

# INAUGURAL-DISSERTATION

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

vorgelegt von  
Dipl.-Phys. Andreas Schweitzer  
aus Nürnberg

Tag der mündlichen Prüfung: 09. Juli 2003



Größen- und Distanzmessungen  
unter Verwendung von Ein- und  
Zweiphotonen-Anregung  
mittels räumlich modulierter  
Beleuchtung

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



## **Größen- und Distanzmessungen unter Verwendung von Ein- und Zweiphotonen-Anregung mittels räumlich modulierter Beleuchtung**

Die Fernfeld-Lichtmikroskopie ist eine Methode, um Strukturuntersuchungen an biologisch komplexen Objekten durchzuführen. Dabei können auch Strukturen analysiert werden, deren Abmessungen deutlich kleiner als die optische Auflösung sind, indem Distanzmessungen zwischen Fluoreszenzmarkern vorgenommen werden. Hier wird eine Methode der Fernfeld-Lichtmikroskopie vorgestellt, mit der sowohl Größen- als auch Distanzmessungen an im Vergleich zur optischen Auflösung kleinen, fluoreszierenden Objekten in Richtung der optischen Achse durchgeführt werden können. Dazu werden zwei kollimierte Laserstrahlen zwischen zwei Objektiven kohärent überlagert, so dass sich eine räumlich modulierte Anregungsintensität ergibt.

In der Arbeit werden zunächst die theoretischen Grundlagen von Mikroskopie, Fluoreszenz-Anregung und Interferenz erläutert und wie sich daraus mittels räumlich modulierter Anregung Distanzen und Objektgrößen bestimmen lassen. Darüberhinaus wird der Mikroskopaufbau beschrieben, mit dem Größen- und Distanzmessungen in axialer Richtung durchgeführt werden.

Abschließend wird die Einkopplung eines gepulsten NIR-Laserstrahls in das Mikroskop erläutert, mit dem die Fluoreszenz über Zweiphotonen-Effekte angeregt werden kann. Dabei werden Messungen bei aufgeweitetem Anregungsstrahl und Messungen der Fluoreszenzlebensdauer beschrieben.

## **Size and Distance Measurements using One- and Two-Photon Excitation by Spatially Modulated Illumination**

Far-field light microscopy is a method to study structures of complex biological objects. This method allows to determine distances between fluorescent markers and thereby analysing structures even considerably smaller than the optical resolution limit. Here, a method of far-field light microscopy is presented, which allows size measurements of as well as distance measurements between fluorescent subwavelength-sized objects along the optical axis. For this purpose, two collimated laser beams interfere in the interspace between two objectives, to achieve a spatially modulated illumination.

This thesis firstly describes theoretical principles of microscopy, fluorescence excitation and interference and how distances and object sizes can be determined using spatially modulated illumination. In addition, the microscope setup is being described, which is used to perform size and distance measurements in axial direction.

Finally, the launch of a pulsed NIR laser beam into the microscope to excite fluorescence emission by two-photon-effects is described. In this case measurements using a widened excitation beam and fluorescence lifetime measurements have been successfully carried out.



# Inhaltsverzeichnis

<b>1. Einleitung</b>	<b>1</b>
<b>2. Grundlagen der Strukturuntersuchung und Mikroskopie</b>	<b>5</b>
2.1. Strukturuntersuchungen . . . . .	5
2.2. Mikroskopie . . . . .	8
2.2.1. Geometrische Optik . . . . .	8
2.2.2. Wellenoptik und Bildentstehung . . . . .	12
<b>3. Fluoreszenz in der Mikroskopie</b>	<b>21</b>
3.1. Grundlagen der Fluoreszenz . . . . .	21
3.2. Quantenmechanik der Fluoreszenz-Anregung . . . . .	24
3.3. Fluoreszenzmikroskopie . . . . .	28
3.3.1. Epifluoreszenzmikroskopie . . . . .	28
3.3.2. Konfokale Laser-Scanning-Mikroskopie . . . . .	28
3.3.3. Moderne Fluoreszenzmikroskope . . . . .	30
3.3.4. Spektrale Präzisions-Distanz-Mikroskopie . . . . .	30
<b>4. Interferenz und Mikroskopie mit räumlich modulierter Anregung</b>	<b>33</b>
4.1. Grundlagen von Interferenz . . . . .	33
4.1.1. Interferenzbedingungen . . . . .	37
4.2. Spiegel-Interferometer . . . . .	37
4.2.1. Michelson-Interferometer . . . . .	38
4.2.2. Mach-Zehnder-Interferometer . . . . .	41
4.2.3. Sagnac-Interferometer . . . . .	41
4.3. Sterninterferometrie . . . . .	42
4.4. SMI-Mikroskopie . . . . .	46
4.4.1. Punktbildfunktion . . . . .	48
4.4.2. Auswertung der Bilddaten . . . . .	51
4.4.3. Distanzmessung . . . . .	51
4.4.4. Größenmessung . . . . .	56
4.5. Anwendung der Zweiphotonen-Anregung in der SMI-Mikroskopie . . . . .	60

<b>5. Aufbau und Justage eines Mikroskops mit räumlich modulierter Anregung</b>	<b>67</b>
5.1. SMI-Mikroskop für eine Anregungswellenlänge von 458 nm . . . . .	67
5.1.1. Aufbau des Anregungsstrahlengangs . . . . .	68
5.1.2. Objekt- und Spiegelpositionierung . . . . .	74
5.1.3. Aufbau des Detektionsstrahlengangs . . . . .	76
5.2. SMI-Mikroskop für Zweiphotonen-Anregung . . . . .	79
5.2.1. Aufbau des Anregungsstrahlengangs . . . . .	80
5.2.2. Aufbau des Detektionsstrahlengangs . . . . .	83
<b>6. Messungen und Ergebnisse</b>	<b>87</b>
6.1. Einphotonen-Anregung mit einer Anregungswellenlänge von 458 nm .	87
6.1.1. Durchführung der Messungen . . . . .	88
6.1.2. Messung der axialen Intensitätsverteilung . . . . .	90
6.1.3. Größenmessungen . . . . .	93
6.1.4. Distanzmessungen . . . . .	99
6.2. Zweiphotonen-Anregung . . . . .	104
6.2.1. Messungen im fokussierten Modus . . . . .	104
6.2.2. Messungen der Fluoreszenzlebensdauer im fokussierten Modus	108
6.2.3. Messungen im Epifluoreszenzmodus . . . . .	111
6.2.4. Durchführung der Experimente . . . . .	113
6.2.5. Messungen von Fluoreszenzlebensdauern im Epifluoreszenzmo-	
dus . . . . .	117
6.2.6. Experimente zur Implementierung der SMI-Anregung . . . . .	119
<b>7. Zusammenfassung und Ausblick</b>	<b>123</b>
7.1. Zusammenfassung . . . . .	123
7.2. Ausblick . . . . .	127
<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>133</b>
<b>Danksagung</b>	<b>139</b>



# Abbildungsverzeichnis

2.1. Veranschaulichung der Größenordnungen, die bei Strukturuntersuchungen betrachtet werden. . . . .	6
2.2. Lichtbrechung an einer sphärischen Oberfläche im Punkt A. Dabei ist $R$ der Krümmungsradius, $s_0$ und $s_1$ die Gegenstands- bzw. Bildweite.	9
2.3. Strahlengang in einem konventionellen Mikroskop mit zwei Linsen a) und in einem Mikroskop mit auf „unendlich“ gerechneten Objektiven b). . . . .	11
2.4. Darstellung der Punktbildfunktion in lateraler und axialer Richtung. .	15
2.5. Ein direkter Vergleich der Punktbildfunktionen zeigt, dass die axiale Punktbildfunktion etwa dreimal breiter ist als in lateraler Richtung. Bei der Berechnung von $r$ und $z$ aus $p$ und $q$ wurden die Parameter $NA = 1,25$ , $\lambda = 458$ nm und $n = 1,5$ verwendet. . . . .	16
2.6. Intensitätsverläufe zweier punktförmiger Objekte im Mindestabstand nach dem Rayleigh-Kriterium, wobei $p$ die generalisierte optische Koordinate in lateraler Richtung darstellt. . . . .	17
2.7. Auflösung der Bilder zweier punktförmiger Objekte nach dem FWHM-Kriterium, mit $p$ wie in Abbildung 2.6. . . . .	18
3.1. Energieniveauschema eines mehratomigen Fluoreszenzfarbstoffmoleküls. Dabei sind die elektronischen Singulettzustände $S_0$ und $S_1$ sowie der Triplettzustand $T_1$ mit einigen vibratorischen Unterniveaus dargestellt. IC: Internal Conversion, ISC: Inter System Crossing (nach [Albrecht02a]). . . . .	22
3.2. Prinzip der konfokalen Laser-Scanning-Mikroskopie [Leica]. . . . .	29
3.3. Prinzipieller Aufbau des 4Pi-Mikroskops in Kombination mit der STED-Mikroskopie [MPIbpcNews02]. . . . .	31
4.1. Überlagerung zweier Wellen im Punkt $P$ , die von den Punkten $S_1$ und $S_2$ ausgehen. Aus [Hecht99], Seite 354. . . . .	34
4.2. Schematische Darstellung des Michelson-Interferometers. Aus [Hecht99] Seite 374. . . . .	38

4.3.	Gesamtdarstellung der Teleskope des VLT. Dabei sind <i>UT1</i> bis <i>UT4</i> die „Unit“-Teleskope mit einem Spiegeldurchmesser von jeweils 8,20 m. Die beiden mit <i>AT</i> bezeichneten Teleskope sind „Hilfsteleskope“, die zur Durchführung der Interferometrie benötigt werden [VLTIWhitebook98]. . . . .	43
4.4.	Das „Catseye“ ist ein kleines, bewegliches Spiegelsystem zur Einstellung der optischen Weglängen [VLTIWhitebook98]. . . . .	44
4.5.	Prinzip der Messung kleiner Winkelgrößen durch Sterninterferometrie.	45
4.6.	Prinzip der Anregung im SMI-Mikroskop. Zwei kohärente Laserstrahlen werden in die hinteren Fokusebenen zweier gegenüberstehender Objektive einfokussiert, wodurch sich zwischen den Objektiven ein stehendes Wellenfeld ausbildet (nach [Albrecht02a]. . . . .	46
4.7.	Detektionsprinzip des SMI-Mikroskops. Die PSF wird durch Verschieben des Objekts in axialer Richtung durch das ortsfeste Wellenfeld erhalten. Unter der Voraussetzung, dass alle auftretenden Brechungsindizes gleich sind erhält man bei einem Maximum in der Fokusebene $z_f = z_w$ einen Intensitätsverlauf nach Abbildung 4.8 [Albrecht02a]. . .	49
4.8.	Axialer Intensitätsverlauf im SMI-Mikroskop berechnet aus Gleichung (4.29) unter Berücksichtigung experimentell sinnvoller Werte $n = 1,5$ , $\lambda = 458$ nm, $NA = 1,25$ , und $\vartheta = 0$ . Weiterhin ist $z_0 = z^* = 1,5$ $\mu\text{m}$ und $\delta = 0$ . . . . .	50
4.9.	Axiale Punktbildfunktionen zweier verschiedener Objekte gleicher spektraler Signatur, die sich in ihrer Position unterscheiden. Dabei ist $z_{01} = 1,6$ $\mu\text{m}$ und $z_{02} = 1,4$ $\mu\text{m}$ . Darüberhinaus wurde $z_{01} - z_1^* = z_{02} - z_2^* = 50$ nm gesetzt, während alle anderen Parameter mit denen aus Abbildung 4.8 übereinstimmen. . . . .	54
4.10.	Verlauf der nach Gleichung (4.39) berechneten Anpassungsfunktion. Dabei wurde für $F = 0$ , $B = E = 2,5 \cdot 10^{-7}$ m, $C = 4,85 \cdot 10^{-8}$ m sowie $z_1 = z_2 = z_3 = 1,5$ $\mu\text{m}$ eingesetzt. Die Tatsache, dass es sich hier um ein ausgedehntes Objekt mit etwa 100 nm Durchmesser handelt, wird durch $A = 0,7$ und $D = 0,3$ berücksichtigt. . . . .	55
4.11.	Auswirkungen der Objektgröße auf den Verlauf der Anpassungsfunktion nach Gleichung (4.39). Dabei entspricht die Objektausdehnung in Fall a) dem halben und in Fall b) einem ganzen Wellenfrontenabstand (nach [Albrecht02a]). . . . .	57
4.12.	Prinzip der Größenmessung durch einen analytischen Ansatz. . . . .	58
4.13.	Kalibrationskurven zur Bestimmung der Objektgröße aus dem Modulationskontrast. . . . .	59
4.14.	Kalibrationskurven zur Bestimmung der Objektgröße aus dem Modulationskontrast unter Berücksichtigung der Objektform. . . . .	60
4.15.	Axialer Intensitätsverlauf bei Verwendung einer Anregungswellenlänge von $\lambda_{ex} = 760$ nm (links) und $\lambda_{ex} = 458$ nm (rechts). . . . .	61

4.16. Durch virtuelle SMI-Mikroskopie festgestellte axiale Distanzen fluoreszierender Nanopartikel bei Zweiphotonen-Anregung. . . . .	63
4.17. Abschätzung der axialen Auflösung durch virtuelle SMI-Mikroskopie unter Verwendung der Zweiphotonen-Anregung. . . . .	64
4.18. Kalibrationskurve zur Größenbestimmung und Verwendung der Zweiphotonen-Anregung. . . . .	65
5.1. Schematische Darstellung des SMI-Mikroskopaufbaus für eine Anregungswellenlänge von $\lambda_{ex} = 458$ nm. . . . .	68
5.2. SMI-Mikroskopaufbau bei Verwendung von $\lambda_{ex} = 458$ nm. . . . .	69
5.3. Aufbau des Kollimators, der zur Aufweitung des Laserstrahls verwendet wird. . . . .	71
5.4. Grundstruktur und wesentliche Bestandteile des interferometrischen Anregungsstrahlengangs. . . . .	72
5.5. Strahlengang zur Detektion des Fluoreszenzlichts aus dem Objektbereich. . . . .	77
5.6. Schematische Darstellung des SMI-Mikroskopaufbaus unter Verwendung der Zweiphotonen-Anregung $\lambda_{ex} \approx 760$ nm. . . . .	79
5.7. SMI-Mikroskop zur Verwendung mit Zweiphotonen-Anregung. . . . .	80
5.8. Aufbau und Struktur des Detektionssystems PicoStar HR12, das grundsätzlich aus dem Bildverstärker und der CCD-Kamera zusammengesetzt ist. . . . .	84
6.1. Darstellung experimenteller Messkurven grün fluoreszierender Beads mit einer nominalen Größe (Herstellerangaben) von a) 57 nm, b) 71 nm, c) 100 nm, d) 140 nm und e) 200 nm. Die Messungen wurden mit den einfachen Objektiven durchgeführt. . . . .	91
6.2. Darstellung experimenteller, mittels SMI-Mikroskopie aufgenommener Messkurven grün fluoreszierender Beads mit einer nominalen Größe (Herstellerangaben) von a) 57 nm, b) 71 nm, c) 100 nm, d) 140 nm und e) 200 nm. Diese Messungen wurden mit den Hochleistungsobjektiven durchgeführt. . . . .	92
6.3. Größenmessungen an grün fluoreszierenden Beads. In a) sind die Einzelmessungen für die verschiedenen Objekte dargestellt. In b) ist der daraus erhaltene Mittelwert aufgetragen, wobei die Fehlerbalken aus der Standardabweichung der Einzelmessung berechnet sind. Zum Vergleich sind die nominellen Objektgrößen eingetragen. . . . .	94

6.4.	Größenmessungen an grün fluoreszierenden Beads unter Verwendung von Hochleistungsobjektiven. In a) sind die Einzelmessungen für die verschiedenen Objekte dargestellt. In b) ist der daraus erhaltene Mittelwert aufgetragen, wobei die Fehlerbalken aus der Standardabweichung der Einzelmessung berechnet werden. Zum Vergleich sind die nominellen Objektgrößen eingetragen. . . . .	96
6.5.	Am CLSM aufgenommene axiale Intensitätsverteilungen. Dabei wurde bei a) ein 140 nm Bead und bei b) ein 57 nm Bead gemessen. . . . .	97
6.6.	Messungen der FWHM in z-Richtung von grün fluoreszierenden Beads am CLSM. Hier sind in a) die Einzelmessungen und in b) die Mittelwerte der gemessenen FWHM aufgetragen. Die Fehler sind aus der Standardabweichung der Einzelmessung berechnet. . . . .	98
6.7.	Vergleich der Größenmessungen, die am SMI-Mikroskop und am CLSM durchgeführt wurden. . . . .	99
6.8.	Dreidimensionale Darstellung von SMI-Datensätzen. In den oberen Bildern ist ein Bildstapel mit 140 nm Beads, aufgenommen mit einfachen Objektiven, gezeigt. Die unteren Bilder sind aus einem Bildstapel mit 100 nm Beads extrahiert, die mit korrigierten Hochleistungsobjektiven aufgenommen wurden. Dabei sind in den Darstellungen der Rohdaten a) und c) deutlich die modulierten Strukturen zu erkennen. Aus der gemessenen Objektgröße und der Objektposition wurden „realistische“ 3D-Bilder berechnet b) und d). . . . .	103
6.9.	Zweiphotonen-Anregung fluoreszierender Farbstoffe im fokussierten Modus. . . . .	105
6.10.	Zweiphotonen-Anregung von ZnS-Kristallen im fokussierten Modus bei gleichzeitiger Durchlichtbeleuchtung. . . . .	106
6.11.	Zweiphotonen-Anregung von UV-anregbaren Mikropartikeln ( $d = 200$ nm) im fokussierten Modus. Aus dem lateralen Intensitätsprofil ergibt sich eine FWHM von $5,2 \mu\text{m}$ , so dass bei diesem Objekt von einem Cluster aus Mikropartikeln auszugehen ist. . . . .	107
6.12.	Darstellung der Fluoreszenzintensität in Abhängigkeit von der Intensität der Zweiphotonen-Anregung. . . . .	108
6.13.	Lebensdauerprofile der Farbstoffe Coumarin a), Dapoxyl b) und F-Rot c). Daraus ergeben sich Fluoreszenzlebensdauern von $(1,6 \pm 0,2)$ ns, $(6,2 \pm 0,9)$ ns und $> 12$ ns . . . . .	110
6.14.	Zweiphotonen-Anregung von Rhodamin-6G-Kristallen im Epifluoreszenzmodus, wobei der Durchmesser der Anregungszone auf etwa $40 \mu\text{m}$ aufgeweitet ist. . . . .	114
6.15.	Zweiphotonen-Anregung von grün fluoreszierenden Mikropartikeln ( $d = 2 \mu\text{m}$ ) im Epifluoreszenzmodus, wobei der Durchmesser der Anregungszone auf etwa $40 \mu\text{m}$ aufgeweitet ist. . . . .	115

6.16. Zweiphotonen-Anregung von UV-anregbaren Mikropartikeln ( $d = 200$ nm) im Epifluoreszenzmodus, wobei der Durchmesser der Anregungszone auf etwa $40 \mu\text{m}$ aufgeweitet ist. . . . .	116
6.17. Lebensdauerprofile der Farbstoffe Coumarin a) und Dapoxyl b) aufgenommen im Epifluoreszenzmodus. Dabei ergeben sich Fluoreszenzlebensdauern von $(2,2 \pm 0,3)$ ns für Coumarin und $(7,6 \pm 1,0)$ ns für Dapoxyl. . . . .	117
6.18. Direkter Vergleich der Fluoreszenzlebensdauern von Coumarin und Dapoxyl. Hieraus ist ersichtlich, dass die Fluoreszenzlebensdauern beider Farbstoffe gut unterschieden werden können und somit eine weitere spektrale Signatur zur Fluoreszenzmarkierung zur Verfügung steht. . .	118



# Tabellenverzeichnis

4.1. Objektformen für die Größenbestimmung. . . . .	58
4.2. Bestimmung der axialen Distanz $d$ [nm] durch virtuelle SMI-Mikroskopie bei Zweiphotonen-Anregung. . . . .	62
4.3. Bestimmung der axialen Auflösung $R$ [nm] durch virtuelle SMI-Mikroskopie unter Verwendung der Zweiphotonen-Anregung. . . . .	64
5.1. Spezifikationen der Imager 3 CCD-Kamera (LaVision GmbH). . . . .	78
5.2. Spezifikationen der Bildverstärker-Kontrolleinheit (LaVision GmbH). . . . .	85
5.3. Arbeitsmodi des Bildverstärkers (LaVision GmbH). . . . .	86
5.4. Spezifikationen Picosekunden Verzögerungseinheit (LaVision GmbH). . . . .	86
6.1. Ergebnisse der Größenmessungen an Beads unterschiedlicher Größe. Die angegebenen Fehler entsprechen der Standardabweichung der Einzelmessung. Die nominellen Größen beziehen sich dabei auf Herstellerangaben. . . . .	94
6.2. Ergebnisse der Größenmessungen an Beads unterschiedlicher Größe, wobei diese Messungen mit den Hochleistungsobjektiven durchgeführt wurden. Die angegebenen Fehler entsprechen der Standardabweichung der Einzelmessung. Die nominellen Größen beziehen sich dabei auf Herstellerangaben. . . . .	96
6.3. Signal-zu-Rausch-Verhältnisse bei Messungen unterschiedlich großer Objekte am konfokalen Laser-Scanning-Mikroskop. . . . .	97
6.4. Ergebnisse der Größenmessungen an Beads unterschiedlicher Größe am CLSM. Die angegebenen Fehler entsprechen der Standardabweichung der Einzelmessung. Die nominellen Größen beziehen sich dabei auf Herstellerangaben. . . . .	98
6.5. Axiale Distanzmessungen an Beads mit 100 nm Durchmesser am SMI-Mikroskop unter Verwendung einfacher Objektive. Die angegebenen Fehler entsprechen der Standardabweichung der Einzelmessung. . . . .	100
6.6. Axiale Distanzmessungen an Beads mit 100 nm Durchmesser am SMI-Mikroskop unter Verwendung der Hochleistungsobjektive. Die angegebenen Fehler entsprechen der Standardabweichung der Einzelmessung. . . . .	102

6.7. Ergebnisse der Fluoreszenzlebensdauermessungen an verschiedenen Farbstoffen. . . . .	118
---	-----



# 1. Einleitung

Strukturuntersuchungen sind heute die wichtigsten Methoden in der Naturwissenschaft, um Informationen über den Aufbau der uns umgebenden Materie von sehr kleinen Skalen (Elementarteilchen) zu sehr großen Skalen (Universum) zu erhalten. Die Lichtmikroskopie ist eine Methode der Strukturuntersuchung für mittlere Skalen ( $\approx 10^7$  m), die als Sonde Photonen unterschiedlicher Energie im Bereich um 1 eV benutzt. Die meisten heute bekannten Erkenntnisse bezüglich der Strukturen biologisch komplexer Lebensformen auf der Ebene der Zellen wurden mit Hilfe der Lichtmikroskopie gewonnen. Die Lichtmikroskopie hat den Nachteil, dass das damit erreichbare Auflösungsvermögen (Mindestabstand, bei dem zwei punktförmige Objekte noch getrennt wahrgenommen werden können) bis auf einige hundert Nanometer nach unten begrenzt ist. Das ergibt sich aus der Theorie der optischen Auflösung nach **Ernst Abbe** von 1879.

Aus diesem Grunde wurden in den letzten Jahrzehnten neue Mikroskopiemethoden, wie z.B.: Elektronenmikroskopie, atomare Kraftmikroskopie (*engl. Atomic Force Microscopy, AFM*) und optische Nahfeldmikroskopie (*engl. Scanning Nearfield Optical Microscopy, SNOM*) entwickelt. Diese Methoden haben jedoch, obwohl man mit ihnen auch wesentlich kleinere Strukturen erkennen kann, den erheblichen Nachteil, dass die verwendeten Proben in sehr aufwendigen Verfahren präpariert werden müssen. Diese Präparationen lassen keine Untersuchungen an biologischen Proben in ihrer natürlichen Umgebung oder sogar Messungen an lebenden Objekten (*in vivo*) zu. Darüberhinaus können mit diesen Verfahren ausschließlich Oberflächen abgebildet werden. Um diese Probleme zu umgehen, wurde die Fernfeld-Lichtmikroskopie in der letzten Zeit wieder verstärkt weiterentwickelt, wobei man auch moderne Bildverarbeitungsmethoden und Anregungsmechanismen mit einbezieht. Bei der Fernfeld-Lichtmikroskopie sind die Dimensionen der Apparatur und der Abstand zwischen Probe und Objektiv groß im Vergleich zur verwendeten Wellenlänge. Dadurch wird eine direkte Berührung der Probe durch das Objektiv vermieden, so dass keine spezielle Präparation der Probe erforderlich ist und folglich die in der biologischen Forschung üblichen, konventionellen Präparationen der Objekte zwischen Objektträgern und Deckglas ermöglicht werden.

Die optische Fernfeld-Lichtmikroskopie ist nach wie vor eine der wichtigsten Methoden, um dreidimensionale Strukturen in Zellen zu untersuchen. Um dabei topologische Untersuchungen an biologischen Objekten durch die Messung von Positionen,

Distanzen und Größen mit hoher Genauigkeit auch innerhalb von dicken Proben vorzunehmen zu können, werden die interessierenden Regionen auf der DNA (Genabschnitte) oder einzelne Zellorganellen mit fluoreszierenden Markern versehen, welche mit geeignetem Anregungslicht (beteiligt durch Quecksilberdampflampen oder Laser) zur Fluoreszenz (siehe Kapitel 3) angeregt und z.B. über eine CCD-Kamera oder Photodioden detektiert werden. Eine besonders interessante Variante der **Fluoreszenzmikroskopie** ist die Ende der 70er Jahre entwickelte konfokale Laser-Scanning-Mikroskopie (CLSM)[CCremer78]. Hierbei wird die Probe mit dem anregenden Lichtstrahl zeilenweise abgerastert und das Fluoreszenzlicht mit einer konfokalen Blende von dem Licht aus nicht im Fokus befindlichen Ebenen getrennt. Dieses Verfahren wird heute routinemäßig und erfolgreich in der biologischen Forschung angewendet.

Mit Hilfe der Fluoreszenzmikroskopie ist eine Auflösung von etwa 300 nm in lateraler Richtung (Ebene senkrecht zur optischen Achse) und etwa 600 nm in axialer Richtung entlang der optischen Achse erreichbar. Eine deutliche Erhöhung der Distanzauflösung bzw. des Auflösungsäquivalents ergibt sich, wenn die punktförmigen fluoreszierenden Objekte, zwischen welchen die Distanzen gemessen werden sollen, mit Fluoreszenzfarbstoffen unterschiedlicher **spektraler Signatur** markiert werden (spektrale Präzisions-Distanz-Mikroskopie, SPDM) [Edelmann99]. Bei Anwendung dieser Methode kann die Distanzauflösung auf bis zu 30 nm in lateraler und 50 nm in axialer Richtung verbessert werden.

Von biologischem Interesse ist dabei insbesondere die Bestimmung von Größen und Distanzen einzelner, mittels der Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH) markierter DNA-Abschnitte [Esa00, Speicher96]. Aus diesen Messungen kann die morphologische Struktur des Genoms bzw. der Genom-Nanostrukturen [TCremer01] innerhalb der betrachteten Objekte bestimmt werden. Unter der Annahme einer dreidimensionalen funktionellen Struktur der Chromosomenterritorien kann aus der Kenntnis der Morphologie auf fundamentale Parameter, wie Genaktivität und Genexpression, geschlossen werden. Weiterhin kann mit dieser Methode der Einfluss pathologischer Ereignisse auf die Genom-Nanostrukturen festgestellt werden. In der letzten Zeit liegt ein Hauptinteresse der biologischen Forschung in der Untersuchung sogenannter biomolekularer Maschinen (BMM). Dabei handelt es sich um funktionelle supramolekulare Biostrukturen, welche wichtige Funktionen innerhalb der Zellen ausüben. Um diese Strukturen zu untersuchen, ist es erforderlich, Distanzen bis in den Bereich von 10 nm und darunter zu messen. Dieser Messbereich ist jedoch bisher nur mit Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer(FRET)-Methoden zugänglich [Lilley00], die den Abstand zwischen zwei unmittelbar benachbarten Molekülen liefern. Eine topologische Strukturbestimmung kann auf diese Weise nicht erfolgen. Aus diesem Grunde ist die Verbesserung der Lokalisation mehrerer spezifisch fluoreszierender Objekte und damit eine verbesserte Bestimmung der Distanzen zwischen vielen Objekten das wesentliche Ziel bei der Weiterentwicklung der Fernfeld-Fluoreszenzmikroskopie.

In den letzten Jahren wurde durch Veränderungen an der Punktabbildungs-

---

funktion (*engl. Point Spread Function Engineering*) eine deutliche Verbesserung der Auflösung bis hinunter in den 30-nm-Bereich erreicht. Die konfokale 4Pi-Mikroskopie [Hell94a] beruht dabei auf einer deutlichen Vergrößerung der numerischen Apertur ( $NA$ ), da in diesem Fall durch zwei gegenüberliegende Objektive gleichzeitig detektiert und angeregt wird. Eine weitere Methode ist die *Stimulated-Emission-Depletion-Mikroskopie (STED)* [Hell94b]. Hier wird eine erhebliche Reduzierung der Halbwertsbreite der Punktabbildungsfunktion durch gezielte Entvölkerung des angeregten Zustands außerhalb des Fokuspunkts erreicht. Darüberhinaus werden die sehr genauen Distanzmessmethoden der Interferometrie mit der Lichtmikroskopie in zunehmendem Maße verknüpft, z.B. im Rahmen der *Standing Wavefield Fluorescence Microscopy* [Bailey93, Lanni86a, Lanni86b].

In der Arbeitsgruppe Angewandte Optik und Informationsverarbeitung von Herrn Prof. Dr. Dr. C. Cremer am Kirchhoff-Institut für Physik der Universität Heidelberg wird die Mikroskopie mit räumlich modulierter Anregung (*engl. Spatially Modulated Illumination, SMI*) [Schneider99] betrieben, mit der es möglich ist, kleine fluoreszierende Objekte bis auf wenige Nanometer genau zu lokalisieren und deren Distanzen zu bestimmen. Dabei muss erwähnt werden, dass diese Methode nicht in erster Linie zur Erhöhung der effektiven Auflösung als vielmehr der Optimierung der Lokalisationsgenauigkeit dient, die aufgrund der erhaltenen Phaseninformation erreicht wird. Damit wird deutlich, dass es sich hierbei um eine Methode der optischen Interferometrie handelt, die bekanntlich eine der genauesten Messtechniken der Physik darstellt und im Allgemeinen zur Messung sehr kleiner Wegunterschiede oder Ähnlichem verwendet wird. Lokalisations- und Distanzmessungen bei einer Anregungswellenlänge von 488 nm werden in [Albrecht02a, Albrecht02b] vorgestellt. Weiterhin kann die SMI-Mikroskopie zur Größenbestimmung kleiner fluoreszierender Objekte bei der Anregungswellenlänge von 488 nm bis hinunter zu einer Größe von 40 nm herangezogen werden [Failla02a, Failla02b].

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit der Weiterentwicklung der Mikroskopie mit räumlich modulierter Anregung hin zu kleineren Anregungswellenlängen im Bereich von 458 nm, sowie mit der Implementierung der Zweiphotonen-Anregung für diese Mikroskopiemethode. Dazu werden zunächst die Grundlagen von Strukturuntersuchungen und Mikroskopie (Kapitel 2) sowie die Theorie der Fluoreszenz mit Ein- und Zweiphotonen-Anregung (Kapitel 3) und deren Anwendung in der Mikroskopie beschrieben.

In Kapitel 4 wird nach der Erläuterung der Grundlagen von Interferenz eingehend auf die Methode der Mikroskopie mit räumlich modulierter Anregung eingegangen und der bisherige Stand dieser Technologie verdeutlicht. Diese Mikroskopiemethode wird im Wesentlichen auf der Grundlage der Interferenz des Anregungslichts durchgeführt, die grundsätzlich sehr genaue Positions- und Abstandsbestimmungen erlaubt. Der Mikroskop-Prototyp, der im Rahmen dieser Arbeit aufgebaut und für die Messungen verwendet wurde, wird ausführlich in Kapitel 5 beschrieben.

Die in diesem Zusammenhang durchgeführten Experimente sind Inhalt von Kapitel 6. Hier werden einerseits Messungen und Untersuchungen vorgestellt, die sich auf eine kürzere Anregungswellenlänge bei Einphotonen-Anregung beziehen. Andererseits wird die Anwendung der Zweiphotonen-Anregung von der ersten Detektion von Fluoreszenz über die Aufweitung des Anregungsstrahls zu einem Querschnitt von mehreren Mikrometern, dem sogenannten Epifluoreszenzbetrieb, bis hin zu Lebensdauermessungen vorgestellt.

Im letzten Kapitel 7 werden noch einmal die wesentlichen Ergebnisse zusammengefasst und daraus Schlüsse für das weitere Vorgehen gezogen. Dabei soll insbesondere darauf eingegangen werden, welchen Einfluss die erhaltenen Untersuchungsergebnisse auf die praktische Anwendung dieser Mikroskopiemethode bei der Untersuchung biologischer Proben hat. Darüberhinaus wird auch die Kombination verschiedener Mikroskopiemethoden und deren praktische Machbarkeit diskutiert. Ein kurzer Ausblick bezüglich der weiteren Schritte bis hin zur möglichen Kommerzialisierung der hier vorgestellten Konzepte schließt diese Arbeit ab.

## 2. Grundlagen der Strukturuntersuchung und Mikroskopie

In diesem Kapitel wird auf die grundlegenden Prinzipien der Strukturuntersuchung mit physikalischen Methoden eingegangen. Dadurch wird die Mikroskopie bzw. Nanoskopie in einen größeren Gesamtzusammenhang gestellt, mit dem aufgezeigt wird, dass es viele Parallelen zwischen den meisten Teilgebieten der Physik von der Untersuchung der Elementarteilchen bis hin zur Beobachtung von Strukturen im Universum gibt. Daran schließt sich eine Darstellung der geometrischen Optik an, die als notwendige Grundlage zum Verständnis der Mikroskopie dringend erforderlich ist.

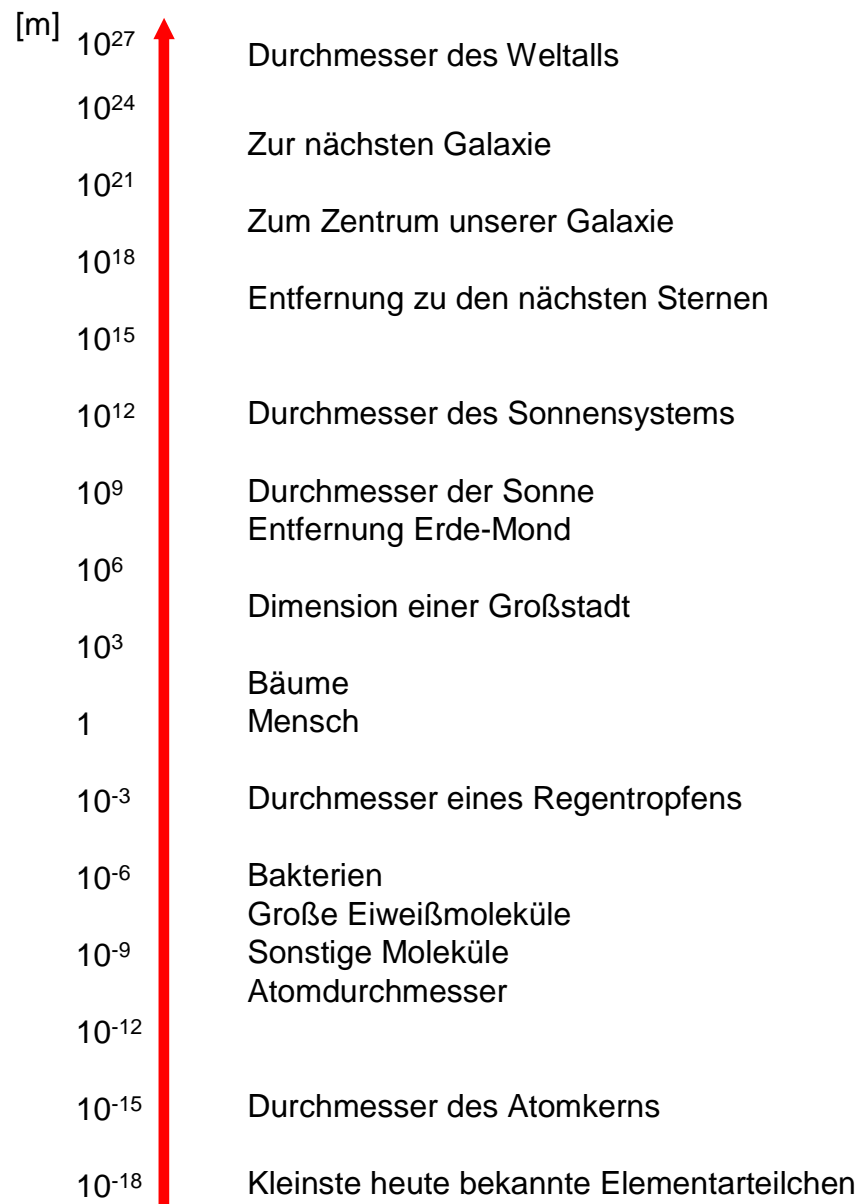
### 2.1. Strukturuntersuchungen

Die wesentliche Aufgabe der Physik ist die Untersuchung der Struktur der uns umgebenden Materie. Die daraus erhaltenen Erkenntnisse und die dabei auftretenden Wechselwirkungen sind die entscheidende Grundlage aller Naturwissenschaften. Strukturuntersuchungen werden auf allen Größenskalen durchgeführt, angefangen bei etwa  $10^{-18}$  m zur Untersuchung der inneren Strukturen der Elementarteilchen, wie z.B. der Protonen in der Hochenergiephysik bis hin zu sehr großen Skalen von  $10^{20}$  m und mehr bei der Bestimmung von Strukturen des Universums in Astronomie und Astrophysik. Die Skalenverhältnisse sind logarithmisch in Abbildung 2.1 dargestellt.

Auch die Mikroskopie ist eine Methode der Strukturuntersuchung, die sich folglich auf der Mikrometerskala ( $10^{-6}$  m) abspielt. In diesem Bereich werden in erster Linie biologische Präparate und Strukturen von Oberflächen betrachtet. In der letzten Zeit wurde die Mikroskopie hin zu kleinen Skalen im Nanometerbereich ( $10^{-9}$  m) ausgedehnt, weshalb sie hier als Nanoskopie bezeichnet wird.

Die Strukturuntersuchungen laufen in allen Größenbereichen nach derselben Methodik ab. Die zu untersuchende Struktur ist ein Target oder Zielobjekt, das sich entweder in Ruhe befindet oder selbst beschleunigt bzw. bewegt wird. Dieses Target wird mit Hilfe von Sonden untersucht, welche in der Regel leichte Teilchen (Leptonen)

### Größenskala der in der Natur vorkommenden Dimensionen



**Abbildung 2.1.:** Veranschaulichung der Größenordnungen, die bei Strukturuntersuchungen betrachtet werden.

oder Photonen unterschiedlicher Energie sind. So wird beispielsweise an der Hadron-Elektron-Ring-Anlage (HERA) beim Deutschen Elektronen-Synchrotron (DESY) in Hamburg das Vordringen in bisher unerschlossene Bereiche der Materieforschung bis hin zu kleinsten Skalen betrieben. Dabei werden bei einem Auflösungsvermögen von

$10^{-18}$  m genaue Strukturuntersuchungen des Protons und des Elektrons möglich, so dass eine mögliche aber bisher noch unbekannte Struktur der Quarks gefunden werden könnte. Zu diesem Zweck werden die Protonen auf eine Endenergie von 820 GeV und die Elektronen auf eine Endenergie von 30 GeV beschleunigt und anschließend zur Kollision gebracht [H1, Schweitzer99]. Die dabei erhaltene **Schwerpunktenergie** ergibt sich aus der Addition der Viererimpulse der einzelnen Teilchen zu:

$$\begin{aligned} E_S &= ((E_{T1} + E_{T2})^2 - (p_{T1} + p_{T2})^2)^{\frac{1}{2}} \\ &= ((820 \text{ GeV} + 30 \text{ GeV})^2 - (820 \text{ GeV} - 30 \text{ GeV})^2)^{\frac{1}{2}} \approx 314 \text{ GeV} \end{aligned}$$

Diese Schwerpunktenergie ist entscheidend für die Strukturauflösung, die bei Betrachtung der verwendeten Teilchen mit dem angegebenen Teilchenbeschleuniger möglich ist. Dabei wird davon ausgegangen, dass die **de-Broglie-Wellenlänge**  $\lambda_B = \frac{hc}{E_S}$  der Strahlteilchen in der Größenordnung der zu untersuchenden Strukturen liegen muss.

Bei der Untersuchung der Strukturen des Universums werden die Informationen aus der Beobachtung von Photonen aller Bereiche des elektromagnetischen Spektrums mit Hilfe von Teleskopen gewonnen [Unsöld97]. Mit einem Teleskop wird Licht von „unendlich“ weit entfernten Objekten wie Planeten, Sternen oder fernen Galaxien aufgesammelt. Diese Objekte werden dann in der Brennebene des Objektivs, das eine Sammellinse (Refraktor) oder ein Sammelspiegel (Reflektor) sein kann, abgebildet und durch das Okular (Sammellinse) betrachtet bzw. detektiert.

In der Mikroskopie sind die zu untersuchenden biologischen Proben das Target und Licht unterschiedlicher Wellenlänge ist die Sonde. Die Energie der Photonen des sichtbaren Lichts bei einer Wellenlänge von  $\lambda = 500 \text{ nm}$  wird dabei folgendermaßen berechnet:

$$E_{\text{phot}} = h\nu = h\frac{c}{\lambda}$$

Dabei ist  $h = 6,626 \cdot 10^{-34} \text{ Js}$  das Planck'sche Wirkungsquantum und  $c = 2,997 \cdot 10^8 \text{ ms}^{-1}$  die Lichtgeschwindigkeit im Vakuum. Einsetzen ergibt:

$$E_{\text{phot}} = 6,626 \cdot 10^{-34} \text{ Js} \frac{2,997 \cdot 10^8 \text{ ms}^{-1}}{5 \cdot 10^{-7} \text{ m}} = 3,972 \cdot 10^{-19} \text{ J.}$$

Führt man jetzt die Elementarladung  $e = 1,602 \cdot 10^{-19} \text{ C}$  ein, erhält man eine Photonenenergie von 2,48 eV. Damit kann die prinzipielle Strukturauflösung zu  $\approx 10^{-7} \text{ m}$  aus einem Vergleich mit der weiter oben für eine Energie von 314 GeV erhaltenen Strukturauflösung in der Größenordnung von  $10^{-18} \text{ m}$  abgeschätzt werden. Dabei ergibt sich aus dieser Abschätzung über die Photonenenergie genau das Auflösungsvermögen, das für optische Systeme aus der Theorie von Ernst Abbe folgt und sich direkt auf die Größenordnung der Wellenlänge der Photonen bezieht.

## 2.2. Mikroskopie

In diesem Abschnitt werden die optischen Grundlagen der Mikroskopie vorgestellt. Dabei wird zunächst mit dem weitgehend vereinfachten Modell der geometrischen Optik der zugrundeliegende Strahlengang erläutert [Hecht99]. Da jedes Mikroskop geometrisch begrenzt ist, reicht dieses Modell, das Licht durch Strahlen beschreibt für eine exakte Beschreibung nicht aus. Stattdessen muss das Licht für eine genaue Beschreibung der Bildentstehung und des Auflösungsvermögens als eine elektromagnetische Welle betrachtet werden, die an geometrischen Grenzflächen gebeugt wird (siehe Abschnitt 2.2.2) [Hecht99, Greiner91].

### 2.2.1. Geometrische Optik

Die Geometrische Optik reicht jedoch in den meisten Fällen für eine Beschreibung der optischen Eigenschaften eines Linsensystems aus. Die geometrische Optik kann unter der Voraussetzung verwendet werden, dass die Abmessungen des betrachteten Systems groß sind gegenüber der Wellenlänge des Lichts. In diesem Falle kann auf eine detaillierte wellenoptische Analyse verzichtet werden, da die auftretenden Beugungseffekte, welche mit der geometrischen Optik nicht beschrieben werden können, für  $\lambda \rightarrow 0$  vernachlässigt werden können. Im Rahmen dieser Näherung werden hier Lichtstrahlen betrachtet, die sich annähernd parallel bzw. unter kleinen Winkeln zur optischen Achse ausbreiten und beinahe senkrecht auf die optischen Grenzflächen treffen (*paraxiale Näherung, achsennahe Strahlen*) und an diesen Grenzflächen nach dem **Brechungsgesetz von Snellius** (siehe Gleichung (2.1)) gebrochen werden:

$$\frac{\sin \alpha}{\sin \beta} = \frac{n_2}{n_1}. \quad (2.1)$$

Unter der Annahme der paraxialen Näherung kann dieses Gesetz linearisiert werden, so dass Gleichung (2.1) in  $n_1\alpha = n_2\beta$  übergeht, wobei  $\phi = \sin \phi = \tan \phi$  zu setzen ist.

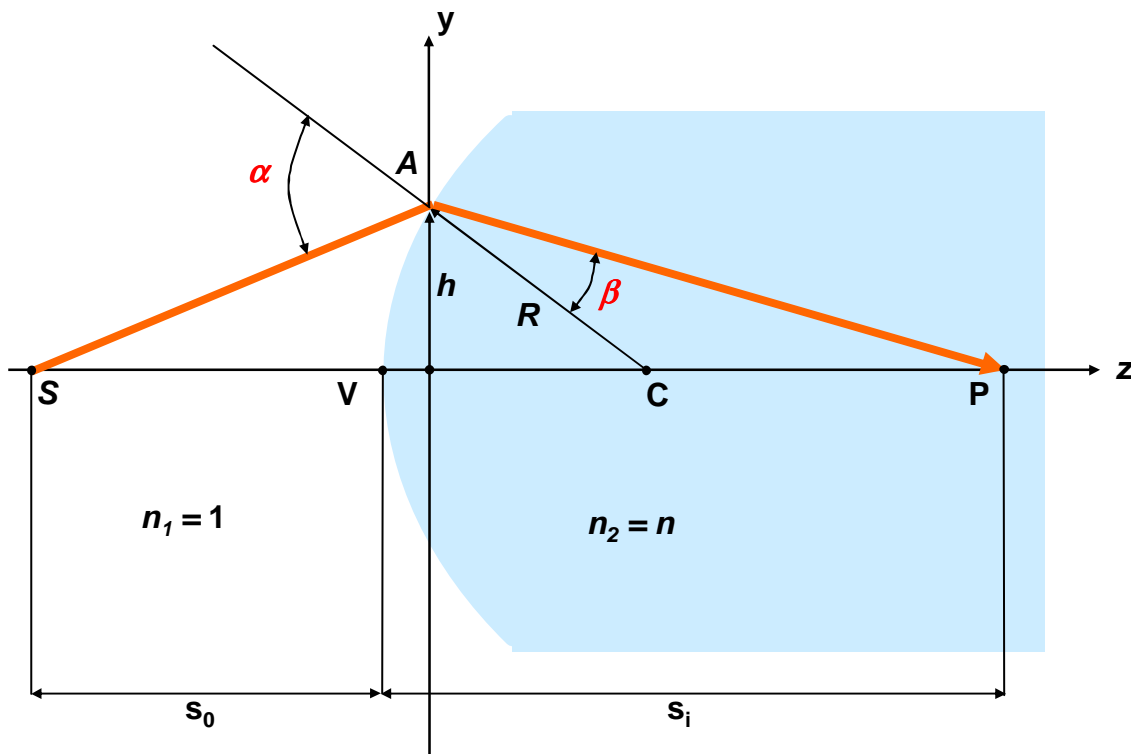
### Abbildungsgleichungen für dünne Linsen

Zur Beschreibung des Übergangs von achsennahen Lichtstrahlen zwischen optischen Medien mit unterschiedlichem Brechungsindex wird zunächst ein Lichtstrahl betrachtet, der von der Punktquelle  $S$  ausgehend auf eine sphärische lichtbrechende Oberfläche trifft [Hecht99]. Diese hat den Radius  $R$  und den Mittelpunkt  $C$  (siehe Abbildung 2.2). Auf der linken Seite im Medium Luft ist der Brechungsindex  $n_1 = 1$ , auf der rechten Seite ist  $n_2 = n$  zu setzen, wobei  $n > 1$  ist. Der Strahl, der an der Stelle  $A$  auf die Grenzfläche trifft, wird aufgrund der Bedingung  $n_2 > n_1$  zur örtlichen Normalen, d.h. zur optischen Achse hin gebrochen.

Unter Anwendung von Gleichung (2.1) und der paraxialen Näherung ergibt sich:

$$\frac{n_1}{s_o} + \frac{n_2}{s_i} = \frac{n_2 - n_1}{R}. \quad (2.2)$$





**Abbildung 2.2.:** Lichtbrechung an einer sphärischen Oberfläche im Punkt A. Dabei ist R der Krümmungsradius,  $s_0$  und  $s_1$  die Gegenstands- bzw. Bildweite.

Eine dünne Linse ist ein optisches System, das aus mindestens zwei brechenden Grenzflächen besteht, wobei mindestens eine davon gekrümmt ist. Die effektive Dicke der Linse kann vernachlässigt werden. Unter diesen Voraussetzungen wird bei Anwendung auf die erste Oberfläche (2.2) zu:

$$\frac{n_1}{s_{o1}} + \frac{n_2}{s_{i1}} = \frac{n_2 - n_1}{R_1}. \quad (2.3)$$

Bei Anwendung auf die zweite Oberfläche ergibt sich:

$$\frac{n_2}{-s_{i1} + d} + \frac{n_1}{s_{i2}} = \frac{n_1 - n_2}{R_2}. \quad (2.4)$$

Die Addition beider Gleichungen liefert:

$$\frac{n_1}{s_{o1}} + \frac{n_1}{s_{i2}} = (n_2 - n_1) \left( \frac{1}{R_1} - \frac{1}{R_2} \right) + \frac{n_2 d}{(s_{i1} - d)s_{i1}}. \quad (2.5)$$

Bei dünnen Linsen ( $d \rightarrow 0$ ) und unter der Annahme, dass die Linse von Luft umgeben ist ( $n_1 = 1$ ), erhält man die **Abbildungsgleichung**

$$\frac{1}{s_o} + \frac{1}{s_i} = (n_2 - 1) \left( \frac{1}{R_1} - \frac{1}{R_2} \right). \quad (2.6)$$

Darüberhinaus wird die Bildweite zur Brennweite  $f$  der betrachteten Linse, wenn sich der Gegenstand im Unendlichen befindet. Für die **Brechkraft** bzw. die **reziproke Brennweite** gilt

$$\frac{1}{f} = (n_2 - 1) \left( \frac{1}{R_1} - \frac{1}{R_2} \right). \quad (2.7)$$

Damit vereinfacht sich die Abbildungsgleichung weiter zu

$$\frac{1}{s_o} + \frac{1}{s_i} = \frac{1}{f}. \quad (2.8)$$

Mit diesen einfachen Zusammenhängen wird in der Regel bereits eine adäquate Darstellung der wesentlichen optischen Eigenschaften einfacher Systeme zur Bilderzeugung ermöglicht. Zu diesem Bereich gehören beispielsweise die Bildkonstruktion mittels Linsen und Spiegeln, aber auch der prinzipielle Strahlengang in Mikroskopen (zur Bilderzeugung bei sehr kleinen Objekten) und Teleskopen (Detektion sehr weit entfernter Objekte).

### Strahlengang im konventionellen Mikroskop

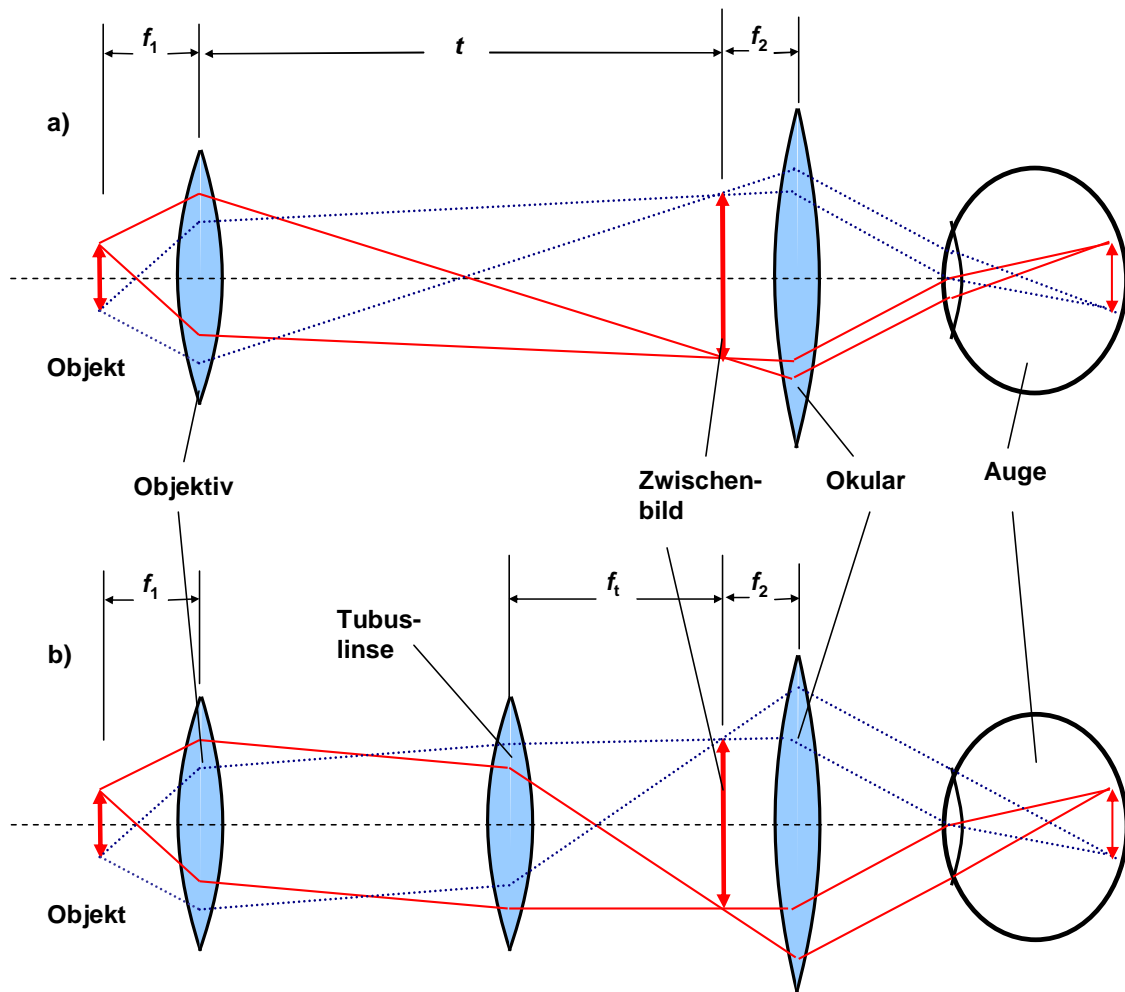
Ein Mikroskop ist eine Apparatur, mit der kleine Objekte von der Größe weniger Mikrometer und in neuerer Zeit auch Nanometer detektiert und abgebildet werden. Das konventionelle Mikroskop ist aus zwei Linsen bzw. Linsensystemen zusammengesetzt, die in Abbildung 2.3 a) dargestellt werden. Das Linsensystem, welches dem Objekt am nächsten steht, wird auch als **Objektiv** bezeichnet und hat eine sehr kleine Brennweite  $f_1$ . Mit dem Objektiv wird ein reelles vergrößertes Zwischenbild entworfen, das dann mit dem **Okular** der Brennweite  $f_2$  zusammen mit der **Augenlinse** betrachtet wird, wobei eine weitere Vergrößerung stattfindet. Die Gesamtvergrößerung des Mikroskops ergibt sich dann als Produkt der einzelnen Vergrößerungen von Objektiv und Okular zu:

$$V = \frac{t}{f_1} \frac{s_0}{f_2}.$$

Dabei ist  $t \approx 160$  mm die Tubuslänge und  $s_0 \approx 250$  mm der Abstand zum Standardnahpunkt bzw. die deutliche Sehweite. In modernen Hochleistungsmikroskopen werden häufig auf „unendlich“ gerechnete Objektive verwendet, die zur exakten Abbildung von Objekten direkt in der Brennebene herangezogen werden. Das reelle Zwischenbild wird in diesem Fall durch eine zusätzliche Linse, die sogenannte **Tubuslinse** mit einer Brennweite  $f_t$  erzeugt (siehe Abbildung 2.3 b)). Die Vergrößerung ergibt sich unter dieser Voraussetzung zu:

$$V = \frac{f_t}{f_1} \frac{s_0}{f_2}.$$

Eine naheliegende und häufig angewendete Mikroskopiemethode ist die **Durchlichtmikroskopie**, bei der die Probe von der dem Objektiv gegenüberliegenden Seite



**Abbildung 2.3.:** Strahlengang in einem konventionellen Mikroskop mit zwei Linsen a) und in einem Mikroskop mit auf „unendlich“ gerechneten Objektiven b).

mit einer möglichst inkohärenten Lichtquelle beleuchtet wird. Zu diesem Zweck wird auf der Beleuchtungsseite eine **Kondensorlinse** verwendet, welche dazu dient, die Lichtquelle inkohärent auf die Probe abzubilden. Um dies zu verwirklichen, werden zwei verschiedene Möglichkeiten angewendet:

- Bei der **kritischen Beleuchtung** ist die Kondensorlinse meist eine einfache Konvexlinse, die ein Bild der Lichtquelle auf der Probe erzeugt. Bei dieser Beleuchtungsmethode muss jedoch darauf geachtet werden, dass die Lichtquelle möglichst homogen ist, damit die Probe gleichmäßig ausgeleuchtet wird.
- Bei der **Köhler'schen Beleuchtung** wird der Kondensor aus einem System von zwei Linsen gebildet, mit dem es ermöglicht wird, eine homogene,

inkohärente Ausleuchtung der Probe zu erreichen.

Im Allgemeinen muss davon ausgegangen werden, dass die idealisierten Bedingungen der geometrischen Optik nicht gegeben sind und alle Linsen daher auch Linsenfehler aufweisen, die hier kurz erwähnt werden sollen. Die **sphärische Aberration** ergibt sich daraus, dass eine sphärisch geschliffene Linse nur achснаhe Strahlen, die unter kleinem Winkel einfallen, exakt im Brennpunkt fokussiert. Lichtstrahlen, die weiter von der optischen Achse entfernt sind, werden in einem Punkt fokussiert, der zwischen Linse und Brennpunkt liegt. Die **chromatische Aberration** wird durch die Abhängigkeit des Brechungsindex  $n$  von der Wellenlänge  $\lambda$  des Lichts (*Dispersion*) verursacht. In der Praxis bedeutet das, dass der Brennpunkt des kurzwelligen (blauen) Lichts näher an der Linse liegt als der Brennpunkt des langwelligen (roten) Lichts. Um diese Bildfehler in der praktischen Anwendung von Mikroskopen deutlich zu minimieren, werden in den meisten Fällen Objektive mit einem Linsensystem aus bis zu 10 Linsen aus unterschiedlichen Materialien verwendet.

Eine weitere wichtige Größe zur Charakterisierung von Objektiven ist die **numerische Apertur**,  $NA$ . Die numerische Apertur wird im Wesentlichen durch die Geometrie des Aufbaus bestimmt und folgendermaßen definiert:

$$NA = n \sin \vartheta_{max}.$$

Dabei ist  $n$  der Brechungsindex des Immersionsmediums und  $\vartheta_{max}$  die Hälfte des maximal möglichen Öffnungswinkels des durch das Objektiv aufgenommenen Lichtkegels. Bei der Untersuchung präparierter Proben mit mikroskopischen Methoden sind grundsätzlich folgende Aspekte zu beachten:

- Zur Darstellung kleiner Objekte ist eine ausreichende **Vergrößerung** des Objektivs sicherzustellen. Vergrößerungsfaktoren beginnen bei 2-fach bis hin zu 100-facher Vergrößerung.
- Um gute Abbildungen zu erhalten, sind **ausreichende Lichtstärken** zu verwenden.
- Damit das zur Detektion erforderliche Licht auch gut aufgesammelt werden kann, muss die Geometrie der Apertur so ausgelegt sein, dass möglichst viel Licht detektiert wird. Das bedeutet, dass die **numerische Apertur**,  $NA$  des Objektivs groß sein muss. (siehe auch Abschnitt „Auflösungsvermögen“, Seite 15)

### 2.2.2. Wellenoptik und Bildentstehung

Unter der Voraussetzung, dass nicht nur der Strahlengang im Mikroskop, sondern auch der genaue Mechanismus der Bildentstehung von entscheidender Bedeutung ist, müssen für eine sinnvolle und vollständige Beschreibung aller wesentlichen Aspekte

wellenoptische Betrachtungen angestellt werden. Diese Betrachtungen werden hier ausschließlich in Vakuum bzw. Luft und Glas durchgeführt, so dass die Ladungs- und Stromdichte als auch die elektrische Leitfähigkeit als 0 angenommen werden können. In diesem Falle ist die magnetische Induktion  $\vec{B} = \mu\mu_0\vec{H}$  und die elektrische Feldstärke  $\vec{E} = \epsilon\epsilon_0\vec{D}$  jeweils von den elektrischen bzw. magnetischen Eigenschaften des Linsenmaterials abhängig. Dabei sind  $\epsilon_0$  bzw.  $\mu_0$  die Dielektrizitäts- bzw. Induktionskonstante und  $\epsilon$  bzw.  $\mu$  die materialabhängige relative Dielektrizitätskonstante bzw. die relative Permeabilität. Die für diese Beschreibung grundlegenden **Maxwell-Gleichungen** werden dann folgendermaßen ausgedrückt [Greiner91]:

$$\operatorname{div} \vec{E} = 0 \quad (2.9)$$

$$\operatorname{rot} \vec{E} = -\frac{\partial \vec{B}}{\partial t} \quad (2.10)$$

$$\operatorname{div} \vec{B} = 0 \quad (2.11)$$

$$\operatorname{rot} \vec{B} = \epsilon\epsilon_0\mu\mu_0\frac{\partial \vec{E}}{\partial t}. \quad (2.12)$$

Diese vier Gleichungen bilden ein lineares Gleichungssystem partieller, homogener Differentialgleichungen erster Ordnung zur Beschreibung elektrischer und magnetischer Felder. Bildet man für dieses Gleichungssystem jeweils die zweite Ableitung, so ergibt sich eine homogene Wellengleichung für die Felder  $\vec{E}$  und  $\vec{B}$ :

$$\left(\Delta \vec{E} - \frac{1}{c'^2} \frac{\partial^2 \vec{E}}{\partial t^2}\right) \Psi(\vec{r}, t) = 0, \quad (2.13)$$

$$\left(\Delta \vec{B} - \frac{1}{c'^2} \frac{\partial^2 \vec{B}}{\partial t^2}\right) \Psi(\vec{r}, t) = 0. \quad (2.14)$$

Werden in diesen Gleichungen zeitlich periodisch veränderliche elektrische und magnetische Felder angenommen, so erhält man daraus die grundlegenden Eigenschaften elektromagnetischer Wellen, zu denen auch das sichtbare Licht in einem Wellenlängenbereich von  $\lambda = 400 \text{ nm}$  bis  $\lambda = 800 \text{ nm}$  zu zählen ist. In diesen **Wellengleichungen** beschreibt die Konstante  $c'$  die Lichtgeschwindigkeit im betrachteten Medium, welches durch die Materialkonstanten  $\epsilon$  und  $\mu$  charakterisiert wird, so dass:

$$c' = \frac{c}{n} = \frac{1}{\sqrt{\epsilon\epsilon_0\mu\mu_0}}, \quad (2.15)$$

wobei im **Brechungsindex**

$$n = \sqrt{\epsilon\mu} \quad (2.16)$$

alle elektromagnetisch relevanten Eigenschaften des betrachteten Mediums zusammengefasst werden. Die Lösungen der Wellengleichungen (2.13) und (2.14) (im Folgenden wollen wir uns auf die Betrachtung des  $\vec{E}$ -Feldes beschränken) beschreiben die

Ausbreitung elektromagnetischer Wellen. Dabei gibt es Lösungen, mit denen parallele, auf eine optische Grenzfläche zulaufende ebene Wellen durch

$$\vec{E}(\vec{r}, t) = \vec{E}_0 e^{i(\vec{k}\vec{r} - \omega t + \phi)} \quad (2.17)$$

beschrieben werden. Dabei ist  $\vec{k} = 2\pi/\lambda \vec{e}_k$  der Wellenvektor und  $\omega = 2\pi\nu$  die Kreisfrequenz. Die Ausbreitungsgeschwindigkeit der Welle ist  $c' = \omega/k$  und  $\phi$  beschreibt die Phase der Welle bezüglich zum Koordinatenursprung. Es handelt sich hier um eine *transversale Welle*, denn es gilt  $\vec{E} \perp \vec{B} \perp \vec{k}$ . Linear polarisierte Wellen erhält man unter der Voraussetzung, dass der Vektor  $\vec{E}_0$  zeitlich konstant ( $\partial E_0/\partial t$ ) ist. Darüberhinaus ergeben sich aus den Wellengleichungen auch Lösungen für Wellen, welche konvergierende oder divergierende Lichtstrahlen beschreiben (**Kugelwellen**):

$$\vec{E}(\vec{r}, t) = \vec{E}_0 \frac{1}{r} e^{i(\vec{k}\vec{r} - \omega t + \phi)}. \quad (2.18)$$

Diese Wellen haben prinzipiell die gleichen Eigenschaften wie ebene Wellen. Der Unterschied liegt hier darin, dass die Wellenfronten (Punkte gleicher Phase) hier nicht durch parallele Ebenen sondern durch konzentrische Kugelschalen mit dem Radius  $r$  dargestellt werden.

Die meisten der üblicherweise verwendeten Detektoren für elektromagnetische Strahlung messen jedoch nicht direkt die elektrische Feldstärke  $\vec{E}$  sondern die **Intensität**  $\mathbf{I}$  des Lichts. Die Intensität hängt dabei grundsätzlich vom Quadrat des Betrags der elektrischen Feldstärke und der Ausbreitungsrichtung der Wellen ab, so dass gilt:

$$\vec{I}(\vec{r}, t) = \text{const} |\vec{E}_0|^2 \vec{e}_k. \quad (2.19)$$

### Punktbildfunktion

Eine wesentliche Eigenschaft der elektromagnetischen Wellen ist, dass sie an geometrischen Grenzflächen und insbesondere an den Rändern der Linsen und Linsenfassungen gebeugt werden. Diese Effekte werden in der paraxialen Näherung mit Hilfe der **Fraunhofer-Beugung** beschrieben. Die Konsequenz daraus ist, dass bei jeder Abbildung eines punktförmigen Objektes durch eine beugungsbegrenzte Optik kein Punkt sondern ein verwaschenes Scheibchen erzeugt wird. Der Intensitätsverlauf des abgebildeten Objekts wird dabei durch die Punktbild- bzw. Punktverwaschungsfunktion (*engl. Point Spread Funktion, PSF*) beschrieben. Für die laterale Abbildung senkrecht zur optischen Achse ergibt sich dabei in der Fokusebene folgende Punktbildfunktion [Hecht99, Gu00]:

$$h_{z=0}(r) = h_0 \left( \frac{2J_1(p(r))}{p(r)} \right)^2, \quad (2.20)$$

wobei  $r$  der Abstand von der optischen Achse,  $J_1$  die Besselfunktion erster Ordnung und

$$p(r) = \frac{2\pi}{\lambda} NA r \quad (2.21)$$

die generalisierte optische Koordinate für die laterale Abbildung darstellt.

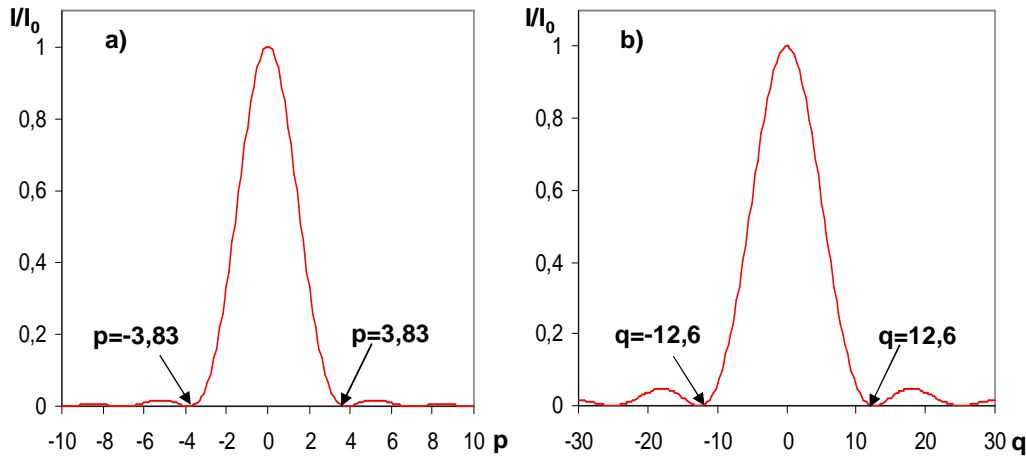


Abbildung 2.4.: Darstellung der Punktbildfunktion in lateraler und axialer Richtung.

Für die Abbildung in Richtung der optischen Achse ergibt sich als Punktbildfunktion [Hecht99, Gu00]:

$$h_{r=0}(z) = h_0 \left( \frac{\sin(q(z)/4)}{q(z)/4} \right)^2, \quad (2.22)$$

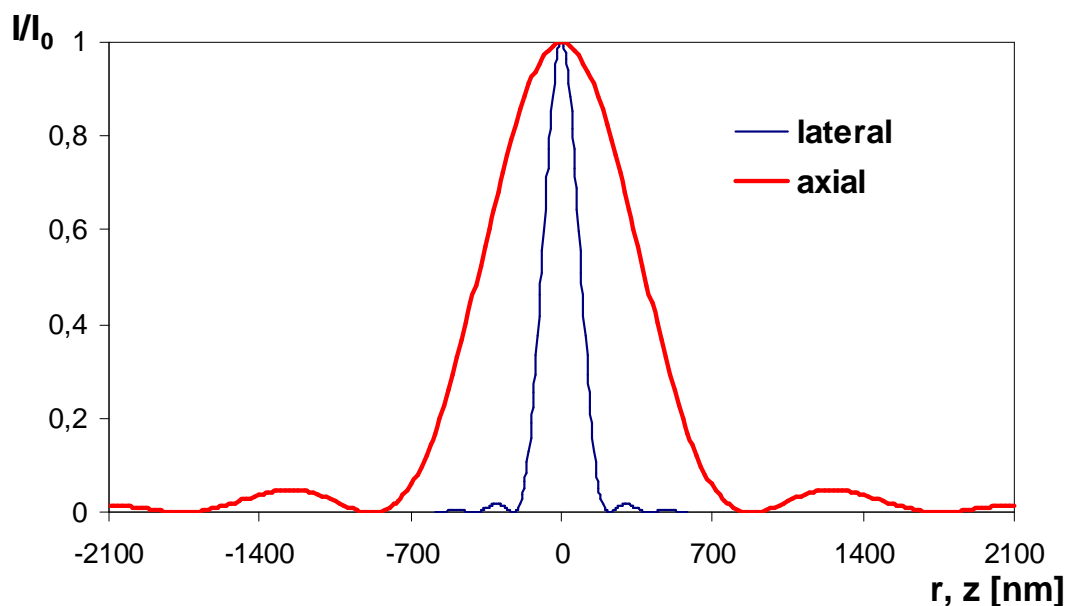
wobei  $z$  der Abstand zum Fokuspunkt und

$$q(z) = \frac{2\pi}{\lambda} \frac{NA^2}{n} z \quad (2.23)$$

die generalisierte optische Koordinate entlang der optischen Achse ist.

### Auflösungsvermögen

Ein entscheidendes Kriterium zur Charakterisierung eines optisch abbildenden Systems ist das **Auflösungsvermögen**. Die Abbildung wird prinzipiell dadurch beschrieben, dass jedes abzubildende Objekt aus vielen einzelnen Punkten besteht, von denen jeder eine eigene PSF in den Bildraum projiziert. Das bedeutet, dass die Abbildung durch die Faltung der Bildpunkte mit der PSF „verschmiert“ und die Auflösung dadurch verringert wird. Das Auflösungsvermögen hängt vor allem von



**Abbildung 2.5.:** Ein direkter Vergleich der Punktbildfunktionen zeigt, dass die axiale Punktbildfunktion etwa dreimal breiter ist als in lateraler Richtung. Bei der Berechnung von  $r$  und  $z$  aus  $p$  und  $q$  wurden die Parameter  $NA = 1,25$ ,  $\lambda = 458$  nm und  $n = 1,5$  verwendet.

der Wellenlänge des zur Abbildung verwendeten Lichts und der geometrischen Dimension der Apparatur ab, welche bei Mikroskopen durch die numerische Apertur  $NA$  des Objektivs (s.o.) beschrieben wird, so dass für das Mikroskop bei lateraler Abbildung gilt:

$$d_{min} = konst \frac{\lambda}{NA}.$$

Im Detail gibt es verschiedene Kriterien, mit denen man das Auflösungsvermögen definieren kann. Diese Kriterien wirken sich auf den konstanten Vorfaktor  $konst$  aus und unterscheiden sich teilweise deutlich. Ein häufig verwendetes Kriterium zur Bestimmung des Auflösungsvermögens bezieht sich auf den minimalen Abstand zweier Objekte, die gerade noch als getrennt detektiert werden können. Dies entspricht im Wesentlichen dem **Rayleigh-Kriterium**, das die Auflösung als den Abstand zweier Punkte definiert, in dem das Maximum der PSF des ersten Punkts mit dem Minimum erster Ordnung des zweiten Punkts zusammenfällt (siehe Abbildung 2.6). Unter Verwendung der jeweils ersten Nullstellen von Gleichung (2.20) und (2.22) bei  $p = 3,83$  und  $q = 4\pi$  folgt nach Einsetzen in die Gleichungen (2.21) und (2.23) für die minimalen Abstände:

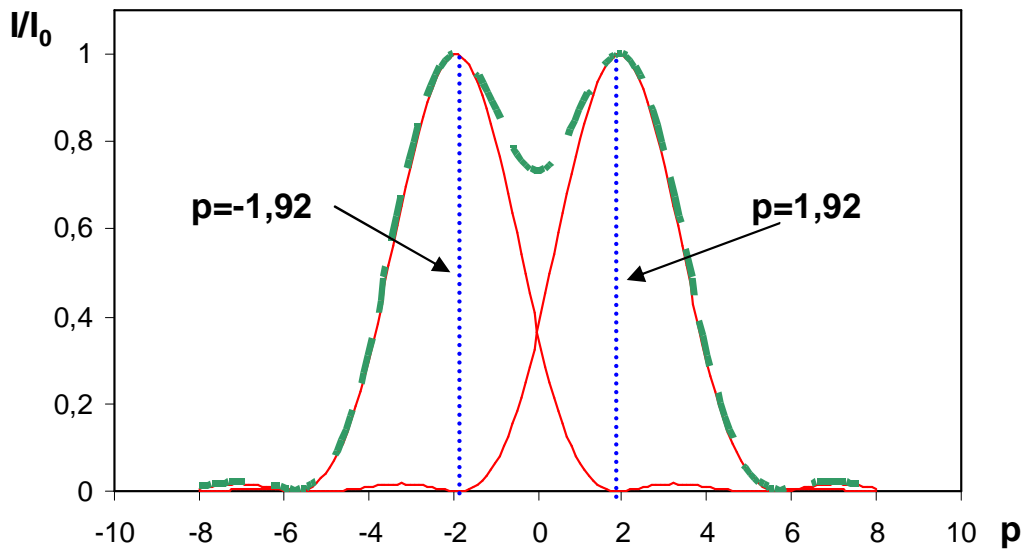
$$r_{min} = 0,61 \frac{\lambda}{NA} \quad (2.24)$$



und

$$z_{min} = 2 \frac{n\lambda}{NA^2}, \quad (2.25)$$

wobei  $r_{min}$  der minimale Abstand in der Fokusebene ist und  $z_{min}$  den minimalen Abstand in Richtung der optischen Achse darstellt.



**Abbildung 2.6.:** Intensitätsverläufe zweier punktförmiger Objekte im Mindestabstand nach dem Rayleigh-Kriterium, wobei  $p$  die generalisierte optische Koordinate in lateraler Richtung darstellt.

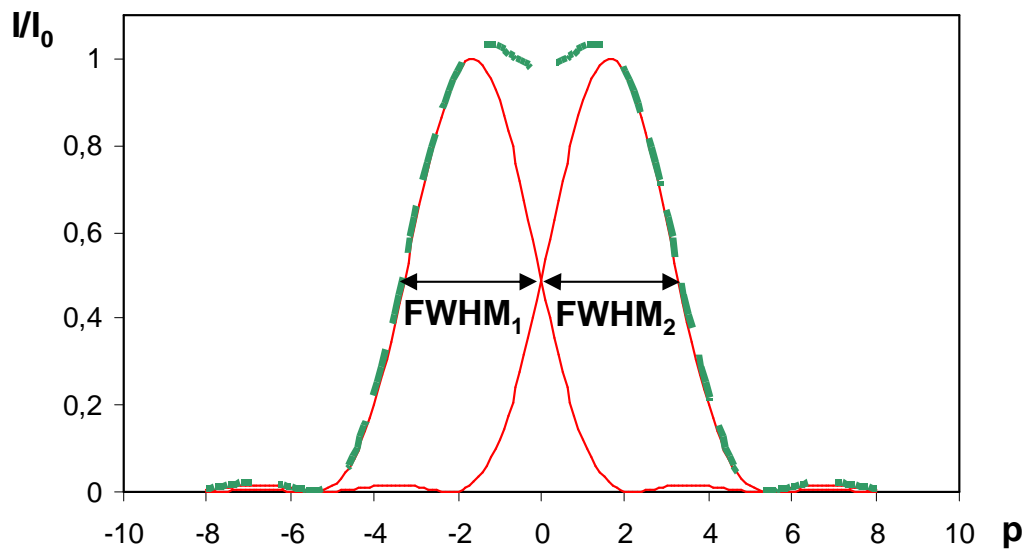
Das **Sparrow-Kriterium** wird unter der Voraussetzung eingesetzt, dass Intensitätsunterschiede besonders gut detektiert werden können (differentielle Detektoren). Hierbei sind zwei Punkte optisch aufgelöst, wenn die zweite Ableitung der gemeinsamen Intensitätsverteilung in einem Punkt verschwindet, d.h. dass diese Intensitätsverteilung entlang der geometrischen Verbindungslinie beider Punkte ein lokales Minimum aufweisen muss. Zusätzlich muss in diesem Fall zwischen kohärent und inkohärent leuchtenden Objekten unterschieden werden. Bei inkohärenten Quellen wird die Gesamtintensität direkt durch Addition der Amplitudenquadrate nach  $I \approx E_1^2 + E_2^2$  erhalten. Betrachtet man jedoch kohärente Lichtquellen, so ist zusätzlich noch der Interferenzterm zu berücksichtigen, und es gilt:

$$I \approx (E_1 + E_2)^2 \approx E_1^2 + E_2^2 + E_1 E_2 \cos \phi,$$

wobei  $\phi$  die Phasendifferenz zwischen den von beiden Lichtquellen emittierten Lichtwellen ist. Für die laterale Richtung ergibt sich nun durch Betrachtung der Gleichungen (2.20) und (2.22) für den Fall inkohärenter Lichtquellen ein minimaler Abstand von  $r_{min} = 0,48 \lambda/NA$ . Für den Fall kohärenter Lichtquellen und unter der

## 2. Grundlagen der Strukturuntersuchung und Mikroskopie

Voraussetzung, dass beide Lichtquellen gleichphasig (d.h.  $\cos \phi = 1$ ) emittieren ist  $r_{min} = 0,73 \lambda/NA$ . Das zeigt, dass bei Verwendung von inkohärenter Beleuchtung in der Mikroskopie eine deutlich bessere Auflösung erreicht wird. Auch im Falle der Fluoreszenzmikroskopie (siehe Kapitel 3) kann die Emission der Farbstoffe, auch wenn diese kohärent zum Beispiel durch Laserstrahlung angeregt werden, als inkohärent angesehen werden. Dies folgt im Wesentlichen aus dem statistischen Charakter der Fluoreszenzemission, welche keine Vorzugsrichtung aufweist.



**Abbildung 2.7.:** Auflösung der Bilder zweier punktförmiger Objekte nach dem FWHM-Kriterium, mit  $p$  wie in Abbildung 2.6.

In einem weiteren Kriterium wird die **Halbwertsbreite** der Punktbildfunktion (engl. *Full Width at Half Maximum, FWHM*), gleichbedeutend mit der Breite auf halber Maximalintensität, als Auflösung betrachtet (siehe Abbildung 2.7). Aus den Gleichungen (2.20) und (2.22) ergibt sich damit:

$$FWHM_{lateral} = 0,52 \frac{\lambda}{NA} \text{ und} \quad (2.26)$$

$$FWHM_{axial} = 1,77 \frac{n\lambda}{NA^2} \quad (2.27)$$

Für alle verwendeten Auflösungskriterien gilt stets, dass die laterale Auflösung um etwa einen Faktor drei besser ist als die axiale Auflösung.

Bei allen bisher vorgenommenen Betrachtungen wurde angenommen, dass die PSF eines abbildenden Systems ausschließlich vom Detektionssystem abhängt und die Beleuchtung des Objektraums homogen ist. Durch eine Veränderung der Form

des Anregungslichtfeldes im Objektbereich, das durch die **Anregungs-PSF**  $h_L$  beschrieben wird, ergeben sich neue Abbildungseigenschaften des optischen Systems. Wird die bisher verwendete Punktbildfunktion als **Detektions-PSF**  $h_D$  bezeichnet, so ergibt sich die **Gesamt-PSF**  $h_G$  nach [Lindek95] aus dem Produkt

$$h_G(\vec{r}) = h_L(\vec{r}) \cdot h_D(\vec{r}). \quad (2.28)$$

Insgesamt ergibt sich daraus, dass die Halbwertsbreite der Gesamt-PSF durch geeignete Modifikationen des Anregungslichtfeldes reduziert und dadurch die Auflösung erhöht werden kann. Dieses Prinzip wird z.B. in der konfokalen Laser-Scanning-Mikroskopie (CLSM) und im Rahmen des „Point-Spread-Function-Engineering“ angewendet.

### Abtastung und Digitalisierung

Ein entscheidender Schritt bei der Bereitstellung physikalisch auswertbarer Bilddaten aus der Mikroskopie besteht in der Detektion der kontinuierlichen Intensitätsverteilungen in der Bildebene durch geeignete Detektoren. Da diese Detektoren in der Regel diskrete Punkte „abtasten“, wird die kontinuierliche Intensitätsverteilung zunächst in diskrete Matrixelemente transformiert. Da der Detektor, z.B. eine CCD-Kamera, aus einer Matrix nebeneinanderliegender Photodioden besteht, ist die Intensitätsverteilung  $I(x)$  in der Bildebene über die Fläche der einzelnen Detektorelemente zu integrieren, und man erhält für die Intensität  $I_{m,n}$  in den Punkten  $x_{m,n}$ :

$$I_{m,n} = \int_{(m-\frac{1}{2})\Delta x_1}^{(m+\frac{1}{2})\Delta x_1} \int_{(n-\frac{1}{2})\Delta x_2}^{(n+\frac{1}{2})\Delta x_2} I(x) dx_1 dx_2. \quad (2.29)$$

Dabei gibt  $m$  und  $n$  die Nummer des Detektorelements und  $\Delta x_1$  bzw.  $\Delta x_2$  die Ausdehnung des Elements in Richtung  $x_1$  bzw.  $x_2$  an. Bei Verwendung einer CCD-Kamera werden die Detektorelemente auch häufig als Bildelemente (*picture elements, pixels*) bezeichnet. Um eine eindeutige Abbildung des reellen Bildes mit Hilfe der CCD-Kamera zu erhalten, muss das **Abtasttheorem** erfüllt sein [Jähne97], welches im Rahmen des FWHM-Auflösungskriteriums in folgender einfacher Weise dargestellt werden kann:

$$\Delta x \leq \frac{1}{2} FWHM. \quad (2.30)$$

Ein weiteres Problem bei der Bereitstellung der Bilddaten besteht in der Tatsache, dass die Intensitäten, welche von den einzelnen Pixeln detektiert werden, in eine digitale Information mit festgelegter Digitalisierungstiefe  $Q$  umgesetzt werden.  $Q$  wird dabei durch die Anzahl der zur Digitalisierung verwendeten Bits (z.B.  $Q = 2^8, 2^{10} usw.$ ) bestimmt. Das bedeutet, dass die kontinuierliche Intensitätsverteilung  $I$  nur mittels einer endlichen Zahl von Digitalisierungsstufen  $i_0, i_1, \dots, i_{Q-1}$  dargestellt werden kann, die von der Digitalisierungstiefe bestimmt wird. Dies führt dazu,

dass nicht der tatsächliche Intensitätswert, sondern die ihm am nächsten liegende Digitalisierungsstufe als Intensität gespeichert wird. Die dabei auftretende Standardabweichung  $\sigma$  beträgt nach [Jähne97] dabei maximal 0,3 bis 0,5 Digitalisierungsstufen, kann aber durch Mittelwertbildung bei  $n$  Mehrfachmessungen deutlich auf  $\sigma/\sqrt{n}$  reduziert werden.

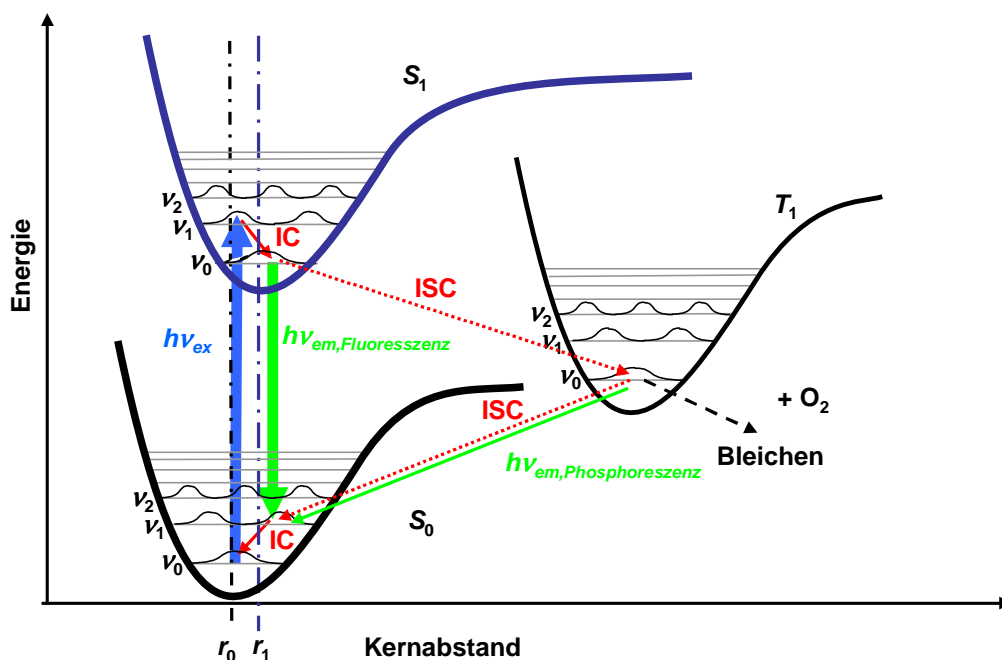
Darüberhinaus wird die praktisch erreichbare Genauigkeit durch systematische Fehler im Detektionssystem eingeschränkt. So ist bei kommerziell erhältlichen Analog-Digital-Wandlern (ADC) mit zum Teil deutlichen Unregelmäßigkeiten der Quantisierungsstufen zu rechnen. Die einzelnen Photodetektoren der verwendeten CCD-Kamera sind grundsätzlich nicht alle gleich empfindlich, wenige Pixel sind nicht aktiv („tote Pixel“), und einige Pixel zeigen immer maximale Intensität an („heiße Pixel“).

## 3. Fluoreszenz in der Mikroskopie

In diesem Kapitel wird zunächst auf die wesentlichen Aspekte der Fluoreszenz eingegangen, wobei auch eine quantenmechanische Deutung der Ein- bzw. Zweiphotonen-Anregung dargestellt wird. Im zweiten Teil dieses Kapitels werden Anwendungen von Fluoreszenzeigenschaften für die optische Abbildung in der Mikroskopie vorgestellt. Die Fluoreszenzemission wird in Mikroskopie gerne verwendet, da man dabei die Proben spezifisch mit fluoreszierenden Markierungen versehen kann. Diese Markierungen enthalten in der Regel Fluoreszenzfarbstoffe, die mit gängigen Spektrallinien angeregt werden können. Die daraus resultierende Fluoreszenz kann aufgrund des hohen Kontrasts zur Umgebung leicht beobachtet bzw. detektiert werden. Eine verbesserte Auflösung ergibt sich in diesem Zusammenhang, wenn sowohl die Anregung als auch die Detektion fokussiert erfolgt (siehe konfokale Mikroskopie).

### 3.1. Grundlagen der Fluoreszenz

Die wesentliche Voraussetzung für das Auftreten von Fluoreszenz ist eine Wechselwirkung zwischen Atomen und Molekülen mit elektromagnetischen Wellen. Auf diese Weise kann ein Atom oder Molekül durch die Absorption eines Photons in einen höheren energetischen Zustand gebracht werden. Die daran anschließende Abregung der elektronisch angeregten Atome bzw. Moleküle wird dann als **Fluoreszenz** bezeichnet, wenn die Lichtemission in einem Zeitrahmen von etwa  $10^{-7}$  s erfolgt. Für den Fall, dass die Emission der Photonen deutlich verzögert wird, spricht man von **Phosphoreszenz**, welche in einem Zeitraum von Sekunden, Minuten oder sogar Stunden abläuft [Hecht99]. In der Regel findet die Emission von Fluoreszenzphotonen beim Übergang vom ersten angeregten Zustand  $S_1$  in den Grundzustand  $S_0$  statt (siehe Abbildung 3.1). Grundsätzlich können zwar auch höhere Zustände  $S_{>1}$  angeregt werden. Diese zerfallen aber meistens sehr schnell durch innere Konversion in den ersten angeregten Zustand. Darüberhinaus kann der Übergang vom  $S_1$  Zustand in den Grundzustand neben der Abstrahlung von Photonen mittels Fluoreszenz oder Phosphoreszenz auch strahlungslos oder über Stöße bzw. Elektronenaustausch mit anderen Atomen oder Molekülen stattfinden. In diesem Falle kommt es bei geeignet liegenden Absorptions- bzw. Emissionsspektren zu einem strahlungslosen Austausch von Energie zwischen den Molekülen (**Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer**,



**Abbildung 3.1.:** Energieniveauschema eines mehratomigen Fluoreszenzfarbstoffmoleküls. Dabei sind die elektronischen Singulettzustände  $S_0$  und  $S_1$  sowie der Triplettzustand  $T_1$  mit einigen vibratorischen Unterniveaus dargestellt. IC: Internal Conversion, ISC: Inter System Crossing (nach [Albrecht02a]).

### FRET [Lilley00]).

Im Allgemeinen kann die zeitabhängige Zahl der angeregten Moleküle  $dN$  über folgende universal einsetzbare Differentialgleichung beschrieben werden:

$$dN = -cNdt,$$

dabei ist  $dt$  der betrachtete Zeitraum und  $c$  die Zerfallskonstante. Das negative Vorzeichen bedeutet, dass die Zahl der angeregten Moleküle mit der Zeit abnimmt. Insgesamt ergibt sich damit:

$$N = -N_0e^{-ct}.$$

Die Lebensdauer lässt sich daraus zu  $\tau = \frac{1}{c}$  angeben. Die Lebensdauer ist eine charakteristische Größe für alle Fluoreszenzfarbstoffe und kann z.B. bei Verwendung gepulster Anregung gemessen werden (siehe Kapitel 6).

Betrachtet man hier Moleküle, so sind neben den elektronischen Energieniveaus, wie sie auch bei Atomen vorkommen, zusätzlich unterschiedliche Schwingungs-, Rotations- und Vibrationszustände zu beachten. Aus diesem Grunde sind die Energieübergänge bei Molekülen nicht als scharfe Linien sondern als Bandenspektren ausgebildet. Auf diese Weise kann ein Molekül, welches aus dem ersten elektro-

nisch angeregten Zustand  $S_1$  in den elektronischen Grundzustand  $S_0$  zerfällt, durchaus auf verschiedene höherenergetische rotatorische bzw. vibratorische Zustände des Grundzustands gelangen. Dabei ist zu berücksichtigen, dass bevorzugt Übergänge zwischen Energieniveaus stattfinden, die sich in ihrem Kernabstand möglichst wenig unterscheiden (**Franck-Condon-Prinzip**). Aufgrund dieser Tatsache finden die Zerfälle in unterschiedliche Energieniveaus des Grundzustands mit verschiedenen Wahrscheinlichkeiten statt. Die vielfältige Struktur der Energiezustände in den Molekülen, die durch interne Konversion (IC, siehe Abbildung 3.1) ineinander übergehen können, ist auch die Ursache dafür, dass sich die Energie des absorbierten Photons von der Energie des emittierten Photons meistens unterscheidet (**Stokes-Verschiebung**). In diesem Zusammenhang werden folgende Fälle unterschieden:

- Das eingestrahelte Licht hat eine größere Energie, d.h. eine kleinere Wellenlänge als das emittierte Licht (**Stokes**). Das kann vorkommen, wenn das Molekül in ein höheres Energieniveau des Grundzustands zerfällt. Dies ist der häufigste Fall, der es auch ermöglicht, das Fluoreszenzlicht spektral vom Anregungslicht zu trennen.
- Das eingestrahelte Licht hat eine kleinere Energie also eine größere Wellenlänge als das emittierte Licht (**Anti-Stokes**). Anti-Stokes tritt zum Beispiel ein, wenn das Molekül vor der Absorption nicht im Grundzustand war.
- die Energie von absorbiertem und emittiertem Licht ist gleich (**Rayleigh-Streuung**).

Eine wesentliche physikalische Eigenschaft von Fluoreszenz ist ihr statistischer Charakter. Das bedeutet, dass der Zerfall der angeregten Fluoreszenzfarbstoffe nur mit statistischen Methoden beschrieben werden kann und einem exponentiellen Zerfallsgesetz folgt (s.o.). Darüberhinaus erfolgt die spontane Emission von Photonen bei Zerfall eines einzelnen Moleküls nach einer zufälligen Zeit in eine zufällige Richtung, so dass sowohl eine räumliche als auch eine zeitliche Kohärenz der emittierten Photonen auszuschließen ist.

Der in Abbildung 3.1 dargestellte Triplettzustand  $T_1$  spielt eine wesentliche Rolle beim Zustandekommen von **Phosphoreszenz** und ist Ausgangspunkt für die Mechanismen des Ausbleichens. Um Phosphoreszenz handelt es sich, wenn der Übergang vom  $S_1$  nach  $S_0$  über den Triplettzustand  $T_1$  (Interkombinationsübergang, Inter System Crossing, ISC) bei den Atomen oder Molekülen stattfindet, bei denen die Kopplung von Spin- und Bahnmomenten der Elektronen eine Linearkombination aus LS- und die jj-Kopplung darstellt [Haken90]. Da dieser Übergang wegen des Umklappens der Elektronenspins bei der Emission von Photonen verboten ist, tritt die Emission eines Photons der Energie  $h\nu_{em,Phosphoreszenz}$  ausschließlich aufgrund von Wechselwirkungen des Atoms oder Moleküls mit der Umgebung bei sehr kleiner Rate auf. Das bedeutet, dass die Lebensdauer des Triplettzustands und damit die Zeitskala der Phosphoreszenz von mehreren Sekunden bis hin zu Stunden betragen kann.

Da der Triplettzustand im Vergleich zum Grundzustand eine höhere Energie und damit eine höhere chemische Reaktivität sowie eine lange Lebensdauer aufweist, kommt es zu Reaktionen mit Sauerstoff, wobei das Farbstoffmolekül in eine nicht-fluoreszierende Konfiguration [Sandison95] übergeht. Bei weiterer Anregung des Triplettzustands ist auch eine Dissoziation des Moleküls nicht auszuschließen. Die Übergangswahrscheinlichkeit des Farbstoffmoleküls in den Triplettzustand kann durch Zugabe chemischer Substanzen reduziert werden („chemisches Quenchen“).

## 3.2. Quantenmechanik der Fluoreszenz-Anregung

Eine möglichst genaue physikalische Erklärung der Fluoreszenz und der damit verbundenen Wechselwirkungen zwischen den Atomen und Molekülen sowie den elektromagnetischen Feldern wird erhalten, wenn man auf die Grundlagen der Quantenmechanik zurückgreift [Landau79, GM31]. Die **Schrödinger-Gleichung** für das Gesamtsystem ist gegeben durch:

$$H \Psi_0(x) = E \Psi_0(x). \quad (3.1)$$

Dabei setzt sich die **Hamiltonfunktion H** folgendermaßen zusammen:

$$H_{ges} = \sum_k H^k + H_{Atom} + H'. \quad (3.2)$$

Hierbei sind  $\sum_k H^k$  die  $k$  Hohlraumzustände, welche in diesem Fall die elektromagnetischen Wellen in der Umgebung der Atome beschreiben.  $H_{Atom}$  ist die Hamiltonfunktion des als ortsfest angenommenen Atoms, und  $H'$  ist die Wechselwirkungsenergie zwischen beiden Bestandteilen des Systems, die im Vergleich zu den beiden ersten Termen sehr klein ist und folglich als „**Störung**“ betrachtet werden kann. Diese Annahme berechtigt uns später, die Prinzipien der **Störungsrechnung** anzuwenden.

Zunächst sollen hier die einzelnen Terme der Hamiltonfunktion etwas näher erläutert werden. Die quantenmechanischen Zustände elektromagnetischer Wellen werden dabei im Allgemeinen durch ein zunächst begrenztes Kastenpotential beschrieben, in dem die Wellen „eingeschlossen“ sind. Zum Abschluss wird dieses Kastenpotential dann als unendlich groß angenommen. Das Vektorpotential  $\vec{A}$  der Hohlraumzustände ergibt sich damit nach [GM31] zu:

$$\vec{A} = \sum_k q^k A^k = \sum_k q^k e^k e^{2\pi i \nu_k (s_x^k x + s_y^k y + s_z^k z)}. \quad (3.3)$$

Darüberhinaus sind folgende Zusammenhänge für elektromagnetische Strahlung in Hohlräumen bekannt: Die Anzahl der möglichen Eigenschwingungen in einem Hohlraum ist begrenzt und wird bei gegebenem Volumen  $V$  im Frequenzbereich zwischen  $\nu$  und  $\nu + \Delta\nu$  beschrieben durch:

$$Z(\nu)\Delta\nu = \frac{8\pi\nu^2}{c^3} V \Delta\nu. \quad (3.4)$$



Die Hamiltonfunktion der Strahlung im Hohlraum ergibt sich aus den Maxwell-Gleichungen als harmonischer Oszillator folgendermaßen:

$$\sum_k H^k = \sum_k h\nu_k(n_k + \frac{1}{2}), \quad (3.5)$$

$$h\nu_{s s'} = \sum_k h\nu_k(n_k - n'_k), \quad (3.6)$$

wobei Gleichung (3.6) die Energiedifferenz zweier Hohlraumzustände beschreibt. Unter diesen Voraussetzungen ergeben sich die Matrixelemente für  $q^k$  nach [GM31] zu:

$$\begin{aligned} q_{s s'}^k &= \sqrt{\frac{hc^2}{2\pi\nu_k V}}(n_k + 1), & n'_k &= n_k + 1, n'_l = n_l \\ &= \sqrt{\frac{hc^2}{2\pi\nu_k V}}(n_k), & n'_k &= n_k - 1, n'_l = n_l \\ &= 0 & & \text{sonst.} \end{aligned} \quad (3.7)$$

Die Hamiltonfunktion des ortsfesten Atoms  $H_{Atom}$  wird im Wesentlichen durch bekannte Beziehungen zwischen den Zuständen des Atoms, welche aus gängigen Atommodellen gewonnen werden, ausreichend beschrieben.

Die Wechselwirkungsenergie  $H'$  wird aus der Orts- und Impulsinformation eines Atomelektrons, der potentiellen Energie dieses Elektrons im Atom und dem Vektorpotential des elektromagnetischen Strahlungsfeldes am Ort dieses Elektrons erhalten. Unter der Voraussetzung, dass die Wellenlänge des Lichts groß gegen die räumliche Ausdehnung des Atoms ist, sind räumliche Schwankungen des Vektorpotentials vernachlässigbar, und man erhält für die Wechselwirkungsenergie, wenn man die elektrischen Momente über alle Atomelektronen summiert, d.h.  $\vec{P} = \sum_r eq_r$ :

$$H' = -\frac{1}{c}(\vec{P}\dot{\vec{A}}).$$

Geht man nun weiterhin von der Beziehung aus, dass die zeitliche Ableitung des Vektorpotentials proportional zur elektrischen Feldstärke ist, also  $\frac{1}{c}\dot{\vec{A}} = \vec{E}$ , so ergibt sich

$$H' = -\vec{P}\vec{E}.$$

Damit ist die Wechselwirkungsenergie letztendlich nichts anderes als die potentielle Energie des elektrischen Moments der Atomelektronen gegen das von außen einwirkende elektromagnetische Strahlungsfeld.

An dieser Stelle kann die Störungsrechnung angewendet werden, da davon auszugehen ist, dass die Wechselwirkungsenergie sehr klein im Verhältnis zu den Hamiltonfunktionen des Atoms bzw. des elektromagnetischen Feldes sein wird. Unter

dieser Voraussetzung ist es erlaubt, die Wellenfunktion nach den Eigenfunktionen des „ungestörten“ Systems zu entwickeln:

$$\Psi = \sum a_{ns} \Psi_{ns}.$$

Zu einem beliebig ausgewählten Anfangszeitpunkt ( $t = 0$ ) sei das Atom in einem Zustand  $n_0$  und der Hohlraum in einem Zustand  $s_0$ . In erster Näherung erhält man damit unter Bezug auf Gleichung (3.1) nach [GM31]:

$$a_{ns}^{(1)} = H'_{ns, n_0 s_0} \frac{1 - e^{2\pi i(\nu_{nn_0} + \nu_{ss_0})t}}{h(\nu_{nn_0} + \nu_{ss_0})}. \quad (3.8)$$

Bis hierhin handelt es sich um eine **Störungsrechnung erster Ordnung**, da hier nur die Terme in erster Näherung berücksichtigt werden. Aus der Störungsrechnung erster Ordnung wird direkt auf die Emission und Absorption unter Beteiligung eines Photons geschlossen. Dabei ist die Absorption grundsätzlich von der Anzahl der Atome in Grundzustand  $n_0$  und von der Lichtdichte  $\rho(\nu)$  der im Hohlraum vorhandenen Photonen abhängig, welche möglichst exakt die Frequenz haben, die zur Anregung des Atoms notwendig ist. Diese Art der Absorption wird dann im Weiteren als Einphotonen-Anregung bezeichnet, da in einem Prozess durch Absorption eines geeigneten Photons direkt der Übergang vom Grundzustand des Atoms in den ersten angeregten Zustand erfolgt.

Im Folgenden wird die Störungsrechnung bis zur zweiten Näherung fortgesetzt (**Störungsrechnung zweiter Ordnung**), um auch die Doppelabsorption beschreiben zu können, die auch häufig als Zweiphotonenabsorption bezeichnet wird. Bei der Doppelabsorption befinden sich alle Atome zum Anfangszeitpunkt ( $t = 0$ ) im Grundzustand  $n_0$ . Der Hohlraum, in dem sich diese Atome befinden, enthalte zu diesem Zeitpunkt zwei unabhängige Eigenschwingungen, welche die gleiche Ausbreitungsrichtung und die gleiche Polarisation aufweisen und für die darüberhinaus gilt, dass die Summe der Eigenfrequenzen  $\nu_k + \nu_l$  gleich der Frequenz des elektronischen Übergangs im Atom ist. Daraus erhält man eine von Null verschiedene Wahrscheinlichkeit für einen Übergang von  $n_0 \rightarrow n$  unter der Voraussetzung, dass der Hohlraumzustand  $s$  aus  $s_0$  durch die Absorption eines Photons der Frequenz  $\nu_k$  (Spektralbereich  $\nu$ ) und eines zweiten Photons mit der Frequenz  $\nu_l$  (Spektralbereich  $\nu'$ ) hervorgeht. Insgesamt ergeben sich daraus unter Verwendung von  $H'_{nn'ss'} = \sum_k \dot{q}_{ss'}(\vec{P}_{nn'} A^k)$  nach [GM31] folgende Zusammenhänge:

$$a_{ns}^{(2)} = \frac{1}{c^2} \dot{q}_{n_k^0-1, n_k^0}^k \dot{q}_{n_l^0-1, n_l^0}^l \sum \left[ \frac{(\vec{P}_{nn'} e^l)(\vec{P}_{n'n^0} e^k)}{h(\nu_{n'n^0} - \nu_k)} + \frac{(\vec{P}_{nn'} e^k)(\vec{P}_{n'n^0} e^l)}{h(\nu_{n'n^0} - \nu_l)} \right] \cdot \frac{1 - e^{2\pi i(\nu_{nn^0} - \nu_k - \nu_l)t}}{h(\nu_{nn^0} - \nu_k - \nu_l)}. \quad (3.9)$$

Zur Vereinfachung dieses Ausdrucks werden die in Gleichung (3.7) definierten Matrixelemente verwendet, welche die Eigenschaften des Hohlraums wesentlich beschreiben.

Damit wird die Gleichung im Wesentlichen durch Systemparameter wie Frequenz ( $\nu$ ), Eigenzustände ( $n$ ), elektrisches Moment, Polarisation und Volumen beschrieben, und es folgt:

$$a_{ns}^{(2)} = \frac{2\pi h}{V} \sqrt{n_k^0 \nu_k n_l^0 \nu_l} \sum_{n'} \left[ \frac{(\vec{P}_{nn'} \vec{e}') (\vec{P}_{n'n^0} \vec{e})}{h(\nu_{n'n^0} - \nu_k)} + \frac{(\vec{P}_{nn'} \vec{e}) (\vec{P}_{n'n^0} \vec{e}')}{h(\nu_{n'n^0} - \nu_l)} \right] \cdot \frac{1 - e^{2\pi i(\nu_{nn^0} - \nu_k - \nu_l)t}}{h(\nu_{nn^0} - \nu_k - \nu_l)}. \quad (3.10)$$

Verwendet man weiterhin die mittlere monochromatische Strahlungsdichte  $\rho(\nu)$ , die im Allgemeinen über den Ausdruck

$$V\rho(\nu)\Delta\nu = \sum_{\nu < \nu_k < \nu + \Delta\nu} h\nu_k n_k^0 \quad (3.11)$$

definiert ist, so ergibt sich die Wahrscheinlichkeit der Doppelabsorption durch Bildung der Summe  $|a_{ns}^{(2)}|^2$  über die Hohlraumzustände  $s$ . Dies entspricht bei großem Hohlraum einer Integration über die Frequenzen  $\nu_k$  und  $\nu_l$ :

$$\sum |a_{ns}^{(2)}|^2 = 4\pi^2 \left| \sum_{n'} \left[ \frac{(\vec{P}_{nn'} \vec{e}') (\vec{P}_{n'n^0} \vec{e})}{h(\nu_{n'n^0} - \nu)} + \frac{(\vec{P}_{nn'} \vec{e}) (\vec{P}_{n'n^0} \vec{e}')}{h(\nu_{n'n^0} - \nu')} \right] \right|^2 \cdot \int \rho(\nu_k) \rho(\nu_l) \frac{4 \sin^2 \pi(\nu_{nn^0} - \nu_k - \nu_l)t}{h^2(\nu_{nn^0} - \nu_k - \nu_l)^2} d\nu_k d\nu_l. \quad (3.12)$$

Unter Berücksichtigung der Bedingung für Doppelabsorption, dass die Summe der Frequenzen im Hohlraum ( $\nu_k, \nu_l$ ) gerade der zur Anregung des Atoms erforderlichen Frequenz ( $\nu_{nn^0}$ ) entspricht, erhält man an dieser Resonanzstelle

$$W_{nn^0} = \frac{16\pi^4}{h^2} \int \rho(\nu_{nn^0} - \nu) \rho(\nu) d\nu |\vec{p}^k \vec{e}'|^2, \quad (3.13)$$

wobei  $\vec{p}^k$  hier als Abkürzung des Summenausdrucks in Gleichung (3.12) zu verstehen ist. Das Integral ist hier über die Breite der im Hohlraum befindlichen Spektrallinien auszuführen.

Aus diesen Betrachtungen ergeben sich alle wesentlichen Eigenschaften der Doppelabsorption, d.h. der simultanen Absorption zweier Photonen, um ein Atom in einen angeregten Zustand zu heben (Zweiphotonen-Effekt). Einerseits wird die Wahrscheinlichkeit einer Doppelabsorption dadurch positiv beeinflusst, dass sie von der Anzahl der Atome im Grundzustand abhängt (s.o.). Auf der anderen Seite bewirkt die quadratische Abhängigkeit von der Lichtdichte (siehe Gleichung (3.12)), dass sehr hohe Lichtintensitäten  $\rho(\nu)$  zur Beobachtung der Doppelabsorption erforderlich sind.

Insgesamt ist hier festzuhalten, dass der Prozess der Doppelabsorption nur innerhalb der sehr kurzen Zeitskala der **Heisenberg'schen Unschärferelation** erfolgen

kann, da die beiden in einem Prozess ablaufenden Vorgänge für sich genommen den Energieerhaltungssatz nicht erfüllen. Dies bedeutet, dass das Atom durch Absorption eines Photons der Frequenz  $\nu$  vom Grundzustand  $n_0$  in einen virtuellen Zwischenzustand  $n'$  und durch Absorption eines zweiten Photons der Frequenz  $\nu'$  in den angeregten Endzustand  $n$  übergeht.

## 3.3. Fluoreszenzmikroskopie

In diesem Abschnitt wird beschrieben, inwieweit die hier erläuterten Prinzipien der Fluoreszenz im Bereich der Strukturuntersuchung mit Hilfe der Mikroskopie eingesetzt werden können. Dabei wird sowohl die „klassische“ Fluoreszenzmikroskopie mit Aufsichtbeleuchtung (Epifluoreszenz) als auch die konfokale Laser-Scanning-Mikroskopie beschrieben. Daran schließt sich eine Darstellung weiterer moderner Fluoreszenzmikroskope an, mit denen es möglich ist, sehr genaue Strukturuntersuchungen an fluoreszenzmarkierten Objekten vorzunehmen.

### 3.3.1. Epifluoreszenzmikroskopie

Bei einem **Epifluoreszenzmikroskop** wird das auf einem konventionellen Objektträger präparierte Objekt auf den Objektstisch eines kommerziell erhältlichen Mikroskops eingelegt und von oben durch das Objektiv mit dem Licht einer Gasentladungslampe (meistens Quecksilber oder Xenon) beleuchtet (*Aufsicht*). Um dabei eine spezifische Fluoreszenz-Anregung zu erhalten, wird durch einen Anregungsfilter nur Licht der Wellenlänge auf die Probe geführt, die benötigt wird, um die gewünschte Fluoreszenz anzuregen. Durch den Einsatz eines wellenlängenselektiven Strahlteilers in den Mikroskopstrahlengang wird erreicht, dass das von der Probe emittierte Fluoreszenzlicht durch das Objektiv entweder am Okular des Mikroskops direkt beobachtet oder mit einer Kamera detektiert werden kann.

Bei der Epifluoreszenzmikroskopie wird ein relativ großer Bereich des Objektträgers ausgeleuchtet, was zu einem großen sichtbaren Gesichtsfeld führt. Aus diesem Grunde eignet sich ein Epifluoreszenzmikroskop sehr gut dazu, einen schnellen Überblick über die Qualität einer Präparation zu erhalten. Grundsätzlich werden hier zweidimensionale Aufnahmen senkrecht zur optischen Achse erhalten, wodurch es auch möglich ist, Aussagen über die laterale Auflösung des Mikroskops bzw. die laterale Größe der Objekte zu machen. Ein optisches Scannen in Richtung parallel zur optischen Achse wird hier in der Regel nicht durchgeführt.

### 3.3.2. Konfokale Laser-Scanning-Mikroskopie

Ein entscheidender Fortschritt insbesondere bei der Untersuchung dreidimensionaler Strukturen mit der Fluoreszenzmikroskopie ist mit der Entwicklung der **konfokalen**

**Laser-Scanning-Mikroskopie** (engl. *Confocal Laser Scanning Microscopy, CLSM*) [CCremer78] gelungen (siehe Abbildung 3.2). Dabei wird die Probe, welche ebenfalls auf einem konventionellen Objektträger präpariert wird, mit einem Laser in allen drei Raumrichtungen abgerastert (*gescannt*). Bei der Durchführung der Messungen wird die Probe zunächst in der lateralen Ebene mit einem in den Objektbereich fokussierten Laserstrahl zeilenweise abgerastert, wobei das Fluoreszenzlicht mit einer konfokalen Blende von dem Licht aus den Ebenen getrennt wird, welche sich nicht im Fokus befinden. Dieser Vorgang wird in Abhängigkeit von den betrachteten Objekten zwischen 4- und 32-mal wiederholt, um damit eine Mittelung zur Unterdrückung von Rauscheffekten durchzuführen. Nach Abschluss der lateralen Rasterung wird die nächste Ebene in axialer Richtung abgerastert, die in der Regel einen Abstand von 150 bis 200 nm zur vorhergehenden Ebene aufweist. Nachdem die Probe auch in axialer Richtung vollständig erfasst ist, wird aus diesen Messdaten ein dreidimensionales Bild der Probe rekonstruiert. Im Rahmen der CLSM wird eine Auflösung von etwa 300 nm in lateraler Richtung und 600 nm in axialer Richtung erreicht. Im Gegensatz

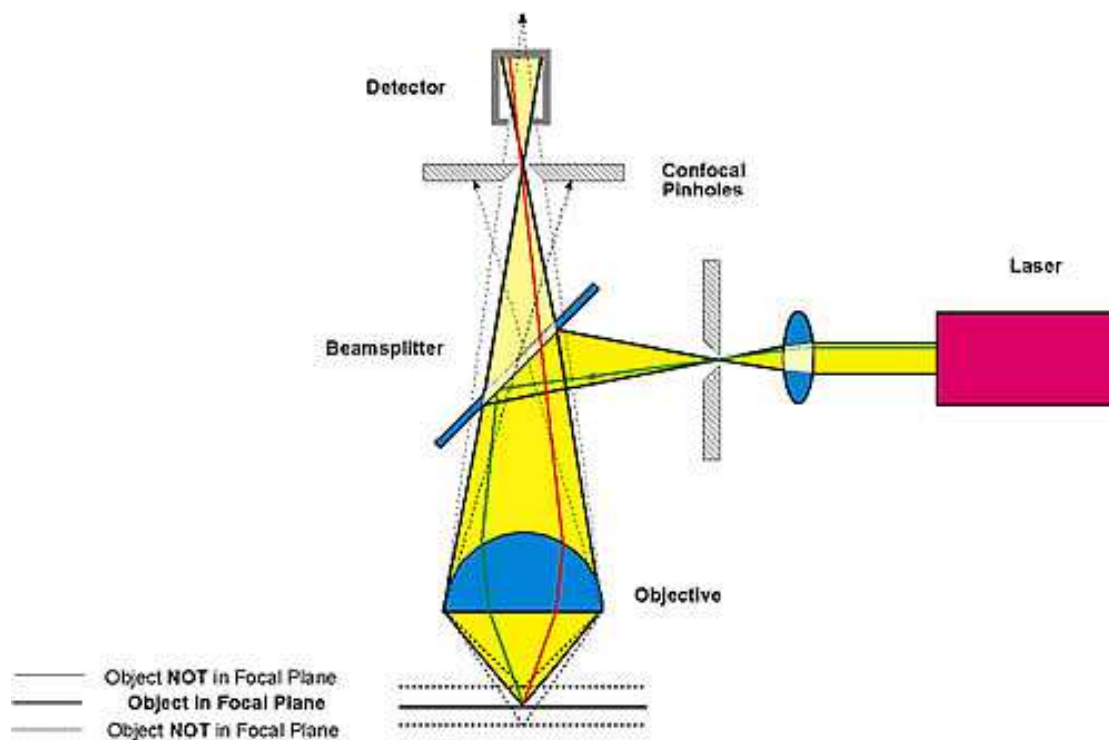


Abbildung 3.2.: Prinzip der konfokalen Laser-Scanning-Mikroskopie [Leica].

zur CLSM wird bei der in dieser Arbeit vorgestellten Mikroskopiemethode in den meisten Fällen kein fokussierter Laserstrahl, sondern ein aufgeweiteter Anregungsstrahl verwendet.

#### 3.3.3. Moderne Fluoreszenzmikroskope

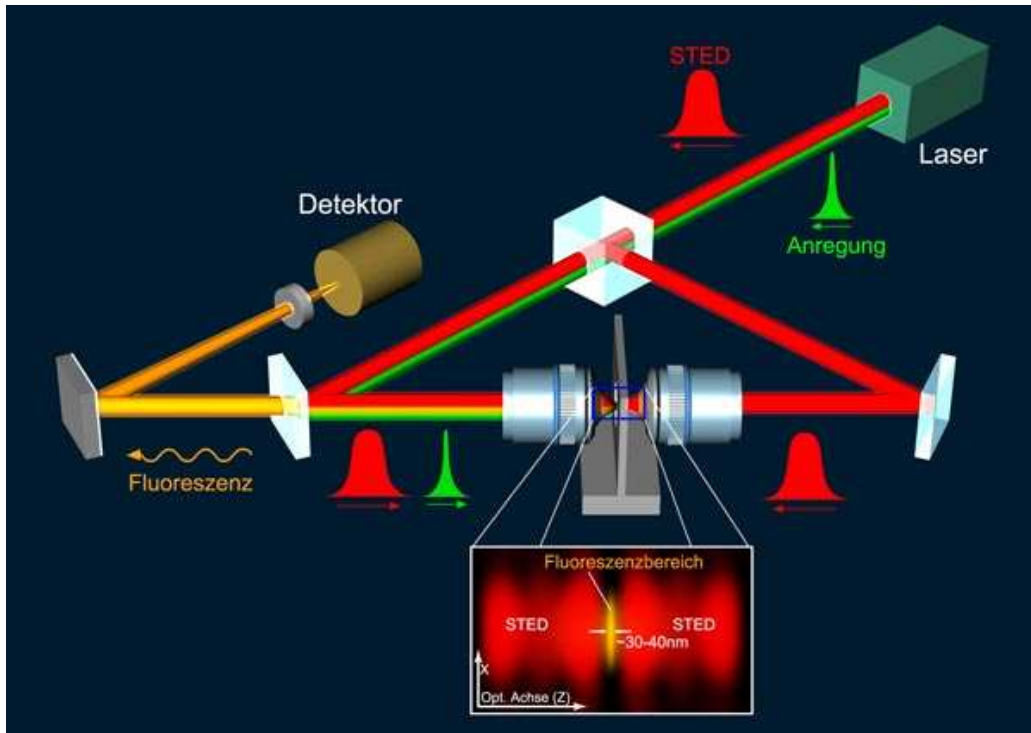
Bei der konfokalen **4Pi-Mikroskopie** [Hell94a] wird die Mikroskopie über zwei sich gegenüberstehende Objektive betrieben. Da hier analog zur CLSM fokussierte Laserstrahlen zur Anregung verwendet werden, ist die gegenseitige Angleichung der optischen Weglängen, die mittels Spiegeln und Strahlteilern vorgenommen wird, sehr aufwendig. Da grundsätzlich sowohl der Anregungsstrahlengang als auch der Detektionsstrahlengang über beide Objektive laufen kann, ist die Fluoreszenz-Anregung der Probe (A-Typ), die Detektion des Fluoreszenzlichts (B-Typ) oder auch beides gleichzeitig (C-Typ) kohärent durchführbar. Der wesentliche Vorteil dieser Mikroskopiemethode besteht darin, dass das Emissionslicht der Probe durch ein System größerer numerischer Apertur betrachtet und detektiert werden kann, da der abgedeckte Raumwinkel hier um den Faktor zwei größer ist. Mit Typ-C der konfokalen 4Pi-Mikroskopie kann die Halbwertsbreite der axialen PSF deutlich auf etwa 100 nm reduziert werden. In Kombination mit SPDM (siehe Abschnitt 3.3.4 wurden Distanzen von 60 nm mit einer Genauigkeit von 1,2 nm gemessen [Schmidt00].

Eine weitere Methode zur Erhöhung der effektiven Auflösung ist die Mikroskopie mit Unterdrückung der Fluoreszenz durch stimulierte Emission (*engl. Stimulated Emission Depletion, STED* [Hell94b, Klar00]). Bei diesem Mikroskopiesystem, das ebenfalls auf dem konfokalen Prinzip mit Fokussierung der Anregung auf die Probe beruht, wird zusätzlich zum Anregungsstrahl ein zweiter rotverschobener Laserstrahl in die Probe eingestrahlt. Dieser STED-Strahl wird durch optische Elemente so geformt, dass sich um den Anregungsfokus ein dreidimensionaler Ring („Donut“) ausbildet. In diesem Bereich findet in unmittelbarer Umgebung des Anregungsfokus eine stimulierte Emission statt, mit der die Fluoreszenz unterdrückt wird. Bei dieser Mikroskopiemethode wird folglich die Breite der Anregungs-PSF durch eine stimulierte Fluoreszenzemission von Farbstoff im Randbereich der PSF vor der eigentlichen Fluoreszenzdetektion deutlich verringert. Mit dieser Methode konnte bisher eine Auflösung bis hinunter zu 30 nm erreicht werden. In Abbildung 3.3 ist ein 4Pi-Mikroskop in Kombination mit der **STED-Mikroskopie** dargestellt.

#### 3.3.4. Spektrale Präzisions-Distanz-Mikroskopie

Betrachtet man im Rahmen der Fluoreszenzmikroskopie ausschließlich Objekte, welche mit demselben Farbstoff markiert sind, so ist die optische Auflösung sowohl in lateraler als auch in axialer Richtung durch klassische Auflösungskriterien begrenzt (siehe Kapitel 2). Das bedeutet auch, dass Abstände zwischen zwei Objekten nicht mehr gemessen werden können, wenn ihr Abstand kleiner ist als das Auflösungsvermögen. Werden dagegen Objekte mit unterschiedlicher spektraler Signatur verwendet, können auch Distanzen gemessen werden, welche deutlich kleiner sind als die optische Auflösung [Bornfleth98, Edelmann99, Edelmann00].

Eine wesentliche Voraussetzung für die Bestimmung von Distanzen ist eine zu-



**Abbildung 3.3.:** Prinzipieller Aufbau des 4Pi-Mikroskops in Kombination mit der STED-Mikroskopie [MPIbpcNews02].

verlässige **Lokalisation** der betrachteten Objekte. Die Lokalisation kann dabei sowohl durch modellbasierte Methoden, bei denen durch entsprechende Anpassungsfunktionen das Maximum der gemessenen Punktbildfunktion festgestellt wird, als auch durch schwerpunkt-basierte Methoden vorgenommen werden. In der Regel wird hier die schwerpunkt-basierte Lokalisation angewendet, bei der zunächst eine Segmentierung der zu lokalisierenden Objekte durchgeführt wird. Dazu ist es erforderlich, einen adäquaten Schwellwert  $I_s$  zu finden, wobei Pixel mit  $I \geq I_s$  als zum Objekt gehörend definiert werden. Pixel mit kleineren Intensitätswerten werden verworfen. Bei der Festlegung des Schwellwerts wird in der Regel auf die Intensitätswerte in der weiteren Umgebung des Objekts zurückgegriffen, wobei der Minimalwert mit  $I_{min}$  und der Maximalwert mit  $I_{max}$  bezeichnet wird. Der Schwellwert ergibt sich daraus zu  $I_s = k(I_{max} - I_{min})$  wobei  $k$  zwischen 0,2 und 0,4 liegt.

Die Berechnung der Objektposition kann in Analogie zur Bestimmung des Massenschwerpunkts in der Mechanik vorgenommen werden, wenn  $x_i$  als Positionen der zum Objekt gehörigen Pixel und  $I_i$  als korrespondierende Intensitätswerte definiert werden. Dabei gilt

$$x = \frac{1}{N} \sum x_i I_i \quad \text{mit} \quad N = \sum I_i, \quad (3.14)$$

wobei  $N$  die Anzahl der detektierten Photonen angibt. Diese Positionsbestimmung ist vor allem bei symmetrischen Intensitätsverteilungen anwendbar, wie sie bei der Detektion "punktförmiger", d.h. im Vergleich zur Anregungswellenlänge kleiner Objekte auftreten. Weiterhin kann die Lokalisation noch verbessert werden, wenn der Untergrund durch Subtraktion des minimalen Intensitätswerts „abgeschnitten“ wird [Heintzmann99]. Die Genauigkeit der Lokalisation kann für alle Raumrichtungen unter Berücksichtigung des Photonenrauschens berechnet werden, wobei nach [Edelmann00] gilt:

$$\sigma_{x,y,z} = \frac{1}{\sqrt{8 \ln 2}} \frac{FWHM_{x,y,z}}{\sqrt{N}}. \quad (3.15)$$

Dabei gibt  $FWHM_{x,y,z}$  die Halbwertsbreite der gemessenen Punktbildfunktion in jeder der drei Raumrichtungen an. Systematische Fehler, die hier im Wesentlichen durch die Abtastung verursacht werden, können vernachlässigt werden, solange eine Abtastweite von  $\Delta x = FWHM/4$  eingehalten wird [Heintzmann99].

Die **Distanz**  $d$  zwischen zwei Objekten wird allgemein aus der Differenz der Ortsvektoren  $\vec{r}_1$  und  $\vec{r}_2$  berechnet, so dass gilt:

$$d = |\vec{r}_1 - \vec{r}_2| = \sqrt{(x_1 - x_2)^2 + (y_1 - y_2)^2 + (z_1 - z_2)^2}. \quad (3.16)$$

Diese Objektdistanz kann jedoch nur dann berechnet werden, wenn die betrachteten Objekte auch zuverlässig getrennt detektiert werden können. Dazu müssen die Objekte bei Verwendung derselben spektralen Markierung in allen drei Raumrichtungen einen Mindestabstand aufweisen, der sich nach den in Abschnitt 2.2.2 diskutierten Auflösungskriterien richtet.

Kleinere Abstände können unter der Voraussetzung bestimmt werden, dass die Intensitätsverteilungen der einzelnen Objekte *unabhängig voneinander* detektiert werden. Dazu werden die Objekte mit verschiedenen **spektralen Signaturen** versehen, um die Intensitätsverteilungen in unabhängigen Detektionskanälen aufzunehmen und daraus die Objektpositionen zu bestimmen. Dieses Verfahren ist die **spektrale Präzisions-Distanz-Mikroskopie** [Edelmann99].



# 4. Interferenz und Mikroskopie mit räumlich modulierter Anregung

In diesem Kapitel werden zunächst die Grundlagen der Interferenz als eine Folge der Wellennatur der elektromagnetischen Wellen erläutert und verschiedene Typen von Interferometern und ihre Verwendung bei der Messung physikalischer Größen besprochen. In diesem Zusammenhang wird auch ein Beispiel aus der Astronomie vorgestellt.

Im zweiten Teil dieses Kapitels wird die Mikroskopie mit räumlich modulierter Anregung (*engl. Spatially Modulated Illumination (SMI) Microscopy*) beschrieben, die im Rahmen dieser Arbeit betrieben und weiterentwickelt wurde. An dieser Stelle werden auch einige Simulationen zur SMI-Mikroskopie unter Anwendung der Zweiphotonen-Anregung beschrieben.

## 4.1. Grundlagen von Interferenz

Die Interferenz wird im Rahmen der Wellennatur des Lichts als Überlagerung zweier oder mehrerer Lichtwellen in einem bestimmten Raumbereich betrachtet. Dabei wird die endgültige Form der überlagerten Welle ausschließlich von den physikalischen Parametern wie Amplitude, Frequenz und Phase jeder der überlagerten Einzelwellen festgelegt. Betrachten wir hier nochmals die Wellengleichungen (2.13) und (2.14) aus Kapitel 2, so ergibt sich, dass jede Feldkomponente einer elektromagnetischen Welle folgende Differentialgleichung erfüllt:

$$\frac{\partial^2 \psi}{\partial x^2} + \frac{\partial^2 \psi}{\partial y^2} + \frac{\partial^2 \psi}{\partial z^2} = \frac{1}{v^2} \frac{\partial^2 \psi}{\partial t^2}. \quad (4.1)$$

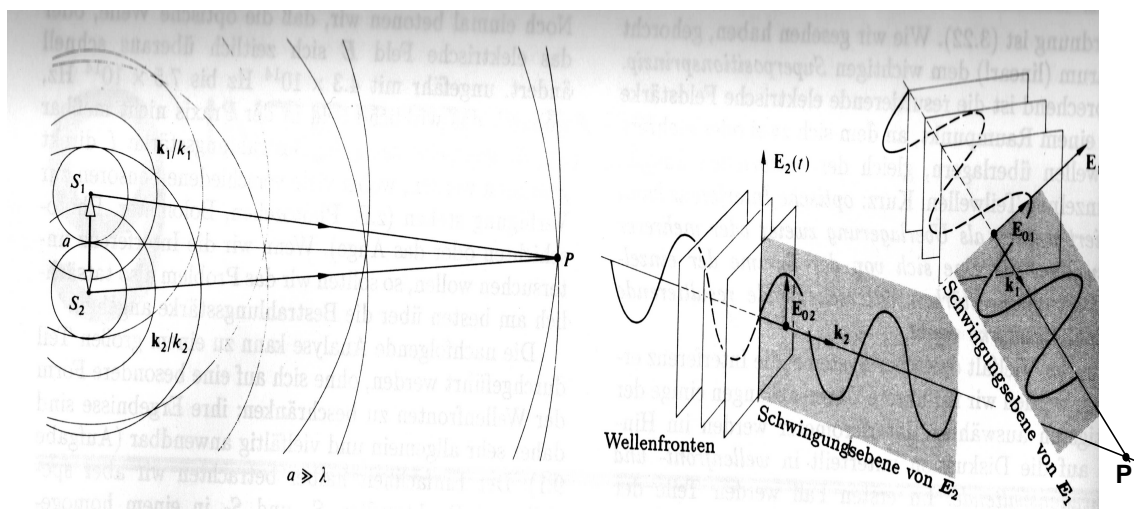
Das ist eine lineare Differentialgleichung zweiter Ordnung, bei der alle  $\psi(\vec{r}, t)$  nur in der ersten Potenz auftreten (*Linearität*). Dies bedeutet, dass jede Linearkombination der einzelnen Lösungen  $\psi_1(\vec{r}, t), \psi_2(\vec{r}, t), \dots, \psi_n(\vec{r}, t)$  auch eine Lösung der Wellendifferentialgleichung darstellt, so dass gilt:

$$\psi(\vec{r}, t) = \sum_{i=1}^n K_i \psi_i(\vec{r}, t). \quad (4.2)$$

Dieser Zusammenhang stellt das **Superpositionsprinzip** dar [Hecht99], wobei die Konstanten  $K_i$  willkürlich gewählt werden können. Das Superpositionsprinzip besagt, dass jede Welle durch die Summe der einzelnen Teilwellen beschrieben wird. Grundsätzlich ist hier zu berücksichtigen, dass Licht bzw. die Ausbreitung des Lichts mit Hilfe vektorieller Größen behandelt werden muss, da sowohl die elektrischen als auch die magnetischen Felder sogenannte Vektor-Felder sind. Aus diesem Grunde werden die Grundgleichungen der Interferenz zunächst im Vektor-Modell beschrieben. Dabei wird hier über die Intensität argumentiert, da diese wesentlich einfacher gemessen werden kann als das zeitlich sehr schnell veränderliche elektrische Feld. Nach dem Superpositionsprinzip ergibt sich die elektrische Feldstärke  $\vec{E}$  an jedem Ort aus der Summe einzelner Felder  $\vec{E}_1, \vec{E}_2, \dots$  zu:

$$\vec{E} = \vec{E}_1 + \vec{E}_2 + \dots \quad (4.3)$$

Wir betrachten zwei Punktquellen in einem homogenen Medium, deren gegenseitiger Abstand deutlich größer als die Wellenlänge des Lichts ist und welche Licht der gleichen Frequenz abstrahlen. Darüberhinaus wird angenommen, dass der Beobachtungspunkt so weit von den Lichtquellen entfernt ist, dass die Wellenfronten als eben betrachtet werden können. Diese Situation ist in Abbildung 4.1 dargestellt.



**Abbildung 4.1.:** Überlagerung zweier Wellen im Punkt  $P$ , die von den Punkten  $S_1$  und  $S_2$  ausgehen. Aus [Hecht99], Seite 354.

Unter diesen Annahmen erhält man Wellen der Form:

$$\vec{E}_1(\vec{r}, t) = \vec{E}_{01} \cos(\vec{k}_1 \cdot \vec{r} - \omega t + \delta_1) \quad (4.4)$$

sowie

$$\vec{E}_2(\vec{r}, t) = \vec{E}_{02} \cos(\vec{k}_2 \cdot \vec{r} - \omega t + \delta_2). \quad (4.5)$$

Die Intensität ist allgemein direkt vom zeitlichen Mittelwert des Quadrats der elektrischen Feldstärke abhängig, so dass gilt:

$$I = \langle \vec{E}^2 \rangle = \langle \vec{E} \cdot \vec{E} \rangle .$$

Einsetzen ergibt:

$$\begin{aligned} \vec{E}^2 &= (\vec{E}_1 + \vec{E}_2) \cdot (\vec{E}_1 + \vec{E}_2) \\ &= \vec{E}_1^2 + \vec{E}_2^2 + 2\vec{E}_1 \cdot \vec{E}_2. \end{aligned} \quad (4.6)$$

Unter diesen Voraussetzungen gilt für die Intensität:

$$I = I_1 + I_2 + I_{12} \quad (4.7)$$

wobei

$$\begin{aligned} I_1 &= \langle \vec{E}_1^2 \rangle, \\ I_2 &= \langle \vec{E}_2^2 \rangle, \\ I_{12} &= \langle 2\vec{E}_1 \cdot \vec{E}_2 \rangle . \end{aligned} \quad (4.8)$$

Wie hieraus zu ersehen ist, ergibt sich die Gesamtintensität bei der Überlagerung von Wellen nicht ausschließlich aus der Summe der Intensitäten der einzelnen Teilwellen. Es tritt ein zusätzlicher Term auf, der die Wechselwirkung der beiden Teilwellen im Rahmen der Überlagerung beschreibt und üblicherweise als **Interferenzterm** bezeichnet wird. Wir erhalten den Interferenzterm für die in den Gleichungen (4.4) und (4.5) dargestellten Wellen durch Einsetzen, so dass gilt:

$$\vec{E}_1 \cdot \vec{E}_2 = \vec{E}_{01} \cdot \vec{E}_{02} \cos(\vec{k}_1 \cdot \vec{r} - \omega t + \delta_1) \cdot \cos(\vec{k}_2 \cdot \vec{r} - \omega t + \delta_2). \quad (4.9)$$

Mit dem Additionstheorem  $\cos(x - y) = \cos x \cos y + \sin x \sin y$  ergibt sich:

$$\begin{aligned} \vec{E}_1 \cdot \vec{E}_2 &= \vec{E}_{01} \cdot \vec{E}_{02} [\cos(\vec{k}_1 \cdot \vec{r} + \delta_1) \cos \omega t + \sin(\vec{k}_1 \cdot \vec{r} + \delta_1) \sin \omega t] \cdot \\ &\quad [\cos(\vec{k}_2 \cdot \vec{r} + \delta_2) \cos \omega t + \sin(\vec{k}_2 \cdot \vec{r} + \delta_2) \sin \omega t]. \end{aligned} \quad (4.10)$$

Nach dem Ausmultiplizieren dieser Gleichung wird zunächst eine zeitliche Mittelung durchgeführt. Diese Mittelung ist zulässig, da das Zeitintervall  $T$ , in dem die Intensität betrachtet wird, deutlich größer ist als die Schwingungsdauer der Welle, d.h.  $T > \frac{2\pi}{\omega}$ . Für die zeitliche Mittelung der trigonometrischen Funktionen ergibt sich  $\langle \cos \omega t^2 \rangle = \frac{1}{2}$ ,  $\langle \sin \omega t^2 \rangle = \frac{1}{2}$  und  $\langle \cos \omega t \sin \omega t \rangle = 0$ . Unter diesen Voraussetzungen erhält man:

$$\vec{E}_1 \cdot \vec{E}_2 = \frac{1}{2} \vec{E}_{01} \cdot \vec{E}_{02} [\cos(\vec{k}_1 \cdot \vec{r} + \delta_1) \cos(\vec{k}_2 \cdot \vec{r} + \delta_2) + \sin(\vec{k}_1 \cdot \vec{r} + \delta_1) \sin(\vec{k}_2 \cdot \vec{r} + \delta_2)]. \quad (4.11)$$

Unter Verwendung des oben angegebenen Additionstheorems in der anderen Richtung ergibt sich:

$$\langle \vec{E}_1 \cdot \vec{E}_2 \rangle = \frac{1}{2} \vec{E}_{01} \cdot \vec{E}_{02} \cos(\vec{k}_1 \cdot \vec{r} + \delta_1 - \vec{k}_2 \cdot \vec{r} - \delta_2). \quad (4.12)$$

Damit ergibt sich für die Intensität im Rahmen des Interferenzterms der folgende Ausdruck:

$$I_{12} = \vec{E}_{01} \cdot \vec{E}_{02} \cos \phi, \quad (4.13)$$

wobei  $\phi$  in diesem Zusammenhang die Phasendifferenz der beteiligten Wellen angibt, welche sowohl durch Weglängen- als auch durch Phasenkonstantenunterschiede bestimmt wird. Da die beteiligten vektoriellen elektrischen Felder hier im Skalarprodukt erscheinen, wird sofort klar, dass es zu keinen Interferenzerscheinungen ( $I_{12} = 0$ ) kommt, wenn  $\vec{E}_{01}$  und  $\vec{E}_{02}$  senkrecht aufeinander stehen. Im Folgenden wird angenommen, dass die Felder  $\vec{E}_{01}$  und  $\vec{E}_{02}$  parallel bzw. antiparallel ausgerichtet sind. In diesem weitaus häufigsten Fall spielt der vektorielle Charakter der Felder keine Rolle, so dass auf eine skalare Beschreibung zurückgegriffen werden kann. Unter diesen Voraussetzungen ergibt sich für die Intensitäten:

$$I_{12} = E_{01} E_{02} \cos \phi = 2\sqrt{I_1 I_2} \cos \phi. \quad (4.14)$$

Für die Gesamtintensität folgt damit

$$I = I_1 + I_2 + 2\sqrt{I_1 I_2} \cos \phi. \quad (4.15)$$

An dieser Stelle werden zunächst einige Betrachtungen angestellt, welche die praktischen Auswirkungen dieser Zusammenhänge aus experimenteller Sicht näher erläutern. Betrachtet werden zwei Lichtwellen, deren Intensitäten gleich sind, d.h.  $I_1 = I_2 = I_0$ . Dadurch vereinfacht sich der Ausdruck für die Gesamtintensität zu

$$I = 2I_0 + 2I_0 \cos \phi, \quad (4.16)$$

so dass die tatsächlich an einem bestimmten Ort gemessene Intensität ausschließlich von der Phasendifferenz der beteiligten Wellenzüge beeinflusst wird. Die maximale Intensität von  $I = 4I_0$  ergibt sich dabei, wenn  $\cos \phi = 1$  also  $\phi = 0, 2\pi, 4\pi, \dots$  ist. Dieser Fall stellt die vollständige **konstruktive Interferenz** dar. Gilt für die Phasendifferenz die Bedingung  $1 > \cos \phi > 0$  so erhält man eine *Verstärkung* der Intensität. Eine *Abschwächung* der Gesamtintensität ergibt sich, wenn  $\cos \phi < 0$  ist. Im Extremfall kann es auch zu vollständiger *Auslöschung* bzw. **destruktiver Interferenz** kommen, wenn die Phasendifferenz  $\phi = \pi, 3\pi, \dots$  beträgt und damit  $\cos \phi = -1$  wird.

### 4.1.1. Interferenzbedingungen

Grundsätzlich werden alle Interferenzerscheinungen, die bei der Überlagerung elektromagnetischer Wellen auftreten, durch die gegenseitige Phasenbeziehung bzw. Phasendifferenz der beteiligten Teilwellen bestimmt. Diese Phasendifferenz wird dabei im Wesentlichen durch die Differenz der optischen Weglängen  $k(r_1 - r_2)$  und eine konstante Phasendifferenz  $\delta_1 - \delta_2$  charakterisiert. Zur Erzeugung von Interferenzmustern ist es nicht notwendig, dass die Teilwellen phasengleich sind, sondern dass eine evtl. bereits vorhandene Phasendifferenz zwischen den Lichtwellen zeitlich und räumlich konstant bleibt. Erfüllen die Lichtwellen diese Bedingung, so nennt man sie auch **kohärent**. Die wesentliche Eigenschaft der **Kohärenz** besteht folglich darin, dass sich alle bei der Überlagerung beteiligten Wellenzüge in wohldefinierter Weise (z.B. sinusförmig) verhalten, bevor es zu unkorrelierten Veränderungen der gegenseitigen Phasenbeziehungen kommt. Der Zeitraum, in dem die Lichtwellen diese Bedingung erfüllen, ist ein Maß für die zeitliche Kohärenz. Wird die Situation von einem festen Punkt im Raum betrachtet, so variieren die Lichtwellen für eine festgelegte Anzahl von Schwingungen in der oben definierten Weise. Die dem entsprechende Weglänge wird aus diesem Grunde als Kohärenzlänge bezeichnet.

Um die Relevanz dieser Interferenzbedingungen abschätzen zu können, werden an dieser Stelle für einige experimentell wichtige Lichtquellen die Größenordnungen von Kohärenzzeit bzw. Kohärenzlänge betrachtet. Den Idealfall zur Erzeugung von Interferenz stellt die Verwendung von monochromatischen Lichtquellen dar, welche nur Licht einer festen Frequenz in reiner Sinusform abstrahlen und folglich eine unendlich große Kohärenzlänge aufweisen. Experimentell anwendbare Lichtquellen mit der größten, reell erreichbaren Kohärenzlänge sind LASER (*engl. Light Amplification by Stimulated Emission of Radiation*). Mit Lasern wird eine Kohärenzlänge von einigen Metern bis hin zu einigen Kilometern erreicht. Bei gewöhnlichen Gasentladungslampen, wie sie in den meisten Laboratorien verwendet werden, liegt die Kohärenzlänge zwischen mehreren Millimetern und einigen Zentimetern. Mit natürlichen Lichtquellen (z.B. Glühlampen) sind konstante relative Phasenbeziehungen meistens nur über einen sehr kurzen Zeitraum realisierbar, so dass dabei evtl. entstehende Interferenzmuster sofort verwaschen werden und folglich nicht detektierbar sind. Interferenzmuster treten besonders deutlich unter der Voraussetzung auf, dass die beteiligten Wellen die gleiche Frequenz und die gleiche Amplitude aufweisen.

## 4.2. Spiegel-Interferometer

In diesem Abschnitt wird erläutert, wie man mit Hilfe geeigneter Spiegelkonstellationen Interferenzmuster erzeugen kann, um diese zur Bestimmung kleinster Längenunterschiede heranzuziehen. Hierbei wird in der Regel der vorhandene Strahl durch geeignete Strahlteilung in mehrere Teilstrahlen aufgeteilt, welche dann in einem fest-

gelegten Bereich durch die Spiegel wieder überlagert werden.

### 4.2.1. Michelson-Interferometer

Das bekannteste Spiegelinterferometer ist das Michelson-Interferometer (siehe Abbildung 4.2). Dabei strahlt eine ausgedehnte Lichtquelle, welche z.B. auch eine Ga-

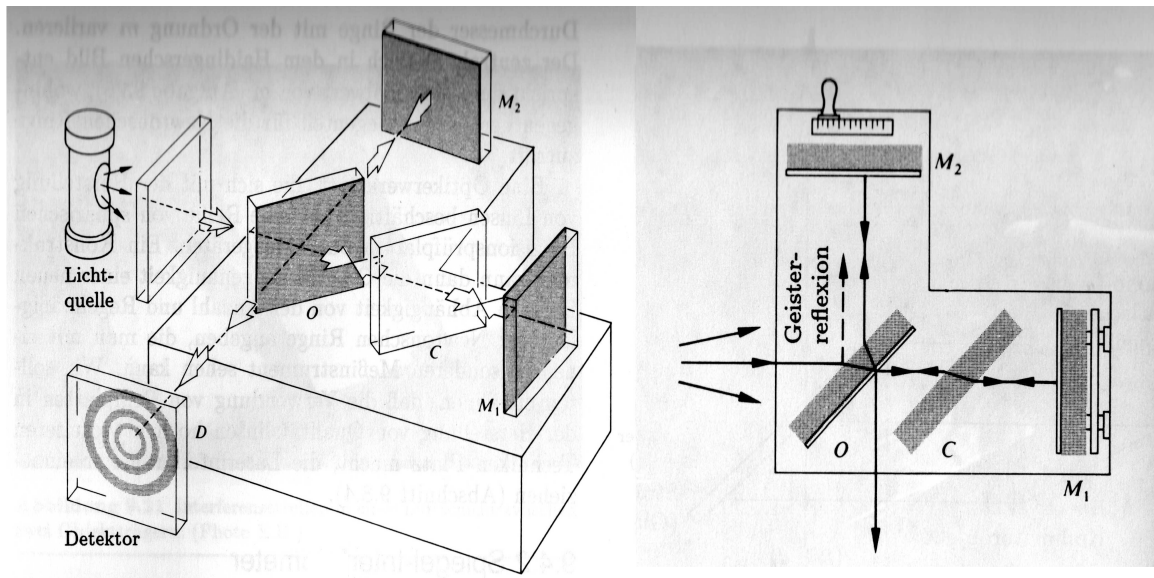


Abbildung 4.2.: Schematische Darstellung des Michelson-Interferometers. Aus [Hecht99] Seite 374.

sentladungslampe oder eine gleichmäßig emittierende Fläche sein kann, Lichtwellen aus. Diese werden durch einen Strahlteiler zu einem Teil in Richtung des Spiegels  $M_2$  reflektiert, während der andere Teil in Richtung des Spiegels  $M_1$  durchgelassen wird. Die beiden Teilwellen werden von den entsprechenden Spiegeln zum Strahlteiler zurückreflektiert, wobei die von  $M_1$  kommenden Wellen in Richtung auf den Detektor reflektiert und die von  $M_2$  kommenden Wellen auf den Detektor durchgelassen werden. Auf diese Weise werden die beiden Teilwellen zwischen dem Strahlteiler und dem Detektor überlagert, so dass Interferenzmuster erzeugt werden, die hier als Ringe ausgebildet sind. Aufgrund der Tatsache, dass die eine Teilwelle auf der Innenseite und die zweite Teilwelle auf der Außenseite des Strahlteilers reflektiert wird, ist leicht ersichtlich, dass ein Teilstrahl den Strahlteiler dreimal durchdringt, während der zweite Teilstrahl nur einmal den Strahlteiler durchläuft. Um eine optische Wegdifferenz zu erhalten, welche dem tatsächlichen, geometrischen Wegunterschied entspricht, muss folglich zwischen  $O$  und  $M_1$  eine Korrekturplatte  $C$  eingebaut werden. Diese Korrekturplatte muss genau die gleiche Dicke, die gleiche Neigung und die gleichen Materialeigenschaften aufweisen, wie der eingesetzte Strahlteiler. Auf diese

Weise kann das Interferometer sowohl mit quasimonochromatischen Lichtquellen als auch mit Lichtquellen größerer spektraler Bandbreite betrieben werden. Durch die Reflexionen der Teilstrahlen auf der Innen- bzw. Außenseite des Strahlteilers ergibt sich hier eine Phasenverschiebung um  $\pi$ , so dass sich als Bedingung für destruktive Interferenz ergibt

$$2d \cos \Theta_m = m\lambda. \quad (4.17)$$

Dabei ist  $d$  der tatsächliche Wegunterschied,  $\Theta_m$  der Radiuswinkel des  $m$ -ten Interferenzrings und  $m$  die Ordnung der Interferenz. Da hiermit Interferenzmuster erzeugt werden sollen, ist sofort klar, dass beide Terme dieser Gleichung kleiner als die Kohärenzlänge der verwendeten Lichtquelle sein müssen. Die entscheidende Frage für die experimentelle Anwendung des Michelson-Interferometers ist es, wie Veränderungen der tatsächlichen Wegdifferenz durch die Interferenzringe festgestellt werden. Bei Abnahme der Wegdifferenz  $d$  ziehen sich die Interferenzringe zum Zentrum des Schirms hin zusammen, wobei stets ein Ring verschwindet, wenn  $d$  um die halbe Wellenlänge reduziert wird. Bei  $d = 0$  ist der Interferenzring im Zentrum so weit ausgedehnt, dass er den gesamten Detektor bedeckt. Werden die Spiegel weiter gegeneinander verschoben, so erscheinen die Ringe wieder und laufen vom Zentrum nach außen.

Auf dieser Grundlage basiert auch die Möglichkeit, sehr genaue Längenmessungen mit dem Michelson-Interferometer durchzuführen. Dabei verschiebt sich die Position der einzelnen Interferenzstreifen jeweils an die Position der benachbarten Streifen, wenn der bewegliche Spiegel genau um die halbe Wellenlänge verschoben wird. Die Längenänderung  $\Delta d$  ergibt sich dann aus der Anzahl  $n$  der Interferenzstreifen, welche einen festgelegten Bezugspunkt passiert haben, zu:

$$\Delta d = n \left( \frac{\lambda}{2} \right).$$

Die Zählung der Interferenzstreifen kann dabei entweder mit Hilfe einer mikroskopischen Anordnung durch einen Beobachter oder durch elektronische Detektion durchgeführt werden. Mit diesem Verfahren konnte Michelson unter anderem die genaue Anzahl der Wellenlängen der roten Kadmiumlinie zu 3106327 bestimmen, welche im Standardmeterstab enthalten sind [Strong58].

Das bekannteste vor allem historisch interessante Experiment, dass mit dem Michelson-Interferometer durchgeführt wurde, ist das **Michelson-Morley-Experiment**. Mit diesem Experiment sollte festgestellt werden, ob der Äther, welcher ein Transportmedium für Licht darstellen sollte, im Raum ruht oder von großen Objekten (z.B. der Erde) mitgeführt wird. Bei einem stationären Äther könnte man auf der Erdoberfläche einen Ätherwind feststellen. Dies würde zu einer Abhängigkeit der gemessenen Lichtgeschwindigkeit von der Richtung dieses Ätherwindes führen.

Zur Durchführung des Experiments muss der nach rechts laufende Zweig  $OM_1$  des Interferometers parallel zur Erdgeschwindigkeit  $v$  ausgerichtet sein, so dass sich die

#### 4. Interferenz und Mikroskopie mit räumlich modulierter Anregung

---

folgende Argumentation ergibt: Ein nach rechts laufender Lichtstrahl bewegt sich in Bezug auf das bewegte Interferometer gegen den Ätherwind mit der Geschwindigkeit  $c - v$ , so dass für die Zeit zum Durchlaufen des Weges  $x_1$  von  $O$  nach  $M_1$  gilt:

$$t_1^a = \frac{x_1}{c - v}. \quad (4.18)$$

Für das Durchlaufen des Rückweges folgt damit:

$$t_1^b = \frac{x_1}{c + v}. \quad (4.19)$$

Damit ist die Gesamtzeit für Hin- und Rückweg gegeben zu:

$$t_1 = \frac{x_1}{c - v} + \frac{x_1}{c + v} = \frac{2x_1}{c} \beta^2, \quad (4.20)$$

wobei  $\beta = \frac{1}{\sqrt{1 - v^2/c^2}}$ . Die Gesamtzeit für den Hin- und Rückweg  $x_2$  zum zweiten Spiegel ist gegeben durch:

$$t_2 = \frac{2x_2}{c} \beta. \quad (4.21)$$

Der Laufzeitunterschied zwischen den beiden Wegen  $x_1$  und  $x_2$  ist damit für  $x_1 = x_2 = x$  beschrieben durch:

$$\Delta t = \frac{2x}{c} (\beta^2 - \beta) = \frac{x}{c} \left( \frac{v}{c} \right)^2. \quad (4.22)$$

Hier wurde die binomische Entwicklung für  $c \gg v$  verwendet.

Bei Verwendung von Licht einer Wellenlänge ist offensichtlich der Zeitunterschied  $\Delta t$  in beiden Wegen mit einer Veränderung der Anzahl der Wellenlängen verknüpft, welche in die Interferometerarme hineinpassen. Für eine festgelegte Wellenlänge  $\lambda$  ergibt sich für die Variation der Streifenzahl  $\Delta n = \frac{c}{\lambda} \Delta t$ . Wird das Interferometer im Rahmen dieses Experiments um jeweils  $90^\circ$  gedreht, so wird eine Zeitdifferenz von  $2\Delta t$  impliziert, welche dann mit Hilfe der Streifenverschiebung

$$\Delta n = \frac{2x}{\lambda} \left( \frac{v}{c} \right)^2 \quad (4.23)$$

gemessen werden kann. Unter der Annahme der Erdgeschwindigkeit von 30 km/s und einer Lichtwellenlänge von 550 nm ergibt sich eine Streifenverschiebung von  $\Delta n = 0,4$ . Diese Verschiebung könnte mit dem Michelson-Interferometer problemlos gemessen werden. Tatsächlich wurden diese Experimente über Monate hinweg durchgeführt, ohne dass jemals eine Verschiebung der Interferenzstreifen festgestellt wurde. Auf diese Weise wurde die Äthertheorie widerlegt und die spezielle Relativitätstheorie eingeführt bzw. untermauert.



### 4.2.2. Mach-Zehnder-Interferometer

Ein Mach-Zehnder-Interferometer ist in der Regel als rechteckiger Aufbau bzw. Parallelogramm aufgebaut und besteht im Wesentlichen aus zwei Strahlteilern und zwei totalreflektierenden Spiegeln. Auf diese Weise wird das von einer ausgedehnten Lichtquelle ausgesandte Licht von einem Strahlteiler in zwei Teilstrahlen aufgeteilt, welche auf unterschiedlichen Wegen über die Spiegel auf einen zweiten Strahlteiler geführt werden. Der zweite Strahlteiler kombiniert die beiden Teilstrahlen wieder und führt das Licht auf einen Detektor, mit dem die Interferenzerscheinungen festgestellt werden. Da die durchlaufenen geometrischen Lichtwege hier deutlich voneinander getrennt sind, ist die richtige Ausrichtung und Justage dieses Interferometers relativ anspruchsvoll. Diese spezielle und sehr empfindliche Anordnung begründet jedoch auch die große Anzahl von Anwendungsgebieten für das Mach-Zehnder-Interferometer.

Mach-Zehnder-Interferometer werden vorwiegend bei der Untersuchung optischer Eigenschaften verschiedener Materialien eingesetzt. Dabei ergibt sich eine optische Weglängendifferenz, wenn man Objekte in einen Strahlengang einbringt, so dass es zu Veränderungen der Interferenzmuster kommt. Im Allgemeinen können mit dieser Methode Dichteschwankungen in Gasströmungsbildern untersucht werden, wie sie zum Beispiel in Windkanälen entstehen.

Auch die im Rahmen dieser Arbeit untersuchte Mikroskopie mit räumlich modulierter Anregung beinhaltet als wesentlichen Bestandteil ein Interferometer, welches grundsätzlich auf der Mach-Zehnder-Anordnung basiert (siehe Abschnitt 4.4).

### 4.2.3. Sagnac-Interferometer

Bei einem Sagnac-Interferometer, für das es mehrere verschiedene geometrische Anordnungen gibt, durchlaufen die Lichtstrahlen zwei identische aber in entgegengesetzter Richtung verlaufende Wege, bevor die Strahlen zur Interferenz gebracht werden. Man kann hier auch von einer geschlossenen Wegschleife reden. Einerseits werden bei Einbringen von Objekten in den Strahlengang des Sagnac-Interferometers immer beide Strahlen beeinflusst, was die Anwendbarkeit in der Materialuntersuchung deutlich einschränkt. Andererseits kann mit Hilfe eines **rotierenden Sagnac-Interferometers** die Rotationsgeschwindigkeit eines Systems gemessen werden (*Gyroskop*). Wir gehen im Weiteren davon aus, dass das gesamte Interferometer um eine senkrechte Achse durch das Zentrum des Interferometers rotiert wird. Unter dieser Voraussetzung verkürzt sich durch die Rotation der Weg, der von einem der beiden Strahlen durchlaufen werden muss, während der Weg des zweiten Strahls verlängert wird. Die dadurch erzeugte Weglängendifferenz verursacht eine Verschiebung der Interferenzstreifen, die proportional zur Winkelgeschwindigkeit  $\omega$  der Rotationsbewegung ist. Eine genaue Betrachtung der Laufzeiten in Abhängigkeit von der Rotationsgeschwindigkeit, die im Wesentlichen analog zu den Ausführungen zum Michelson-Morley-Experiment (siehe Abschnitt 4.2.1) angestellt wird, ergibt für die

Verschiebung der Interferenzstreifen:

$$\Delta n = \frac{4A\omega}{c}. \quad (4.24)$$

Mit dieser Methode kann die Rotationsgeschwindigkeit der Erde gut bestimmt werden.

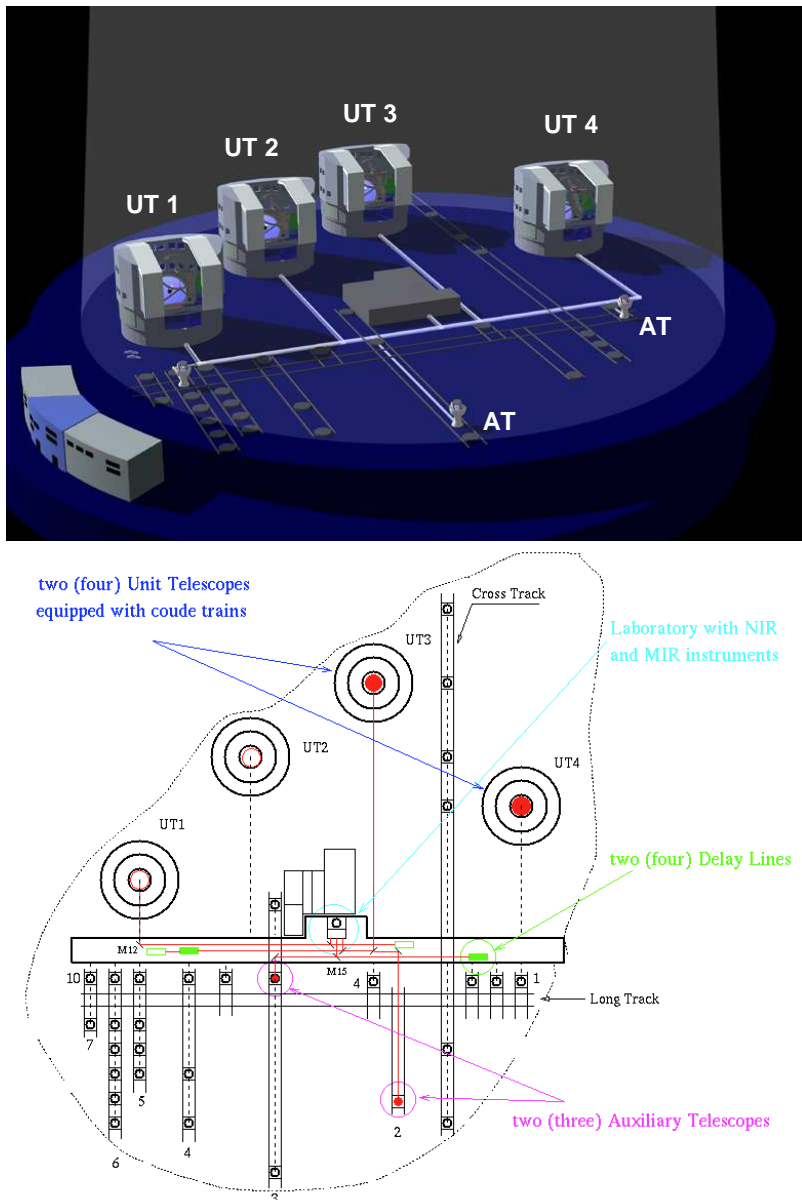
### 4.3. Sterninterferometrie

In der Astronomie werden die physikalischen Eigenschaften von Himmelskörpern und hier insbesondere der Sterne allein durch die Untersuchung der elektromagnetischen Strahlung, welche von diesen Objekten ausgesendet wird, festgestellt. Auf diese Weise erhält man zum Einen spektrale Informationen, welche Aufschluss über die chemische Zusammensetzung und die Temperatur des Sterns geben. Zum Anderen können aus den Sternspektren auch Informationen über deren Radialgeschwindigkeit, Sternwinde, Pulsation und evtl. vorhandene Magnetfelder gewonnen werden. Darüberhinaus ist man aber auch an der Messung des Durchmessers der Sterne und der Distanzen zwischen eng benachbarten Sternen interessiert.

Auf diesem Gebiet kommt die **Sterninterferometrie** zum Einsatz, mit der kleine Winkelgrößen von Himmelskörpern gemessen werden können [Glindemann03, VLTIWhitebook98]. Bei einem Sterninterferometer wird das Licht der Sterne, das aufgrund der großen Entfernung zur Quelle als parallel betrachtet werden kann, durch zwei oder mehr weit auseinanderstehende, bewegliche Spiegel  $M_1$  und  $M_2$  gesammelt. Diese Spiegel oder **Teleskope** sind meist selbst komplizierte optische Systeme, welche als Hauptkomponente einen Sammelspiegel mit Durchmessern von acht Metern und mehr aufweisen. Das Prinzip wird hier am Beispiel des Interferometers des *Very Large Telescope (VLT)* der europäischen Südsternwarte in Chile verdeutlicht, welches in Abbildung 4.3 gezeigt ist.

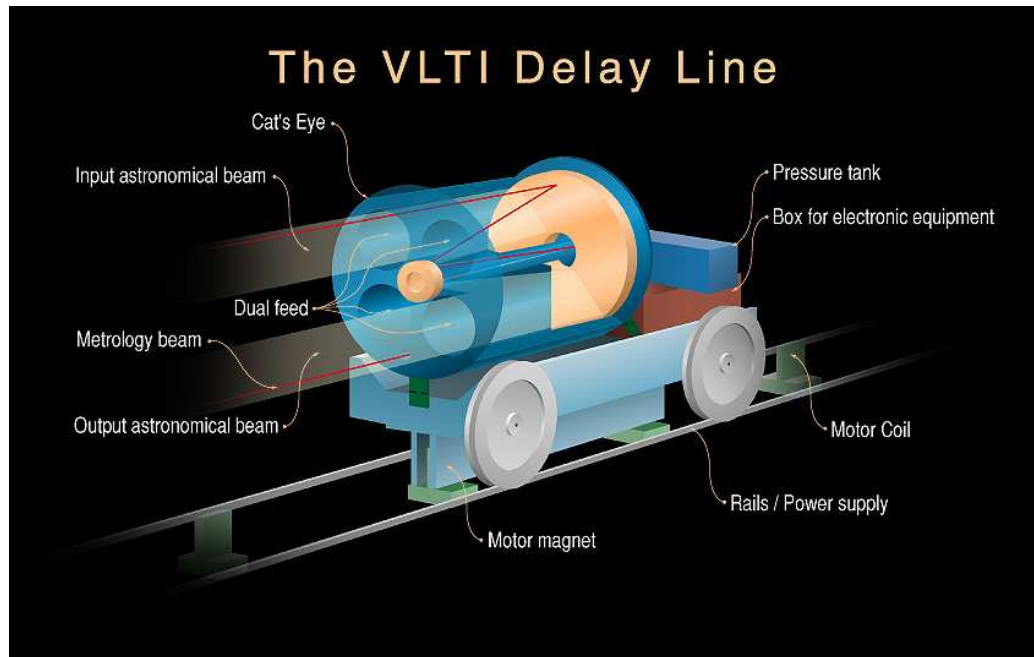
Nach dem Aufsammeln des Lichts durch die Teleskope wird das Licht mittels zweier Spiegel  $M_3$  und  $M_4$  auf die Blendenöffnungen  $B_1$  und  $B_2$  eines Detektors geführt. Damit die relative Differenz der Phasenwinkel zwischen den Signalen an den Eintrittsöffnungen des Detektors mit der an den Teleskopen übereinstimmt, müssen die optischen Wege  $M_1M_3B_1$  und  $M_2M_4B_2$  die gleiche Länge haben. Die Einstellung dieser Länge wird mittels spezieller Spiegelsysteme, den sogenannten „Catseyes“ (siehe Abbildung 4.4) vorgenommen.

Im Detektor erhält man damit ein Interferenzmuster, das prinzipiell dem des *Youngschen Doppelspalterexperimentes* entspricht. Wir betrachten zunächst ein „enges“ Doppelsternsystem bestehend aus zwei Sternen, deren Abstand bestimmt werden soll. Dazu wird das Sterninterferometer so ausgerichtet, dass einer der beiden Sterne auf der optischen Achse des Interferometers liegt (siehe Abbildung 4.5). Weiterhin wird angenommen, dass das von den Sternen emittierte Licht nur eine kleine Linienbreite



**Abbildung 4.3.:** Gesamtdarstellung der Teleskope des VLT. Dabei sind  $UT1$  bis  $UT4$  die „Unit“-Teleskope mit einem Spiegeldurchmesser von jeweils 8,20 m. Die beiden mit  $AT$  bezeichneten Teleskope sind „Hilfsteleskope“, die zur Durchführung der Interferometrie benötigt werden [VLTWhitebook98].

um eine mittlere Wellenlänge  $\bar{\lambda}$  aufweisen. Auf diese Weise ergibt sich aus den in Phase schwingenden Signalen an  $B_1$  und  $B_2$  ein Interferenzmuster aus hellen und dunklen Streifen mit einem axialen Punkt  $P_1$  auf der optischen Achse. Das Licht des zweiten Sterns tritt nun unter einem Winkel  $\Delta S$  in das Interferometer ein, so dass es



**Abbildung 4.4.:** Das „Catseye“ ist ein kleines, bewegliches Spiegelsystem zur Einstellung der optischen Weglängen [VLTWhitebook98].

zu einer Phasenverschiebung kommt, die im Wesentlichen von  $\Delta S$  und dem Abstand  $d$  der Teleskope  $M_1$  und  $M_2$  bestimmt ist. Das Interferenzmuster des zweiten Sterns ist damit um einen zweiten Punkt  $P_2$  zentriert, welcher gegen  $P_1$  um den Winkel  $\Delta S^*$  verschoben ist, wobei gilt

$$\frac{2\pi}{\lambda}d \cdot \Delta S = \frac{2\pi}{\lambda}a \cdot \Delta S^*.$$

Dabei ist  $a$  der Abstand zwischen den Blenden  $B_1$  und  $B_2$ . Die beiden Einzelsterne werden als inkohärente Punktquellen betrachtet, so dass sich deren Interferenzmuster in der Bildebene des Detektors einfach überdecken. Der Abstand der Streifen beider Interferenzmuster ist identisch und nur vom Abstand  $a$  der beiden Blenden abhängig. Die **Sichtbarkeit** des Streifensystems wird durch eine Variation des Abstands  $d$  der Teleskope  $M_1$  und  $M_2$  in der Weise verändert, dass sich bei einer Phasenverschiebung von  $\pi = 2\pi d \Delta S / \lambda$  die Maxima des einen Sterns mit den Minima des anderen Sterns überdecken und somit keine Interferenzstreifen mehr beobachtet werden können. Da dafür die Bedingung

$$d = \frac{\lambda}{2\Delta S}$$

erfüllt sein muss, kann der Winkelabstand  $\Delta S$  der beiden Sterne des Doppelsternsystems direkt aus dem Abstand  $d$  der Teleskope gemessen werden.

Grundsätzlich ist es damit auch möglich, den Winkeldurchmesser  $\Delta S_D$  einzelner

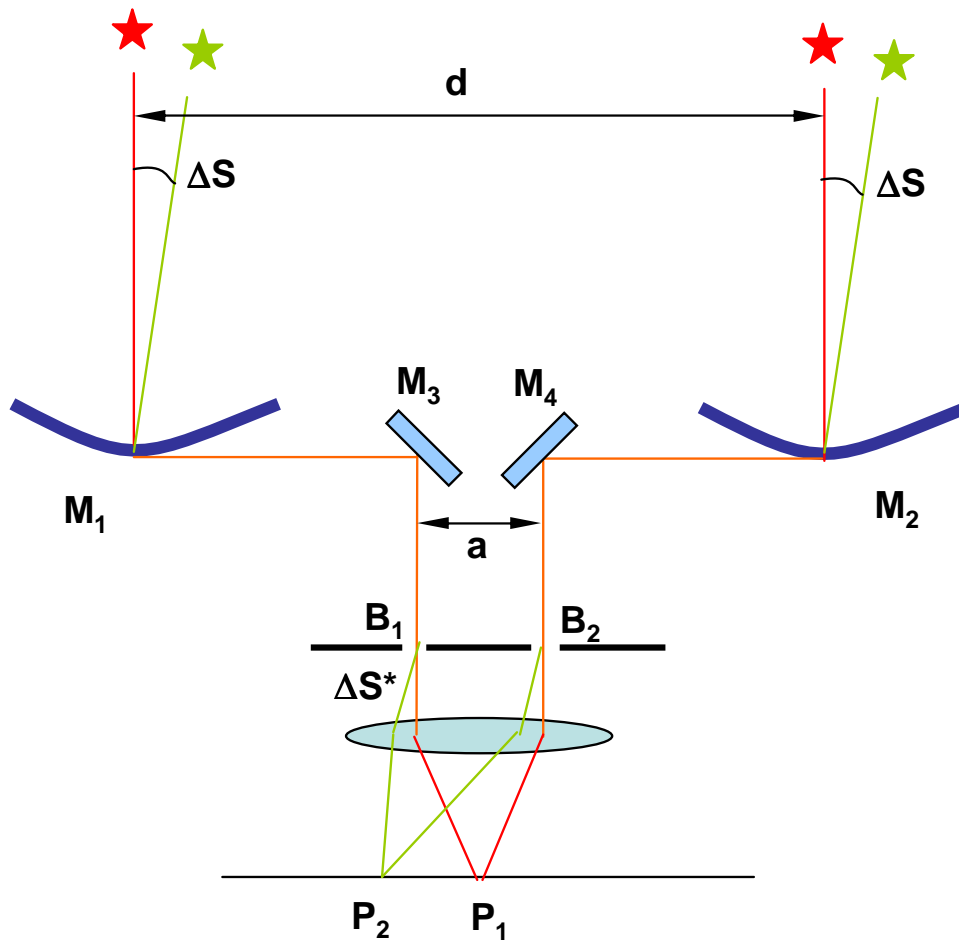


Abbildung 4.5.: Prinzip der Messung kleiner Winkelgrößen durch Sterninterferometrie.

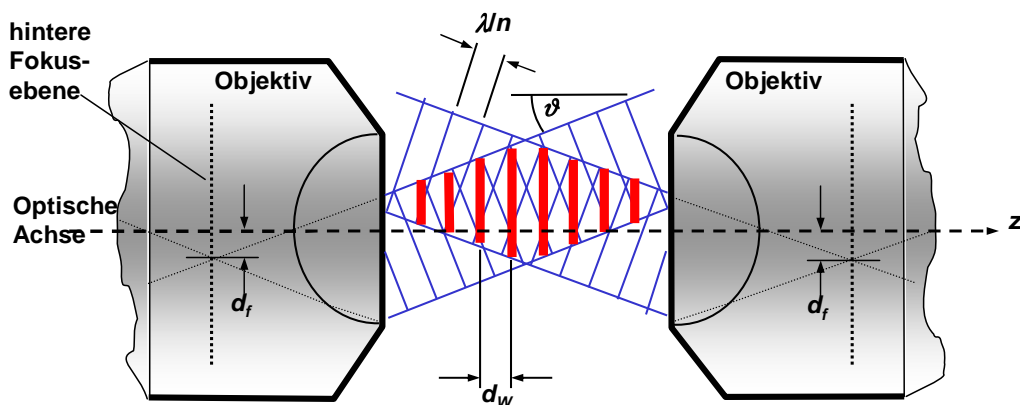
Sterne zu messen. Zu diesem Zweck betrachtet man den Stern als scheibenförmige Verteilung inkohärenter Lichtquellen, für welche die Punktbildfunktion als Besselfunktion erster Ordnung beschrieben wird (siehe Kapitel 2, Gleichung (2.20)). Die Interferenzstreifen zweier Punkte auf der Oberfläche des Sterns verschwinden folglich, wenn das Maximum der einen Punktbildfunktion und das erste Minimum der zweiten Punktbildfunktion übereinanderliegen. Das passiert genau dann, wenn die Bedingung  $\pi d \Delta S / \bar{\lambda} = 3,83$  und damit

$$d = 1,22 \frac{\bar{\lambda}}{\Delta S}$$

erfüllt ist. Daraus ergibt sich, dass der Winkeldurchmesser des Sterns ebenfalls einfach aus der Messung des Abstands der Teleskope gemessen werden kann.

## 4.4. SMI-Mikroskopie

In diesem Abschnitt erfolgt nun eine detaillierte konzeptionelle Darstellung der Mikroskopie mit räumlich modulierter Anregung. Diese Anregung wird dadurch erzeugt, dass man zwei Laserstrahlen im Objektbereich des Mikroskops interferieren lässt. Um die dazu erforderlichen parallelen Strahlen im Objektbereich zu erhalten, werden zwei durch ein Interferometer gegeneinanderlaufende Laserstrahlen in die hintere Fokusebene zweier direkt gegenüberliegender Objektive einfokussiert (siehe Abbildung 4.6). Unter der Voraussetzung, dass beide Laserstrahlen in einer Ebene liegen und der Abstand  $d_f$  der Fokuspunkte zur optischen Achse gleich ist, ergibt sich eine **stehende Lichtwelle**, deren Ebenen maximaler Intensität (**Wellenfronten**) stets senkrecht auf der optischen Achse des Mikroskops stehen. Diese Anregungsmethode wird auch häufig als *Stehwellenfeld* bezeichnet und in der „Stehwellen-Mikroskopie“ (engl. *Standing-Wave Fluorescence Microscopy*) [Bailey93, Lanni86a, Lanni86b] angewendet. Der Objektträger ist bei diesem Mikroskopieverfahren senkrecht zur optischen Achse und zwischen den beiden horizontal eingebauten Objektiven eingebracht, deren gegenseitiger Abstand bei etwa 2-3 Millimetern liegt.



**Abbildung 4.6.:** Prinzip der Anregung im SMI-Mikroskop. Zwei kohärente Laserstrahlen werden in die hinteren Fokusebenen zweier gegenüberstehender Objektive einfokussiert, wodurch sich zwischen den Objektiven ein stehendes Wellenfeld ausbildet (nach [Albrecht02a]).

Eine genaue Herleitung der Intensitätsverteilung entlang der optischen Achse folgt aus der Betrachtung der Überlagerung zweier gegenläufiger elektromagnetischer Wellen vorgenommen. Dabei ist eine nach links laufende Welle gegeben durch

$$E_l = E_0 \cos(\vec{k} \cdot \vec{r} + \omega t).$$

Eine nach rechts laufende Welle wird demnach durch

$$E_r = E_0 \cos(\vec{k} \cdot \vec{r} - \omega t)$$

dargestellt. Verläuft der Wellenvektor  $\vec{k}$  nicht parallel zur Richtung  $\vec{z}$  der optischen Achse, so ergibt sich unter der Voraussetzung  $k \parallel \vec{r}$  für den Betrag der Ausbreitungsrichtung  $\vec{r}$  unter Verwendung einfacher Winkelbetrachtungen  $r = z/\cos\vartheta$ . Damit werden die beiden Ausdrücke zu

$$E_l = E_0 \cos\left(k \frac{z}{\cos\vartheta} + \omega t\right)$$

und

$$E_r = E_0 \cos\left(k \frac{z}{\cos\vartheta} - \omega t\right).$$

Die beiden Wellen werden nun durch Addition der einzelnen Wellen überlagert, und man erhält durch Anwendung des Additionstheorems  $\cos x + \cos y = 2 \cos \frac{x+y}{2} \cos \frac{x-y}{2}$  für die zusammengesetzte Welle

$$E = 2E_0 \cos k \frac{z}{\cos\vartheta} \cos \omega t. \quad (4.25)$$

Da im Weiteren Intensitäten betrachtet werden sollen, muss Gleichung (4.25) noch quadriert werden. Auf diese Weise ergibt sich für die Intensität entlang der optischen Achse

$$I(z) = I_0 \cos^2\left(\frac{kz}{\cos\vartheta} + \frac{d\phi}{2}\right). \quad (4.26)$$

Dieser Ausdruck vereinfacht sich weiter, wenn man  $k_z = k \cos\vartheta$  einsetzt. Berücksichtigt man darüberhinaus, dass sich zwischen den Objektiven ein Medium mit dem Brechungsindex  $n$  befindet, so ist  $k_z = 2n\pi \cos\vartheta/\lambda$ . Ein Intensitätsmaximum im Wellenfeld ergibt sich also immer dann, wenn  $k_z$  ein ganzzahliges Vielfaches von  $\pi$  ist, so dass sich für den Abstand  $d_w$  der Wellenfronten

$$d_w = \frac{\lambda}{2n \cos\vartheta} \quad (4.27)$$

ergibt. Unter Verwendung dieses Zusammenhanges kann der Wellenfrontabstand  $d_w$  entweder durch eine Veränderung des Brechungsindex  $n$  oder des relativen Neigungswinkels  $\vartheta$  beeinflusst werden. Dabei wird der Brechungsindex im Objektbereich von Objektträger, Einbettungsmedium und Immersionsflüssigkeit bestimmt, während der Winkel  $\vartheta$  durch den Abstand  $d_f$  der Fokuspunkte von der optischen Achse über  $\sin\vartheta \approx d_f/f_{\text{objektiv}}$  festgelegt wird. Bei dem in dieser Arbeit vorgestellten SMI-Mikroskop ergibt sich bei einer Laserwellenlänge von 458 nm ein theoretischer Wellenfrontabstand von  $d_w = 152$  nm. Die gemessenen effektiven Anregungswellenlängen können jedoch bei entsprechender Veränderung der Brechungsindizes im Objektbereich bzw. des Winkels zwischen den interferierenden Teilstrahlen deutlich von diesem Wert abweichen.

Die im Rahmen der räumlich modulierten Anregung auftretenden Ebenen gleicher Intensität sind dabei nicht vollständig eben. Aufgrund kleinerer Abweichungen bei

der Planarität der Spiegel oder wegen Aberrationen der Objektivlinsen kommt es zu **Wellenfrontverzerrungen**. Für einen SMI-Mikroskopaufbau unter Verwendung einer Anregungswellenlänge von  $\lambda = 488 \text{ nm}$  wurden in einer lateralen Objektregion der Fläche  $2,5 \mu\text{m} \cdot 2,5 \mu\text{m}$  mittlere Verzerrungen von  $\lambda/109$  gemessen, wobei die maximale Wellenfrontverzerrung bei  $\lambda/30$  und innerhalb biologischer Proben sogar bei bis zu  $\lambda/12$  lag [Schneider99, Schneider00].

Insgesamt kann die Intensitätsverteilung im Objektraum jedoch als unabhängig von der exakten lateralen Position betrachtet werden, da das vom Detektor (hier: CCD-Kamera) detektierte Gesichtsfeld in der Regel deutlich kleiner als der ausgeleuchtete Objektbereich ist. Das soll eine kleine Abschätzung näher verdeutlichen: Die Breite  $B_s$  des Stehwellenfeldes hängt von der Brennweite der Objektivlinse  $f_o$  und der Einfokussierlinse  $f_e$  ab. Darüberhinaus muss noch der  $1/e^2$ -Durchmesser des Laserstrahls  $B_l$  berücksichtigt werden, und es gilt  $B_s = B_l \cdot f_o/f_e$  für parallele Strahlen. In den in dieser Arbeit beschriebenen Experimenten beträgt der Strahldurchmesser  $B_l \approx 10 \text{ mm}$ . Die Brennweiten sind  $f_o \approx 1,5 \text{ mm}$  und  $f_e = 80 \text{ mm}$ , womit sich für die Breite des Stehwellenfeldes ein Wert von  $\approx 190 \mu\text{m}$  ergibt. Da jedoch mit der CCD-Kamera nur ein Gesichtsfeld von einigen  $10 \mu\text{m}$  Breite detektiert werden kann, ist der tatsächlich ausgeleuchtete Bereich etwa 5-10 mal größer.

#### 4.4.1. Punktbildfunktion

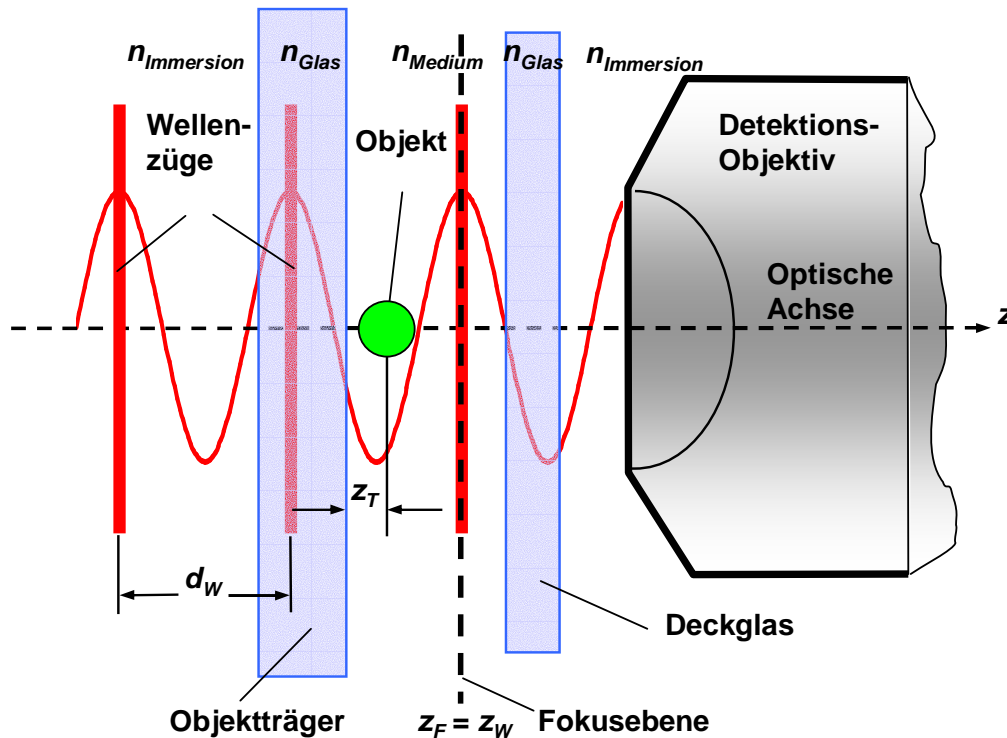
Die Punktbildfunktion (PSF) jedes abbildenden Systems und damit auch des hier beschriebenen Mikroskops entspricht dem Produkt der Punktbildfunktionen von Anregungs- und Detektionssystem. Die Anregungs-PSF entspricht im SMI-Mikroskop gerade der Intensitätsverteilung des Anregungslichts in axialer Richtung, wie sie in Gleichung (4.26) beschrieben ist. Die Punktbildfunktion  $h$  des SMI-Mikroskops in axialer Richtung entspricht folglich dem Produkt von Gleichung (4.26) und Gleichung (2.22) aus Abschnitt 2.2.2, welche die Detektions-PSF von konventionellen Mikroskopen beschreibt, und es ergibt sich

$$h_{r=0}(z) = h_0 \cos^2 \left( k_z(z - z_f) + \frac{d\phi}{2} \right) \cdot \text{sinc}^2 \left( \frac{1}{4} q(z - z_f) \right). \quad (4.28)$$

Dabei ist  $k_z$  die bereits oben definierte Wellenzahl und  $q(z)$  die verallgemeinerte optische Koordinate aus Gleichung (2.23). Die Funktion  $\text{sin}(z)/z$  wird im Weiteren als  $\text{sinc}(z)$  bezeichnet. Wie aus Gleichung (4.28) zu entnehmen, wird die Punktbildfunktion, welche die Abbildung eines Objekts in der axialen Koordinate  $z$  beschreibt, im Wesentlichen durch Anregungswellenlänge  $\lambda$ , die numerische Apertur  $NA$  der Objektivlinse, den Brechungsindex  $n$ , die Phasenverschiebung  $d\phi$  der Laserstrahlen und den Winkel  $\vartheta$  bestimmt. Unter der Voraussetzung, dass der Brechungsindex im gesamten Objektraum identisch ist, ergibt sich ein von der genauen Objektposition bezüglich des Objektträgers unabhängiger Verlauf der SMI-Punktbildfunktion. Die Phasenver-



schiebung der Laserstrahlen wird in der Regel so eingestellt, dass sich bei  $z = z_f = z_w$  ein Maximum des Wellenfeldes befindet.



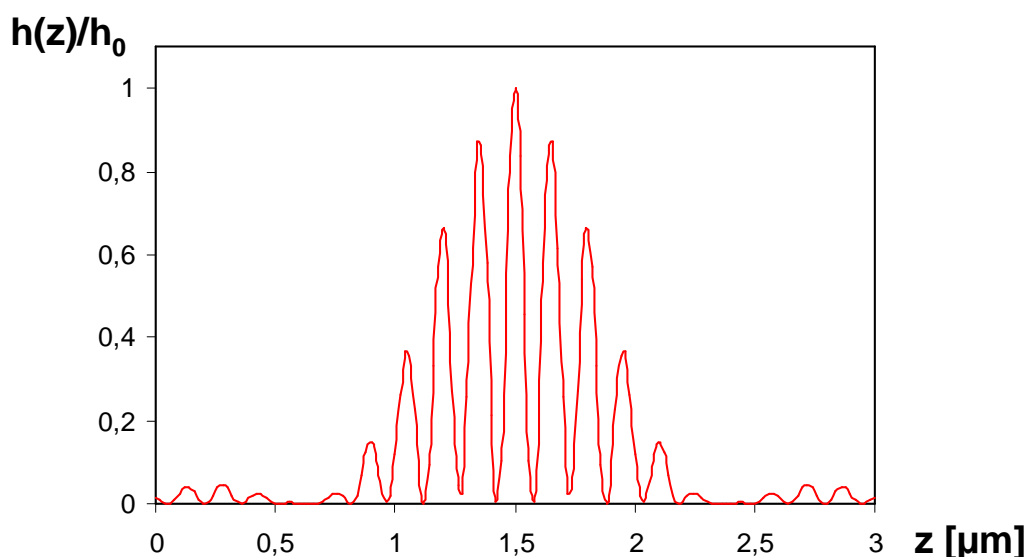
**Abbildung 4.7.:** Detektionsprinzip des SMI-Mikroskops. Die PSF wird durch Verschieben des Objekts in axialer Richtung durch das ortsfeste Wellenfeld erhalten. Unter der Voraussetzung, dass alle auftretenden Brechungsindizes gleich sind erhält man bei einem Maximum in der Fokusebene  $z_f = z_w$  einen Intensitätsverlauf nach Abbildung 4.8 [Albrecht02a].

Die Bereitstellung der Bilddaten kann mit dem SMI-Mikroskop grundsätzlich durch zwei verschiedene Ansätze vorgenommen werden. Bei der ersten Messmethode, die im Rahmen dieser Arbeit sehr häufig angewendet wird, muss der Objektträger in Richtung der optischen Achse verschoben und an jeweils äquidistanten Positionen ein zweidimensionales Bild aufgenommen werden (**Objekt-Rasterung, Optical Sectioning**). Dabei ist die exakte Position der einzelnen Objekte durch die Objektträgerposition  $z_{ot}$  und den Abstand  $z_t$  der Objekte von der Objektträgeroberfläche über  $z = z_{ot} + z_t$  bestimmt. Da für dieses Aufnahmeverfahren das Abtasttheorem für jeden Wellenzug der axialen Intensitätsverteilung erfüllt sein muss, ergibt sich eine maximale Schrittweite von  $< 100$  nm bei einem mittleren Wellenfrontabstand von 200 nm. Diese Bedingung wird mit der experimentell realisierten Schrittweite von 20 nm gut erfüllt. Nach der Messung werden die 300 bis 400 einzelnen zwei-

dimensionalen Bilder zu einem dreidimensionalen **Bildstapel** zusammengefügt, aus welchem mit Hilfe geeigneter Bildverarbeitungsalgorithmen die axiale Intensitätsverteilung eines Objekts rekonstruiert wird. Die auf diese Weise erhaltenen Bilddaten werden durch Gleichung (4.28) in der folgenden Form beschrieben:

$$h_{r=0}(z) = h_0 \cos^2(k_z(z - z_0) + \delta) \cdot \text{sinc}^2\left(\frac{1}{4}q(z - z^*)\right). \quad (4.29)$$

Dabei wird  $z$  hier beschrieben durch eine diskrete Anzahl  $i$  von Verschiebungen um die Schrittweite  $dz$  und es gilt  $z = i \cdot dz$ . Die dabei erhaltene Funktion enthält mehrere Wellenzüge unterschiedlicher Intensität. Der gegenseitige Abstand der Wellenfronten wird dabei durch Winkel  $\vartheta$  zwischen den Laserstrahlen bestimmt.  $z_0$  gibt hier die Position des Maximums einer Wellenfront an, während das Maximum der Hüllkurve (*Epifluoreszenzkurve*) durch  $z^*$  festgelegt wird. Eine konstante Phase wird durch  $\delta$  eingeführt.



**Abbildung 4.8.:** Axialer Intensitätsverlauf im SMI-Mikroskop berechnet aus Gleichung (4.29) unter Berücksichtigung experimentell sinnvoller Werte  $n = 1,5$ ,  $\lambda = 458 \text{ nm}$ ,  $NA = 1,25$ , und  $\vartheta = 0$ . Weiterhin ist  $z_0 = z^* = 1,5 \mu\text{m}$  und  $\delta = 0$ .

Die zweite Messmethode, die mit dem SMI-Mikroskop angewendet wird, ist die **Phasen-Rasterung**. In diesem Falle bleiben sowohl Objektträger als auch Objekt ortsfest, während die Phase  $d\phi$  des Wellenfeldes variiert wird. Das wird durch Verschiebung eines Interferometerspiegels mit einer festgelegten Schrittweite erreicht. Die einzelnen Bilder werden hier folglich bei verschiedenen Phasendifferenzen  $d\phi$  aufgenommen, so dass sich eine Intensitätsverteilung in  $\cos^2$ -Form ergibt. Für diese Mes-

sungen ist es sinnvoll, die Objekte vor der Messung in die Fokusebene des Objektivs zu bringen, um ein möglichst gutes Signal-zu-Rausch-Verhältnis zu erreichen.

#### 4.4.2. Auswertung der Bilddaten

In diesem Abschnitt werden die Methoden näher beschrieben, mit denen die aus den Messungen erhaltenen Bilddaten untersucht werden. Dabei geht es vor allem darum, Distanzen kleiner fluoreszierender Objekte zu messen und Aussagen über deren axiale Ausdehnung zu machen. Allgemein ist hier zu beachten, dass sich alle Aussagen bezüglich Distanzen und Größen der Objekte ausschließlich auf die Fluoreszenzfarbstoffverteilungen beziehen.

Der erste Schritt bei der Verarbeitung der Bilddaten ist die manuelle Auswahl geeigneter Objekte aus den Datensätzen. Dabei werden bevorzugt kleine isolierte, gut identifizierbare Objekte ausgewählt, welche eine hohe Fluoreszenzintensität bei gutem Signal-zu-Rausch-Verhältnis aufweisen. Darüberhinaus wird die in axialer Richtung ebenfalls häufig modulierende Hintergrundintensität dadurch minimiert, dass alle Intensitätswerte unterhalb eines vorher festgelegten Schwellwerts abgezogen werden, der in der Regel auf etwa 20% des Intensitätsmaximums gesetzt wird. Auf diese Weise werden Modulationen in den Randbereichen der axialen Intensitätsverteilung deutlich reduziert, so dass die experimentell erhaltenen Verteilungen besser mit dem zu erwartenden Verlauf der aus theoretischen Überlegungen folgenden Punktbildfunktion übereinstimmen.

Die axiale Intensitätsverteilung eines Objekts, welche im Gegensatz zur lateralen PSF aus den Aufnahmen vieler Einzelbilder erhalten wird, ergibt sich aus dem dreidimensionalen Datensatz durch Aufsummieren der Pixel der lateralen zweidimensionalen Bilder in einer  $3 \times 3$ - bzw.  $5 \times 5$ -Pixel großen  $(x, y)$ -Umgebung um das Objekt. Durch dieses Vorgehen wird die Anzahl der für jedes Objekt berücksichtigten Photonen deutlich erhöht, was zu einem besseren Signal-zu-Rausch-Verhältnis beiträgt. Dieser Vorteil kann aber nur genutzt werden, wenn die  $(x, y)$ -Umgebung nicht zu groß gewählt wird, da anderenfalls gegen das Abtasttheorem verstoßen wird und es dadurch zu unerwünschten Artefakten kommen kann. Für die weiteren Betrachtungen muss klargestellt werden, dass die axiale Intensitätsverteilung, die in der Regel durch Anpassung einer Funktion nach Gleichung (4.29) dargestellt wird, teilweise erheblich von der theoretischen Punktbildfunktion abweicht. Ein Grund dafür ist, dass die bei den Messungen untersuchten Objekte nicht als punktförmig angenommen werden können.

#### 4.4.3. Distanzmessung

Die Lokalisation und die Messung von Distanzen in der Objekt- bzw. Bildebene (laterale Richtung) erfolgt mit dem SMI-Mikroskop analog zu konventionellen Mikroskopen, da sich die Abbildungseigenschaften diesbezüglich nicht unterscheiden.

Zur Bestimmung der Lokalisationsgenauigkeit in axialer Richtung erfolgt zunächst eine Abschätzung der Größenordnungen auch unter Berücksichtigung der für die SMI-Mikroskopie erhaltenen PSF und der darin enthaltenen zusätzlichen Phaseninformation. Die Lokalisation der Objekte wird dabei durchgeführt, indem an die erhaltene axiale Intensitätsverteilung die Funktion aus Gleichung (4.29) angepasst wird. Dabei ergibt sich die Objektposition aus dem Maximum  $z^*$  der Detektions-PSF also der Hüllkurve. In diesem Fall wird die Genauigkeit nach [Schneider99] durch die Halbwertsbreite  $FWHM$  der Hüllkurve bestimmt, so dass analog zu Gleichung (3.15) auf Seite 32 gilt

$$\Delta z^* \approx \frac{1}{\sqrt{8 \ln 2}} \frac{FWHM}{\sqrt{N}}. \quad (4.30)$$

Dabei ist  $N$  die detektierte Photonenzahl. Auf diese Weise lässt sich also keine Verbesserung der Lokalisationsgenauigkeit gegenüber einer Anregung mit konstanter Intensität erreichen.

Die räumlich modulierte Anregung macht jedoch Sinn, wenn bei der Auswertung auch die einzelnen Wellenzüge berücksichtigt und die daraus erhaltene Phaseninformation mitverwendet wird. Unter dieser Voraussetzung zerlegt man die erhaltenen Kurven in  $x$  Wellenzüge gleicher Intensität, wobei  $x$  zwischen 5 und 9 liegt. Bei gleicher Gesamtphotonenzahl enthält jeder Wellenzug  $N/x$  Photonen bei gleichzeitig deutlich kleinerer Halbwertsbreite, die im Vergleich zur Halbwertsbreite der Hüllkurve um etwa  $1/x$  kleiner ist. Unter der Voraussetzung, dass alle Wellenzüge einzeln lokalisiert werden, kann der statistische Fehler des Mittelwerts  $z_0$  aus  $x$  Einzellokalisationen abgeschätzt werden, was den Gesamtfehler wiederum um etwa  $1/\sqrt{x}$  verringert. Um diese Einzellokalisationen durchzuführen, müssen die Wellenfronten jeweils um den Wellenfrontenabstand  $d_W$  an die Stelle des mittleren Wellenzugs verschoben werden. Berücksichtigt man diese Feststellungen in Gleichung (4.30) so ergibt sich

$$\Delta z_0 \approx \frac{1}{\sqrt{8 \ln 2}} \frac{1}{\sqrt{x}} \frac{FWHM/x}{\sqrt{N/x}} = \frac{1}{x} \Delta z^*. \quad (4.31)$$

Hieraus ist zu ersehen, dass die Lokalisationsgenauigkeit unter Einbeziehung der  $x$  Wellenzüge um den Faktor  $1/x$  besser ist als bei der Bestimmung über die Hüllkurve. Insgesamt ist es günstig, möglichst viele Wellenfronten einzubeziehen, was unter anderem durch Verwendung kürzerer Anregungswellenlängen bei größeren Stokes-Verschiebungen erreicht werden kann.

Die aus der Betrachtung der einzelnen Wellenzüge ebenfalls zugängliche Phaseninformation wird verwendet, um die axiale Distanz zweier gleichzeitig gemessener Objekte an den Positionen  $z_1$  und  $z_2$  zu bestimmen. Dabei ergeben sich die Phasen  $\Phi_1$  und  $\Phi_2$  für die beiden Objekte aus der axialen Punktbildfunktion (siehe Gleichung (4.28)) zu

$$\Phi_1 = k_{z1}(z_1 - z_f) + \frac{d\phi_1}{2} \quad (4.32)$$

sowie

$$\Phi_2 = k_{z2}(z_2 - z_f) + \frac{d\phi_2}{2}. \quad (4.33)$$

Unter der Annahme, dass diese Objekte in einer Aufnahme unter gleichen Bedingungen im selben Wellenfeld aufgenommen werden, gilt  $k_{z1} = k_{z2} = k_z$  und  $d\phi_1 = d\phi_2$  und man erhält nach Bildung der Differenz von Gleichung (4.32) und (4.33) die Objektdistanz aus

$$z_2 - z_1 = \frac{1}{k_z}(\Phi_2 - \Phi_1). \quad (4.34)$$

Für die experimentellen Daten muss die Funktion (4.29) an die axiale Intensitätsverteilung der einzelnen Objekte angepasst werden, und man erhält ganz analog den Ausdruck

$$z_{02} - z_{01} = \frac{1}{k_z}(\Phi_1 - \Phi_2). \quad (4.35)$$

Werden die beiden Gleichungen (4.34) und (4.35) kombiniert, so ergibt sich, dass die gemessene **Wellenfrontdistanz** und die **Objektdistanz**  $dz_0$  gleich sind, und man erhält

$$dz_0 = z_{02} - z_{01} = z_1 - z_2. \quad (4.36)$$

Bei diesem einfachen Zusammenhang ist jedoch zu berücksichtigen, dass die Phasen nicht eindeutig bestimmt werden können, da aufgrund der Periodizität der  $\cos^2$ -Funktion auch Distanzen vorkommen, welche durch Addition bzw. Subtraktion ganzzahliger Vielfacher des Wellenfrontenabstands  $d_W$  zu  $dz_0$  erhalten werden, so dass gilt

$$dz = dz_0 + nd_W. \quad (4.37)$$

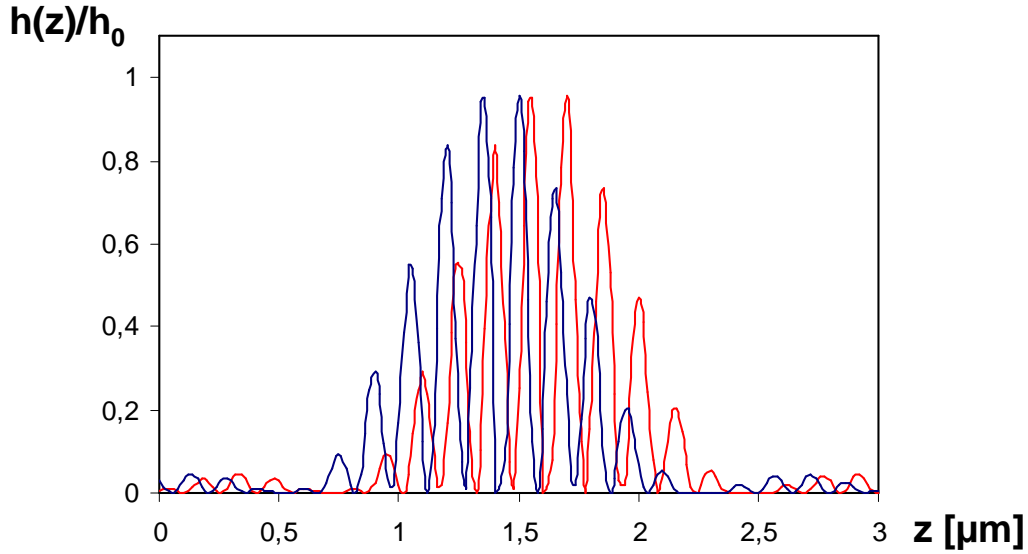
Berücksichtigt man nun die Differenz der Maxima der Hüllkurve  $dz^* = z_1^* - z_2^*$  und wählt ein ganzzahliges  $n$ , so dass die Bedingung  $|dz - dz^*| \leq d_W$  erfüllt ist, so erhält man ein eindeutiges Ergebnis für die Distanzmessung.

Eine kurze Betrachtung der bei der Distanzmessung zu berücksichtigen Fehler zeigt, dass jede gemessene Position  $z_{01}$  und  $z_{02}$  mit einem Fehler entsprechend Gleichung (4.31) versehen ist. Auf diese Weise ergibt sich für den Fehler von  $dz_0$  in guter Näherung folgender Zusammenhang:

$$\Delta dz^* = \frac{1}{x} \Delta dz^*, \quad (4.38)$$

wobei der Fehler der Distanz der Hüllkurven durch  $\Delta dz^*$  beschrieben wird. Dieser Zusammenhang ist auch der Grund dafür, dass der Fehler  $\Delta dz^*$  stets deutlich kleiner als der halbe Wellenfrontabstand sein muss, um ein eindeutiges Ergebnis der Distanzmessung zu erhalten.

In der Regel müssen die zu Lokalisation und Distanzmessung benötigten Parameter aus der Anpassung einer geeigneten Funktion an die axiale Intensitätsverteilung erhalten werden. Dabei weichen die tatsächlich verwendeten Funktionen teilweise



**Abbildung 4.9.:** Axiale Punktbildfunktionen zweier verschiedener Objekte gleicher spektraler Signatur, die sich in ihrer Position unterscheiden. Dabei ist  $z_{01} = 1,6 \mu\text{m}$  und  $z_{02} = 1,4 \mu\text{m}$ . Darüberhinaus wurde  $z_{01} - z_1^* = z_{02} - z_2^* = 50 \text{ nm}$  gesetzt, während alle anderen Parameter mit denen aus Abbildung 4.8 übereinstimmen.

deutlich von Gleichung (4.29) ab, da hier auch Aberrationen, Brechungsindexvariationen und andere Effekte in der Mikroumgebung der Objekte zu berücksichtigen sind. Aus diesem Grunde ist die Halbwertsbreite der Hüllkurve bei den gemessenen Daten durch die bei realen Verhältnissen reduzierte optische Auflösung meistens verbreitert und muss folglich durch zusätzliche Parameter beschrieben werden. Obwohl die gemessenen Objekte üblicherweise eine Größe deutlich kleiner als die Anregungswellenlänge aufweisen, können diese nicht als punktförmig angesehen werden. Daraus folgt eine Redzierung der Amplitude der Modulation, die ebenfalls durch zusätzliche Parameter erfasst werden muss. Weitere Parameter werden erforderlich, wenn die gemessene Verteilung starke Asymmetrien oder andere Verzerrungen aufweist. Für die in dieser Arbeit vorgestellten Messungen wird in der Regel eine Anpassungsfunktion verwendet, welche in folgender Weise definiert ist:

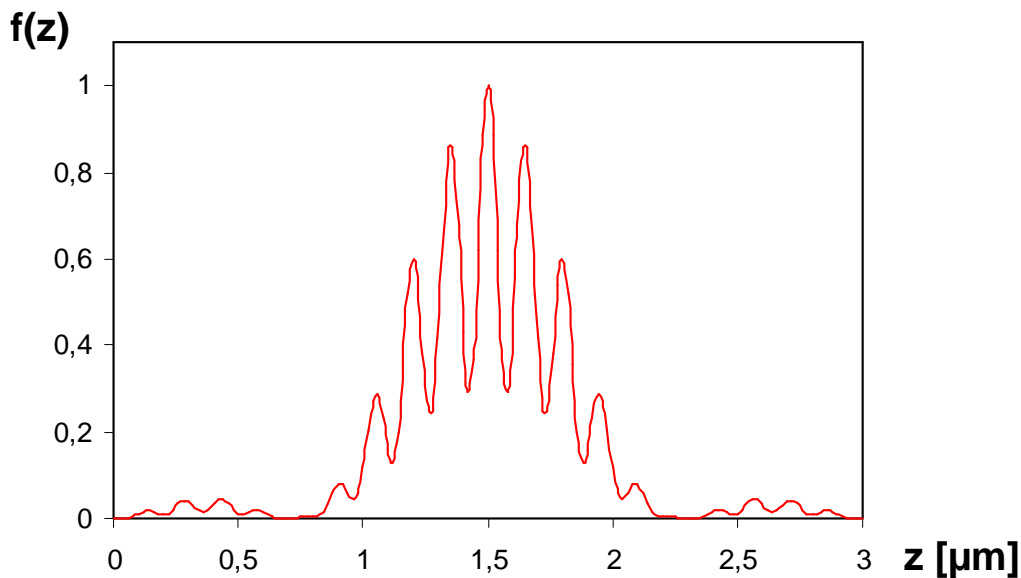
$$f(z) = A \operatorname{sinc}^2\left(\frac{z - z_1}{B}\right) \cdot \cos^2\left(\frac{z - z_2}{C}\right) + D \operatorname{sinc}^2\left(\frac{z - z_3}{E}\right) + F. \quad (4.39)$$

In dieser Anpassungsfunktion werden insgesamt neun Parameter zur Beschreibung der gemessenen Kurven verwendet. In diesem Zusammenhang beschreiben  $A$  und  $D$  die maximale Amplitude der Modulation bzw. die Amplitude der „unteren“ Hüllkurve. Über das Verhältnis von  $A$  und  $D$  wird der „Modulationskontrast“ bestimmt, der von der axialen Ausdehnung der betrachteten Objekte abhängt. Die Parameter  $B$  und  $z_1$  beziehen sich auf die Breite und die Position der oberen Hüllkurve. Die

wesentlichen Informationen über die Phase und den Wellenfrontenabstand werden durch die Position der Wellenzüge  $z_2$  und den Parameter  $C$  definiert durch

$$C = \frac{\lambda}{2\pi n \cdot dz} \quad (4.40)$$

gegeben, wobei  $dz$  die Schrittweite in Richtung der optischen Achse angibt. Die Parameter  $E$  und  $z_3$  beschreiben die Breite und die Position des Maximums der „unteren“ Hüllkurve.  $F$  ist ein freier Parameter, mit dem vorwiegend die Intensität des Hintergrunds berücksichtigt wird. Eine Beispielkurve ist in Abbildung 4.10 dargestellt.



**Abbildung 4.10.:** Verlauf der nach Gleichung (4.39) berechneten Anpassungsfunktion. Dabei wurde für  $F = 0$ ,  $B = E = 2,5 \cdot 10^{-7}$  m,  $C = 4,85 \cdot 10^{-8}$  m sowie  $z_1 = z_2 = z_3 = 1,5 \mu\text{m}$  eingesetzt. Die Tatsache, dass es sich hier um ein ausgedehntes Objekt mit etwa 100 nm Durchmesser handelt, wird durch  $A = 0,7$  und  $D = 0,3$  berücksichtigt.

Wie bereits bei der Vorstellung der verschiedenen unter Verwendung der SMI-Mikroskopie durchführbaren Bildaufnahmemethoden in Abschnitt 4.4.1 dargestellt, kann die Position und der Abstand der Wellenfronten auch durch eine Veränderung der Phasendifferenz der Laserstrahlen festgestellt werden. Dies ist jedoch nur dann sinnvoll, wenn die zu untersuchenden Distanzen kleiner als der Wellenfrontenabstand  $d_W$  sind. Da die Objekte bei dieser Messmethode stets in der Fokusebene der Objektiv verbleiben, wird die Detektions-PSF hier nicht berücksichtigt, und die

Anpassungsfunktion vereinfacht sich zu

$$f(z) = A \cos^2\left(\frac{z - z_2}{C}\right) + F, \quad (4.41)$$

wobei hier nur noch vier Parameter zur Beschreibung der axialen Intensitätsverteilung benötigt werden. Dabei handelt es sich um die Amplitude der Modulation  $A$ , die Position der Wellenzüge  $z_2$  und  $C$ , das über Gleichung (4.40) definiert ist.  $F$  beschreibt auch hier die Hintergrundintensität.

Darüberhinaus ermöglicht dieses Verbleiben der Objekte in der Fokusebene auch eine Erhöhung der Photonenausbeute und damit eine Verbesserung des Signal-zu-Rausch-Verhältnisses. Aus diesem Grunde ist es prinzipiell möglich, beliebig viele Wellenzüge zu detektieren und damit die Genauigkeit der Distanzmessung erheblich zu erhöhen.

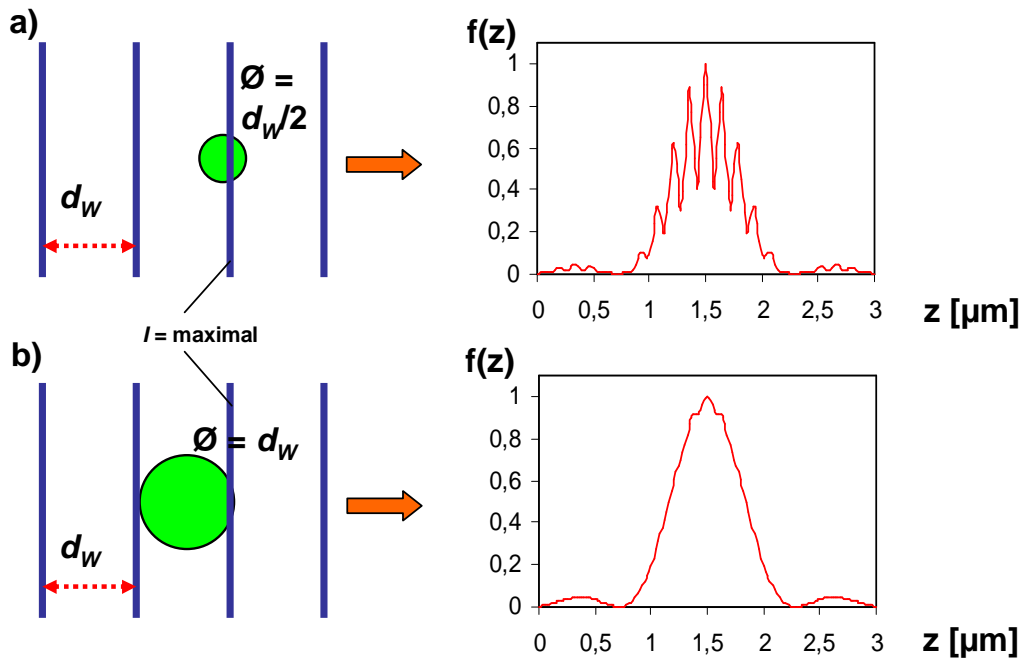
#### 4.4.4. Größenmessung

Wie bereits im vorhergehenden Abschnitt bei der Darstellung der Anpassungsfunktionen angedeutet, ergibt sich eine Abhängigkeit der gemessenen axialen Intensitätsverteilung von der axialen Ausdehnung der Fluoreszenzfarbstoffverteilung betrachteter Objekte. Die tatsächliche Form der Objekte kann dabei deutlich von der Farbstoffverteilung abweichen, so dass im Weiteren mit „Objekt“ ausschließlich die Farbstoffverteilung bezeichnet wird.

Zur Beschreibung des zugrundeliegenden Prinzips wird zunächst ein punktförmiges Objekt betrachtet. Befindet sich dieses Objekt an einer Stelle  $z$  genau zwischen zwei Wellenfronten, so dass an diesem Punkt keine Anregung stattfindet, ergibt sich für die axiale Intensitätsverteilung der Wert 0 (siehe Gleichung (4.29)). Da nun aber die Ebenen unterschiedlicher Anregungsintensität unendlich schmal sind, ergibt sich für Objekte mit einer von 0 verschiedenen axialen Ausdehnung ein anderes Bild. In diesem Fall gibt es immer Bereiche im Objekt, die zur Fluoreszenz angeregt werden, so dass die axiale Intensitätsverteilung in den Minima nicht bis auf 0 zurückgeht. Je größer das dabei betrachtete Objekt ist, desto stärker wird auch die Fluoreszenzintensität im Anregungsminimum sein. Aus diesem Grunde ergibt sich mit zunehmender axialer Ausdehnung der Objekte eine Abnahme der Amplitude der Modulation. Dieses Prinzip wird in Abbildung 4.11 dargestellt. In diesem Zusammenhang muss auch erwähnt werden, dass es für diese Methode der Größenbestimmung eine obere Grenze für die zu untersuchenden Objekte gibt. Unter der Voraussetzung, dass das Objekt eine axiale Ausdehnung größer als der Wellenfrontenabstand besitzt, ist praktisch keine Modulation mehr zu erkennen, da sich hier Bereiche mit großer und kleiner Anregungsintensität annähernd ausgleichen.

Die ersten Untersuchungen bezüglich des Zusammenhangs zwischen den Parametern der Anpassungsfunktionen zur Beschreibung der axialen Intensitätsverteilung einer SMI-Mikroskopaufnahme und der axialen Ausdehnung der Objekte wurden durch





**Abbildung 4.11.:** Auswirkungen der Objektgröße auf den Verlauf der Anpassungsfunktion nach Gleichung (4.39). Dabei entspricht die Objektausdehnung in Fall a) dem halben und in Fall b) einem ganzen Wellenfrontenabstand (nach [Albrecht02a]).

Methoden der **Virtuellen Mikroskopie** durchgeführt [Failla02a, Failla02b]. Dabei handelt es sich um Computersimulationen der mit dem SMI-Mikroskop erhaltenen optischen Abbildung. Für diese Untersuchungen wurden Objekte mit gaußförmiger Farbstoffverteilung und Durchmessern zwischen 10 und 300 Nanometern angenommen. Bei diesen Simulationen konnte ein eindeutiger Zusammenhang zwischen dem **Modulationskontrast**  $R$ , der durch die Amplituden  $A$  und  $D$  (siehe Gleichung (4.39)) über

$$R = \frac{D}{A + D}, \quad A > 0, D > 0 \quad (4.42)$$

definiert ist, und dem Durchmesser  $d$  der Objekte hergestellt werden. In Abbildung 4.13 sind mittels der analytischen Methode (siehe unten) berechnete **Kalibrationskurven** gezeigt, die prinzipiell mit denen aus der virtuellen Mikroskopie erhaltenen übereinstimmen. Aus diesen Kurven kann bei bekanntem Modulationskontrast die Objektgröße für eine bestimmte Anregungswellenlänge abgelesen werden. Die Größenbestimmung ist im linearen Bereich der Kalibrationskurven gut durchführbar und wird in den Randbereichen bei kleinerer Steigung entsprechend ungenauer, so dass sich der sinnvolle Messbereich in der Regel auf Größen zwischen 30 nm und etwa dem Wellenfrontenabstand beschränkt. Darüberhinaus muss darauf geachtet werden, dass die Intensität der beiden zur Anregung interferierenden Teilstrahlen genau gleich

#### 4. Interferenz und Mikroskopie mit räumlich modulierter Anregung

---

ist, da sonst schon das Wellenfeld im Minimum nicht bis auf den Wert 0 zurückgeht.

Eine weitere, neu entwickelte Methode zur Größenbestimmung beruht darauf, die Anregungsintensität an der Stelle eines Objektes mit vorgegebener Form über die Ausdehnung des Objekts zu integrieren. Die dabei betrachteten Integrale haben die folgende Grundstruktur:

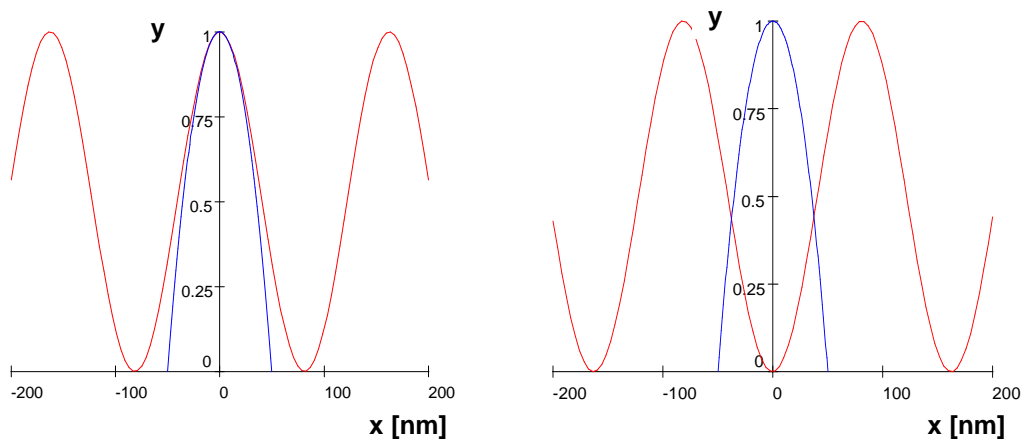
$$I \propto \int_{-\infty}^{\infty} \cos^2 \left( \frac{2\pi n}{\lambda} (a - x) \right) \cdot F(a) da. \quad (4.43)$$

Dabei ist  $F(a)$  ein „Formfaktor“, der die Form bzw. die effektive Fläche des betrachteten Objekts beschreibt. Bei den hier durchgeführten Untersuchungen wurden folgende Objektformen betrachtet:

Objektform	Formfaktor
Würfel, Quader	1
Kugel	$\left(\frac{d}{2}\right)^2 - a^2$
Kugelschale 0,5	$\left(\frac{d}{4}\right)^2 - a^2$
Kugelschale 0,1	$\left(\frac{d}{20}\right)^2 - a^2$
Gauß	$e^{-\frac{4 \ln(2) a^2}{d^2}}$

**Tabelle 4.1.:** Objektformen für die Größenbestimmung.

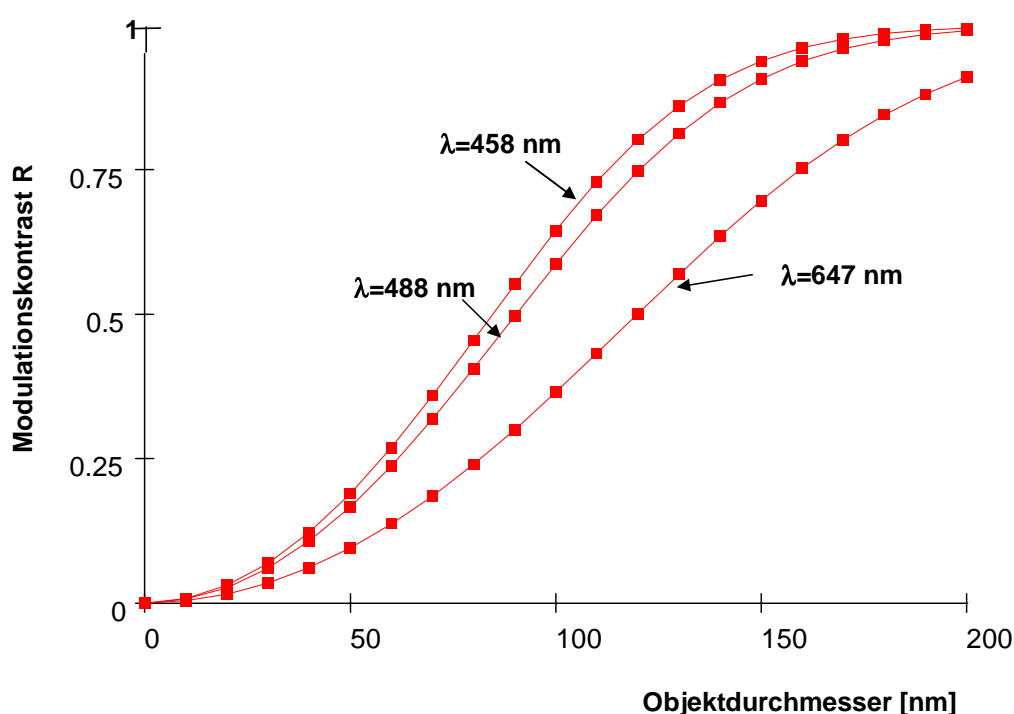
Diese Integration wird, wie in Abbildung 4.12 dargestellt, einmal im Anregungsmaximum und einmal im Anregungsminimum durchgeführt.



**Abbildung 4.12.:** Prinzip der Größenmessung durch einen analytischen Ansatz.

Aus dem Vergleich der dabei erhaltenen Werte folgt der Modulationskontrast. Da die hier entstehenden Ausdrücke analytisch lösbar sind, kann eine Umformung in der Weise vorgenommen werden, dass die Größe bei Angabe des Modulationskontrastes und der effektiven Anregungswellenlänge direkt berechnet wird. Das bedeutet auch, dass keine zuvor mit virtueller Mikroskopie simulierten Kalibrationskurven zur Größenbestimmung erforderlich sind.

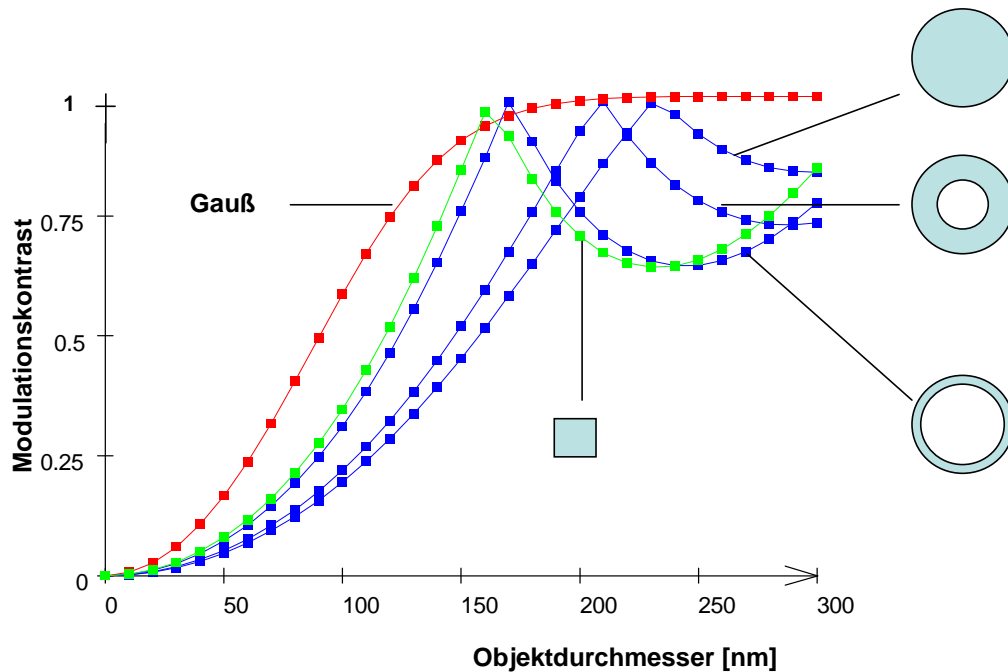
Um beide beschriebenen Methoden zur Größenbestimmung besser vergleichen zu können, werden auch hier Kurven erzeugt, welche die Abhängigkeit der Objektgröße bei gaußförmiger Farbstoffverteilung vom Modulationskontrast für festgelegte Anregungswellenlängen verdeutlichen (siehe Abbildung 4.13).



**Abbildung 4.13.:** Kalibrationskurven zur Bestimmung der Objektgröße aus dem Modulationskontrast.

Insgesamt ergibt sich bei den Untersuchungen zur Größenbestimmung, dass beide Methoden nahezu gleichwertig verwendet werden können, wobei jedoch die analytische Methode einige Vorteile insbesondere bezüglich der Geschwindigkeit bietet und darüberhinaus zusätzliche Untersuchungsmöglichkeiten bereitstellt. So wird wie bereits oben angedeutet, der Modulationskontrast erheblich von der Form der betrachteten Objekte beeinflusst (siehe Abbildung 4.14). Folglich sollte es möglich sein, die Objektform zu bestimmen, wenn der Modulationskontrast für das selbe Objekt bei

zwei verschiedenen Anregungswellenlängen gemessen wird.



**Abbildung 4.14.:** Kalibrationskurven zur Bestimmung der Objektgröße aus dem Modulationskontrast unter Berücksichtigung der Objektform.

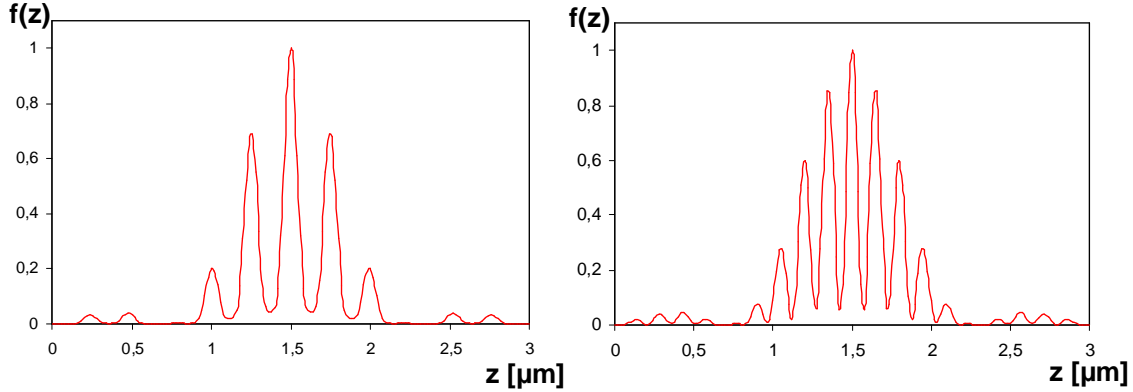
Weiterhin kann im Integranden auch die Farbstoffkonzentration in den Objekten sowie eine eventuelle Schwingung der Objekte um die Ruhelage auf der Nanometerskala berücksichtigt werden.

## 4.5. Anwendung der Zweiphotonen-Anregung in der SMI-Mikroskopie

In diesem Abschnitt werden einige Simulationen vorgestellt, die durch **virtuelle Mikroskopie** erhalten wurden, um die theoretischen Möglichkeiten der SMI-Mikroskopie in Kombination mit der Zweiphotonen-Anregung aufzuzeigen.

Da es sich im Falle der Zweiphotonen-Anregung um einen nichtlinearen Effekt handelt (siehe dazu Abschnitt 3.2), ergibt sich im Vergleich zum Einphotonenfall eine quadratische Abhängigkeit der Fluoreszenz-Anregung von der Intensität der Laserstrahlen. Der Einfluss der auf diese Weise erhaltenen Veränderung der Form der axialen Punktbildfunktion des SMI-Mikroskops auf die Genauigkeit der Lokalisation und Distanzmessung wird im Folgenden beschrieben. In Abbildung 4.15 sind simu-

lierte SMI-Punktbildfunktionen für die Ein- und Zweiphotonen-Anregung dargestellt.



**Abbildung 4.15.:** Axialer Intensitätsverlauf bei Verwendung einer Anregungswellenlänge von  $\lambda_{ex} = 760$  nm (links) und  $\lambda_{ex} = 458$  nm (rechts).

Eine nähere Betrachtung dieser Kurven ergibt dabei, dass im Zweiphotonenfall die einzelnen Wellenfronten aufgrund der größeren Anregungswellenlänge ( $\lambda_{ex} = 760$  nm) weiter auseinanderliegen. Die erwartete  $\cos^4$ -Form der Anregungs-PSF verursacht bei ähnlicher Wellenlänge eine kleinere Halbwertsbreite der Wellenfronten.

Die Vorteile einer zur Erzeugung des Zweiphotonen-Effekts üblichen Anregung mit Nah-Infrarot (NIR) liegen einerseits in einer deutlich besseren Trennung von Anregungswellenlänge ( $\lambda_{ex} = 760$  nm) und Emissionswellenlänge ( $\lambda_{em} \approx 500$  nm). Andererseits können Strukturen im Inneren dicker, transparenter Objekte mit dem NIR weit besser untersucht werden als mit allen anderen Wellenlängen [Gu95, Brakenhoff96, Bewersdorf98].

Die PSF der SMI-Mikroskopie unter Anwendung der Zweiphotonen-Anregung kann grundsätzlich analog zu Abschnitt 4.4.1 beschrieben werden, wobei das Wellenfeld hier durch zwei gegenläufige, gepulste NIR-Laserstrahlen erzeugt wird, die in die hintere Fokusebene der Objektivseife einfokussiert werden. In diesem Fall erhält man für die PSF des Gesamtsystems

$$PSF_{SMI} = PSF_{EPI} \cos^4 \left( \frac{2\pi n(z - z_0)}{\lambda} \right). \quad (4.44)$$

Hierbei ist  $PSF_{EPI}$  die Epifluoreszenz-PSF eines konventionellen Lichtmikroskops.

Die hier vorgestellten Simulationen durch virtuelle Mikroskopie wurden durchgeführt, um die theoretischen Grenzen der Präzision axialer Distanzmessungen für ein SMI-Mikroskop unter Anwendung der Zweiphotonen-Anregung auch in Abhängigkeit vom Photonenrauschen zu untersuchen. Dazu wurde die Anzahl der von jedem Objekt detektierten Photonen systematisch variiert. Für diese Simulationen konnten zwei unabhängige punktförmige Objekte mathematisch am besten durch zwei

Deltadistributionen nach Dirac repräsentiert werden, welche sich an den Positionen  $P_1(x_1, y_1, z_1)$  und  $P_2(x_2, y_2, z_2)$  befanden, so dass gilt

$$P_{1(2)} = \delta(x - x_{1(2)}, y - y_{1(2)}, z - z_{1(2)}). \quad (4.45)$$

Die einzelnen Objekte, die in verschiedenen Kanälen des „virtuellen“ SMI-Mikroskops sichtbar gemacht wurden, ergaben sich aus einer Faltung dieser Deltadistribution mit der SMI-PSF. Folglich waren die beiden unabhängigen punktförmigen Objekte jeweils durch eine SMI-PSF zentriert um die Punkte  $P_1$  und  $P_2$  gegeben. Dabei wurde eine Anpassungsfunktion verwendet, um zunächst die exakte Position des Maximums der PSF für jedes Objekt  $z_{01}$  und  $z_{02}$  zu bestimmen. Als Anpassungsfunktion wurde hier die SMI-PSF in axialer Richtung in folgender Form verwendet:

$$f(z) = A \operatorname{sinc}^2\left(\frac{z - z_{max}}{B}\right) \cdot \cos^4\left(\frac{z - z_0}{C}\right). \quad (4.46)$$

Dabei sind  $A, B, C, z_{max}$  und  $z_0$  die gesuchten Parameter. Die axiale Distanz  $d_{12}$  wurden dann aus

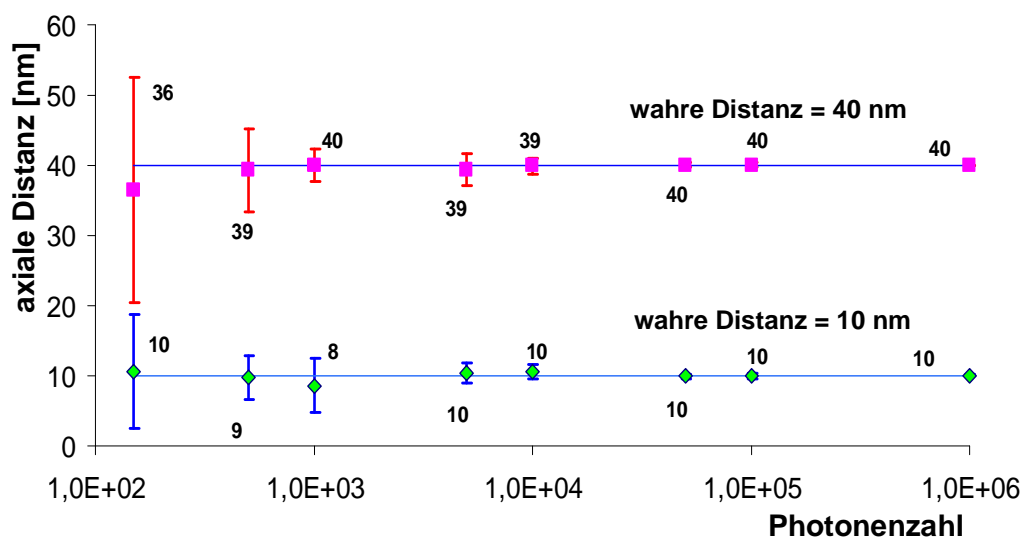
$$d_{12} = z_{02} - z_{01} \quad (4.47)$$

erhalten.

Die hier vorgestellten Simulationen wurden auf der Basis eines „least-square“ Anpassungsalgorithmus durchgeführt, wobei jeweils eine vorher festgelegte Anzahl detektierter Photonen pro Objekt gesetzt wurde. Die axiale Distanz zwischen den Objekten wurde aus dem Abstand der Maxima der Punktbildfunktionen dieser Objekte nach Addition von „Poisson“-Rauschen berechnet. Dieses Vorgehen wurde für jede „wahre“, d.h. vorgegebene Distanz 20 mal bei kleiner Photonenzahl ( $N_{ph} \leq 5000$ ) bzw. 10 mal bei größerer Photonenzahl ( $N_{ph} \leq 10000$ ) wiederholt. Die Ergebnisse dieser Untersuchungen sind in Tabelle 4.2 und Abbildung 4.16 dargestellt.

$N_{ph}$	$d_{wahr} = 40,0 \text{ nm}$	$d_{wahr} = 10,0 \text{ nm}$
150	$36,5 \pm 16,0$	$10,6 \pm 8,2$
500	$39,3 \pm 5,9$	$9,8 \pm 3,1$
1000	$40,0 \pm 2,3$	$8,6 \pm 3,9$
5000	$39,3 \pm 2,3$	$10,4 \pm 1,4$
10000	$39,9 \pm 1,1$	$10,6 \pm 1,0$
50000	$40,1 \pm 0,3$	$9,9 \pm 0,4$
100000	$40,1 \pm 0,4$	$10,0 \pm 0,4$
1000000	$40,0 \pm 0,1$	$10,1 \pm 0,1$

**Tabelle 4.2.:** Bestimmung der axialen Distanz  $d$  [nm] durch virtuelle SMI-Mikroskopie bei Zweiphotonen-Anregung.



**Abbildung 4.16.:** Durch virtuelle SMI-Mikroskopie festgestellte axiale Distanzen fluoreszierender Nanopartikel bei Zweiphotonen-Anregung.

Die erhaltenen Ergebnisse zeigen, dass Objektabstände bei einer axialen Distanz von  $d = 10$  nm und  $d = 40$  nm bei Durchführung von Mehrfachmessungen auch bei kleinen Photonenzahlen gut ermittelt werden können. Der Fehler der angegebenen Distanzen entspricht der Standardabweichung aus 10 bzw. 20 nacheinander durchgeführten Simulationen. Unter idealen experimentellen Bedingungen kann die axiale Distanz der Objekte bei ausreichender Photonenzahl bis auf 0,1 nm genau bestimmt werden.

Wie in Abbildung 4.15 dargestellt, enthält die PSF für Zweiphotonen-Anregung aufgrund der größeren Anregungswellenlängen weniger Wellenfronten, so dass die Nebenmaxima stärker unterdrückt werden. Aus diesem Grunde sollte die axiale Auflösung des SMI-Mikroskops mit Zweiphotonen-Anregung deutlich besser sein als bei Einphotonen-Anregung. Um diesen Sachverhalt zu untersuchen, wurden weitere Simulationen durchgeführt, für die jeweils zwei Objekte an derselben lateralen Position mit einem vorgegebenen Abstand von 100 nm oder mehr in axialer Richtung betrachtet wurden. In Abbildung 4.17 und Tabelle 4.3 werden die Ergebnisse dieser Simulationen zusammengefasst.

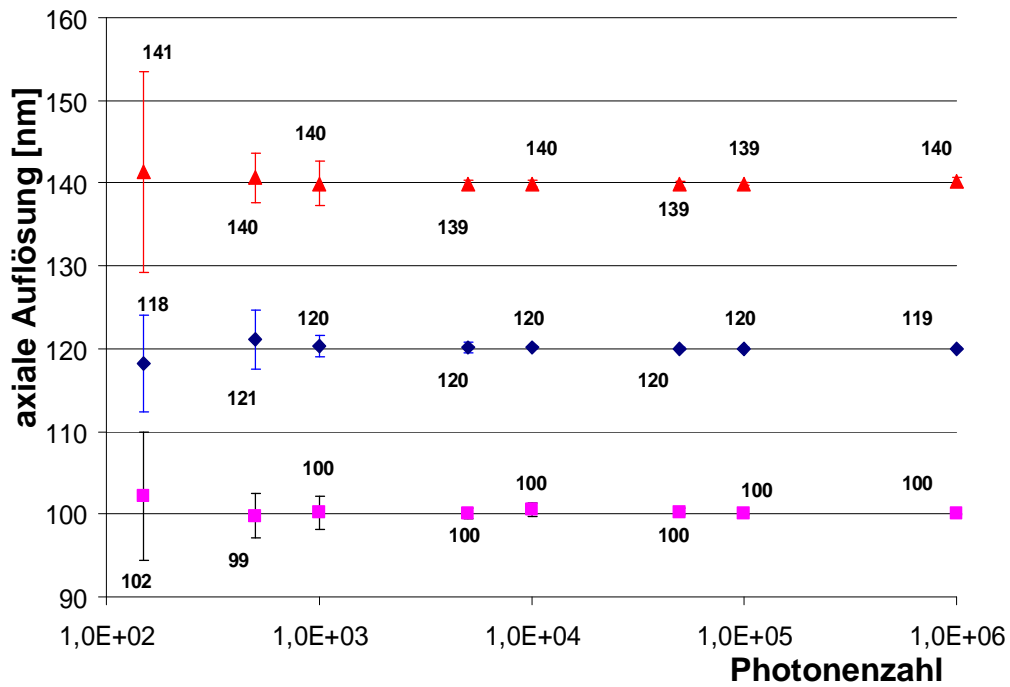
Die hier vorgestellten Simulationen bestätigen, dass mit Zweiphotonen-Anregung in der SMI-Mikroskopie eine axiale Auflösung von 100 nm erreicht werden kann. Bei noch kleineren Objektabständen ist auch bei Verwendung dieser Mikroskopiemethode nicht mehr von einer zuverlässigen Trennung der Objekte auszugehen. Insgesamt ergibt sich damit eine deutlich bessere axiale Auflösung als bei Verwendung der Einphotonen-Anregung.

Aufgrund der größeren Anregungswellenlänge von  $\lambda_{ex} = 760$  nm ist unter Anwen-

#### 4. Interferenz und Mikroskopie mit räumlich modulierter Anregung

$N_{ph}$	$R_{wahr} = 100$ nm	$R_{wahr} = 120$ nm	$R_{wahr} = 140$ nm
150	$102,2 \pm 7,8$	$118,2 \pm 5,8$	$141,4 \pm 12,2$
500	$99,8 \pm 2,7$	$121,1 \pm 3,6$	$140,7 \pm 3,0$
1000	$100,2 \pm 2,0$	$120,3 \pm 1,3$	$140,0 \pm 2,7$
5000	$100,1 \pm 0,6$	$120,0 \pm 0,7$	$139,9 \pm 0,5$
10000	$100,6 \pm 0,8$	$120,1 \pm 0,2$	$140,0 \pm 0,4$
50000	$100,3 \pm 0,4$	$120,2 \pm 0,2$	$139,9 \pm 0,4$
100000	$100,0 \pm 0,1$	$120,0 \pm 0,1$	$139,9 \pm 0,1$
1000000	$100,0 \pm 0,1$	$119,9 \pm 0,1$	$140,2 \pm 0,5$

**Tabelle 4.3.:** Bestimmung der axialen Auflösung  $R$  [nm] durch virtuelle SMI-Mikroskopie unter Verwendung der Zweiphotonen-Anregung.



**Abbildung 4.17.:** Abschätzung der axialen Auflösung durch virtuelle SMI-Mikroskopie unter Verwendung der Zweiphotonen-Anregung.

derung der Zweiphotonen-Anregung mit einer Ausdehnung der Größenbestimmung von fluoreszierenden Objekten zu größeren Werten zu rechnen. Abbildung 4.18 zeigt die mittels der analytischen Methode berechneten Kurven bei gaußförmiger Farbstoff-



verteilung. Die Berechnung wurde über folgenden Ausdruck vorgenommen:

$$I \propto \int_{-\infty}^{\infty} \cos^4 \left( \frac{2\pi n}{\lambda} (a - x) \right) \cdot e^{-\frac{4 \ln(2) a^2}{d^2}} da. \quad (4.48)$$

Der  $\cos^4$ -Zusammenhang ergibt sich dabei aus der quadratischen Abhängigkeit der Fluoreszenzintensität von der Anregungsintensität im Rahmen der Zweiphotonen-Anregung. Für die Wellenlänge wird  $\lambda = 760$  nm eingesetzt.

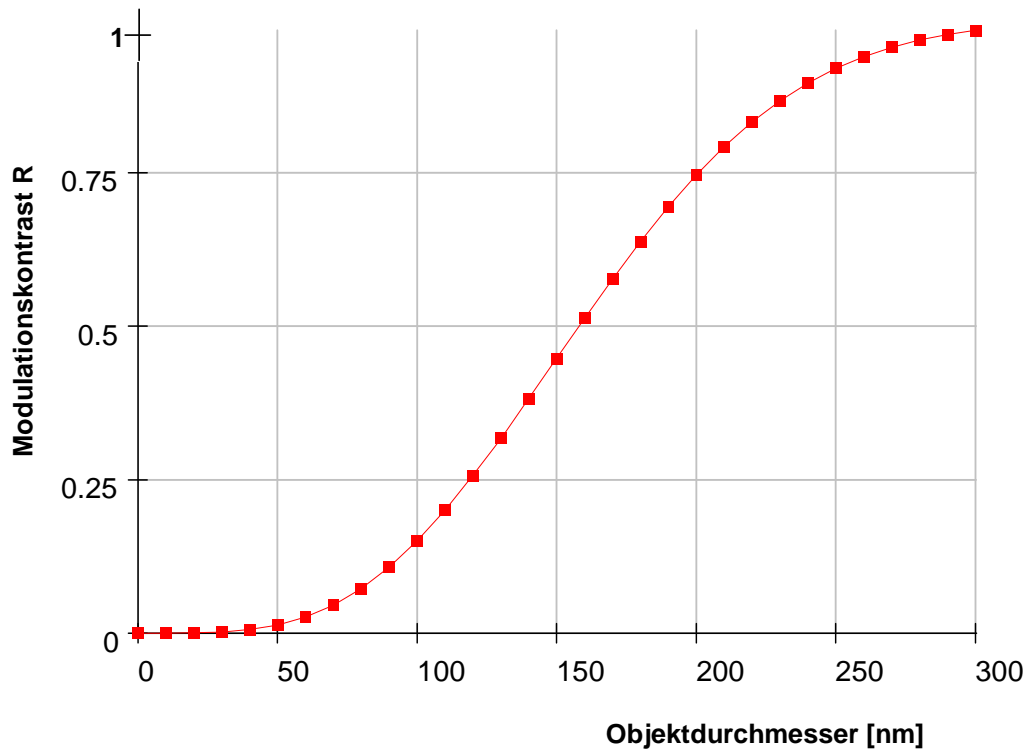


Abbildung 4.18.: Kalibrationskurve zur Größenbestimmung und Verwendung der Zweiphotonen-Anregung.

#### 4. *Interferenz und Mikroskopie mit räumlich modulierter Anregung*

---

# 5. Aufbau und Justage eines Mikroskops mit räumlich modulierter Anregung

In diesem Kapitel wird das experimentelle Vorgehen bei der Realisierung des SMI-Mikroskops beschrieben. Dabei wird zunächst ein kurzer Überblick zu den Rahmenbedingungen des Experiments gegeben, bevor im Einzelnen auf die Realisierung des SMI-Mikroskops unter Verwendung einer Anregungswellenlänge von  $\lambda_{ex} = 458 \text{ nm}$  eingegangen wird. Dieses SMI-Mikroskop wurde im Rahmen dieser Arbeit in trigonaler Form vollständig neu aufgebaut, wobei das Grundkonzept den in [Schneider99] und [Albrecht02a] dargestellten Experimenten entspricht. Im zweiten Abschnitt dieses Kapitels wird der Ausbau dieses SMI-Mikroskops zu einem Instrument mit Zweiphotonen-Anregung aufgezeigt und die ersten experimentellen Schritte in diese Richtung vorgestellt.

## 5.1. SMI-Mikroskop für eine Anregungswellenlänge von 458 nm

Der experimentelle Aufbau des SMI-Mikroskop-Prototyps befindet sich in einem speziell dafür vorgesehenen Optiklabor, das zur Durchführung der Messungen vollständig abgedunkelt werden kann. Die insbesondere für den Betrieb der Laser erforderliche Infrastruktur bezüglich Wasser- und Stromversorgung ist bereitgestellt. Der gesamte experimentelle Aufbau einschließlich der zur Anregung erforderlichen Laser ist auf einem schwingungsgedämpften optischen Tischsystem (bestehend aus: Tischplatte 07 OPT 536 und Isolatoren 07 OTI 055, Melles Griot GmbH<sup>1</sup>) aufgebaut. Der Mikroskopaufbau selbst ist auf einem „**Breadboard**“ der Größe  $60 \text{ cm} \times 60 \text{ cm}$  aus Superinvar M-XI-22 (Newport GmbH<sup>2</sup>) montiert, um thermisch induzierte Längenveränderungen innerhalb des Mikroskops zu reduzieren. Zur Minimierung von Streulicht und übermäßiger Staubansammlung wurde in Zusammenarbeit mit der me-

---

<sup>1</sup>Lilienthalstraße 30-32, 64625 Bensheim, <http://www.mellesgriot.com>

<sup>2</sup>Holzhofallee 19-21, 64295 Darmstadt, <http://www.newport.com>

## 5. Aufbau und Justage eines Mikroskops mit räumlich modulierter Anregung

chanischen Werkstatt des Kirchhoff-Instituts jeweils eine Aluminiumabdeckung für den Mikroskopaufbau und die Laser angefertigt. Die Abdeckung für das Mikroskop musste sehr großräumig konstruiert und mit Seitenelementen zum Aufklappen versehen werden, damit der uneingeschränkte Zugang zum Mikroskop gewährleistet ist. Darüberhinaus wurden weitere kleinere Abdeckungen für den Detektionsstrahlengang notwendig, um Streulicht vom Laser zu reduzieren. In Abbildung 5.1 ist der gesamte Aufbau schematisch dargestellt. Eine Photographie des Aufbaus ist in Abbildung 5.2 gezeigt.

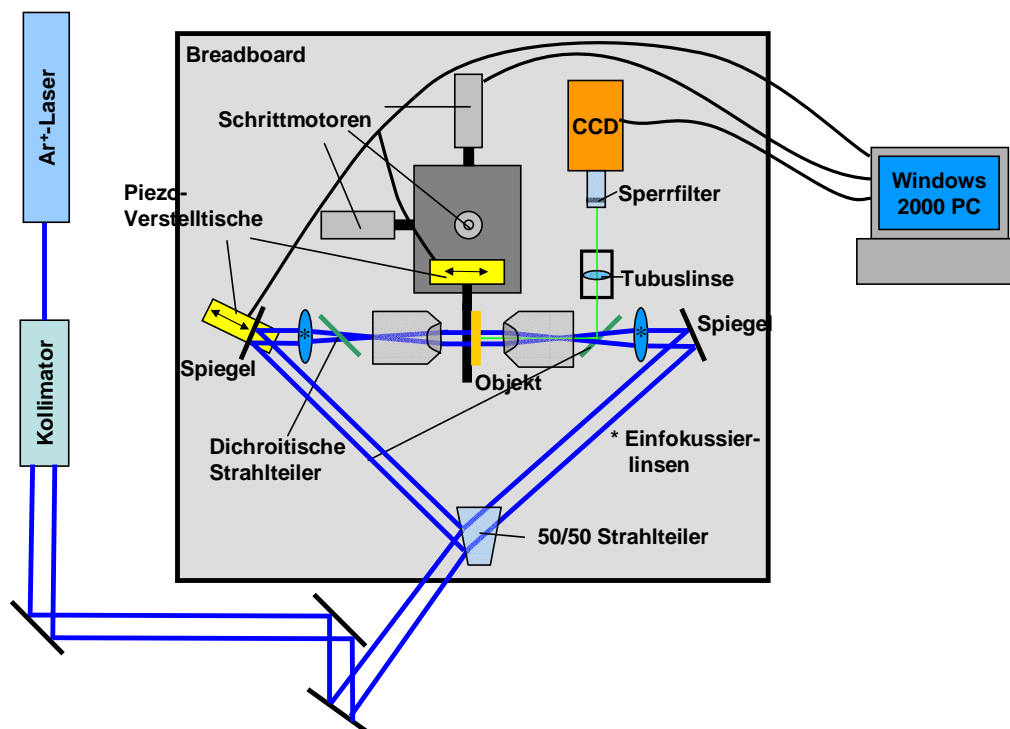


Abbildung 5.1.: Schematische Darstellung des SMI-Mikroskopaufbaus für eine Anregungswellenlänge von  $\lambda_{ex} = 458 \text{ nm}$ .

### 5.1.1. Aufbau des Anregungsstrahlengangs

Die SMI-Mikroskopie basiert grundsätzlich auf Fluoreszenz-Anregung mit räumlich modulierter Beleuchtung, die durch die Interferenz zweier in entgegengesetzter Richtung laufender Laserstrahlen erzeugt wird (siehe Abschnitt 4.4). Der in das Mikroskop eintretende Laserstrahl wird unter Verwendung eines 50/50-Strahlteilers in zwei gleichintensive, kohärente Teilstrahlen gleicher Wellenlänge und Polarisation aufgeteilt, die dann in die hintere Fokusebene zweier sich gegenüberliegender Objektive

### 5.1. SMI-Mikroskop für eine Anregungswellenlänge von 458 nm

---

einfokussiert werden, so dass kollimiertes Licht die Objektive in Vorwärtsrichtung verlässt (Anregungsstrahlengang). Auf diese Weise bildet sich zwischen den Objektiven eine stehende Lichtwelle mit ebenen, auf der optischen Achse senkrecht stehenden Wellenfronten aus, die in axialer Richtung eine Amplitude mit sinusförmiger räumlicher Modulation aufweist. Durch Bewegen des Objekts entlang der optischen Achse können bestimmte Regionen selektiv angeregt werden. Um die durch SMI mögliche Verbesserung der Positionierungsgenauigkeit zu erhalten, müssen die Targets kleiner als die halbe Wellenlänge der Anregungsstrahlung sein, da bei größeren Objekten keine ausreichende Modulationstiefe mehr entsteht, weil sich dann stets ein Anregungsmaximum innerhalb des Objekts befindet. Um ein möglichst großes Sichtfeld zu erzielen bzw. um eine möglichst große Fläche ebener Wellenfronten zu erreichen, ist der Laserstrahl vor den Einfokussierlinsen auf einen  $1/e^2$ -Durchmesser von etwa 10 mm aufgeweitet.

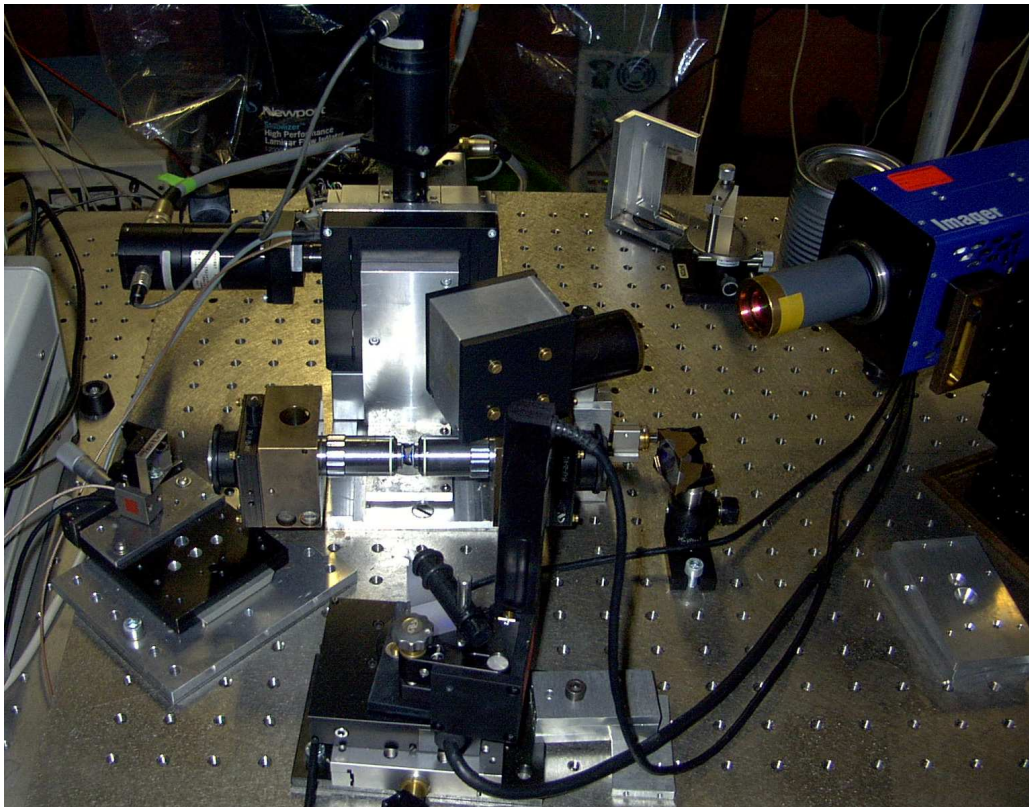


Abbildung 5.2.: SMI-Mikroskopaufbau bei Verwendung von  $\lambda_{ex} = 458$  nm.

### **Einkopplung des Lasers**

Um diese Anregung experimentell zu realisieren, wird ein Ar-Ionen( $\text{Ar}^+$ )-Laser (Modell Innova 310, Coherent, Inc.<sup>3</sup>) verwendet. Da dieser Laser von den Vorbesitzern gebraucht ist (Baujahr 1994), haben wir vor dem ersten Betrieb zunächst Leistungsmessungen im Dauerbetrieb über mehrere Stunden durchgeführt. Dadurch konnte eine maximale Ausgangsleistung von etwa 10 W stabil erreicht werden. Für die weiteren Messungen mit Einphotonen-Anregung wird eine durchschnittliche Laserleistung von 2-5 W verwendet. Da der  $\text{Ar}^+$ -Laser im Multiline-Betrieb arbeitet, wird eine Aufspaltung in die einzelnen emittierten Spektrallinien mit anschließender Selektion der für die Messungen ausgewählten Anregungswellenlänge, hier bei  $\lambda_{ex} = 458$  nm, vorgenommen. Zu diesem Zweck wird der Laserstrahl auf ein **60°-Dispersionsprisma** aus dem Material N-SF10 (Linos Photonics GmbH<sup>4</sup>) gelenkt, mit dem insgesamt vier Spektrallinien bei  $\lambda = 458$  nm, 476 nm, 488 nm und 514 nm deutlich getrennt werden. Aufgrund dieser guten Linienaufspaltung wird die gewählte Anregungswellenlänge bei  $\lambda_{ex} = 458$  nm durch Abblocken der anderen Spektrallinien selektiert und in das Mikroskop eingekoppelt. Das Dispersionsprisma ist auf einem **Dreh-Kipp-Tisch** (Modell M-PO32N, Newport) aufgebaut, so dass sowohl die Einfallswinkel als auch die Neigung des Prismas bequem eingestellt werden können.

Um alle optischen Komponenten des SMI-Mikroskops und dabei insbesondere die Objektivöffnungen möglichst homogen auszuleuchten, ist es erforderlich, den Laserstrahl mit einem Durchmesser von etwa einem Millimeter um das Fünf- bis Zehnfache aufzuweiten. Zu diesem Zweck wurde ein Kollimator konstruiert, der im Wesentlichen aus zwei Konvexlinsen (Linos Photonics GmbH) mit den Brennweiten  $f=10$  mm und  $f=60$  mm besteht, die im Abstand von 70 mm zueinander angeordnet werden (siehe Abbildung 5.3). Für die Messungen mit den Hochleistungsobjektiven mit Wasserimmersion (s.u.) werden diese Linsen durch achromatische Duplettlinen der Brennweiten  $f=20$  mm und  $f=200$  mm im Abstand von 220 mm ersetzt. Zwischen die beiden Linsen kann im gemeinsamen Fokuspunkt noch eine Lochblende zur Unterdrückung höherer Lasermoden eingefügt werden. Zur Realisierung dieser Konstruktion wurden Bauelemente aus dem Mikrobankprogramm von Linos Photonics (ehemals Spindler und Hoyer) und Montageelemente, die in der mechanischen Werkstatt des Kirchhoff-Instituts für Physik gefertigt wurden, verwendet. Zur reproduzierbaren Justage der Strahllage und Strahlrichtung im SMI-Mikroskop wurden am Eingang und am Ausgang des Kollimators Lochblenden mit einer dem jeweiligen Strahldurchmesser angepassten Größe genau zentrisch montiert, welche nach erfolgreicher Justage wieder entfernt wurden. Der dabei erhaltene aufgeweitete, parallel kollimierte Laserstrahl wird mittels einer „**Shearing Plate**“ [Kirsten97, Melles99] auf die Güte der Kollimation überprüft. Dabei handelt es sich im Prinzip um eine fast planparallele Platte mit sehr kleinem Keilwinkel an deren Vorder- und Rückseite das Laserlicht reflek-

---

<sup>3</sup>Laser Group, 5100 Patrick Henry Drive, Santa Clara, CA 95054

<sup>4</sup>Königsallee 23, 37081 Göttingen, <http://www.linos-photonics.de>

tiert und zur Interferenz gebracht wird. Das auf einem Schirm darstellbare Interferenzmuster sollte bei idealer Kollimation horizontal ausgerichtete Interferenzstreifen aufweisen.

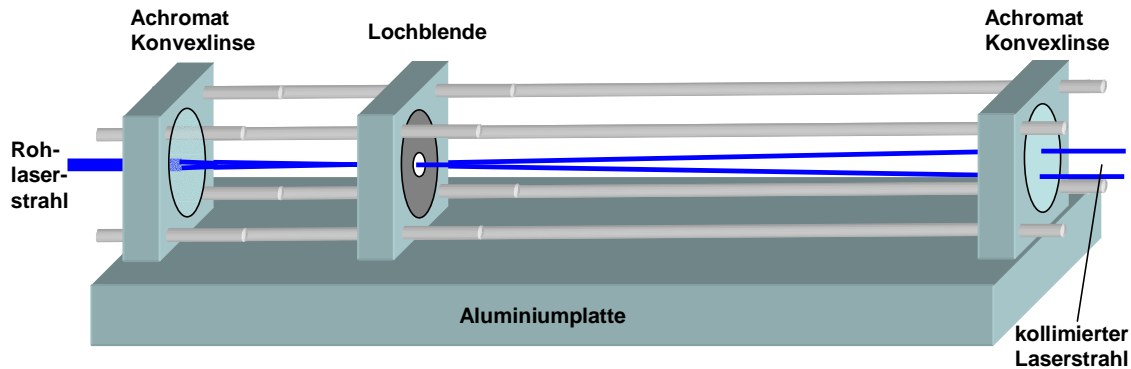


Abbildung 5.3.: Aufbau des Kollimators, der zur Aufweitung des Laserstrahls verwendet wird.

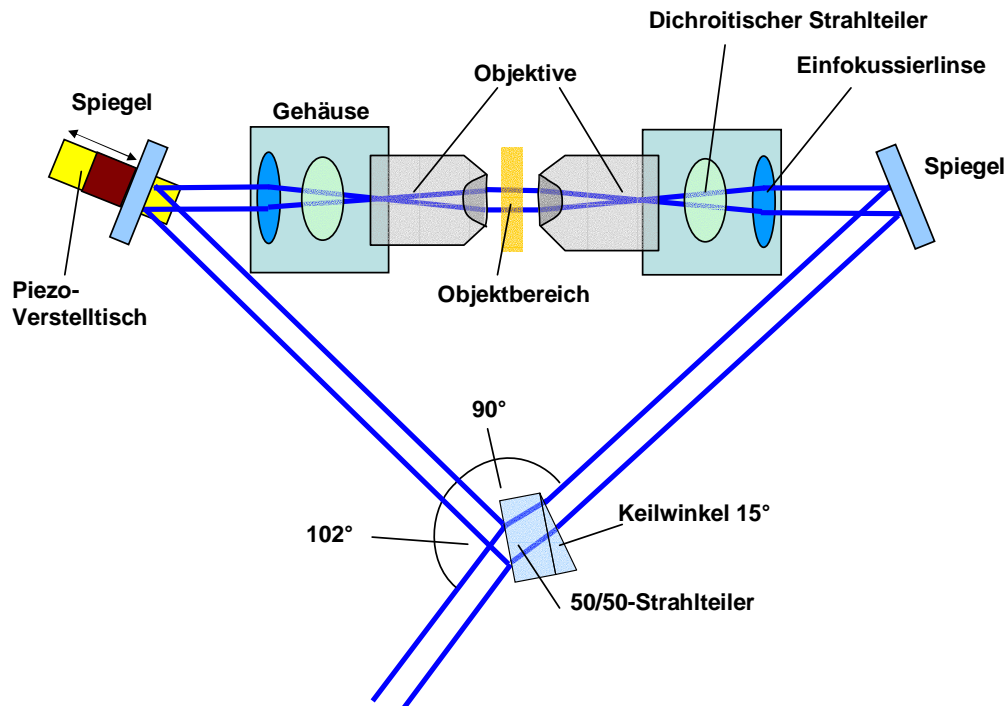
Der so erhaltene Anregungsstrahl wird mittels zweier **Spiegel** auf den 50/50-Strahlteiler des Interferometers geleitet. Alle Spiegel, welche hier verwendet werden, um den Anregungslaserstrahl in das Interferometer des Mikroskops einzukoppeln, sind Reflektoren des Typs 10Z40ER.2 (Newport) aus Zerodur mit einem Durchmesser von 25 mm. Das Reflexionsvermögen beträgt 99% und die Planarität liegt bei  $\lambda/20$ . Alle Spiegel werden durch **kinematische Spiegelhalter** vom Typ U-50P (Newport) gehalten.

### Interferometer

Das erste Element des eigentlichen Mikroskopaufbaus ist der 50/50-Strahlteiler. Dabei handelt es sich um ein Strahlteilerprisma aus Suprasil 3 (Spezialanfertigung, DoroTEK Gesellschaft für Systemtechnik mbH<sup>5</sup>), das aufgrund einer Breitbandbeschichtung im gesamten visuellen Spektralbereich verwendet werden kann. Die reflektierenden Flächen haben dabei jeweils eine Kantenlänge von 25 mm und weisen eine Wellenfrontendeformation von  $\lambda/20$  auf. An den reflektierenden Flächen wird der unter dem Brewsterwinkel von  $51^\circ$  einfallende senkrecht polarisierte Laserstrahl zu 50 % transmittiert und zu 50 % unter  $90^\circ$  reflektiert. Um unerwünschte Mehrfachreflexionen aus dem Interferometer auszukoppeln, ist der Strahlteiler mit einem Keilwinkel von  $15^\circ$  ausgestattet. Das Strahlteilerprisma ist auf einem elektronisch steuerbaren **Dreh-Kipp-Tisch** (Newport) angebracht und kann daher sehr fein justiert werden.

In dem hier realisierten trigonalen Aufbau, der in Abbildung 5.4 beschrieben ist, werden die auf diese Weise erzeugten Laserstrahlen durch zwei Spiegel jeweils in

<sup>5</sup>Grenzweg 25, 15344 Strausberg



**Abbildung 5.4.:** Grundstruktur und wesentliche Bestandteile des interferometrischen Anregungsstrahlengangs.

die hintere Fokusebene zweier sich gegenüberstehender Objektive einfokussiert. Dazu wird auf jeder Seite eine achromatische Duplettlinse mit einer Brennweite von  $f = 80 \text{ cm}$  (Modell PAC 364, Newport) verwendet, die an der spiegelzugewandten Seite der Objektivhalterung in einem **Drei-Achsen-Translationshalter** des Typs M-LP-05-XYZ (Newport) befestigt ist. Mit diesen Linsenhalterungen kann die laterale und axiale Position der Einfokussierlinsen bezüglich der Objektive eingestellt werden. Da es sich bei dem System aus Einfokussierlinse und Objektiv grundsätzlich auch um einen Kollimator handelt, bei dem parallele Lichtstrahlen im Objektbereich zwischen den Objektiven entstehen, muss auch für diese Linsenkombination die Kollimation überprüft werden. Dazu wird das Linsensystem auf einer Seite entfernt, so dass auf der jeweils gegenüberliegenden Seite das Anregungslicht von vorne auf das Objektiv geleitet werden kann. Die „**Shearing Plate**“ wird in diesem Fall auf der Außenseite der Objektivhalterung positioniert, so dass das entstehende Interferenzmuster auf einem Schirm betrachtet werden kann. Die axiale Position der Einfokussierlinse wird dabei so eingestellt, dass sich wiederum horizontal verlaufende Interferenzstreifen ausbilden. Für die hier vorgestellten Messungen werden Objektive mit einer numerischen Apertur von  $NA = 1,25$  bei 100-facher Vergrößerung



(Standardobjektiv MIC 700, 100x/1,25, Euromex microscopen BV<sup>6</sup>) sowie Hochleistungsobjektive mit Wasserimmersion mit 63-facher Vergrößerung bei einer numerischen Apertur von  $NA = 1,2$  (Typ PLAPO, 63x/1,2, Wasserimmersion, Leica microsystems GmbH<sup>7</sup>) verwendet. In der Objektivhalterung auf der Detektionsseite ist zwischen Objektiv und Einfokussierlinse ein **dichroitischer Strahlteiler** (Kurzpasskantenfilter,  $R > 90\%$  für  $\lambda \geq 500$  nm,  $T > 80\%$  für  $\lambda \leq 488$  nm, Laseroptik GmbH<sup>8</sup>) eingesetzt, um Anregungs- und Detektionslicht zu trennen. Dabei wird das senkrecht polarisierte Anregungslicht mit  $\lambda_{ex} = 458$  nm transmittiert und das Detektionslicht  $\lambda_{em} \geq 500$  nm unter einem Einfallswinkel von  $45^\circ$  nach oben in den Detektionsstrahlengang reflektiert. Um die Symmetrie des geometrischen Aufbaus herzustellen und eventuell auch die Möglichkeit zu haben das zweite Objektiv zur Detektion heranzuziehen, wird ein identischer dichroitischer Strahlteiler auch auf der anderen Seite eingesetzt.

Die Objektivhalterungen wurden in der mechanischen Werkstatt des Kirchhoff-Instituts für Physik hergestellt. Die Objektivhalterung auf der Detektionsseite ist auf drei übereinander montierte Linearverschiebetische (Typ M-461, Newport) aufgebaut und kann dadurch in allen Raumrichtungen verschoben werden. Auf der gegenüberliegenden Seite ist die Objektivhalterung über einen Winkel fest mit dem Breadboard verbunden. Die beiden **Spiegel** im Interferometer sind aluminiumbeschichtete Reflektoren des Typs 02 MLE 003/001 (Melles Griot) aus Zerodur mit einer Kantenlänge von 25 mm, die ein Reflexionsvermögen von  $\geq 95\%$  und eine Wellenfrontverzerrung  $\lambda/20$  aufweisen. Der rechte Interferometerspiegel ist auf einem kinematischen Spiegelhalter vom Typ U50-P (Newport) montiert. Der linke Interferometerspiegel befindet sich auf einem **piezoelektrisch verstellbaren Verschiebetisch** der wiederum auf einem linearen Verschiebetisch mit Mikrometerschraube montiert ist.

Im Interferometer des SMI-Mikroskops muss der eintretende Laserstrahl bezüglich seiner Lage und Richtung auf die Mikroskopobjektive justierbar sein. Dies wird durch zwei Spiegel erreicht. Für die Strahlage ist der weiter entfernte Spiegel verantwortlich, während der den Objektiven näherstehende Spiegel die Strahlrichtung durch die Objektive wesentlich beeinflusst. Daher kann es durch iteratives Verstellen beider Spiegel erreicht werden, dass der Laserstrahl genau zentriert in axialer Richtung durch die beiden Mikroskopobjektive geht. Die Grobjustage erfolgte dabei durch Positionieren der in einer horizontalen Ebene befindlichen Strahlteiler, Optikhalter und Objektivhalterungen. Der exakte Abgleich der Höhe der Objektivhalterungen, die mit jeweils zwei Schrauben befestigt wurden, wurde daraufhin mit Hilfe eines in der mechanischen Werkstatt exakt auf das erforderliche Maß gefrästen Justageblocks aus Aluminium durchgeführt. Die Feinjustierung der Winkel und der Strahlage wurde hier unter Verwendung einer speziellen, in der mechanischen Werkstatt

---

<sup>6</sup>Papenkamp 20, Rijkerswoerd, 6836 BD Arnhem, Holland

<sup>7</sup>Lilienthalstraße 39-45, 64625 Bensheim, <http://www.leica-microsystems.com>

<sup>8</sup>30826 Garbsen

des Kirchhoff-Instituts hergestellten Justageröhre aus Messing vorgenommen, die anstelle der Objektive jeweils in eine der beiden Objektivhalterungen eingeschraubt werden kann. In diesem Justagewerkzeug befindet sich an jedem Ende jeweils eine Lochblende mit einem Durchmesser von 0,8 mm. Hiermit justiert man die Strahllage durch den entfernten Spiegel außerhalb des Interferometers und die Strahlwinkel durch die objektivnahen Spiegel innerhalb des Interferometers auf maximale durch die beiden Blenden der Justageröhre tretende Lichtintensität. Die genaue Justage auf das dabei auftretende Intensitätsmaximum wurde dabei unter Zuhilfenahme eines optoakustischen Wandlers durchgeführt, wobei höhere Lichtintensitäten in höhere akustische Frequenzen umgewandelt werden. Diese akustische Wahrnehmung der Lichtintensität erleichtert die optischen Justage wesentlich, da der Blick nicht durch ein Anzeigegerät abgelenkt wird. Das Abstimmen auf das Intensitätsmaximum wird durch die höhere Empfindlichkeit des Gehörs auf Frequenzänderungen im Vergleich zur Empfindlichkeit des Auges auf Intensitätsänderungen erheblich vereinfacht. Die hier beschriebene Feineinstellung muss nach Änderungen im optischen Strahlengang gelegentlich wiederholt werden.

### 5.1.2. Objekt- und Spiegelpositionierung

Um die hier beschriebenen hochpräzisen Größen- und Distanzmessungen durchführen zu können, ist zunächst eine präzise mechanische Objekt- bzw. Spiegelpositionierung erforderlich. Nur unter dieser Voraussetzung werden die Vorteile der interferometrischen Messung in vollem Umfang zum Tragen kommen. Aus diesem Grunde wurde zur Fixierung des handelsüblichen Objektträgers mit den Standardmaßen  $L \times B \times H = 76 \text{ mm} \times 25 \text{ mm} \times 1 \text{ mm}$  ein spezieller **Objektträgerhalter** konstruiert, der über eine Dreipunktlagerung auf einer **Magnethalterplatte** gelagert wird [Jäckle99]. Diese Konstruktion ermöglicht einen schnellen und unkomplizierten Wechsel der Objektträger, da der Objektträgerhalter auf der Magnethalterplatte stets in der gleichen Position arretiert wird.

### Verschiebetisch mit Schrittmotoren, Grobpositionierung

Die Grundlage der Objektpositionierung bildet ein temperaturstabilisierter Verschiebetisch [Jäckle99], der im Wesentlichen aus zwei Translationsverschiebetischen des Typs M-125 (Physik Instrumente (PI) GmbH Co<sup>9</sup>) mit einem Verfahrweg von maximal 25 mm und einem Translationsverschiebetisch M-155 (PI) mit einem maximalen Verfahrweg von 100 mm zusammengesetzt wird. Der Verschiebetisch mit dem größten Verfahrweg wird dabei direkt auf dem Breadboard in horizontaler Ausrichtung montiert, um damit den Objektträger in den Raum zwischen den beiden Objektiven hinein bzw. wieder herauszufahren. Die unterschiedlichen Metalle und die

---

<sup>9</sup>Polytec Platz 1-7, 76337 Waldbronn, <http://www.physikinstrumente.com>

Verschraubungspunkte der einzelnen Verbindungen zwischen den Verschiebetischen sind hier in der Weise gewählt, dass sich die Position des Objektträgers bei Temperaturschwankungen nicht wesentlich verändert. Das gilt für die laterale Richtung parallel zur Oberfläche ( $y$ -Richtung) und die Richtung entlang der optischen Achse ( $z$ -Richtung).

Eine andere Situation ergibt sich jedoch, wenn die laterale Richtung senkrecht zur Oberfläche ( $x$ -Richtung) betrachtet wird, welche parallel zur Gravitation gerichtet ist. Für diese Richtung konnte bei früheren Messungen an einem anderen Mikroskopaufbau unter Verwendung der gleichen Verschiebetischkonfiguration (siehe [Albrecht02a, Jäckle99]) ein **kontinuierliches, langsames Absinken** des Verschiebetisches entlang der Gravitationsrichtung festgestellt werden, das unter anderem durch das Verdrängen von Schmierflüssigkeit aus Zwischenräumen zwischen Gewindestangen und Gewindeführung erklärt werden kann.

Die drei einzelnen Verschiebetische werden durch jeweils einen Schrittmotor des Typs ZSS 422-200-1.2 (Phytron GmbH<sup>10</sup>) angetrieben, wobei die Ansteuerung der Motoren mittels der Schrittmotorsteuerung (Modell mc compact, ITK Dr. F. Kasen GmbH<sup>11</sup>) vorgenommen wird. Diese Steuerung ist über eine RS-232-Schnittstelle mit dem Steuer-PC verbunden, so dass mittels eines Steuerprogramms bestimmte Positionen angefahren werden und weitere Parameter der Schrittmotoren, wie z.B. die Verfahrgeschwindigkeit eingestellt werden können. Darüberhinaus ist es möglich, die Position des Objektträgers durch einen in die Schrittmotorsteuerung integrierten Joystick zu verfahren.

Neben dem Einbringen oder Entfernen des Objektträgers aus dem Bereich zwischen den beiden Objektiven werden die Schrittmotoren vor allem dazu verwendet, die Objektträger in den Fokuspunkt des Detektionsobjektivs zu bringen und geeignete Objekte durch laterales Verfahren des Objektträgers aufzufinden.

### **Piezelektrische Verschiebetische, Feinpositionierung**

Die Genauigkeit, mit der eine Position mittels der oben besprochenen Verschiebetische mit Schrittmotoren angefahren werden kann, liegt im Bereich von 0,5 bis 1 Mikrometer. Dies reicht bei weitem nicht aus, um damit interferometrische Messungen durchzuführen. Aus diesem Grunde wird die Feinpositionierung im Rahmen der Messung durch **piezelektrische Verstellische** vorgenommen. Auf diese Weise wird der Objektträger während der Messung mit einer Schrittweite von 20 nm mit hoher Genauigkeit in Richtung der optischen Achse bewegt. Im Mikroskopaufbau wird dazu ein Piezo-Lineartisch (Modell P-915.723, PI GmbH Co.) verwendet, mit dem eine schnelle Positionierung des Objektträgers über einen Bereich von  $200\ \mu\text{m} \times 200\ \mu\text{m}$  entlang der optischen Achse gewährleistet wird. Mittels kapazitiver Sensoren erhält

---

<sup>10</sup>Industriestraße 12, 82194 Gröbenzell, <http://www.phytron.de>

<sup>11</sup>Beim Eberacker 3, 35633 Lahnau

man eine die hohe Positionsauflösung bei einer Wiederholbarkeit im Bereich weniger Nanometer.

Um die Phase des Wellenfeldes durch ein feststehendes Objekt durchfahren zu können, wurde der linke Interferometerspiegel auf ein lineares Piezo-Mikrostelltisch (Modell P-770.10, PI) montiert, das einen Verstellweg von  $7\ \mu\text{m}$  mit hoher Positionsauflösung und guter Wiederholbarkeit aufweist.

Die Regelung wird über ein Steuerelement (Modell P-864.00) vorgenommen, welches über eine RS-232-Schnittstelle mit dem Steuer-PC verbunden ist.

### 5.1.3. **Aufbau des Detektionsstrahlengangs**

Die Abbildung bzw. Detektion des untersuchten Objekts erfolgt analog zur konventionellen Epifluoreszenz-Mikroskopie über eines der beiden Objektive und eine Tubulinse, welche das Fluoreszenzlicht auf einen geeigneten Detektor fokussiert (Detektionsstrahlengang, siehe Abbildung 5.5). Im hier vorgestellten Mikroskopaufbau wird das rechte Objektiv zur Detektion verwendet, indem das im Fokus des Objektivs aufgesammelte Fluoreszenzlicht in parallelem Strahlengang auf den **dichroitischen Strahlteiler** geführt und unter einem Einfallswinkel von  $45^\circ$  nach oben in den Detektionsstrahlengang reflektiert wird. An dieser Stelle befindet sich eine in der mechanischen Werkstatt des Kirchhoff-Instituts für Physik hergestellte Halterung, die einen Spiegel enthält, welcher das Fluoreszenzlicht unter einem Einfallswinkel von  $45^\circ$  wieder parallel zur Breadboardoberfläche ausrichtet. Am Ausgang dieses Gehäuses ist die **Tubulinse** vom Typ E 00/1x (Leica) angebracht, die das Fluoreszenzlicht auf den Detektor fokussiert, bei dem es sich in diesem Fall um eine konventionelle CCD<sup>12</sup>-Kamera (siehe Abschnitt Kamera und Detektionssystem) handelt. Die Tubulinse mit einer Brennweite von  $f = 16\ \text{cm}$  bildet in Kombination mit dem auf „unendlich“ gerechneten Objektiv ein optisch korrigiertes System zur Minimierung sphärischer und chromatischer Aberrationen. Unmittelbar vor die CCD-Kamera wird noch ein **Blocking-Filter** (Typ HQ 467 LP, AHF analysentechnik AG<sup>13</sup>) eingebaut, der Photonen im Bereich der Anregungswellenlänge herausfiltert, die z.B. aus Streulicht oder Reflexion ( $\leq 5\%$ ) von Anregungslicht in den Detektionsstrahlengang durch den dichroitischen Strahlteiler herrühren.

Um Bilder des Objektraums auf die CCD-Kamera scharf abbilden zu können, ist es erforderlich, die Distanz des CCD-Chips von der Tubulinse richtig einzustellen. Diese Einstellungen wurden hier durch Fokussieren auf einen „unendlich“ weit (hier etwa 3 m) entfernten Lichtpunkt und dessen scharfe Abbildung auf dem CCD-Chip vorgenommen. Hierzu musste die Position der Kamera und des Detektionsstrahlengangs bezüglich der Strahlachse zunächst genau ausgerichtet werden. Erst danach konnte durch Veränderung der Kameraposition in Richtung der optischen Achse ei-

---

<sup>12</sup>Charged Coupled Device

<sup>13</sup>Kohlplattenweg 18, 72074 Tübingen

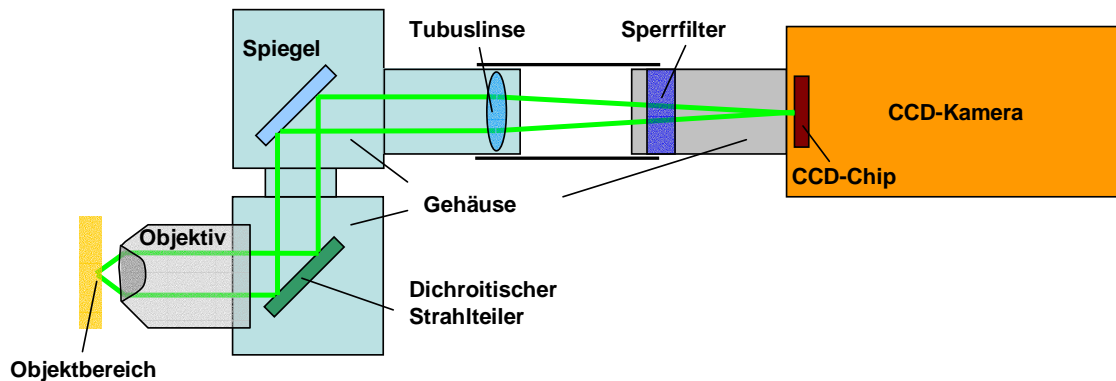


Abbildung 5.5.: Strahlengang zur Detektion des Fluoreszenzlichts aus dem Objektbereich.

ne Anpassung des Abstands zwischen Tubuslinse und CCD-Chip erreicht werden, so dass der entfernte Lichtpunkt scharf abgebildet wurde.

### Kamera und Detektionssystem

Der hier realisierte Aufbau ermöglicht die Aufnahme zweidimensionaler Bilder fluoreszierender Objekte. Diese Aufnahmen sollen einerseits mit möglichst kleiner emittierter Photonenzahl und andererseits auch in relativ kurzer Zeit durchgeführt werden. Diese Anforderungen können nur erfüllt werden, wenn zur Detektion eine CCD-Kamera als Halbleiterflächendetektor mit hoher Empfindlichkeit bzw. Quanteneffizienz (QE) und schneller Auslese bei geringem Ausleserauschen verwendet wird.

In dem hier beschriebenen Mikroskopaufbau wird dabei eine **Schwarz-Weiß CCD-Kamera** vom Typ Imager 3 der Firma LaVision GmbH<sup>14</sup> mit einer Quantenausbeute von  $\approx 40\%$  im sichtbaren Bereich verwendet (Spezifikationen siehe Tabelle 5.1). Der Progressive-Scan-CCD-Chip besitzt 1024 Pixel in vertikaler und 1280 Pixel in horizontaler Richtung (SVGA-Auflösung). Der gegenseitige Abstand der einzelnen Pixel beträgt in beiden Richtungen jeweils  $6,7 \mu\text{m}$ . Auf diese Weise ergibt sich aus einer 100-fachen Objektivvergrößerung und einer einfachen Vergrößerung der Tubuslinse eine Abtastweite im Objektraum von  $6,7 \cdot 10^{-6}\text{m}/100 = 6,7 \cdot 10^{-8}\text{m} = 67 \text{ nm}$ , womit das Abtasttheorem (siehe Gleichung (2.30) in Abschnitt 2.2.2) für die praktisch erreichbare Auflösung des Mikroskops erfüllt ist.

Die Empfindlichkeit der Kamera kann durch das sogenannte „Binning“ erhöht werden, wobei jeweils zwei oder mehr nebeneinanderliegende Pixel „zusammengefasst“ und deren Intensitätswerte addiert werden. Auf der anderen Seite wird durch das „Binning“ aber auch die effektive Pixelgröße erhöht, so dass meist maximal zwei Pixel zusammengefasst werden. Dieses Vorgehen ist insbesondere im Rahmen der

<sup>14</sup>Anna-Vandenhoeck-Ring 19, 37079 Göttingen, <http://www.lavision.de>

Anzahl Pixel	1280 (horizontal) × 1024 (vertikal)
Pixelgröße	6,7 μm × 6,7 μm
Größe des CCD-Chips	8,6 mm × 6,9 mm
CCD-Temperatur	−12° C
Spektralbereich	400-900 nm
„Full-Well Capacity“	25000 e <sup>−</sup>
Frequenz des A/D-Wandlers	12,5 MHz
Digitalisierungstiefe	12 Bit
A/D-Konversionsfaktor	5 e <sup>−</sup> /Count
Ausleserauschen	7 bis 8 e <sup>−</sup>
Maximale Quanteneffizienz	56 % bei 340 nm
Mittlerer Dunkelstrom	< 0,1 e <sup>−</sup> /pixel/s
Maximale Bildwiederholrate (Vollbild)	8/s
Maximale Bildwiederholrate (Teilbild)	32/s
Integrationszeit	0,001 bis 1000 s
Binning	1-8 (horizontal), 1-128 (vertikal)
Serielle Verbindung	Koaxial (10 m)

**Tabelle 5.1.:** Spezifikationen der Imager 3 CCD-Kamera (LaVision GmbH).

Objektsuche vor der Messung hilfreich, um schwach fluoreszierende Objekte aufzufinden.

Die Geschwindigkeit mit der die Auslese des CCD-Chips vorgenommen wird, hängt im Wesentlichen davon ab, ob der gesamte Chip oder nur ein vorher festgelegten Teilbereich des Chips, die **ROI** (*engl. Region of Interest*) ausgelesen werden soll. Dabei können ROI der Größen 32 × 32, 64 × 64, 128 × 128, 256 × 256 und 512 × 512 Pixel gesetzt werden. Da der eingebaute Analog-zu-Digital (A/D)-Wandler mit einer Frequenz von 12,5 MHz arbeitet, werden maximal 12,5 · 10<sup>6</sup> Pixel bzw. 8 Vollbilder pro Sekunde ausgelesen. Wird hier eine kleine ROI gesetzt bzw. mit „Binning“ gearbeitet, kann die Bildwiederholrate bis auf das Vierfache gesteigert werden, so dass bis zu 32 Teilbilder pro Sekunde ausgelesen werden können.

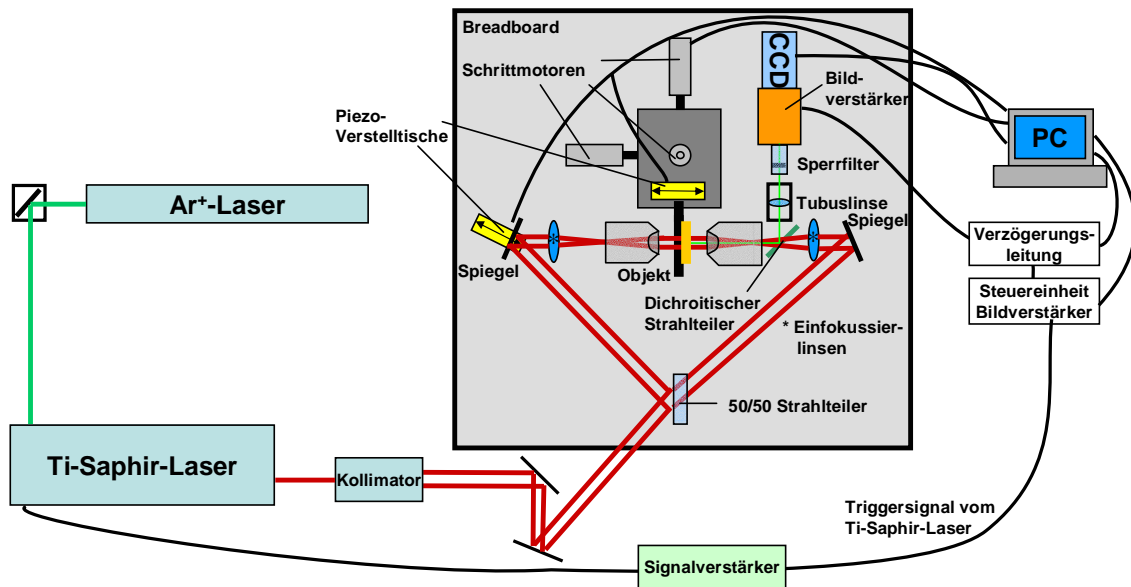
Die gemessenen Intensitätswerte werden mit 12 Bit digitalisiert, das bedeutet, dass es  $Q = 2^{12} = 4096$  verschiedene Quantisierungsstufen gibt. Ein CCD-Zählereignis bzw. CCD-Count entspricht dabei der Differenz zweier Quantisierungsstufen, die identisch mit der Detektion von fünf Photonen ist. Um die Kamerasteuerung und das Auslesen der Bildinformation aus Speicher der Kamera direkt über den Steuer-PC erledigen zu können, wird eine spezielle **Framegrabber-Karte** benötigt, welche mit der Kamera über ein serielles Schnittstellenkabel verbunden ist.

Zur Reduzierung thermisch induzierter Elektron-Loch-Paare im CCD-Chip, welche zu nichtkorrelierten CCD-Counts führen (**thermisches Rauschen**), wird der CCD-Chip mittels eines Peltier-Elements auf −11° C gekühlt. Die dabei entstehende

Kühlluft wird über einen Ventilator im Kameragehäuse abtransportiert.

## 5.2. SMI-Mikroskop für Zweiphotonen-Anregung

Wie bereits in Abschnitt 4.5 erläutert, ergeben sich bei Anwendung der Zweiphotonen-Anregung im Rahmen der SMI-Mikroskopie verschiedene Vorteile bzw. Erweiterungen im Vergleich zur Einphotonen-Anregung, welche eine experimentelle Realisierung grundsätzlich sinnvoll erscheinen lassen. Aus diesem Grunde wurde auf der Grundlage des in Abschnitt 5.1 beschriebenen Mikroskopaufbaus mit Einphotonen-Anregung ein Ausbau zur Zweiphotonen-Anregung vorangetrieben. Dabei war es notwendig, unter prinzipieller Erhaltung der geometrischen Grundstruktur des Aufbaus, einzelne Komponenten des Experiments an die Anforderungen der Zweiphotonen-Anregung, insbesondere im Hinblick auf die veränderten Wellenlängen und die gepulste Anregung anzupassen. Die erforderlichen Anpassungen und die dazu verwendeten Komponenten werden in diesem Abschnitt beschrieben. Die dabei realisierte Grundstruktur des Aufbaus ist in den Abbildungen 5.6 und 5.7 dargestellt.



**Abbildung 5.6.:** Schematische Darstellung des SMI-Mikroskopaufbaus unter Verwendung der Zweiphotonen-Anregung  $\lambda_{ex} \approx 760$  nm.

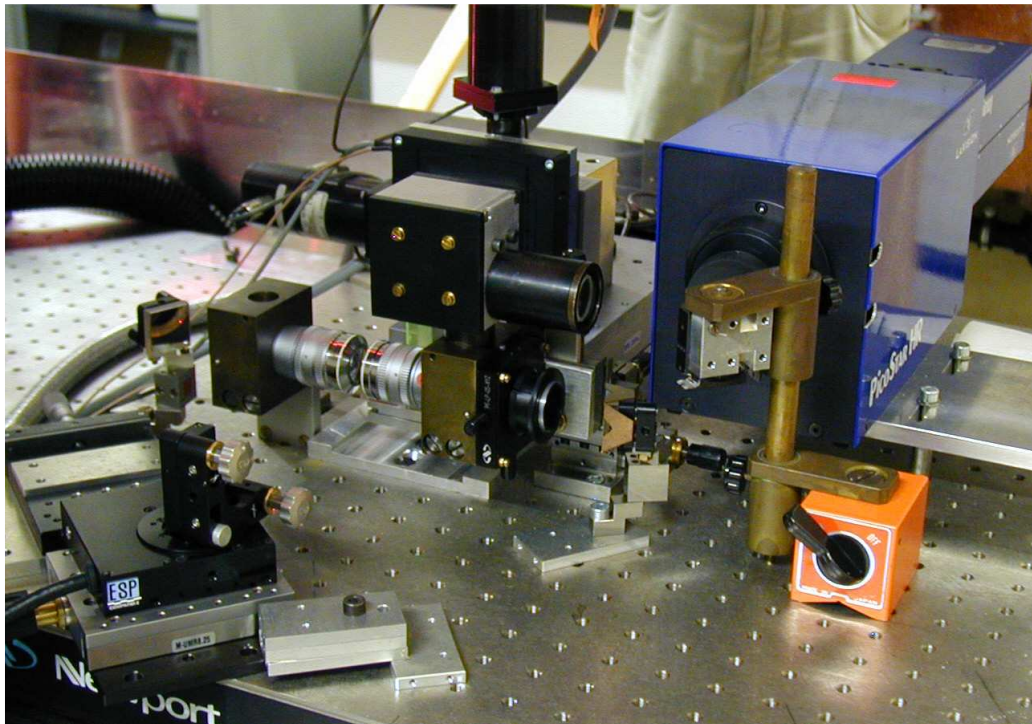


Abbildung 5.7.: SMI-Mikroskop zur Verwendung mit Zweiphotonen-Anregung.

### 5.2.1. Aufbau des Anregungsstrahlengangs

Für die Fluoreszenz-Anregung mittels des Zweiphotonen-Effekts wird ein Laserstrahl im Wellenlängenbereich von  $\lambda \approx 700$  bis 1000 nm (**Nah-Infrarot, NIR**) mit hoher Intensität benötigt. Diese Anforderungen werden durch einen NIR-Kurzpuls-Laser erfüllt, der sehr kurze Pulse hoher Intensität erzeugt und daher z.B. auch zur Messung von Fluoreszenzlebensdauern herangezogen werden kann.

#### Einkopplung des Lasers

In der hier durchgeführten experimentellen Realisierung wird als NIR-Kurzpuls-Laser ein Titan(Ti)-Saphir-Laser vom Typ Mira 900 F der Firma Coherent in den bestehenden Aufbau des SMI-Mikroskops integriert. Um die Pumpenergie für diesen Laser zur Verfügung zu stellen, wird der bereits zur Einphotonen-Anregung verwendete  $\text{Ar}^+$ -Laser (Innova 310, Coherent) verwendet, der dafür jedoch auf die maximale Ausgangsleistung von 10 Watt optimiert werden muss.

In enger Zusammenarbeit mit Herrn Dipl.-Phys. Christian Müller aus der Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Dr. Jürgen Wolfrum (Physikalisch-Chemisches-Institut der Universität Heidelberg) wurde der Ti-Saphir-Laser auf dem schwingungsfreien Tisch montiert und bezüglich des Pumplaserstrahls einjustiert. Dabei wird der senkrecht



polarisierte Pumplaserstrahl zunächst parallel polarisiert und daraufhin auf den Ti-Saphir-Kristall geführt, in dem der NIR-Laserstrahl erzeugt und anschließend in einem Ringresonator verstärkt wird. Um einen optimalen Betrieb des Ti-Saphir-Lasers sicherzustellen, wurde der Laser zunächst im cw-Modus betrieben und auf maximale Ausgangsleistung abgestimmt, die bei etwa 1,6 W liegt. Nachdem der cw-Modus sicher etabliert war, wurde auf den gepulsten Modus (mode locking) umgestellt. Um diesen zu erhalten, wird der Kerrlinseneffekt, der durch die hohe Lichtintensität im Kristall entsteht, ausgenutzt. Dabei wird ein Laserpuls mit hoher zeitlich und räumlich begrenzter Energie im Kristall fokussiert, wodurch der Strahldurchmesser im gepulsten Betrieb deutlich verringert wird. Eine enge Blende im Resonator sorgt dafür, dass nur der durch den Kerreffekt verengte gepulste Strahl verstärkt wird, während der breitere kontinuierliche Laserstrahl unterdrückt wird. Die dabei erhaltene Pulsform und die Wiederholrate werden mit Hilfe eines schnellen Zweikanal-Digitalspeicheroszilloskops (Typ TDS 220/A1, Tektronix Inc.<sup>15</sup>) kontrolliert, das direkt an den Ausgang der internen Photodiode zur Leistungsmessung des Ti-Saphir-Lasers angeschlossen wird. Auf diese Weise wird bei einer Pumpleistung von 10 W ein stabiler, gepulster NIR-Laserstrahl ( $\lambda = 760$  nm) mit einer Pulsbreite von 200 fs bei einer Wiederholrate von 76 MHz zur Verfügung gestellt, dessen mittlere Ausgangsleistung bei etwa 0,8 W liegt.

Parallel zur Inbetriebnahme des Lasersystems wurde die Einkopplung des Laserstrahls in das SMI-Mikroskop vorbereitet. Dazu wurde eine hochpräzise Strahlhöhenanpassung mit silberbeschichteten Spiegeln (Typ 13E20ER.2, Newport) zusammengesetzt aus den Spiegelhaltern (Typ 670-RCB und 670-RCT, Newport) sowie dem Montagestab (Typ M-70, Newport) montiert, um die Höhendifferenz zwischen dem Strahlaustritt am Ti-Saphir-Laser und der Strahlebene im SMI-Interferometer auszugleichen. Zur Anpassung des Laserstrahldurchmessers an die Pupillenweite der verwendeten Mikroskopobjektive wurde der in Abschnitt 5.1.1 beschriebene Kollimator zur Aufweitung des Laserstrahls verwendet. In diesem Fall werden in den Kollimator eine Konkavlinse mit einer Brennweite von -20 mm und eine Konvexlinse mit einer Brennweite von 30 mm eingesetzt. Damit konnte ein paralleler NIR-Laserstrahl mit einem sichtbaren Durchmesser von etwa 3-5 mm eingestellt werden.

### Interferometer

Die prinzipielle Struktur des trigonalen Interferometeraufbaus wurde bei der Realisierung der Mikroskopie mit Zweiphotonen-Anregung nicht verändert. Dennoch ist es erforderlich, einzelne Komponenten des Interferometers an die Verhältnisse der Zweiphotonen-Anregung anzupassen. In diesem Fall wird ein 50/50-Strahlteiler verwendet, der speziell für den Nah-Infrarotbereich angefertigt wurde (Typ 50/50 VIS-

---

<sup>15</sup>P.O. Box 500 Beaverton, OR 97077

NIR-Strahlteiler (L/10), AHF). Dabei handelt es sich um ein beschichtetes, planares Substrat mit einer Dicke von 3 mm und einem Durchmesser von 25 mm, das mit einer feinjustierbaren Linsenhalterung (Typ U100A, Newport) auf dem Breadboard befestigt wurde. Auch in diesem Fall wird der unter dem Brewsterwinkel einfallende Laserstrahl zu 50 % transmittiert und zu 50 % unter 90° reflektiert. Bei der Zweiphotonen-Anregung mittels eines gepulsten Ti-Saphir-Lasers kann ein planarer Strahlteiler an dieser Stelle verwendet werden, da sich Mehrfachreflexionen aufgrund des zeitlichen Abstands der Laserpulse nicht auf die Interferometrie, die innerhalb einer Kohärenzlänge stattfindet, auswirken.

Die beiden weiteren Interferometerspiegel und die beiden Objektivhalterungen mit den Einfokussierlinsen sind identisch zu der in Abschnitt 5.1 dargestellten Konfiguration. Für die Messungen mit Zweiphotonen-Anregung können hier sowohl Ölimmersionsobjektive mit einer numerischen Apertur von  $NA = 1,25$  bei 100-facher Vergrößerung als auch Luftobjektive mit 40-facher Vergrößerung bei einer numerischen Apertur von  $NA = 0,65$  (Standardobjektive, 40x/0,65, Edmund Industrie Optik GmbH<sup>16</sup>) verwendet werden. Die Einstellung der Kollimation des Linsensystems aus Einfokussierlinse und Objektiv wird bei Anwendung der Zweiphotonen-Anregung nicht mittels einer „Shearing Plate“ vorgenommen, da die mit den Augen wahrnehmbare Intensität für eine derartige Untersuchung nicht ausreicht. Unter dieser Voraussetzung wird das Anregungslicht zuerst zur Einfokussierlinse und dann durch das Objektiv geführt. Das Licht, welches das Objektiv nach vorne verlässt wird in einiger Entfernung (hier etwa 1 m) auf einen Schirm projiziert. Die axiale Position der Einfokussierlinse wird daraufhin solange eingestellt, bis der Durchmesser des Lichtpunkts auf dem Schirm minimal wird.

Der detektionsseitige **dichroitische Strahlteiler**, der in die Objektivhalterung zwischen Objektiv und Einfokussierlinse eingebaut ist, muss im Falle der Zweiphotonen-Anregung durch einen Strahlteiler ersetzt werden, welcher das NIR-Anregungslicht ( $\lambda \geq 720$  nm) transmittiert und das sichtbare Detektionslicht ( $\lambda \leq 680$  nm) in den Detektionsstrahlengang reflektiert. Zu diesem Zweck wird ein dichroitischer Strahlteiler vom Typ 670 DCXXR (AHF) verwendet. Um eine möglichst hohe Laserintensität im Objektbereich zu erhalten sowie auch aus Kostengründen, wurde bei dieser Modifikation auf den identischen Strahlteiler in der zweiten Objektivhalterung verzichtet, da hier eine zusätzliche Detektion über das zweite Objektiv nicht in Erwägung gezogen wird.

Die gesamte Justage des Interferometers erfolgt analog zum Mikroskop mit Einphotonen-Anregung, wobei in diesem Fall die Vorteile der Verwendung des optoakustischen Wandlers besonders deutlich werden, da das intensive NIR-Licht von den Augen nur sehr schwach wahrgenommen wird. Der optoakustische Wandler ist aber gerade im Infrarotbereich sehr empfindlich, so dass mit dessen Hilfe sehr gut auf maximale Lichtintensität abgestimmt werden kann. Zur weitgehenden Vermeidung

---

<sup>16</sup>Greschbachstraße 23, 76229 Karlsruhe

der besonderen Gefahren durch den unsichtbaren, leistungsstarken NIR-Strahl bei den Justagearbeiten wurde ein He-Ne-Laser mit einer Ausgangsleistung von 1 mW installiert, der ausschließlich als Hilfsmittel zur Justage verwendet und bei Bedarf anstelle des NIR-Strahls in den Strahlengang eingespiegelt wird. Dazu war es erforderlich, die Strahlen von Ti-Saphir-Laser und He-Ne-Laser im Bereich des Kollimators und damit auch des Mikroskops möglichst genau zu überlagern. Hierzu wurde zunächst der NIR-Strahl durch den Kollimator geführt und die daraus resultierende Strahlposition auf einem Schirm abgebildet und markiert. Der He-Ne-Laser wurde dann in den Strahlengang eingespiegelt und auf die Markierung ausgerichtet. Dieser wesentlich weniger gefährliche Laserstrahl kann somit bei allen weiteren Veränderungen und Einstellungen am Mikroskop als Justagestrahl verwendet werden, so dass bei Einkopplung des NIR-Strahls nur noch sehr geringe Korrekturen vorzunehmen sind.

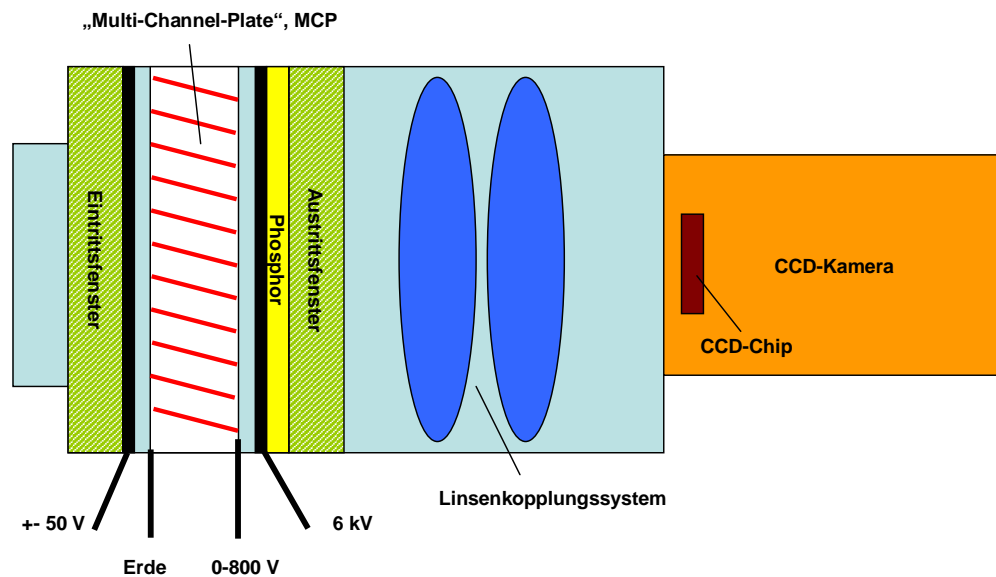
Die gesamte **Objekt- und Spiegelpositionierung** wurde nicht modifiziert und erfolgt wie in Abschnitt 5.1.2 beschrieben.

### 5.2.2. Aufbau des Detektionsstrahlengangs

Der Strahlengang zur Detektion der durch Zweiphotonen-Anregung hervorgerufenen Fluoreszenzemission entspricht grundsätzlich der in Abschnitt 5.1.3 dargestellten Konfiguration, wobei aber die speziellen Anforderungen durch die geänderte Anregungswellenlänge zu berücksichtigen sind. So ist in diesem Fall ein dichroitischer Strahlteiler zu verwenden, der das NIR-Anregungslicht transmittiert und das Fluoreszenzlicht im sichtbaren Spektralbereich nach oben in den Detektionsstrahlengang reflektiert. Darüberhinaus muss das **Blocking-Filter** (Typ E700SP, AHF), welches vor den Detektor gesetzt wird so spezifiziert sein, dass Licht mit Wellenlängen von  $\lambda > 680$  nm möglichst vollständig geblockt und sichtbares Licht durchgelassen wird. Das zur Detektion der Fluoreszenzintensität verwendete Detektionssystem besteht im Fall der Zweiphotonen-Anregung aus der oben beschriebenen CCD-Kamera, vor die jedoch noch ein Bildverstärker vorgeschaltet werden kann, mit dem zeitaufgelöste Messungen ermöglicht werden.

#### Kamera und Detektionssystem

Zur Detektion des Fluoreszenzlichts im Rahmen der Zweiphotonen-Anregung wird das Kamerasystem **PicoStar HR12** der Firma LaVision GmbH verwendet (siehe Abbildung 5.8). Dieses Detektionssystem beinhaltet die bereits in Abschnitt 5.1.3 eingehend beschriebene **CCD-Kamera Imager 3**, einen **Micro-Channel-Plate(MCP)-Bildverstärker** sowie einen **Picosekunden-Verzögerungs-Generator**. Alle Komponenten werden durch einen Personalcomputer mittels der von LaVision bereitgestellten Software **DAVIS** angesteuert.



**Abbildung 5.8.:** Aufbau und Struktur des Detektionssystems PicoStar HR12, das grundsätzlich aus dem Bildverstärker und der CCD-Kamera zusammengesetzt ist.

Im Rahmen des experimentellen Einsatzes der PicoStar HR12 kann das Detektionssystem sowohl als konventionelle CCD-Kamera als auch in Kombination mit dem tastbaren MCP-Bildverstärker und dem Verzögerungs-Generator zur Messung von Fluoreszenzlebensdauern herangezogen werden. Auf diese Weise wurde zuerst unter Fokussierung des Anregungslichts im Objektraum die prinzipielle Realisierung des Zweiphotonen-Effekts und dessen quadratische Abhängigkeit von der Anregungsintensität mittels der CCD-Kamera überprüft. Zur Messung von Fluoreszenzlebensdauern oder auch zur Messung sehr schwacher Fluoreszenzsignale ist der Aufbau und die Anwendung des kompletten Detektionssystems erforderlich, bei dem es sich grundsätzlich um eine bildverstärkte CCD-Kamera (*engl. intensified CCD, ICCD*) mit sehr schnellen Tastzeiten handelt. Dieses System ermöglicht neben zeitlich hochaufgelösten Messungen auch die Detektion einzelner Photonen, da die verwendete Photokathode eine hohe Empfindlichkeit bis in den UV-Bereich aufweist. Der empfindliche Bildverstärker mit einem Kathodendurchmesser von 18 mm ist mit einem sehr schnellen **elektronischen Shutter** ausgestattet, der Tastzeiten bis hinunter zu 200 ps bei einer Auflösung von 10 Linien/mm und einer Pulswiederholrate von 100 MHz ermöglicht. Die Kopplung des Bildverstärkers an den CCD-Chip wird mittels eines Linsensystems vorgenommen, welches zwischen dem Austrittsfenster des Bildverstärkers und dem CCD-Chip im Kameragehäuse eingebaut ist. Der Bildverstärker selbst ist in einer Vakuumröhre untergebracht und besteht aus der **Photokathode**, der **Micro-Channel-Plate** und dem **Leuchtschirm**. Die durch den

Detektionsstrahlengang auf die Photokathode fokussierten Photonen erzeugen im Kathodenmaterial Elektronen, wobei sich bei Photonen der Wellenlänge  $\lambda \approx 500$  nm eine Quanteneffizienz von etwa 14% ergibt. Das bedeutet, dass sieben Photonen zur Generierung eines Elektrons notwendig sind. Das negative Potential der Photokathode gegen die MCP wird nur während der Tastzeit aufrechterhalten, so dass die Elektronen außerhalb der Tastzeit nicht beschleunigt und folglich auch nicht detektiert werden. Innerhalb der Tastzeit erfolgt eine Beschleunigung der Photoelektronen auf die MCP. Dabei handelt es sich um eine 1 mm starke Verstärkerplatte, die viele Löcher mit einem Durchmesser von  $10 \mu\text{m}$  gruppiert in einer hexagonalen Struktur enthält. Zwischen Eingang und Ausgang der MCP wird eine Hochspannung in der Weise angelegt, dass Elektronen, welche mit den Wänden der MCP-Röhren kollidieren, weitere Elektronen (*Sekundärelektronen*) auslösen und dadurch eine „Elektronenlawine“ erzeugt wird. Die Verstärkung hängt dabei vor allem von der angelegten Hochspannung ab und kann maximal etwa den Faktor  $10^4$  erreichen. Nach dem Verlassen der MCP wird die entstandene „Elektronenlawine“ durch eine Spannung von 6 kV auf den Leuchtschirm beschleunigt, in dem für jedes eintreffende Elektron etwa 200 „grüne“ Photonen erzeugt werden. Dieses auf dem Leuchtschirm erzeugte „Bild“ wird mittels eines Linsensystems auf den CCD-Chip abgebildet.

MCP	260-800 V nach Werkseinstellung
Leuchtschirm	5,8 kV plus MCP-Spannung
Kathodenspannung	-50 bis +50
Negative Vorspannung	-50 bis +50

**Tabelle 5.2.:** Spezifikationen der Bildverstärker-Kontrolleinheit (LaVision GmbH).

Die Steuerung des Bildverstärkers wird durch eine spezielle Kontrolleinheit vorgenommen, mit der alle relevanten Parameter eingestellt und überwacht werden. Die Kontrolleinheit beinhaltet die Niedervolt-Spannungsversorgung mit der auch die Spannungspulse zur zeitlichen Steuerung des Bildverstärkers bereitgestellt werden. Die zur Bildverstärkung erforderlichen Hochspannungen werden mittels einer Hochspannungsversorgung realisiert, deren Spezifikationen in Tabelle 5.2 zusammengefasst sind. Die integrierte Signalverarbeitung ermöglicht die Auswahl verschiedener Arbeitsmodi und Triggerschwellwerte. Dabei sind insgesamt folgende Arbeitsmodi vorgesehen:

Die Ansteuerung der Bildverstärker-Kontrolleinheit erfolgt mittels eines eingebauten „**Microcontrollers**“, welcher über eine serielle RS 232 Schnittstelle durch den Steuerrechner angesprochen wird.

Um das externe Triggersignal, das in diesem Fall vom Ti-Saphir-Laser gegeben wird vor dem Triggern des Bildverstärkers zeitlich verzögern zu können, wird eine Picosekunden Verzögerungseinheit **ps Delay Unit** zwischen den Triggersignalgeber

## 5. Aufbau und Justage eines Mikroskops mit räumlich modulierter Anregung

Logischer bzw. „Slave“-Modus	Bindung des Bildverstärkers an ein logisches Signal, z.B. ein PC Triggersignal.
DC-Modus	Kontinuierlicher Betrieb des Bildverstärkers.
COMB-Modus	Generiert ein Zeitfenster („Gate“) für jedes ankommende externe Triggersignal.
RF-Modus	Der Bildverstärker wird mittels eines externen sinusförmigen Signals moduliert.
Benutzerdefinierter Modus	Dieser Modus kann vom Benutzer individuell programmiert werden.

**Tabelle 5.3.:** Arbeitsmodi des Bildverstärkers (LaVision GmbH).

Einstellbare Verzögerungszeit	0-20 ns
Interne Verzögerung	$\approx 4,5$ ns
Inkrement der Verzögerungsschritte	25 ps
Interner Schrittfehler	$< 25$ ps
Jitter	praktisch nicht vorhanden
Charakteristische Impedanz	50 $\Omega$

**Tabelle 5.4.:** Spezifikationen Picosekunden Verzögerungseinheit (LaVision GmbH).

und den Bildverstärker geschaltet. Die Verzögerungseinheit basiert auf Verzögerungsleitungen verschiedener Länge, die über elektrische Relais geschaltet werden. Auf diese Weise werden Verzögerungen bzw. Zeitmessungen mit einer maximalen Dauer von 20 ns in 25 ps Schritten durchführbar. Die Spezifikationen der ps Verzögerungseinheit sind in Tabelle 5.4 angegeben.

Die Ansteuerung der Picosekunden-Verzögerungseinheit wird ebenfalls mittels einer RS 232 Schnittstelle über den Steuerrechner durchgeführt. Wie bereits erwähnt, werden alle Komponenten des Detektionssystems mittels der Software DAVIS verwaltet, so dass im Rahmen der Messungen ein komfortabler Umgang mit dem Detektionssystem gewährleistet ist. Eine Software zur Steuerung des Mikroskopaufbaus insbesondere bezüglich der Objektpositionierung wurde von Herrn Dr. Benno Albrecht in unserer Arbeitsgruppe entwickelt. Beide Programme werden während der Messungen problemlos unter Verwendung desselben Betriebssystems eingesetzt, was eine übersichtliche Durchführung der Messungen ermöglicht.

## 6. Messungen und Ergebnisse

In diesem Kapitel werden die Durchführung der Messungen und die dabei erhaltenen Ergebnisse vorgestellt. Dazu wird nach einer kurzen Einführung in die Präparation der Objekte und die Feinjustage des Mikroskops einschließlich des Aufsuchens zur Aufnahme geeigneter Objekte die Durchführung der Sequenzaufnahmen beschrieben. Die mittels dieser Sequenzaufnahmen erhaltenen axialen Intensitätsverteilungen werden zur Bestimmung der axialen Positionen und Distanzen einzelner fluoreszierender Objekte verwendet und lassen darüberhinaus auch Rückschlüsse auf die Objektgröße zu. Zur Auswertung der Messdaten werden die in den Abschnitten 4.4.3 und 4.4.4 vorgestellten Anpassungsmethoden angewendet.

Im zweiten Teil dieses Kapitels werden Messungen und Ergebnisse unter Anwendung der Zweiphotonen-Anregung dargestellt. Dabei werden nach der Vorstellung erster Testmessungen im bereits weitgehend etablierten fokussierten Betriebsmodus auch Messungen im **Epifluoreszenzmodus** beschrieben, bei welchen der Durchmesser des anregenden Laserstrahls auf etwa 40 bis 50  $\mu\text{m}$  aufgeweitet wird. In diesem Zusammenhang werden auch Messungen der Fluoreszenzlebensdauer an verschiedenen Farbstoffen vorgestellt, die als zusätzliche **spektrale Signatur** zur Unterscheidung in der Fluoreszenzmikroskopie herangezogen werden kann. Eine Beschreibung der Experimente zur Implementierung der SMI-Anregung schließt dieses Kapitel ab.

### 6.1. Einphotonen-Anregung mit einer Anregungswellenlänge von 458 nm

Die Anregungswellenlänge von 458 nm ist besonders gut zur Anregung in der biologischen Forschung häufig verwendeter Fluoreszenzfarbstoffe wie beispielsweise **Cyan Fluorescent Protein (CFP)**, „Fluorol 555“, einige Coumarine, AMCA-6-dUTP sowie Riboflavin geeignet, ohne dazu UV-Lichtquellen verwenden zu müssen. Weiterhin ist bei dieser Wellenlänge davon auszugehen, dass die in Abschnitt 4.4.4 beschriebene Größemessung zu kleineren Durchmessern hin ausgedehnt werden kann (siehe Kalibrationskurven zur Größemessung in Abbildung 4.13 auf Seite 59).

### 6.1.1. Durchführung der Messungen

Zur Untersuchung der physikalischen Eigenschaften des SMI-Mikroskops und zur Messung der axialen Intensitätsverteilungen kommen in der Regel physikalische Probekörper bzw. fluoreszierende Nanopartikel, sogenannte *Beads* zum Einsatz. In diesem Fall werden grün fluoreszierende Nanopartikel (Polymer Microspheres Green Fluorescing 468/508, Duke Scientific Corp.<sup>1</sup>) mit Durchmessern von 57 nm, 71 nm, 100 nm, 140 nm und 200 nm verwendet. Bei der Objektpräparation werden 10  $\mu\text{l}$  Suspension mit Beads auf einen handelsüblichen Objektträger mit den Abmessungen  $L \times B \times H = 76 \text{ mm} \times 26 \text{ mm} \times 1 \text{ mm}$  aufgebracht. Nach vollständigem Eintrocknen der Suspension wird ein Tropfen des Einbettungsmediums **Vec-tashield** ( $n \approx 1,46$ , Vector Laboratories<sup>2</sup>) auf den Objektträger getropft. Dieser Objektträger wird mit einem Deckglas der Stärke  $170 \mu\text{m}$  abgedeckt und an den Rändern mit Nagellack versiegelt. Die verwendete Partikel-Suspension wird dabei in Abhängigkeit von der betrachteten Fragestellung mehr oder weniger stark verdünnt. So wurde die Feineinstellung des Mikroskops und der dabei erhaltenen Modulation direkt mit der Suspension des Herstellers vorgenommen, während die Größen- und Positionsmessungen mit einer 1:200 verdünnten Suspension durchgeführt wurden.

Zur Durchführung der Messungen wurde die Ausgangsleistung des Multiline-Ar<sup>+</sup>-Lasers auf etwa 2 W eingestellt, so dass sich nach der Aufspaltung der einzelnen Laserlinien eine Leistung von 20 mW auf der 458 nm-Linie ergab. Daraus folgt eine Energiedichte von etwa  $20 \text{ mW}/30000 \mu\text{m}^2 \approx 70 \text{ W}/\text{cm}^2$  im Objektbereich.

Die gesamte Steuerung der Objektpositionierung und Fluoreszenzdetektion wurde mittels einer Steuersoftware vorgenommen, die in unserer Arbeitsgruppe von Herrn Dr. Benno Albrecht [Albrecht02a] speziell zu diesem Zweck entwickelt wurde. Zur abschließenden Feinjustage des Mikroskopaufbaus wurde ein Objektträger mit relativ dicht liegenden Nanopartikeln mit einem Durchmesser von 100 nm verwendet, der in die Fokusebene des Detektionsobjektivs eingebracht wurde. Die Positionierung erfolgte hier über die in Abschnitt 5.1.2 beschriebenen Schrittmotoren. Die Belichtungszeit der Kamera wurde auf 0,2 bis 0,4 Sekunden eingestellt. Die Steuersoftware erlaubt in diesem Zusammenhang Schwellwert und Verstärkung der Signaldarstellung am Bildschirm so zu optimieren, dass die detektierten Objekte gut sichtbar werden. Auf diese Weise konnte das Interferenzmuster bzw. die Modulation, welche sich im Objektbereich als Muster abwechselnd heller und dunkler Streifen ausbildet, beobachtet und optimiert werden. Zur Optimierung der Modulation wurden präzise Einstellungen an den Interferometerspiegeln bzw. dem 50/50-Strahlteiler vorgenommen, um damit möglichst breite und kontrastreiche Streifen zu erhalten. In diesem Zusammenhang sollte auch darauf geachtet werden, dass die Intensität beider Teilstrahlen im Interferometer gut übereinstimmt (siehe Abschnitt 4.4.4). Diese Übereinstimmung konnte jedoch nur grob abgeschätzt werden, indem jeweils ein Teilstrahl abgedeckt

---

<sup>1</sup>2463 Faber Place, Palo Alto, CA 94303

<sup>2</sup>Burlingame, California



und die verbleibende Fluoreszenzintensität in der Signaldarstellung am Bildschirm beobachtet wurde.

Nach Abschluss der Feineinstellung des Mikroskops wurden Objektträger mit *verdünnter* Bead-Suspension in den Objektbereich eingebracht. Dadurch wurde gewährleistet, dass *einzelne* Nanopartikel beobachtet und deren Position und Größe gemessen werden konnten. Das wesentliche Problem in diesem Zusammenhang lag in einem möglichst schnellen Auffinden zur Messung geeigneter Objekte. Diese **Objekt-suche** erfolgte dabei in mehreren Schritten. Nach dem Einbringen des Objektträgers in den Objektbereich, wurde zunächst die Fokusebene aufgesucht und durch laterales Verschieben geeignete Objekte in das Gesichtsfeld der Kamera gebracht. Dazu wurden ausschließlich die Schrittmotoren verwendet, welche über den Steuerrechner mittels eines „Joystick“ verfahren werden können. Da dieser Vorgang schnell ablaufen musste, wurde hier eine kurze Belichtungszeit gewählt. Die Kameraempfindlichkeit kann bei Bedarf durch „Binning“ (siehe Abschnitt 5.1.3) erhöht werden. Nachdem sich nun die zur Messung vorgesehenen Objekte grob in der Fokusebene befinden, erfolgte die exakte Feineinstellung der Fokusebene mittels des Piezoverstellisches, auf dem der Objektträgerhalter befestigt ist.

Die Aufnahmesoftware wurde so eingerichtet, dass der Piezoverstellisch auf dem das Objekt gelagert wird, in 20 nm Schritten entlang der optischen Achse verschoben werden kann. Dies ermöglicht die Durchführung von **Sequenzaufnahmen**. Dabei wurden von dem zweidimensionalen Gesichtsfeld, welches die zu untersuchenden Objekte enthält, in der Regel 300 bis 400 Aufnahmen gemacht, bei denen die axiale Position entlang der optischen Achse jeweils um 20 nm verschoben wurde. Daraus ergab sich ein maximales abgerastertes Raumvolumen von  $6,9 \mu\text{m} \times 8,6 \mu\text{m} \times 8 \mu\text{m} \approx 475 \mu\text{m}^3$ . Die Belichtungszeit lag hier in der Regel bei 0,4 s, woraus sich eine Aufnahmezeit von  $400 \times 0,4 \text{ s} = 160 \text{ s}$  ergab.

Zur Bestimmung der Objektgrößen wurden jeweils einige Bildstapel für jede nominelle Beadgröße aufgenommen. Aus diesen Daten wurden dann jeweils 10 bis 15 Objekte ohne spezielle Auswahlkriterien zufällig ausgewählt und nach den in Abschnitt 4.4.4 beschriebenen Methoden ausgewertet (siehe Abschnitt 6.1.3). Um darüberhinaus axiale Distanzmessungen durchführen zu können, wurden **Serien** mit jeweils fünf bis acht Bildstapeln aufgenommen. Das bedeutet, dass jede Objektregion fünf- bis achtmal hintereinander aufgenommen wurde, ohne dabei eine Änderung der Aufnahmeparameter vorzunehmen (siehe Abschnitt 6.1.4). Die Aufnahme einer höheren Zahl von Bildstapeln pro Serie war nicht zu empfehlen, da das Hintergrundrauschen bei den letzten Bildstapeln in der Regel bereits relativ groß war und es teilweise zu Verschiebungen der Objekte kam, die durch geringfügige Ungenauigkeiten in der Ansteuerung der Piezoverstellische bei der Repositionierung verursacht wurde. In den meisten der hier betrachteten Fälle lag das Signal-zu-Rausch-Verhältnis bei der Detektion der untersuchten Objekte zwischen 5 und 10.

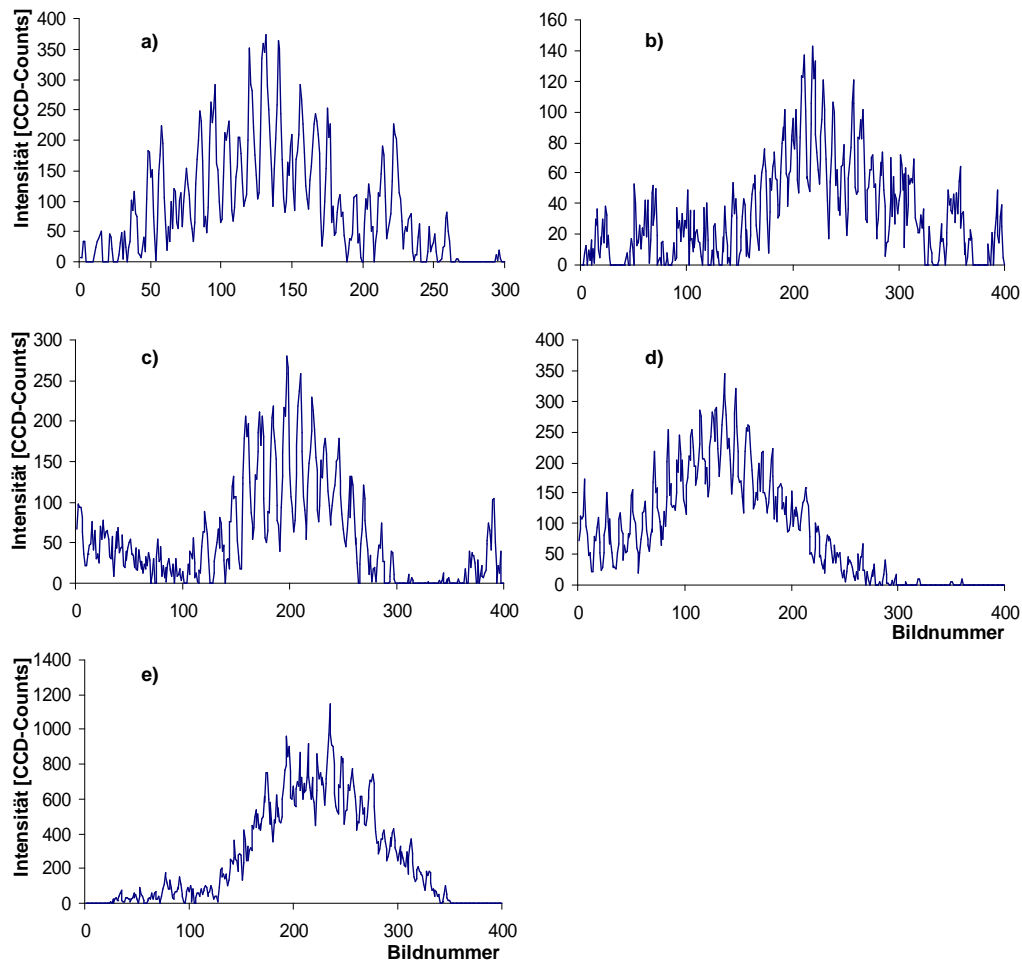
### 6.1.2. Messung der axialen Intensitätsverteilung

Werden die Messungen wie hier beschrieben durchgeführt, so kann aus den erhaltenen Messdaten mittels der in Abschnitt 4.4.2 dargestellten Methode der axiale Intensitätsverlauf (AID) der einzelnen Objekte bestimmt werden. Die dabei insgesamt detektierte Photonenzahl liegt in der Größenordnung von  $10^5$  Photonen für jedes Objekt. In Abbildung 6.1 sind gemessene axiale Intensitätsverläufe für Beads unterschiedlicher Größe zusammengestellt. Alle dargestellten axialen Intensitätsverteilungen entsprechen grundsätzlich der in Abbildung 4.8 auf Seite 50 dargestellten theoretischen Punktbildfunktion des SMI-Mikroskops. Alle Kurven zeigen ausgeprägte lokale Maxima bzw. Wellenzüge, die einen gegenseitigen Abstand zwischen 170 und 250 nm aufweisen. Der theoretische Wert für den Wellenfrontenabstand ergibt sich für eine Anregungswellenlänge von  $\lambda = 458$  nm nach Gleichung (4.27) auf Seite 47 zu 152 nm unter der Annahme, dass der Brechungsindex im Objektraum bei 1,5 liegt und die interferierenden Teilstrahlen exakt parallel verlaufen (Winkel  $\vartheta = 0^\circ$ ). Dies bedeutet, dass die gemessenen Wellenfrontenabstände teilweise deutlich über dem theoretisch erwarteten Wellenfrontenabstand liegen und darüberhinaus im Vergleich einzelner Messungen mehr oder weniger stark variieren. Wenn davon ausgegangen wird, dass der zur Anregung verwendete Laserstrahl eine konstante Wellenlänge zur Verfügung stellt, so können diese Abweichungen ausschließlich durch eine Veränderung des Brechungsindex im Objektbereich oder durch eine Verkippung der interferierenden Teilstrahlen (Winkel  $\vartheta > 0^\circ$ ) verursacht werden. Die aus den experimentellen Daten erhaltenen Halbwertsbreiten der Hüllkurve in axialer Richtung, die wesentlich von der numerischen Apertur der verwendeten Objektivs und dem Brechungsindex im Objektraum abhängt, liegen bei etwa  $2 \mu\text{m}$ . Dieser Wert ist erneut deutlich größer als die theoretisch berechnete Halbwertsbreite von 780 nm, welche sich aus Gleichung (2.26) auf Seite 18 ergibt. Diese Abweichung ist jedoch auch zu erwarten, da die theoretische Halbwertsbreite nur unter idealen, experimentell kaum realisierbaren Bedingungen erreichbar ist. Das gilt vor allem dann, wenn wie hier im Aufbau einfache Objektivs verwendet werden, die nur wenig auf sphärische und chromatische Aberrationen korrigiert sind. In den Randbereichen der dargestellten Intensitätsverteilungen ist deutlich das Hintergrundrauschen zu erkennen.

Die Tatsache, dass die Intensitäten in den lokalen Minima der axialen Intensitätsverteilung deutlich von 0 verschieden sind, kann mit der theoretischen Punktbildfunktion des SMI-Mikroskops nicht erklärt werden. Aus diesem Grunde lassen sich die erhaltenen Messkurven besser durch den Verlauf der Anpassungsfunktion (4.39) beschreiben, der in Abbildung 4.10 auf Seite 55 gezeigt ist. Bei dieser Anpassungsfunktion wird die Größe der betrachteten Objekte mit berücksichtigt, indem eine Relation zwischen der Tiefe der Modulation und der Objektgröße hergestellt wird (siehe Abschnitt 6.1.3).

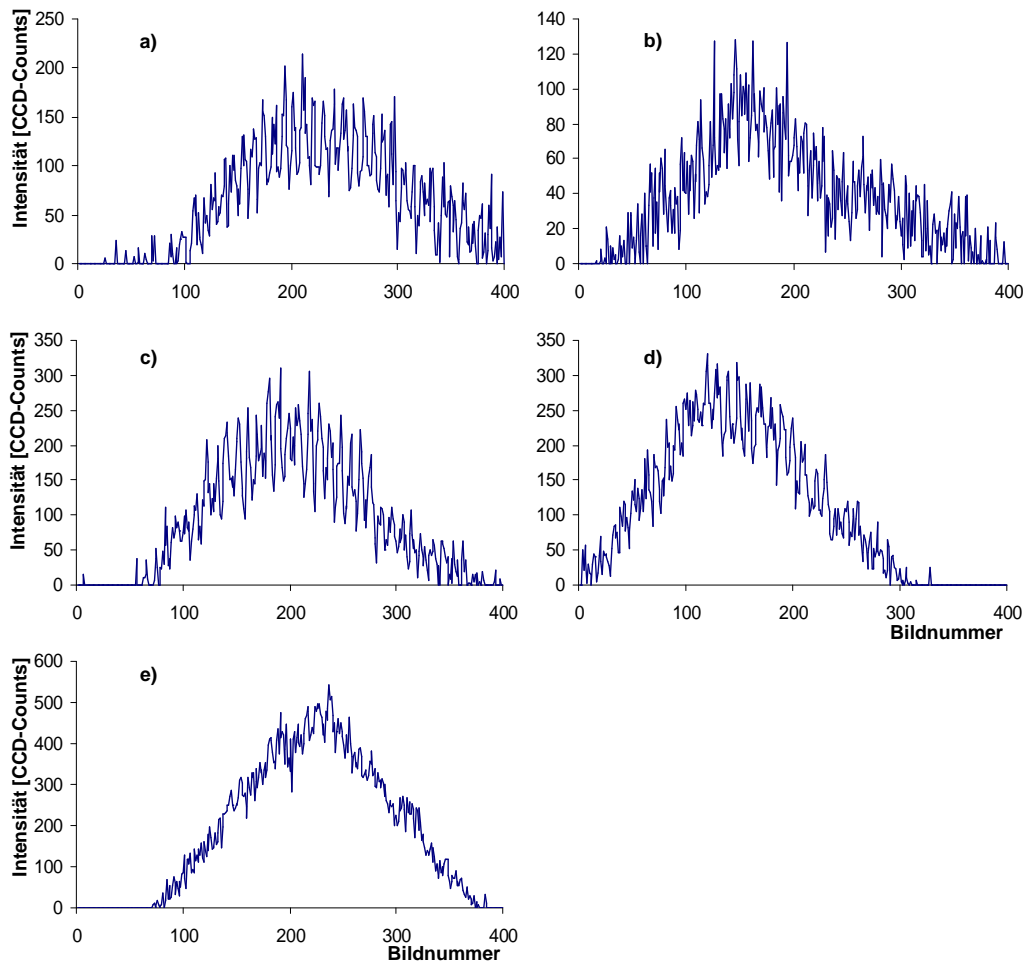
Die axiale Intensitätsverteilung wurde zusätzlich auch unter Verwendung der Hochleistungsobjektivs mit Wasserimmersion (Modell PLAPO 63x/ $NA = 1,2$ , Leica

## 6.1. Einphotonen-Anregung mit einer Anregungswellenlänge von 458 nm



**Abbildung 6.1.:** Darstellung experimenteller Messkurven grün fluoreszierender Beads mit einer nominalen Größe (Herstellerangaben) von a) 57 nm, b) 71 nm, c) 100 nm, d) 140 nm und e) 200 nm. Die Messungen wurden mit den einfachen Objektiven durchgeführt.

GmbH) gemessen. Die dabei erhaltenen Messkurven sind in Abbildung 6.2 dargestellt. Der Vergleich der erhaltenen axialen Intensitätsverteilungen zeigt, dass unabhängig von den verwendeten Objektiven stets die aufgrund der Anregung mittels Wellenfeld erwartete Modulation detektiert werden kann. In diesem Zusammenhang ist sowohl der Abstand der Wellenfronten  $d_w$  und als auch die Halbwertsbreite praktisch unabhängig von den Objektivparametern. Dieser Sachverhalt war zunächst etwas erstaunlich, da bei Verwendung eines besser korrigierten Hochleistungsobjektivs eine kleinere Halbwertsbreite der Messkurven erwartet wurde. Tatsächlich wird die Halbwertsbreite aber im Wesentlichen durch die numerische Apertur der Objektive bestimmt, welche für die günstigen Objektive bei  $NA = 1,25$  und für die Hochlei-



**Abbildung 6.2.:** Darstellung experimenteller, mittels SMI-Mikroskopie aufgenommener Messkurven grün fluoreszierender Beads mit einer nominalen Größe (Herstellerangaben) von a) 57 nm, b) 71 nm, c) 100 nm, d) 140 nm und e) 200 nm. Diese Messungen wurden mit den Hochleistungsobjektiven durchgeführt.

stungsobjektive bei  $NA = 1,2$  liegt. Bei allen gemessenen axialen Intensitätsverteilungen ist die Abhängigkeit der Modulationstiefe bzw. des Modulationskontrasts von der Größe des gemessenen Objekts offensichtlich. Dabei ist die Modulation unter Verwendung der Hochleistungsobjektive bei annähernd gleichem Signal-zu-Rausch-Verhältnis insbesondere für die größeren Objekte weniger stark ausgeprägt. Erstaunlicherweise sind die mit den Hochleistungsobjektiven aufgenommenen axialen Intensitätsverteilungen grundsätzlich etwas stärker verrauscht, was vor allem bei kleinen Objekten mit ungünstigerem Signal-zu-Rausch-Verhältnis zu weniger zuverlässigen Aussagen über die tatsächliche Objektgröße führt. Eine mögliche Ursache dafür ist, dass zur besseren Korrektur der auftretenden Aberrationen eine größere Zahl

von Linsenelementen erforderlich ist, die zu einer Reduzierung der Transmission des Fluoreszenzlichts führt.

### 6.1.3. Größenmessungen

Die Bestimmung der Objektgröße wurde an allen präparierten Objekten (siehe Abschnitt 6.1.1) mittels der in Abschnitt 4.4.4 auf Seite 56 beschriebenen Methode vorgenommen. Dazu wurden aus den aufgenommenen Datensätzen jeweils etwa 10 bis 15 Objekte ausgewählt, für welche die axiale Intensitätsverteilung extrahiert wurde. Daraufhin wurde die Funktion (4.39) an die Messkurven angepasst, um die zur Größenbestimmung erforderlichen Parameter  $A$  und  $D$  zu erhalten, aus den nach Gleichung (4.42) auf Seite 57 der Modulationskontrast berechnet wurde. In diesem Zusammenhang wurden wenige der ausgewählten Objekte noch verworfen, deren axiale Intensitätsverteilung nicht sinnvoll angepasst werden konnte. Dieser Fall trat insbesondere bei kleineren Objekten mit kleinem Signal-zu-Rausch-Verhältnis und größerem Hintergrundrauschen ein. Stark unsymmetrische oder verschobene Kurven sowie Verteilungen mit Spitzen hoher Intensität außerhalb der Fokusebene, die durch kurzzeitig detektierte, „schwimmende“ Objekte hoher Intensität z.B. in der Immersionsflüssigkeit oder im Einbettungsmedium hervorgerufen wurden, waren ebenfalls zu verwerfen.

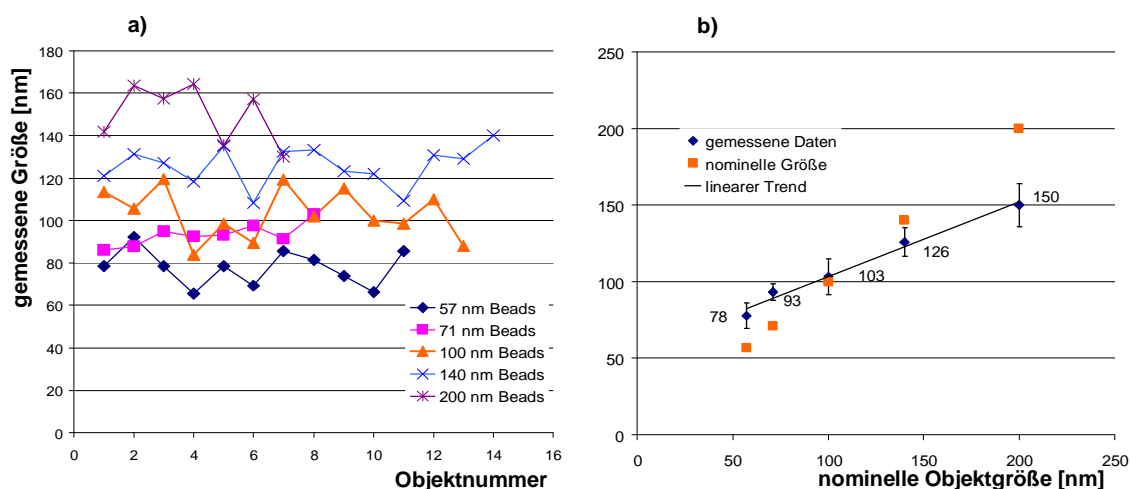
Bei gegebener effektiver Anregungswellenlänge, die ebenfalls aus den Anpassungsparametern gewonnen wurde, kann über die in Abschnitt 4.4.4 beschriebenen Kalibrationskurven (siehe Abbildung 4.13 auf Seite 59) direkt vom Modulationskontrast auf die Objektgröße geschlossen werden.

#### Verwendung einfacher, handelsüblicher Objektive

Im Rahmen dieser Untersuchungen wurden zunächst die axialen Intensitätsverteilungen ausgewertet, die unter Verwendung der günstigen Objektive erhalten wurden. Dabei wurde die axiale Ausdehnung mehrerer Objekte derselben nominellen Größe gemessen, um eine Mittelung durchführen zu können. Der Fehler der Größenmessung ergibt sich dann aus der **Standardabweichung** der Einzelmessung. Insgesamt wurden sieben Objekte der nominellen Größe 200 nm, 14 Objekte der nominellen Größe 140 nm, 13 Objekte der nominellen Größe 100 nm, acht Objekte der nominellen Größe 71 nm und 11 Objekte der nominellen Größe 57 nm untersucht. Die dabei erhaltenen Ergebnisse sind in Tabelle 6.1 zusammengestellt. Diese Messungen zeigen, dass mit den hier vorgestellten Methoden die gemessenen Objektgrößen sowohl von der erhaltenen Größenordnung als auch vom prinzipiellen Verlauf in Abhängigkeit von der Größe der Objekte bereits relativ gut mit den nominellen Objektgrößen übereinstimmen. Der Fehler der angegebenen nominellen Objektgrößen wird vom Hersteller mit 10% bis 15% angegeben und mit dem Herstellungsverfahren begründet, bei dem sowohl der exakte Durchmesser der Beads als auch deren Farbstoffverteilung nicht

nominelle Größe [nm]	gemessene Größe [nm]	Anzahl der gemessenen Beads
57	$78 \pm 8$	11
71	$93 \pm 5$	8
100	$103 \pm 12$	13
140	$126 \pm 9$	14
200	$150 \pm 14$	7

**Tabelle 6.1.:** Ergebnisse der Größenmessungen an Beads unterschiedlicher Größe. Die angegebenen Fehler entsprechen der Standardabweichung der Einzelmessung. Die nominellen Größen beziehen sich dabei auf Herstellerangaben.



**Abbildung 6.3.:** Größenmessungen an grün fluoreszierenden Beads. In a) sind die Einzelmessungen für die verschiedenen Objekte dargestellt. In b) ist der daraus erhaltene Mittelwert aufgetragen, wobei die Fehlerbalken aus der Standardabweichung der Einzelmessung berechnet sind. Zum Vergleich sind die nominellen Objektgrößen eingetragen.

immer genau gleich ist. Bei den Messungen ist darüberhinaus festzustellen, dass die Gerade der gemessenen Werte eine kleinere Steigung aufweist, als die Gerade der nominellen Werte. Das bedeutet, dass kleine Objekte in den Messungen eher zu groß und große Objekte eher zu klein gemessen werden. Diese Abweichungen können neben den üblicherweise bei den ersten Messungen an einem Mikroskop-Prototyp auftretenden Schwierigkeiten auch physikalische Ursachen haben, die im Folgenden kurz erläutert werden. Wie bereits in Abschnitt 4.4.4 im Rahmen der Größenbestimmung dargestellt, hängt die gemessene Objektgröße auch von der Form bzw. der Farbstoffverteilung der betrachteten Beads ab. In den hier vorgestellten Messungen sowie in [Failla02a, Failla02b] wurde in den Kalibrationskurven eine gaußförmige

Farbstoffverteilung angenommen. Besitzen die Objekte dagegen eine kugelförmige Farbstoffverteilung oder sind die Farbstoffe nur in einer Kugelschale konzentriert, so ergeben teilweise deutlich unterschiedliche Kalibrationskurven (siehe Abbildung 4.14 auf Seite 60). Aus diesen Kalibrationskurven ergeben sich bei gleichem Modulationskontrast größere Objektdimensionen. Darüberhinaus wird der Modulationskontrast durch eine eventuelle Bewegung bzw. Schwingung der Objekte um eine Ruhelage in axialer Richtung beeinflusst. Im Falle einer Schwingung erscheinen insbesondere kleinere Objekte deutlich größer, wenn von einer Schwingungsamplitude von einigen 10 Nanometern ausgegangen wird (Untersuchungen: C. Wagner).

Insgesamt ist hier festzuhalten, dass die beschriebene Methode zur Größenbestimmung individueller kleiner fluoreszierender Objekte mit Durchmessern erheblich kleiner als die optische Auflösung prinzipiell Ergebnisse liefert, die im Wesentlichen den angegebenen Objektgrößen entsprechen (siehe Abbildung 6.3). Das bedeutet, dass unter Verwendung der SMI-Mikroskopie in Kombination mit den simulierten Kalibrationskurven Größenmessungen an Objekten unterhalb der halben Anregungswellenlänge und damit deutlich unterhalb der optischen Auflösung möglich sind. Dieser Sachverhalt stellt einen erheblichen Fortschritt im Vergleich zur konfokalen Laser-Scanning-Mikroskopie (CLSM) dar, mit der in axialer Richtung Halbwertsbreiten  $\geq 600$  nm gemessen werden können und folglich Objekte mit kleineren Durchmessern stets diese minimale Halbwertsbreite aufweisen (siehe dazu Vergleich von Größenbestimmungen an SMI und CLSM).

### Verwendung von Hochleistungsobjektiven

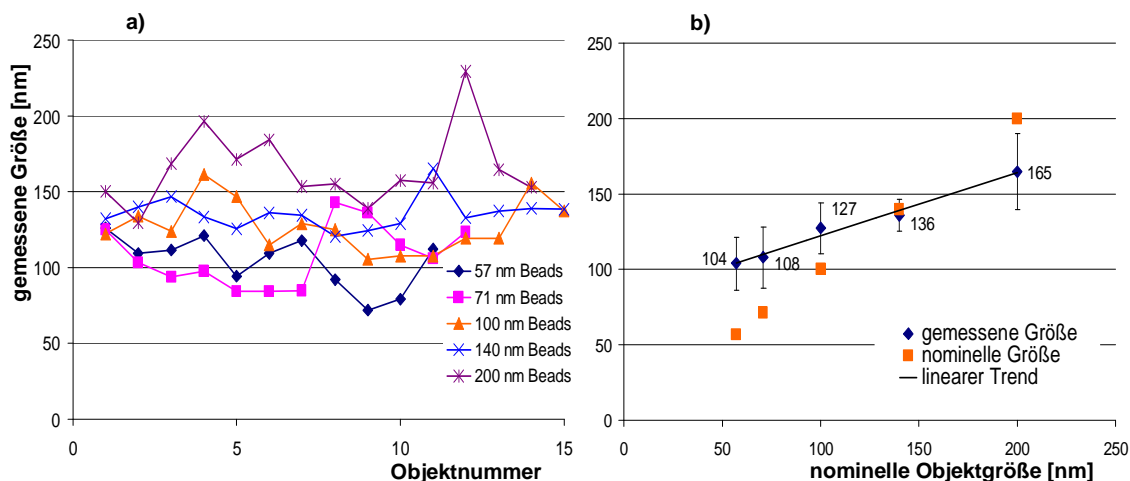
Im folgenden Abschnitt werden Ergebnisse von Größenmessungen vorgestellt, die aus den mittels der besser korrigierten Hochleistungsobjektive aufgenommenen axialen Intensitätsverteilungen erhalten wurden. Sowohl bei der Messung als auch bei der Auswertung wurde dabei analog zum vorangegangenen Abschnitt vorgegangen. Auf diese Weise wurden sieben Objekte der nominellen Größe 200 nm, 14 Objekte der nominellen Größe 140 nm, 13 Objekte der nominellen Größe 100 nm, acht Objekte der nominellen Größe 71 nm und 11 Objekte der nominellen Größe 57 nm untersucht. Die Ergebnisse für diesen Fall sind aus Tabelle 6.2 zu entnehmen. Bei diesen Messungen sind die gemessenen Objektgrößen bei allen betrachteten Beads größer als bei der Verwendung einfacherer Objektive, und kommen damit bei den Beads mit einem Durchmesser  $d > 100$  nm der nominellen Objektgröße deutlich näher. Die kleineren Objekte mit einem Durchmesser von  $d \leq 100$  nm werden im Gegensatz dazu bei der Größenmessung zu groß gemessen, so dass sich hier eine untere Grenze für die Größenbestimmung bei etwa 100 nm Durchmesser ergibt. Dies wird vor allem durch das relativ hohe Hintergrundrauschen in den axialen Intensitätsverteilungen (siehe Abbildung 6.2) verursacht, das eine sinnvolle Anpassung der Parameter erheblich erschwert.

Mit den hier beschriebenen Messungen gelang es, den Durchmesser einzelner fluo-

nominelle Größe [nm]	gemessene Größe [nm]	Anzahl der gemessenen Beads
57	$104 \pm 17$	11
71	$108 \pm 20$	12
100	$127 \pm 17$	15
140	$136 \pm 11$	15
200	$165 \pm 25$	14

**Tabelle 6.2.:** Ergebnisse der Größenmessungen an Beads unterschiedlicher Größe, wobei diese Messungen mit den Hochleistungsobjektiven durchgeführt wurden. Die angegebenen Fehler entsprechen der Standardabweichung der Einzelmessung. Die nominellen Größen beziehen sich dabei auf Herstellerangaben.

reszierender Objekte mit einem vom Hersteller angegebenen nominellen Durchmesser zwischen 57 und 200 nm zu bestimmen.



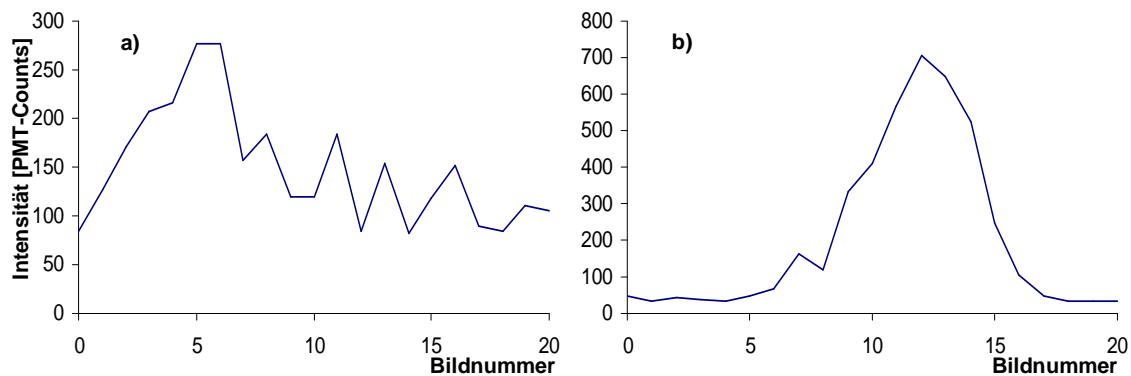
**Abbildung 6.4.:** Größenmessungen an grün fluoreszierenden Beads unter Verwendung von Hochleistungsobjektiven. In a) sind die Einzelmessungen für die verschiedenen Objekte dargestellt. In b) ist der daraus erhaltene Mittelwert aufgetragen, wobei die Fehlerbalken aus der Standardabweichung der Einzelmessung berechnet werden. Zum Vergleich sind die nominellen Objektgrößen eingetragen.

### Vergleich von Größenmessungen am SMI-Mikroskop und am CLSM

Zur Veranschaulichung und Verifizierung der Tatsache, dass mittels der SMI-Mikroskopie Objektgrößen weit unterhalb der optischen Auflösungsgrenze bestimmt werden können, wurden vergleichende Messungen derselben Objekte auch am konfokalen Laser-Scanning-Mikroskop durchgeführt. Dabei wurden dieselben Objektträger



wie im Rahmen der SMI-Mikroskopie eingesetzt und mit einem Laserstrahl der Wellenlänge von 488 nm zur Fluoreszenz angeregt. Zur Durchführung der Messungen wurde in jeder axialen Ebene ein zweidimensionaler Objektskan mit jeweils 16 Mittelungen vorgenommen und die dabei erhaltene Intensität im grünen Farbkanal mittels eines Photomultipliers detektiert. Zur vollständigen Erfassung der Objekte in Richtung der optischen Achse wurden jeweils etwa 20 bis 24 axiale Schnitte bei einer Schrittweite von 162 nm notwendig. Beispiele für die dabei erhaltenen axialen Intensitätsverteilungen sind in Abbildung 6.5 gezeigt. Aus diesen Messkurven ist



**Abbildung 6.5.:** Am CLSM aufgenommene axiale Intensitätsverteilungen. Dabei wurde bei a) ein 140 nm Bead und bei b) ein 57 nm Bead gemessen.

deutlich zu erkennen, dass die Halbwertsbreite FWHM im Wesentlichen unabhängig von der Größe des gemessenen Objekts ist, denn die FWHM hat in allen hier betrachteten Fällen etwa 5 axiale Schritte zu 162 nm also ca. 810 nm. Ein nicht zu unterschätzendes Problem im Rahmen der Messungen mit dem konfokalen Laser-Scanning-Mikroskop stellt das niedrige Signal-zu-Rausch-Verhältnis bei den Daten der kleinen Objekte dar, welche in Tabelle 6.3 zusammengefasst sind. Hierbei wird

nominelle Größe [nm]	Signal-zu-Rausch-Verhältnis
57	2
71	5
100	8
140	15
200	31

**Tabelle 6.3.:** Signal-zu-Rausch-Verhältnisse bei Messungen unterschiedlich großer Objekte am konfokalen Laser-Scanning-Mikroskop.

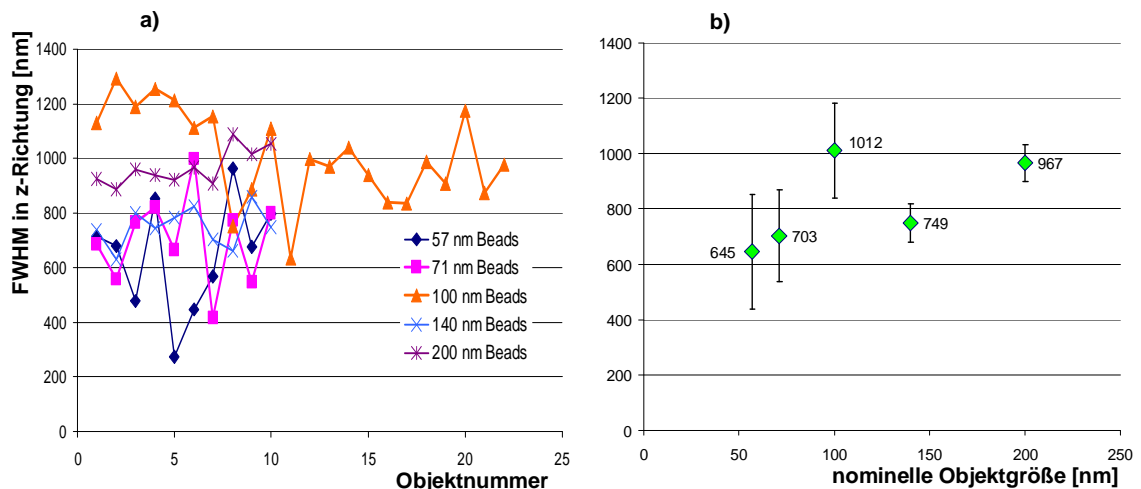
deutlich, dass das Hintergrundrauschen bei den Objekten mit einem Durchmesser

## 6. Messungen und Ergebnisse

von 57 bzw. 71 nm bereits so stark war, dass eine Anpassung der Gaußfunktion an die Messkurve teilweise sehr schwierig war. Aus diesem Grunde weisen die erhaltenen Ergebnisse bei diesen Objektgrößen einen relativ großen Fehler auf, weshalb die entsprechenden Ergebnisse eher als Richtwerte zu verstehen sind. Alle im Rahmen der Messungen am konfokalen Laser-Scanning-Mikroskop erhaltenen Halbwertsbreiten der axialen Intensitätsverteilungen sind in Tabelle 6.4 zusammengestellt und in Abbildung 6.6 dargestellt.

nominelle Größe [nm]	FWHM in z-Richtung [nm]	Anzahl Beads
57	$645 \pm 207$	10
71	$703 \pm 167$	10
100	$1012 \pm 171$	22
140	$749 \pm 70$	10
200	$967 \pm 66$	10

**Tabelle 6.4.:** Ergebnisse der Größenmessungen an Beads unterschiedlicher Größe am CLSM. Die angegebenen Fehler entsprechen der Standardabweichung der Einzelmessung. Die nominellen Größen beziehen sich dabei auf Herstellerangaben.



**Abbildung 6.6.:** Messungen der FWHM in z-Richtung von grün fluoreszierenden Beads am CLSM. Hier sind in a) die Einzelmessungen und in b) die Mittelwerte der gemessenen FWHM aufgetragen. Die Fehler sind aus der Standardabweichung der Einzelmessung berechnet.

Aus diesen Daten ist unmittelbar ersichtlich, dass die gemessene FWHM der mittels CLSM erhaltenen axialen Intensitätsverteilungen zwischen 645 und 1012 nm liegt und nicht von der individuellen Objektgröße abhängig ist. Dies stimmt mit

der theoretischen Erwartung überein, welche der CLSM in axialer Richtung eine optische Auflösung im Sinne des FWHM-Kriteriums von 600 nm unter optimalen optischen Bedingungen zuschreibt (siehe dazu Abschnitt 3.3.2 auf Seite 28). Für die praktische Anwendung bedeutet das, dass für Objekte mit einer axialen Ausdehnung  $d < 600$  nm stets eine  $\text{FWHM} \geq 600$  nm gemessen wird und folglich nicht direkt auf die tatsächliche Größe geschlossen werden kann. Dies ist hier nur bei Objekten möglich, die im Vergleich mit der Grenze der optischen Auflösung eine deutlich größere axiale Ausdehnung aufweisen. In Abbildung 6.7 sind die Größenmessungen, die am SMI-Mikroskop und am CLSM durchgeführt wurden, vergleichend dargestellt. Der Vergleich dieser Daten zeigt, dass Größenmessungen an kleinen fluoreszierenden

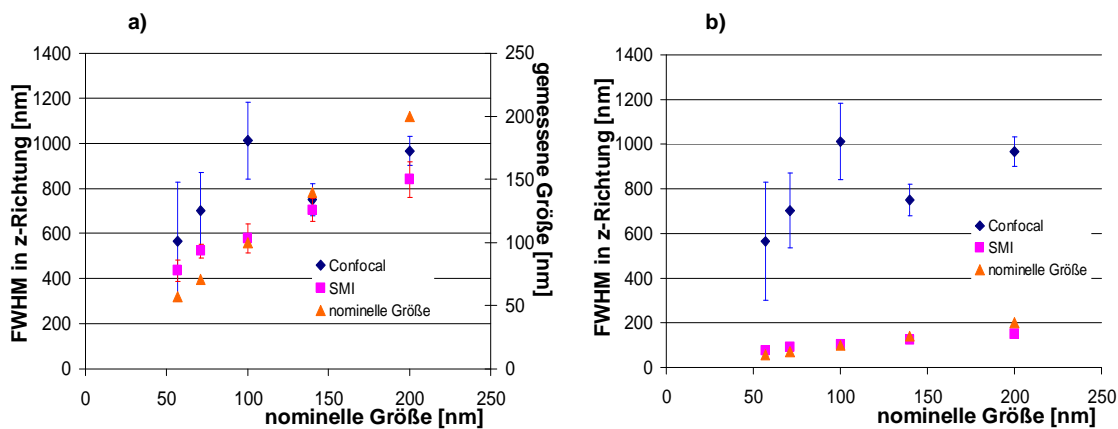


Abbildung 6.7.: Vergleich der Größenmessungen, die am SMI-Mikroskop und am CLSM durchgeführt wurden.

Objekten mit einem Durchmesser weit unterhalb der optischen Auflösung nur am SMI-Mikroskop und nicht am CLSM durchführbar sind. Dabei erhält man bei den Messungen am SMI-Mikroskop einerseits die prinzipiell richtige Größenordnung, wie ein Vergleich mit den ebenfalls eingezeichneten nominellen Objektgrößen verdeutlicht. Andererseits ergibt sich bei den Messungen am SMI-Mikroskop eine eindeutige Abhängigkeit der gemessenen Objektgröße von den nominellen Werten, während am CLSM stets eine axiale Halbwertsbreite an der Grenze der optischen Auflösung also von  $\geq 600$  nm gemessen wird.

#### 6.1.4. Distanzmessungen

Zur Bestimmung der axialen Distanz von Objekten wurden Serienaufnahmen, d.h. mehrere identische dreidimensionale Aufnahmen derselben Objektregion an den Präparaten mit 100 nm Beads aufgenommen. In den daraus erhaltenen Bilddaten wurden jeweils etwa 10 bis 15 Objekte ausgewählt, welche in allen Serienaufnahmen identifiziert und ausgewertet wurden. Der laterale Abstand der Objekte musste

dabei mindestens 500 nm betragen, um die Schwerpunkte der Fluoreszenzfarbstoffverteilungen gut trennen zu können. An die daraus extrahierten axialen Intensitätsverteilungen wurde wiederum die Anpassungsfunktion (4.39) auf Seite 54 angepasst, um daraus das Maximum der Hüllkurve  $z_1$  und das Maximum des Wellenfeldes  $z_2$  zu erhalten. Aus diesen Parametern wurde die axiale Distanz der gemessenen Objekte nach der in Abschnitt 4.4.3 beschriebenen Methode bestimmt. Einige der ausgewählten Objekte wurden nach den bereits in Abschnitt 6.1.3 diskutierten Kriterien nachträglich verworfen.

### Verwendung einfacher, handelsüblicher Objektive

Die Messungen axialer Distanzen wurden zunächst an axialen Intensitätsverteilungen vorgenommen, die unter Verwendung der einfachen nur wenig korrigierten Objektive erhalten wurden. Dabei wurde die axiale Position (**Lokalisation**) der einzelnen 100 nm Beads für alle erhaltenen Serienaufnahmen bestimmt, in denen die jeweiligen Objekte eindeutig indentifiziert werden konnten und die axiale Intensitätsverteilung den oben beschriebenen Mindestanforderungen genügte. Dabei ergaben sich für die hier untersuchten Objekte jeweils sechs unabhängige, wiederholte Messungen der Objektposition. Die axiale Distanz wurde daraufhin zwischen zufällig ausgewählten **Bead-Paaren** durchgeführt und über die sechs wiederholten Messungen gemittelt. Als Fehler der Distanzmessung wird hier die **Standardabweichung der Einzelmessung** angegeben. Die im Rahmen der Distanzmessungen erhaltenen Ergebnisse sind aus Tabelle 6.5 zu ersehen. Bei diesen Messungen wurden axiale Objektdistan-

	axiale Distanz [nm]	Anzahl Serienaufnahmen
Distanz 1-2	$195 \pm 397$	6
Distanz 2-3	$511 \pm 357$	6
Distanz 3-4	$39 \pm 488$	6
Distanz 4-5	$116 \pm 455$	6
Distanz 5-6	$57 \pm 443$	6
Distanz 6-7	$22 \pm 308$	6
Distanz 7-8	$16 \pm 548$	6
Distanz 8-9	$241 \pm 495$	6
Distanz 9-10	$82 \pm 242$	6

**Tabelle 6.5.:** Axiale Distanzmessungen an Beads mit 100 nm Durchmesser am SMI-Mikroskop unter Verwendung einfacher Objektive. Die angegebenen Fehler entsprechen der Standardabweichung der Einzelmessung.

zen im Bereich von 16 nm bis zu 511 nm gemessen, wobei kleinere Distanzwerte grundsätzlich überwiegen. Prinzipiell sollten sich hier nur Distanzen wenig verschieden von 0 ergeben, wenn alle Beads auf dem Objektträger angetrocknet und fixiert

sind. Unter realen Bedingung können jedoch durch Unebenheiten des Objektträgers, Krümmung der Wellenfronten, lokale Brechungsindexvariationen und evtl. nicht ausreichend fixierte Objekte auch größere axiale Distanzen gemessen werden. Der Fehler der Distanzmessungen lag zwischen 242 nm und 548 nm. Eine Ursache für diese relativ großen Fehler ist in der großen Halbwertsbreite der Hüllkurven der axialen Intensitätsverteilungen zu sehen, die hier bei etwa 2  $\mu\text{m}$  lag. Aus diesem Grunde war sowohl die Lokalisation des Maximums der Hüllkurve als auch die Feststellung des maximalen Wellenzugs, insbesondere bei verrauschten Messkurven, erheblich erschwert. Auf diese Weise konnte es zu Verschiebungen dieser Maximalwerte zwischen den einzelnen Serienaufnahmen desselben Objekts und damit zu den großen Abweichungen bei der Distanzmessung kommen.

Alle im Rahmen dieser Untersuchungen erhaltenen axialen Distanzen und die Fehler sind hier signifikant kleiner als die optische Auflösung konventioneller Mikroskopiesysteme in axialer Richtung. Es war zu erwarten, dass die Ergebnisse der hier vorgestellten Distanzmessungen noch nicht mit den Distanzmessungen an einem bereits länger vorhandenen SMI-Mikroskop mit anderen Anregungswellenlängen [Albrecht02a] bzw. den Distanzmessungen mittels konfokaler spektraler Präzisions-Distanz-Mikroskopie (siehe Abschnitt 3.3.4) vergleichbar waren. Dies lag daran, dass bei der Evaluierung dieser Daten die Möglichkeiten der höheren Lokalisierungspräzision durch die SMI-Mikroskopie noch nicht vollständig ausgeschöpft werden konnten. Darüberhinaus müssen noch einige bei der Implementierung und Realisierung eines neuen Prototyps auftretenden experimentellen Schwierigkeiten überwunden werden. Insgesamt handelt es sich bei Betrachtung sehr kleiner fluoreszierender Objekte um eine axiale Distanzauflösung, die bislang mit nicht-konfokalen Systemen nicht erreicht werden kann.

### Verwendung von Hochleistungsobjektiven

Bei der Messung axialer Distanzen wurden dieselben Objekte zum Vergleich auch mit den besser korrigierten Hochleistungsobjektiven gemessen. Bei der hier vorgestellten Serie wurden acht unabhängige Sequenzaufnahmen desselben Objektbereichs durchgeführt. Bei der Auswertung dieser Messungen wurden nach Anwendung der im vorangegangenen Abschnitt beschriebenen Auswahlkriterien zwischen fünf und sieben unabhängige Messungen der Objektposition vorgenommen und daraus die axiale Distanz zwischen einzelnen **Bead-Paaren** bestimmt. Die dabei erhaltenen Objektdistanzen sind aus Tabelle 6.6 zu entnehmen. Bei Betrachtung dieser Messwerte ist auffällig, dass die erhaltenen Distanzen zwischen den einzelnen Objekten im Mittel relativ groß sind. Zwei gemessene Distanzen sind kleiner als 200 nm, während sich die meisten hier gemessenen Distanzen in einem Bereich zwischen 315 und 859 nm bewegen. Dies deutet darauf hin, dass die Objekte nicht vollständig fixiert waren und sich bewegen konnten, oder ein Teil der gemessenen Objekte war auf dem Objektträger fixiert, während sich andere Objekte in der Schicht des Einbettungsmediums

	axiale Distanz [nm]	Anzahl Serienaufnahmen
Distanz 1-2	$372 \pm 899$	6
Distanz 2-3	$723 \pm 652$	7
Distanz 3-4	$640 \pm 804$	7
Distanz 4-5	$735 \pm 1120$	6
Distanz 5-6	$315 \pm 1540$	7
Distanz 6-7	$356 \pm 1052$	7
Distanz 7-8	$859 \pm 1062$	7
Distanz 8-9	$186 \pm 1041$	5
Distanz 9-10	$191 \pm 1278$	6

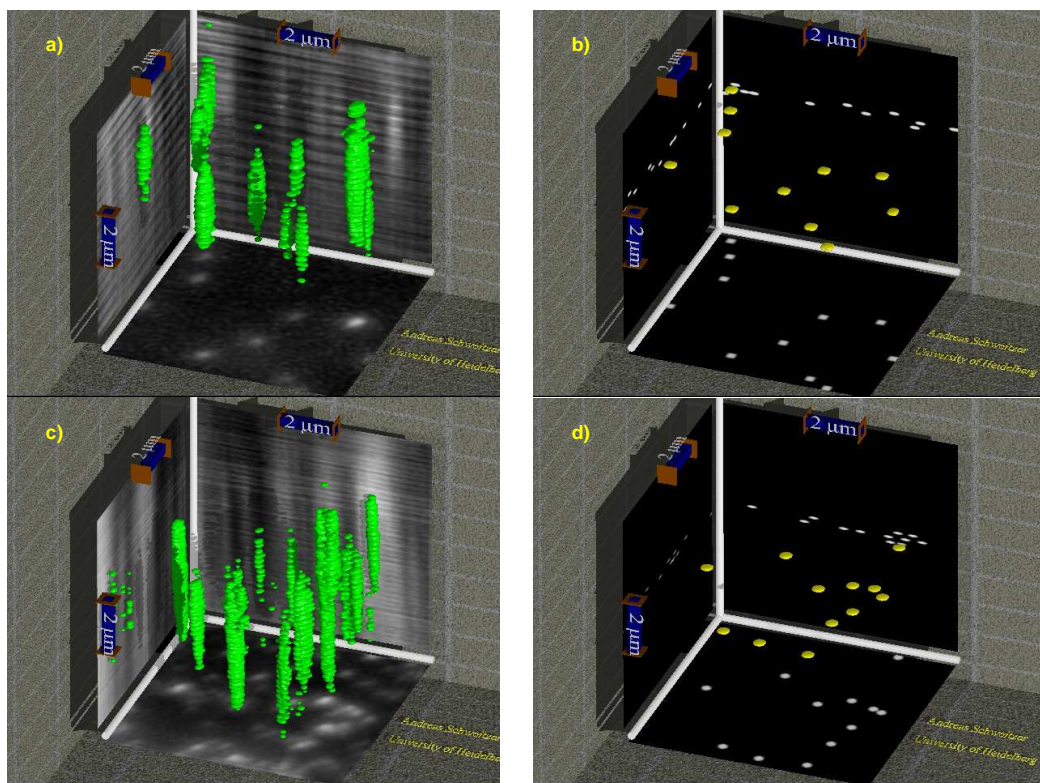
**Tabelle 6.6.:** Axiale Distanzmessungen an Beads mit 100 nm Durchmesser am SMI-Mikroskop unter Verwendung der Hochleistungsobjektive. Die angegebenen Fehler entsprechen der Standardabweichung der Einzelmessung.

befanden, die einige Mikrometer dick sein kann. Weiterhin ist bei diesen Messungen festzustellen, dass der Fehlerbereich der Distanzmessung ebenfalls sehr groß ist und im Bereich zwischen 652 und 1540 nm liegt. Neben der großen Halbwertsbreite der Hüllkurven von  $2 \mu\text{m}$  (s.o.) kann dieser Sachverhalt auch durch eine Veränderung der relativen Position der Objekte im Verlauf der wiederholten Messungen begründet werden. Diese Abweichungen konnten entweder durch eine tatsächliche Drift der Beads in axialer Richtung oder durch Ungenauigkeiten bei der Repositionierung des Piezoverschiebetisches im Rahmen der wiederholten Messungen verursacht werden.

Insgesamt bleibt im Rahmen der Distanzmessungen festzuhalten, dass sich mit diesem Mikroskop-Prototyp unter guten optischen Bedingungen axiale Distanzen einzelner fluoreszierender Objekte mit einer bisher bei nicht-konfokalen Systemen erreichten Größenordnung und Genauigkeit bestimmt werden konnten. Es sind aber im Vergleich zur spektralen Präzisions-Distanz-Mikroskopie und zu einem bereits seit einiger Zeit in der praktischen Anwendung befindlichen SMI-Mikroskop unter Verwendung anderer Anregungswellenlängen noch einige experimentelle Probleme bei diesem Prototyp zu lösen. Dazu gehören im Rahmen der Distanzmessungen vor allem die Fixierung der Objekte und die Genauigkeit bei der Repositionierung des Piezoversteltisches bei wiederholten Messungen. Die Messungen mit den korrigierten Hochleistungsobjektiven erbrachten im Rahmen der hier vorgestellten Untersuchungen keine besseren Ergebnisse im Vergleich zu Messungen mit einfacheren Objektiven. Dadurch erscheint es insgesamt möglich, ein SMI-Mikroskop unter Verwendung der einfachen Objektive zu betreiben und dadurch erhebliche Kosten einzusparen.

### 3D-Darstellung von SMI-Datensätzen

Zur besseren Veranschaulichung der mittels SMI-Mikroskopie erhaltenen Bilddaten und den daraus erhaltenen tatsächlichen Informationen über wesentliche physikalische Parameter der gemessenen Objekte, wurden zunächst dreidimensionale Darstellungen der gemessenen Rohdaten berechnet. Dazu wurde die Software **Povray** angewendet. Auf diese Weise wurde die laterale Objektposition mit dem Maximum der Fluoreszenzintensität des Objekts in der lateralen Ebene identifiziert. Die axiale Intensitätsverteilung ist deutlich an den modulierenden Strukturen zu erkennen, deren größte laterale Ausdehnung mit der axialen Position des maximalen Wellenzugs korrespondiert.



**Abbildung 6.8.:** Dreidimensionale Darstellung von SMI-Datensätzen. In den oberen Bildern ist ein Bildstapel mit 140 nm Beads, aufgenommen mit einfachen Objektiven, gezeigt. Die unteren Bilder sind aus einem Bildstapel mit 100 nm Beads extrahiert, die mit korrigierten Hochleistungsobjektiven aufgenommen wurden. Dabei sind in den Darstellungen der Rohdaten a) und c) deutlich die modulierten Strukturen zu erkennen. Aus der gemessenen Objektgröße und der Objektposition wurden „realistische“ 3D-Bilder berechnet b) und d).

Um aus diesen Informationen eine dreidimensionale Representation der tatsächlichen Verhältnisse insbesondere in Bezug auf die Größe und Position der betrachteten

Objekte zu erhalten, musste zunächst die Objektgröße für die Darstellung festgelegt werden. Für die hier dargestellten Bilder wurde dazu auf die nominellen Objektgrößen zurückgegriffen, die sich nicht wesentlich von den gemessenen Werten unterscheiden. Dies gilt insbesondere aufgrund der Tatsache, dass die Objektgröße in ganzzahligen Vielfachen der axialen Schrittweite von 20 nm angegeben werden musste. Auf diese Weise wurden für die 140 nm Beads 7 Schritte und für die 100 nm Beads 5 Schritte als axiale Ausdehnung angegeben. Die Ausdehnung der Objekte in lateraler Richtung wurde mit der FWHM der lateralen Intensitätskurven gleichgesetzt, die in der Regel bei etwa 300 nm lag. Die laterale Objektposition wurde durch die Maxima der lateralen Intensitätsverteilungen festgelegt, während die axiale Position mit der Position des maximalen Wellenzugs gleichgesetzt wurde. In Abbildung 6.8 sind zwei SMI-Datensätze dreidimensional dargestellt.

## 6.2. Zweiphotonen-Anregung

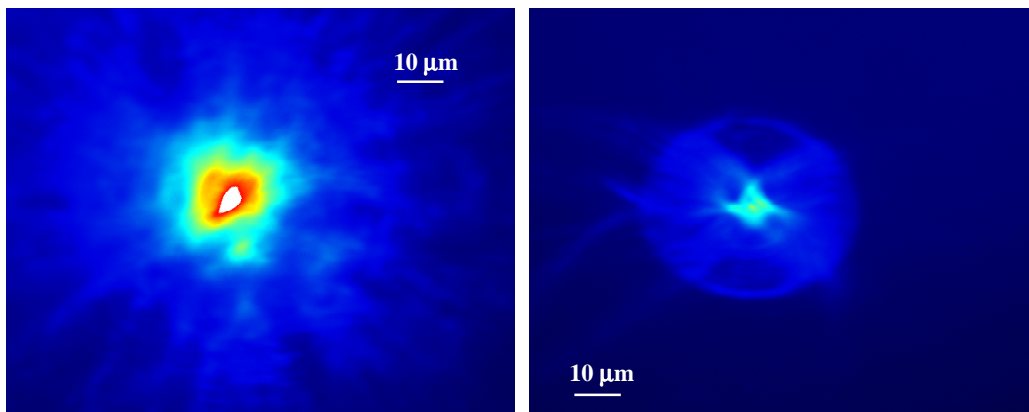
### 6.2.1. Messungen im fokussierten Modus

Da sowohl bei der Anwendung eines konventionellen Epifluoreszenzmikroskops als auch eines Mikroskops mit räumlich modulierter Beleuchtung ein planares, auf eine Kantenlänge von einigen  $10\ \mu\text{m}$  aufgeweitetes Anregungsfeld verwendet wird, war zunächst zu befürchten, dass die Lichtintensität in einem planaren Wellenfeld für eine Mehrphotonen-Anregung nicht ausreichen wird. Aus diesem Grunde wurden zunächst orientierende Vorversuche mit einem auf die Objektebene fokussierten Laserstrahl unter Verwendung nur eines der beiden Objektiv durchgeföhrt, da die konfokale Mehrphotonen-Mikroskopie bereits weitgehend etabliert ist [Soeller96, Denk95]. Zum prinzipiellen Nachweis des Zweiphotonen-Effekts wurde der Anregungsstrahlengang auf der Seite des Detektionsobjektivs so justiert, dass das kollimierte Anregungslicht ohne Verwendung von Einfokussierlinsen durch das Objektiv direkt in den Objektbereich fokussiert wurde. Dabei wurde der Durchmesser des Fokuspunkts anhand einiger Testaufnahmen auf etwa einen Mikrometer abgeschätzt. Die Fluoreszenzemission wurde daraufhin über den Detektionsstrahlengang auf die CCD-Kamera abgebildet, die im Rahmen dieser Messungen vorläufig als konventionelle CCD-Kamera ohne Bildverstärker eingesetzt wurde. Die Belichtungszeit lag für alle vorgestellten Messungen bei 0,5 s oder im Falle sehr starker Signale auch darunter. Die Ansteuerung der Kamera wurde mit der von der LaVision GmbH zur Verfügung gestellten Steuer- software DAVIS vorgenommen, die später auch zur Ansteuerung des Bildverstärkers benötigt wurde (siehe Abschnitt 6.2.2). Das Einbringen der Objektträger in den Objektbereich und das Auffinden der Messobjekte erfolgte bei diesen Messungen analog zu dem in Abschnitt 6.1.1 beschriebenen Vorgehen.

Zur Durchführung der ersten Experimente wurden die leicht zugänglichen grün fluoreszierenden Farbstoffe aus Textmarkerstiften mit Ethanol herausgelöst und auf



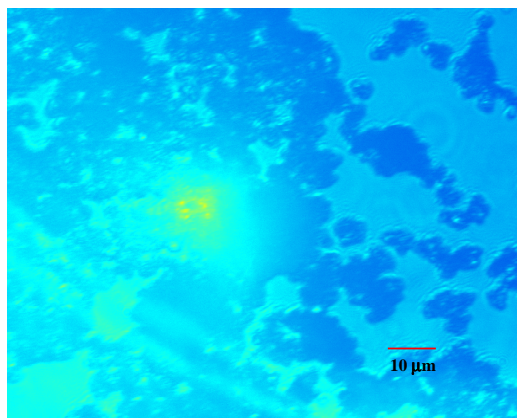
konventionelle Objektträger aufgebracht. Diese Farbstoffe, deren exakte Zusammensetzung nur grob beschrieben ist, lassen eine gute Fluoreszenzausbeute erwarten. Diese Präparate wurden im fokussierten Modus des Mikroskops mittels Zweiphotonen-Effekt angeregt und die daraus resultierende Fluoreszenzintensität mit der CCD-Kamera detektiert. Für diese Untersuchungen wurde ein Hochleistungsobjektiv (Modell 63x,  $NA = 1,2$ ; Leica) mit Wasserimmersion eingesetzt. Unter diesen Bedingungen konnte der Zweiphotonen-Effekt im Objektbereich eindeutig nachgewiesen und sogar mit „bloßem“ Auge durch die NIR-Laserschutzbrille als helles grünliches Leuchten beobachtet werden. Einige in diesem Zusammenhang von der CCD-Kamera aufgenommene Bilder sind in Abbildung 6.9 dargestellt. Diese Falschfarbendarstellungen zeigen, dass die Intensität in einem sehr kleinen Bereich um den Fokuspunkt sehr hoch war und nach außen schnell abnahm. Bei weiteren untersuchten Farbstoffproben, die hier nicht dargestellt sind, konnte ein übersteuertes Signal aufgrund der hohen Intensität selbst bei entsprechender Einstellung der Aufnahmeparameter nicht vermieden werden.



**Abbildung 6.9.:** Zweiphotonen-Anregung fluoreszierender Farbstoffe im fokussierten Modus.

Zur weiteren Untersuchung des fokussierten Anregungsmodus wurden in Wasser suspendierte Zinksulfid-(ZnS)-Kristalle auf einen Objektträger präpariert und mit einem Deckglas abgedeckt. Es wurde gefunden, dass die ZnS-Kristalle gut über Zweiphotonen-Effekt anregbar sind. Im Rahmen dieser Experimente wurden die Kristalle zunächst mittels einer Weißlichtquelle im Durchlicht aufgenommen, um die Fokusebene aufzufinden, in der eine „scharfe“ Abbildung auf die CCD-Kamera erfolgt. Daraufhin wurde der Ti-Saphir-Laser zur Realisierung der Zweiphotonen-Anregung zugeschaltet. Eine der dabei erhaltenen Aufnahmen ist in Abbildung 6.10 zu sehen. In dieser Falschfarbendarstellung heben sich die Kristalle deutlich als dunkle Strukturen im Durchlicht ab. Der Bereich, in dem Zweiphotonen-Anregung stattfand ist aufgrund der hohen Fluoreszenzintensität ebenfalls klar erkennbar (helle Bereiche).

Nach diesem ersten Nachweis des Zweiphotonen-Effekts wurden weitere Präpa-



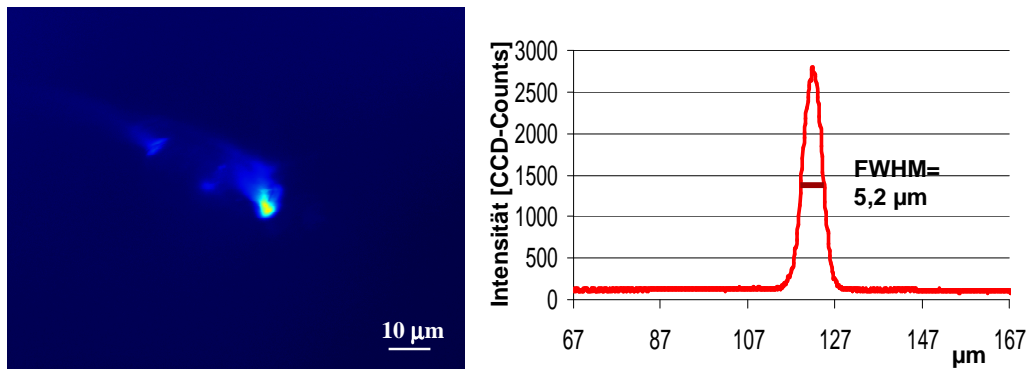
**Abbildung 6.10.:** Zweiphotonen-Anregung von ZnS-Kristallen im fokussierten Modus bei gleichzeitiger Durchlichtbeleuchtung.

rate hergestellt und auf Zweiphotonen-Effekt untersucht. So wurden mit DAPI bzw. H33258 (Farbstoff zum Anfärben von DNA) gefärbte Hefezellen, UV-anregbare Mikropartikel (FluoSpheres carboxylate-modified microspheres  $d=200$  nm (365/415), Molecular Probes<sup>3</sup>) sowie andere Farbstoffe wie Coumarin (7-amino-4-methylcoumarin) oder Dapoxyl (2-aminoethylsulfonamide) auf Objektträgern präpariert. Dazu wurden jeweils etwa  $10 \mu\text{l}$  entsprechender Lösung auf die Objektträger aufgebracht, eingebettet und mit einem Deckglas abgedeckt. Dabei war vor allem die Frage zu untersuchen, ob auch die kleinen UV-anregbaren Mikropartikel mittels Zweiphotonen-Effekt angeregt werden konnten, um diese später im Epifluoreszenzmodus einsetzen zu können. Bei diesen Messungen stellte sich heraus, dass sich diese Präparate über den Zweiphotonen-Effekt zur Fluoreszenz anregen ließen, die eindeutig von der CCD-Kamera detektiert werden konnte. In Abbildung 6.11 ist die Zweiphotonen-Anregung der UV-anregbaren Mikropartikel mit einem Durchmesser von  $d = 200$  nm im fokussierten Modus gezeigt. Dabei ergab sich bei einem Signal-zu-Rausch-Verhältnis von 30 eine Halbwertsbreite FWHM von  $5,2 \mu\text{m}$ . Diese Werte wurden direkt aus den erhaltenen Profilkurven abgelesen. Daraus ist zu ersehen, dass es sich bei dem fluoreszierenden Objekt um einen Cluster aus mehreren Mikropartikeln handelte.

Um die im Rahmen der Zweiphotonen-Anregung erwartete quadratische Abhängigkeit der Fluoreszenzintensität von der Intensität der Anregung zu bestätigen, wurden verschiedene Graufilter mit Transmissionsfaktoren zwischen 0,92 und 0,1 zur Abschwächung des Anregungslichts verwendet. Diese Graufilter wurden vor dem Strahlaustritt des Ti-Saphir-Lasers direkt in den Strahlengang senkrecht zur optischen Achse eingebracht. Dabei musste insbesondere darauf geachtet werden, dass die Strahlage nicht durch eine Verkipfung der verwendeten Graufilter erheblich be-

---

<sup>3</sup>Eugene, Oregon USA



**Abbildung 6.11.:** Zweiphotonen-Anregung von UV-anregbaren Mikropartikeln ( $d = 200 \text{ nm}$ ) im fokussierten Modus. Aus dem lateralen Intensitätsprofil ergibt sich eine FWHM von  $5,2 \mu\text{m}$ , so dass bei diesem Objekt von einem Cluster aus Mikropartikeln auszugehen ist.

einflusst wurde. Unter dieser Voraussetzung wurden verschiedene Konfigurationen untersucht, unter denen die unerwünschte Verkippung der Filter so gering gehalten werden konnte, dass sich kein wesentlich störender Einfluss auf die Messungen ergab. Da zur Durchführung der Messungen bis zu zehn Graufilter jeweils manuell ausgetauscht und eingesetzt wurden, nahmen die Messungen einige Minuten in Anspruch, so dass eine ausreichende zeitliche Konstanz der Fluoreszenzemission dringend erforderlich war. Aus diesem Grunde wurde getestet, welche Farbstoffe unter welchen Präparationsbedingungen eine für diese Messungen ausreichende Photostabilität aufweisen. Das Auffinden geeigneter Farbstoffe für diese Untersuchung erwies sich jedoch als schwierig, da alle bis zu diesem Zeitpunkt verwendeten Farbstoffe starkes Ausbleichverhalten unter Anwendung der Zweiphotonen-Anregung im fokussierten Modus zeigten. Schließlich stellte sich heraus, dass der grün fluoreszierende Farbstoff aus den Textmarkern für diese Messungen am besten geeignet war, da er bei hoher Fluoreszenzintensität die größte Photostabilität aufwies. Weiterhin mussten geeignete Objekte bzw. Regionen auf dem Objektträger ausgewählt werden, die diese Stabilitätsbedingungen erfüllten. Diese Randbedingungen sind auch die Ursache dafür, dass es nur wenige vollständige Messkurven gibt, bei denen alle Filter durchgemessen werden konnten. Alle durchgeführten Untersuchungen zeigten jedoch deutlich die theoretisch erwartete quadratische Abhängigkeit der mittels Zweiphotonen-Anregung erhaltenen Fluoreszenzintensität vom Photonenfluss des Anregungslichts. In Abbildung 6.12 sind die Messwerte aufgetragen die aus zwei Messserien der Fluoreszenzintensität in Abhängigkeit von der Intensität der Zweiphotonen-Anregung erhalten wurden. In diesem Zusammenhang wird eine vollständige Messreihe, die Datenpunkte für alle verwendeten Graufilter beinhaltet, mit einer berechneten Parabel bezogen auf die Maximalintensität verglichen. Dabei ergibt sich, dass diese Messung gut durch die erwartete quadratische Funktion beschrieben werden kann. Für eine zweite Messrei-

he, in welcher für zwei Filter keine Messpunkte vorlagen, wurde eine **Trendlinie** berechnet, die einen Potenzwert von 1,89 liefert und somit gut mit einem Potenzwert von 2 verträglich ist. Alle in diesem Zusammenhang durchgeführten Untersuchungen

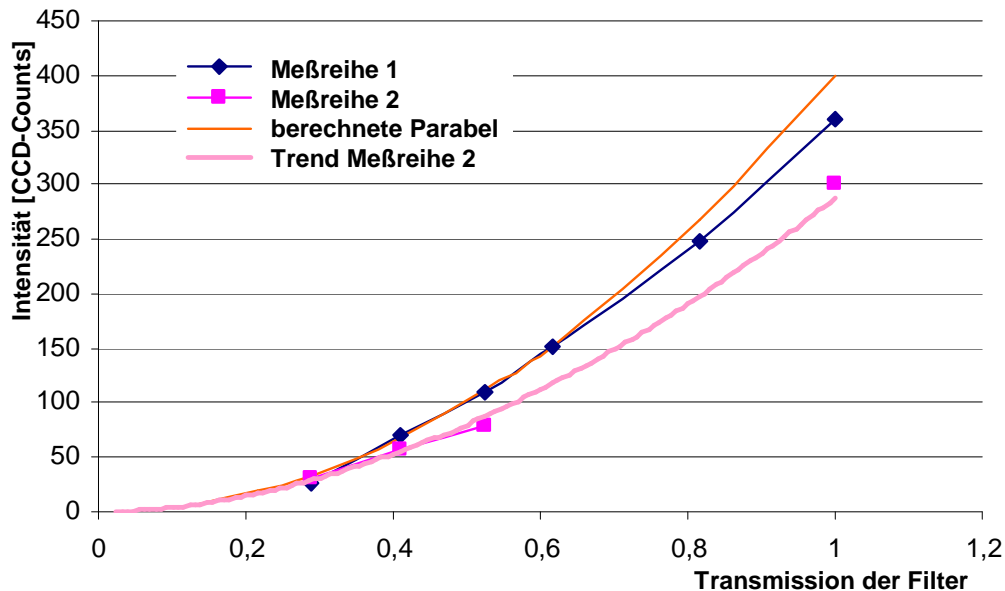


Abbildung 6.12.: Darstellung der Fluoreszenzintensität in Abhängigkeit von der Intensität der Zweiphotonen-Anregung.

legen eindeutig den Schluss nahe, dass die hier detektierten Fluoreszenzemissionen tatsächlich über den Zweiphotonen-Effekt angeregt wurden.

### 6.2.2. Messungen der Fluoreszenzlebensdauer im fokussierten Modus

Zur Messung von Fluoreszenzlebensdauern wurde ein im ns-Bereich schnell schaltbarer Bildverstärker vor die CCD-Kamera montiert. Dieser Bildverstärker hat ein einstellbares Zeitfenster, dessen Länge für die Aufnahmen in einem Bereich zwischen 200 und 1000 ps variiert werden kann. Zur Tastung des Bildverstärkers ist ein mittels Vorverstärker elektrisch angepasstes schnelles Triggersignal vom Ti-Saphir-Laser erforderlich, welches über eine regelbare Verzögerungsleitung zeitlich verzögert werden kann. Damit wird festgelegt, nach welcher Zeit im Nanosekundenbereich nach einem Triggersignal die Aufnahme gestartet werden soll. Dieses Zeitintervall kann zwischen 0 und 20 ns in Schritten von 25 ps eingestellt werden. Auf diese Weise wird das **Zeitfenster** bei der ersten Messung ohne Verzögerung direkt nach dem Laserpuls geöffnet und nach der eingestellten Länge des Zeitfensters von in der Regel 1000 ps wieder

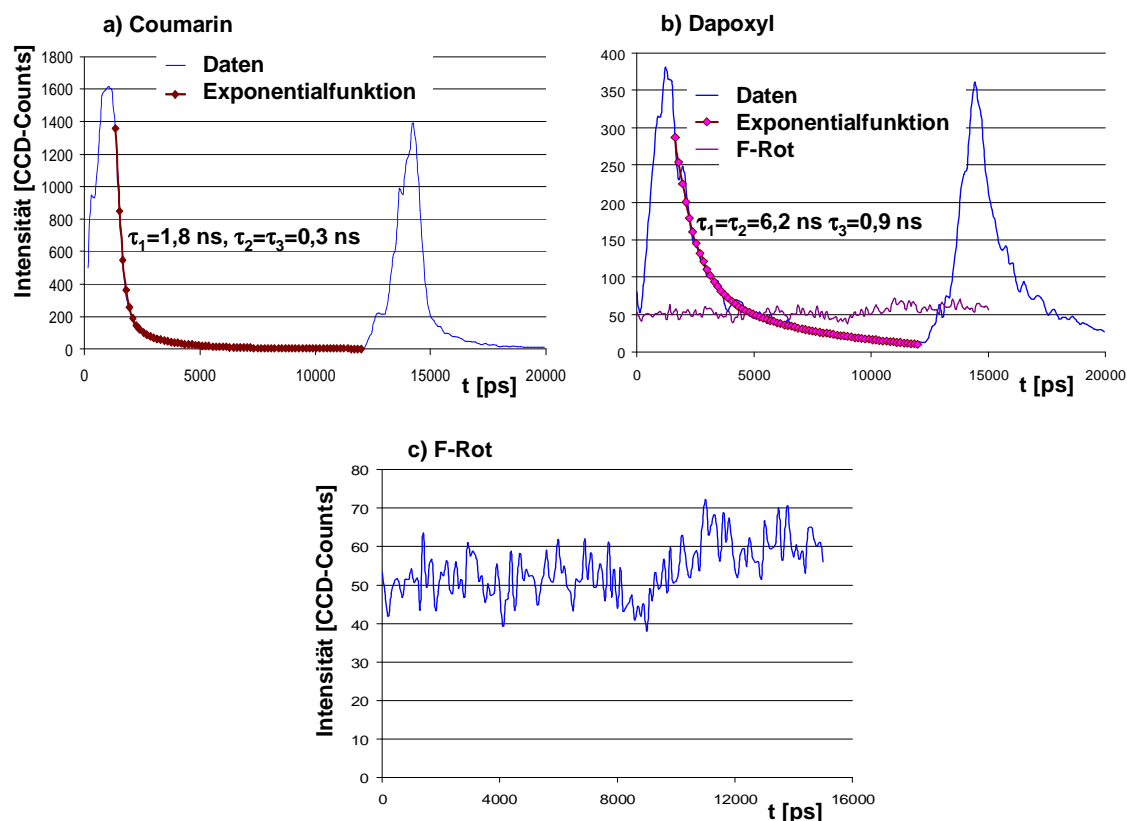
geschlossen. Bei jedem weiteren Laserpuls wird die Verzögerungszeit vor dem Öffnen des Zeitfensters um 25 ps erhöht, bis eine Gesamtmesszeit von 20 ns nach einem Laserpuls abgedeckt ist. Diese Messmethode hat jedoch auch einen Einfluss auf die effektive Belichtungszeit des CCD-Chips. Geht man von einer Belichtungszeit von einer Sekunde aus, so wird der Chip dabei nur alle 13,2 ns für jeweils 1000 ps = 1 ns belichtet, so dass sich eine effektive Belichtungszeit von  $1/13,2 \text{ s} = 76 \text{ ms}$  ergibt. Dem steht die Möglichkeit gegenüber mit dem Bildverstärker auch einzelne Photonen mittels einer hohen Verstärkerspannung zu detektieren, so dass bei entsprechend eingestellter Spannung auch kleine effektive Belichtungszeiten zur Detektion fluoreszierender Objekte ausreichen. Die Ansteuerung des kompletten Detektionssystems konnte im Rahmen dieser Messungen ausschließlich mit der Software DAVIS bewerkstelligt werden, so dass ein Parallelbetrieb von DAVIS und dem Steuerprogramm des SMI-Mikroskops erforderlich war. Insgesamt erhält man aus diesen Messungen ein Zeitprofil der Fluoreszenzintensität, aus dem die Fluoreszenzlebensdauer bestimmt werden kann.

Auf dieser Grundlage wurden Messungen von Fluoreszenzlebensdauern an den präparierten Objekten durchgeführt. Nach Auswahl eines einzelnen zur Messung vorgesehenen Bereichs bzw. Objekts mittels einer kleinen ROI (*engl. Region of Interest*), welche nur dieses Objekt enthält, wurden die Fluoreszenzlebensdauern der Objekte gemessen. Nach dem Start der Messungen wurde jeweils ein Zeitintervall von insgesamt 20 ns abgetastet, wobei sich ein zeitlich exponentiell verlaufender Intensitätsverlauf ergab, der im Weiteren als Lebensdauerprofil bezeichnet wird.

Zur Auswertung dieser Lebensdauerprofile wurden jeweils Exponentialfunktionen bzw. die Summe mehrerer Exponentialfunktionen (für bi- und triexponentielle Zerfälle) an die Profile angepasst und danach aus den Anpassungsparametern die Fluoreszenzlebensdauer bestimmt. Diese Anpassungen wurden mit der Software DAVIS vorgenommen. Insgesamt erwies es sich dabei als sinnvoll, jeweils eine Exponentialfunktion mehr für die Anpassung heranziehen als bezüglich der Anzahl der tatsächlichen Zerfallskomponenten des Farbstoffs notwendig erscheint. Durch diese zusätzlichen „Freiheitsgrade“, wird die Anpassung zuverlässiger. Die Genauigkeit bzw. der Fehler dieser Anpassungsmethode liegt dabei in der Größenordnung von 15 bis 20% und kann sowohl über wiederholte Messungen an demselben Farbstoff als auch mittels der Variation der Anpassungsparameter abgeschätzt werden.

Bei den durchgeführten Messungen wurden dabei abhängig vom untersuchten Farbstoff Fluoreszenzlebensdauern von etwa 300 Picosekunden bis über 12 Nanosekunden festgestellt. Selbst bei chemisch reinen Fluoreszenzfarbstoffen ist zu erwarten, dass zum Beispiel durch Anlagerung an andere Moleküle (z.B. Proteine) die Fluoreszenzlebensdauer durch die Veränderung der Mikroumgebung beeinflusst wird. In diesem Falle würde man als Messergebnis eine Überlagerung der Lebensdauer des freien und des angelagerten Farbstoffs erwarten. Solche zusammengesetzten Abklingfunktionen wurden durch Anpassen mehrerer Exponentialfunktionen entfaltet.

Als störend erwies sich bei der Messung der Fluoreszenzlebensdauer zunächst das



**Abbildung 6.13.:** Lebensdauerprofile der Farbstoffe Coumarin a), Dapoxyl b) und F-Rot c). Daraus ergeben sich Fluoreszenzlebensdauern von  $(1,6 \pm 0,2) \text{ ns}$ ,  $(6,2 \pm 0,9) \text{ ns}$  und  $> 12 \text{ ns}$

ungünstige Signal-zu-Rausch-Verhältnis, das im Wesentlichen durch in die Kamera gelangendes Streulicht verursacht wurde. Durch Verwendung der in Abschnitt 5.1 erwähnten kleineren Abdeckungen für den Detektionsstrahlengang und nach Durchführung weiterer Maßnahmen zur Reduzierung des Raumlichts konnte durch Abschirmung von Streulicht ein wesentlich besseres Signal-zu-Rausch-Verhältnis erreicht werden. Die hohe Wiederholfrequenz des Ti-Saphir-Lasers lässt Lebensdauer-messungen bis zu einer maximalen Zeit von 13,2 ns mit einer Auflösung im Picosekundenbereich zu. Zur Messung längerer Fluoreszenzabklingzeiten könnte ein elektrooptischer Puls-Selektor („Puls-Picker“) zur Erzeugung einer kleineren Wiederholrate verwendet werden. Dies ist jedoch für die meisten in der Biologie eingesetzten Fluorophore (mit Ausnahme langlebiger Lanthaniden-Chelate) nicht unbedingt notwendig. Beispiele mehrerer aus den Lebensdauer-messungen erhaltener Lebensdauerprofile sind in Abbildung 6.13 dargestellt. Für die meisten hier untersuchten Fluoreszenzfarbstoffe ergeben sich demnach Lebensdauern zwischen etwa 2 und 7 Nanosekunden,

wobei es auch Farbstoffe mit deutlich größerer Lebensdauer gibt. Speziell ergibt sich eine Lebensdauer von  $(1,6 \pm 0,2)$  ns für Coumarin und von  $(6,2 \pm 0,9)$  ns für Dapoxyl. Zu den Farbstoffen mit großer Lebensdauer gehört zum Beispiel auch der untersuchte Farbstoff F-Rot (entwickelt bei BASF), dessen genaue Struktur und Zusammensetzung nicht veröffentlicht ist. Bei allen hier dargestellten Lebensdauerprofilen liegen mehrere Zerfallskomponenten mit unterschiedlicher Zerfallszeit vor. In der Regel muss davon ausgegangen werden, dass die größte Zerfallszeit auch die Hauptzerfallskomponente des reinen Farbstoffs darstellt. Kürzere Zerfallszeiten werden vor allem durch die Mikroumgebung oder den Anregungsmechanismus verursacht. In den hier gezeigten Profilen erscheint die lange Zerfallskomponente deutlich unterdrückt, während die kurzen Zerfallskomponenten mit einem schnellen Abfallen der Profile überwiegen. Dieser Sachverhalt kann hier mit der hohen Anregungsintensität erklärt werden. Dadurch kann es zum Einen zu einer schnellen Veränderung der Mikroumgebung kommen, welche die Fluoreszenzemission der langlebigen Farbstoffkomponenten unterdrückt. Zum Anderen muss auch mit einer photochemischen Zersetzung der Farbstoffe gerechnet werden, die vor allem die langlebigen Farbstoffkomponenten betrifft.

### 6.2.3. Messungen im Epifluoreszenzmodus

Das wesentliche hier zu lösende Grundproblem war die Frage, inwieweit es im SMI-Modus überhaupt möglich ist, kleine Objekte auch dann mittels Zweiphotonen-Effekt anzuregen, wenn die Anregungsenergie nicht wie im konfokalen Mikroskop auf einen winzigen Bereich von etwa einem Quadratmikrometer fokussiert ist, sondern, wie im Epifluoreszenz- und SMI-Betrieb erforderlich, über ein Gebiet von mehreren Quadratmikrometern (z.B.: 10 Mikrometer Durchmesser) verteilt wird. Für dieses grundlegende Problem gab es folgende theoretische Abschätzung, welche eine SMI-Anregung mittels Zweiphotonen-Effekt prinzipiell möglich erscheinen ließ: Ausgangspunkt für eine Abschätzung des detektierbaren Fluoreszenzsignals  $N_{det}$  ist dabei die Anzahl der Zweiphotonen-Absorptionsprozesse  $N_{ex}$ , die durch den Anregungswirkungsquerschnitt  $\sigma$ , die Farbstoffkonzentration  $C$  und die Photonendichte des Anregungslichts  $\Phi$  in einem Volumenelement  $dV$  über das Zeitintervall  $dt$  wie folgt bestimmt wird:

$$dN_{ex}(\vec{r}, t) = \sigma C(\vec{r}) \Phi^2(\vec{r}, t) dV dt \quad (6.1)$$

Die mittlere Anzahl detektierbarer Fluoreszenzphotonen aus dem Anregungsvolumen  $N_{det}$  ist dabei im Wesentlichen abhängig von der Geometrie des Aufbaus, bestimmt durch den halben Öffnungswinkel  $\vartheta$ , dem Brechungsindex  $n$  sowie dem Vergleich der Länge der axialen Anregungszone ( $A_{SMI}, A_{confocal}$ ) und der Fläche des lateralen Anregungsbereichs ( $L_{SMI}, L_{confocal}$ ) im SMI- bzw. konfokalen Mikroskop, wobei sich

folgender Zusammenhang ergibt:

$$N_{det} = 0, 2\pi(1 - \cos \vartheta) \frac{n}{h^2 c^2} T_{Laser}^2 P_{Laser}^2 \frac{\lambda g_p A_{SMI} L_{confocal}}{f \tau A_{confocal} L_{SMI}} C \sigma T_{det} Q_{det} V_{bleich} t_{int} \quad (6.2)$$

Dabei werden auch die Eigenschaften des zur Anregung verwendeten Ti-Saphir-Lasers berücksichtigt, welche durch die Anregungswellenlänge  $\lambda$ , die mittlere Laserleistung  $P_{Laser}$ , die Pulsform  $g_p$ , die Pulswiederholfrequenz  $f$  und die Pulsdauer  $\tau$  beschrieben werden. Die Transmissionseigenschaften des Mikroskopaufbaus werden durch die Parameter  $T_{Laser}$  für die Transmission der Laseranregung und  $T_{det}$  für die Transmission des Detektionslichts beschrieben. Weiterhin sind die Farbstoffkonzentration  $C$ , der Wirkungsquerschnitt  $\sigma_2$ , Verluste durch Ausbleichen  $V_{bleich}$ , die Quanteneffizienz des detektierenden Systems  $Q_{det}$  und die Integrationszeit  $t_{int}$  in die Abschätzung bezüglich der detektierbaren Fluoreszenzphotonen mit einzubeziehen.

In den hier angegebenen Formeln wird das gesamte Anregungsvolumen betrachtet. Um daraus die Anzahl der detektierbaren Fluoreszenzphotonen pro Pixel zu erhalten, wird bei einem Epifluoreszenz- bez. SMI-Mikroskop die Anzahl der detektierten Photonen  $N_{det}$  durch die Anzahl der beleuchteten Pixel dividiert. Bei Verwendung einer 100-fachen Vergrößerung und einer angenommenen Pixelgröße von  $10 \mu\text{m} \times 10 \mu\text{m}$  wird die Querschnittsfläche des Anregungsvolumens von  $100 \mu\text{m}^2$  auf eine Fläche mit  $100 \times 100 = 10^4$  Pixeln abgebildet.

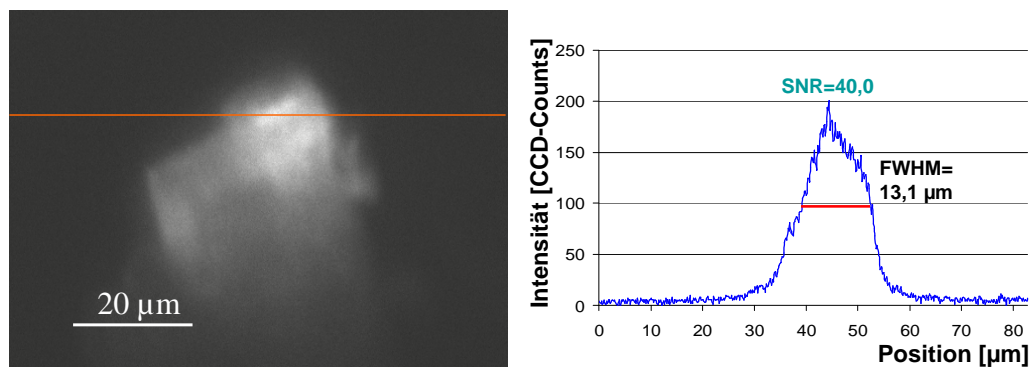
Bei Betrachtung von Aufnahmen mit Färbung großer zellulärer Strukturen erhält man bei der Annahme von realistischen SMI-Parametern und unter Verwendung einer konventionellen CCD-Kamera (Quantenwirkungsgrad 0,4) eine mittlere Anzahl von etwa 100 detektierbaren Photonen pro Pixel bei einer angenommenen Belichtungszeit von einer Sekunde. Werden dagegen Aufnahmen mit Markierungen kleiner zellulärer Strukturen betrachtet, so ist die Situation wesentlich komplizierter. Unter dieser Voraussetzung wird in einer „worst case“-Abschätzung von einer um vier Größenordnungen geringeren Farbstoffkonzentration ausgegangen, was einer Anzahl von etwa 500 Fluorochromen im SMI-Anregungsvolumen entspricht. Entsprechend sinkt auch die Anzahl der detektierbaren Photonen. Auf der anderen Seite kann jedoch davon ausgegangen werden, dass diese Fluorochrome in einem Volumen von nur 1% des Anregungsvolumens konzentriert sind, so dass die lokale Fluoreszenzintensität um das 100-fache ansteigt. Insgesamt verringert sich also die Anzahl der detektierbaren Photonen um etwa zwei Größenordnungen im Vergleich zu großen zellulären Strukturen, wenn ein Farbstoff mit gleichem Wirkungsquerschnitt für Zweiphotonen-Anregung verwendet wird. Das entspricht einem Photon pro Pixel. Bei Verwendung eines Farbstoffes mit hohem Wirkungsquerschnitt, wie z.B. Rhodamin B können so auch unter diesen Bedingungen etwa 130 Photonen pro Pixel detektiert werden, wenn die Belichtungszeit eine Sekunde beträgt. Dieser Wert kann folglich im Idealfall größer sein als die mittlere Photonenzahl bei großflächigen Objekten, da hier durch die Aufkonzentrierung der Fluorophore ein besseres Signal-zu-Rausch-Verhältnis bei gleichzeitig geringerer Hintergrundfluoreszenz zu erwarten ist.



### 6.2.4. Durchführung der Experimente

Da es zu Beginn der hier vorgenommenen Arbeiten noch keine experimentellen Beweise für eine Zweiphotonen-Anregung im Epifluoreszenzmodus gab, stand die experimentelle Klärung dieser grundlegenden Frage zunächst im Vordergrund. Nachdem nun die prinzipielle Machbarkeit der Zweiphotonen-Anregung im fokussierten Modus gezeigt war (siehe Abschnitt 6.2.1), wurde die experimentelle Realisierung des Epifluoreszenzmodus im parallelen Anregungslicht durchgeführt. Um einen auf einen  $10\ \mu\text{m}$  Durchmesser aufgeweiteten, parallelen Strahl im Objektbereich zwischen den beiden Objektiven zu erhalten, musste der zur Anregung verwendete Laserstrahl durch eine Einfokussierlinse (achromatische Duplettlinse, siehe Abschnitt 5.1.1) in die hintere Fokusebene der Objektive einfokussiert werden. In diesem Zusammenhang musste auch darauf geachtet werden, dass nicht in die Verkittungsebenen der Objektive fokussiert wird, um eventuelle Beschädigungen der Objektive durch die hohe Laserleistung von etwa  $50\ \text{kW}$  pro Laserpuls zu vermeiden. Da die Objektivhersteller die genaue Zusammensetzung der Objektive nicht veröffentlichen, wurde aus diesem Grunde entschieden, zunächst nicht die Hochleistungsobjektive (63-fach,  $NA = 1,2$ , Wasserimmersion, Leica Microsystems), sondern einfachere, preisgünstige Objektive (Luftobjektiv 40-fach,  $NA = 0,65$ , Edmund Optics, bzw. Ölimmersionsobjektiv 100-fach,  $NA = 1,2$ , Euromex) zu verwenden. Unter Verwendung der achromatischen Duplettlinen mit einer Brennweite von  $f = 80\ \text{mm}$  ließ sich die erforderliche Strahlcharakteristik im Objektraum herstellen. Die genaue Justage der lateralen und insbesondere der axialen Position der Einfokussierlinsen zu den Objektiven wurde nach der in Abschnitt 5.2.1 beschriebenen Methode vorgenommen und durch Messung des Strahldurchmessers in verschiedenen Projektionsabständen verifiziert. Zur Detektion der über Zweiphotonen-Anregung im Epifluoreszenzmodus erhaltenen Fluoreszenzemission wurde das gesamte Detektionssystem einschließlich des Bildverstärkers verwendet, da hier voraussichtlich auch sehr schwache Fluoreszenzsignale detektiert werden mussten. Die Belichtungszeit lag dabei bei einer Sekunde bis hin zu fünf Sekunden, so dass sich eine effektive Belichtungszeit von maximal  $500\ \text{ms}$  ergab. Die Verstärkungsspannung am Bildverstärker betrug in der Regel  $550\ \text{V}$ . Mit diesen Einstellungen wurde eine gute Sichtbarkeit der angenommenen Fluoreszenzemission erwartet.

Die Messungen von Zweiphotonen-Fluoreszenzen im Epifluoreszenzmodus wurden am Farbstoff eines grün fluoreszierenden Markierungsstiftes vorgenommen, der als homogene Schicht auf den Objektträger aufgebracht wurde. Es wurde das Objektiv mit 40-facher Vergrößerung bei einer numerischen Apertur von  $0,65$  verwendet. Es konnte gezeigt werden, dass dieser Farbstoff bei Anregung mit einem parallelen Strahl von etwa  $40\ \mu\text{m}$  Durchmesser gut anzuregen ist. Das bedeutet, dass der Zweiphotonen-Effekt auch bei homogener Ausleuchtung im Epifluoreszenzmodus nachgewiesen wurde. Daraufhin wurden auch andere Farbstoffe, z.B.: Bisbenzimid (komplexiert an DNA), Coumarin, Dapoxyl (s.o.) und 1,8 ANS (1-anilinonaphthalene-

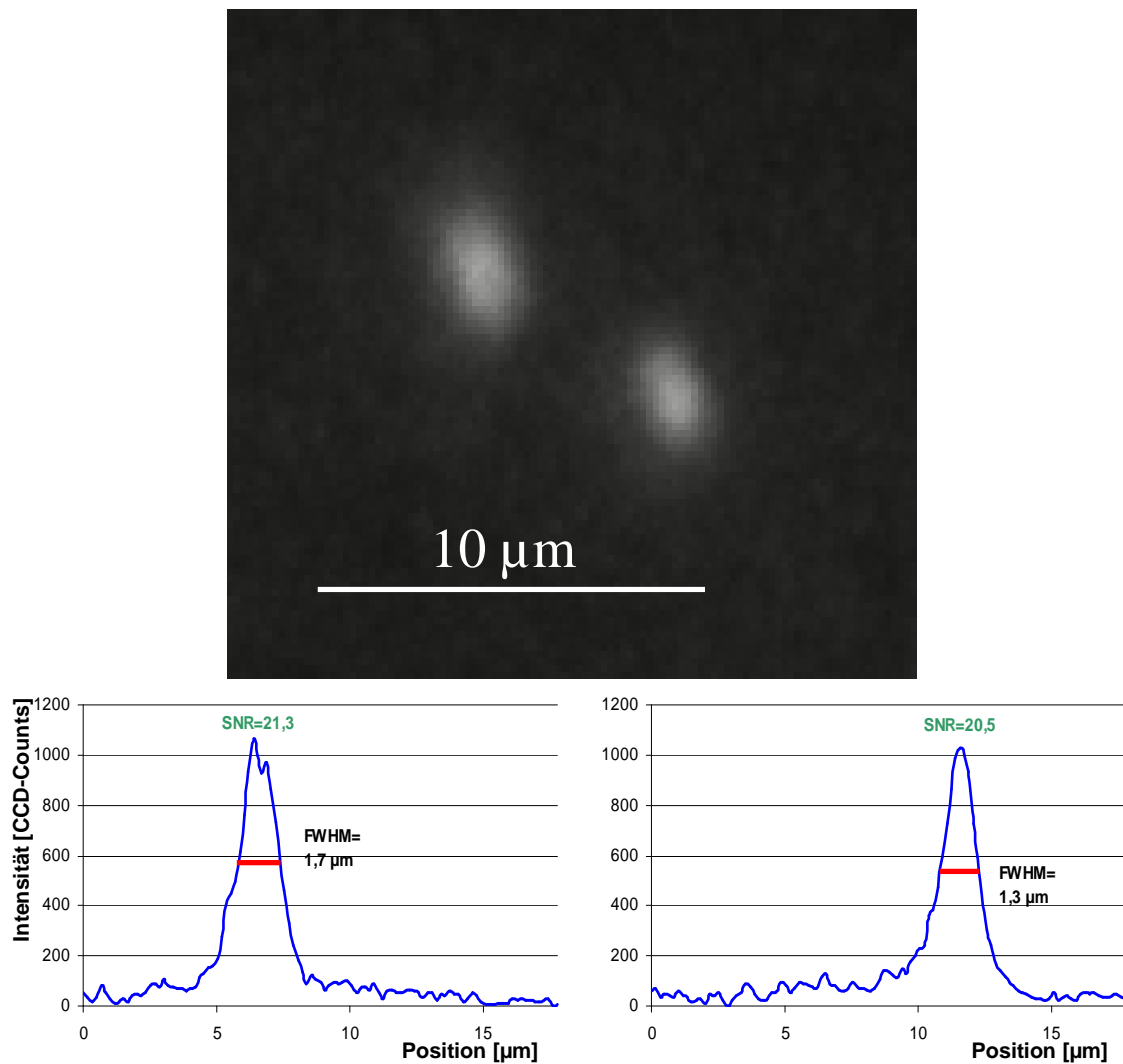


**Abbildung 6.14.:** Zweiphotonen-Anregung von Rhodamin-6G-Kristallen im Epifluoreszenzmodus, wobei der Durchmesser der Anregungszone auf etwa  $40\ \mu\text{m}$  aufgeweitet ist.

8-sulfonic acid) untersucht, welche alle gut im Epifluoreszenzmodus mit einem Strahldurchmesser von 40 Mikrometer anregbar waren und teilweise Strukturen durch Auskristallisieren zeigten. So ließen sich zum Beispiel Rhodamin-6G-Kristalle gut anregen (siehe Abbildung 6.14). Selbst bei dieser eher großflächigen Struktur konnte ein gutes Signal-zu-Rausch-Verhältnis von 40 erzielt werden. Die Kristallgröße kann dabei aus der Halbwertsbreite FWHM des lateralen Intensitätsprofils zu  $13,1\ \mu\text{m}$  abgeschätzt werden. Weiterhin wurden Mikropartikel mit verschiedenen Anregungsspektren und Durchmessern untersucht. Dabei lieferten vor allem die grün fluoreszierenden Partikel mit  $2\ \mu\text{m}$  Durchmesser (Fluoresbrite Carboxylate YG 2 Micron Microspheres, Polysciences, Inc.<sup>4</sup>) gute Ergebnisse (siehe Abbildung 6.15). Die angeregten Partikel sind innerhalb des Anregungsbereichs räumlich deutlich an unterschiedlichen Raumpunkten lokalisiert. Bei einem Signal-zu-Rausch-Verhältnis von über 20 ergibt sich eine FWHM von  $1,3\ \mu\text{m}$  bzw.  $1,7\ \mu\text{m}$ , wobei insbesondere der zweite Wert relativ gut mit der vom Hersteller angegebenen Objektgröße von  $2\ \mu\text{m}$  übereinstimmt. Kleinere Partikel desselben Herstellers waren jedoch erheblich schlechter anzuregen und daher praktisch nicht sichtbar, weil deren Wirkungsquerschnitt für UV-Absorption deutlich kleiner ist. Die bereits im Rahmen der Untersuchungen mit fokussierter Anregung präparierten UV-anregbaren Mikropartikel mit einem Durchmesser von  $d = 200\ \text{nm}$  wurden nun im Epifluoreszenzmodus verwendet und konnten auch in diesem Modus ohne größere Schwierigkeiten angeregt werden. In Abbildung 6.16 ist die Zweiphotonen-Anregung dieser Mikropartikel im Epifluoreszenzmodus inklusive einiger lateraler Intensitätsprofile dargestellt. Einzelne Objekte werden dabei durch Nummern sowohl auf der Aufnahme der CCD-Kamera als auch in den Profilen markiert.

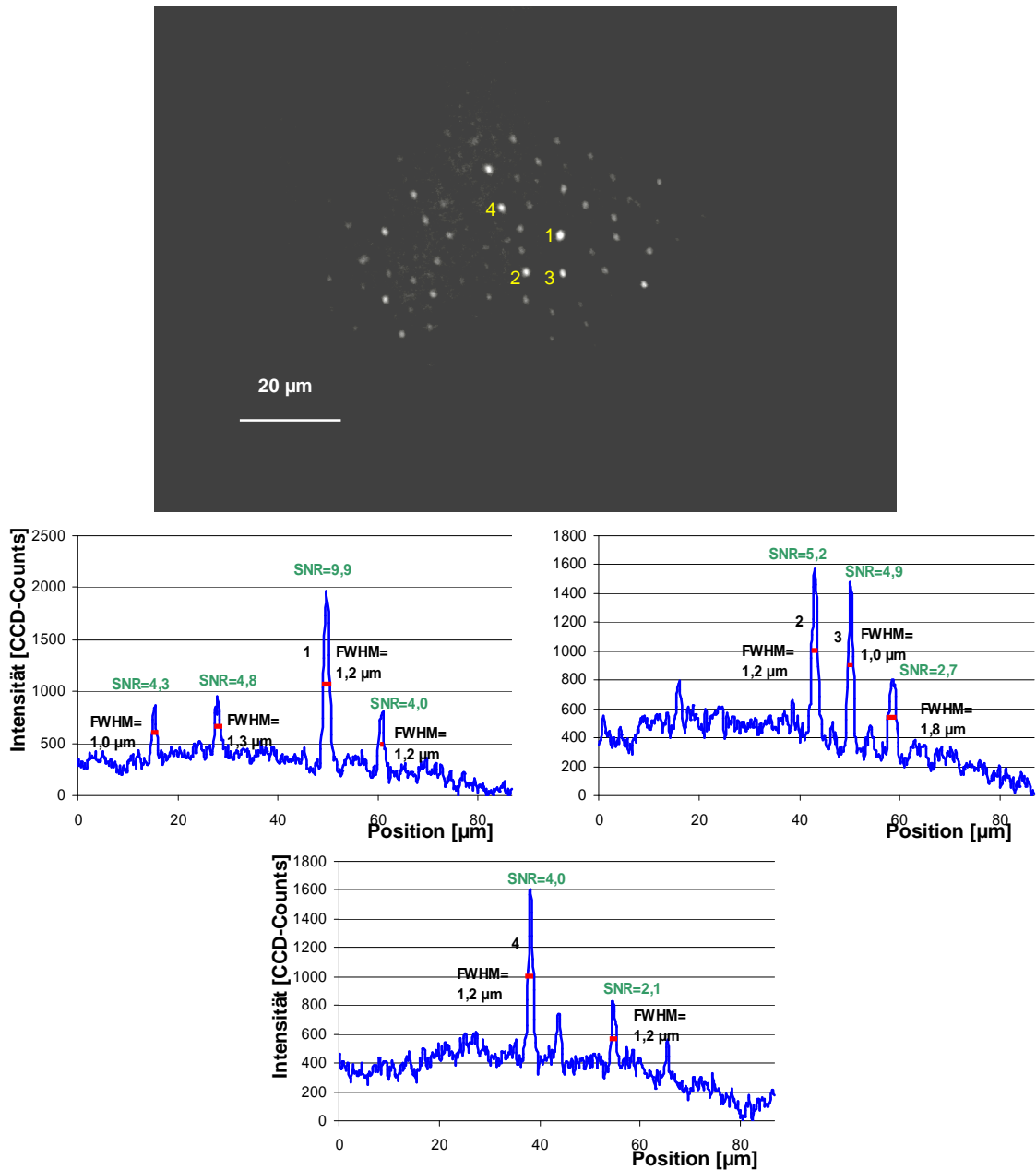
Aus dieser Darstellung ist ersichtlich, dass die UV-anregbaren Mikropartikel in

<sup>4</sup>Warrington, PA 18976-2590



**Abbildung 6.15.:** Zweiphotonen-Anregung von grün fluoreszierenden Mikropartikeln ( $d = 2\mu\text{m}$ ) im Epifluoreszenzmodus, wobei der Durchmesser der Anregungszone auf etwa  $40\mu\text{m}$  aufgeweitet ist.

einem Bereich von etwa  $40\mu\text{m}$  Durchmesser angeregt wurden. Das Signal-zu-Rausch-Verhältnis aller betrachteten Objekte lag zwischen 2 und 4 für die „schwächeren“ Objekte, bei den es sich wahrscheinlich um Einzelobjekte handelte und bis zu 9,9 bei größeren Objekten, bei denen möglicherweise Cluster mit mehreren Partikeln vorlagen. Die gemessene FWHM lag bei  $1,2\mu\text{m} \pm 0,2\mu\text{m}$ , wobei hier insgesamt neun Objekte gemessen und die Standardabweichung der Einzelmessung berechnet wurde. Die maximale Auflösung bzw. die durch die Detektionseigenschaften definierte



**Abbildung 6.16.:** Zweiphotonen-Anregung von UV-anregbaren Mikropartikeln ( $d = 200 \text{ nm}$ ) im Epifluoreszenzmodus, wobei der Durchmesser der Anregungszone auf etwa  $40 \text{ μm}$  aufgeweitet ist.

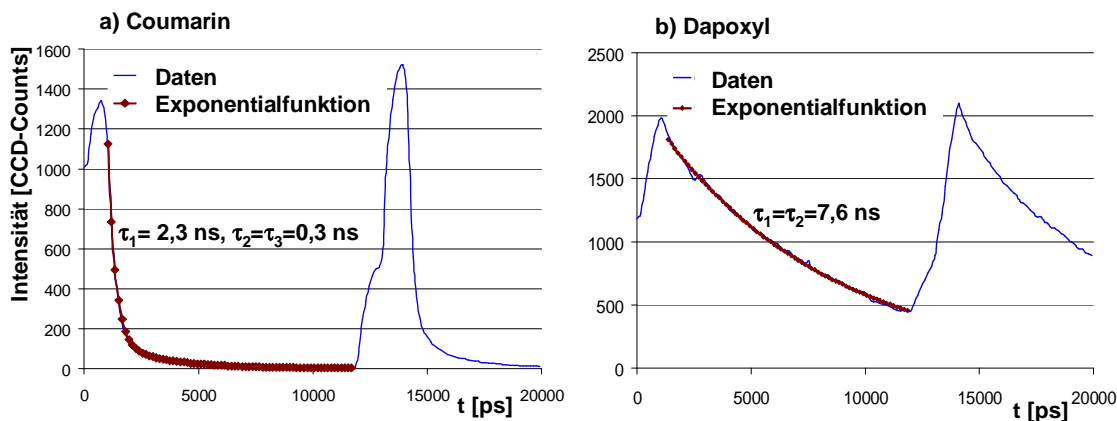
minimale Breite der PSF wird beschrieben durch

$$FWHM_{theo} = 0,52 \frac{\lambda}{NA}.$$

Bei der Verwendung von Objektiven mit einer numerischen Apertur von  $NA = 0,65$  ergibt sich hieraus die minimale FWHM zu  $\approx 0,6 \mu\text{m}$ . Insgesamt ist folglich festzuhalten, dass die gemessenen Werte der FWHM unter diesen Bedingungen bereits recht nahe am theoretisch möglichen Bestwert liegen.

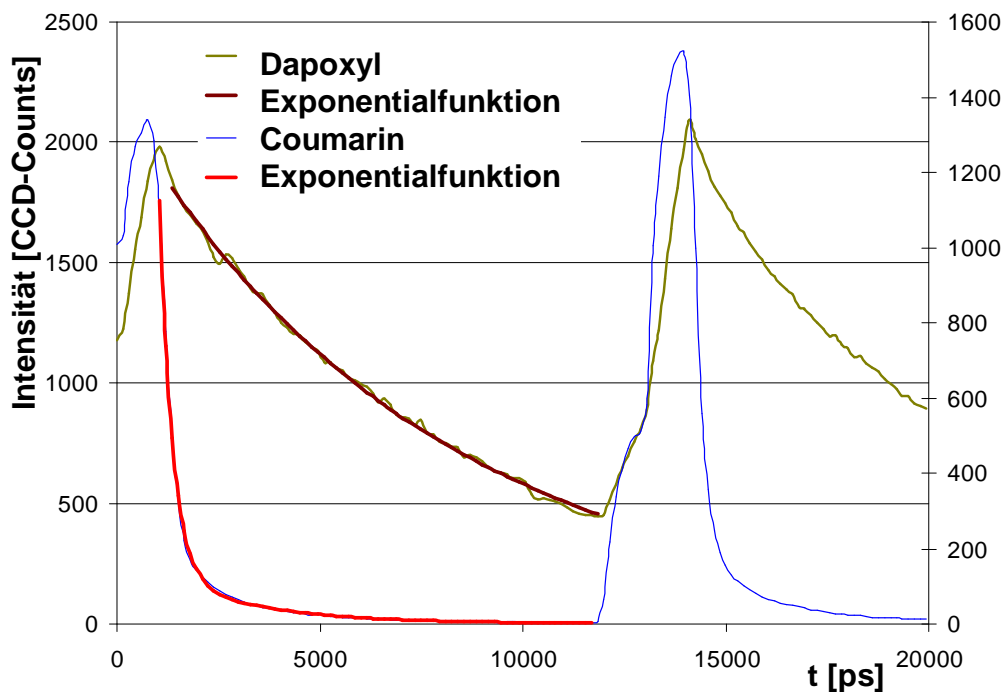
### 6.2.5. Messungen von Fluoreszenzlebensdauern im Epifluoreszenzmodus

Im Epifluoreszenzmodus wurden darüberhinaus auch die Fluoreszenzlebensdauern derselben Farbstoffe gemessen, die bereits im fokussierten Modus untersucht wurden. Die dabei erhaltenen Ergebnisse sind in Abbildung 6.17 dargestellt und stimmen prinzipiell bezüglich der Zerfallskomponenten mit den im fokussierten Modus erhaltenen Zerfallzeiten der gleichen Farbstoffe überein. Die Genauigkeit bzw. der Fehler der verwendeten Anpassungsmethode liegt hier in der Größenordnung von 15 bis 20% (siehe Abschnitt 6.2.2). Unter diesen Voraussetzungen ergibt sich hier eine Fluoreszenzlebensdauer von  $(2,2 \pm 0,3)$  ns für Coumarin und  $(7,6 \pm 1,0)$  ns für Dapoxyl. Diese Feststellung erscheint auf den ersten Blick etwas erstaunlich, da die Lebensdauerprofile im Epifluoreszenzmodus teilweise deutlich langsamer abfallen als die vergleichbaren Profile im fokussierten Modus. Tatsächlich sind jedoch bei diesen Farbstoffen alle Zerfallskomponenten unabhängig vom verwendeten Anregungsmodus vorhanden, werden aber unterschiedlich stark gewichtet. Aus diesem Grunde ist im Epifluoreszenzmodus aufgrund der geringeren lokalen Intensität davon auszugehen, dass der Farbstoff bei näherungsweise unveränderter Mikroumgebung überwiegend in seiner Grundstruktur vorliegt und somit die längere Hauptkomponente des Zerfalls stark überwiegt. Die hier durchgeführten Messungen der Fluoreszenzlebensdauer an



**Abbildung 6.17.:** Lebensdauerprofile der Farbstoffe Coumarin a) und Dapoxyl b) aufgenommen im Epifluoreszenzmodus. Dabei ergeben sich Fluoreszenzlebensdauern von  $(2,2 \pm 0,3)$  ns für Coumarin und  $(7,6 \pm 1,0)$  ns für Dapoxyl.

verschiedenen Farbstoffen zeigen, dass diese Farbstoffe mittels ihrer Lebensdauer bezeichnet und unterschieden werden können (siehe Abbildung 6.18), da der Farbstoff Coumarin stets eine deutlich kürzere Lebensdauer aufweist als Dapoxyl. Diese Tatsache ermöglicht es, die Fluoreszenzlebensdauer als zusätzliche spektrale Signatur zur Identifizierung und Unterscheidung fluoreszierender Markierungen heranzuziehen. Eine abschließende Zusammenstellung der erhaltenen Ergebnisse einschließlich



**Abbildung 6.18.:** Direkter Vergleich der Fluoreszenzlebensdauern von Coumarin und Dapoxyl. Hieraus ist ersichtlich, dass die Fluoreszenzlebensdauern beider Farbstoffe gut unterschieden werden können und somit eine weitere spektrale Signatur zur Fluoreszenzmarkierung zur Verfügung steht.

eines Vergleichs von fokussiertem und Epifluoreszenzmodus ist aus Tabelle 6.7 zu ersehen.

Farbstoff	Epifluoreszenzmodus	fokussierter Modus
Coumarin	$2,2 \pm 0,3$ ns	$1,6 \pm 0,2$ ns
Dapoxyl	$7,6 \pm 1,0$ ns	$6,2 \pm 0,9$ ns
F-Rot	$> 12$ ns	$> 12$ ns

**Tabelle 6.7.:** Ergebnisse der Fluoreszenzlebensdauermessungen an verschiedenen Farbstoffen.

### 6.2.6. Experimente zur Implementierung der SMI-Anregung

Nach der erfolgreichen Etablierung des Epifluoreszenzmodus wurde mit der experimentellen Verwirklichung des eigentlichen SMI-Betriebs begonnen. Dazu müssten die Laserpulse im Verhältnis 50/50 geteilt und im Objektbereich überlagert werden. Ein beim Übergang vom Epifluoreszenz- zum SMI-Modus auftretendes grundsätzliches Problem ergibt sich dabei aus den außerordentlich kurzen Pulslängen von 200 fs und den daraus folgenden kurzen Wellenzügen, die in Luft nur etwa  $60 \mu\text{m}$  lang sind. Zur Grobjustierung des SMI-Interferometeraufbaus wurden daher zunächst die beiden Objektive aus dem Interferometer entfernt und die beiden Anregungsstrahlen mittels der Einfokussierlinsen ( $f = 80 \text{ mm}$ ) auf den ungefähren Objektbereich fokussiert. Als Einstellungshilfe hierfür wurde in die Objektebene ein Spiegel eingebracht, der das Licht durch die Einfokussierlinse zurück reflektierte. Bei richtiger Fokussierung war rückwärts ein kollimierter Strahl beobachtbar.

Nach dieser Fokussierung wurde ein Objektträger mit einer grün fluoreszierenden Schicht eingelegt und die Zweiphotonen-Anregung beobachtet. Dabei ergab sich, dass eine besonders starke Fluoreszenz genau an den Stellen auftrat, an denen sich der Objektträger im Fokus einer der beiden Einfokussierlinsen befand. Da dieser Sachverhalt das Auffinden des gesuchten Überlagerungspunkts der Laserpulse deutlich erschwerte, wurden nach den ersten Experimenten auch die Einfokussierlinsen entfernt, um direkt mit dem kollimierten Anregungsstrahl im Objektbereich zu arbeiten. Zunächst mussten hierzu die beiden gegenläufigen Teilstrahlen im Interferometer zur Interferenz gebracht werden. Dazu wurde mehrfach nach dem in den Abschnitten 5.1.1 und 5.2.1 beschriebenen Justageverfahren vorgegangen, wobei jeweils zuerst der He-Ne-Laserstrahl verwendet und anschließend mit dem NIR-Strahl nur noch einmal nachgeregelt wurde. Dieser Vorgang musste nach der ersten erfolgreichen Einstellung einmal pro Woche ausführlich wiederholt werden, um die kontinuierliche Überlagerung der beiden Teilstrahlen zu gewährleisten.

Daraufhin wurde ein Objektträger mit einer grün fluoreszierenden Schicht eingelegt und unter Verwendung einer geeigneten Laserschutzbrille der fluoreszierende Punkt ohne weitere optische Hilfsmittel aufgesucht. Dies war jedoch über längere Zeiträume sehr anstrengend, da der Punkt, an dem die Fluoreszenz auftrat, nur sehr schwach wahrgenommen werden konnte. Aus diesem Grunde war es nicht notwendig, den NIR-Strahl, wie ursprünglich geplant, mit Graufiltern soweit abzuschwächen, dass die Intensität eines der beiden Teilstrahlen des Interferometers gerade nicht mehr zur Fluoreszenz-Anregung ausreichte. Bei diesen Untersuchungen wurde nach dem Punkt gesucht, an dem sich die Pulse der beiden Teilstrahlen im Interferometer überlagerten und dadurch eine etwa viermal höhere Fluoreszenzintensität auftrat, verglichen mit der Anregung der Fluoreszenz durch nur einen der beiden Teilstrahlen. Dieser Punkt war nicht problemlos aufzufinden, weshalb nach einer noch ausgefeilteren Vorgehensweise gesucht wurde. Zunächst wurde ein Objektträger (im Folgenden als Nr.1 bezeichnet) bereitgestellt, auf dem ein Deckglas an zwei Seiten

mittels eines doppelseitigen Klebebandes aufgesetzt wurde, um eine Küvette mit etwa  $200\ \mu\text{m}$  Schichtdicke zu erhalten, in welche der Farbstoff mit einer Pipette eingebracht werden konnte. In einer anderen Variante wurde auf einem weiteren Objektträger (im Folgenden mit Nr.2 bezeichnet) eine rechteckige Küvette mit einer Grundfläche von  $10\ \text{mm} \times 10\ \text{mm}$  aufgeklebt, um bei Bedarf einen größeren Bereich absuchen zu können. Die Farbstoffe wurden in flüssiger Form in die Küvetten eingebracht, um eine homogene Farbstoffverteilung bereitzustellen. Zunächst wurden verschiedene Farbstoffe auf die Sichtbarkeit ihrer Fluoreszenz mit „bloßem“ Auge (aber selbstverständlich unter Verwendung der Laserschutzbrille) untersucht, wobei festgestellt wurde, dass sich Fluorescein am besten für die anstehenden Untersuchungen eignen würde. Bei diesem Farbstoff konnte unter Verwendung des Objektträgers Nr.1 zwar ein fluoreszierender Punkt gesehen werden, die Stelle mit der vierfachen Intensität war jedoch nicht auffindbar. Das Gleiche galt auch bei der Verwendung von Objektträger Nr.2, bei dem deutlich eine fluoreszierende Linie durch die ganze Küvette erkennbar war. Aber auch unter diesen Voraussetzungen war im gesamten Verfahrensbereich bis zum gegenwärtigen Zeitpunkt kein besonders heller Punkt (Aufblitzen) zu erkennen.

Im Rahmen dieser Untersuchungen wurde auch festgestellt, dass es bei exakter Justage des Aufbaus zu Rückreflexionen von Laserlicht in den Ti-Saphir-Laser kam, wenn beide Teilstrahlen des Interferometers verwendet wurden. Unter der Voraussetzung, dass einer der Teilstrahlen abgedeckt oder ein dispersives Element (z.B.: Einfokussierlinsen bzw. Objektive) in den Strahlengang eingebracht wurde, traten diese Rückreflexionen nicht auf. Zur Eliminierung dieses Problems wurden verschiedenen Möglichkeiten in Betracht gezogen. Zum Einen wurde eine Änderung der Polarisation mittels eines  $\lambda/4$ -Plättchens vorgenommen. Mit diesem Verfahren konnten die Rückreflexionen zwar nicht vollständig unterdrückt aber doch deutlich reduziert werden. Die zweite Variante bestand darin, die auftretenden Weglängen im gesamten Versuchsaufbau durch Einfügen zusätzlicher Spiegel so zu verändern, dass der zurückreflektierte Puls im Laserresonator nicht verstärkt wurde. Dazu musste die optische Weglänge außerhalb des Lasers deutlich verschieden zu einem ganzzahligen Vielfachen von vier Metern sein. Diese vier Meter entsprechen dabei gerade dem Abstand zwischen zwei aufeinanderfolgenden Laserpulsen. Diese Variante wurde jedoch aufgrund des relativ großen Aufwands und der Intensitätsverluste durch zusätzliche Spiegel nicht weiterverfolgt.

Nach der Reduzierung von Rückreflexionen in den Ti-Saphir-Laser wurden verschiedene Kameras zur direkten Detektion der Fluoreszenz ohne Verwendung des Detektionsstrahlengangs getestet. Am besten eignete sich eine von Herrn Dipl.-Ing. Heinz Eipel gebaute sehr empfindliche Videokamera, die mit einem Fernsehmonitor verbunden wird. Diese kleine Kamera wurde auf geeigneten Haltern befestigt, um direkten Einblick in den Objektbereich zu bekommen. Vor das Kameraobjektiv wurde ein geeigneter Filter angebracht, um das NIR-Licht zu sperren. In diesem Zusammenhang wurde auch festgestellt, dass das optische Filter mit OD6-Sperrung



weniger sperrt als der Filter der Laserschutzbrille. Aus diesem Grunde wurde vorübergehend ein Filter aus einer Laserschutzbrille ausgebaut und vor die Kamera gesetzt. Erste Tests mit der so präparierten Kamera zeigten, dass damit die Fluoreszenz im Objektbereich gut detektiert werden konnte. In dieser Konfiguration war folglich zu erwarten, dass der Punkt an dem sich die Laserpulse überlagern, aufgefunden werden könnte. Durch Verschiebung des Objektträgers entlang der  $z$ -Achse konnte auf diese Weise die Asymmetrie der Interferometerarme gemessen und anschließend durch entsprechende Feinjustagen eliminiert werden.

Nach dem Grobabgleich der Längen der Interferometerarme im Millimeterbereich wurden die beiden Objektive wieder eingesetzt und der Fokus der beiden Linsen in die hintere Fokusebene der Objektive justiert (siehe dazu Abschnitt 5.2.1). Der Feinabgleich der Interferenz in der Objektebene zwischen den Objektiven wurde durch sukzessives Verschieben der Position eines Interferometerspiegels bei Beobachtung des Interferenzmusters auf einem fluorchromierten Objektträger durchgeführt. Entsprechende präzisionsmechanische Vorrichtungen wurden konstruiert. Prinzipiell sollten damit auch hochpräzise Größen- und Distanzmessungen im SMI-Betrieb möglich werden, welche jedoch im Rahmen der vorliegenden Arbeit auch aus technischen Gründen nicht mehr realisiert werden konnten.



# 7. Zusammenfassung und Ausblick

In diesem abschließenden Kapitel werden zunächst die im Rahmen der vorliegenden Arbeit erhaltenen Ergebnisse zusammengefasst, wobei auch auf die experimentellen Änderungen und Unterschiede im Vergleich zu anderen SMI-Mikroskop-Prototypen [Schneider99, Albrecht02a] dargestellt werden. Daran schließt sich ein Ausblick an, in dem verschiedene Perspektiven zur Weiterentwicklung der SMI-Mikroskopie mit Einphotonen-Anregung aufgezeigt und Möglichkeiten zur Realisierung eines SMI-Mikroskops mit Zweiphotonen-Anregung diskutiert werden.

## 7.1. Zusammenfassung

Inhalt dieser Arbeit ist die Vorstellung des experimentellen Aufbaus eines Fluoreszenzmikroskops mit räumlich modulierter Anregung (**SMI-Mikroskop**) und der damit vorgenommenen Größen- und Distanzmessungen an einzelnen fluoreszierenden Objekten. Darüberhinaus wurden auch Experimente unter Anwendung der Zweiphotonen-Anregung an diesem Aufbau durchgeführt.

Um die beschriebenen Experimente durchführen zu können, wurde das SMI-Mikroskop vollständig neu aufgebaut und im Vergleich zum Vorgängermodell [Schneider99] und zum parallel mit anderen experimentellen Schwerpunkten entwickelten Prototyp [Albrecht02a] in zahlreichen Details modifiziert. Da zur Fluoreszenz-Anregung im Einphotonenmodus ein Multiline-Ar<sup>+</sup>-Laser verwendet wurde, mussten die einzelnen Laserlinien erst durch ein Dispersionsprisma aufgespalten werden. Dadurch konnte die für die Messungen erforderliche Wellenlänge, welche bei den hier vorgenommenen Untersuchungen bei  $\lambda = 458 \text{ nm}$  lag, selektiert und direkt in den Kollimator zur Aufweitung des Laserstrahls eingekoppelt werden. Dabei wurde bewusst auf die Verwendung einer Glasfaser zur Einkopplung des Lasers in das Mikroskop verzichtet, um einen zusätzlichen Leistungsverlust zu vermeiden. Durch den trigonalen Aufbau des Interferometers konnte eine weitgehende Angleichung der optischen Weglängen der interferierenden Teilstrahlen erreicht werden. In diesem Zusammenhang wurde der 50/50-Strahlteiler auf einem elektronisch steuerbaren Dreh-Kipp-Tisch und einer der Interferometerspiegel auf einem linearen Verschiebetisch mit Mikrometerschraube montiert, um diese Elemente besser einstellen zu können. Die piezoelektrischen Verschiebetische wurden vom

Vorgängeraufbau übernommen. Zur Detektion der Fluoreszenzemission wurde eine neue Schwarz/Weiss-CCD-Kamera eingebaut, die im Rahmen der Experimente mit Zweiphotonen-Anregung mit einem Bildverstärker kombiniert werden konnte.

Die **Steuerung** der CCD-Kamera, der piezoelektrischen Verstelltische und der Schrittmotoren wurde soweit möglich mit der von Herrn Dr. Benno Albrecht entwickelten und in [Albrecht02a] beschriebenen **Steuer-Software** vorgenommen. Dazu waren jedoch einige Anpassungen erforderlich, um die neue CCD-Kamera und die piezoelektrischen Verstelltische korrekt ansteuern zu können (Zusammenarbeit mit C. Wagner).

Zur **Auswertung** der gemessenen Bilddaten, wie sie in Kapitel 4 Abschnitt 4.4.2 dargestellt wird, wurde das Bildanalyse-Softwarepaket KHOROS der Khoral Research Inc.<sup>1</sup> angewendet [Rasure91, Kostatinides94], welches unter dem Betriebssystem LINUX läuft. Auf dieser Grundlage wurde aus den Messdaten die axiale Intensitätsverteilung extrahiert und eine vorgegebene Fitfunktion an diese Kurven angepasst, wobei die Parameter entsprechend variiert werden konnten. Mit dieser Methode konnten sowohl die Objektposition als auch der Modulationskontrast bestimmt werden. Aus diesen Werten konnte dann auf die Objektgröße und die axiale Distanz zwischen den Objekten geschlossen werden.

Im Rahmen der hier durchgeführten Experimente wurde die **axiale Ausdehnung fluoreszierender Objekte** gemessen, die im Vergleich zur Anregungswellenlänge als klein anzusehen waren. Dabei konnte die axiale Ausdehnung mit dem Durchmesser des Objekts für den Fall gleichgesetzt werden, in dem sphärische Objekte vorlagen. Um die Genauigkeit der Größenbestimmung abzuschätzen, wurden aus den betrachteten Datensätzen für jede nominelle Objektgröße jeweils etwa 10 bis 15 Objekte ausgewählt, über die Einzelmessungen gemittelt und die Standardabweichung berechnet. Auf diese Weise wurden für Beads mit einem nominellen Durchmesser von 57, 71, 100, 140 und 200 nm Objektgrößen zwischen 78 nm für die kleinsten Beads bis hin zu 165 nm bei den größten Objekten gemessen. Die Präzision dieser Messungen, welche über die Standardabweichung der Einzelmessung definiert wurde, lag hier zwischen 10 und 20 nm. Bei allen in diesem Zusammenhang durchgeführten Messungen konnte eine prinzipielle Abhängigkeit des Modulationskontrasts von der nominellen Objektgröße festgestellt werden. Grundsätzlich lagen alle Größmessungen in der richtigen Größenordnung. Diese Feststellungen galten dabei im Wesentlichen unabhängig von den zur Messung verwendeten Objektiven, so dass es hier auch möglich war, preislich günstigere Objektive mit einfacheren Korrekturen einzusetzen. Die vorhandenen systematischen Abweichungen der gemessenen Objektgrößen von den nominellen Durchmessern konnten einerseits durch lokale Variationen der physikalischen Parameter im experimentellen Aufbau, wie z. B. Brechungsindex und Winkel zwischen den interferierenden Teilstrahlen verursacht werden, die sich

---

<sup>1</sup>6200 Uptown Blvd. N.E., Suite 200, Albuquerque, NM 87110-4142, U.S.A., <http://www.khoral.com>

im Verlauf der Messungen nicht exakt bestimmen ließen. Andererseits musste auch von einem Einfluss der Objektform bzw. der Form der Fluoreszenzfarbstoffverteilung des Objekts auf die Messung der Größe ausgegangen werden. Zur Klärung dieser Frage laufen gegenwärtig Untersuchungen, die verschiedene Kalibrationskurven zur Bestimmung der Objektgröße aus dem Modulationskontrast in Abhängigkeit von der Objektform vorsehen (Zusammenarbeit mit C. Wagner).

Vergleichende Messungen derselben Präparate am konfokalen Laser-Scanning-Mikroskop ergaben in diesem Zusammenhang eine Halbwertsbreite der axialen Intensitätsverteilung von  $\geq 600$  nm unabhängig vom Durchmesser der Objekte. Das bedeutet, dass bei der Messung von Objekten mit Durchmessern kleiner als die optische Auflösungsgrenze in axialer Richtung stets eine Objektgröße korrespondierend mit der FWHM der axialen Intensitätsverteilung gemessen wurde. Bei Durchführung einer Dekonvolution würden sich dabei „punktförmige“ Objekte ergeben. Tatsächlich konnten bei den Messungen am CLSM keine sinnvollen Aussagen über die Objektgröße gemacht werden. Im Gegensatz dazu konnten unter Anwendung der Mikroskopie mit räumlich modulierter Anregung Objektgrößen deutlich unterhalb der optischen Auflösungsgrenze gemessen werden.

Darüberhinaus wurden im Rahmen der Experimente **Distanzen** zwischen den Schwerpunkten der Fluoreszenzfarbstoffverteilungen der Beads mit 100 nm Durchmesser vorgenommen. Der laterale Abstand der betrachteten Beads musste dabei so groß gewählt werden, dass die Schwerpunkte der Fluoreszenzfarbstoffverteilungen gut getrennt werden konnten. Folglich waren alle lateralen Abstände  $\geq 500$  nm. Zur Bestimmung der axialen Distanzen zwischen den betrachteten Bead-Paaren wurden die Messungen der axialen Intensitätsverteilungen und damit der Objektpositionen für jedes Objekt jeweils etwa 5 bis 8-mal hintereinander vorgenommen. Dabei ergaben sich bei Verwendung der einfachen Objektive axiale Distanzen zwischen 10 und 300 nm mit einer Standardabweichung der Einzelmessung im Bereich zwischen 242 und 500 nm. Diese relativ großen axialen Distanzen und vor allem die große Standardabweichung können dabei folgende Ursachen haben:

Eine Ursache liegt in **systematischen zeitlichen Änderungen** der lokalen physikalischen Parameter bei der Durchführung der Messungen. Darunter sind vor allem lokale Brechungsindexvariationen z.B. durch Luftblasen im Einbettungsmedium, unterschiedliche Brechungsindizes innerhalb der Objekte oder Veränderungen der Immersionsflüssigkeit und temporäre Variationen des Winkels zwischen den interferierenden Teilstrahlen zu verstehen. In diesem Zusammenhang sind auch mögliche Probleme bei der Fixierung der Objekte zu sehen, die zu einer Bewegung der Objekte während der Durchführung der Sequenzaufnahmen auch in axialer Richtung führen können. Weiterhin können große Distanzwerte auch damit erklärt werden, dass sich ein Objekt auf dem Objektträger und das zweite Objekt in der Schicht des Einbettungsmediums Vectashield befindet, die einige Mikrometer dick sein kann.

Eine zweite Ursache für diese Abweichungen liegt in systematischen Fehlern, die

bei der Auswertung der Bilddaten aufgetreten sind. Dabei ist vor allem problematisch, dass die Anpassung der Fitfunktion an die gemessenen axialen Intensitätsverteilungen häufig manuell vorgenommen werden musste. Darüberhinaus ist es grundsätzlich schwieriger, die genaue Position des Maximums einer Kurve festzustellen, wenn die Kurve wie in diesem Fall mit etwa  $2\ \mu\text{m}$  relativ breit ist.

Dabei zeigte sich im Rahmen dieser Experimente das **grundsätzliche Problem**, nachdem es nicht möglich ist im Voraus zu entscheiden, ob die festgestellten Abweichungen durch systematische Fehler bei der Durchführung der Messungen oder im Rahmen der Auswertungen bestimmt werden. Um den Einfluss des verwendeten Auswert-Algorithmus auf die Ergebnisse der Größen- und Distanzmessungen zu untersuchen, werden gegenwärtig neue Algorithmen entwickelt, bei denen neue Anpassungsmethoden angewendet werden, die eine höhere Automatisierung der Auswertung ermöglichen sollen (Zusammenarbeit mit C. Wagner). Insgesamt lieferten die hier vorgestellten Messungen der axialen Distanzen gute Ergebnisse im Vergleich mit anderen nicht-konfokalen Mikroskopiemethoden.

In einem zweiten Schwerpunkt der hier vorgestellten Arbeiten wurden Messungen unter Verwendung der **Zweiphotonen-Anregung** durchgeführt. Dazu wurde der Multiline- $\text{Ar}^+$ -Laser als Pumplaser für einen gepulsten Ti-Saphir-Laser eingesetzt, der zur Realsisierung der Zweiphotonen-Anregung über den entsprechend angepassten Kollimator in den Mikroskopaufbau eingekoppelt wurde. Auf diese Weise konnte ein gepulster NIR-Laserstrahl mit einer Wellenlänge von  $\lambda = 760\ \text{nm}$  bei einer Wiederholfrequenz von 76 MHz mit einer durchschnittlichen Ausgangsleistung von 0,8 W benutzt werden. Zum Nachweis des Zweiphotonen-Effekts wurde das Anregungslicht zunächst direkt auf die Probe fokussiert und das emittierte Fluoreszenzlicht mittels der CCD-Kamera detektiert. Dabei konnten Zweiphotonen-Effekte für praktisch alle untersuchten Farbstoffe, wie z. B. DAPI, H33258, Dapoxyl und Coumarin aber auch bei Mikropartikeln mit UV- und visueller Anregung durch Fluoreszenz im sichtbaren Spektralbereich bei Anregung mit NIR nachgewiesen werden. In diesem Rahmen konnte auch die quadratische Abhängigkeit der Zweiphotonen-Fluoreszenz von der Intensität der Anregung verifiziert werden, indem Messungen bei verschiedenen Abschwächungen der Anregungsintensität durch Anwendung von Graufiltern mit verschiedenen Transmissionsfaktoren vorgenommen wurden.

Nachdem der Nachweis der Zweiphotonen-Effekte geführt war, konnte mit der Implementierung des **Epifluoreszenzmodus** begonnen werden. Dabei war vor allem die Frage zu klären, ob die verfügbare Anregungsintensität noch zur Erzeugung von Zweiphotonen-Effekten ausreicht, wenn der Durchmesser des Anregungsstrahls auf einige  $10\ \mu\text{m}$  aufgeweitet wird. Zur Durchführung dieser Messungen wurde die bildverstärkte CCD-Kamera eingesetzt, da unter diesen Voraussetzung von relativ schwachen Fluoreszenzsignalen ausgegangen werden musste. Folglich wurde zunächst der Bildverstärker neu in den Mikroskopaufbau integriert. Bei den daraufhin durchgeführten Messungen konnte tatsächlich ein Objektbereich mit einem Durchmesser von etwa

40  $\mu\text{m}$  ausgeleuchtet werden, innerhalb dessen Zweiphotonen-Anregung beobachtbar war. Im Rahmen dieser Messungen wurden UV-anregbare Beads mit einem Durchmesser von 200 nm untersucht. Dabei ergab sich bei der Auswertung der lateralen Intensitätsprofile bei gutem Signal-zu-Rausch-Verhältnis eine Halbwertsbreite zwischen 1,0 und 1,3  $\mu\text{m}$ , was bei Verwendung der Objektive mit einer numerischen Apertur von  $NA = 0,65$  bereits nahe an die optische Auflösung herankam. Darüberhinaus konnten die Objektgrößen von grün fluoreszierenden Beads mit einem Durchmesser von 2  $\mu\text{m}$  und von Rhodamin-6G-Kristallen bei gutem Signal-zu-Rausch-Verhältnis bereits richtig abgeschätzt werden. Hier handelte es sich nach unserem Wissen um die ersten Experimente, bei denen die Zweiphotonen-Anregung nicht fokussiert sondern mit **aufgeweitetem Anregungsstrahl** erfolgreich vorgenommen wurde.

In weiteren Untersuchungen wurde die gepulste Anregung angewendet, um damit die **Fluoreszenzlebensdauer** der verwendeten Farbstoffe zu messen. Dazu wurde die gute zeitliche Tastbarkeit der bildverstärkten CCD-Kamera ausgenutzt, um nach einem vorher festgelegten Abstand vom Laserpuls jeweils die Fluoreszenz über einen eingestellten Zeitraum („Zeitfenster“) zu detektieren. Aus den daraus erhaltenen Profilen, bei denen die Fluoreszenzintensität mit der Zeit, die seit dem Laserpuls vergangen war, exponentiell abnahm, konnte die Fluoreszenzlebensdauer durch geeignete Anpassung einer Exponentialfunktion bestimmt werden. Dabei ergab sich, dass die Fluoreszenzlebensdauer der speziell darauf untersuchten Farbstoffe Coumarin, Dapoxyl und F-Rot gut voneinander unterschieden werden konnten. Somit kann die Fluoreszenzlebensdauer als zusätzliche **spektrale Signatur** zur Unterscheidung von Fluoreszenzfarbstoffen verwendet werden (*Fluorescence Lifetime Imaging Microscopy, FLIM* [Lakowicz92, Marriott91]).

Abschließend wurden Experimente zur Implementierung der räumlich modulierten Anregung (**SMI-Modus**) im Rahmen der Zweiphotonen-Anregung durchgeführt. Dabei erwies sich die exakte Justage des Interferometers, bei dem die optischen Weglängen der Teilstrahlengänge innerhalb der kurzen Kohärenzlänge der Laserpulse von etwa 60  $\mu\text{m}$  gleich lang sein müssen als so komplex, dass der SMI-Modus im Rahmen dieser Arbeit nicht mehr realisiert werden konnte.

## 7.2. Ausblick

Nachdem in dieser Arbeit gezeigt werden konnte, dass mittels der Mikroskopie mit räumlich modulierter Anregung unter Verwendung der Einphotonen-Anregung sowohl die Größen in axialer Richtung als auch die Positionen und axialen Distanzen von Objekten deutlich kleiner als die optische Auflösung gemessen werden können, werden im Folgenden Perspektiven aufgezeigt, mit denen die SMI-Mikroskopie zukünftig weiter verbessert und ausgebaut werden kann.

Bei der Verbesserung bzw. **Optimierung** des gegenwärtig bestehenden Mikroskop-Prototyps zu einem Präzisions-SMI-Mikroskop müssen Modifikationen in

der Weise vorgenommen werden, dass einerseits die Breite der gemessenen axialen Intensitätsverteilungen und andererseits das Hintergrundrauschen reduziert wird. Um zunächst die prinzipielle Machbarkeit der Methode und die physikalischen Eigenschaften des Aufbaus zu untersuchen, wurden bei den hier vorgestellten Messungen überwiegend preisgünstige, einfachere Objektive mit einer numerischen Apertur von  $NA \approx 1,2$  verwendet. Würden in diesem Zusammenhang Objektive mit einer größeren numerischen Apertur  $NA \geq 1,4$  eingesetzt, so würden sich Messkurven mit deutlich kleinerer Halbwertsbreite ergeben. Im gegenwärtigen Aufbau werden dichroitische Strahlteiler verwendet, die das Anregungslicht transmittieren und das emittierte Fluoreszenzlicht reflektieren. Da das Interferometer folglich zwei zusätzliche Komponenten enthält, kommt es zu einer geringen Abschwächung des Anregungsstrahls und zu eventuellen zusätzlichen Interferenzen durch die planparallelen Strahlteiler. Würde man die dichroitischen Strahlteiler so einrichten, dass das Anregungslicht reflektiert und das Fluoreszenzlicht transmittiert würde, so könnte man diese Strahlteiler direkt als Interferometerspiegel verwenden. Damit enthielte das Interferometer zwei optische Komponenten weniger und unerwünschte Interferenzen würden vermieden. In diesem Zusammenhang müssten jedoch zunächst neue Objektivhalterungen konstruiert werden, mit denen sich die Anpassung der geometrischen Verhältnisse realisieren ließe. Im Rahmen dieser Arbeiten könnten darüberhinaus verschiedene geometrische Konfigurationen getestet und der trigonale mit einem rechteckigen Aufbau verglichen werden.

In der nächsten Zeit sind verschiedene **Messungen** geplant, mit denen zum Einen die physikalischen Eigenschaften des Mikroskops weiter beschrieben und zum Anderen die Möglichkeiten zur Messung an biologischen Proben untersucht werden sollen. So zeichnen sich *Nanokristalle* bzw. *Quantum Dots* [Bruchez98] vor allem durch ihre geringe Größe von wenigen Nanometern aus, so dass die Möglichkeiten der Größen- und Distanzmessung damit gut zu untersuchen sind. Darüberhinaus weisen Nanokristalle bei Verwendung desselben Anregungsspektrums durchaus unterschiedliche Emissionsspektren auf [Banin98], so dass SPDM auch bei Verwendung nur einer Anregungswellenlänge ermöglicht wird. Im Rahmen dieser Untersuchungen soll auch festgestellt werden, ob einzelne Farbstoffmoleküle nachgewiesen werden können. Im Rahmen von **Messungen an biologischen Proben** ist die Messung von Positionen und Distanzen markierter Objekte und die Bestimmung der Größe dieser Objekte von entscheidender Bedeutung bei der Untersuchung der dreidimensionalen Struktur von Chromatin-Nanostrukturen. Dabei interessiert vor allem die räumliche Anordnung dieser Nanostrukturen im Verhältnis zu supramolekularen Komplexen („Biomolekulare Maschinen“). Diese Strukturen spielen eine wesentliche Rolle bei der Transkription oder Reparatur in intakten menschlichen Zellkernen [TCremer00, TCremer01, Lamond98].

Zur Kombination von spektraler Präzisions-Distanz-Mikroskopie (SPDM) und SMI-Mikroskopie ist es erforderlich, **verschiedene Anregungswellenlängen** zur



Verfügung zu stellen. Im gegenwärtigen Aufbau können durch die Verwendung des Multiline-Ar<sup>+</sup>-Lasers neben der Laserlinie bei  $\lambda = 458$  nm noch Laserlinien bei Wellenlängen von 476 nm, 488 nm und 514 nm eingekoppelt werden. Dabei können prinzipiell entweder nur eine Wellenlänge oder eine Kombination aus mehreren Wellenlängen gleichzeitig eingekoppelt werden. Weitere Laserlinien bei größeren und kleineren Wellenlängen können verwendet werden, wenn zusätzliche Laser bereitgestellt werden. Insgesamt ist bei der Auswahl der Anregungswellenlängen darauf zu achten, dass sowohl die Filter und Strahlteilerprismen des SMI-Mikroskops als auch die zur Fluoreszenzmarkierung der Proben verwendeten Farbstoffe passend auf die Anregungswellenlänge abgestimmt sind. Dies gilt insbesondere bei der Untersuchung biologischer Proben, bei denen es oft einige Jahre dauern kann bis geeignete Markierungen zur Verwendung bei einer speziellen Anregungswellenlänge entwickelt werden.

Eine wesentliche Verbesserung des gegenwärtigen Aufbaus im Sinne der praktischen Anwendung insbesondere bei der Durchführung von *in vivo* Messungen würde sich aus einem **vertikalen Aufbau** des SMI-Mikroskops ergeben. Auf diese Weise könnte durch die horizontale Orientierung des Objektträgers vermieden werden, dass sich die betrachteten Objekte und die Einbettungs- und Immersionsmedien in Richtung der Schwerkraft bewegen. Unter dieser Voraussetzung könnten dann auch Messungen an Objekten in Lösung vorgenommen werden. Darüberhinaus würde ein vertikaler Aufbau in der Regel eine größere Kompaktheit und Stabilität aufweisen.

Wie aus den in dieser Arbeit durchgeführten Messungen deutlich wird, ist die räumlich modulierte Anregung im gegenwärtigen Aufbau nur in axialer Richtung realisiert. Das bedeutet, dass die Vorteile der SMI-Mikroskopie, die sich aufgrund des Wellenfeldes ergeben, auch ausschließlich für die axiale Richtung zum Tragen kommen. Aus diesem Grunde würde sich eine erhebliche Erweiterung der SMI-Mikroskopie ergeben, wenn die räumlich modulierte Anregung auch in der lateralen Ebene eingeführt werden könnte. Um dies zu realisieren, wären verschiedene Ansätze denkbar. So könnte die SMI-Mikroskopie zum Beispiel mit der **Mikroaxialtomographie** [Bradl94, Kozubek02] kombiniert werden. Im Rahmen der Mikroaxialtomographie werden die Objekte auf eine Glasfaser aufgebracht, die mittels eines miniaturisierten Schrittmotors in definierter Weise gedreht werden kann. Mit dieser Methode können die Objekte folglich aus verschiedenen Richtungen in der Weise aufgenommen werden, dass auch Strukturen in der lateralen Ebene mit der Genauigkeit der Messungen in axialer Richtung bestimmt werden können. Ein weitere Möglichkeit zur Einführung eines lateralen Wellenfeldes bestünde in der Kombination der SMI-Mikroskopie mit der **Total Internal Reflection Fluorescence (TIRF)-Microscopy** [Upmann02]. Bei der TIRF-Mikroskopie wird das Anregungslicht in der Weise am Rand des Objektivs eingekoppelt, dass der Laserstrahl unter dem Brewsterwinkel auf die Deckglasoberfläche auftrifft und wieder in das Objektiv mit großer Linsenöffnung zurückreflektiert wird. Auf diese Weise entsteht im Objektbereich ein evaneszentes Feld, mit dem die Objekte zur Fluoreszenz angeregt

werden. Wird hier über den Strahlengang, in den der Laserstrahl zurückreflektiert wird, ein zweiter Laserstrahl eingekoppelt, so ergibt im Objektbereich eine räumlich modulierte Anregung in lateraler Richtung. Darüberhinaus könnten Interferenzen in beiden lateralen Raumrichtungen durch geeignete Gitter im Anregungsstrahlengang durch „harmonische Anregung“ (*engl. harmonic excitation*) erzeugt werden [Heintzmann98, Frohn01]. Dadurch ergäbe sich eine laterale Modulation im Objektbereich, die durch entsprechende Steuerung der optischen Elemente durch die Probe durchgeföhren werden könnte. Ein weiterer Vorteil dieser Methode würde darin bestehen, dass eines der beiden bisher verwendeten Objektivs eingespart werden könnte.

Zur Realisierung von Fluoreszenzlebensdauermessungen und **FLIM** (s.o.) nicht nur im Rahmen der Zweiphotonen-Anregung, die ausschließlich sehr kostenintensive Lasersysteme erfordert, sondern auch bei Anwendung der Einphotonen-Anregung, wird der Einsatz von gepulsten Laserdioden im sichtbaren Spektralbereich in Erwägung gezogen. Diese neuerdings auch relativ preiswert erhältlichen Laserdioden sind sowohl für den wichtigen kurzwelligen Bereich zwischen  $\lambda = 450$  und  $\lambda = 550$  nm als auch für den roten Spektralbereich erhältlich, wobei der Pulsabstand einige zehn Nanosekunden beträgt. Zur Messung der mittels dieser gepulsten Anregung erhaltenen Fluoreszenzlebensdauer der verwendeten Farbstoffe unter Anwendung der Einphotonen-Anregung kann dann die zeitaufgelöste, bildverstärkte CCD-Kamera eingesetzt werden, die bisher nur im Rahmen der Zweiphotonen-Anregung verwendet wurde.

Nachdem im Rahmen dieser Arbeit bereits eine **Zweiphotonen-Anregung** im Epifluoreszenzmodus erfolgreich etabliert werden konnte, ergaben sich bei der experimentellen Realisierung der räumlich modulierten Anregung (SMI-Modus) erhebliche Schwierigkeiten, die vor allem durch die sehr kurzen Pulslängen des Ti-Saphir-Lasers von etwa 200 fs und der daraus folgenden kurzen Ausdehnung der Wellenzüge (Kohärenzlänge = 60  $\mu\text{m}$  in Luft) verursacht wurden. Eine Überlagerung der im Verhältnis 50/50 geteilten Laserpulse im Objektbereich wurde mit dem gegenwärtig vorhandenen Mikroskop-Prototyp nicht erreicht.

Aus diesem Grunde ist für die Realisierung des SMI-Modus ein kompakterer Aufbau der Mikroskopbestandteile vorgesehen, bei dem die optischen Komponenten in festem Abstand zueinander auf einer gemeinsamen Trägerkonstruktion eingebaut werden, so dass sich aus der Anordnung der Interferometerspiegel und des 50/50-Strahlteilers bereits weitgehend symmetrische Teilstrahlengänge ergeben. Dabei soll die Trägerkonstruktion möglichst kompakt und die gegenseitige Position der optischen Komponenten innerhalb der mechanischen Toleranzgrenze von 0,1  $\mu\text{m}$  konstant sein. Als freie, einstellbare Parameter werden nur noch Drehung und Verkippung der optischen Komponenten sowie eine Bewegung der gesamten Trägerkonstruktion parallel zur optischen Achse relativ zu den feststehenden Objektiven zugelassen. Mit dieser Konstruktion sollte es besser möglich sein, die kurzen Laserpulse im Bereich zwischen den beiden Objektiven zu überlagern.

Einige adäquate Justagemöglichkeiten zum Auffinden des Raumpunkts, an dem Interferenz zwischen den beiden Teilstrahlen stattfindet, sind bereits in Abschnitt 6.2.6 auf Seite 119 dargestellt. Im Wesentlichen kommt es hier auf eine gute Sichtbarmachung des Interferenzpunkts durch Verwendung geeigneter Fluoreszenzfarbstoffe in ausreichender Menge und auf die effiziente Detektion der erhaltenen Fluoreszenz an. Die Grobeinstellung des Interferenzpunkts im Objektbereich kann dabei zunächst ohne Objektive und Einfokussierlinsen durchgeführt werden. In diesem Zusammenhang muss dann auf Videokameras oder andere Detektionssysteme mit ausreichender Empfindlichkeit zurückgegriffen werden, da mit der CCD-Kamera des Mikroskopaufbaus ohne die Objektive keine Detektion erfolgen kann. Zum anschließenden exakten Feinabgleich der Interferometerarme wird die vollständige SMI-Mikroskopkonfiguration wiederhergestellt. Auf diese Weise wird der Interferenzpunkt durch Beobachtung des Interferenzmusters auf flouorochromierten Objektträgern mittels der CCD-Kamera und gleichzeitigem definiertem Verschieben der Position eines der Interferometerspiegel aufgesucht. Unter Verwendung einer neuen mechanischen Mikroskopkonstruktion und nach sorgfältiger Durchführung der beschriebenen Justagen sollte es gelingen, die Zweiphotonen-Anregung auch im Rahmen der SMI-Mikroskopie anzuwenden.

Um die hier vorgestellte Mikroskopiemethode zu **kommerzialisieren** und damit die routinemäßige Anwendung in Biologie und Medizin zu ermöglichen, sind unabhängig von der verwendeten Anregung noch einige prinzipielle Aspekte zu betrachten. Von entscheidender Bedeutung für die Kommerzialisierung ist ein möglichst kompakter Aufbau, der im Idealfall als Zusatzmodul an konventionelle Mikroskope angebaut werden könnte. Aus diesem Grunde sollte ein kompakter, stabiler Aufbau entwickelt werden, der nach Möglichkeit vertikal orientiert ist. Darüberhinaus müsste die Handhabung des Mikroskops noch deutlich verbessert werden. Dabei sollte vor allem das Aufsuchen der Fokusebene und der zur Messung vorgesehenen Objekte automatisiert und mittels eines Okulars nachprüfbar gemacht werden. Die Steuersoftware sollte so eingerichtet werden, dass nach der Durchführung der Messungen sofort durch einen „Klick“ auf ein Objekt dessen Größe berechnet und dargestellt wird. Darüberhinaus ist eine dreidimensionale Darstellung der gemessenen Objekte erforderlich, die sich direkt auf die gemessenen Größen und Distanzen bezieht. Wenn diese dargestellten Anforderungen erfüllt werden können, erscheint eine Kommerzialisierung grundsätzlich möglich.



# Literaturverzeichnis

- [Albrecht02a] B. Albrecht, *Hochpräzisions-Fluoreszenzmessungen mit Räumlich Modulierter Anregung*, Dissertation, Universität Heidelberg (2002).
- [Albrecht02b] B. Albrecht, A.V. Failla, A. Schweitzer & C. Cremer, *Spatially Modulated Illumination Microscopy allows Axial Distance Resolution in the Nanometer Range*, Appl. Opt. **41**(1) (2002).
- [Bailey93] B. Bailey, D.L. Farkas, D.L. Taylor & F. Lanni, *Enhancement of axial resolution in fluorescence microscopy by standing-wave excitation*, Nature **366**, 44-48 (1993).
- [Banin98] U. Banin, M. Bruchez, A.P. Alivisatos, T. Ha, S. Weiss & D.S. Chemla, *Size-dependent electronic level structure of InAs nanocrystal quantum dots: Test of multiband effective mass theory*, J. Chem. Phys. **109**(6), 2306-2309 (1998).
- [Bewersdorf98] J. Bewersdorf, R. Pick & S.W. Hell, *Multifocal multiphoton microscopy*, Opt. Lett. **23**, 655-657 (1998).
- [Bornfleth98] H. Bornfleth, K. Sätzler, R. Eils & C. Cremer, *High-precision distance measurements and volume-conserving segmentation of objects near and below the resolution limit in three-dimensional confocal fluorescence microscopy*, J. Microsc. **189**, 118-136 (1998).
- [Bradl94] J. Bradl, M. Hausmann, B. Schneider, B. Rincke & C. Cremer, *A versatile 2Pi-tilting device for fluorescence microscopes*, J. Microsc. **176**, 211-221 (1994).
- [Brakenhoff96] G.J. Brakenhoff, M. Müller & R.I. Ghauharali, *Analysis of efficiency of two-photon versus single-photon absorption for fluorescence generation in biological objects*, J. Microsc. **183**, 140-144 (1996).
- [Bruchez98] J.M. Bruchez, M. Moronne, P. Gin, S. Weiss & A.P. Alivisatos, *Semiconductor Nanocrystals as Fluorescent Biological Labels*, Science **281**, 2013-2016 (1998).
- [CCremer78] C. Cremer & T. Cremer, *Considerations on a laser-scanning-microscope with high resolution and depth of field*, Mikroskopie Acta **81**(1), 31-44 (1978).

- [TCremer00] T. Cremer, G. Kreth, H. Koester, R.H.A. Fink, R. Heintzmann, I. Solovei, D. Zink & C. Cremer, *Chromosome territories, interchromatin domain compartment and nuclear matrix: An integrated view of the functional nuclear architecture*, Crit. Rev. Euk. Gene Expr. **12**(2), 179-212 (2000).
- [TCremer01] T. Cremer & C. Cremer, *Chromosome territories and the functional nuclear architecture*, Nature Reviews **2**, 292-301 (2001).
- [Denk95] W. Denk, D.W. Piston & W.W. Webb, *Two-Photon Molecular Excitation in Laser-Scanning Microscopy*, In: Handbook of Biological Confocal Microscopy, Editor: J.B. Pawley, Plenum Press, New York, London, 445-458 (1995).
- [Edelmann99] P. Edelmann, *Confocal Spectral Precision Distance Microscopy for the investigation of the functional 3D structure of the human genome*, Dissertation, Universität Heidelberg (1999).
- [Edelmann00] P. Edelmann & C. Cremer, *Improvement of confocal Spectral Precision Distance Microscopy (SPDM)*, In: Optical Diagnostics of Living Cells III, Proc. SPIE **3921**, 313-320 (2000).
- [Esa00] A.Esa, P. Edelmann, G. Kreth, L. Trakhtenbrot, N. Amariglio, G. Rechavi, M. Hausmann & C. Cremer, *Three-dimensional spectral precision distance microscopy of chromatin nanostructures after triple-colour DNA labelling: a study of the BCR region on chromosome 22 and the Philadelphia chromosome*, J. Microsc. **199**, 96-105 (2000).
- [Failla02a] A.V. Failla, A. Cavallo, C. Cremer, *Subwavelength size determination using SMI virtual microscopy*, Appl. Opt. **41**(31), 6651-6659 (2002).
- [Failla02b] A.V. Failla, B. Albrecht, U. Spoeri, A. Kroll, C. Cremer, *Nanosizing of fluorescent objects by spatially modulated illumination microscopy*, Appl. Opt. **41**(34), 7275-7283 (2002).
- [Frohn01] J.T. Frohn, H.F. Knapp & A. Stemmer, *Three-dimensional resolution enhancement in fluorescence microscopy by harmonic excitation*, Opt. Lett. **26**(11), 828-830 (2002).
- [Glindemann03] A. Glindemann, *Das Very Large Telescope Interferometer*, SuW **3/2003**, 24-32 (2003).
- [GM31] M. Goeppert-Mayer, *Über Elementarakte mit zwei Quantensprüngen*, Ann. Phys. (Paris) **9**, 273-294 (1931).
- [Greiner91] W. Greiner, *Lehrbuch der Theoretischen Physik Band 3: Klassische Elektrodynamik*, Verlag Harri Deutsch, Frankfurt am Main, Thun, 5. Auflage (1991).

- 
- [Gu95] M. Gu & J.R. Sheppard, *Comparison of three-dimensional imaging properties between two-photon and single-photon fluorescence microscopy*, J. Microsc. **177**, 128-137 (1995).
- [Gu00] M. Gu, *Advanced Optical Imaging Theory*, Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York (2000).
- [H1] H1-Collaboration, *The H1 Detector at HERA*, Internal Report **DESY H1-96-01** (1996).
- [Haken90] H. Haken & H.C. Wolf, *Atom und Quantenphysik*, Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York (1990).
- [Hecht99] E. Hecht, *Optik*, R. Oldenbourg Verlag, München, Wien, 2. Auflage (1999).
- [Heintzmann98] R. Heintzmann & C. Cremer, *Laterally Modulated Excitation Microscopy: Improvement of resolution by using a diffraction grating*, Proc. SPIE **3568**, 185-196 (1998).
- [Heintzmann99] R. Heintzmann, *Resolution Enhancement of Biological Light Microscopic Data*, Dissertation, Universität Heidelberg (1999).
- [Hell94a] S.W. Hell, S. Lindek, C. Cremer & E.H.K. Stelzer, *Measurements of 4pi-confocal point spread function proves 75 nm axial resolution*, Appl. Phys. Lett. **64**(11), 1335-1337 (1994).
- [Hell94b] S.W. Hell J. Wichmann, *Breaking the diffraction resolution limit by stimulated emission: stimulated-emission-depletion fluorescence microscopy*, Opt. Lett. **19**, 780-782 (1994).
- [Jäckle99] P. Jäckle, *Temperaturstabilisierte Objekthalterung und chromatisches Korrekturlement zur Optimierung eines Zwei-Laser-Wellenfeld Mikroskops*, Diplomarbeit, Universität Heidelberg (1999).
- [Jähne97] B. Jähne, *Digitale Bildverarbeitung*, Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York (1997).
- [Kirsten97] I. Kirsten, *Untersuchungen zur axialen Auflösungsverbesserung am Heidelberger Wellenfeldmikroskop*, Diplomarbeit, Universität Heidelberg (1997).
- [Klar00] T.A. Klar, S. Jakobs, M. Dyba, A. Egnér & S.W. Hell, *Fluorescence microscopy with diffraction resolution barrier broken by stimulated emission*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA **97**, 8206-8210 (2000).
- [Kostatinides94] K. Kostatinides & J. Rasure, *The Khoros Software Development Environment for Image and Signal Processing*, IEEE Trans. Image Proc. **3**(3), 1921-1927 (1994).

- [Kozubek02] M. Kozubek, M. Skalnikova, Pe. Matula, E. Bartova, J. Rauch, F. Neuhäus, H. Eipel, M. Hausmann, *Automated microaxial tomography of cell nuclei after specific labelling by fluorescence in situ hybridisation*, *Micron* **33**, 655-665 (2002).
- [Lakowicz92] J.R. Lakowicz, H. Szmaczinski & K. Nowaczyk, *Fluorescence lifetime imaging*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89**, 1271-1275 (1992).
- [Lamond98] A.I. Lamond & W.C. Earnshaw, *Structure and Function in the Nucleus*, *Science* **280**, 547-553 (1998).
- [Landau79] L.D. Landau & E.M. Lifschitz, *Lehrbuch der Theoretischen Physik, Band III: Quantenmechanik*, Akademie-Verlag, Berlin (1979).
- [Lanni86a] F. Lanni, *Standing-Wave Fluorescence Microscopy*, In: Applications of Fluorescence in the Biomedical Sciences, Editoren: D.L. Taylor, A.S. Waggoner, F. Lanni, R.F. Murphy R.R. Birge, A.R. Liss. Inc., New York, 505-521 (1986).
- [Lanni86b] F. Lanni, A.S. Waggoner & D.L. Taylor, *Standing-wave luminescence microscopy*, US-Patent No. 4 621 911 (1986).
- [Leica] Leica Microsystems GmbH: [www.confocal-microscopy.com](http://www.confocal-microscopy.com).
- [Lilley00] D.M.J. Lilley T.J. Wilson, *Fluorescence resonance energy transfer as a structural tool for nucleic acids*, *Cur. Opin. Chem. Biol.* **4**, 507-517 (2000).
- [Lindek95] S. Lindek, E.H.K. Stelzer & S.W. Hell, *Two New High-Resolution Confocal Fluorescence Microscopies (4Pi, Theta) with One- and Two-Photon Excitation*, In: Handbook of Biological Confocal Microscopy, Editor: J.B. Pawley, Plenum Press, New York, London, 417-430 (1995).
- [Marriott91] G. Marriott, R.M. Clegg, D.J. Arndt-Jovin & T.M. Jovin, *Time-resolved imaging microscopy. Phosphorescence and delayed fluorescence imaging*, *Biophys. J.* **60**, 1374-1387 (1991).
- [Melles99] Melles Griot Katalog, *Shear-Plate Collimation Testers*, 47.12 (1999).
- [MPIbpcNews02] MPIbpc News Jahrgang 8 (2002): Pressemeldung: *Von Mikroskopie zu Nanoskopie* **11/02** unter [www.mpibpc.gwdg.de](http://www.mpibpc.gwdg.de)
- [Rasure91] J. Rasure & C. Williams, *An Integrated Data Flow Visual Language and Software Development Environment*, *J. Vis. Lang. Comp.* **2**, 217-246 (1991).
- [Sandison95] D.R. Sandison, R.W. Williams, K.S. Wells, J. Strickler & W.W. Webb, *Quantitative Fluorescence Confocal Laser Scanning Microscopy (CLSM)*, In: Handbook of Biological Confocal Microscopy, Editor: J.B. Pawley, Plenum Press, New York, London, 39-53 (1995).



- 
- [Schmidt00] M. Schmidt, M. Nagorny & S.W. Hell, *Subresolution axial measurements in far-field fluorescence microscopy with precision of 1 nanometer*, Rev. Scient. Instr. **71**, 2742-2745 (2000).
- [Schneider99] B. Schneider, *Spatially Modulated Illumination Mikroskopy*, Dissertation, Universität Heidelberg (1999).
- [Schneider00] B. Schneider, B. Albrecht, P. Jaeckle, D. Neofotistos, S. Söding, T. Jäger & C. Cremer, *Nanocalisation measurements in spatially modulated illumination microscopy using two coherent illumination beams*, In: Optical Diagnostics of Living Cells III, Proc. SPIE **3921**, 321-330 (2000).
- [Schweitzer99] A. Schweitzer, *Entwicklung eines z-Vertex Triggers*, Diplomarbeit, Universität Heidelberg (1999).
- [Soeller96] C. Soeller & M.B. Cannell, *Construction of a two-photon microscope and optimisation of illumination pulse duration*, Eur. J. Physiol. **432**, 555-561 (1996).
- [Speicher96] M.R. Speicher, S. Gwyn Ballard & D.C. Ward, *Karyotyping human chromosomes by combinatorial multi-fluor FISH*, Nature Genetics **12**, 368-375 (1996).
- [Strong58] J. Strong, *Concepts of Classical Optics*, Verlag W.H. Freeman, San Francisco, CA (1958).
- [Unsöld97] A. Unsöld & B. Baschek, *Der neue Kosmos*, Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York (1997).
- [Upmann02] I. Upmann, *Aufbau und Anwendung mikroskopischer Systeme zur Messung an Einzelmolekülen*, Dissertation, Universität Heidelberg (2002).
- [VLTIWhitebook98] Whitebook of the European Southern Observatory, ESO Education & Public Relations Department, Karl-Schwarzschild-Straße 2, 85748 Garching (1998). Im Internet unter: [www.eso.org](http://www.eso.org)



# Danksagung

An dieser Stelle gilt mein Dank allen, die mich bei der Durchführung dieser Arbeit durch hilfreichen Rat oder aufmunternde Worte unterstützt haben:

- Herrn Prof. Dr. Dr. Christoph Cremer für seine stets vorbildliche Betreuung und die Möglichkeit diese Arbeit unter Vorgabe des interessanten Themas in der Arbeitsgruppe „Angewandte Optik und Informationsverarbeitung“ durchführen zu können.
- den anderen Mitgliedern der Arbeitsgruppe Dr. Jutta Finsterle, Dr. Gregor Kreth, Dr. Johann von Hase, Margund Bach, Heinz Eipel, Udo Spöri, Nick Kepper, Christian Wagner, Lars Hildenbrand, Florian Staier und Christoph Engelbrecht für die angenehme Arbeitsatmosphäre und die Gesprächsbereitschaft und Unterstützung bei allen Problemen und Fragen, die sich im Laufe dieser Arbeit ergeben haben.

Besonderer Dank gilt dabei:

- Dr. Gregor Kreth, Dr. Jutta Finsterle, Heinz Eipel und Udo Spöri für das Korrekturlesen dieser Arbeit und die damit verbundenen hilfreichen Tips und inspirierenden Diskussionen.
- Herrn Dr. Gregor Kreth für die Betreuung der Rechner und die Unterstützung bei computertechnischen Problemen.
- Frau Margund Bach für ihre Gesprächsbereitschaft und die Unterstützung bei allen organisatorischen Fragen.
- Herrn Heinz Eipel für zahlreiche, sehr inspirierende Diskussionen und seine Hilfestellungen bei der Durchführung der Experimente zur Zweiphotonen-Anregung.
- Herrn Lars Hildenbrand, der ebenfalls bei den Zweiphotonen-Experimenten mitgewirkt hat.
- Herrn Christian Wagner, der wesentlich an der Entwicklung neuer Kalibrationskurven für die Größenbestimmung mitgewirkt und Simulationen

des Modulationskontrasts in der Abhängigkeit von der Objektform durchgeführt hat. Insbesondere gilt Herrn Christian Wagner Dank dafür, die Abbildungen 4.12, 4.13 und 4.14 veröffentlichen zu dürfen. Darüberhinaus hat er mich bei der Realisierung des experimentellen Aufbaus tatkräftig unterstützt.

Danken möchte ich auch den ehemaligen Mitgliedern der Arbeitsgruppe

- Dr. Benno Albrecht, Dr. Bernhard Schneider, Dr. Peter Edelmann, Dr. Antonio Virgilio Failla, Dr. Antonio Cavallo, Thorsten Jäger und Alexander Kroll für ihre Mitarbeit am Projekt.
- Herrn Dr. Benno Albrecht für seine Gesprächsbereitschaft und Unterstützung bei allen Problemen, die sich im Laufe des Projektes ergaben. Seine Diskussions- und Hilfsbereitschaft haben mir sehr geholfen. Für das Korrekturlesen gebührt ihm ebenfalls mein Dank.
- Herrn Dr. Peter Edelmann für seine Erläuterungen und Hilfestellungen bei Messungen am konfokalen Laser-Scanning-Mikroskop und der Auswertung von Bilddaten mit KHOROS.
- Herrn Dr. Antonio Virgilio Failla für die Einweisung in die Computersimulationen der „virtuellen“ SMI-Mikroskopie.

Besonderer Dank gilt

- den Professoren Dr. Bille, Dr. Hübner und Dr. Appenzeller für die Anfertigung des Gutachtens und die Teilnahme an der Disputation
- Herrn Christian Müller für die tatkräftige Unterstützung bei Aufbau, Inbetriebnahme und Wartung des Ti-Saphir-Lasers.
- den Institutssekretärinnen für ihre Unterstützung bei administrativen Angelegenheiten.
- Herrn Lamade und seinen Mitarbeitern aus der feinmechanischen Werkstatt des Kirchhoff-Instituts für Physik für die Anfertigung und Modifikation einiger Bauteile für das SMI-Mikroskop und weitere kompetente Beratungen bei allen technischen Fragen.
- Frau Birgit Hatzfeld für Hilfestellungen bezüglich Rechtschreibung und Grammatik.
- Meinen Eltern für ihre moralische und finanzielle Unterstützung.

Diese Aufzählung erhebt keinen Anspruch auf Vollständigkeit, da noch zu viele Personen genannt werden müssten. Ich danke allen.