden Deckgläser für 30 min mit Poly-L-lysin inkubiert. Danach wurde Probe 1 mit 1:500 in 1%-igem BSA (Bovine Serum Albumin) verdünnten Primärantikörper (Anti- $\beta$ -Actin clone AC-15, Sigma, USA) für 1 h inkubiert. Dann wurde das Poly-L-Lysin für 30 min mit 10%-igem BSA blockiert, um zu verhindern, daß der Sekundärantikörper (Carboxyl-Rhodamin) an die Poly-L-Lysin-Schicht bindet. Anschließend wurde für 1 h der 1:50 in 1%-igem BSA verdünnte Sekundärantikörper auf die Probe gegeben. An einen Primärantikörper koppeln dabei etwa 8–16 Sekundärantikörper. Auf die zweite Probe wurde der 1:100 in 1%-igem BSA verdünnte Sekundärantikörper direkt auf die Poly-L-Lysin Schicht gegeben. Dadurch läßt sich eine Probe mit einzelnen Fluoreszenzfarbstoffen herstellen. Eine Kontrollprobe wurde analog zu Probe 1 hergestellt, allerdings ohne einen Sekundärantikörper hinzuzugeben. In dieser Probe sollte keine Fluoreszenz meßbar

sein. Die Fluoreszenz wurde bei einer Wellenlänge von 488 nm angeregt und mit einer APD detektiert. Die Ergebnisse für die drei verschiedenen Proben sind in Abbildung 4.13 gezeigt. Jeder Datensatz besteht aus  $256 \times 256$  Pixeln mit einer Größe von  $46 \text{ nm} \times 46 \text{ nm}$ . Jede Zeile wurde achtmal gemittelt und es wurden jeweils sechs Bilder akkumuliert. Das ergibt eine Messzeit von 15 s pro Bild. Das Signal-zu-Rausch-Verhältnis in (a) beträgt etwa 3.

Wie erwartet sind in Probe 2 alle Punkte annähernd gleich hell, während in Probe 1 einige deutlich hellere Punkte zu sehen sind und die Helligkeit stärker variiert. Die Kontrollmessung zeigt dagegen einen schwachen Untergrund, aber kaum Struktur. Die Messung an Probe 2 zeigt, daß 4Pi-Mikroskopie mit 1-Photonen-Anregung sensitiv genug ist, um einzelne Fluoreszenzmoleküle zu erfassen.

### Zusammenfassung

Die vorgestellten Messungen zeigen, daß mit einem 4Pi-Mikroskop mit 1-Photonen-Anregung im Typ C Nebenmaxima unter 50 % selbst in biologischen Proben erzielt werden können. Voraussetzung für die Entfaltbarkeit der Daten sind Objektive mit einer hohen numerischen Apertur von  $NA = 1,46$ , kombiniert mit einer geeigneten Einbettung. Es können in 1-Photonen Typ C für biologische Anwendungen auch standardmäßig verwendete Farbstoffe mit geringer Stokes-Verschiebung eingesetzt werden, so daß spektral keine Einschränkung in der Wahl der Farbstoffe besteht. Damit eröffnet sich die Möglichkeit, auch mehrfarbige 4Pi-Aufnahmen mit linearer Fluoreszenzanregung durchzuführen.

Es steht somit eine effiziente, einfache und kostengünstige Alternative zum bisher verwendeten 2-Photonen-4Pi-Mikroskop zur Verfügung. Die Messungen zeigen weiterhin, daß mit 1-Photonen 4Pi Typ C die höchste axiale Auflösung erzielt werden kann (60 nm nach linearer Entfaltung). Einzelne Fluoreszenzmoleküle konnten mit einem 1-Photonen 4Pi-Mikroskop nachgewiesen werden.

# Kapitel 5

## 1-Photonen 4Pi-Mikroskopie im Typ A

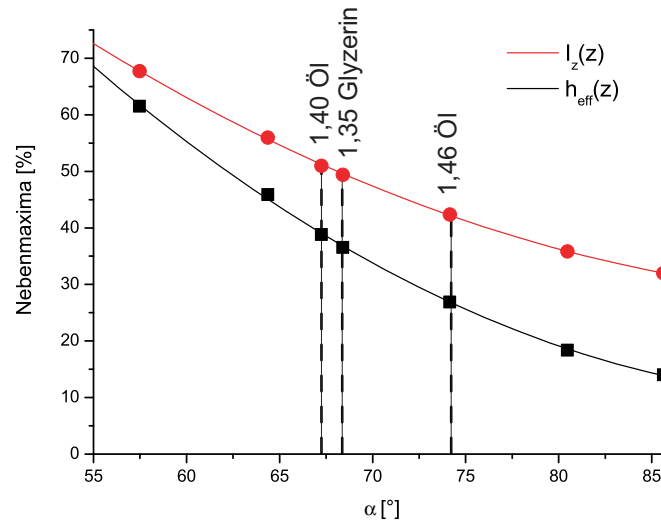
Ein 4Pi-Mikroskop mit linearer Fluoreszenzanregung und inkohärenter Detektion des Fluoreszenzlichtes (Typ A) ist der einfachste 4Pi-Aufbau, da weder ein Multiphotonen-Laser zur Anregung, noch ein Abgleich der Weglängendifferenz und der Dispersion zur kohärenten Detektion des Fluoreszenzlichts (Typ C) benötigt wird. Dadurch wird die Justage wesentlich vereinfacht, jedoch steht in diesem Fall zur Reduktion der Nebenmaxima nur die Konfokalisierung zur Verfügung. Im vorausgegangenen Kapitel wurde gezeigt, daß 1-Photonen 4Pi-Mikroskopie mit ultra-hohen Aperturwinkeln auch bei kleinen Stokes-Verschiebungen Nebenmaxima unter 50 % liefern kann. Das legt die Vermutung nahe, daß mit den in dieser Arbeit verwendeten Objektiven auf die kohärente Detektion des Fluoreszenzlichts zur Reduktion der Nebenmaxima verzichtet werden kann. In diesem Kapitel wird deshalb untersucht, ob es möglich ist, auch in diesem 4Pi-Typ entfaltbare Daten zu akquirieren. Die in diesem Kapitel vorgestellten Ergebnisse wurden in [29] veröffentlicht.

### 5.1 Eigenschaften von 1-Photonen 4Pi-Typ A

Die Anregung der Fluoreszenz findet durch Absorption eines Photons statt, d. h. in Gleichung 2.11 gilt  $m = 1$ . Das Fluoreszenzlicht wird inkohärent detektiert. Damit ergibt sich für die PSF bei linearer Fluoreszenzanregung im Typ A:

$$\begin{aligned} h_{4\text{PiTypA}}^{1\text{ph}}(\vec{r}) &= h_{\text{exc}4\text{Pi}}^{1\text{ph}}(\vec{r}) \cdot h_{\text{konf}}(\vec{r}) \\ &= |\vec{E}_{\text{exc}}(\vec{r}) + \hat{M}\vec{E}_{\text{exc}}(\hat{M}\vec{r})|^2 \cdot |\vec{E}_{\text{det}}(\vec{r})|^2 \otimes \vec{l}(\vec{r}). \end{aligned} \quad (5.1)$$

Das Auflösungsvermögen wird durch die verwendete Anregungswellenlänge bestimmt. Die Detektionswellenlänge hat kaum Einfluß auf die PSF. Die Intensität



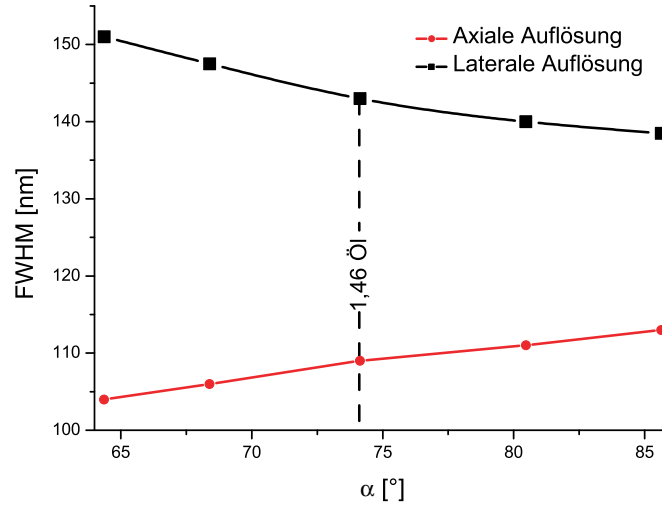
**Abbildung 5.1.** Berechnete Intensitäten der Nebenmaxima (in Prozent des Hauptmaximums) für unterschiedliche Öffnungswinkel. Die Höhe der Nebenmaxima nimmt erwartungsgemäß im Linienprofil, sowie im  $z$ -Profil für 1-Photonen 4Pi-Typ A mit zunehmendem Öffnungswinkel ab ( $\lambda_{\text{exc}} = 488 \text{ nm}$ ;  $\lambda_{\text{det}} = 515 \text{ nm}$ ;  $2\rho = 0,5 \text{ AU}$ ;  $n = 1,518$ ).

der Nebenmaxima wird durch den Öffnungswinkel der Objektivse bestimmt und kann durch die konfokale Detektionslochblende  $l(\vec{r})$  reduziert werden.

Die Abhängigkeit der Intensität der Nebenmaxima im Linienprofil  $h(z)$ , sowie im  $z$ -Profil  $I_z$  (Gl. 4.2) vom Semiaperturwinkel  $\alpha$  der Objektivse, ist in Abbildung 5.1 dargestellt. Die Werte wurden für eine Anregungswellenlänge von  $\lambda_{\text{exc}} = 488 \text{ nm}$  und eine Fluoreszenz mit einer zentralen Wellenlänge von  $\lambda_{\text{det}} = 520 \text{ nm}$ , bei einem Lochblendendurchmesser von  $0,5 \text{ AU}$ , sowie einem Brechungsindex von  $1,518$  berechnet. Die Intensität der Nebenmaxima nimmt im Linienprofil und im  $z$ -Profil mit zunehmendem Öffnungswinkel ab. Im Linienprofil sinken die Nebenmaxima von  $37\%$  auf  $27\%$ , wenn die bislang standardmäßig verwendeten Objektivse mit  $\text{NA} = 1,40$  gegen die hochaperturigen Objektivse mit  $\text{NA} = 1,46$  ausgetauscht werden. Im  $z$ -Profil sinkt die Intensität der Nebenmaxima um  $7\%$  auf  $42\%$  für die neuen Objektivse. Damit liegen beide Werte unter  $50\%$ . Den theoretischen Berechnungen zufolge sollten die Nebenmaxima schon für Glycerinobjektivse ( $\text{NA} = 1,35$ ) knapp unter  $50\%$  liegen. Jedoch war es damit bislang nicht möglich im Typ A Nebenmaxima unter  $50\%$  zu erzielen, denn residuale Aberrationen führen in der Praxis dazu, daß die gemessenen Nebenmaxima typischerweise um etwa  $10$  Prozentpunkte höher liegen. Abbildung 5.1 zeigt ebenfalls das Verhalten der Nebenmaxima wenn Objektivse mit noch größeren Öffnungswinkeln hergestellt werden könnten. Ihre Intensität würde bei höheren Öffnungswinkeln im Linienprofil und im  $z$ -Profil weiter abnehmen.

Das Verhalten von axialer und lateraler Halbwertsbreite mit zunehmendem Öffnungswinkel  $\alpha$  ist in Abbildung 5.2 dargestellt. Die Berechnungen erfolgten unter

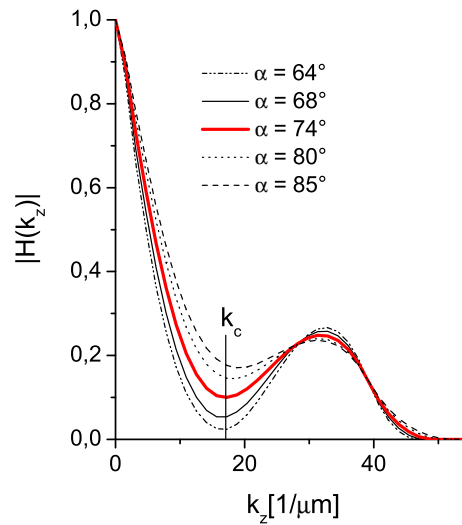




**Abbildung 5.2.** Berechnete axiale und laterale Halbwertsbreiten der PSF in Abhängigkeit vom Öffnungswinkel  $\alpha$  der verwendeten Objektive, bei 4Pi-Mikroskopie mit 1-Photonen-Anregung im Typ A. Die laterale Halbwertsbreite nimmt mit größerem  $\alpha$  ab, während die axiale Halbwertsbreite leicht zunimmt ( $\lambda_{\text{exc}} = 488 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{\text{det}} = 520 \text{ nm}$ ,  $2\rho = 0,5 \text{ AU}$ ,  $n = 1,515$ ).

denselben Annahmen wie die in Abbildung 5.1 dargestellten Berechnungsergebnisse. Erwartungsgemäß sinkt mit zunehmendem Öffnungswinkel die laterale Halbwertsbreite. Die axiale Halbwertsbreite nimmt mit größerem Öffnungswinkel leicht zu. Im Grenzfall  $\alpha \rightarrow 0^\circ$  ergibt sich eine stehende Welle, die zwar eine Halbwertsbreite der Maxima von 80 nm besitzt, jedoch sind in diesem Fall alle Maxima gleich hoch und eine Entfaltung der Bilddaten ist unmöglich. Wird der Öffnungswinkel erhöht, so ergeben sich Beiträge, die in Winkeln von  $0^\circ$  bis  $\alpha$  zur optischen Achse propagieren. Die Zerlegung der Felder ergibt in diesem Fall auch einen Beitrag  $E_z$  parallel zur optischen Achse. Dieser Beitrag führt dazu, daß die axiale Halbwertsbreite des zentralen Maximums mit zunehmendem Öffnungswinkel zunimmt. Bei den verwendeten Objektiven mit  $\text{NA} = 1,46$  ergibt sich eine Halbwertsbreite von ca. 110 nm. Für den Grenzfall  $\alpha \rightarrow 90^\circ$  beträgt die axiale Halbwertsbreite 113 nm. Das Volumen des zentralen Maximums der 4Pi-PSF insgesamt (d. h. das effektive Detektionsvolumen) nimmt ab, da die Abnahme in  $x$ - und  $y$ -Richtung die leichte Zunahme in axialer Richtung überkompensiert.

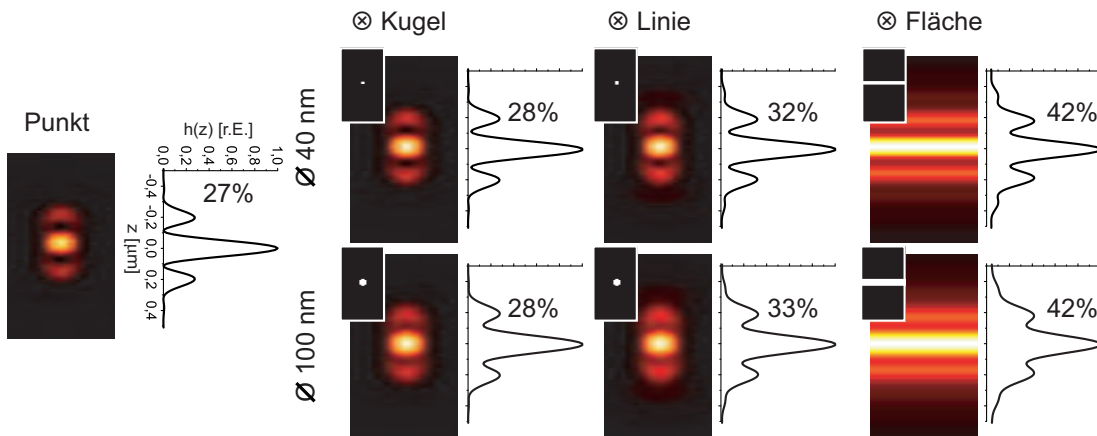
Abbildung 5.3 zeigt die OTF  $|H(k_z)|$  für verschiedene Werte des Semiaperturwinkels  $\alpha$  der Objektive. Mit größerem Öffnungswinkel wird das erste Minimum der OTF zunehmend aufgefüllt und der Wert an  $|H(k_c)|$  nimmt zu. Bei den verwendeten Objektiven mit einem Öffnungswinkel von  $74^\circ$  beträgt  $|H(k_z)|$  an der kritischen Frequenz  $k_c$  noch 12 % des Ausgangswertes und ist damit ausreichend über Null, so daß entfaltbare Daten auch in Anwesenheit von mäßigem Rauschen erzielt werden können. Je größer der verwendete Öffnungswinkel wird, desto robuster wird diese Methode. Bei einer weiteren Vergrößerung des Öffnungswinkels



**Abbildung 5.3.** Die OTF  $|H(k_z)|$  in Abhängigkeit von Semiaperturwinkel  $\alpha$  der Objektiv. Bei den verwendeten Objektiven mit  $NA = 1,46$  beträgt der Wert an  $k_c = 12\%$  des Ausgangswertes. Eine weitere Vergrößerung von  $\alpha$  würde die OTF an  $k_c$  noch weiter anheben. (Berechnungen für  $\lambda_{exc} = 488\text{ nm}$ ,  $\lambda_{det} = 568\text{ nm}$ ,  $n = 1,518$ ,  $2\rho = 0,5\text{ AU}$ )

auf  $80^\circ$ , steigt der Wert an der kritischen Frequenz auf knapp  $15\%$ . Die nur geringfügig unterschiedlichen axialen Auflösungen der PSFs für verschiedene Öffnungswinkel spiegeln sich in ähnlichen Verläufen der OTFs wider. Die maximal übertragene Frequenz der OTF beträgt  $k_{max}$  in allen Fällen  $45\ \mu\text{m}^{-1}$ .

Die Abhängigkeit der Intensität der Nebenmaxima im Linienprofil von der lateralen Ausdehnung ist in Abbildung 5.4 für verschiedene Objekte dargestellt. Die PSF eines berechneten Punktobjekts wurde mit einer Kugel, einem Zylinder (in  $y$ -Richtung) und mit einer Fläche (in der  $xy$ -Ebene), jeweils mit einem Durchmesser oder einer Dicke von  $40\text{ nm}$  bzw.  $100\text{ nm}$ , gefaltet. Die Ergebnisse für  $\varnothing = 40\text{ nm}$  sind in Abbildung 5.4 in der oberen Zeile dargestellt, die Ergebnisse für eine Faltung mit  $\varnothing = 100\text{ nm}$  sind in der unteren Zeile gezeigt. Die Werte der Nebenmaxima des Linienprofils reichen dabei von  $27\%$  für ein infinitesimal kleines Punktobjekt, bis zu  $42\%$  für die Faltung mit einer  $100\text{ nm}$  dicken Schicht. Die Berechnungen zeigen, daß für die Höhe der Nebenmaxima die Dicke des Objekts kaum eine Rolle spielt, jedoch die laterale Ausdehnung des Objekts einen starken Einfluß hat. Die Daten lassen sich daher in Abhängigkeit von der Form des gemessenen Objekts (punktförmig, linienförmig oder flächig in  $xy$ -Richtung ausgedehnt) unterschiedlich gut entfalten. Die Intensitäten der theoretischen Nebenmaxima liegen für alle Objekte unter  $50\%$ , jedoch ist im Experiment aufgrund von residualen Aberrationen mit höheren Nebenmaxima zu rechnen. Dennoch soll-

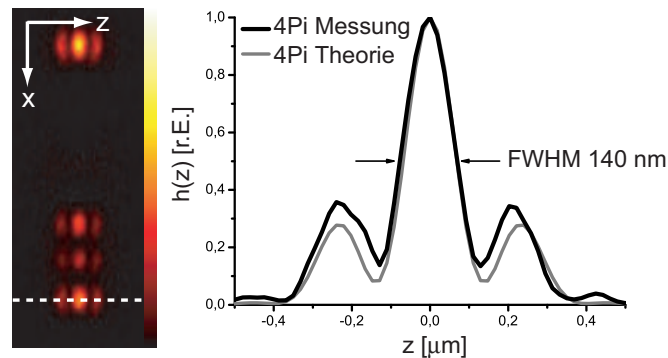


**Abbildung 5.4.** Faltung einer 1-Photonen 4Pi Typ A PSF mit einem Punkt- und einem Linienobjekt, sowie mit einer Fläche. Die obere Zeile wurde berechnet für  $\varnothing = 40$  nm, die untere für  $\varnothing = 100$  nm. Bei einem Linienprofil steigen die Nebenmaxima von 27% für ein infinitesimal kleines Objekt auf 42% für ein in  $xy$ -Richtung ausgedehntes Objekt an. Die Objektdicke hat kaum Einfluß auf die Höhe der Nebenmaxima, es werden lediglich die Minima in der PSF mit zunehmender Objektdicke aufgefüllt. ( $\lambda_{\text{exc}} = 488$  nm,  $\lambda_{\text{det}} = 520$  nm,  $NA = 1,46$ )

te 1-Photonen 4Pi-Mikroskopie im Typ A problemlos bei Punktobjekten (z. B. Telomere vgl. Kap. 8.2) und bei Linienobjekten (z. B. Mikrotubuli) eingesetzt werden können. Die Messung einer flächigen Struktur (z. B. Golgi-Apparat) stellt die höchsten Anforderungen an die optischen Eigenschaften der Probe und die Justage des 4Pi-Aufbaus. Abbildung 5.4 zeigt weiterhin, daß die endliche Ausdehnung des Objekts zu einem verbreiterten Hauptmaximum, sowie zu aufgefüllten Minima in der PSF führt. Ein Vergleich der Meßdaten mit den theoretischen Erwartungen erlaubt damit prinzipiell auch die Bestimmung der Dicke des Objekts [14, 25].

## 5.2 Messungen an technischen Proben

Experimente wurden zunächst an roten Fluoreszenzbeads (Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland) mit einer zentralen Emissionswellenlänge von 605 nm und einem Durchmesser von 100 nm durchgeführt. Zur Anregung wurde Laserlicht der Wellenlänge  $\lambda_{\text{exc}} = 568$  nm verwendet. Abbildung 5.5 zeigt einen  $xz$ -Schnitt durch mehrere Fluoreszenzbeads und das gemessene Linienprofil durch eines der Beads. Zum Vergleich mit den theoretischen Erwartungen wurde die für ein punktförmiges Objekt berechnete PSF mit einer Kugel ( $\varnothing = 100$  nm) gefaltet. Es ergibt sich eine gute Übereinstimmung von Experiment und Theorie. Die Halbwertsbreite beträgt in beiden Fällen 140 nm. Die theoretisch berechnete Halbwerts-



**Abbildung 5.5.** Messung an roten Fluoreszenzbeads mit  $\varnothing = 100$  nm, bei  $\lambda_{\text{exc}} = 568$  nm. Das Linienprofil durch ein Bead zeigt Nebenmaxima von 35 %. Die Halbwertsbreite beträgt 140 nm und stimmt für Messung und Theorie überein. Zur Berechnung der theoretischen Kurve wurde die PSF für ein punktförmiges Objekt mit einer Kugel  $\varnothing = 100$  nm gefaltet. (Für ein punktförmiges Objekt beträgt die theoretische Halbwertsbreite 126 nm.)

breite der PSF eines punktförmigen Objekts bei gleicher Anregungswellenlänge beträgt 126 nm. Bei kürzeren Anregungswellenlängen ist die erwartete Halbwertsbreite kleiner. Theoretisch ergibt sich bei  $\lambda_{\text{exc}} = 488$  nm eine Halbwertsbreite von 108 nm. Aufgrund der guten Übereinstimmung der Halbwertsbreite in Experiment und Theorie kann davon ausgegangen werden, daß mit einem 4Pi-Mikroskop im Typ A für Objekte, die kleiner als die Auflösungsgrenze sind, bei einer Anregungswellenlänge von 568 nm auch experimentell eine Auflösung von 126 nm erzielt werden kann.

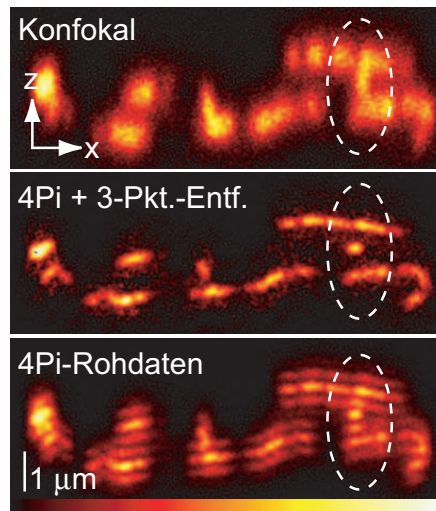
Die experimentell ermittelten Nebenmaxima liegen mit 35 % deutlich unter 50 % und entsprechen ebenfalls den Erwartungen. Theoretisch werden Nebenmaxima von 28 % erwartet. Die höheren experimentellen Nebenmaxima resultieren aus nicht beeinflussbaren Restaberrationen in der Probe und im 4Pi-System.

Diese Messungen bestätigen, daß ein 4Pi-Mikroskop mit linearer Fluoreszenzanregung vom Typ A entfaltbare Daten von technischen Proben liefern kann.

### 5.3 Messungen an biologischen Proben

Um die Anwendbarkeit der Methode auf biologische Proben zu prüfen, wurden Experimente an verschiedenen Strukturen durchgeführt: Als Beispiel für 4Pi-Messungen an punktförmigen Strukturen dienen Telomere. Dies sind die Endstücke der Chromosomen. Die Ergebnisse dazu werden in Kap. 8.2 vorgestellt.

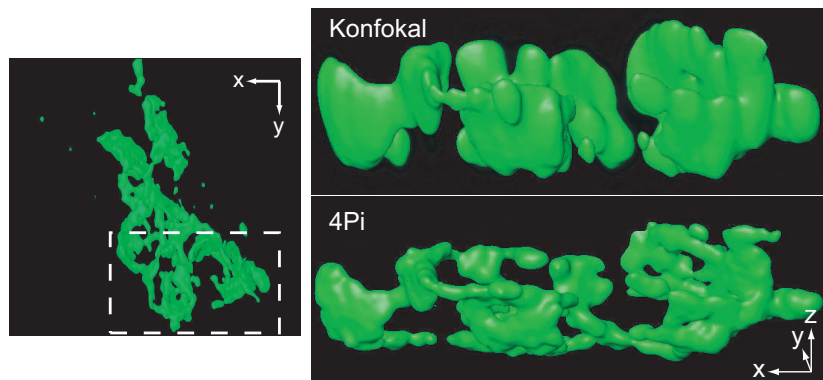
Zur Überprüfung der Methode an lateral ausgedehnten Objekten wurde das im *cis*-Golgi lokalisierte Protein GM130 in *Vero*-Zellen mit dem organischen Farb-



**Abbildung 5.6.** Ein Cis-Golgi Protein (GM130) wurde in Vero-Zellen mit Cy3 gefärbt. Der konfokale  $xz$ -Schnitt wird mit den Daten eines 4Pi-Mikroskops im Typ A verglichen. Die 4Pi-Rohdaten besitzen Nebenmaxima von knapp 50%. Dennoch werden diese durch eine Dreipunktentfaltung nahezu vollständig entfernt. Nach Entfaltung zeigen die 4Pi-Daten ein klares und detailliertes Bild des Golgi-Apparats. Beide Messungen wurden bei einer Anregungswellenlänge von  $\lambda_{\text{exc}} = 568 \text{ nm}$  durchgeführt.

stoff Cy3 markiert. Abbildung 5.6 zeigt einen  $xz$ -Schnitt durch den Golgi-Apparat einer Zelle. Eine konfokale Messung wird mit einer 4Pi-Aufnahme derselben Stelle vor und nach Dreipunktentfaltung verglichen. In beiden Fällen beträgt die Anregungswellenlänge  $\lambda_{\text{exc}} = 568 \text{ nm}$ . Die 4Pi-Rohdaten zeigen Nebenmaxima knapp unter 50%. Nach einer Dreipunktentfaltung wurde im 4Pi-Datensatz ein Untergrund von 10% subtrahiert. Abbildung 5.6 zeigt, daß die Nebenmaxima auch an kritischen Stellen zufriedenstellend entfernt werden können. Insbesondere an der hervorgehobenen Stelle kann ein konfokales Mikroskop die Verteilung des *cis*-Golgi Proteins nicht auflösen.

Eine 3D-Messung des mit Rhodamin6G gefärbten GM130-Proteins in einer Vero-Zelle ist in Abbildung 5.7 dargestellt. Das im *cis*-Golgi lokalisierte Protein wurde im konfokalen Modus und im 4Pi-Mikroskop im Typ A mit linearer Fluoreszenzanregung aufgenommen. In beiden Fällen wurde als Anregungswellenlänge  $\lambda_{\text{exc}} = 568 \text{ nm}$  gewählt. Die Nebenmaxima des 4Pi-Datensatzes wurden durch Dreipunktentfaltung entfernt. In Abbildung 5.7 zeigt die  $xy$ -Projektion (links) den, mit der Software AMIRA (Version 3.1.1., Mercury Computer Systems Inc., San Diego, USA) dreidimensional dargestellten Ausschnitt (rechts). Zur Visualisierung der Daten wurde die Funktion „Isosurface“ verwendet. Aufgrund der verbesserten axialen Auflösung zeigt die 4Pi-Aufnahme deutlich feinere Strukturen, als die konfokale Aufnahme. Der komplette Datensatz besteht aus 274 Schnitten in  $xz$ -Richtung, die jeweils mit einem Abstand von 61 nm aufgenommen wurden.

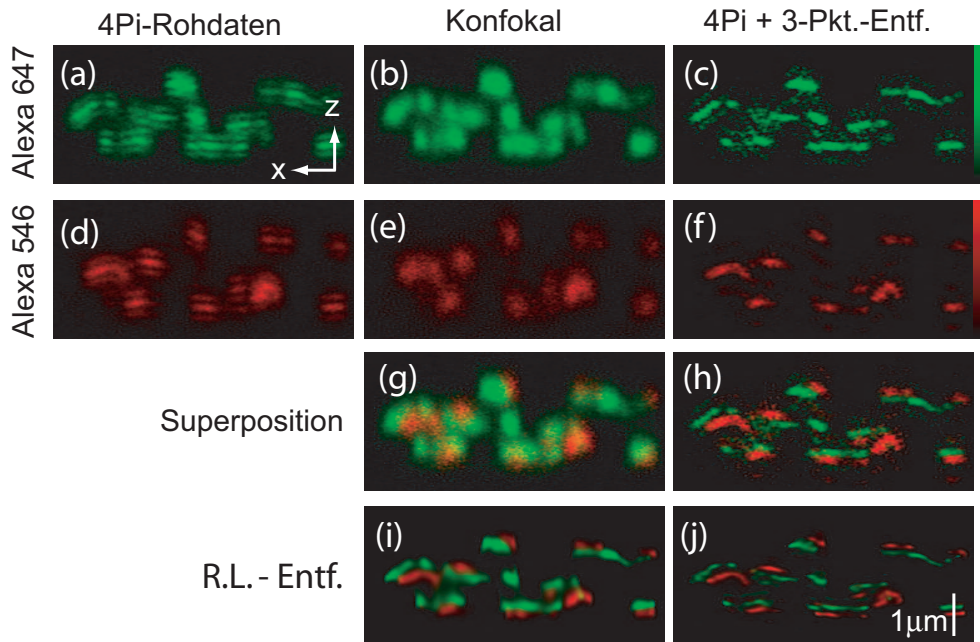


**Abbildung 5.7.** 3D-Messung einer Vero-Zelle, bei der das Protein (GM130), das im cis-Golgi lokalisiert ist, mit Rhodamin gefärbt wurde. Die  $xy$ -Projektion (links) zeigt den mit der Software AMIRA dreidimensional dargestellten Ausschnitt (rechts). In der 4Pi-Messung sind die Strukturen axial deutlich feiner aufgelöst als in der konfokalen Messung. In beiden Fällen wurde die Fluoreszenz bei  $\lambda_{\text{exc}} = 568 \text{ nm}$  angeregt.

Der Datensatz ist  $16,6 \mu\text{m} \times 5,0 \mu\text{m} \times 15,0 \mu\text{m}$  groß und die Aufnahmezeit betrug 33 min. Die Meßzeit kann halbiert werden, indem bidirektional gemessen wird. Dabei werden bei Vor- und Rücklauf des Scanners Daten aufgenommen. Zur Detektion wurde eine APD verwendet. Damit diese nicht gesättigt wurde, mußte die Laserleistung entsprechend reduziert werden. Um dennoch ein gutes Signal-zu-Rausch-Verhältnis zu erzielen, wurde jede Zeile acht Mal gemittelt. Wird zur Detektion des Fluoreszenzsignals ein PMT verwendet, so ist nicht mehr die Sättigung des Detektors der limitierende Faktor, sondern das Bleichen des Fluoreszenzfarbstoffs. Bei bleichstabilen Farbstoffen und einem PMT als Detektor kann die Laserleistung erhöht werden, um die Meßzeit zu reduzieren.

### 5.3.1 Mehrfarben-Messungen

In biologischen Fragestellungen ist es oft nicht nur von Interesse eine einzelne Struktur darzustellen, sondern häufig ist besonders die relative Lage von mindestens zwei verschieden gefärbten Strukturen, z. B. verschiedenen Proteinen interessant. Für 2-Photonen-Anregung im Typ A [26] und im Typ C [36] wurde bereits gezeigt, daß es möglich ist mit einem 4Pi-Mikroskop Mehrfarbenaufnahmen zu erhalten. Die Herausforderung bei Zweifarbenmessungen in der 4Pi-Mikroskopie ist, konstruktive Interferenz für beide Fluoreszenzwellenlängen zu erzielen. Hier werden zum erstmalig Zweifarbenmessungen vorgestellt, die mit 1-Photonen 4Pi-Mikroskopie aufgenommen wurden. Die hier dargestellten Ergebnisse wurden im justierfreundlicheren Typ A akquiriert, der etwas höhere Nebenmaxima als Typ C besitzt. Daher lassen sich Zweifarbenmessungen ebenso im Typ C durchführen.



**Abbildung 5.8.** Doppeltgefärbter (gelb-rot) Golgi-Apparat in Vero-Zellen (*trans*-Golgi: Alexa546; *cis*-Golgi: Alexa647). Beide Detektionskanäle sind für die 4Pi-Rohdaten (a, d), die konfokalen Daten (b, e) und die 4Pi-Daten nach Dreipunktentfaltung (c, f) separat dargestellt. Nach Superposition zeigen die 4Pi-Ergebnisse (h) eine deutlich höhere axiale Auflösung im Vergleich zur konfokalen Messung (g). Auch nach Richardson-Lucy-Entfaltung zeigen die 4Pi-Daten (j) eine höhere Auflösung als die konfokalen Daten (i).

Für Zweifarbenmessungen wurden *Vero*-Zellen transient mit einem Sulfotransferase-GFP Hybrid transfiziert. Die Sulfotransferase ist im *trans*-Golgi lokalisiert. Über einen GFP-Antikörper (Biozol, Eching, Deutschland) wird daran ein Alexa546-Antikörper (Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland) gekoppelt. Das ist notwendig, da GFP durch die Einbettung in TDE zu stark bleicht und nicht mehr detektiert werden kann. Als zweiter Farbstoff wurde der rot fluoreszierende Alexa647-Antikörper an das im *cis*-Golgi lokalisierte Protein GM130 gekoppelt. Die Anregung fand für Alexa546 bei  $\lambda_{\text{exc}} = 568 \text{ nm}$  und für Alexa647 bei  $\lambda_{\text{exc}} = 647 \text{ nm}$  statt. Um die Emissionswellenlängen spektral zu trennen, wurde ein dichroitischer Strahlteiler (Z690SPRDC, Chroma Technology Corp, USA) mit einer Trennkante bei 690 nm verwendet. Das Fluoreszenzlicht wurde von zwei APDs detektiert.

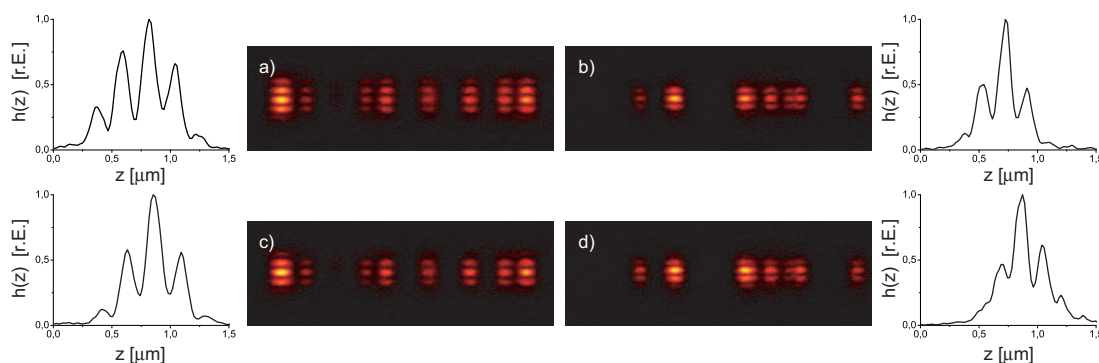
Da der Alexa647 Farbstoff sehr schwer und nur bei hohen Laserleistungen mit  $\lambda_{\text{exc}} = 568 \text{ nm}$  anregbar war, konnten beide Fluorophore nicht simultan angeregt werden. Die Anregungswellenlänge mußte daher nach jedem  $xz$ -Schnitt auf 647 nm umgeschaltet werden. Auf diese Weise konnten die zwei Farben sequentiell aufgenommen werden. Das Durchsprechen der beiden Kanäle war vernachlässigbar. Nach der 4Pi-Messung wurde der selbe Datenstapel noch einmal

im konfokalen Modus bei gleichen Anregungswellenlängen aufgenommen. Die Ergebnisse sind für 4Pi-Mikroskopie (a, d) und Konfokalmikroskopie (b, e) in Abbildung 5.8 für beide Anregungswellenlängen getrennt dargestellt. Die Nebenmaxima der 4Pi-Messung liegen für beide Anregungswellenlängen unter 50 % und werden durch Dreipunktentfaltung (c, f) zufriedenstellend entfernt. Die Überlagerung beider Farbkanäle zeigt für 1-Photonen 4Pi Typ A (h) deutlich klarere und besser aufgelöste Strukturen, als die konfokale Aufnahme (g).

Um zu untersuchen, in wieweit sich die Auflösung der beiden Aufnahmen durch einen nichtlinearen Entfaltungsalgorithmus steigern läßt, wurde auf den konfokalen und den 4Pi-Datensatz eine Richardson-Lucy-Entfaltung angewendet. Abbildungen 5.8i) und (j) zeigen, daß die 4Pi-Abbildung, aufgrund der höheren Auflösung der Rohdaten, der konfokalen Abbildung auch in diesem Fall überlegen ist.

Bei der gewählten Farbstoffkombination, d.h. Anregung der Fluoreszenz im gelben und roten Wellenlängenregime, ist keine Fokus-Korrektur der Objektive notwendig, da der Farblängsfehler zwischen gelb und rot bei den verwendeten Objektiven gering ist. Abbildung 3.3 zeigt jedoch, daß der Farblängsfehler, wie bei den meisten Objektiven, zu kurzen Wellenlängen hin zunimmt. Er beträgt für die verwendeten Objektive zwischen 488 nm und 568 nm etwa 275 nm. Allerdings hat die Verwendung von Farbstoffen, die im grünen Wellenlängenbereich emittieren, den Vorteil, daß aufgrund der kürzeren Wellenlängen etwas höhere Auflösungen erreicht werden können. Eine Berechnung ergibt eine Auflösung von 108 nm für eine Anregungswellenlänge von 488 nm bzw. 126 nm für eine Anregungswellenlänge von 568 nm. Theoretisch sind die Nebenmaxima bei Fluoreszenzanregung bei 488 nm genauso hoch wie bei einer Anregung bei 568 nm – es sollten sich also ähnliche Ergebnisse wie bei einer gelb/roten-Farbstoffkombination erzielen lassen. Jedoch sind die optischen Verhältnisse bei kürzeren Wellenlängen oft kritischer bezüglich Restaberrationen. Aufgrund des Farblängsfehlers muß für doppeltgefärbte Proben bei kurzen Anregungswellenlängen der Fokus des justierbaren Objektivs für die zwei Anregungswellenlängen unterschiedlich eingestellt werden. Nur so können für beide Wellenlängen symmetrische PSFs mit Nebenmaxima unter 50 % erreicht werden. Dies verhindert eine simultane Aufnahme in beiden Kanälen wie es in 2-Photonen-Anregung oder für 1-Photonen-Anregung im rot-gelben Wellenlängenbereich möglich ist. Um eine Verschiebung der Datensätze durch thermischen Drift zu minimieren, werden die beiden Farben alternierend aufgenommen. Nach jedem aufgenommenem  $z$ -Schnitt wird der Fokus für die jeweilige Wellenlänge angepaßt. Wenn nur der Fokus verändert wird, sind beide Datensätze axial gegeneinander verschoben. Das kann durch einen globalen Offset nach der Aufnahme korrigiert werden. Alternativ kann der Farblängsfehler für die zweite Wellenlänge korrigiert werden, indem die  $z$ -Position des justierbaren Objektivs nur um die Hälfte des Weges verschoben wird, der notwendig ist um den Fokus zu korrigieren und der  $z$ -Tisch um denselben Weg in entgegenge-

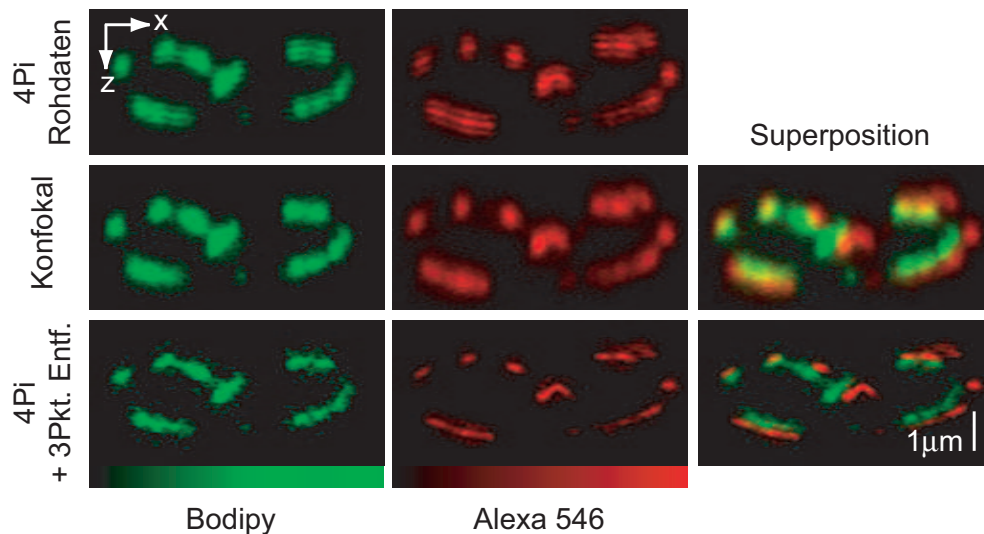




**Abbildung 5.9.** Einstellung der Automatik für Zweifarbenmessungen. Die Messungen wurden an einer Probe aus roten und grünen Fluoreszenzbeads durchgeführt. (a) und (c) zeigen den roten Detektionskanal ( $\lambda_{\text{exc}} = 568 \text{ nm}$ ), (b) und (d) den grünen Detektionskanal ( $\lambda_{\text{exc}} = 488 \text{ nm}$ ). In der oberen Zeile ist die Automatik für grüne Fluoreszenz optimiert, in der unteren Zeile für rote Fluoreszenz. Wird der Fokus der Objektive für eine Wellenlänge optimiert, führt der Farblängsfehler dazu, daß das Linienprofil im jeweils anderen Kanal (a bzw. d) verbreitert und schlechter moduliert ist.

setzter Richtung verschoben wird. Der Effekt der Farblängsfehler-Korrektur ist in Abbildung 5.9 zu sehen. Als Probe wurden Yellow-Green Beads und Red Beads gemischt und der Fokus alternierend für 488 nm bzw. 568 nm eingestellt. Wenn der Fokus für eine Anregung bei 488 nm (obere Zeile) eingestellt wird, sind die Fokusse der beiden Objektive für 568 nm axial versetzt und umgekehrt.

Um zu untersuchen, ob im 1-Photonen Typ A trotz der schlechteren optischen Eigenschaften auch „konventionelle“, d. h. grün-orange oder grün-rote, Farbkombinationen für Doppelfärbungen verwendet werden können, wurde an die im *trans*-Golgi lokalisierte Sulfotransferase der organische Farbstoff Bodipy FL (Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland) mit  $\lambda_{\text{exc}} = 515 \text{ nm}$  und einem Emissionsmaximum bei  $\lambda_{\text{det}} = 520 \text{ nm}$  gekoppelt. Das GM130-Protein wurde mit Alexa456 gefärbt. Die Datenaufnahme fand alternierend statt, d. h. nach jedem  $xz$ -Schnitt wurde die Anregungswellenlänge umgeschaltet. Durch Fokusänderung eines Objektivs konnte der Farblängsfehler jeweils für 488 nm oder 568 nm korrigiert werden, so daß die PSFs für beide Anregungswellenlängen optimal waren. Die dadurch entstehende  $z$ -Verschiebung beider Datensätze wurde nach der Datenakquisition manuell korrigiert. In Abbildung 5.10 sind die Ergebnisse für eine 4Pi-Messung und eine konfokale Messung dargestellt. Bei einer Anregung mit 488 nm sind die Nebenmaxima, aufgrund stärkerer Aberrationen bei kürzeren Wellenlängen, höher, als bei 568 nm. Die Aufnahmen zeigen dennoch, daß 1-Photonen 4Pi-Mikroskopie vom Typ A mit entfaltbaren Nebenmaxima auch in diesem Fall möglich ist und damit auch für Farbstoffe, die im blauen oder grünen Wellenlängenregime angeregt werden, eingesetzt werden kann.



**Abbildung 5.10.** Doppeltgefärbter (grün/orange) Golgi-Apparat in Vero-Zellen. Der trans-Golgi wurde mit Bodipy FL markiert und ein cis-Golgi-Marker (GM130) wurde mit einem Alexa546-Antikörper gefärbt. Die Bodipy FL-Daten zeigen etwas höhere Nebenmaxima als die entsprechenden Alexa546-Daten sind aber dennoch entfaltbar. Nach Dreipunktentfaltung und Abzug eines Untergrundes von 10 % zeigen die 4Pi-Daten gegenüber den konfokalen Daten eine höhere axiale Auflösung.

## Zusammenfassung

Die Messungen zeigen, daß mit Objektiven mit einer numerischen Apertur von 1,46 und einem geeigneten Einbettmedium, mit 1-Photonen-Anregung und inkohärenter Detektion des Fluoreszenzlichts (Typ A), Nebenmaxima unter 50 % erzielt werden können. Es kann auf einen teuren modengekoppelten 2-Photonen-Laser verzichtet werden. Des weiteren ist ein aufwendiger Abgleich der optischen Weglänge und der Dispersion nicht notwendig. Es steht damit ein vereinfachtes und günstiges System zur Verfügung, das eine Auflösung von 110 nm liefert. Punktförmige und linienartige Strukturen sind unkritisch, bei flächigen Objekten wie z. B. dem Golgi-Apparat muss jedoch besonders sorgfältig auf die optischen Eigenschaften der Probe und eine präzise Justage des 4Pi-Mikroskops geachtet werden, um entfaltbare Daten zu erhalten. Hier wurde mit Messungen am Golgi-Apparat gezeigt, daß auch in diesem Fall hochaufgelöste Daten erzielt werden können. 1-Photonen 4Pi Typ A (und damit auch Typ C) erlaubt Zweifarbenmessungen, um die dreidimensionale Verteilung beispielsweise zweier Proteine in der Zelle vergleichend zu untersuchen. Messungen mit Farbkombinationen im orange-roten Bereich können mit derzeitigen Optiken ohne zusätzliche Korrekturen durchgeführt werden. Im blau-gelben Bereich ist für die verwendeten Objektive eine zusätzliche Korrektur aufgrund des starken Farblängsfehlers not-

wendig. Diese Probleme sind jedoch nicht prinzipieller Natur, sondern können durch zusätzliche optische Elemente korrigiert, oder durch entsprechend korrigierte Objektive vermieden werden.



# Kapitel 6

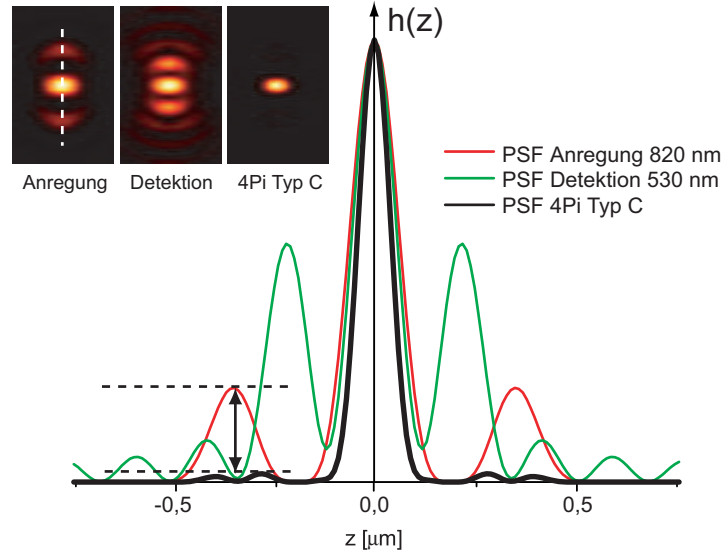
## 2-Photonen 4Pi-Mikroskopie

Um die Daten einer 4Pi-Messung interpretieren zu können, sind bislang Entfaltungsalgorithmen notwendig, um die Nebenmaxima aus den Bilddaten entfernen. Die notwendige Entfaltung stellt in der Praxis eine große Hürde dar, zum einen, weil die Daten nicht sofort (während der Messung) interpretiert werden können. Zum anderen, weil durch die Entfaltung ein Fehler in der Intensität verursacht wird, der in der Größenordnung von etwa 10 % des Signals liegt. Dadurch werden genauere Aussagen, beispielsweise zur Dichteverteilung von Fluorophoren verhindert.

Die niedrigsten Nebenmaxima werden mit 2-Photonen 4Pi-Mikroskopie mit kohärenter Detektion des Fluoreszenzlichts (Typ C) erreicht. Der Zweiphotoneneffekt reduziert die Nebenmaxima aufgrund der quadratischen Abhängigkeit der Anregungswahrscheinlichkeit von der Laserintensität. Zusätzlich können die Nebenmaxima im Typ C durch geeignete Wahl der Anregungs- und Detektionswellenlängen weiter reduziert werden. Bisher konnten mit Ölobjektiven ( $NA = 1,40$ ) oder mit Glyzerinobjektiven ( $NA = 1,35$ ) Nebenmaxima zwischen 25 % und 35 % in biologischen Proben erzielt werden [17]. Eine wichtige Fragestellung dieser Arbeit ist deshalb, wie weit die Nebenmaxima durch ultrahochaperturige Objektive reduziert werden können und ob es möglich ist, auf eine Entfaltung der Daten zu verzichten.

### 6.1 Konfokales 2-Photonen 4Pi Typ C

Die Fluoreszenzmoleküle werden in einem 2-Photonen 4Pi-Mikroskop durch einen 2-Photonen-Prozess angeregt. Dabei absorbiert ein Fluorophor innerhalb von Femtosekunden zwei Photonen der doppelten Wellenlänge und geht in den angeregten Zustand über. Zur Anregung sind gepulste Laser notwendig, damit eine genügend hohe Photonendichte im Anregungsfokus vorliegt. Es werden Anre-



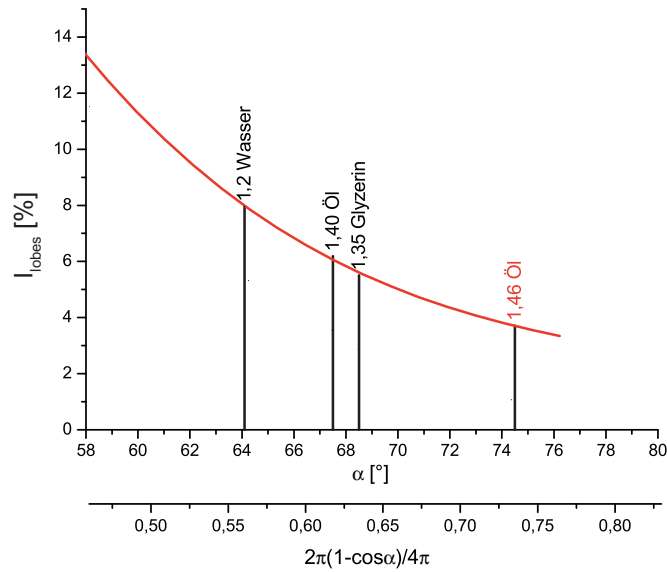
**Abbildung 6.1.** Effekt der Wellenlängenverschiebung zwischen Anregung ( $\lambda_{\text{exc}} = 820 \text{ nm}$ ) und Detektion ( $\lambda_{\text{det}} = 530 \text{ nm}$ ) im Typ C. Die normierten Linienprofile durch die berechneten PSFs zeigen, daß bei geeigneter Wahl der Wellenlängen die Maxima 1. Ordnung von  $h_{\text{exc}4\text{Pi}}^{2\text{ph}}$  mit den Minima 2. Ordnung von  $h_{\text{det}4\text{Pi}}$  übereinstimmen und umgekehrt. Dadurch werden die Nebenmaxima der Gesamt-PSF effektiv reduziert.

gungswellenlängen im Bereich zwischen 760 nm und 880 nm verwendet. In einem 2-Photonen-4Pi-Mikroskop vom Typ C wird das Fluoreszenzlicht kohärent detektiert. Damit ergibt sich die Gesamt-PSF eines 2-Photonen 4Pi-Mikroskops vom Typ C zu:

$$\begin{aligned}
 h_{4\text{PiTypC}}^{2\text{ph}}(\vec{r}) &= h_{\text{exc}4\text{Pi}}^{2\text{ph}}(\vec{r}) \cdot h_{\text{det}4\text{Pi}}(\vec{r}) \\
 &= |\vec{E}_{\text{exc}}(\vec{r}) + \hat{M}\vec{E}_{\text{exc}}(\hat{M}\vec{r})|^4 \cdot |\vec{E}_{\text{det}}(\vec{r}) + \hat{M}\vec{E}_{\text{det}}(\hat{M}\vec{r})|^2 \otimes \vec{l}(\vec{r}).
 \end{aligned} \tag{6.1}$$

Die Quadrierung der Beleuchtungs-PSF aufgrund der 2-Photonen Anregung führt zu niedrigen Nebenmaxima in der Gesamt-PSF.

Der Wellenlängenunterschied zwischen Anregungswellenlänge und Detektionswellenlänge führt zu einem Effekt ähnlich der Stokes-Verschiebung bei 1-Photonen 4Pi Typ C und bei geeigneter Wahl der Wellenlängen zu einer effektiven Reduktion der Nebenmaxima. Die Profile durch die entsprechenden PSFs sind in Abbildung 6.1 dargestellt. Die Maxima 1. Ordnung der Anregungs-PSF  $h_{\text{exc}4\text{Pi}}^{2\text{ph}}$  (rot) treffen auf ein Minimum in der Detektions-PSF  $h_{\text{det}4\text{Pi}}$  (grün) und umgekehrt. Die Anregungswellenlänge von 820 nm ist dabei so gewählt, dass bei einer Fluoreszenz um 530 nm, wie es z. B. bei den häufig verwendeten Fluoreszenzfarbstoffen FITC (495 nm/517 nm), eGFP (488 nm/509 nm) oder Alexa488 (493 nm/520 nm) der Fall ist, das Verhältnis von Anregungswellenlänge zu Detektionswellenlänge  $\kappa$  mit  $\kappa = \lambda_{\text{exc}}/\lambda_{\text{em}} \approx 1,5$  optimal ist. Die Neben-

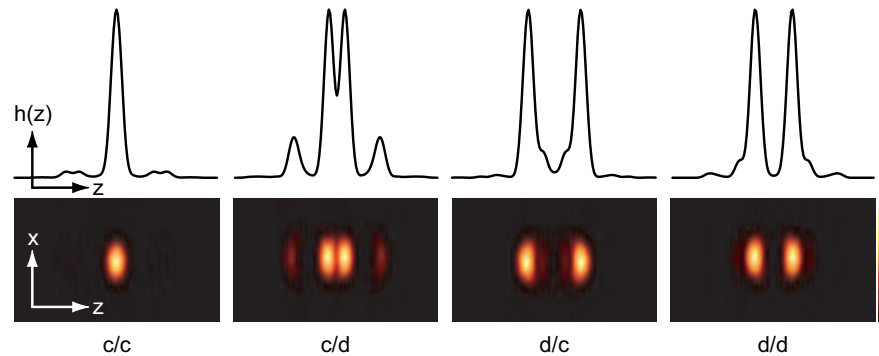


**Abbildung 6.2.** Intensitätsverlauf der Nebenmaxima im  $z$ -Profil bei 2-Photonen 4Pi Typ C mit zunehmendem Semiaperturwinkel  $\alpha$  der Objektive. Der Semiaperturwinkel ist in  $[\circ]$  angegeben (obere Abszisse) sowie als Verhältnis von abgedecktem Raumwinkel zum vollen Raumwinkel von  $4\pi$  (untere Abszisse). Mit zunehmendem  $\alpha$  nimmt die Intensität der Nebenmaxima ab. Für die in dieser Arbeit verwendeten Objektive mit  $NA = 1,46$  ergibt sich im  $z$ -Profil eine Intensität der Nebenmaxima von 4 % des Hauptmaximums.

maxima werden so möglichst effektiv reduziert und die Gesamt-PSF (schwarz), weist an dieser Stelle ein reduziertes Nebenmaximum mit Doppelstruktur auf. Zusätzlich führt die kohärente Detektion des Fluoreszenzlichtes zu einer Reduktion der Halbwertsbreite der PSF (vgl. Tabelle 4.1).

Die Abhängigkeit der Nebenmaxima im  $z$ -Profil vom Öffnungswinkel der verwendeten Objektive ist in Abbildung 6.2 dargestellt. Für die in dieser Arbeit verwendeten Ölimmersionsobjektive mit einer numerischen Apertur von 1,46 sinkt die Höhe der theoretisch erwarteten Nebenmaxima im Vergleich zu den standardmäßig verwendeten Objektiven mit  $NA = 1,40$  um 2 % im  $z$ -Profil. Es ergeben sich Nebenmaxima mit Intensitäten von nur 4 % des Hauptmaximums. Theoretisch sollten auch die standardmäßig verwendeten Ölobjektive Nebenmaxima unter 10 % liefern. Die bisher experimentell erzielten Nebenmaxima zeigen mit 25, %–30 % jedoch eine große Diskrepanz zu den theoretischen Erwartungen.

Aufgrund der kohärenten Superposition, von sowohl Anregungs- als auch Detektionslicht, treten in Abhängigkeit von Weglängenunterschied der beiden Arme des 4Pi-Moduls und Einstellung des Dispersionskeils, unterschiedliche Phasenkombinationen für Anregung und Detektion auf. Von Interesse sind dabei vor allem Fälle mit einer Phasenverschiebung  $\Delta\phi = 0$  (konstruktive Interferenz) und



**Abbildung 6.3.** Normierte PSFs und Linienprofile für verschiedene Phasenkombinationen von Anregungs- und Detektionslicht. Die PSF für  $(c/c)$  besteht aus einem schmalen zentralen Maximum und niedrigen Nebenmaxima. Für  $(c/d)$  weist die PSF höhere Nebenmaxima und ein gespaltenes Hauptmaximum auf. Die Fälle für destruktive Anregung ( $d/c$ ) bzw. ( $d/d$ ) bestehen aus zwei Maxima mit unterschiedlichem axialen Abstand. ( $\lambda_{\text{exc}} = 820 \text{ nm}$ ;  $\lambda_{\text{det}} = 525 \text{ nm}$ ;  $2\rho = 0,5 \text{ AU}$ ).

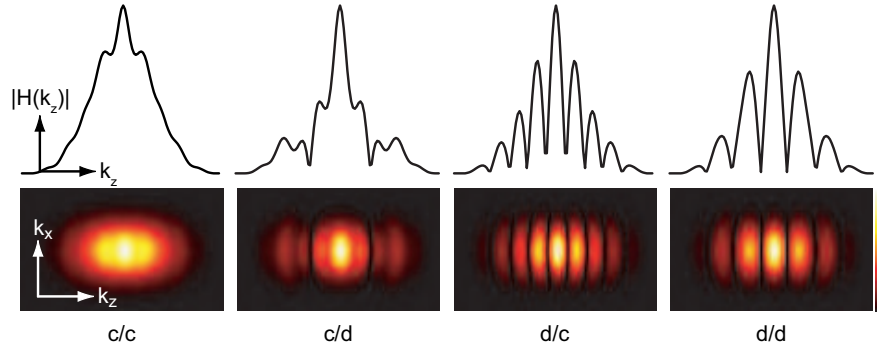
$\Delta\phi = \pi$  (destruktive Interferenz):

- konstruktive Anregung und konstruktive Detektion ( $c/c$ )
- konstruktive Anregung und destruktive Detektion ( $c/d$ )
- destruktive Anregung und konstruktive Detektion ( $d/c$ )
- destruktive Anregung und destruktive Detektion ( $d/d$ ).

Die normierten PSFs und Linienprofile für diese vier Fälle sind in Abbildung 6.3 dargestellt. Die PSF für  $(c/c)$  besteht aus einem schmalen Hauptmaximum und niedrigen Nebenmaxima. Für  $(c/d)$ -Interferenz ergibt sich dagegen ein breites, zentrales Maximum mit einem kleinen Minimum („Dip“) in der Mitte und schmalen Nebenmaxima. Die Nebenmaxima sind höher als bei  $(c/c)$ . Die Fälle mit destruktiver Anregung bestehen aus zwei gleich hohen Maxima mit einem breiten Minimum ( $d/c$ ) bzw. mit einem schmalen Minimum ( $d/d$ ) in der Mitte. Die maximalen Intensitäten und die Integrale der verschiedenen Interferenztypen sind in Tabelle 6.1 aufgeführt. Der Fall mit konstruktiver Anregung und konstruktiver Detektion besitzt das höchste Signal im Maximum, das bedeutet, daß dieser Fall bei der Einstellung der Phase auch am leichtesten identifiziert werden kann. Aufgrund der höheren Intensität im Maximum sind die detektierten Strukturen bei  $(c/c)$  besonders hell und kontrastreich. Das Integral der PSF ist für  $(c/c)$ -Einstellung ebenfalls am höchsten.  $(c/c)$  ist die optimale Phaseneinstellung, wenn nur an einem Ausgang des 4Pi-Moduls das Fluoreszenzlicht detektiert wird, da in diesem Fall die höchste Intensität erreicht wird.

Die OTFs der vier Phasenkombinationen sind zusammen mit  $|H(k_z)|$  in Abbildung 6.4 gezeigt. Die OTFs für verschiedene Phaseneinstellungen sind unterschiedlich stark moduliert, das bedeutet, daß die verschiedenen PSFs unterschiedlich gut entfaltbar sind. Für  $(c/c)$  ergibt sich eine zusammenhängende OTF mit



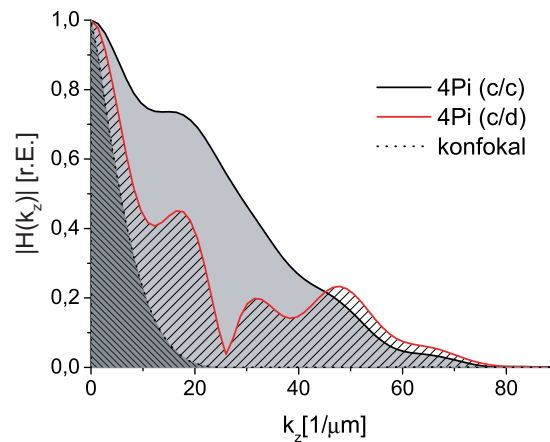


**Abbildung 6.4.** Normierte OTFs für verschiedene Phaseneinstellungen von Anregung und Detektion. Die OTF für (c/c) ist kaum moduliert und alle Ortsfrequenzen werden gut übertragen. Für die Fälle destruktiver Interferenz der Anregung sind die OTFs dagegen stark moduliert und einige Frequenzen werden kaum übertragen. ( $\lambda_{\text{exc}} = 820 \text{ nm}$ ;  $\lambda_{\text{det}} = 525 \text{ nm}$ ;  $2\rho = 0,5 \text{ AU}$ )

kaum ausgeprägtem Minimum an der kritischen Frequenz. Der Wert an  $k_c$  beträgt 73 %. Der hohe Wert an der kritischen Frequenz spiegelt sich in den niedrigen Nebenmaxima in der PSF wider. Die OTF für (c/d) ist ebenfalls nur schwach moduliert und der Wert von  $|H(k_z)|$  an  $k_c$  beträgt etwa 40 %. Damit ist die OTF deutlich über Null und die entsprechenden Daten sind auch bei experimentell erzielten Signal-zu-Rausch-Verhältnissen entfaltbar. Die OTFs bei destruktiver Anregung sind dagegen deutlich stärker moduliert. An der kritischen Frequenz ist die OTF für (d/c) auf 12 % des ursprünglichen Wertes abgesunken und (d/d) ist an  $k_c$  kaum von Null verschieden. Daten, die bei destruktiver Phase von Anregung und Detektion bei geringem Signal-zu-Rausch-Verhältnis aufgenommen werden, sind nicht mehr entfaltbar. Sofern das Anregungslicht konstruktiv interferiert, also für (c/c) und (c/d), sind die aufgenommenen Daten gut entfaltbar. Abbildung 6.5 vergleicht die OTFs dieser Fälle mit der OTF eines Konfokalmikroskops. Die maximal übertragenen Frequenzen sind in beiden 4Pi-Typen ähnlich groß und betragen bei 2-Photonen-Anregung mit  $\lambda_{\text{exc}} = 820 \text{ nm}$  etwa  $70 \mu\text{m}^{-1}$ . In einem Konfokalmikroskop dagegen ist die OTF selbst bei 1-Photonen-Anregung ( $\lambda_{\text{exc}} = 488 \text{ nm}$ ) bereits bei  $k_{\text{max}} = 17 \mu\text{m}^{-1}$  auf 3 % des Ausgangsniveaus ab-

Interferenztyp	$I_{\text{max}}$	Integral
(c/c)	1	1
(c/d)	0,32	0,60
(d/c)	0,32	0,63
(d/d)	0,39	0,72

**Tabelle 6.1.** Berechnete maximale Intensitäten und Integrale des  $z$ -Profils bei verschiedenen Phasen von Anregung und Detektion. Die Werte wurden jeweils auf (c/c) normiert. ( $NA = 1,46$ ;  $n = 1,515$ ;  $\lambda_{\text{exc}} = 820 \text{ nm}$ ;  $\lambda_{\text{det}} = 525 \text{ nm}$ ;  $2\rho = 0,5 \text{ AU}$ )



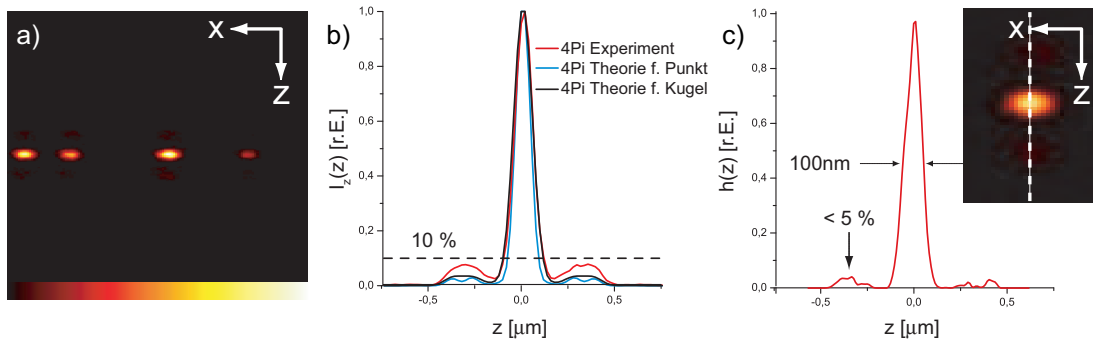
**Abbildung 6.5.** Vergleich von  $|H(k_z)|$  (normiert) für 4Pi-(c/c), 4Pi-(c/d) und für konfokale Detektion. Ein 2-Photonen 4Pi-Mikroskop ( $\lambda_{\text{exc}} = 780 \text{ nm}$ ) transmittiert Frequenzen bis zu  $70 \mu\text{m}^{-1}$  nahezu unabhängig vom Interferenztyp. Für (c/d) werden hohe Frequenzen sogar besser übertragen als, im (c/c)-Fall. In einem Konfokalmikroskop mit  $\lambda_{\text{exc}} = 488 \text{ nm}$  ist die OTF schon bei  $17 \mu\text{m}^{-1}$  auf 3% ihrer Ausgangshöhe abgefallen. ( $NA = 1,46$ ;  $\lambda_{\text{det}} = 525 \text{ nm}$   $2\rho = 0,5 \text{ AU}$ )

gefallen. Die maximal transmittierten Frequenzen in einem 4Pi-Mikroskop sind damit etwa viermal so hoch wie die eines Konfokalmikroskops und entsprechend ist die axiale Auflösung um den Faktor vier höher. Die Tatsache, daß bei (c/c) und (c/d) ähnlich hohe Ortsfrequenzen übertragen werden bedeutet, daß nach Entfaltung der Daten beide Phasenkombinationen dieselbe axiale Auflösung liefern. Bei hohen Frequenzen gibt es Bereiche, die im (c/d)-Fall besser übertragen werden (Abb. 6.5). Diese Bereiche entsprechen steilen Flanken und dem gespaltenen Hauptmaximum in der (c/d)-PSF.

## 6.2 Messungen an technischen und biologischen Proben

Zunächst wurden Experimente an technischen Proben durchgeführt, um die erzielbaren Nebenmaxima und die Auflösung im 2-Photonen 4Pi Typ C Mikroskop zu quantifizieren.

Abbildung 6.6 zeigt Messungen an fluoreszierenden Beads (Yellow-Green-Beads,  $505 \text{ nm}/515 \text{ nm}$ ,  $\varnothing = 100 \text{ nm}$ ). Links ist ein  $xz$ -Schnitt aus einem 3D-Datensatz zu sehen, der bei einer Anregungswellenlänge von  $820 \text{ nm}$  aufgenommen wurde. In Abbildung 6.6b) wird das gemessene  $z$ -Profil (rot) und theoretisch berechnete  $z$ -Profile für ein Punktobjekt (blau), sowie für eine Kugel mit einem Durchmesser von  $100 \text{ nm}$  gezeigt (schwarz). Für ausgedehnte Objekte wird das Minimum im Nebenmaximum aufgefüllt. (Bei größeren Durchmessern wird auch das Mini-

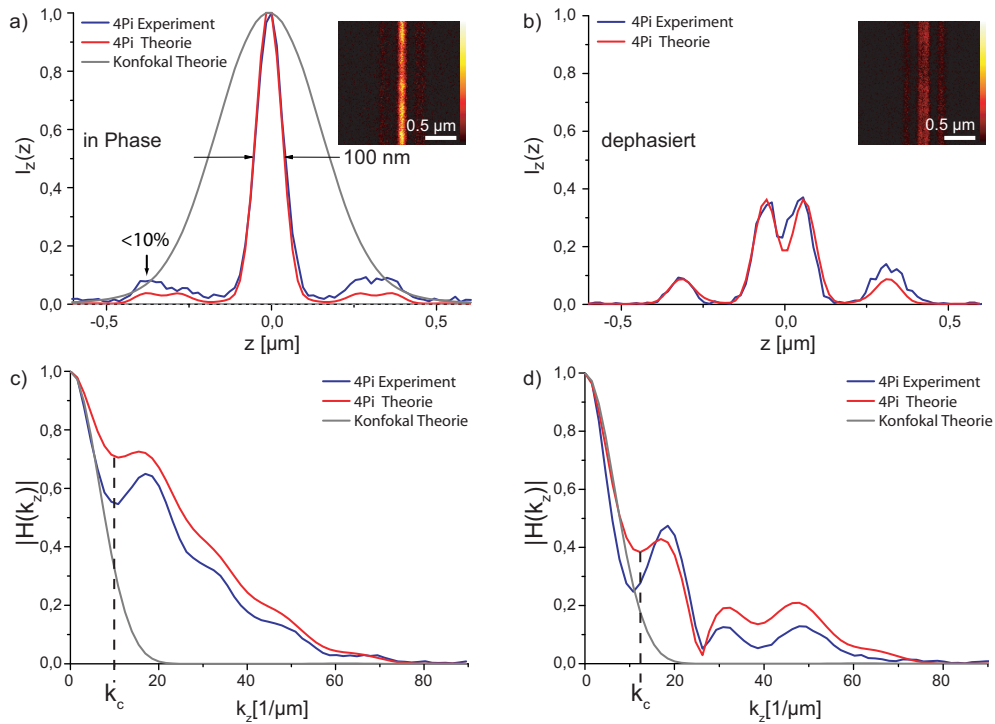


**Abbildung 6.6.** a)  $xz$ -Schnitt aus einem 3D-Datensatz, aufgenommen an Yellow-Green Fluoreszenzbeads ( $\lambda_{\text{exc}} = 820 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{\text{det}} = 525 \text{ nm}$ ) mit  $\varnothing = 100 \text{ nm}$ . b) Gemessenes  $z$ -Profil (rot) verglichen mit dem theoretisch berechneten für ein Punktobjekt (blau) und bei Berücksichtigung der Ausdehnung des Objekts durch Faltung mit einer Kugel ( $\varnothing = 100 \text{ nm}$ ) (schwarz). Das Minimum in den Nebenmaxima des  $z$ -Profils wird bei ausgedehnten Objekten aufgefüllt. Das Linienprofil durch eines der Fluoreszenzbeads (c) zeigt Nebenmaxima unter 5% und eine Halbwertsbreite von 100 nm.

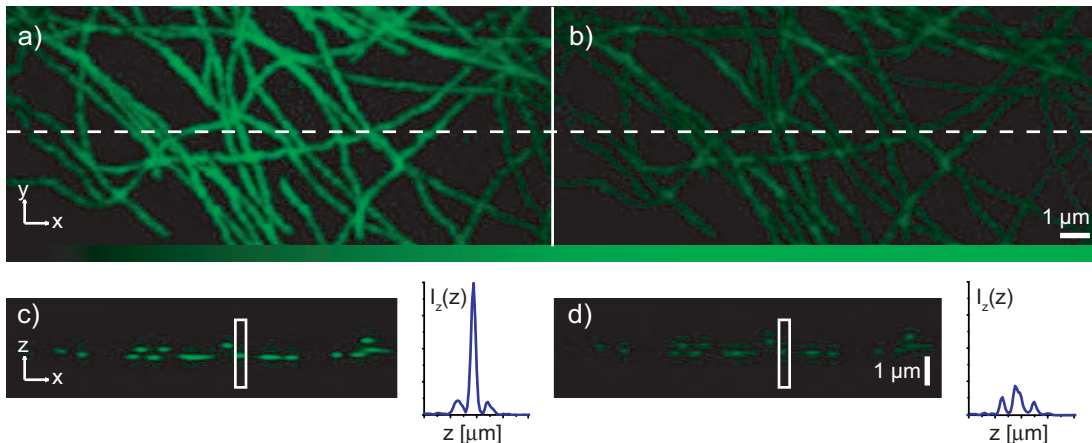
zum Minimum zwischen Haupt- und Nebenmaximum aufgefüllt.) Experiment und Theorie zeigen eine gute Übereinstimmung und die Nebenmaxima sind in beiden Fällen deutlich unter 10%. Das Linienprofil  $h(z)$  durch ein Yellow-Green-Bead (c) zeigt Nebenmaxima unter 5% und eine axiale Halbwertsbreite von 100 nm.

Ein besonders kritischer Test ist die Messung an einer fluoreszenten Schicht. Dazu wurde ein Monolayer aus QDots mit einem Fluoreszenzmaximum bei 525 nm auf einem Deckglas aufgebracht. Die QDots wurden bei 820 nm angeregt. Abbildung 6.7 zeigt die an der Schicht gemessenen  $z$ -Profile bei konstruktiver Anregung und konstruktiver Detektion (a), sowie destruktiver Detektion (b). Die gemessenen Nebenmaxima im (c/c)-Modus liegen unterhalb von 10%. Die Auflösung ist mit 100 nm im Vergleich zur konfokalen PSF (berechnet für  $\lambda_{\text{exc}} = 488 \text{ nm}$ ) deutlich erhöht. (Die theoretische Halbwertsbreite eines Konfokalmikroskops beträgt 370 nm.) Der  $xz$ -Schnitt durch die fluoreszente Schicht in Abbildung 6.7a) zeigt ein schmales, helles Maximum, im Vergleich zum (c/d)-Modus in (b). Hier hat das zentrale Maximum einen „Dip“ in der Mitte und ist in der Intensität um über 60% gegenüber dem (c/c)-Fall reduziert.

Die durch Fouriertransformation ermittelten OTFs sind in den Abbildungen 6.7a) und (b) dargestellt. Erwartungsgemäß liegen die experimentell bestimmten OTFs geringfügig unterhalb den theoretischen Kurven. Die Frequenzen werden in beiden Fällen so gut übertragen, daß die Daten problemlos entfaltet werden können. Für (c/c) beträgt  $|H(k_z)|$  an der kritischen Frequenz 55% und für (c/d) ergeben sich 25%. Theoretisch werden an der kritischen Frequenz 70% für (c/c) und knapp 40% für (c/d) erwartet. Die maximal übertragenen Frequenzen sind in beiden Modi etwa  $k_{\text{max}} \sim 80 \mu\text{m}^{-1}$ . Die erzielbare Auflösung ist damit für (c/c) und (c/d) vergleichbar und etwa einen Faktor vier höher als im konfokalen Fall.



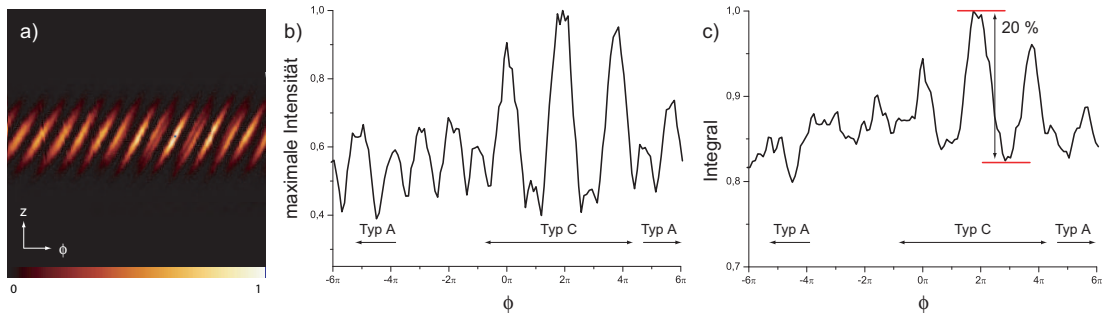
**Abbildung 6.7.** Gemessene  $z$ -Profile einer Schicht aus QDots ( $\lambda_{\text{exc}} = 820 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{\text{det}} = 525 \text{ nm}$ ) bei (c/c)- (a) bzw. (c/d)-Einstellung (b). Zum Vergleich sind die berechneten 4Pi-PSFs und die konfokale PSF eingezeichnet. Die Intensität des Hauptmaximums ist im (c/d)-Fall um 64 % kleiner als bei (c/c)-Einstellung. Das Integral im (c/d)-Fall ist um 28 % reduziert. Die Nebenmaxima liegen im (c/c)-Fall unter 10 %, die Halbwertsbreite beträgt 100 nm. Die entsprechenden OTFs beider Fälle sind in (c) bzw. (d) dargestellt. Die theoretischen Werte bei  $k_c$  sind 70 % für (c/c) und 39 % für (c/d). Die experimentellen Werte liegen etwas unterhalb der Theorie und betragen 55 % bzw. 25 %. Ein Vergleich mit der konfokalen OTF zeigt, daß in beiden 4Pi-Modi höhere Frequenzen übertragen werden.



**Abbildung 6.8.**  $xy$ -Schnitte von Mikrotubuli (gefärbt mit Alexa488) in einer PtK-2 Zelle. Anregung der Fluoreszenz bei  $\lambda_{\text{exc}} = 780 \text{ nm}$ . Die Mikrotubuli wurden bei konstruktiver Anregung und konstruktiver Detektion (a) und bei konstruktiver Anregung und destruktiver Detektion (b) gemessen. In (c) und (d) sind  $xz$ -Schnitte dargestellt, die in (a, b) gestrichelt markierte Stelle zeigen. Exemplarisch ist für beide Einstellungen ein  $z$ -Profil, das an einem Mikrotubulus gemessen wurde, gezeigt.

Zum Vergleich von (c/c)- und (c/d)-Einstellung in biologischen Proben wurden Messungen an Mikrotubuli in PtK2-Zellen durchgeführt, die mit mit Alexa488 markiert wurden. Abbildung 6.8 zeigt den selben  $xy$ -Schnitt einmal im (c/c)-Modus (a) und im (c/d)-Modus (b). Das Signal ist im (c/c)-Fall deutlich heller und klarer. Die gestrichelte Linie zeigt die Position der  $xz$ -Schnitte in der  $xy$ -Darstellung. Die  $xz$ -Schnitte sind zusammen mit einem  $z$ -Profil durch einen Mikrotubulus in (c) und (d) dargestellt. Auch im  $xz$ -Schnitt ist die Struktur bei (c/c)-Einstellung heller. Das  $z$ -Profil verdeutlicht die Intensitätsverhältnisse für beide Einstellungen. Im Fall konstruktiver Anregung und konstruktiver Detektion (c/c) ist ein schmales Hauptmaximum und niedrige Nebenmaxima zu sehen. Im Fall konstruktiver Anregung und destruktiver Detektion (c/d) ist das Signal insgesamt um etwa  $2/3$  reduziert und zeigt ein breites Hauptmaximum und zwei fast ebenso hohe Nebenmaxima. Die an den Mikrotubuli gemessenen 4Pi-Profile stimmen mit den Erwartungen (vgl. Abbildung 6.7) gut überein. Um ein optimales Signal am Detektor zu erzielen, muß für die Messung eine konstruktive Interferenz des Beleuchtungs- sowie des Detektionslichts eingestellt sein.

Abbildung 6.9a) zeigt eine Phasenserie, die an einer Schicht aus grün fluoreszierenden QDots gemessen wurde. Die Phasenserie wurde aufgenommen, indem nach jedem  $xz$ -Schnitt der Luftweg in einem 4Pi-Arm schrittweise, durch Verschieben eines Spiegels (S2 in Abbildung 3.1), verändert wurde. Abbildung 6.9a) ergibt sich aus dem aufgenommenen Datensatz, indem über  $x$  integriert wird. Aus Abbildung 6.9a) ergibt sich weiterhin das  $z$ -Profil bei einer bestimmten Phase  $\phi$  entlang einer Linie parallel zur  $z$ -Achse. Aufgrund der kurzen Kohärenzlänge des



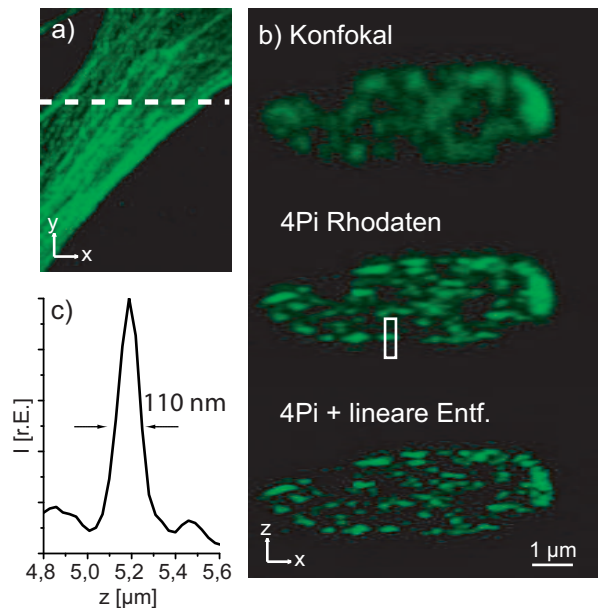
**Abbildung 6.9.** Messung des  $z$ -Profils an einer Schicht aus QDots ( $\lambda_{\text{exc}} = 820 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{\text{det}} = 525 \text{ nm}$ ) (a). Die Phasenserie reicht von Typ A über Typ C zurück zu Typ A. Der Typ C-Bereich läßt sich deutlich anhand der Doppelstruktur und den ausgeprägten Maxima erkennen. Die maximale Intensität entlang  $\phi$  zeigt, daß die Modulationstiefe im Typ C-Bereich größer wird (b). Das Integral der  $z$ -Antwort als Funktion der Phase  $\phi$  ist bei konstruktiv-destruktiver Interferenz um 20 % kleiner als bei konstruktiv-konstruktiver Interferenz (c).

Fluoreszenzlichts beschränkt sich der Typ C Bereich auf wenige Wellenlängen. Die Phasenserie reicht von Typ A über Typ C wieder zu Typ A. In der Phasenserie läßt sich der Typ A-Bereich anhand der gleich hohen Maxima erkennen. Im Typ C-Bereich treten aufgrund der Interferenz des Fluoreszenzlichtes dunklere Maxima mit Doppelstruktur und hellere, schmale Maxima auf.

Der Verlauf der maximalen Intensität mit  $\phi$  ist in Abbildung 6.9b) gezeigt. Die Modulationstiefe der Intensität nimmt im Typ C-Bereich zu. Der Intensitätsunterschied der Maxima ist größer, als im Typ A-Bereich. In einem  $xz$ -Schnitt läßt sich die Phase von  $(c/c)$  anhand des 4Pi-Musters einstellen, sofern beugungsbegrenzt kleine Objekte in der Probe sind. In Abbildung 6.9c) ist der Verlauf des Integrals in Abhängigkeit von der Phase  $\phi$  dargestellt. Im Typ A-Bereich ist nur eine schwache Modulation des Integrals zu sehen, während im Typ C-Bereich der Wert des Integrals für  $(c/d)$  und  $(c/c)$  deutlich unterschiedlich ist. Zwischen  $(c/d)$  und  $(c/c)$  besitzt das Integral einen Unterschied von ca. 20 % und bei der Phaseneinstellung für  $(c/c)$  nimmt das Integral einen Maximalwert an. Dadurch kann die optimale Phaseneinstellung allein durch Bestimmung des Integrals ermittelt werden und ermöglicht somit im Prinzip eine automatische Einstellung der Phase, auch wenn keine feinen Strukturen in der Probe enthalten sind. Aufgrund der großen Intensitätsunterschiede zwischen  $(c/c)$  und  $(c/d)$  ist auch die manuelle Phaseneinstellung durch die hochaperturigen Objektive deutlich erleichtert.

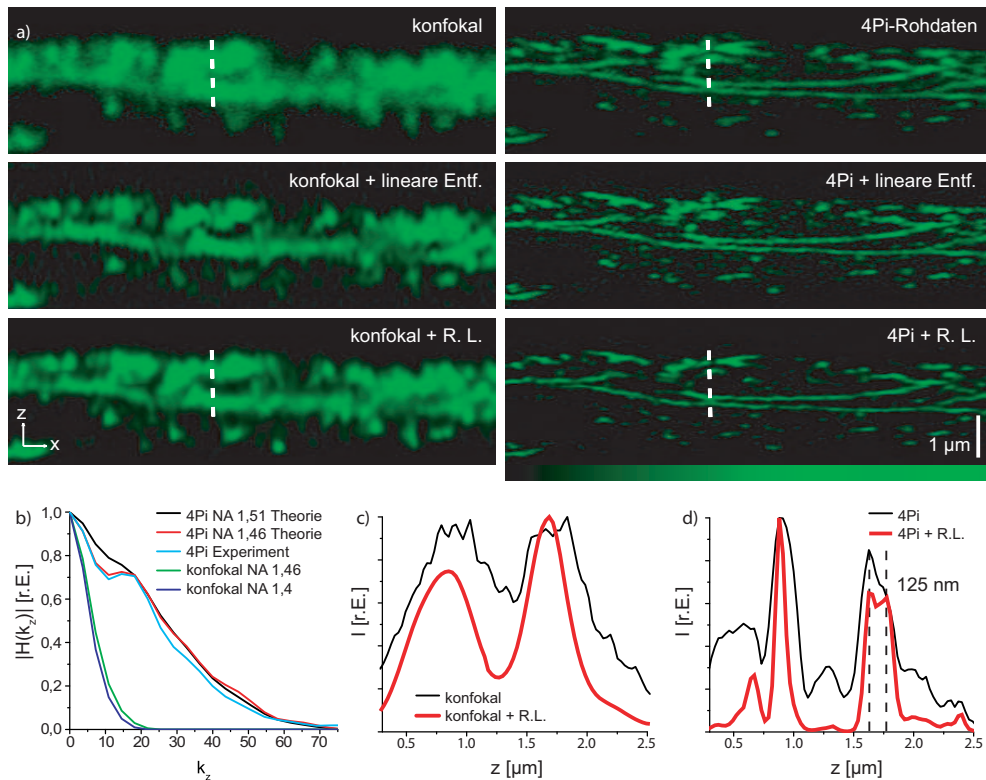
Desweiteren wurden Experimente an SH-SY5Y Zellen und an PtK-2 Zellen durchgeführt, um zu untersuchen, ob Nebenmaxima in der Größenordnung von 10 % auch in biologischen Proben erzielt werden können.<sup>1</sup> Abbildung 6.10 zeigt Mikro-

<sup>1</sup>SH-SY5Y sind neuronienähnliche menschliche Neuroblastomazellen. PtK-2 Zellen sind Nierenzellen der Kängururatte



**Abbildung 6.10.** Aufnahme einer SH-SY5Y-Zelle, deren Mikrotubuli mit Alexa488 gefärbt wurden. Die  $xy$ -Projektion (a) zeigt die in b) dargestellte Schnittebene. Konfokale Aufnahme bei einer Anregungswellenlänge  $\lambda_{\text{exc}} = 488 \text{ nm}$  im Vergleich zu 4Pi-Rohdaten im Typ C bei 2-Photonen-Anregung ( $\lambda_{\text{exc}} = 780 \text{ nm}$ ) sowie die entsprechenden 4Pi-Daten nach linearer Entfaltung (b). Das Profil durch die in (b) markierte Stelle vor Entfaltung zeigt, daß die 4Pi-Rohdaten nur minimale Nebenmaxima besitzen (c).

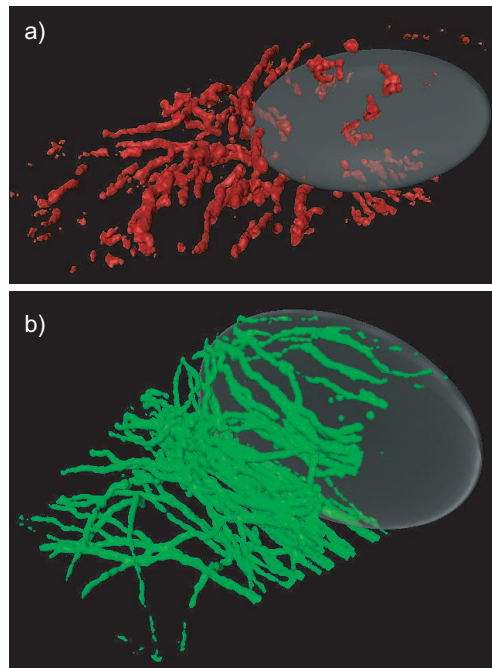
tubuli in SH-SY5Y-Zellen, die mit Alexa488 gefärbt wurden. Die  $xy$ -Projektion zeigt einen Ausschnitt, in dem die Mikrotubuli entlang eines sich ausdifferenzierenden Axons verlaufen. Der gesamte 3D-Datensatz ist  $19 \mu\text{m} \times 13 \mu\text{m} \times 11 \mu\text{m}$  groß. Die Voxelgröße beträgt  $73 \text{ nm} \times 44 \text{ nm} \times 61 \text{ nm}$ . Nacheinander wurden eine konfokale und eine 4Pi-Messung des 3D-Datensatzes durchgeführt. Die gestrichelte Linie markiert die Ebene in der die in (b) dargestellten  $xz$ -Schnitte liegen. Die Ergebnisse der konfokalen Messung werden den 4Pi-Rohdaten und den 4Pi-Daten nach linearer Entfaltung gegenübergestellt. Die Mikrotubuli sind in den 4Pi-Rohdaten feiner aufgelöst als in der konfokalen Messung und zeigen fast verschwindende Nebenmaxima. Das Profil durch den in (b) markierten Mikrotubulus ist in (c) dargestellt. Die Intensität der Nebenmaxima beträgt etwa 10% des Maximums und ist in der Größenordnung des Untergrundes. Die an diesem Mikrotubulus gemessene Halbwertsbreite beträgt  $110 \text{ nm}$ . Die Rohdaten wurden zusätzlich entfaltet, um zu prüfen, in wie weit die Interpretation der Daten durch Entfaltung erleichtert wird. Das Ergebnis nach einer linearen Entfaltung der Rohdaten erscheint etwas klarer, jedoch ergibt sich kaum ein Unterschied zu den Rohdaten. Eine Entfaltung der Rohdaten ist damit nicht notwendig und die 4Pi-Daten können direkt interpretiert werden.



**Abbildung 6.11.** Vergleich einer konfokalen Messung und einer 4Pi-Messung an Mikrotubuli (gefärbt mit Carboxylrhodamin) in einer PtK-2 Zelle. Es werden die Rohdaten, die Ergebnisse nach einer linearen- und einer R.L.-Entfaltung gegenübergestellt. In beiden Fällen wird die Auflösung durch Entfaltung erhöht. Die Profile zeigen, daß nach R.L.-Entfaltung die 4Pi-Messung (d) eine höhere axiale Auflösung als die konfokale Messung (c) besitzt. Mikrotubuli mit einem Abstand von 125 nm können im 4Pi-Modus getrennt werden. Die OTFs (b) zeigen gute Übereinstimmung von Experiment und Theorie. Die theoretische Kurve für  $NA = 1,51$  ( $\alpha = 85^\circ$ ) liegt nur geringfügig über der OTF für die verwendeten Objektive.

In einem weiteren Experiment wurde untersucht, ob und wie mit linearer und nicht-linearer Entfaltung (Richardson-Lucy-Algorithmus) die Auflösung der konfokalen, sowie der 4Pi-Daten gesteigert werden kann. Abbildung 6.11 zeigt Mikrotubuli in einer PtK-2 Zelle, die mit Carboxylrhodamin gefärbt wurden. Es wurde ein  $xz$ -Schnitt im konfokalen Modus bei einer Anregungswellenlänge von  $\lambda_{exc} = 568$  nm und im 4Pi-Fall bei einer Anregungswellenlänge von  $\lambda_{exc} = 780$  nm aufgenommen. Die 4Pi-Rohdaten zeigen auch hier deutlich feiner aufgelöste Strukturen, als die konfokale Messung. Abbildung 6.11a) zeigt, daß die Auflösung beider Datensätze durch lineare und Richardson-Lucy-Entfaltung erhöht wird. In (c) und (d) sind die Profile durch die in den  $xz$ -Schnitten gestrichelt markierte Stelle für die konfokale bzw. die 4Pi-Messung vor Entfaltung (schwarz) dargestellt. Das Profil der 4Pi-Rohdaten zeigt zwei klar getrennte Maxima, die





**Abbildung 6.12.** Mitochondrien gefärbt mit Rhodamin (a) und Mikrotubuli gefärbt mit Alexa488 (b) in PtK-2 Zellen. Die 2-Photonen 4Pi-Rohdaten wurden mit der Software AMIRA ohne vorherige Entfaltung der Datensätze visualisiert. Es sind keine Artefakte durch 4Pi-Nebenmaxima zu beobachten.

konfokal gerade noch getrennt werden können. Die Profile nach Richardson-Lucy-Entfaltung sind rot dargestellt. Im konfokalen Fall ist das Minimum nach Entfaltung ausgeprägter. Das Profil durch den entfalteten 4Pi-Datensatz (rot) zeigt zusätzlich zu den konfokal aufgelösten Maxima eine Substruktur. Die residualen Nebenmaxima wurden durch die Entfaltung entfernt und es können zwei Mikrotubuli aufgelöst werden, die an dieser Stelle parallel verlaufen. Ihr Abstand beträgt 125 nm. Die Profile nach Richardson-Lucy-Entfaltung (R.L.) zeigen, daß die Auflösung zwar in beiden Fällen gesteigert werden kann, die Auflösung der 4Pi-Daten den konfokalen Daten aufgrund der höheren Auflösung der Rohdaten überlegen ist. In (b) sind die theoretischen und gemessenen OTFs verglichen, die aus der Abbildung durch Fouriertransformation berechnet wurden. Die experimentelle 4Pi-OTF stimmt sehr gut mit der theoretisch erwarteten OTF für Objektive mit  $NA = 1,46$  überein. Zusätzlich ist die OTF für ein 2-Photonen 4Pi-Mikroskop vom Typ C eingezeichnet, wenn Objektive mit einer numerischen Apertur von 1,51 gefertigt werden könnten. Dies entspricht einem Semiaperturwinkel von  $85^\circ$ . Die Kurve liegt nur unwesentlich über der Kurve für Objektive mit  $NA = 1,46$  und in beiden Fällen ist die OTF fast komplett aufgefüllt. 2-Photonen 4Pi Typ C ist mit den verwendeten ultra-hochaperturigen Objektiven bereits fast an der physikalischen Grenze angelangt und die zu erwartenden Verbesserungen durch eine weitere Vergrößerung des Öffnungswinkels sind in diesem 4Pi-Typ gering.

In Abbildung 6.12 sind 3D-Messungen von Mitochondrien (a) und Mikrotubuli (b) in PtK-2 Zellen dargestellt. Die Mitochondrien wurden mit Carboxylrhodamin, die Mikrotubuli mit Alexa488 markiert. Bei den Messungen wurde eine Anregungswellenlänge von  $\lambda_{\text{exc}} = 760 \text{ nm}$  verwendet. Beide Datensätze wurden nicht entfaltet, sondern direkt mit dem „Isosurface“-Werkzeug der Software AMIRA visualisiert. Um die 3D-Struktur besser darzustellen wurde der Nukleus durch ein Ellipsoid visualisiert.

Die Schwelle wird bei der Visualisierung so gesetzt, daß der Untergrund nicht mehr dargestellt wird. Die Schwelle ist dabei so niedrig gewählt, daß die Mikrotubuli nicht unterbrochen werden.<sup>2</sup> Die residualen Nebenmaxima betragen nur noch ca. 10 % und sind damit niedriger als die Schwelle. Sie führen somit in der Visualisierung nicht zu den sonst typischen 4Pi-Artefakten. Der Datensatz der Mitochondrien-Messung besteht aus 177  $xz$ -Schnitten und ist insgesamt  $24 \mu\text{m} \times 8 \mu\text{m} \times 11 \mu\text{m}$  groß; die Voxelgröße beträgt  $50 \text{ nm} \times 28 \text{ nm} \times 61 \text{ nm}$ . Jede Zeile wurde acht Mal gemittelt. Die Meßzeit betrug etwa 45 min.

Der Datensatz der Mikrotubuli ist  $19 \mu\text{m} \times 8 \mu\text{m} \times 10 \mu\text{m}$  groß, es wurden 159  $xz$ -Schnitte aufgenommen. Die Voxelgröße beträgt  $73 \text{ nm} \times 30 \text{ nm} \times 61 \text{ nm}$ , dabei wurde jede Zeile achtmal gemittelt. Die gesamte Aufnahmezeit des Datenstapels betrug ca. 20 min.

## Zusammenfassung

In einem 4Pi-Mikroskop vom Typ C mit 2-Photonen-Anregung und den ultrahochaperturigen Objektiven können in biologischen Proben Nebenmaxima mit Intensitäten von unter 10 % der Intensität des Hauptmaximums erzielt werden. Damit sind die Abbildungen quasi frei von Artefakten und auf eine Entfaltung der Daten, die bisher zwingend notwendig war, kann verzichtet werden. Die Ergebnisse sind bereits während der Aufnahme interpretierbar. Theoretisch hätten schon die standardmäßig verwendeten Öbobjektive Werte unter 10 % liefern sollen. Doch erst die Kombination der hochaperturigen Objektive mit dem hier vorgestellten Einbettmedium Thiodiethanol (TDE, vgl. Kapitel 3.3), ermöglicht die Aufnahme von Daten mit nahezu verschwindend kleinen Nebenmaxima. Ein weiterer entscheidender Faktor ist der Corr-Ring der Objektive, er erlaubt es probenabhängige Restaberrationen auszugleichen und somit minimale Nebenmaxima zu erzielen.

---

<sup>2</sup>In Abbildung 6.12b) sind die Mikrotubuli am Rand des Volumens dennoch unterbrochen. Der Grund dafür ist, daß bei dieser Messung die Vergrößerungsdifferenz der Objektive noch nicht angepaßt wurde und das Bildfeld entsprechend klein ist. Am Rand des Bildfelds fokussieren die Objektive nicht auf den selben Punkt. Dies führt zu einem reduzierten Signal am Rand des Bildfelds und bei der Visualisierung zu unterbrochenen Strukturen.

# Kapitel 7

## 2-Kanal 4Pi-Mikroskopie

Fluoreszenzmikroskopie mit 2-Photonen-Anregung besitzt aufgrund der höheren Bleichrate [40] eine geringere Signalausbeute, als bei 1-Photonen-Anregung. Aus diesem Grund beschäftigt sich dieses Kapitel damit, wie in einem 2-Photonen 4Pi-Mikroskop das emittierte Fluoreszenzsignal möglichst effizient genutzt werden kann. Insbesondere bei schwachem Signal, wie es bei 2-Photonen-Anregung oft der Fall ist, oder bei schnell bleichenden Fluorophoren, ist dies von großem Interesse.

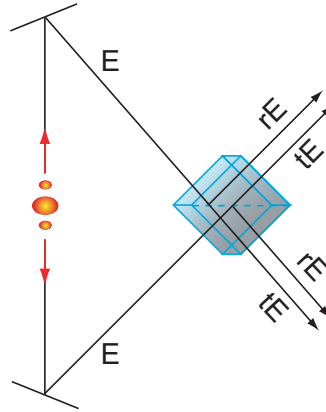
In einem 4Pi-Aufbau wird durch die gegenüberliegenden Objektive doppelt so viel Fluoreszenzlicht wie in einem Konfokalmikroskop aufgesammelt. Aufgrund der hohen numerischen Apertur der Objektive wird insgesamt 72% der emittierten Fluoreszenz gesammelt. Der Nachteil der bisherigen 4Pi-Aufbauten ist allerdings, daß nur etwa die Hälfte des Fluoreszenzsignals detektiert wird, denn aus Symmetriegründen verläßt knapp die Hälfte das 4Pi-Mikroskop am zweiten Ausgang des Strahlteilers.<sup>1</sup> In diesem Kapitel wird untersucht, welche Eigenschaften das Signal am zweiten Ausgang besitzt und ob es genutzt werden kann, um die Signalausbeute zu verdoppeln.

### 7.1 Phasenverhalten am Strahlteiler

Abbildung 7.1 zeigt eine Prinzipskizze des 4Pi-Moduls. Das von der Probe emittierte Fluoreszenzlicht wird von beiden gegenüberliegenden Objektiven aufgesammelt. Am Strahlteiler wird ein Teil des Lichts reflektiert (Reflexionskoeffizient  $r$ ) und der andere Teil wird transmittiert (Transmissionskoeffizient  $t$ ). In einem

---

<sup>1</sup>Im Prinzip gilt das auch für die Anregung, jedoch kann dieser Verlust durch erhöhte Laserleistung wieder kompensiert werden.



**Abbildung 7.1.** Skizze zur Herleitung des Phasenverhaltens des Fluoreszenzlichtes am Strahlteiler. Das emittierte Fluoreszenzlicht mit Feldstärke  $E$  wird am Strahlteiler reflektiert ( $rE$ ) bzw. transmittiert ( $tE$ ), dabei sind  $r$  und  $t$  Reflexions- bzw. Transmissionskoeffizienten.

symmetrischen Aufbau müssen die Intensitäten, die vom Strahlteiler ausgehen  $|rE + tE|^2$  der Summe der auftreffenden Intensitäten  $|E|^2$  entsprechen:

$$\begin{aligned} |rE + tE|^2 + |rE - tE|^2 &= |E|^2 + |E|^2 \\ |r|^2 + rt^* + tr^* + |t|^2 &= 1. \end{aligned} \quad (7.1)$$

Ohne Absorption gilt wegen der Energieerhaltung  $|r|^2 + |t|^2 = 1$ . Damit verkürzt sich Gleichung 7.1 auf  $rt^* + tr^* = 0$ . Für die Phasen von reflektierten und transmittierten Wellen gilt damit:

$$e^{i(\phi_r - \phi_t)} = -e^{i(\phi_t - \phi_r)}. \quad (7.2)$$

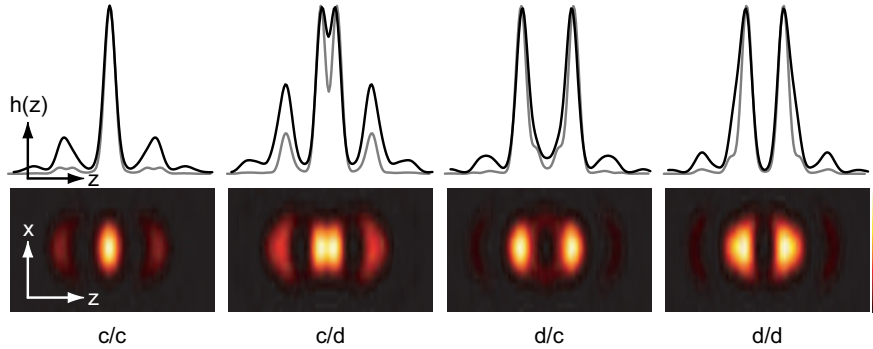
Diese Gleichung kann umgeschrieben werden zu

$$\begin{aligned} e^{i(\phi_r - \phi_t)} &= e^{i\pi} e^{i(\phi_t - \phi_r)} \\ e^{2i(\phi_r - \phi_t)} &= e^{i\pi}. \end{aligned} \quad (7.3)$$

Damit gilt für den Phasenunterschied  $\Delta\phi$  von reflektiertem und transmittiertem Strahl, bei identischer optischer Weglänge, auf beiden Pfaden:

$$\Delta\phi := \phi_r - \phi_t = \frac{\pi}{2}. \quad (7.4)$$

Die optische Weglänge wird nun beispielsweise so eingestellt, daß der reflektierte und der transmittierte Strahl an einem Ausgang des 4Pi-Moduls konstruktiv interferieren, also  $\Delta\phi = 0$ . Dazu wird die optische Weglänge eines Pfades durch Verfahren eines piezogesteuerten Spiegels um  $-\pi/2$  geändert (Abb. 7.5). Für den anderen Ausgang des Strahlteilers bedeutet das einen Phasenunterschied



**Abbildung 7.2.** Nicht-konfokale, normierte PSFs und  $z$ -Profile für verschiedene Phasenkombinationen von Anregung und Detektion. Die Nebenmaxima bei (c/c) und (c/d) sind im Vergleich zur konfokalisierten Messung erhöht und das gespaltene Hauptmaximum bei (c/d) ist weniger stark ausgeprägt (Zum Vergleich sind die konfokalen PSFs (grau) eingezeichnet). ( $NA = 1,46$ ;  $\lambda_{\text{exc}} = 820 \text{ nm}$ ;  $\lambda_{\text{det}} = 525 \text{ nm}$ )

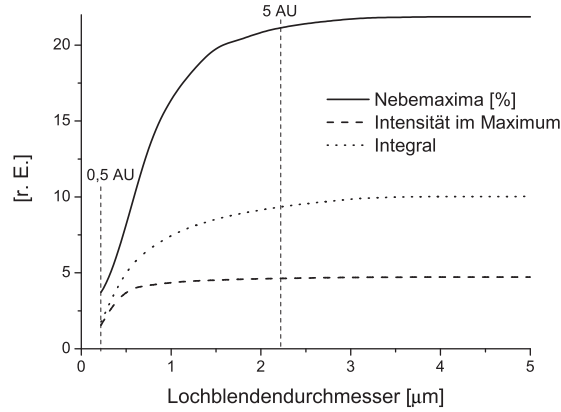
zwischen reflektiertem und transmittiertem Strahl von  $\Delta\phi = \pi$ . Insgesamt besitzen die beiden Strahlteilerausgänge im 4Pi-Mikroskop eine Phasendifferenz von  $\pi$  für das Fluoreszenzsignal. Das Signal an beiden Ausgängen ist daher immer komplementär, d. h. wird an einem Ausgang konstruktive Anregung und konstruktive Detektion (c/c) eingestellt, ergibt sich am anderen Ausgang automatisch konstruktive Anregung und destruktive Detektion (c/d) bzw. umgekehrt.

## 7.2 Nicht-konfokales 2-Photonen 4Pi-Mikroskop im Typ C

Das Signal, das das 4Pi-Mikroskop am zweiten Ausgang des Strahlteilers verläßt, wird nicht-konfokal detektiert. Aus diesem Grund beschäftigt sich dieser Abschnitt mit den Eigenschaften eines nicht-konfokalen 4Pi-Mikroskops.

In einem Konfokalscanner ergibt sich die axiale Auflösung durch eine Lochblende im Detektionspfad. In einem 4Pi-Mikroskop dagegen wird die axiale Auflösung durch die kohärente Superposition der entgegengesetzt propagierenden sphärischen Wellen erzeugt. Die Lochblende dient nur einer zusätzlichen Reduktion der Nebenmaxima der PSF. Bei ausreichend niedrigen Nebenmaxima sollte auf die Lochblende verzichtet werden können. Erste Ergebnisse dazu sind in [17] vorgestellt. Dort wird eine nahezu nicht-konfokale Messung durchgeführt, indem die Lochblende am konventionellen Detektionspfad geöffnet wurde.

Hier wird nun untersucht, welchen Einfluß die Detektionslochblende auf eine 4Pi-PSF hat. Die nicht-konfokale PSF eines 4Pi-Mikroskops mit 2-Photonen-Anregung und kohärenter Detektion des Fluoreszenzlichtes (Typ C) ist gegeben



**Abbildung 7.3.** Verlauf der Intensität der Nebenmaxima im  $z$ -Profil, der Intensität im Hauptmaximum und des gesamten Integrals bei zunehmendem Lochblendendurchmesser von  $0,5 \text{ AU}$  bis  $11 \text{ AU}$  für konstruktive Phasen für Anregung und Detektion ( $c/c$ ). ( $\lambda_{\text{exc}} = 820 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{\text{det}} = 525 \text{ nm}$ ,  $NA = 1,46$ )

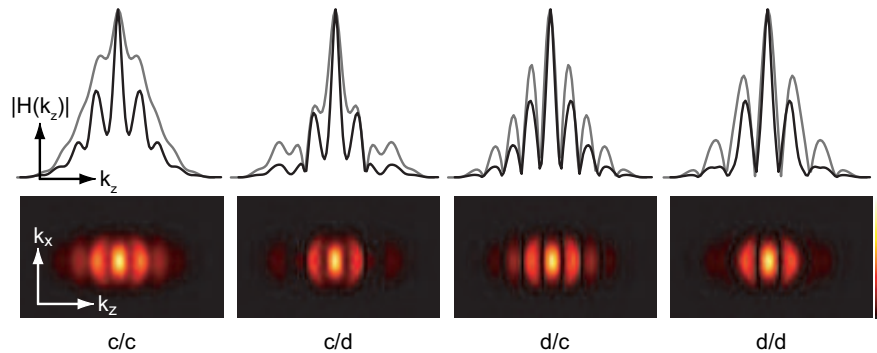
durch:

$$\begin{aligned} h_{4\text{PiTypC}}^{2\text{ph}}(\vec{r}) &= h_{\text{exc}4\text{Pi}}^{2\text{ph}}(\vec{r}) \cdot h_{\text{det}4\text{Pi}}(\vec{r}) \\ &= |\vec{E}_{\text{exc}}(\vec{r}) + \hat{M}\vec{E}_{\text{exc}}(\hat{M}\vec{r})|^4 \cdot |\vec{E}_{\text{det}}(\vec{r}) + \hat{M}\vec{E}_{\text{det}}(\hat{M}\vec{r})|^2. \end{aligned} \quad (7.5)$$

Die PSFs und die dazugehörigen Linienprofile bei nicht-konfokaler Detektion sind in Abbildung 7.2 dargestellt. Die PSFs wurden unter denselben Bedingungen wie die entsprechenden, konfokalisiert PSFs (Abb. 6.3) berechnet.<sup>2</sup> Das Linienprofil  $h(z)$  einer nicht-konfokalen PSF im ( $c/c$ )-Fall zeigt mit 15 % höhere Nebenmaxima, als das entsprechende Linienprofil im konfokalen Fall mit 2 %. Das entspricht den Erwartungen, da die Lochblende zu einer stärkeren axialen Diskriminierung führt und somit die Nebenmaxima reduziert. Das Minimum im Hauptmaximum des ( $c/d$ )-Linienprofils ist weniger stark ausgeprägt und die Nebenmaxima sind erhöht.

Abbildung 7.3 zeigt den Verlauf der maximalen Signalintensität und das Integral in willkürlichen Einheiten in Abhängigkeit vom Durchmesser der Detektionslochblende. Zur Berechnung wurde  $NA = 1,46$ ;  $n = 1,515$ ;  $\lambda_{\text{exc}} = 820 \text{ nm}$  und  $\lambda_{\text{det}} = 525 \text{ nm}$  angenommen. Es zeigt sich, daß im 2-Photonen 4Pi Typ C durch den Verzicht auf die Detektionslochblende das detektierte Signal um einen Faktor 3 gegenüber einer konfokalen Messung ( $2\rho = 0,5 \text{ AU}$ ) gesteigert werden kann. Das Verhalten der Nebenmaxima ist ebenfalls dargestellt. Sie steigen bis zu einem Lochblendendurchmesser von etwa  $3 \mu\text{m}$  an. Die Höhe der Nebenmaxima im  $z$ -Profil steigt von 4 % auf 22 % bei geöffneter Lochblende und liegt damit

<sup>2</sup>Abbildung 7.3 zeigt, daß über einem Lochblendendurchmesser von etwa  $5 \text{ AU}$  keine weiteren Änderungen zu erwarten sind. Zur Berechnung der nicht-konfokalen PSFs wurde  $2\rho = 11 \text{ AU}$  angenommen. Bei einer Fluoreszenzwellenlänge von  $\lambda = 530 \text{ nm}$  und Objektiven mit  $NA=1,46$  entspricht 1 Airy-Einheit [AU]  $0,44 \mu\text{m}$ .



**Abbildung 7.4.** Normierte, nicht-konfokale OTFs (schwarz) zu den PSFs aus Abb. 7.2. Die nicht-konfokalen OTFs liegen unter den konfokalen OTFs (grau), die Werte an  $k_c$  für (c/c) und (c/d) sind aber deutlich über Null. Hohe Frequenzen werden geringfügig schlechter übertragen als im konfokalen Fall ( $k_{\max} = 60 \mu\text{m}^{-1}$  im Vergleich zu etwa  $k_{\max} = 70 \mu\text{m}^{-1}$  für konfokale Detektion).

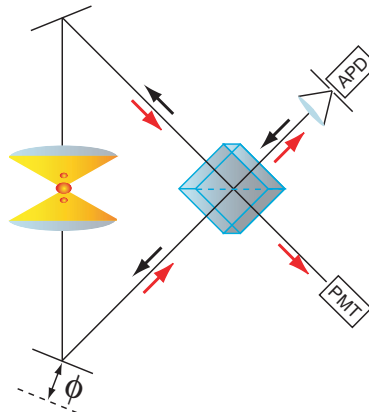
immer noch deutlich unter 50 %.

Die OTFs, die sich für nicht-konfokale Detektion ergeben, sind in Abbildung 7.4 gezeigt. Die OTFs für den nicht-konfokalen Fall liegen unterhalb der konfokalen OTFs, d. h. die Ortsfrequenzen werden etwas schwächer übertragen. Die OTF ist im nicht-konfokalen Fall bei  $k_{\max} = 60 \mu\text{m}^{-1}$  auf 3 % des Ursprungswertes abgesunken. Diese Tatsache spiegelt sich in der PSF durch eine geringfügig schlechtere axiale Auflösung wider: Die nicht-konfokale PSF hat eine theoretische Halbwertsbreite von 100 nm, im Vergleich zu 93 nm, für die konfokale PSF.

Der Wert an der kritischen Frequenz  $|H(k_c)|$  liegt im nicht-konfokalen Fall für konstruktive Anregung und konstruktive Detektion (c/c) bei 26 % bzw. bei destruktiver Detektion (c/d) bei 12 %. Damit liegt er in diesen Fällen deutlich über Null. Für beide Fälle mit destruktiver Anregung sind die OTFs stark durchmoduliert und die Ortsfrequenzen werden bei  $k_c$  nur schwach übertragen. Die entsprechenden Werte für (d/c) und (d/d) betragen 6 % bzw. 3 %. (Abbildungen, die unter diesen Bedingungen aufgenommen werden, werden nur bei günstigem Signal-zu-Rausch-Verhältnis entfaltbar sein.)

### 7.3 Detektion des Signals an beiden Ausgängen des 4Pi-Moduls

Um das Signal am zweiten Ausgang des Strahlteilerwürfels zu messen, wurde im Rahmen dieser Arbeit ein zweiter Detektionskanal aufgebaut (Abb. 3.2). Der Aufbau ist in Abbildung 7.5 skizziert. Das Signal, das üblicherweise in einem 4Pi-Aufbau verwendet wird (oberer Detektionspfad), wird gelangt in den Konfokalscanner, wird dort „de-scanned“, so daß wieder ein stehender Strahl entsteht.



**Abbildung 7.5.** Aufbau zur simultanen Messung einer Phasenserie an beiden Ausgängen des Strahlteilers im 4Pi-Modul. Das Signal am Ausgang, der in den Scanner zurückführt, wird „de-scanned“, auf eine Lochblende fokussiert und mit einer APD aufgenommen. Am nicht-konfokalisiertem Ausgang ist ein PMT angebracht. Die Phasenserie wird durch Änderung der optischen Weglänge in einem Arm des 4Pi-Moduls durch Verschieben eines Spiegels erzeugt.

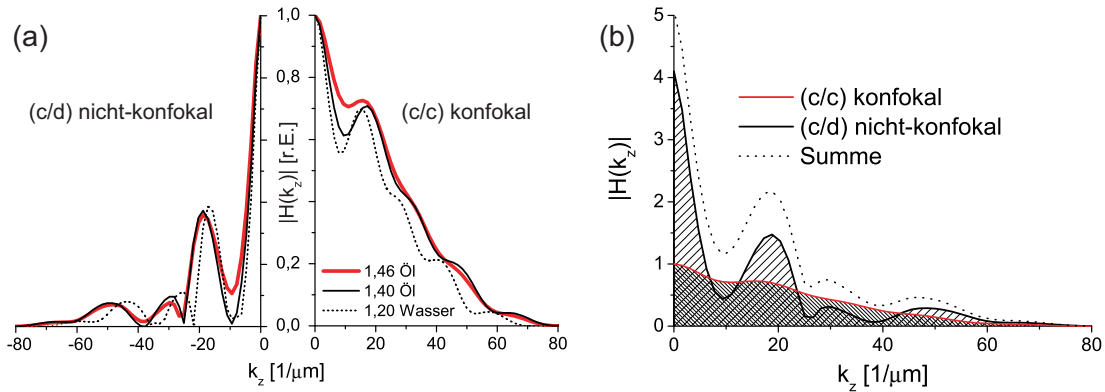
Dieser wird auf eine Lochblende fokussiert und anschließend mit einer APD detektiert. Das Signal am anderen Ausgang des 4Pi-Moduls ist nicht „de-scanned“ und wird daher nicht-konfokal aufgenommen. Aus dem selben Grund wird auch eine größere Detektionsfläche benötigt. Am zweiten Ausgang des 4Pi-Moduls (unterer Detektionspfad) wurde deshalb ein PMT angebracht.

Wird für eine Messung (c/c) am konfokalen Detektionspfad eingestellt, ergibt sich am zweiten Ausgang des Strahlteilers automatisch (c/d). Aus Tabelle 6.1 läßt sich ablesen, daß in diesem Fall am konfokalen Ausgang 62% des Signals detektiert werden und 38% das 4Pi-Mikroskop am Strahlteiler ungenutzt verlassen. Selbst wenn durch konstruktive Anregung und konstruktive Detektion das am konfokalen Ast detektierte Signal maximiert wird, geht am Strahlteiler noch knapp die Hälfte des Signals verloren. Wird dieses Signal zusätzlich detektiert, kann die Signalausbeute fast verdoppelt werden.

Aufgrund der unterschiedlichen Detektionsphasen kann das Signal aus beiden Kanälen nicht direkt aufaddiert werden, sondern muss erst entfaltet und anschließend summiert werden. Alternativ können die beiden Datensätze kombiniert entfaltet werden.

Abbildung 7.6a) zeigt die OTFs die sich bei (c/d) mit nicht-konfokaler Detektion und (c/c) bei konfokaler Detektion für verschiedene Objektive (Wasser NA = 1,2 und Öl mit NA = 1,4 bzw. NA = 1,46) ergeben. Erst die hier verwendeten Objektive mit NA = 1,46 weisen auch bei (c/d) im nicht-konfokalen Fall am der kritischen Frequenz Werte deutlich über Null auf, so daß die hier vorgestellte Methode erst mit den hochaperturigen Objektiven möglich wird. Die OTFs für konfokale Detektion im (c/c)-Fall und nicht-konfokale Detektion im (c/d)-Fall sind in Ab-



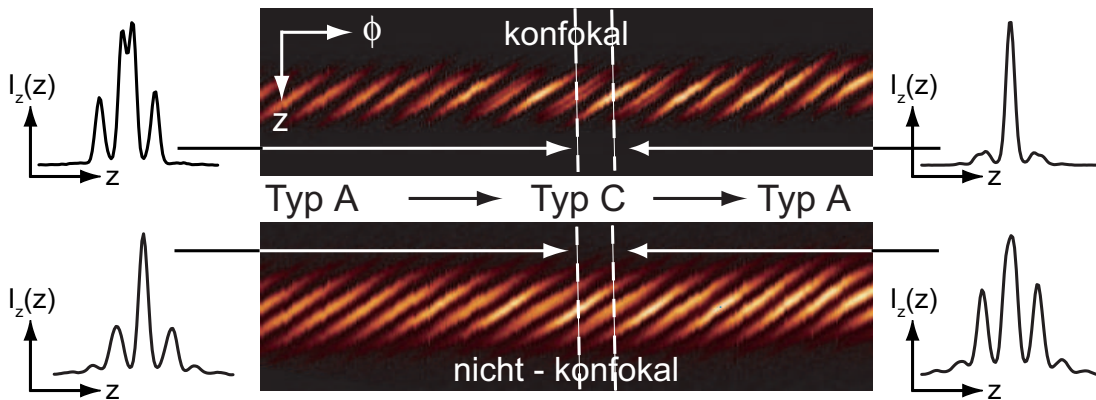


**Abbildung 7.6.** (a) Vergleich der normierten theoretischen OTFs bei nicht-konfokaler Detektion (c/d) und bei konfokaler Detektion (c/c) für verschiedene Objektive. ( $\lambda_{\text{exc}} = 820 \text{ nm}$ ;  $\lambda_{\text{det}} = 525 \text{ nm}$ ). (b) Intensitätsvergleich der theoretischen OTFs bei konfokaler Detektion (c/c) mit  $2\rho = 0,5 \text{ AU}$  und simultaner nicht-konfokaler Detektion (c/d) am zweiten Ausgang des 4Pi-Moduls für Objektive mit  $NA = 1,46$ .

bildung 7.6b) dargestellt. Für die Berechnung der OTF im nicht-konfokalen-Fall wurde ein Lochblendendurchmesser von 11 AU und im konfokalen-Fall 0,5 AU eingesetzt.  $|H(k_z)|$  des nicht-konfokalen Kanals liegt bei kleinen Ortsfrequenzen über der konfokalen OTF, da der Untergrund im nicht-konfokalen Fall deutlich höher ist. Aufgrund der konstruktiv-destruktiven Interferenz sind außerdem hohe Frequenzen in der nicht-konfokalen OTF stärker vertreten. An der kritischen Frequenz sinkt die nicht-konfokale OTF jedoch stark ab, so daß diese Frequenzen im konfokalen (c/d)-Fall besser übertragen werden. Dieses Verhalten kann sich eine kombinierte Entfaltung zu Nutze machen, um jeweils die PSF zu verwenden, die an der entsprechenden Frequenz besser übertragen wird. Ein Richardson-Lucy-Algorithmus, der die zwei Detektionskanäle kombiniert entfaltet, wurde in [11] vorgestellt. Simulationen zeigen, daß der Fehler der Richardson-Lucy-Restauration bei kombinierter Entfaltung der beiden Kanäle um 12 % reduziert werden kann [11]. Diese Verbesserung ist nahezu konstant für alle Signalstärken und entspricht einer Erhöhung der Photonenzahl im konfokalen (c/c)-Fall um etwa 50 %.

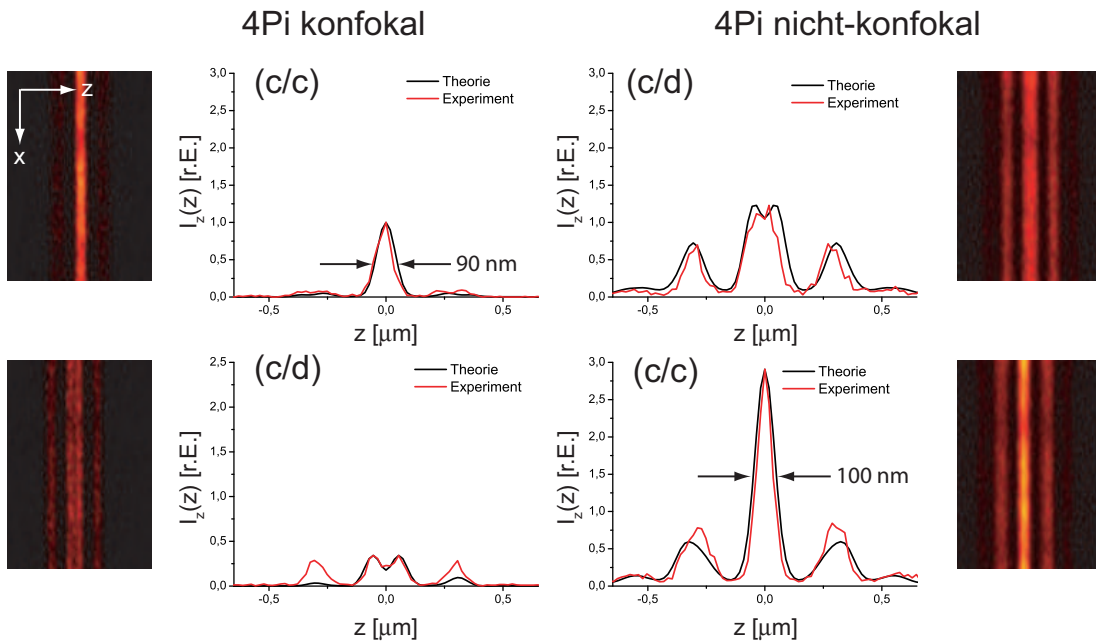
## 7.4 2-Kanal-Messungen an technischen und biologischen Proben

Zur Überprüfung des in Kapitel 7.1 vorgestellten Verhaltens, werden an beiden Ausgängen des Strahlteilers simultan Phasenserien aufgenommen. Phasenserien können erzeugt werden, indem entweder die Dispersionskeile gegeneinander ver-



**Abbildung 7.7.** Simultane Messung einer Phasenserie am konfokalen und am nicht-konfokalen Ausgang des Strahlteilers. Die Serie zeigt den Übergang von 4Pi Typ A über Typ C und wieder zu Typ A. Aufgrund der Phasenverschiebung der Fluoreszenz um  $\pi$  an den Ausgängen verhalten sich die Signale im Typ C an beiden Ausgängen komplementär. Die Messung wurde an einer Schicht aus QDots durchgeführt. ( $\lambda_{\text{exc}} = 780 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{\text{det}} = 525 \text{ nm}$ )

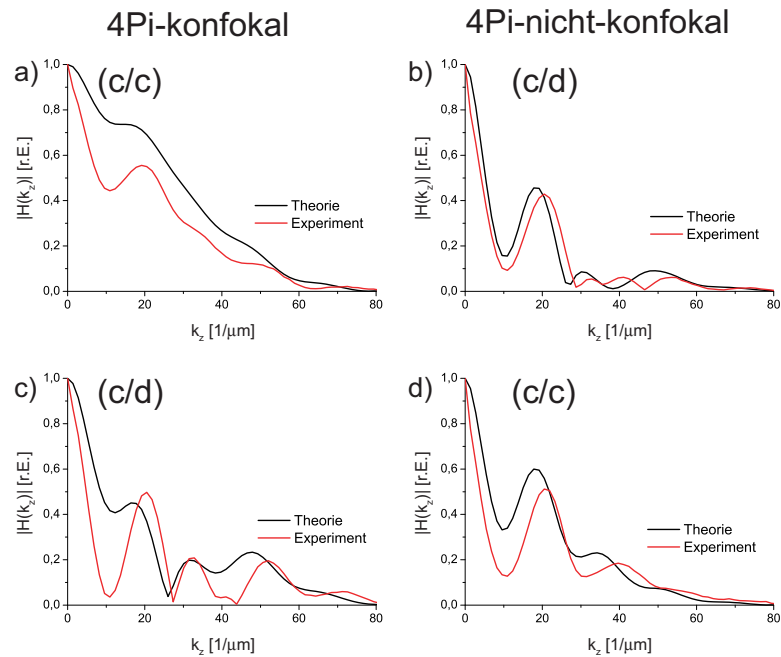
schoben werden, oder die Luftweglänge in einem Arm des 4Pi-Moduls durch Verfahren des Spiegels geändert wird. Hier wurde die optische Weglänge verändert, indem der auf einem Piezoaktor angebrachte Spiegel S2 verschoben wurde. Der Piezoaktor an S2 besitzt einen Hub von  $12 \mu\text{m}$ . Dieser Hub ist größer als die Kohärenzlänge des Fluoreszenzlichtes. Aus diesem Grund kann eine Phasenserie den Bereich von 4Pi Typ A über Typ C und wieder Typ A abdecken. (Für alle in diesem Kapitel vorgestellten Messungen wurde im konfokalen Fall ein Lochblendendurchmesser von  $0,5 \text{ AU}$  verwendet). Zur Messung der Phasenserie wurde eine dünne Schicht QDots ( $\lambda_{\text{det}} = 525 \text{ nm}$ ) auf einen Objektträger aufgebracht. Für jede Position des Spiegels S2 wurde ein  $xz$ -Schnitt aufgenommen. Abbildung 7.7 besteht aus 400  $xz$ -Schnitten. Durch Integration entlang der  $x$ -Achse wurde das  $z$ -Profil berechnet. Die einzelnen  $z$ -Profile für verschiedene Spiegelpositionen ergeben sich aus Abbildung 7.7 als vertikale Schnitte. Im Bereich, in dem nur kohärent beleuchtet, aber inkohärent detektiert wird (Typ A), zeigen beide Ausgänge einen identischen Signalverlauf. Das entspricht den Erwartungen, da das Anregungslicht an beiden Ausgängen dieselbe Phase besitzt. Im Typ C-Bereich zeigt sich dagegen ein komplementäres Verhalten in beiden Detektionskanälen. Das Fluoreszenzlicht weist eine Phasenverschiebung von  $\pi$  für beide Detektionskanäle auf. Im konfokalen Typ C-Bereich wechseln sich besonders hohe, schmale Maxima (c/c) mit mit niedrigeren, breiten Maxima mit Doppelstruktur (c/d) ab. Der Intensitätsunterschied zwischen (c/c) und (c/d) ist größer, als bei nicht-konfokaler Detektion. Zudem ist die Doppelstruktur bei (c/d) im konfokalen Fall deutlicher zu erkennen, während der Doppelpeak bei nicht-konfokaler Detektion aufgefüllt ist. Im nicht-konfokalen Typ C-Fall wechseln sich in der



**Abbildung 7.8.** Simultan aufgenommene konfokale und nicht-konfokale  $xz$ -Schnitte an einer Schicht QDots ( $\lambda_{\text{exc}}=780 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{\text{det}}=525 \text{ nm}$ ). Die gemessenen und theoretischen  $z$ -Profile für (c/c) und (c/d) im konfokalen Fall, sowie deren nicht-konfokale Komplemente werden verglichen. Die Intensität des  $z$ -Profils im konfokal detektierten (c/c)-Fall wurde auf Eins normiert und die  $z$ -Profile der anderen Fälle entsprechend skaliert. Konfokal ergibt sich eine Halbwertsbreite von 90 nm, nicht-konfokal beträgt sie 100 nm.

Phasenserie schmale, helle Maxima mit breiteren Maxima geringerer Intensität ab. Diese Ergebnisse stimmen mit den vorgestellten theoretischen Erwartungen überein und zeigen, daß der verwendete Strahlteiler als weitgehend ideal betrachtet werden kann.

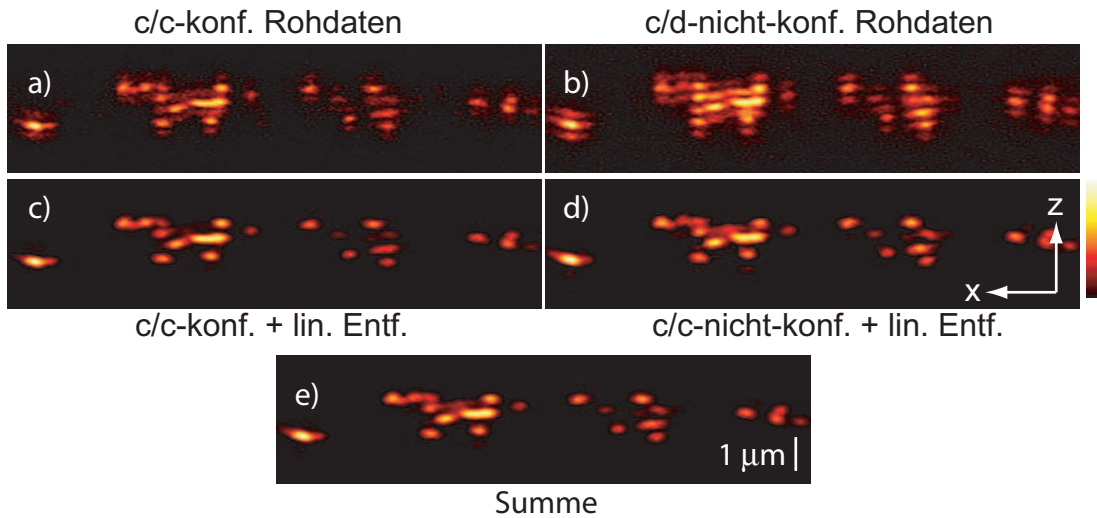
Abbildung 7.8 zeigt einzelne Profile für (c/c)- bzw. (c/d)-Einstellung am konfokalen Ausgang und die simultan aufgenommenen  $z$ -Profile am nicht-konfokalen Ausgang. Die experimentell ermittelten Profile (rot) werden mit den theoretisch erwarteten Kurven (schwarz) verglichen und zeigen eine gute Übereinstimmung. Das konfokal aufgenommene Profil im (c/c)-Fall wurde als bisheriger Standard auf Eins normiert. Die Profile der anderen Fälle wurden entsprechend ihrer Intensitäten im Maximum skaliert. Im nicht-konfokalen Fall ist das Maximum für konstruktive Anregung und konstruktive Detektion um einen Faktor 3 höher, als im konfokalen Fall. Der nicht-konfokale (c/d)-Fall und der konfokal gemessene (c/c)-Fall zeigen vergleichbare Intensitäten. Aufgrund der niedrigen Nebenmaxima eröffnet sich die Möglichkeit, beide Kanäle nicht-konfokal zu detektieren, um somit maximales Signal zu detektieren. Allerdings handelt es sich dabei um Fluoreszenzlicht, das aus einem größeren Fokalebereich stammt und die Bildqualität nicht verbessert. In Abbildung 7.9 sind die OTFs dargestellt, die aus den



**Abbildung 7.9.** Vergleich der OTFs, die aus den Werten aus Abbildung 7.7 berechnet wurden. Die experimentellen OTFs (rot) liegen geringfügig unter den theoretischen Erwartungen (schwarz), sind jedoch alle an  $|H(k_c)| > 0$ .

Daten in Abbildung 7.7 berechnet wurden. Die gemessenen und erwarteten Kurven für  $|H(k_z)|$  werden verglichen. Die gemessenen OTFs liegen unter den theoretischen Werten, sind aber insgesamt in guter Übereinstimmung mit den berechneten OTFs. An der kritischen Frequenz  $k_c$  gilt für alle OTFs  $|H(k_c)| \gg 0$ . Das bedeutet, daß die aufgenommenen Daten in allen Fällen artefaktfrei rekonstruiert werden können. Insbesondere liegt der Wert bei nicht-konfokaler Detektion und konstruktiver Anregung und destruktiver Interferenz (c/d) des Fluoreszenzlichts bei  $|H(k_c)| > 10\%$ . In allen vier Fällen werden im Experiment maximale Ortsfrequenzen bis zu  $k_{\max} = 60 \mu\text{m}^{-1}$  übertragen.

Um die Anwendbarkeit der Zweikanaltechnik für biologische Proben zu überprüfen, wurden Messungen an PtK-2 Zellen durchgeführt. Dazu wurden Mitochondrien mit Alexa546 immuno-gefärbt. Die Phasen wurden auf (c/c) im konfokalen Ast und damit auf (c/d) am nicht-konfokalen Ausgang des 4Pi-Moduls eingestellt. Die Abbildungen 7.10a) und (b) zeigen die an beiden 4Pi-Ausgängen simultan aufgenommenen 4Pi-Rohdaten. Es wurde eine Anregungswellenlänge von 800 nm verwendet. Der konfokal gemessene  $xz$ -Schnitt zeigt die Struktur, die aufgrund der (c/c)-Einstellung ein helles Hauptmaximum und zwei dunkle Nebemaxima aufweist. Der  $xz$ -Schnitt, der am nicht-konfokalen Ausgang aufgenommen wurde, zeigt dagegen wie erwartet ein zentrales Maximum mit Nebemaxima hoher Intensität. Durch lineare Entfaltung können die Artefakte, die durch die



**Abbildung 7.10.** Zweikanalmessungen an Mitochondrien in PtK-2 Zellen, die mit Alexa546 gefärbt wurden. Die Phase wurde auf (c/c) am konfokalen Ausgang und damit (c/d) am nicht-konfokalen Ausgang des 4Pi-Moduls eingestellt. Die 4Pi-Rohdaten (a, b) wurden simultan aufgenommen. Durch lineare Entfaltung werden beide Datensätze rekonstruiert (c, d) und können anschließend summiert werden (e). ( $\lambda_{\text{exc}} = 800 \text{ nm}$ )

verschiedenen 4Pi-PSFs im Bild hervorgerufen werden, in beiden Fällen entfernt werden. Das Ergebnis beider Datensätze nach Entfaltung stimmt überein. Dies zeigt, daß die Entfaltung in beiden Fällen die Nebenmaxima entfernt und äquivalente Ergebnisse liefert. Nach der Entfaltung können beide Datensätze addiert werden. Das Ergebnis ist in Abbildung 7.10e) dargestellt.

Die Datensätze können auch kombiniert entfaltet werden [11]. Dadurch können die Ortsfrequenzen, die in einem Kanal schwächer übertragen werden, durch den anderen Kanal ausgeglichen werden. Das bedeutet insbesondere, daß bei  $k_c$  der konfokale (c/c)-Fall und bei hohen Frequenzen  $k \rightarrow k_{\text{max}}$  der nicht-konfokale (c/d)-Fall verwendet wird.

## Zusammenfassung

Das Fluoreszenzlicht, das den Strahlteiler am zweiten Ausgang verläßt ist um  $\pi$  phasenverschoben und wird nicht-konfokal detektiert. Durch die hochaperturigen Objektive ist dieser (c/d)-Fall auch bei nicht-konfokaler Detektion entfaltbar. Die Sammeffizienz eines 4Pi-Mikroskops kann verdoppelt werden indem das Signal, das in konventionellen Aufbauten nicht genutzt wird, detektiert wird. Dies ist insbesondere bei schwacher Fluoreszenzfärbung oder starkem Bleichen von Vorteil.



# Kapitel 8

## Biologische Anwendungen

In diesem Kapitel werden drei biologische Anwendungsmöglichkeiten der entwickelten Methoden vorgestellt.

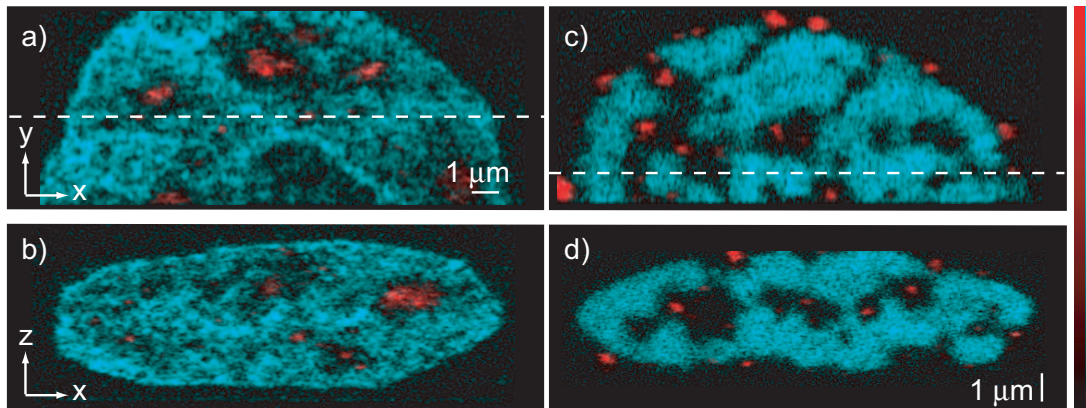
Um die Chromatindichtevertellung im Kern zu untersuchen, sind möglichst niedrige Nebenmaxima notwendig. Daher wurde 2-Photonen 4Pi Typ C verwendet, um das Chromatin darzustellen. Die Einbettung in TDE gewährleistet, daß die Phase ortsunabhängig ist.

Die Messung der Telomerverteilung im Nukleus ist ein Beispiel für 4Pi-Mikroskopie mit linearer Fluoreszenzanregung. Die PNA-Sonden konnten mit 2-Photonen 4Pi-Mikroskopie nicht gemessen werden, da das Fluoreszenzsignal zu schwach war und zudem schnell bleichte.

Eine weitere Herausforderung sind Gewebeschnitte, wie z.B. Hirn-, oder Knochenschnitte. Gewebeschnitte sind von besonderem Interesse, da sie es erlauben, die Zellen nicht isoliert, sondern im Verbund zu betrachten. Durch eine Entfaltung mit ortsabhängiger Phase konnten artefaktfreie Daten eines 5  $\mu\text{m}$  dicken Knochenschnitts erzielt werden.

### 8.1 Chromatinverteilung im Zellkern

Die dreidimensionale Verteilung des Chromatins spielt bei der Regulierung von Prozessen eine wichtige Rolle [10]. Die Genexpression und die Stabilität des Genoms werden bei Krebszellen durch multiple Änderungen gestört. Diese Änderungen gehen einher mit einer Änderung der dreidimensionalen Struktur im Zellkern [32]. Für das Verständnis von Entstehung und Progression von Tumoren ist die Kenntnis der dreidimensionalen Organisation des Genoms im Zellkern essentiell. Die Verteilung der Chromosomen im Zellkern spielt eine wichtige Rolle bei der Genregulation, jedoch die genaue Organisation wird noch immer kontrovers diskutiert. Die hochauflösende 4Pi-Mikroskopie kann einen wichtigen Beitrag zur



**Abbildung 8.1.** Verteilung von Chromatin (blau) und SC35-Domänen (rot) im Kern. Das Chromatin wurde mit DAPI gefärbt und die SC35-Domänen mit Rhodamin. Die Messung wurde mit 2-Photonen 4Pi Typ C durchgeführt. Die linke Seite (a, b) zeigt unkondensiertes Chromatin, die rechte Seite kondensiertes Chromatin (c, d) ( $\lambda_{\text{exc}} = 820 \text{ nm}$ ).

dreidimensionalen Darstellung der Strukturen im Zellkern liefern. Im Zellkern von Eukarionten sind die prä-mRNA-Spleißfaktoren nicht gleichmäßig über den Zellkern verteilt, sondern sie sind an 25-50 Stellen konzentriert, den so genannten „Speckles“ oder auch SC35-Domänen. Diese Speckles werden durch einen Antikörper gegen den Spleiß-Faktor SC35 markiert. Die größeren Domänen entsprechen Interchromatin granulären Clustern, welche zusätzlich zu SC35 noch weitere Spleiß-Faktoren und Proteine enthalten. Diese Cluster sind zwischen  $0,5 - 1,8 \mu\text{m}$  groß und bestehen aus einzelnen Untereinheiten, die jeweils einen Durchmesser von  $20 - 25 \text{ nm}$  besitzen [46, 47]. Zusammen mit der Gruppe *Molekulare Genetik* am DKFZ wurden Experimente zur Verteilung von Chromatin und SC35 in MCF7-Zellen (humane Brustkarzinomzellen) untersucht. Dazu wurde das Chromatin mit DAPI gefärbt und SC35-Domänen mit Rhodamin markiert. Die Zellen wurden in 97% eingebettet. Damit die Struktur des Zellkerns durch den osmotischen Druck beim Austausch des Einbettmediums unverändert bleibt, wurde eine Verdünnungsreihe mit 10%, 20%, 40%, 60%, 80% und  $3 \times 97\%$  TDE (für jeweils 15 min) verwendet.

Abbildung 8.1 zeigt die Verteilung von Chromatin und Speckles im Zellkern. Die linke Seite zeigt unkondensiertes Chromatin, die rechte Seite kondensiertes Chromatin. Während der Kondensation erhöht sich die Dichte des Chromatins. Im kondensierten Fall sind sie kleiner und stärker an der Peripherie des Zellkerns lokalisiert als im unkondensierten Fall. Die Daten wurden mit 2-Photonen 4Pi Typ C aufgenommen und die residualen Nebenmaxima mit einer Dreipunktentfaltung entfernt. Das Bildfeld beträgt in  $xy$ -Richtung etwa  $17 \mu\text{m} \times 7 \mu\text{m}$  und in  $xz$ -Richtung etwa  $17 \mu\text{m} \times 6 \mu\text{m}$ . Insbesondere anhand des unkondensierten Chromatins ist zu erkennen, daß die Phase im gesamten  $xz$ -Schnitt konstant ist. Die-



ses Anwendungsbeispiel zeigt die prinzipielle Möglichkeit, mit 4Pi-Mikroskopie Untersuchungen zur Chromatindichteverteilung im Zellkern durchzuführen.

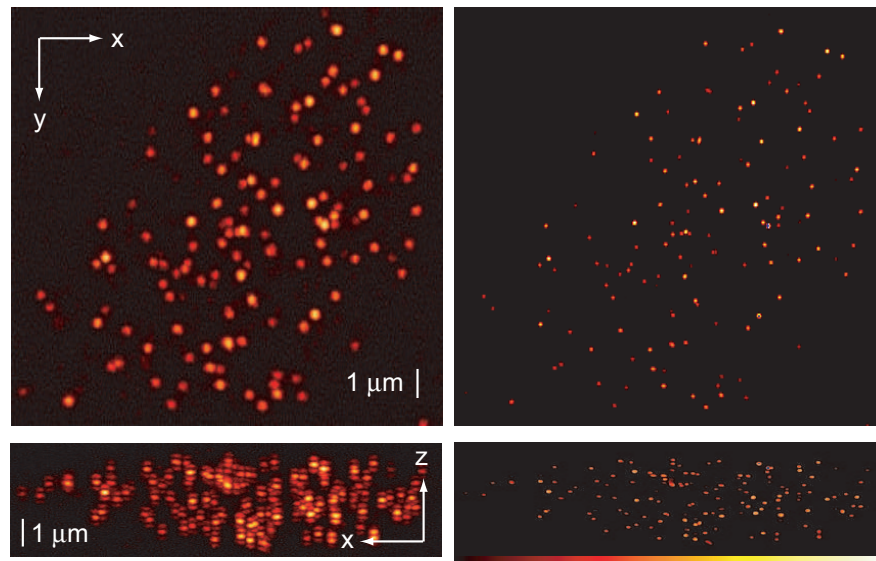
## 8.2 Verteilung der Telomere im Zellkern

Die dreidimensionale Organisation im Zellkern spielt für die Funktion der Zelle eine wichtige Rolle [10]. Es gibt Hinweise, daß diese Struktur im Zellkern von Tumorzellen verändert ist. In Zusammenarbeit mit der Gruppe *Genetik der Hautcarcinogese* am DKFZ wurde die Verteilung von Telomeren im Zellkern verschiedener Zelltypen untersucht.

Bei der Zellteilung verlieren normale Zellen Sequenzen am Ende der Chromosomen. Die Endstücke der Chromosomen werden Telomere genannt. In humanen Zellen bestehen sie aus 5000 bis 15000 Basenpaaren. Die Telomere schließen die Chromosomen ab und bewahren so deren Integrität. Vermutlich ist dieser Verlust von Telomersequenzen mitverantwortlich für die Zellalterung. Bei jeder Zellteilung wird das Telomer um eine bestimmte Anzahl Basenpaare verkürzt. Erreichen die Telomere eine kritische Länge, gehen die Zellen normalerweise in Seneszenz über und können sich nicht weiter teilen. Tumorzellen jedoch können uneingeschränkt proliferieren und müssen daher diesen Mechanismus der Zellalterung außer Kraft setzen, bzw. von neuem Telomersequenzen synthetisieren, um dem Telomerverlust bei Zellteilung entgegenzuwirken. So genannte Telomerase-positive Zellen sind in der Lage neue Telomersequenzen an das Ende der Chromosomen anzulagern.

Zur Untersuchung der Hautcarcinogese werden HaCaT-Zellen als Modell verwendet. Dies sind immortale humane Keratinocyten mit einer aktiven Telomerase aus der Haut, die an den Enden der Telomere neue Telomersequenzen anlagern können. Selbst nach vielen Zellteilungen besitzen sie eine stabile Telomerlänge von 4000 Basen. Zudem werden HaCaT-myc Zellen untersucht, die permanent ein Protein (c-myc) exprimieren. C-Myc ist ein Transkriptionsfaktor der normalerweise aktiviert wird, wenn die Zelle in die S-Phase eintreten soll. In Tumorzellen kommt es zu einer Deregulation und das Protein ist übermäßig häufig vorhanden. In den HaCaT-myc wird c-Myc überexprimiert und es kommt ebenfalls zu einer Deregulation. Diese c-Myc Deregulation stört die 3D-Organisation der Telomere kann und zu einer Aggregation der Telomere führen [32]. Es wird vermutet, daß durch diese Aggregate das entsprechende Chromosom sich während der Mitose abnormal teilt.

Die dreidimensionale Verteilung der Telomere im Kern wird noch immer kontrovers diskutiert. Es wird berichtet, daß in einigen Tumorzellen die Verteilung der Telomere gestört ist. In den beobachteten Clustern konnten die einzelnen Telomere mit einem Dekonvolutionsmikroskop nicht aufgelöst werden [16, 9]. Es wurde beobachtet, daß etwa 60 % der HaCaT-myc Zellen, die sich in der Interphase be-

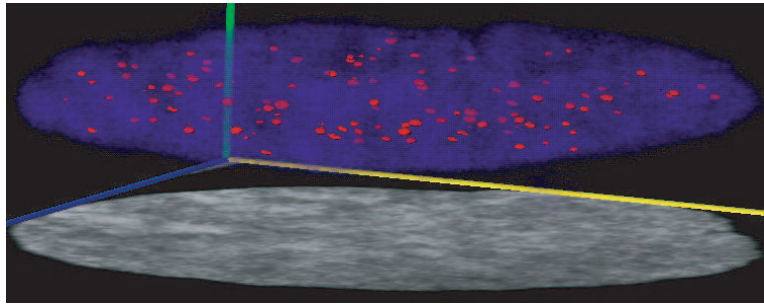


**Abbildung 8.2.** Telomere (markiert mit Cy3) in einer HaCaT-Zelle aufgenommen mit 4Pi Typ A bei 1-Photonen-Anregung ( $\lambda_{\text{exc}} = 568$ ) nm. Die obere Abbildung zeigt jeweils die  $xy$ - die untere die  $xz$ -Projektion des 3D-Datensatzes. Links sind die aufgenommenen Rohdaten, rechts die Daten nach Richardson-Lucy-Entfaltung abgebildet.

finden, Aggregate von Telomeren besitzen [16]. Diese Befunde wurden bislang durch Weitfeldmikroskopie mit anschließender Dekonvolution erzielt. Zur Visualisierung der 3D-Daten wurde die „Isosurface“-Funktion der Software AMIRA verwendet. Die Gruppe beobachtete mit einem Dekonvolutionsmikroskop Cluster von Telomeren in Tumorzelllinien. Sie schlossen daraus, daß die Telomere in Krebszellen aggregieren und die Zellen sich dadurch nicht mehr fehlerfrei teilen können. Mittels 4Pi-Mikroskopie sollte geklärt werden, ob die Cluster auch auf einer Auflösungsskala von 100 nm existieren, oder ob sich die Telomere in Tumorzellen nur näher kommen und in einem 4Pi-Mikroskop als getrennte Punkte sichtbar sind.

Die Telomere wurden mittels Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH) mit einer Cy3-markierten PNA-Sonde gefärbt. Die Proben zeigten eine starke Fluoreszenz bei 1-Photonen-Anregung, jedoch waren sie mit 2-Photonen-Anregung kaum sichtbar. Aus diesem Grund wurde zur Messung 1-Photonen 4Pi-Mikroskopie im Typ A sowie im Typ C verwendet. Die Proben wurden mittels einer Verdünnungsreihe in 97 % TDE eingebettet. Im Zellkern (Dicke des Zellkerns ca.  $4 \mu\text{m}$ ) wurde nach Einbettung in TDE kaum eine Variation der Phase mit der Scantiefe beobachtet. Die Nebenmaxima lagen in 4Pi Typ A und in Typ C unter 50 %. Zur Entfaltung wurde ein Richardson-Lucy-Algorithmus verwendet, da dieser sich besonders gut für punktförmige Objekte eignet.

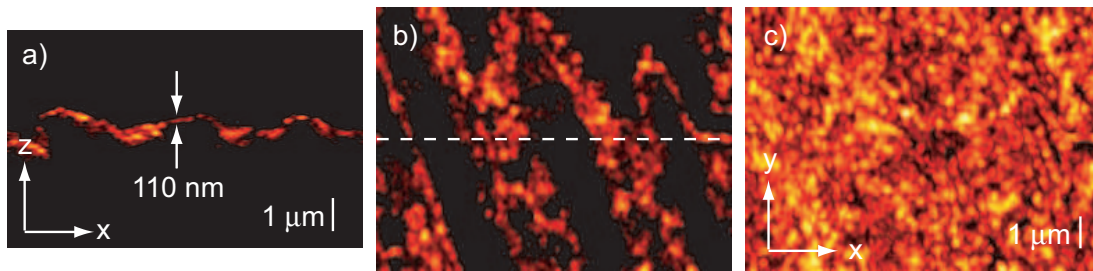
Abbildung 8.2 zeigt eine Projektion in  $xy$ -Richtung sowie in  $xz$ -Richtung von Telomeren in einer HaCaT-Zelle. Der gesamte 3D-Datensatz besteht aus 246



**Abbildung 8.3.** 3D-Darstellung von Telomeren (Cy3, rot) und Chromatin (DAPI, blau) in einer HaCaT-myc Zelle. Cy3 wurde mit 1-Photonen 4Pi Typ C bei einer Wellenlänge von 568 nm aufgenommen. Die Nebenmaxima wurden mit einer Dreipunktentfaltung entfernt. DAPI wurde mit dem 2-Photonen-Laser bei 820 nm angeregt.

$xz$ -Schnitten, die im Abstand von 61 nm aufgenommen wurden. Der dargestellte Ausschnitt aus dem Datensatz ist  $15\ \mu\text{m} \times 4\ \mu\text{m} \times 15\ \mu\text{m}$  groß. Auf der linken Seite der Abbildung sind die Rohdaten, die mit 1-Photonen 4Pi Typ A aufgenommen wurden, zu sehen. Die rechte Seite zeigt die Daten nach Richardson-Lucy-Entfaltung. Abbildung 8.3 zeigt eine 3D-Darstellung von Telomeren und Chromatin in einer HaCaT-myc Zelle. Die Telomere wurden wieder mit Cy3 fluoreszent markiert und das Chromatin wurde mit DAPI gefärbt. Die Telomere und das Chromatin mußten sequentiell aufgenommen werden, da Cy3 mit 568 nm angeregt wurde, jedoch zur Anregung von DAPI kein 1-Photonen-Laser geeigneter Wellenlänge zur Verfügung stand, so daß 2-Photonen-Anregung bei 820 nm verwendet werden mußte. Die Nebenmaxima wurden durch eine Dreipunktentfaltung entfernt. Die Telomere weisen auch hier keine Aggregate auf und sind sowohl lateral als auch axial über den gesamten Zellkern verteilt.

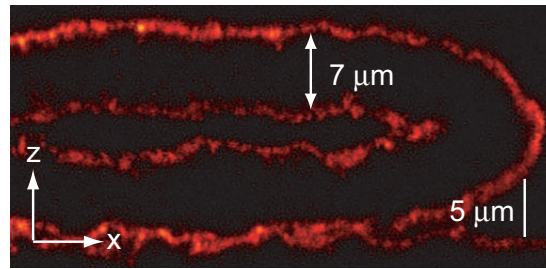
Durch 4Pi-Mikroskopie läßt sich die dreidimensionale Verteilung der Telomere im Kern viel genauer darstellen als mit der bisher verwendeten Methode. Abbildungen 8.2 und 8.3 zeigen Telomere, die innerhalb der Auflösungsgrenze des 4Pi-Mikroskops nicht aggregieren. Zur Kontrolle wurden zunächst Fibroblasten gemessen, die keine Cluster aufweisen sollten. Anschließend wurden HaCaT und HaCaT-myc Zellen untersucht, bei denen jedoch keine Cluster innerhalb der Auflösungsgrenzen des 4Pi-Mikroskops beobachtet werden konnten. Anschließend wurden Proben gemessen, bei denen Telomer-Cluster durch UV-C-Einstrahlung künstlich induziert werden sollten. Auch bei diesen Zellen konnten die in früheren Experimenten im Dekonvolutionsmikroskop beobachteten Cluster nicht bestätigt werden. Allerdings zeigten die im 4Pi-Mikroskop untersuchten Proben auch im Weitfeldmikroskop keine Aggregate. Somit kann die Frage, ob sich die Cluster mit 4Pi-Mikroskopie als einzelne Telomere darstellen lassen, oder ob die Cluster auch in einem 4Pi-Mikroskop nicht aufgelöst werden können, noch nicht abschließend beantwortet werden.



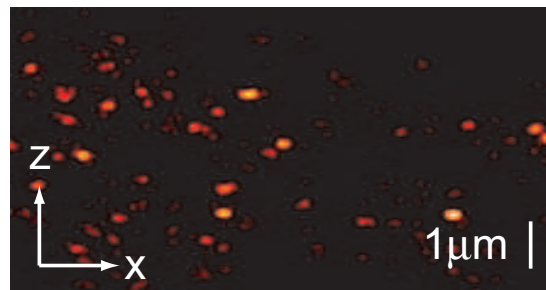
**Abbildung 8.4.** Knochenschnitte, aufgenommen mit 1-Photonen 4Pi Typ C. Collagen wurde mit Alexa555 gefärbt. Der  $xz$ -Schnitt (a) zeigt, daß die Färbung nur innerhalb der Auflösungsgrenze erfolgt ist. Die längsgestreifte Struktur (b) im Cortex des Knochens, die auch im Weitfeldmikroskop zu beobachten ist, wird durch die Topologie des Schnittes verursacht. In der Projektion entlang der  $z$ -Achse (c) ist das Streifenmuster nicht mehr sichtbar.

### 8.3 Fibronectin in Knochenschnitten

Knochen bestehen zum größten Teil aus eingelagerten Mineralien (70–90%) und nur zu etwa 30% aus organischem Material und Wasser. Collagen stellt etwa 90% des organischen Materials im Knochen, welches wiederum hauptsächlich aus Collagen Typ-I Fasern besteht [52]. Mutationen in Collagen-Genen haben daher großen Einfluß auf die Struktur von Collagen und beeinflussen dadurch den Knochenbau. Möglicherweise kann auch Osteoporose durch Mutationen im Collagen Typ-I hervorgerufen werden. Außer Collagen besteht der Knochen noch aus weiteren speziellen Matrixproteinen, darunter Fibronectin und Osteocalcin. Fibronectin ist ein wichtiger Faktor bei der Ausbildung von gesunden Knochen. In *in-vitro*-Experimenten kann sich Collagen auf Deckgläsern nur dann organisieren und Strukturen ausbilden, wenn auch Fibronectin vorhanden ist. Wird es entfernt, verliert das Collagen seine Struktur. Dieser Prozess ist reversibel und bei erneuter Zugabe von Fibronectin bildet sich die Collagenstruktur wieder aus. Dabei ist noch nicht klar, wie Fibronectin bei der Organisation von Collagen mitwirkt. In Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe „Tandemprojekt“ von der Universität Heidelberg sollte untersucht werden, wie Fibronectin im Knochen verteilt ist und ob sich zwischen gesunden und kranken Mäusen ein Unterschied in der Verteilung nachweisen läßt. Mit einem konfokalen Mikroskop konnte die Gruppe bislang keine Aussagen über die Verteilung von Fibronectin im Knochen treffen. Um zu untersuchen wie sich Fibronectin auf den Knochenbau auswirkt, wurde bei Mäusen zum einen Fibronectin in der Leber ausgeschaltet (Leber-KO), zum anderen wurde Fibronectin in den Osteoblasten ausgeschaltet. Zur Kontrolle dienen gesunde Mäuse. Allen Mäusen wurde der Humerus entnommen und daraus ca.  $5\ \mu\text{m}$  dicke Schnitte mit dem Mikrotom herausgeschnitten. Bei der ersten Probenreihe wurde Collagen mit Alexa555 gefärbt, bei der zweiten Reihe Fibronectin, ebenfalls mit Alexa555. (Autofluoreszenz und unspezifische



**Abbildung 8.5.** *xz*-Abbildung eines mit Alexa555 gegen Collagen gefärbten Knochenschnitts. Dargestellt ist eine Stelle, an welcher der Schnitt gefaltet ist. Die Abbildung stellt einen Bereich von  $47\mu\text{m} \times 23\mu\text{m}$  dar. Der Schnitt selbst ist etwa  $5\text{--}7\mu\text{m}$  dick und weist nur an Ober- und Unterseite Fluoreszenz auf.



**Abbildung 8.6.** *Fibronectin-Färbung mit Alexa555.* Fibronectin wurde in der Leber ausgeschaltet. Die Entfaltung erfolgte mit einer ortsabhängigen Phase. Der Bildausschnitt zeigt einen Bereich von  $11\mu\text{m} \times 6\mu\text{m}$ . Im gesamten Volumen des Knochenschnitts ist eine Färbung von Fibronectin zu sehen.

Bindung konnte durch Kontrollproben ausgeschlossen werden, die nur mit einem Sekundärantikörper gefärbt waren). Da der Knochen zu weniger als 2% aus Fibronectin besteht, wurde zur Messung im 4Pi-Mikroskop 1-Photonen-Anregung im Typ C gewählt, um niedrige Nebenmaxima bei möglichst großer Anregungseffizienz zu erzielen. Die Proben wurden über eine Verdünnungsreihe in 97% TDE eingebettet, um die optischen Verhältnisse möglichst gut anzupassen.

Alle Proben, bei denen Collagen gefärbt war, zeigten keine Collagen-Färbung im Volumen, sondern nur Färbung direkt an der Oberfläche des Schnittes. Abbildung 8.4 zeigt einen *xz*-Schnitt nach Dreipunktentfaltung aus einem Knochen, bei dem Fibronectin in der Leber ausgeschaltet wurde. Der Ausschnitt in *xz*-Richtung beträgt etwa  $12\mu\text{m} \times 7\mu\text{m}$ . Der *xy*-Schnitt zeigt einen Bildausschnitt von  $12\mu\text{m} \times 9\mu\text{m}$ . Da die 4Pi-PSFs sehr gut durchmoduliert sind, muß die Dicke der gefärbten Schicht  $< 100\text{ nm}$  sein. Die Knochenschicht war nach der Einbettung kaum optisch aktiv, da keine Störung im Pupillenbild oder in der PSF beobachtet wurde. Anhand einer gefalteten Stelle im Knochenschnitt, konnte nachgewiesen werden, daß, entgegen den Erwartungen, nur die Schnittfläche des Knochens Fluoreszenz zeigt. Die Dicke der Schnitte ließ sich zu etwa  $5\text{--}7\mu\text{m}$

bestimmen, was der Einstellung der Schnittdicke am Mikrotom übereinstimmt. Damit läßt sich die Dicke der gefärbten Schicht deutlich genauer abschätzen, als mit einem konfokalen Mikroskop. Der Collagen-Antikörper färbt demnach nur die Oberfläche des Schnittes.

Anschließend wurden die Schnitte, bei denen Fibronectin markiert wurde, im 4Pi-Mikroskop untersucht. Der Knochenschnitt, der einer gesunden Maus entnommen wurde, zeigt eine weniger starke Markierung, als bei Collagen-Färbung. Dies war aufgrund der geringeren Konzentration von Fibronectin im Knochen zu erwarten. Wie zuvor bei Collagen, konnte das Volumen nicht gefärbt werden. Die Fibronectin-Färbung beschränkte sich auf eine Schicht, die kleiner als die Auflösungsgrenze, d. h. dünner als 100 nm war. Die Probe, bei der Fibronectin in der Leber ausgeschaltet wurde, zeigte jedoch ein deutlich anderes Bild. Obwohl weniger Fibronectin im Knochen enthalten ist, zeigte diese Probe eine Färbung im Volumen. Insbesondere war die Oberfläche des Schnitts nicht stärker als das Volumen gefärbt. Die Messung zeigt eine 4Pi-PSF, deren Phase mit der Eindringtiefe variiert. Das bedeutet, daß der Brechungsindex des Knochengewebes nicht mit dem des Einbettmediums ( $n = 1,515$ ) übereinstimmt. Abbildung 8.6 zeigt das Ergebnis nach linearer Entfaltung mit ortsabhängiger Phase. Auch in diesem Fall können die Nebenmaxima zufriedenstellend entfernt werden. Bei zukünftigen Messungen könnte dies während der Messung durch einen zusätzlichen Offset der Phase korrigiert werden, der abhängig von der Eindringtiefe auf die eingestellte Phase addiert wird.

Auf Basis dieser Ergebnisse wurde als nächstes die Frage untersucht, ob eine vor- ausgehende Färbung des Collagens verhindert, daß Fibronectin im Volumen des Knochenschnitts gefärbt werden kann. Dazu wurden Leber-KO Proben zunächst gegen Collagen und anschließend gegen Fibronectin gefärbt. Es wurden außerdem zwei Kontrollen hergestellt, bei denen nur Collagen bzw. nur Fibronectin markiert wurde. Die Kontrollen zeigten das oben bereits beschriebene Verhalten: Der Schnitt, der gegen Collagen gefärbt wurde, zeigte nur an der Schnittfläche Fluoreszenz, wogegen der Schnitt, der bei dem Fibronectin gefärbt wurde, im gesamten Volumen Fibronectinfärbung zeigte. Der Schnitt, der zuerst gegen Collagen und anschließend gegen Fibronectin gefärbt wurde, wies wiederum nur Fluoreszenz an der Schnittfläche auf. Dieses Ergebnis bedeutet, daß die Collagen-Antikörper an der Oberfläche des Schnittes den Zugang blockieren und keine Färbung von Fibronectin im Volumen stattfinden kann, obwohl Fibronectin im Knochenschnitt vorhanden ist. Als vorläufige Resultate ergeben sich:

- Der Fluoreszenzfarbstoff kann prinzipiell in den Schnitt eindringen und färben, sichtbar an den Leber-KO-Schnitten.
- Bei Proben, die nur an der Schnittfläche gefärbt sind (alle Collagen-Proben, sowie die Fibronectin-Probe der gesunden Maus), müssen strukturelle Gründe vorliegen, wegen derer keine Färbung im Volumen stattfinden kann.

- Collagen kann in allen Fällen nur an der Schnittfläche der Probe gefärbt werden. Die Dicke liegt dabei unterhalb der Auflösungsgrenze und damit  $< 100$  nm. Hier liegen viele Bindungsstellen vor, so daß wahrscheinlich weitere Fluorophore am Eindringen in den Schnitt gehindert werden.
- Leber-KO-Proben zeigen, daß, obwohl weniger Fibronectin im Knochen vorhanden ist, als bei einer gesunden Maus, Fibronectin gefärbt werden kann. Dies ist bei einer gesunden Maus nicht möglich. Das führt zu dem Schluß, daß bei einer gesunden Maus möglicherweise zu viele Bindungsstellen für Fibronectin an der Oberfläche des Schnittes vorhanden sind, so daß, analog zum Collagen-Befund, der Zugang für weitere Fluorophore blockiert wird.

Die ursprüngliche Fragestellung, wie sich die Fibronectin-Verteilung ändert, konnte wegen technischer Schwierigkeiten bei der Färbung, nicht beantwortet werden. Jedoch ließ sich die Dicke der gefärbten Schicht viel genauer bestimmen, als mit einem Konfokalmikroskop. Weitere Experimente könnten Aufschlüsse über die Funktion und Verteilung von Fibronectin und Collagen im Knochen geben. Dieses Anwendungsbeispiel zeigt weiterhin, daß mit 4Pi-Mikroskopie auch Gewebeschnitte untersucht werden können und sich die erzielten Daten artefaktfrei rekonstruieren lassen.





# Kapitel 9

## Diskussion und Zusammenfassung

In einem 4Pi-Mikroskop wird die Probe durch zwei gegenüberliegende hochaperturige Objektive beleuchtet. Durch kohärente Superposition des Anregungslichts kann die axiale Auflösung auf 100 nm erhöht werden. In der 4Pi-PSF ergeben sich ein schmales zentrales Maximum und niedrigere Nebenmaxima, die gegenüber dem Hauptmaximum axial verschoben sind. Um die gemessenen Daten interpretieren zu können, müssen die Nebenmaxima durch Entfaltung entfernt werden. Sobald die Intensität der Nebenmaxima weniger als 50 % des Hauptmaximums beträgt, können die 4Pi-Daten entfaltet werden. Durch 2-Photonen-Anregung wird die Intensität der Nebenmaxima reduziert und die Daten sind entfaltbar. In der Praxis existieren zwei 4Pi-Typen: Im Typ A wird nur das Anregungslicht kohärent überlagert, während im Typ C auch das Fluoreszenzlicht kohärent detektiert wird. Dadurch werden die Nebenmaxima weiter reduziert. Allerdings ist dafür ein aufwendigerer Aufbau notwendig, der einen Abgleich der optischen Weglänge und der Dispersion erlaubt.

Die Anforderungen an ein Mikroskop sind: effiziente Anregung und Detektion des Fluoreszenzlichts, direkte Interpretierbarkeit der Daten, einfache Bedienbarkeit und die Möglichkeit, konventionelle Farbstoffe zu verwenden. Aufgrund der bislang notwendigen 2-Photonen-Anregung sind diese Punkte von einem 4Pi-Mikroskop jedoch nur eingeschränkt erfüllbar.

Um diese Methode weiterzuentwickeln, wurde in dieser Arbeit das Grundprinzip der 4Pi-Mikroskopie gestärkt, indem der Aperturwinkel weiter vergrößert wurde. Entscheidend für die in dieser Arbeit aufgezeigten Fortschritte war es, die seit kurzer Zeit verfügbaren hochaperturigen Objektive mit dem neuen Einbettmedium TDE zu verbinden. Dadurch eröffnen sich qualitativ neue Möglichkeiten in der 4Pi-Mikroskopie, die in Theorie und Praxis nachgewiesen wurden. In dieser Arbeit konnten entscheidende Fortschritte erzielt werden: In 2-Photonen 4Pi

Typ C werden die Nebenmaxima nahezu eliminiert und es kann auf eine Entfaltung der Daten verzichtet werden. Weiterhin kann die Effizienz durch die neuen Objektive weit über die höhere Sammeleffizienz durch den größeren Öffnungswinkel [48] hinaus gesteigert werden: Die Nebenmaxima werden so weit reduziert, daß 4Pi-Mikroskopie mit effizienter 1-Photonen-Anregung im Typ A und im Typ C möglich ist. Ein zusätzlicher Aufbau erlaubt es, die Sammeleffizienz gegenüber einem konventionellen 4Pi-Aufbau zu verdoppeln.

Diese Ergebnisse stellen das Beste dar, was derzeit mit 4Pi-Mikroskopie erreicht werden kann. Die Resultate sind im Einzelnen:

### **4Pi-Mikroskopie mit 1-Photonen-Anregung**

Aufgrund der höheren Effizienz der 1-Photonen-Anregung gegenüber 2-Photonen-Anregung [40] und des einfacheren Aufbaus ist es erstrebenswert, 4Pi-Mikroskopie mit 1-Photonen-Anregung durchzuführen. In diesem Fall können geringere Farbstoffkonzentrationen detektiert, oder die Meßzeiten verkürzt werden. Obwohl die hier durchgeführten Berechnungen zeigen, daß im Typ C die Intensitäten der Nebenmaxima bereits für konventionelle Ölimmersionsobjektive ( $NA = 1,40$ ) theoretisch unter 50 % liegen, war es angesichts von residualen Aberrationen bislang nicht möglich, mit diesen Objektiven bei 1-Photonen-Anregung entfaltbare Daten zu akquirieren. Hier werden daher hochaperturige Ölimmersionsobjektive ( $NA = 1,46$ ) eingesetzt, die die Nebenmaxima bei 1-Photonen-Anregung um 7 % reduzieren. Wie in dieser Arbeit gezeigt wurde, werden dadurch, in Kombination mit einem neuen Einbettmedium, bei 1-Photonen-Anregung im Typ C experimentell Nebenmaxima unter 50 % auch in biologischen Proben erreicht. Durch die Wahl von Farbstoffen mit hoher Stokes-Verschiebung ist es im Typ C möglich, die Nebenmaxima weiter zu reduzieren. Die durchgeführten Experimente zeigen, daß 1-Photonen 4Pi-Mikroskopie im Typ C aber auch für kleine Stokes-Verschiebungen möglich ist. Da in diesem Fall die Nebenmaxima nur geringfügig reduziert werden, wurde untersucht, ob auf die kohärente Superposition des Fluoreszenzlichts verzichtet werden kann und Messungen im Typ A entfaltbare Daten liefern. Ein 1-Photonen 4Pi-Mikroskop vom Typ A ist der einfachste 4Pi-Aufbau, da ein genauer Weglängenabgleich ein Abgleich der Dispersion nicht durchgeführt werden muß. In dieser Arbeit wurde erstmalig gezeigt, daß auch im Typ A bei 1-Photonen-Anregung Nebenmaxima unter 50 % erzielt werden können.

Die Intensität der Nebenmaxima ist für lateral ausgedehnte Objekte, wie sie z. B. im Golgi-Apparat zu finden sind, am größten. Dennoch konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, daß sich im Typ A selbst vom Golgi-Apparat nach Entfaltung artefaktfreie 3D-Daten erzielen lassen.

*Auflösungsvermögen:* Das Auflösungsvermögen eines 4Pi-Mikroskops bei linearer Fluoreszenzanregung ist aufgrund der kürzeren Anregungswellenlänge nicht

---

nur in axialer Richtung, sondern auch in lateraler Richtung gegenüber einem 4Pi-Mikroskop desselben Typs mit 2-Photonen-Anregung verbessert. In einem 4Pi-Mikroskop vom Typ A ist keine Einstellung der Dispersion notwendig und der 4Pi-Aufbau wird dadurch weniger komplex. Jedoch ergibt sich mit 110 nm im Vergleich zu Typ C eine weniger gute axiale Auflösung. Ein 4Pi-Mikroskop mit 1-Photonen-Anregung im Typ C besitzt durch die zusätzliche Interferenz des Fluoreszenzlichts von allen 4Pi-Typen die höchste Auflösung und es ergibt sich theoretisch eine axiale Auflösung von 85 nm. Die Verwendung von linearen und nicht-linearen Entfaltungsalgorithmen ermöglicht es, die Auflösung der Daten in beiden Fällen weiter zu steigern. Experimentell wurde in dieser Arbeit im Typ C mit 1-Photonen-Anregung an Mikrotubuli eine axiale Auflösung von bis zu 60 nm nach linearer Entfaltung erzielt. Dies ist die höchste Auflösung, die bislang mit einem 4Pi-Mikroskop erzielt wurde.

*Wahl der Fluoreszenzfarbstoffe:* Um mit 2-Photonen-Anregung ein gutes Signal-zu-Rausch-Verhältnis zu erzielen, sind besonders bleichstabile Farbstoffe notwendig. Mit 1-Photonen Anregung ergibt sich die Möglichkeit konventionelle Farbstoffe zu einzusetzen. Es wurde gezeigt, daß 4Pi-Mikroskopie mit 1-Photonen-Anregung im Typ C, selbst bei Farbstoffen mit kleiner Stokes-Verschiebung und im Typ A, entfaltbare Daten liefert. Daher ist die in dieser Arbeit vorgestellte Methode nicht auf die Auswahl spezieller Fluoreszenzfarbstoffe angewiesen, sondern ermöglicht den Einsatz konventioneller Farbstoffe. Erst die hohe numerische Apertur der hier verwendeten Objektive erlaubt es, nicht nur unter speziellen Bedingungen, artefaktfreie Daten mit 1-Photonen-Anregung zu erzielen.<sup>1</sup> Bewährte Protokolle, wie sie für die konfokale Mikroskopie verwendet werden, können weiterhin angewandt werden. Dies erleichtert den Übergang vom Konfokalmikroskop zum 4Pi-Mikroskop und insbesondere die Wahl der Farbstoffe für Mehrfachfärbungen, da nur ein kleines Wellenlängenfenster zur Verfügung steht, wenn hohe Stokesverschiebungen notwendig sind. Experimente an einem doppeltgefärbten Golgi-Apparat zeigen, daß in 1-Photonen 4Pi-Mikroskopie im Typ A (und damit auch im Typ C) Zweifarbenmessungen möglich sind.

*Vereinfachung des Aufbaus:* 4Pi-Mikroskopie mit linearer Fluoreszenzanregung hat den Vorteil, daß auf einen modengekoppelten 2-Photonen-Laser verzichtet werden kann. Der 2-Photonen-Laser wird in einem konventionellen 4Pi-Aufbau zusätzlich zu den vorhandenen 1-Photonen-Lasern durch den IR-Eingang des Konfokalscanners eingekoppelt. Wird kein 2-Photonen-Laser benötigt, so wird der Aufbau des 4Pi-Mikroskops weniger komplex und kostengünstiger. Ein zusätzlicher Verzicht auf kohärente Detektion des Fluoreszenzlichts ermöglicht einen noch einfacheren 4Pi-Aufbau, der auch mit kommerziell erhältlichen 4Pi-Geräten

---

<sup>1</sup>Wie in [6] gezeigt wurde ist die Verwendung von Fluoreszenzfarbstoffen mit großer Stokes-Verschiebung dagegen die einzige Möglichkeit, um mit Glyzerinobjektiven ( $NA = 1,35$ ) in 1-Photonen 4Pi Typ C die Intensität der Nebenmaxima unter 50 % zu reduzieren.

realisierbar ist. Zugunsten eines einfacheren Aufbaus wurde, in dem seit 2006 kommerziell erhältlichen TCS 4Pi-Mikroskop (Leica Microsystems, Mannheim), auf die Möglichkeit zum Dispersionsabgleich für Typ C verzichtet. Durch den Einsatz von Ölimmersionsobjektiven mit  $NA = 1,46$  besteht auch für diese Systeme die Möglichkeit, das erhöhte Signal bei 1-Photonen-Anregung zu nutzen. Weiterhin bedeutet die Verwendung von Typ A für Routineanwendungen eine deutliche Vereinfachung, denn im Typ C erfordert jeder Probenwechsel einen Abgleich der optischen Weglänge und der Dispersion.

Durch den Verzicht auf 2-Photonen-Anregung ergibt sich prinzipiell auch die Möglichkeit ein 4Pi-Modul an bestehenden Konfokalmikroskopen anzubringen, so daß kein komplett neues System notwendig ist, um von der erhöhten axialen Auflösung zu profitieren.

*Höhere Effizienz:* Das erzielbare Signal ist bei 1-Photonen-Anregung deutlich höher als bei 2-Photonen-Anregung (laut [40] etwa um den Faktor 10). Zur Detektion des Fluoreszenzsignals bei 1-Photonen-Anregung ist daher der interne PMT des Konfokalscanners ausreichend. Es muß keine zusätzliche APD an den Konfokalscanner angebracht werden, wie es aufgrund des schwachen Fluoreszenzsignals bei 2-Photonen-Anregung notwendig ist. Bei den in dieser Arbeit vorgestellten Experimenten wurde bei 1-Photonen-Anregung das Fluoreszenzlicht allerdings dennoch mit einer APD aufgenommen. Die Laserleistung des 1-Photonen-Lasers mußte dafür so weit reduziert werden, daß die APD nicht gesättigt wurde. Die Verwendung eines PMT erlaubt es, die Laserintensität so weit zu erhöhen, bis der Fluoreszenzfarbstoff zu bleichen beginnt. Dadurch wird mehr Fluoreszenz angeregt, das Signal-zu-Rausch-Verhältnis wird größer und die Meßzeit sollte verkürzt werden können. Allerdings besitzen PMTs, verglichen mit APDs, eine schlechtere Quanteneffizienz und es muß in weiteren Experimenten überprüft werden, ob das höhere Signal, das bei 1-Photonen-Anregung ergibt, die geringere Quanteneffizienz des PMT überwiegt.

In weiteren Experimenten wurde gezeigt, daß es mit 1-Photonen 4Pi-Mikroskopie möglich ist, einzelne Fluoreszenzmoleküle zu detektieren.

### **4Pi-Mikroskopie mit 2-Photonen-Anregung**

Ein weiterer Kritikpunkt an der 4Pi-Mikroskopie ist die Notwendigkeit der Datentfaltung, um artefaktfreie Bilder zu generieren. Dieses ist eine Hürde für die Akzeptanz der Methode, da die Aufnahmen nicht direkt interpretiert werden können. Hinzu kommt eine Vielzahl von Fragestellungen, die an quantitativen Aussagen zur Dichteverteilung der Fluorophore (z. B. Chromatindichteverteilung im Nukleus) interessiert sind. Der Fehler, der sich durch die bislang notwendige Entfaltung der 4Pi-Daten ergibt, liegt in der Größenordnung von 10 % des gemessenen Signals. Daher kann der zu untersuchende biologische Effekt nur nach-

---

gewiesen werden, wenn er zu größeren Intensitätsunterschieden führt. In vielen Fällen ändern sich die Meßwerte aber weit weniger stark. Um diese Fragestellungen dennoch untersuchen zu können, müssen die Nebenmaxima so gering sein, daß keine Entfaltung mehr notwendig ist. Dies ist der Fall, wenn die Intensität der Nebenmaxima etwa 10 % des Hauptmaximums beträgt. Die in der Vergangenheit erzielten Werte lagen mit 25 % – 35 % [17] jedoch fern von diesen Anforderungen. Deshalb wurde in dieser Arbeit untersucht, ob es möglich ist, mit den neuen, hochaperturigen Objektiven ( $NA = 1,46$ ) 4Pi-Daten aufzunehmen, die nicht entfaltet werden müssen. Um möglichst niedrige Nebenmaxima zu erzielen, wurden 2-Photonen-Anregung und kohärente Detektion des Fluoreszenzlichts (Typ C) verwendet. Damit konnten in dieser Arbeit erstmalig Nebenmaxima mit Intensitäten unter 10 %, selbst in biologischen Proben erzielt werden. Somit kann auf eine Entfaltung der Daten verzichtet werden.

Für die in dieser Arbeit verwendeten Objektive sinkt die Intensität der theoretisch erwarteten Nebenmaxima im Vergleich zu den standardmäßig verwendeten Objektiven ( $NA = 1,40$ ) nur um 2 % im  $z$ -Profil. Die durchgeführten Berechnungen zeigen, daß auch schon mit Ölobjektiven mit  $NA = 1,40$ , Nebenmaxima unter 10 % in 2-Photonen 4Pi Typ C erreichbar sein sollten. Der höhere Öffnungswinkel der Objektive allein erklärt nicht, warum erst jetzt Nebenmaxima unter 10 % erreicht werden konnten. (Im Gegensatz dazu ist der höhere Winkel bei 1-Photonen-Anregung entscheidend.) In dieser Arbeit wurden durch vielfältige Weiterentwicklungen erreicht, daß die experimentell erzielten Ergebnisse besser mit den theoretischen Erwartungen übereinstimmen: Eine wichtige Verbesserung ist die Verwendung von Thiodiethanol (TDE) als Einbettmedium, mit dem der Brechungsindex genau an den Brechungsindex des Immersionsöls angepaßt werden kann. Die bislang eingesetzten Medien, weisen einen zu niedrigen Brechungsindex auf, der zu sphärischen Aberrationen und damit zu höheren Intensitäten der Nebenmaxima führt. Die in dieser Arbeit eingesetzten Objektive sind zudem die ersten Ölimmersionsobjektive, die über einen Corr-Ring verfügen, mit dem ein Großteil der probenabhängigen Aberrationen ausgeglichen werden kann. Des Weiteren wurde im Rahmen dieser Arbeit eine Regelung aufgebaut, die die Foci der beiden Objektive in allen drei Raumrichtungen justiert und eine genauere Einstellung erlaubt, als es manuell möglich ist. Als wichtig für minimale Nebenmaxima hat sich ebenfalls die korrekte Einstellung des Dispersionskeils in Kombination mit den geeigneten Wellenlängen herausgestellt. Die Wellenlängen wurden hier so ausgewählt, daß die Maxima der Anregungs-PSF optimal mit den Minima der Detektions-PSF zusammenfallen und vice versa. Die erhöhte Stabilität des im Rahmen dieser Arbeit aufgebauten 4Pi-Moduls und die Entkopplung verschiedener Justageachsen, so daß diese weitgehend unabhängig voneinander optimiert werden können, führen dazu, daß niedrige Nebenmaxima reproduzierbar erzielt werden können. Durch diese Verbesserungen konnten in dieser Arbeit Werte erzielt werden, die weit besser mit den Theoriewerten übereinstimmen, als die in früheren Arbeiten erzielten Ergebnisse. Zusammen mit den

ultra-hochaperturigen Objektiven wurden in dieser Arbeit Nebenmaxima unter 10 % erreicht. Dies erlaubt die direkte Interpretation der Ergebnisse während der Datenakquisition. Die aufgenommenen Daten sind quasi frei von Nebenmaxima ermöglichen somit für biologische Fragestellungen eine Analyse auch von kleinen Intensitätsänderungen.

*Phaseneinstellung:* Die üblicherweise in Messungen verwendete Phaseneinstellung ist konstruktive Interferenz von Anregungs- und Detektionslicht (c/c), da mit dieser Einstellung höchste Signalintensität und niedrigste Nebenmaxima erzielt werden können. Die Phaseneinstellung wird durch die hochaperturigen Objektive deutlich erleichtert. Der Bereich in dem das Fluoreszenzlicht interferiert (Typ C) zeichnet sich durch eine stärkere Modulation im Vergleich zu Typ A aus. Bei einer Phaseneinstellung für konstruktive Interferenz von Anregungs- und Detektionslicht (c/c) wird die Intensität des Hauptmaximums maximal. Diese Einstellung kann aufgrund des großen Intensitätsunterschieds zu konstruktiver Interferenz des Anregungs- und destruktiver Interferenz des Detektionslichts (c/d) an dünnen Strukturen in der Probe leichter aufgefunden werden.

### **Effizienzsteigerung durch 2-Kanal 4Pi-Mikroskopie**

Die 2-Photonen-Anregung besitzt im Vergleich zur 1-Photonen-Anregung eine schlechtere Effizienz. Daher ist es von Interesse, die Detektion des Signals in diesem 4Pi-Modus zu optimieren. Bei bisherigen 4Pi-Aufbauten wird nur etwa die Hälfte des Signals detektiert. Um das Fluoreszenzsignal bei 2-Photonen-Anregung möglichst effektiv zu nutzen, wurde in dieser Arbeit ein Aufbau zur Detektion des Signals am zweiten Ausgang des 4Pi-Moduls vorgestellt. Dadurch kann das detektierte Signal etwa verdoppelt werden. In dieser Arbeit wurde gezeigt, daß das Fluoreszenzlicht am zweiten Ausgang des 4Pi-Moduls eine um  $\pi$  verschobene Phase gegenüber dem konfokalen Ausgang besitzt (d. h. wenn am konfokalen Ausgang (c/c) eingestellt wird, ergibt sich am zweiten Ausgang (c/d)). Das Signal am zweiten Ausgang wird nicht-konfokal detektiert, dadurch ist die Signalintensität zwar größer als am konfokalen Ausgang, allerdings handelt es sich um Fluoreszenzlicht, das aus einer größeren Fokalregion stammt und daher zum Untergrund beiträgt. Die vorgestellten Messungen mit einem 2-Kanal 4Pi-Mikroskop zeigen, daß beide Datensätze entfaltbar sind und nach der Entfaltung addiert werden können, um ein besseres Gesamtsignal zu erhalten. Durch eine kombinierte Entfaltung der beiden simultan akquirierten Datensätze könnte genutzt werden, daß im (c/d)-Fall bestimmte Frequenzen stärker übertragen werden, als im (c/c)-Fall. Dadurch sollte die Entfaltung zuverlässiger werden.

Die Ergebnisse zum zweiten Kanal zeigen, daß mit den eingesetzten ultra-hochaperturigen Objektiven die Nebenmaxima im Fall von 2-Photonen-Anregung bei konstruktiver Interferenz des Anregungslichts niedrig genug sind, um entfalt-

---

bare Daten bei nicht-konfokaler Detektion zu erhalten. Es wurde gezeigt, daß am nicht konfokalen Ast selbst der (c/d)-Fall entfaltet werden kann und artefaktfreie Daten liefert. Wenn optimale Photonenausbeute in einem 4Pi-Aufbau erzielt werden soll, kann daher im konventionellen Detektionspfad die Detektionslochblende so weit wie möglich geöffnet werden oder es kann generell auf eine Detektionslochblende verzichtet werden. Dabei ist zu berücksichtigen, daß dies mit etwas höheren Nebenmaxima und einer geringfügig schlechteren Auflösung verbunden ist. Es ist abzuwägen, ob mehr Signalintensität oder niedrigere Nebenmaxima erzielt werden sollen. Weiterhin läßt sich aus den Ergebnissen schließen, daß bei 2-Photonen-Anregung auf einen Konfokalscanner als Grundlage des 4Pi-Aufbaus verzichtet werden kann. Dadurch können Aufbau und Justage des 4Pi-Mikroskops deutlich vereinfacht werden.

## **Biologische Anwendungen**

Messungen an biologischen Proben zeigen Anwendungsgebiete der vorgestellten Methoden, die bisher nicht zufriedenstellend untersucht werden konnten. Mit 2-Photonen 4Pi Typ C wurde die Verteilung von „Speckles“ und Chromatin im Kern untersucht. Das Chromatin lag in einer Probe unkondensiert und in einer weiteren Probe kondensiert vor. Dieses Beispiel zeigt das Potential der 4Pi-Mikroskopie, Dichteänderungen von Fluorophoren quantitativ zu untersuchen. Mit 2-Photonen 4Pi Typ C wird keine Entfaltung benötigt und durch die Einbettung in TDE kann im gesamten Nukleus eine konstante Phase erzielt werden. Experimente zur Verteilung der Chromosomenden (Telomere) im Kern beweisen, wie wichtig der Schritt zur 1-Photonen-Anregung ist. Die Messung der Telomerverteilung im Zellkern wäre mit 2-Photonen 4Pi-Mikroskopie nicht möglich gewesen, da die PNA-Sonden mit 2-Photonen-Anregung ein zu schwaches Signal lieferten. In der 1-Photonen 4Pi-Mikroskopie konnten diese Strukturen mit hohem Signal und einer hohen axialen Auflösung abgebildet werden. Auch Knochenschnitte konnten mit 1-Photonen 4Pi-Mikroskopie untersucht werden. Aufgrund der hohen Dichte von Mineralien im Knochen variierte die Phase entlang der optischen Achse. Durch Berücksichtigung einer ortsabhängigen Phase bei der Entfaltung konnten jedoch auch in diesem Fall artefaktfreie 4Pi-Aufnahmen erzielt werden. Bei der Untersuchung von weniger dichten Gewebeschnitten, wie z. B. Hirnschnitten, wird sich der Brechungsindex besser anpassen lassen, so daß sich die Phase auch bei dicken Schnitten kaum mit der Scantiefe ändern wird. Somit besteht auch mit einem 4Pi-Mikroskop die Möglichkeit, Zellen nicht nur isoliert, sondern im Gewebe zu untersuchen.

### Zusammenfassung

Durch Objektive mit ultra-hoher numerischer Apertur können in der 4Pi-Mikroskopie entscheidende Verbesserungen erzielt werden. Naheliegender ist die Effizienzsteigerung durch den höheren Öffnungswinkel der Objektive, jedoch ermöglichen diese Objektive zusätzlich effizientere 4Pi-Modi, die bislang nicht möglich waren. Wie in dieser Arbeit gezeigt wurde, können auch mit 1-Photonen-Anregung entfaltbare Abbildungen mit einem 4Pi-Mikroskop erzielt werden. Sowohl im Typ C, als auch im Typ A wurden Nebenmaxima unter 50% erreicht. Mit 2-Photonen 4Pi Typ C können Daten akquiriert werden, die quasi frei von Nebenmaxima sind. Zudem wurde ein Aufbau zur Detektion des Signals am nicht-konfokalen Ausgang des 4Pi-Moduls vorgestellt. Dadurch kann die Sammeleffizienz nahezu verdoppelt werden. Insgesamt stehen vier 4Pi-Modi zur Verfügung und je nach Fragestellung kann entschieden werden, welcher 4Pi-Modus am geeignetsten für die jeweilige Anwendung ist.

- *1-Photonen 4Pi Typ A* stellt einen transparenten und kostengünstigsten 4Pi-Aufbau dar, da auf einen teuren, modengekoppelten 2-Photonen-Laser verzichtet werden kann und zudem weder eine Dispersionskorrektur, noch ein genauer Weglängenabgleich notwendig ist. Aufgrund der hohen Signalintensität bei 1-Photonen-Anregung kann zudem die APD, die bislang in einem 2-Photonen 4Pi-Mikroskop verwendet wird, durch einen PMT ersetzt werden.
- Wird die Dispersion zusätzlich eingestellt, ergibt sich bei konstruktiver Interferenz des Fluoreszenzlichtes in *1-Photonen 4Pi Typ C* eine Verdoppelung der Signalintensität im Hauptmaximum. Dies ist der 4Pi-Modus mit der höchsten Signalintensität. Dieser 4Pi-Typ ist bei schwach gefärbten Proben oder wenn kurze Meßzeiten erzielt werden sollen, optimal. Durch kurze Anregungswellenlängen und kohärente Detektion des Fluoreszenzlichts ist dies zudem der 4Pi-Typ mit der höchsten Auflösung (mit bis zu 60 nm nach linearer Entfaltung).  
Die Nebenmaxima können im Typ C durch Wahl von Farbstoffen mit hoher Stokes-Verschiebung reduziert werden. Bei lateral ausgedehnten Objekten, wie z. B. dem Golgi-Apparat oder bei Proben mit weniger guten optischen Eigenschaften (z. B. dicke Gewebeschnitte) kann es sinnvoll sein durch geeignete Fluoreszenzfarbstoffe die Nebenmaxima im Vergleich zu Typ A zu reduzieren, um mehr Toleranz gegenüber nicht beeinflussbaren Restaberrationen zu schaffen.
- Um die Daten direkt interpretieren zu können, oder wenn quantitative Aussagen über die Dichteverteilung von Fluorophoren gemacht werden sollen, sind Nebenmaxima unter 10% notwendig. Diese können mit *2-Photonen*



---

*4Pi Typ C* erreicht werden. In diesem Fall sind die Daten quasi frei von Nebenmaxima und eine Entfaltung ist nicht notwendig.

- Um bei 2-Photonen-Anregung eine optimale Detektion des Fluoreszenzlichts zu gewährleisten, z. B. bei schwach gefärbten Proben, oder schnell bleichenden Farbstoffen, können beide Detektionskanäle simultan verwendet werden. Das detektierte Signal wird verdoppelt und die Entfaltung zuverlässiger.

Diese Ergebnisse wurden möglich durch Einbettung der Proben in TDE und durch den Corr-Ring der Objektive, mit dem sich probenabhängige Aberrationen minimieren lassen. Weitere Faktoren sind die verbesserte Justierbarkeit und Stabilität des 4Pi-Moduls und ein neuer Aufbau zur genaueren Regelung der Objektivposition. Die hochaperturigen Objektive und insbesondere das neue Einbettmedium können auch in Konfokalmikroskopen oder Dekonvolutionsmikroskopen gewinnbringend eingesetzt werden. Die vorgestellten 4Pi-Typen konnten in dieser Arbeit zur Untersuchung unterschiedlichster biologischer Fragestellungen erfolgreich genutzt werden.



# Kapitel 10

## Ausblick

Mit den neuen Ölimmersionsobjektiven mit ultra-hohem Aperturwinkel in Kombination mit dem Einbettmedium Thiodiethanol (TDE), ist das 4Pi-System an vielen Stellen schon an physikalische Grenzen gelangt. Wie in dieser Arbeit gezeigt wurde, ist 2-Photonen 4Pi Typ C beinahe frei von Nebenmaxima, so daß die aufgenommenen Daten direkt interpretiert werden können. Eine aufwendige Entfaltung der Meßdaten entfällt. Dies macht das System für biologische Routineanwendungen deutlich attraktiver. Ein Vergleich von experimentell ermittelten OTFs und den theoretischen OTFs, die sich ergeben, wenn der Öffnungswinkel auf  $\alpha = 85^\circ$  ( $NA = 1,51$ ) vergrößert werden würde zeigt, daß sich in diesem 4Pi-Modus durch eine weitere Erhöhung der numerischen Apertur nur noch marginale Verbesserungen erwarten lassen.

Durch den großen Öffnungswinkel der Objektive werden 4Pi-Messungen mit linearer Fluoreszenzanregung und konventionellen Fluoreszenzfarbstoffen möglich, so daß das 4Pi-Mikroskop von der höheren Effizienz bei 1-Photonen-Anregung profitieren kann. Dies führt zu einem größeren Signal und ermöglicht verkürzte Meßzeiten. Eine weitere Vergrößerung des Öffnungswinkels der verwendeten Objektive würde die Nebenmaxima weiter reduzieren und die Methode dadurch robuster gegenüber residualen Aberrationen machen. Allerdings führt eine Erhöhung der numerischen Apertur gleichzeitig auch zu höheren Anforderungen an die Genauigkeit, mit der der Brechungsindex des Einbettmediums eingestellt wird. Es bleibt zu untersuchen, in wieweit aus einem noch größeren Öffnungswinkel Nutzen gezogen werden kann.

Die Realisierung von 1-Photonen Typ A ist von besonders großem Interesse, da auf die Interferenz des Detektionslichtes verzichtet werden kann. Zugunsten eines einfacheren Aufbaus sind die kommerziell erhältlichen 4Pi-Mikroskope (TCS 4Pi, Leica Microsystems, Mannheim) für 2-Photonen 4Pi-Mikroskopie im Typ A ausgelegt. Durch den Einbau hochaperturiger Objektive können mit diesen Geräten biologische Fragestellungen auch mit 1-Photonen-Anregung untersucht werden.

Dadurch sollte sich das Anwendungsspektrum der 4Pi-Methode deutlich verbreitern. Würde der Öffnungswinkel der Objektive weiter erhöht werden, würde 1-Photonen 4Pi-Mikroskopie vom Typ A auch für lateral ausgedehnte Strukturen Nebenmaxima mit Intensitäten deutlich unter 50 % besitzen. Mit den hier vorgestellten Objektiven liegen diese nur knapp unter 50 %, so daß alle Einstellungen sehr sorgfältig erfolgen müssen.

Es ist wünschenswert 4Pi-Mikroskopie mit 1-Photonen-Anregung auch mit Wasserimmersionsobjektiven zu ermöglichen. Insbesondere die kürzere Meßzeit, die sich durch das höhere Signal erzielen läßt, wäre für *in-vivo* Messungen mit Wasserimmersionsobjektiven von grundlegendem Interesse. Für *in-vivo* Messungen müssen Meßzeiten im Sekundenbereich für 3D-Messungen erzielt werden. Wasserimmersionsobjektive mit der derzeit höchsten numerischen Apertur ( $NA = 1,20$ ) besitzen einen Öffnungswinkel von  $64^\circ$ . Um vergleichbare Nebenmaxima zu erhalten, müßten Wasserobjektive gefertigt werden, die im wesentlichen denselben Öffnungswinkel wie die hier verwendeten Ölimmersionsobjektive besitzen.

Obwohl sich durch Einbettung in TDE gute optische Eigenschaften der Probe erzielen lassen, zeigen die Messungen noch immer eine Diskrepanz zwischen den theoretisch erwarteten und den experimentell erzielten Nebenmaxima. In der Praxis liegen die Intensitäten der Nebenmaxima in vielen Fällen um etwa 10 % höher, als die theoretischen Berechnungen ergeben. Diese Unterschiede sind auf verschiedenste, bislang nicht kontrollierbare, residuale Aberrationen in der Probe und im Aufbau zurückzuführen. Mittels einer adaptiven Optik könnten solche Restaberrationen weiter korrigiert werden. Dadurch würde insbesondere 4Pi-Mikroskopie mit linearer Fluoreszenzanregung und inkohärenter Detektion (Typ A) robuster gegenüber residualen Aberrationen werden. Eine Variation der PSF, die z. B. durch den Zellkern hervorgerufen wird, könnte damit ebenfalls verhindert werden. Die theoretischen Berechnungen zeigen, daß 4Pi-Mikroskopie mit 1-Photonen-Anregung im Typ C auch mit Wasserimmersionsobjektiven ( $NA = 1,2$ ), Nebenmaxima knapp unter 50 % erzielen sollte. Die Korrektur der Wellenfronten mittels adaptiver Optik könnte auch mit Wasserimmersionsobjektiven 1-Photonen-Anregung ermöglichen und damit die Bildgebung an lebenden Zellen mit höherer Effizienz erlauben.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde das 4Pi-Mikroskop mit einer automatischen Regelung ausgestattet. Werden die Objektive so weit justiert, daß sie sich im Fangbereich der Automatik befinden, werden sie automatisch in allen drei Raumrichtungen auf die optimale Position justiert. Während der Messung verhindert die Regelung ein Auseinanderdriften der Objektive und es muß vom Benutzer nur noch die Phase kontrolliert und gegebenenfalls nachgestellt werden. Eine Möglichkeit der Automatisierung der Phaseneinstellung für 2-Photonen 4Pi-Mikroskopie im Typ C wurde in Kap. 6.2 vorgestellt. Bei Erreichen von Typ C wird bei

---

(c/c)-Einstellung das zentrale Maximum heller und im Gegenzug dazu bei (c/d)-Einstellung dunkler. Bei korrekter Einstellung der Phase besitzt das Hauptmaximum die höchste Intensität. Da auch die Gesamtintensität bei der korrekten Phaseneinstellung maximal wird, ist es im Prinzip möglich, die korrekte Phaseneinstellung anhand der integralen Intensität zu bestimmen.

Für Messungen mit inkohärenter Superposition des Fluoreszenzlichtes (Typ A) kann die PSF näherungsweise durch drei Gaußpeaks beschrieben werden. Es besteht in diesem Fall die Möglichkeit einer automatischen Entfaltung der Daten, wenn jeder  $xz$ -Schnitt mit drei unterschiedlichen Phasen aufgenommen wird. Diese Methode eignet sich insbesondere für 1-Photonen-Anregung, da die Fluoreszenzausbeute deutlich höher als im 2-Photonen-Fall ist. Die Arbeiten legen die Möglichkeit nahe, zukünftig ein „vollautomatisches“ 4Pi-Mikroskop aufzubauen, bei dem Objektiv und Phase justiert werden. Dies ist ein wichtiger Schritt, um den 4Pi-Aufbau weiter zu vereinfachen.

Durch Kombination mit anderen hochauflösenden Techniken könnten in drei Dimensionen hochaufgelöste Daten aufgenommen werden. Andere hochauflösende Techniken wie z. B. STED [23, 49] sind bislang auf zwei Dimensionen beschränkt. Viele biologische Fragestellungen können allerdings nur beantwortet werden, wenn die Zelle dreidimensional betrachtet wird. Um eine hohe Auflösung in allen drei Raumrichtungen zu erhalten, bietet sich 4Pi-STED [21] an. Die laterale Auflösung kann durch den STED-Effekt, die axiale Auflösung durch das 4Pi-Prinzip erhöht werden. Somit könnten hochaufgelöste, dreidimensionale Bilder aufgenommen werden.

Ein weiterer interessanter Punkt ist die Anregung von SHG-Signal (Second Harmonic Generation) in Kombination mit der höheren axialen Auflösung eines 4Pi-Mikroskops. SHG ist ein kohärenter Streuprozess an nicht-zentrosymmetrischen Strukturen, bei dem die Wellenlänge des Anregungslichts halbiert wird. Dadurch wird intrinsisch ein Kontrast erzeugt und es ist keine Markierung der Struktur mit Fluoreszenzfarbstoffen notwendig. SHG-fähige Strukturen innerhalb einer Zelle bzw. eines Gewebes sind beispielsweise Collagen [50] oder Myosin (in Muskelfasern) [8].

Durch die in dieser Arbeit vorgestellten Methoden, hat sich das Spektrum an biologischen Fragen, die mittels 4Pi-Mikroskopie untersucht werden können, deutlich erweitert. Es kann nun damit begonnen werden, diese Fragestellungen zu beantworten.



# Literaturverzeichnis

- [1] ABBE, E.: *Beiträge zur Theorie des Mikroskops und der mikroskopischen Wahrnehmung*. Arch. f. Mikr. Anat., **9**:413–420, 1873.
- [2] BAILEY, B., D. L. FARKAS, D. L. TAYLOR und F. LANNI: *Enhancement of axial resolution in fluorescence microscopy by standing-wave excitation*. Nature, **366**:44–48, 1993.
- [3] BETZIG, E., G. H. PATTERSON, R. SOUGRAT, O. W. LINDWASSER, S. OLENYCH, J. S. BONIFACINO, M. W. DAVIDSON, J. LIPPINCOTT-SCHWARTZ und H. F. HESS: *Imaging Intracellular Fluorescent Proteins at Nanometer Resolution*. Science, **313**(5793):1642–1645, 2006.
- [4] BEWERSDORF, J., B. T. BENNETT und K. L. KNIGHT: *H2AX chromatin structures and their response to DNA damage revealed by 4Pi microscopy*. PNAS, **103**(48):18137–18142, 2006.
- [5] BEWERSDORF, J., R. SCHMIDT und S. W. HELL: *Comparison of I5M and 4Pi-microscopy*. J. Microsc., **222**:105–117, 2006.
- [6] BEWERSDORF, JÖRG: *4Pi-konfokale Fluoreszenzmikroskopie mit 1-Photonen-Anregung*. Dissertation, Ruprecht-Karls-Universität, 2002.
- [7] BORN, MAX: *Optik Ein Lehrbuch der elektromagnetischen Lichttheorie*. Springer-Verlag, 1972.
- [8] BOTH, M., M. VOGEL, O. FRIEDRICH, F. v. WEGENER, T. KÜNSTING, R. H. A. FINK und D. UTTENWEILER: *Second harmonic imaging of intrinsic signals in muscle fibers in situ*. J. Biomed. Opt., **9**(5):882–892, 2004.
- [9] CHUANG, T., S. MOSHIR, Y. GARINI, A. CHUANG, I. YOUNG, B. VERMOLLEN, R. VAN DEN DOEL, V. MOUGEY, M. PERRIN, M. BRAUN, P. KERR, T. FEST, P. BOUKAMP und S. MAI: *The three-dimensional organization of telomeres in the nucleus of mammalian cells*. BMC Biology, **2**(1):12, 2004.

- [10] CREMER, T. und C. CREMER: *Chromosome Territories, Nuclear Architecture and Gene Regulation in Mammalian Cells*. Nature Reviews Genetics, **2**(4):292–301, 2001. 1471-0056.
- [11] DAVIS, BRYNMOR J.: *Analysis of multi-channel microscopy: spectral self-interference, multi-detector confocal and 4Pi systems*. Doctoral Thesis, Boston University, 2006.
- [12] DITTRICH, P.S. und P. SCHWILLE: *Photobleaching and stabilization of fluorophores used for single-molecule analysis with one- and two-photon excitation*. Appl. Phys. B, **73**:829–837, 2001.
- [13] DREZEK, R., A. DUNN und R. RICHARDS-KORTUM: *Light scattering from cells: finite-difference time-domain simulations and goniometric measurements*. Appl. Opt., **38**(16):3651–3661, 1999.
- [14] EGNER, A., S. JAKOBS und S.W. HELL: *Fast 100-nm resolution 3D-microscope reveals structural plasticity of mitochondria in live yeast*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **99**:3370–3375, 2002.
- [15] EGNER, A., M. SCHRADER und S. W. HELL: *Refractive index mismatch induced intensity and phase variations in fluorescence confocal, multiphoton and 4Pi- microscopy*. Opt. Commun., **153**:211–217, 1998.
- [16] ERMLER, S., D. KRUNIC, T. A. KNOCH, S. MOSHIR, S. MAI, K. M. GREULICH-BODE und P. BOUKAMP: *Cell cycle-dependent 3D distribution of telomeres and telomere repeat-binding factor 2 (TRF2) in HaCaT and HaCaT-myc cells*. European Journal of Cell Biology, **83**(11-12):681–690, 2004.
- [17] GUGEL, H., J. BEWERSDORF, S. JAKOBS, J. ENGELHARDT, R. STORZ und S.W. HELL: *Cooperative 4Pi excitation and detection yields 7-fold sharper optical sections in live cell microscopy*. Biophys. J., **87**:4146–4152, 2004.
- [18] GUSTAFSSON, M. G. L., D. A. AGARD und J. W. SEDAT: *Sevenfold improvement of axial resolution in 3D widefield microscopy using two objective lenses*. Proc. SPIE, **2412**:147–156, 1995.
- [19] GUSTAFSSON, M. G. L., D. A. AGARD und J. W. SEDAT: *Sevenfold improvement of axial resolution in 3D widefield microscopy using two objective lenses*. Proc. SPIE, **2412**:147–156, 1995.
- [20] GUSTAFSSON, M.G.L., D.A. AGARD und J.W. SEDAT: *F<sup>5</sup>M: 3D wide-field light microscopy with better than 100 nm axial resolution*. J. Microsc., **195**:10–16, 1999.



- 
- [21] HELL, S. W.: *Increasing the resolution of far-field fluorescence light microscopy by point-spread-function engineering*. In: LAKOWICZ, J.R. (Herausgeber): *Topics in Fluorescence Spectroscopy*, Band 5, Seiten 361–422. Plenum Press, New York, 1997.
- [22] HELL, S. W., G. REINER, C. CREMER und E. H. K. STELZER: *Aberrations in confocal fluorescence microscopy induced by mismatches in refractive index*. *J. Microsc.*, **169**:391–405, 1993.
- [23] HELL, S. W. und J. WICHMANN: *Breaking the diffraction resolution limit by stimulated emission: stimulated emission depletion microscopy*. *Opt. Lett.*, **19**(11):780–782, 1994.
- [24] HESS, S. T., T. P. K. GIRIRAJAN und M. D. MASON: *Ultra-High Resolution Imaging by Fluorescence Photoactivation Localization Microscopy*. *Biophys. J.*, **91**:4258–4272, 2006.
- [25] HILDENBRAND, G., A. RAPP, U. SPÖRI, C. WAGNER, C. CREMER und M. HAUSMANN: *Nano-Sizing of Specific Gene Domains in Intact Human Cell Nuclei by Spatially Modulated Illumination Light Microscopy*. *Biophysical Journal*, **88**:4312–4318, 2005.
- [26] KANO, H., S. JAKOBS, M. NAGORNI und S.W. HELL: *Dual-color 4Pi-confocal microscopy with 3D-resolution in the 100 nm range*. *Ultramicroscopy*, **90**:207–213, 2002.
- [27] KINO, G. S.: *Intermediate Optics in Nipkow Disk Microscopes*. In: PAWLEY, J. B (Herausgeber): *Handbook of biological confocal microscopy*, Seiten 155–165. Plenum Press, 1995.
- [28] LANG, M.C., J. ENGELHARDT und S. W. HELL: *4Pi microscopy with linear fluorescence excitation*. *Opt. Lett.*, **32**(3):259–261, 2007.
- [29] LANG, M.C., T. MÜLLER, J. ENGELHARDT und S.W. HELL: *4Pi microscopy of type A with 1-photon excitation in biological fluorescence imaging*. *Opt. Expr.*, **15**(5):2459–2467, 2007.
- [30] LANNI, F.: *Standing-Wave Fluorescence Microscopy*. In: TAYLOR, D.L. (Herausgeber): *Applications of Fluorescence in the Biomedical Sciences*, Seiten 505–522. Alan R. Liss, Inc., New York, 1986.
- [31] LANNI, F., B. BAILEY, D. L. FARKAS und D. L. TAYLOR: *Excitation field synthesis as a means for obtaining enhanced axial resolution in fluorescence microscopy*. *Bioimaging*, **1**:187–192, 1994.

- [32] LOUIS, S. F., B. J. VERMOLEN, Y. GARINI, I. T. YOUNG, A. GUFFEL, Z. LICHTENSZTEJN, F. KUTTLER, TONY C. Y. C., S. MOSHIR, V. MOUGEY, A. Y. C. CHUANG, P. D. KERR, T. FEST, P. BOUKAMP und S. MAI: *c-Myc induces chromosomal rearrangements through telomere and chromosome remodeling in the interphase nucleus*. PNAS, **102**(27):9613–9618, 2005.
- [33] LUCY, L. B.: *An iterative technique for the rectification of observed distributions*. Astron. J., **79**:745–754, 1974.
- [34] MARKHAM, J. und J.-A. CONCHELLO: *Parametric blind deconvolution of microscopic images: Further results*. In: SPIE, Band **3261**, San Jose, CA, USA, 1998.
- [35] MARTÍNEZ-CORRAL, M.: *Sidelobe decline in single-photon 4Pi microscopy by Toraldo rings*. Micron, (**34**):319–325, 2003.
- [36] MEDDA, R., S. JAKOBS, S.W. HELL und J. BEWERSDORF: *4Pi microscopy of quantum dot-labeled cellular structures*. J. Struct. Biol., **156**:517–523, 2006.
- [37] MINSKY, M.: *Microscopy apparatus*, 1961.
- [38] NAGORNI, M. und S. W. HELL: *Coherent use of opposing lenses for axial resolution increase in fluorescence microscopy. I. Comparative study of concepts*. J. Opt. Soc. Am. A, **18**(1):36–48, 2001.
- [39] NAGORNI, M. und S.W. HELL: *Coherent use of opposing lenses for axial resolution increase in fluorescence microscopy. II. Power and limitation of nonlinear image restoration*. J. Opt. Soc. Am. A, **18**(1):49–54, 2001.
- [40] PATTERSON, G. H. und D. W. PISTON: *Photobleaching in two-photon excitation microscopy*. Biophys. J., **78**:2159–2162, 2000.
- [41] PRESS, WILLIAM H., ET. AL.: *Numerical Recipes in C: the art of scientific computing*. Cambridge University Press, 1992.
- [42] RICHARDS, B. und E. WOLF: *Electromagnetic diffraction in optical systems II. Structure of the image field in an aplanatic system*. Proc. R. Soc. Lond. A, **253**:358–379, 1959.
- [43] RICHARDSON, W. H.: *Bayesian-based iterative method of image restoration*. J. Opt. Soc. Am., **62**:55–59, 1972.
- [44] RUST, M. J., M. BATES und X. ZHUANG: *Sub-diffraction-limit imaging by stochastic optical reconstruction microscopy (STORM)*. Nat. Meth., **3**(10):793–796, 2006.

- [45] SCHRADER, M., K. BAHLMANN, G. GIESE und S.W. HELL: *4Pi-confocal imaging in fixed biological specimens*. Biophys. J., **75**:1659–1668, 1998.
- [46] SPECTOR, D. L.: *Macromolecular domains within the cell nucleus*. Annu. Rev. Cell Biol., **9**:265–315, 1993.
- [47] SPECTOR, D. L.: *Nuclear Domains*. Journal of Cell Science, **114**(16):2891–2893, 2001.
- [48] STAUDT, T., M.C. LANG, R. MEDDA, J. ENGELHARDT und S.W. HELL: *2,2'-Thiodiethanol: A new water soluble mounting medium for high resolution optical microscopy*. Microscopy Research and Technique, **70**:1–9, 2007.
- [49] WESTPHAL, V., L. KASTRUP und S. W. HELL: *Lateral resolution of 28 nm ( $\lambda/25$ ) in far-field fluorescence microscopy*. Appl. Phys. B, **77**(4):377–380, 2003.
- [50] WILLIAMS, R. M., R. W. ZIPFEL und W. W. WEBB: *Interpreting Second-Harmonic Generation Images of Collagen I Fibrils*. Biophys. J., **88**:1377–1386, 2005.
- [51] WOLF, E.: *Electromagnetic diffraction in optical systems I. An integral representation of the image field*. Proc. R. Soc. Lond. A, **253**:349–357, 1959.
- [52] YOUNG, M. F.: *Bone matrix proteins: their function, regulation, and relationship to osteoporosis*. Osteoporos. Int., **14**:S35–S42, 2003.



# Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei all jenen Bedanken, die auf unterschiedlichste Weise am Gelingen dieser Arbeit beteiligt waren.

- ... Herrn Prof. Dr. Stefan W. Hell für die Möglichkeit, dieses interessante Thema zu bearbeiten.
- ... Herrn Prof. Dr. Josef Bille für sein Interesse an meinem Thema und die Bereitschaft das Zweitgutachten zu erstellen.
- ... Der Landesstiftung Baden-Württemberg für finanzielle Unterstützung.
- ... Herrn Dr. Johann Engelhardt für die direkte Betreuung. Vor allem für seine unschätzbaren praktischen Erfahrungen und anregende Diskussionen.
- ... Den Heidelberger Gruppenmitgliedern Thorsten Staudt, Dorothea Hahn, Andreas Engler und Matthias Reuss für abwechslungsreiche Diskussionen und ein angenehmes Arbeitsklima. Thorsten Staudt für Beratung bei chemischen Fragestellungen und seine Hilfe bei der Suche nach einem geeigneten Einbettmedium.
- ... Den Göttinger Kollegen aus der Arbeitsgruppe *NanoBiophotonik* am MPI für biophysikalische Chemie für die freundliche Aufnahme und Unterstützung bei jedem Besuch in Göttingen. Tobias Müller für die Versorgung mit Golgi-Proben. Besonders möchte ich Rebecca Medda für unzählige biologische Proben danken, die sie in Richtung Heidelberg geschickt hat.
- ... Allen Kooperationspartnern für ihr Interesse an der 4Pi-Mikroskopie und das Einbringen von spannenden biologischen Fragestellungen. Michelle Neßling aus der Gruppe *Molekulare Genetik* (DKFZ), Karin Greulich-Bode und Christine Baderschneider aus der Gruppe *Genetik der Hautcarcinogese* (DKFZ), und Inaam Nakchbandi und Anke Bentmann aus dem Institut für Immunologie (Universität Heidelberg) sowie allen anderen Kooperationspartnern.
- ... Der mechanischen Werkstatt des DKFZ, namentlich Herrn Heinrich Rühle und Herrn Wolfram Stroh für ihre hervorragende Arbeit bei der Fertigung des 4Pi-Moduls.
- ... Brynmore Davis for correcting the english version of the abstract.
- ... Falko Lohberger und Bert Grollmann für das Korrekturlesen dieser Arbeit.
- ... Meinem Freund Bert und meiner Familie für ihre Unterstützung bei all meinen Vorhaben.



## Eigene Veröffentlichungen

Teile dieser Dissertation wurden in folgenden Publikationen veröffentlicht:

1. M. C. LANG, T. MÜLLER, J. ENGELHARDT UND S. W. HELL *4Pi microscopy of type A with 1-photon excitation in biological fluorescence imaging*, Optics Express, **15**(5):2459-2467, 2007.
2. M. C. LANG, J. ENGELHARDT UND S. W. HELL *4Pi microscopy with linear fluorescence excitation*, Optical Letters, **32**(3):259-261, 2007.
3. T. STAUDT, M. C. LANG R. MEDDA, J. ENGELHARDT UND S. W. HELL *2,2'-Thiodiethanol: A new water soluble mounting medium for high resolution optical microscopy*, Microscopy Research and Technique, **70**:1-9, 2007.