

# INAUGURAL - DISSERTATION

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

vorgelegt von  
Dipl.-Phys. Michael Hofmann  
aus Künzelsau

Tag der mündlichen Prüfung: 7.11.2007

# RESOLFT-Mikroskopie mit photoschaltbaren Proteinen

Gutachter: Prof. Dr. Stefan W. Hell  
Prof. Dr. Dr. Christoph Cremer

# Zusammenfassung

Die RESOLFT-Fluoreszenzmikroskopie wurde entwickelt um eine prinzipiell unbegrenzte Auflösung der Fernfeld-Fluoreszenzmikroskopie über die Beugungsgrenze hinaus zu ermöglichen. Bisher wurde die RESOLFT-Mikroskopie einzig über die stimulierte Emission (STED) realisiert, welche sehr hohe Lichtintensitäten benötigt, um die zur Auflösungserhöhung nötige Unterdrückung der Fluoreszenz zu erreichen. Photobleichen begrenzt die einsetzbaren Intensitäten und damit auch die erreichbare Auflösung. In der vorliegenden Arbeit wird die Unterdrückung unerwünschter Fluoreszenz über das reversible Photoschalten zwischen langlebigen Konformationszuständen erreicht, wodurch sehr viel niedrigere Intensitäten ( $\text{W}/\text{cm}^2$ ) als bei STED ( $\text{GW}/\text{cm}^2$ ) zum Einsatz kommen. Dies vermindert Photostress und erlaubt die Verwendung einer vergleichsweise einfachen technischen Apparatur. Durch den Einsatz photoschaltbarer Proteine wurde erstmals ein RESOLFT-Mikroskop mit endogen exprimierbaren Fluoreszenzmarkern realisiert. Es konnte eine Auflösung von 50-100 nm erreicht werden, die nur durch Aberrationen und durch photophysikalische Eigenschaften der schaltbaren Proteine beschränkt ist. Diese Limitationen sind jedoch nicht von prinzipieller Natur, sondern können gezielt überwunden werden. So wurde an rsFastLime, einer Variante des photoschaltbaren Proteins Dronpa, gezeigt, dass fluoreszierende Proteine durch gezielte Mutagenese im Hinblick auf ihren Einsatz in der RESOLFT-Mikroskopie verbessert werden können.

## Abstract

RESOLFT fluorescence microscopy was developed to extend the resolution of far-field microscopy beyond the diffraction limit. So far, the only way RESOLFT-microscopy has been realised is to use stimulated emission depletion (STED), which necessitates very high intensities of light to achieve the fluorescence depletion needed for resolution enhancement, making the attainable resolution mainly limited by photobleaching. In this thesis, the depletion of unwanted fluorescence is achieved by using a reversible photoswitch between persistent, conformational states, thereby allowing the use of much lower intensities ( $\text{W}/\text{cm}^2$ ) as compared to STED ( $\text{GW}/\text{cm}^2$ ). Photostress is reduced and the experimental setup is simplified. By using photoswitchable proteins it could be shown for the first time that endogenic expressible fluorescent markers are compatible with RESOLFT microscopy. A resolution of 50-100 nm was achieved, only limited by aberrations and the photophysical properties of the switchable proteins. These limitations are not of a fundamental nature but can be systematically overcome. By using rsFastLime, a mutant of the photoswitchable protein Dronpa, it was shown that a fluorescent protein can be optimized with regard to its use in RESOLFT microscopy by systematic mutagenesis.

## Abkürzungen

⊗	Faltung zweier Funktionen
3D	dreidimensional
4Pi	kohärente Verwendung von zwei gegenüberliegenden Linsen
AFM	<i>atomic force microscopy</i>
Akt	Aktivierung
Anr	Anregung
AOM	akustooptischer Modulator
APD	<i>avalanche photo diode</i>
asFP595	photoschaltbares Protein
BP	Bandpass
DC	Dichroit
Det	Detektion
Dronpa	photoschaltbares Protein
E2GFP	photoschaltbares Protein
eff	effektiv
Emi	Emission
FCS	<i>fluorescence correlations spectroscopy</i>
FWHM	<i>full width at half maximum</i>
GFP	<i>green fluorescent protein</i>
GSD	<i>ground state depletion</i>
KFP1	photoschaltbares Protein
LCU	<i>laser clean up</i>
LPC	<i>laser power controller</i>
MTF	Modulations-Transferfunktion, Betrag der Fouriertransformierten der PSF
NA	Numerische Apertur
PAA	Polyacrylamid
PH	<i>pinhole</i>
Pol	Polarisator
PSF	<i>point spread function</i> (Punktverteilungsfunktion, auch Punktbildfunktion)
PVA	Polyvinylalkohol
RESOLFT	<i>reversible saturable optical (fluorescence) transitions</i>
rsFastLime	photoschaltbares Protein
SMI	<i>spatially modulated illumination</i>
SNOM	<i>scanning near-field optical microscopy</i>
STED	<i>stimulated emission depletion</i>
STM	<i>scanning tunneling microscopy</i>
TEM	Transversale elektrische Mode (hier eines Lasers)
TTL	Transistor-Transistor-Logik
ÜS	Übersprechen
w.E.	willkürliche Einheiten

# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung und Motivation</b>	<b>1</b>
1.1	Historische Entwicklung der Mikroskopie in der Biologie . . . . .	1
1.2	Beugungsbegrenzte konfokale Mikroskopie . . . . .	4
1.2.1	Theorie der Bildgebung . . . . .	6
1.3	Überwindung der Beugungsgrenze in der Fernfeld-Mikroskopie . . . . .	6
1.3.1	RESOLFT-Konzept . . . . .	7
1.3.2	RESOLFT-Mikroskope . . . . .	10
<b>2</b>	<b>Das photoschaltbare Protein asFP595</b>	<b>12</b>
2.1	Spektroskopie . . . . .	13
2.1.1	Ausschalt-Effizienz und Wellenlänge . . . . .	13
2.1.2	Sättigungsintensitäten und abgeschätzte Auflösung . . . . .	14
2.1.3	Abtastzeit und -leistung bei der Bildaufnahme . . . . .	16
2.1.4	Photophysikalisches Modell der Schaltkinetik . . . . .	17
2.1.5	Photobleichen . . . . .	22
2.1.6	Relevanz der spektroskopischen Ergebnisse für die Bildaufnahme . . . . .	23
2.2	RESOLFT-Mikroskopie mit asFP595 . . . . .	23
2.2.1	Fokale Fluoreszenzverteilung unterhalb des Beugungslimits . . . . .	23
2.2.2	Fluoreszenz-Mikroskopie unterhalb der Beugungsgrenze . . . . .	26
2.2.3	Ergebnisse der RESOLFT-Mikroskopie mit asFP595 . . . . .	28
<b>3</b>	<b>Die photoschaltbaren Proteine Dronpa und rsFastLime</b>	<b>29</b>
3.1	Experimenteller Aufbau . . . . .	30
3.1.1	Optik . . . . .	30
3.1.2	Elektronik . . . . .	31
3.2	Dronpa . . . . .	31
3.3	rsFastLime . . . . .	36
3.4	Spektroskopie rsFastLime . . . . .	40
3.4.1	Fluoreszenzunterdrückung: Charakterisierung und Optimierung . . . . .	40
3.4.2	Photophysik von rsFastLime . . . . .	44
3.5	RESOLFT-Mikroskopie mit rsFastLime . . . . .	51
<b>4</b>	<b>Diskussion und Ausblick</b>	<b>60</b>
	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>64</b>

<b>A Anhang</b>	<b>71</b>
A.1 Theorie des Photoschaltens von asFP595 . . . . .	71
A.2 Messung der Leistung und daraus berechnete Intensität im Fokus . . . . .	74
A.3 Protokolle . . . . .	75
A.3.1 Pufferlösung PBS . . . . .	75
A.3.2 Rotationsbeschichtung . . . . .	75
A.3.3 Immobilisierung mit Glutaraldehyd . . . . .	76
A.3.4 Immobilisierung in Polyacrylamid . . . . .	76
<b>Danksagung</b>	<b>77</b>
<b>Publikationsliste</b>	<b>78</b>

# 1 Einleitung und Motivation

## 1.1 Historische Entwicklung der Mikroskopie in der Biologie

Das Zusammenspiel der unterschiedlichen naturwissenschaftlichen Disziplinen, der Physik, Biologie und Chemie führt häufig zu wesentlichen, neuen Erkenntnissen. Dies ist sehr schön an der Geschichte der Mikroskopie zu sehen. Das Mikroskop, ein Instrument basierend auf Erkenntnissen der Physik, und seine laufende Weiterentwicklung durch zahlreiche Forscher hat sehr oft zu radikal neuen Einsichten in der Biologie geführt. So wurde z.B. durch die wohl erste dokumentierte Verwendung eines zweilinsigen Lichtmikroskops zur Untersuchung biologischer Proben durch Robert Hooke 1664 der Begriff der „Zelle“ in die Biologie eingeführt. Er erkannte in seinem sehr einfachen Mikroskop, welches mit einer Öllampe beleuchtet wurde, durch Unterschiede im Brechungsindex und in der Reflektivität feine Strukturen, die durch den Aufbau des Pflanzengewebes aus einzelnen Zellen entstehen. Grafische Abbildungen dieser sowie zahlreicher weiterer Beobachtungen sind in seinem Werk „Mikrographia“ [1] enthalten.

Ein anderer Pionier in der wissenschaftlichen Betrachtung biologischer Objekte durch optische Geräte war Anthony van Leeuwenhoek (1632-1723), der es als erster verstand, die Kunst des Linsenschleifens so zu perfektionieren, dass sein Instrument, bestehend aus einer einzigen Linse, eine höhere Auflösung bot als die primitiven, mehrlinsigen Mikroskope jener Zeit. Seine 112 Veröffentlichungen in „The Philosophical Transactions of the Royal Society“ brachte die Mikrowelt das erste Mal in das Bewusstsein der wissenschaftlichen Gemeinschaft. 1677 beschrieb er Spermatozoen (Samenzellen) von Insekten und Menschen und widersprach der damals vorherrschenden Theorie von der Spontanzeugung der kleinsten Lebewesen. Er wies nach, dass sich Kornkäfer, Flöhe und Muscheln aus Eiern entwickeln und nicht, wie man damals glaubte, spontan aus Schmutz oder Sand entstehen würden. Er beschrieb weiter die Querstreifung der Muskulatur und das Netzwerk, das die Zellen des Herzmuskels bilden. 1683 entdeckte er Bakterien in seinem eigenen Zahnbelag und in dem von Kontrollpersonen. Außerdem beschrieb er drei Bakterienformen: Bazillen, Kokken und Spirillen. Er hütete die Kunst des Linsenherstellens jedoch als Geheimnis, so dass Bakterien erst wieder beobachtet werden konnten, als es im 19. Jahrhundert gelang, bessere mehrlinsige Mikroskope zu bauen. Dies als abschreckendes Beispiel vor Augen, wird diese Doktorschrift versuchen, sämtliche als wertvoll empfundenen Erkenntnisse meiner Arbeit sorgfältig zu dokumentieren.

Dass nicht nur die optomechanische Verbesserung der Lichtmikroskope eine wichtige Weiterentwicklung sein kann, sondern z.B. auch die Färbung des zu untersuchenden Ob-

jekts und die dadurch verbundene Kontrasterhöhung und/oder Selektivität bei der Betrachtung, lässt sich historisch zum Beispiel an der Entdeckung der Mastzellen durch Paul Ehrlich (1854 - 1915) darstellen. Ehrlich entdeckte unter dem Mikroskop im Protoplasma mancher Blutzellen eine Körnelung, die sich mit Hilfe basischer Farbstoffe darstellen ließ. Er dachte, dass es sich um einen Zustand guter Ernährung handeln müsse und nannte die Zellen „Mastzellen“. Auch andere Gruppen weißer Blutkörperchen wiesen verschiedenartige Granula auf: Ehrlich konnte sie unterscheiden, weil sich einige mit basischen und andere mit sauren Farbstoffen anfärben ließen. Seine Entdeckungen fasste er zusammen in der Publikation „Methodologische Beiträge zur Physiologie und Pathologie der Leukozyten“ [2]. 1908 wurde ihm zusammen mit Ilya Ilyich Mechnikov der Nobelpreis in Physiologie und Medizin „als Anerkennung ihrer Arbeiten über die Immunität“ verliehen. In dieser Arbeit werden anstelle „basischer Farbstoffe“ fluoreszierende Proteine zur Markierung der Proben verwendet.

Die Weiterentwicklung auf optisch-physikalischer Basis wurde erheblich durch die Arbeiten von Ernst Abbe (1840 - 1905) in enger Kooperation mit Carl Zeiss vorangetrieben. Die von Ernst Abbe entwickelte Theorie zur Bildentstehung im Mikroskop hat den Bau von Mikroskopen auf eine wissenschaftliche Grundlage gestellt. 1873 entdeckte Abbe eine fundamentale physikalische Grenze, die noch heute seinen Namen trägt. Bei der Abbildung punktförmiger Objekte durch eine Linse entsteht als Bild ein Lichtfleck, dessen Radius von der Wellenlänge des Lichts  $\lambda$  und dem Öffnungswinkel  $\alpha$  der Linse abhängt. Abbe schloss aus genaueren Betrachtungen dazu, dass Objekte, die sich in einem Abstand kleiner der halben Wellenlänge befinden, sich in einem Licht-Mikroskop nicht unterscheiden lassen [3]. Tatsächlich hängt eine genaue Angabe des kleinsten Abstand  $\Delta r$  von Objekten, die bei einer Abbildung noch getrennt voneinander wahrnehmbar sind, von mehreren Faktoren ab. Als ein einfaches Kriterium setzte sich jedoch der von Abbe hergeleitete Ausdruck durch:

$$\Delta r = \frac{\lambda}{2n \sin \alpha} \quad (1.1)$$

Der Parameter  $n$  ist der Brechungsindex der Probe, das Produkt  $n \sin \alpha$  wird als numerische Apertur ( $NA$ ) der Detektionsoptik bezeichnet. Die Verwendung einer niedrigen Wellenlänge und/oder Optiken mit einer hohen numerischen Apertur führt also zu einer hohen Auflösung. In der Lichtmikroskopie ist die Verwendung kleiner Wellenlängen und hoher numerischer Aperturen technisch eingeschränkt, da die kleinste verwendbare sichtbare Wellenlänge bei ca. 350 nm liegt und die höchste verfügbare numerische Apertur bestehender Optiken/Objektive bei ca. 1,5. Selbst unter den günstigsten Umständen liegt also die Auflösung in der Lichtmikroskopie im Bereich von etwa 150 nm.

Diese Auflösungsgrenze beschränkt den Einsatz der Lichtmikroskopie erheblich. So können beispielsweise Viren, einzelne Gene und eine Vielzahl an Zellorganellen in einem normalen Lichtmikroskop nicht aufgelöst werden. Um die Auflösung weiter zu verbessern wurden deshalb Mikroskope entwickelt, die nicht auf Licht basieren. Die Entwicklung der geometrischen Elektronenoptik [4, 5] und des Elektronenmikroskop [6] im Jahr 1932 führten durch die wesentlich kürzere Wellenlänge der Elektronen gegenüber sichtbarem Licht zu einer deutlichen Erhöhung der erreichbaren Auflösung. Moderne Elektronenmikroskope liefern Bilder mit einer Auflösung von bis zu 0,1 nm [7]. In den frühen Jahren war die Auf-



klärung der im Lichtmikroskop unsichtbaren Krankheitserreger (z.B. Viren) eine bedeutende Triebfeder für die Entwicklung des Elektronenmikroskops. Leider ist es jedoch nicht für die Untersuchung von lebenden Zellen geeignet, da der hochenergetische Elektronenstrahl dieser Mikroskope zerstörend auf biologisches Material einwirkt. Des Weiteren müssen die Proben fixiert, in Hartz eingebettet oder gefroren werden, sowie unter einem Hochvakuum aufgenommen werden, was eine komplexe Probenpräparation bedingt. Durch diese intensive Vorbehandlung der Proben können Artefakte in der Zellstruktur entstehen.

Während der letzten Jahrzehnte wurden weitere Mikroskopiearten entwickelt, die nicht der Begrenzung durch das Beugungslimit in der Fernfeld-Mikroskopie unterliegen. Dazu zählt das Rasterkraftmikroskop (englisch: Atomic Force Microscope, AFM [8]), das Rastertunnelmikroskop (englisch: Scanning Tunneling Microscope, STM [9]) sowie das optische Rasternahfeldmikroskop (englisch: Scanning Near-field Optical Microscope, SNOM [10, 11, 12]). Diese Mikroskopiearten besitzen eine Auflösung nahe oder auf der atomaren Skala. Da das STM jedoch als Signal den Tunnelstrom zwischen einer atomar feinen Spitze und der Probe benutzt, können nur stromleitende Materialien untersucht werden, was den Einsatz in der Biologie einschränkt. AFM und SNOM sind zwar in der Lage, feine Details biologischer Proben aufzulösen [13], es kann damit jedoch keine wirkliche dreidimensionale Bildgebung stattfinden, da alle diese Rastersondenmikroskope von Natur aus oberflächengebunden sind und dadurch auch nicht in das Innere einer Zelle sehen können.

Die Fernfeld-Mikroskopie blieb somit trotz der durch die Beugungsgrenze limitierten Auflösung die in der Biologie bei weitem am meisten verwendete Mikroskopievariante. Es wurden neue Methoden entwickelt, die einen höheren Kontrast der zu untersuchenden Probe ermöglichten, beispielsweise 1902 die Dunkelfeldmethode [14] oder 1934 der Phasenkontrast [15, 16]. Besonders aber die Anwendung von Fluoreszenzmarkern erlaubte durch ihre hohe Spezifität und hohen Kontrast die Aufnahme aussagekräftiger und eindeutiger Bilder bis hin zur Detektion einzelner Moleküle. Durch die Kopplung über Antikörper können zudem organische Farbstoffe spezifisch an bestimmte Proteine und somit auch an bestimmte Kompartimente in der Zelle gekoppelt werden. Hier besteht jedoch wiederum der Nachteil, dass die Zelle bei der Einschleusung des Farbstoffes in den meisten Fällen abstirbt. Durch Klonierung mit fluoreszierenden Proteinen können jedoch auch lebende Zellen proteinspezifisch markiert werden. Das Genom des fluoreszierenden Proteins wird hierbei an das Genom des zu markierenden Proteins angehängt, wodurch die Zelle nun dieses Tandemprotein herstellt. Das bei weitem am meisten benutzte fluoreszierende Protein ist hierbei das GFP (englisch: Green Fluorescent Protein [17]).

Eine aktuelle Methode zur dreidimensionalen Bildgebung von mit fluoreszierenden Proteinen gefärbten biologischen Proben wird im nächsten Kapitel beschrieben und ihre Limitation durch die Beugungsbegrenzung dargestellt. Danach wird das Prinzip der RESOLFT-Mikroskopie vorgestellt, das in dieser Arbeit angewandt wurde, um das Beugungslimit zu überwinden. Zum Schluss der Einleitung wird dann auf die Motivation eingegangen, die RESOLFT-Mikroskopie mit photoschaltbaren fluoreszierenden Proteinen wie asFP595 und rsFastLime zu verwirklichen.

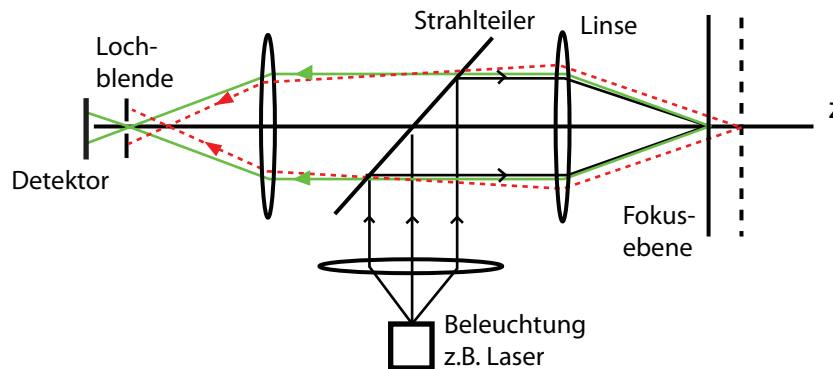


Abbildung 1.1: Prinzip eines konfokalen Mikroskop

## 1.2 Beugungsbegrenzte konfokale Mikroskopie

### Prinzip

Obwohl beugungsbegrenzt, fand vor allem die konfokale Mikroskopie [18] häufige Anwendung in der Biologie und ist auch das Instrument der Wahl für viele Fluoreszenz-Methoden, beispielsweise für die Fluoreszenz-Korrelations-Spektroskopie (englisch: Fluorescence Correlations Spectroscopy, FCS [19, 20]). Da das in dieser Arbeit entwickelte nicht beugungsbegrenzte RESOLFT-Mikroskop auf einem konfokalen Mikroskop aufbaut, soll letzteres hier näher erläutert werden.

Der wesentliche Vorteil der konfokalen Mikroskopie gegenüber der Weitfeldmikroskopie besteht in der Möglichkeit, optisch die Fokusebene von anderen Ebenen der Probe zu trennen. Dies geschieht durch den Einsatz einer Lochblende vor dem Detektor. Die konfokale Mikroskopie ermöglicht somit die 3D-Bildaufnahme von dicken lichtdurchlässigen Objekten mit einer Unterdrückung der größeren optischen Unschärfe von Ebenen außerhalb des Fokus gegenüber der Fokusebene [21]. Abbildung 1.1 zeigt dies schematisch an einem konfokalen Fluoreszenzmikroskop.

Die Anregung der Fluoreszenz in der Probe erfolgt durch Laserlicht, der Laser als Lichtquelle kann hierbei als punktförmig betrachtet werden. Die Linse zur Fokussierung auf die Probe ist in der Praxis ein Objektiv mit einer hohen numerischen Apertur  $NA$ , um einen möglichst kleinen, beugungsbegrenzten Fokus zu erhalten. Die Fluoreszenz der Probe, die durch das Laserlicht angeregt wird, wird auf eine Lochblende vor dem Detektor abgebildet. Je weiter der Entstehungspunkt der Fluoreszenz außerhalb des Fokus liegt, desto mehr wird die Intensität der Fluoreszenz aus diesem Punkt durch die Lochblende abgeschwächt. Zur 3D-Bildgebung kann nun die Probe in allen drei Raumrichtungen durch den Fokus geführt werden, das Signal des Detektors wird dabei für jeden gerasterten Bildpunkt gespeichert und kann auf einem Computer als Bild rekonstruiert werden.

## Auflösung

An Hand einer skalaren Wellentheorie des Lichts lässt sich die Intensitätsverteilung des Lichts im Fokus herleiten, die zusammen mit der Detektion letztendlich die Auflösung des konfokalen Mikroskops bestimmt [22]. Diese Intensitätsverteilung  $h_{\text{Anr}}(x, y, z)$  wird als Punktverteilungsfunktion bezeichnet (englisch: Point Spread Function, PSF). Im Teilchenbild des Lichts kann die PSF als Wahrscheinlichkeit dafür angesehen werden, dass ein beliebiges Photon des einfallenden Laserlichts zum Punkt mit den Koordinaten  $\vec{r} = (x, y, z)$  propagiert. Die laterale Ausdehnung der PSF wird oft als Airy-Scheibe bezeichnet, die durch die Lage der ersten Minima auf beiden Seiten des zentralen Hauptmaximums begrenzt ist. Der Durchmesser der Airy-Scheibe ist gegeben durch:

$$\Delta x, \Delta y = 1.22 \frac{\lambda}{NA} \quad (1.2)$$

Aus dem Radius der Airy-Scheibe ergibt sich das Auflösungskriterium nach Rayleigh:  $\Delta x, \Delta y = 0.61\lambda/NA$ .

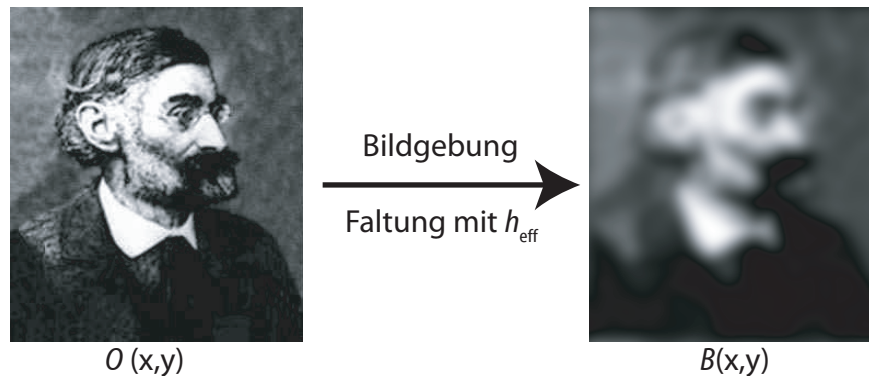
Die axiale Breite des Hauptmaximums der Verteilung  $h_{\text{Anr}}$  entlang der optischen Achse ist um ungefähr den Faktor 3 größer als in lateraler Richtung in der Fokusebene. Die Ausdehnung der PSF entlang der optischen Achse beträgt zwischen den ersten Minima neben dem Hauptmaximum

$$\Delta z = 4.00 \frac{n\lambda}{(NA)^2} \quad (1.3)$$

Besonders für die Auflösung in axialer Richtung ist es jedoch von Bedeutung, dass das detektierte Licht noch durch die Lochblende gefiltert wird. Betrachtet man die beiden Lichtwege der Anregung und der Detektion, so stellt man fest, dass sie im Prinzip bis auf die Richtung der Lichtausbreitung identisch sind. Da der Pfad der Photonen aber nicht von ihrer Richtung abhängt, kann für die Wahrscheinlichkeit der Detektion eines Fluoreszenzphotons, das an der Stelle mit der Raumkoordinate  $\vec{r}$  emittiert wird, eine Detektions-PSF  $h_{\text{Det}}(\vec{r})$  angegeben werden. Im theoretischen Fall einer absolut punktförmigen Lochblende und der gleichen Wellenlänge der Fluoreszenzphotonen wie des Laserlichts ist diese PSF bei genauem Sitz der Lochblende im Abbild des Fokus ungefähr identisch mit der oben bereits beschriebenen PSF ( $h_{\text{Det}} = h_{\text{Anr}}$ ). Das heißt, die effektive PSF  $h_{\text{eff}}$  lässt sich als Multiplikation der Wahrscheinlichkeitsverteilung für die Anregung  $h_{\text{Anr}}$  und die Detektion  $h_{\text{Det}}$  eines Fluoreszenzphotons darstellen:

$$h_{\text{eff}}(\vec{r}) = h_{\text{Anr}}(\vec{r})h_{\text{Det}}(\vec{r}) \cong h_{\text{Anr}}^2(\vec{r}) \quad (1.4)$$

In der oben erwähnten skalaren Wellentheorie zur Berechnung der Punktverteilungsfunktion kann die PSF mit Hilfe von Besselfunktionen berechnet werden [23]. In der Praxis wird der Hauptpeak der PSF oft durch eine Gaussfunktion approximiert. Deshalb wird oft, wie auch in dieser Arbeit, die so genannte Halbwertsbreite (englisch: Full-Width at Half Maximum, FWHM) zur Charakterisierung der PSF und somit der Auflösung benutzt.



**Abbildung 1.2:** Faltung des Bildes von Ernst Abbe mit einer PSF zur Darstellung des „Verschmierungseffekts“ bei der konfokalen Bildgebung.

Im besten Fall liegt die Auflösung heute üblicher konfokaler Fluoreszenzmikroskope bei ca. FWHM 180 nm in lateraler und 500-800 nm in axialer Richtung [24].

### 1.2.1 Theorie der Bildgebung

Das Abrastern der Probe, d.h. die Bildgebung in der konfokalen Mikroskopie, kann theoretisch durch eine Faltung der effektiven PSF  $h_{\text{eff}}$  mit dem Objekt  $O$ , beispielsweise der räumlichen Verteilung von Fluoreszenzmarker, beschrieben werden. Das Bild  $B$  ist dabei gegeben durch:

$$B = h_{\text{eff}} \otimes O \quad (1.5)$$

Diese Faltung bedeutet nichts anderes als eine „Verschmierung“ der Verteilung des Objekts durch die abbildende Optik, d.h. der effektiven PSF. In Abbildung 1.2 ist dieser Effekt schematisch dargestellt.

Das Bild  $B$  ist somit eine lineare Transformation der Objektverteilung  $O$ . Es kann jedoch zusätzlich durch Rauschen beeinträchtigt sein. So ist z.B das Schottrauschen  $S$  des Photodetektionsprozesses direkt korreliert mit der Signalstärke  $I$ , da die gemessene Anzahl der Photoelektronen einer Poissonstatistik mit dem Mittelwert  $I$  unterliegt:  $S \propto \sqrt{I}$ .

## 1.3 Überwindung der Beugungsgrenze in der Fernfeld-Mikroskopie

In den letzten Jahrzehnten sind mehrere Mikroskopiemethoden, beispielsweise die 4Pi Anordnung [25, 26] oder die strukturierte Beleuchtung (englisch: Spatially Modulated Illumination, SMI [27]), entwickelt worden und haben erhebliche Zugewinne an optischer Auflösung gerade entlang der optischen Achse erzielt und zu neuen Erkenntnissen in der Biologie geführt [28, 29]. Allerdings überwinden alle diese Methoden die Beugungsgrenze nicht wirk-

lich, sondern reizen ihre Möglichkeiten vollends aus [30]. Die wirkliche Überwindung wurde erst durch Ausnutzung der Farbstoffeigenschaften selbst, wie in dem RESOLFT-Konzept, realisiert.

### 1.3.1 RESOLFT-Konzept

Seit den Anfängen der Nichtlinearen Optik [31] wurde darüber spekuliert, dass ein nicht-linearer Zusammenhang zwischen der angewandten Intensität und dem gemessenen Signal prinzipiell die Auflösung eines fokussierenden optischen Systems steigern kann. Diese Vorstellungen blieben aber ungenau und ohne Konsequenzen, da ein konkretes physikalisches Konzept fehlte. Tatsächlich stellte sich der Multi-Photonen Prozess, der ursprünglich als eine Methode zur Auflösungssteigerung angesehen wurde, als dafür ungeeignet heraus, da der Auflösungsgewinn aufgrund der nichtlinearen Abhängigkeit des Fluoreszenzsignals von der Anregungsintensität durch das dazu benötigte, üblicherweise sehr langwellige Laserlicht kompensiert wird.

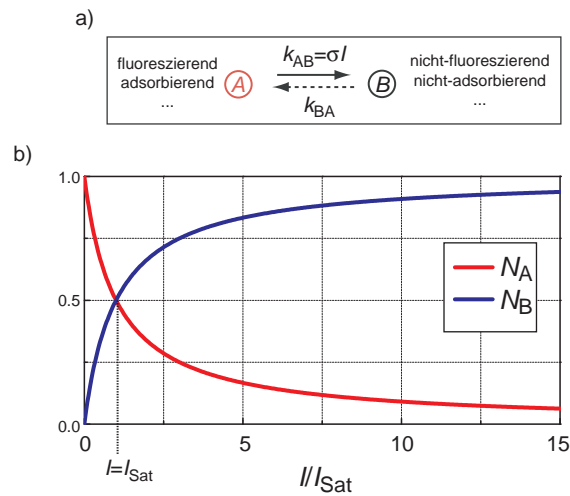
Erst in den frühen 1990er Jahren konnten konkrete Konzepte zur Überwindung des Beugungslimits mit fokussiertem Licht entwickelt werden [32, 33, 34]. In den Jahren nach 2000 wurde dann gezeigt, dass diese im RESOLFT-Konzept vereint und erweitert werden können [35, 36, 37]. Das RESOLFT-Konzept kann als eine Familie von Methoden verstanden werden, die reversible sättigbare optische (Fluoreszenz-) Übergänge benutzen (englisch: Reversible Saturable Optical (Fluorescence) Transitions), um eine Bildgebung oder eine Strukturherstellung unterhalb der Beugungsgrenze im Nanometerbereich mit fokussiertem sichtbarem Licht zu erreichen.

Das dazu verwendete Konzept wird in [30, 35, 36, 37, 38] beschrieben und soll hier nochmals kurz dargestellt werden.

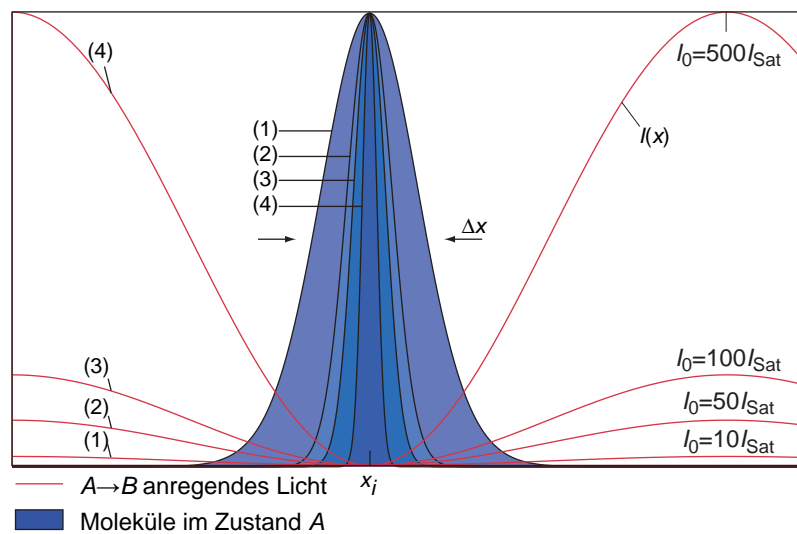
Ausgegangen wird von einem fluoreszenten Molekül mit zwei unterschiedlichen Zuständen  $A$  und  $B$ , wobei  $A$  und  $B$  sich in ihren Detektionseigenschaften unterscheiden müssen (beispielsweise absorbierend/nicht absorbierend oder fluoreszierend/nicht fluoreszierend). Der Übergang  $A \rightarrow B$  kann optisch mit einer Rate  $k_{AB} = \sigma I$  angeregt werden (Abbildung 1.3 a). Die Variablen  $\sigma$  und  $I$  stellen den Wirkungsquerschnitt des Übergangs beziehungsweise die Lichtintensität dar. Die Rate für den entgegengesetzten Übergang  $B \rightarrow A$  ist gekennzeichnet durch  $k_{BA}$ . Er kann auch durch Licht, oder durch eine chemische Reaktion, thermisch usw. angeregt werden aber auch spontan stattfinden. Die Kinetik der molekularen Zustände wird durch  $dN_A/dt = -dN_B/dt = k_{BA}N_B - k_{AB}N_A$  beschrieben, wobei  $N_{A,B}$  die normalisierte Besetzungswahrscheinlichkeit des jeweiligen Zustands darstellt. Nach einer Zeitspanne  $t \gg (k_{AB} + k_{BA})^{-1}$  hat die Besetzung der Zustände ein dynamisches Gleichgewicht mit  $N_A^\infty = k_{BA}/(k_{AB} + k_{BA})$  erreicht. Die Wahrscheinlichkeit für das Molekül, sich in  $A$  oder  $B$  zu befinden hängt grundsätzlich von  $k_{AB}$  und somit von  $I$  ab:

$$N_A^\infty = 1 - N_B^\infty = \frac{k_{BA}}{(k_{AB} + k_{BA})} = \frac{1}{1 + (\sigma/k_{AB})I} = \frac{1}{1 + I/I_{\text{Sat}}} \quad (1.6)$$

Bei der so genannten Sättigungsintensität  $I_{\text{Sat}} = k_{BA}/\sigma$  liegt eine Gleichverteilung der Besetzungswahrscheinlichkeiten mit  $N_A^\infty = N_B^\infty = 1/2$  vor. Für  $I \gg I_{\text{Sat}}$  gilt  $k_{AB} \gg k_{BA}$ ,



**Abbildung 1.3:** Einfaches Zwei-Zustands Modell mit einem fluoreszierenden ( $A$ ) und einem nicht fluoreszierenden Zustand ( $B$ ) (a). Der Übergang  $A \rightarrow B$  wird durch Licht angeregt. Zum Zeitpunkt  $t = 0$  befinden sich alle Moleküle im Zustand  $A$ . (b) zeigt die Verteilung der Zustände  $N_A^\infty$  und  $N_B^\infty$  nach dem Erreichen des dynamischen Gleichgewichts in Abhängigkeit der angewandten Intensität.



**Abbildung 1.4:** Räumliche Einschränkung der Moleküle im Zustand  $A$  durch Erhöhung der Intensität  $I_0$  einer stehenden Welle.

so dass das Molekül sich praktisch nur noch im Zustand  $B$  befindet:  $N_A^\infty \rightarrow 0$ . Die Abhängigkeit der Besetzungswahrscheinlichkeit der Zustände von der angewandten Lichtintensität  $I$  ist an Abbildung 1.3 b dargestellt. Sie ist hochgradig nichtlinear, wobei der Zustand  $A$  in einer gesättigten Weise entvölkert wird.

Abbildung 1.4 zeigt wie dieses Verhalten ausgenutzt werden kann, um beliebig schmale Regionen des Zustands  $A$  zu erzeugen. Das Schema in Abbildung 1.4 ist eindimensio-

nal, kann jedoch ohne weiteres auf drei Dimensionen erweitert werden. Die einzige allgemeine Voraussetzung ist, dass die Intensitätsverteilung  $I$  in einem Punkt ein Minimum mit  $I(x_i) = 0$  besitzt. In einer Dimension kann die Nullstelle am besten durch eine stehende Welle realisiert werden:  $I(x) = I_0 \cos^2(2\pi nx/\lambda)$ , mit dem Brechungsindex  $n$  und der Wellenlänge des Lichts  $\lambda$ . Wenn nun die Intensitätsverteilung  $I(x)$  auf eine räumliche Verteilung von Molekülen angewandt wird, die sich zunächst im Zustand  $A$  befinden, so werden für  $I_0 \gg I_{\text{Sat}}$  praktisch alle Moleküle in den Zustand  $B$  gepumpt, mit Ausnahme der Moleküle in einer sehr schmalen Region um  $x_i$ . Je größer nun das Verhältnis von  $I_0/I_{\text{Sat}} \gg 1$ , desto schmaler ist die Region, in der der Zustand  $A$  noch besetzt ist. Durch eine Taylorentwicklung der Intensitätsverteilung um den Punkt  $x_i$  kann nun gezeigt werden, dass die FWHM der resultierenden Verteilung der Moleküle im Zustand  $A$  bei Intensitäten  $I_0 \gg I_{\text{Sat}}$  gegeben ist durch

$$\Delta x \approx \frac{\lambda}{\pi n \sqrt{I_0/I_{\text{Sat}}}} \quad (1.7)$$

Der wichtige Zusammenhang  $\Delta x \approx (I_{\text{Sat}}/I_0)^{-\frac{1}{2}}$  gilt im allgemeinen für jede angenommene Intensitätsverteilung um eine Nullstelle bei  $x_i$ . Wenn die Nullstelle durch die Fokussierung mit einer Linse (Öffnungswinkel  $\alpha$ ) erreicht wird, und die Fluoreszenz durch die gleiche Linse erfasst wird, wie in dieser Arbeit, so kann die Auflösung durch folgende Gleichung gut angenähert werden [30]:

$$\Delta x \approx \frac{\lambda}{2n \sin \alpha \sqrt{1 + I_0/I_{\text{Sat}}}} \quad (1.8)$$

Diese Gleichung kann als eine Erweiterung des Kriteriums von Abbe (1.1) angesehen werden und geht für  $I_0 = 0$  in dieses über. Für  $I_0/I_{\text{Sat}} = 100$  liegt der Auflösungsge-  
winn gegenüber Abbe ungefähr bei einem Faktor 10. Trotz der Abhängigkeit von  $\Delta x$  von  $\lambda/(n \sin \alpha)$  erlaubt Gleichung 1.8 eine im Prinzip unbegrenzte örtliche Auflösung, die im wesentlichen nur durch den maximal erreichbaren Faktor  $I_0/I_{\text{Sat}} = \epsilon$  abhängig ist. Da  $\epsilon$  sozusagen die Intensität  $I_0$  in Einheiten der Sättigungsintensität  $I_{\text{Sat}}$  angibt, bezeichnet man  $\epsilon$  als Sättigungsfaktor. Für eine möglichst hohe Auflösung muss also ein möglichst hohes  $\epsilon$  erreicht werden. Dies kann durch Steigerung der maximalen Intensität  $I_0$  oder durch Verringerung der Sättigungsintensität  $I_{\text{Sat}}$  erreicht werden.  $I_{\text{Sat}} = k_{\text{BA}}/\sigma$  ist durch den molekularen Wirkungsquerschnitt  $\sigma$  des Übergangs  $A \rightarrow B$  und durch die Ratenkonstante  $k_{\text{BA}}$  des Übergangs  $B \rightarrow A$  bestimmt, die beide durch die Eigenschaften des verwendeten Moleküls bestimmt sind. Des weiteren kann  $I_{\text{Sat}}$  durch den Einfluß konkurrierender spontaner Übergänge zu dem durch Licht angeregten Übergang  $A \rightarrow B$  bestimmt sein. Falls diese spontanen Übergänge überwiegen, kann das hier dargestellte RESOLFT-Konzept nicht mehr angewendet werden.

### 1.3.2 RESOLFT-Mikroskope

Als wohl erste Verwirklichung des RESOLFT-Prinzip kann die STED-Mikroskopie (englisch: STImulated Emission Depletion) mit Unterdrückung der Fluoreszenz durch stimulierte Emission angesehen werden [32, 34]. Es wurden bereits effektive PSFs mit einer Halbwertsbreite von kleiner 20 nm erreicht [39, 40]. Durch die STED-Mikroskopie konnten Strukturen in Zellen gezeigt werden, die vorher unzugänglich erschienen [39, 41, 42]. In der STED-Mikroskopie kann nach dem im vorigen Abschnitt dargestellten RESOLFT-Formalismus der angeregte Singulett Zustand  $S_1$  eines fluoreszierenden Moleküls als Zustand  $A$  des RESOLFT-Konzepts angesehen werden, der durch stimulierte Emission in den Grundzustand  $S_0$  (RESOLFT-Konzept: Zustand  $B$ ) übergeführt wird, so dass die Fluoreszenz Emission effektiv unterdrückt wird. Der Wirkungsquerschnitt  $\sigma$  der stimulierten Emission liegt gewöhnlich in der Größenordnung des Wirkungsquerschnitts der Absorption eines Photons durch den Übergang von  $S_0$  nach  $S_1$  ( $\sigma = 10^{-16} - 10^{-18} \text{ cm}^2$ ). Da die stimulierte Emission mit der spontanen Fluoreszenz-Emission  $k_F \approx (1 \text{ ns})^{-1}$  des Übergangs  $S_1 \rightarrow S_0$  konkurriert, kann die Sättigungsintensität  $I_{\text{Sat}}$  durch  $k_F/\sigma$  angenähert werden. Dies führt zu Sättigungsintensitäten von einigen 10-100 MW/cm<sup>2</sup> [39] und damit zu der Verwendung von Spitzenintensitäten im GW/cm<sup>2</sup> Bereich zum Erreichen einer hohen Auflösung. Diese Bedingung wird am besten durch die Verwendung von Pulsen mit einer Dauer unterhalb einer Nanosekunde verwirklicht. Da diese Intensitäten zu Photostress in der Probe, vor allem aber zur Zerstörung der Fluoreszenz durch Photobleichen führen können [43], ist eine STED-Alternative mit einer niedrigeren Sättigungsintensität wünschenswert.

Eine solche Alternative besteht in der Möglichkeit, den Grundzustand eines Moleküls durch Pumpen in seinen Triplet-Zustand zu entleeren [33]. Im RESOLFT-Konzept entspricht der Grundzustand dem zur Fluoreszenz anregbarem Zustand  $A$  (Abbildung 1.3), der Tripletzustand dem Dunkelzustand  $B$ . Wegen der 1000fach höheren Lebenszeit des Triplet-Zustands (im Vergleich zu der Lebenszeit des  $S_1$  Zustandes), kann das Fluoreszenzsignal durch Intensitäten unterdrückt werden, die im Vergleich zu STED um den gleichen Faktor geringer sind. Die Realisierung dieses Konzepts wurde als GSD-Mikroskopie bezeichnet (englisch: Ground State Depletion) und konnte mit einer erzielten Auflösung von 50 nm realisiert werden [44]. Der Nachteil der GSD-Mikroskopie liegt jedoch in der hohen Bleichrate aus dem langlebigen, photoinstabilen Triplet-Zustand.

Im Gegensatz zu STED, dass auf der gesättigten Entleerung des  $S_1$  beruht, wird bei SPEM (englisch: Saturated Patterned Excitation Microscopy [45]), auch als SSIM (englisch: Saturated Structured Illumination Microscopy) bekannt, der  $S_0$  Zustand in einer gesättigten Weise entvölkert, wobei dies im Gegensatz zu GSD durch Sättigung des Übergangs  $S_0 \rightarrow S_1$  geschieht. Man erhält somit schmale Regionen im nichtfluoreszierenden Zustand  $S_0$  (RESOLFT-Konzept: Zustand  $B$ ) umgeben von steil ansteigenden Regionen, in denen der Fluoreszenzmarker im fluoreszierenden Zustand  $S_1$  (RESOLFT-Konzept: Zustand  $A$ ) vorliegt. Da die gleichen Zustände und somit die gleichen spontanen Übergangsraten wie in STED beteiligt sind, liegen auch die Sättigungsintensitäten im gleichen Größenbereich. Wegen der „invertierten“ Aufnahme von schmalen, dunklen Regionen neben hellen, breiten Regionen bedarf es einer rechnergestützten Nachbearbeitung der Daten, und somit muss ein



exzellentes Signal-zu-Rausch Verhältnis vorliegen, um Artefakte durch die Nachbearbeitung zu vermeiden. Die Datenaufnahme erfolgt durch Rotation und Translation linienförmiger Nullstellen mit einem Abstand von  $\lambda/2n$  und einer Kamera. Hiermit konnte eine laterale Auflösung von 50 nm an fluoreszierenden Kügelchen (englisch: beads) gezeigt werden [46]. Dies demonstriert das Potential eines linienbasierten, parallelisierten Weitfeld-Ansatzes auch für andere Zustands-Paare  $A - B$  des RESOLFT-Konzepts.

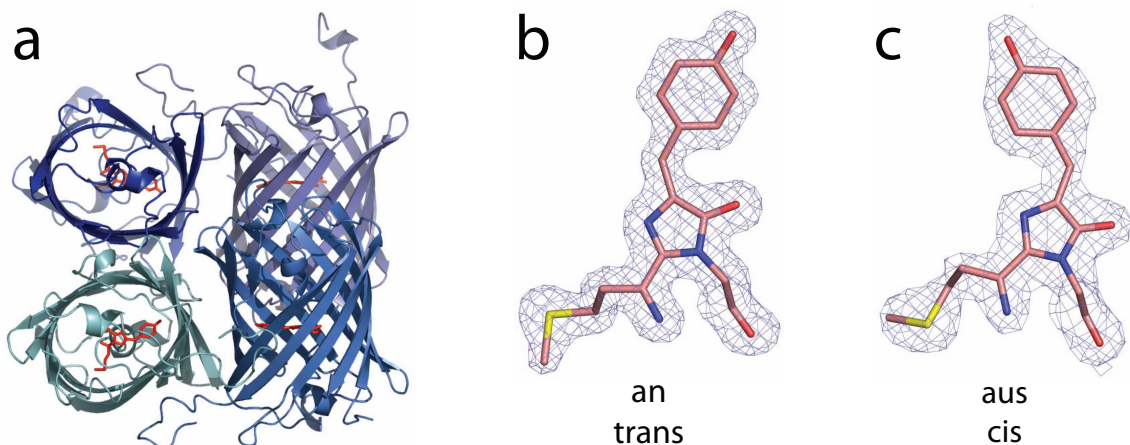
Der vielversprechendste Ansatz zur Realisierung des RESOLFT-Konzepts besteht in seinem Grundprinzip, Fluorophore reversibel mit Licht zwischen einem fluoreszierendem Zustand und einem Dunkelzustand hin- und herzuschalten. Solch ein Photoschalten kann durch eine Konformationsänderung des Moleküls zu Stande kommen. In den letzten Jahren wurde eine wachsende Zahl von reversibel photoschaltbaren organischen Molekülen [47, 48, 49, 50] und von photoschaltbaren fluoreszierenden Proteinen entdeckt, zum Beispiel asFP595 [51], E2GFP [52] und Dronpa [53]. Da die Konformationszustände dieser Photomarker üblicherweise von Sekunden bis Stunden stabil sind, sind die zur Sättigung der Übergänge zu erwartenden Intensitäten und somit der Photostress auf die Probe marginal verglichen zu STED oder sogar GSD. Die Verwendung von fluoreszierenden Proteinen in der Bildgebung von lebenden Zellen sowie die zu erwartende niedrige Sättigungsintensität macht die RESOLFT-Mikroskopie mit photoschaltbaren Proteinen außerordentlich interessant.

Auf Grund all der in diesem Abschnitt genannten möglichen Vorteile einer RESOLFT-Mikroskopie mit photoschaltbaren Proteine soll im weiteren Verlauf eine detaillierte Untersuchung der Realisierungsmöglichkeiten, der Limitierungen und der weiterführenden Möglichkeiten eines solchen Ansatzes am Beispiel der photoschaltbaren fluoreszierenden Proteine asFP595 (Kapitel 2), Dronpa und einer für die RESOLFT-Mikroskopie verbesserten Mutante von Dronpa (Kapitel 3) erfolgen. Es wird jeweils die Kinetik der beteiligten Zustände und somit das Sättigungsverhalten in Experiment und Theorie dargelegt und im Hinblick auf die Anwendung in der RESOLFT-Mikroskopie optimiert. An Teststrukturen kann jeweils die Überwindung des Beugungslimits bei sehr niedrigen Sättigungsintensitäten mit der RESOLFT-Mikroskopie an photoschaltbaren Proteinen gezeigt werden. Eine molekulare Auflösung bei sehr niedrigen Intensitäten und mit Fluoreszenzmarkern, die zur Markierung von Proteinen in lebenden Zellen benutzt werden können, ist somit prinzipiell realisierbar. Die RESOLFT-Mikroskopie mit photoschaltbaren Proteinen bietet somit ein großes Potential zur Beantwortung zahlreicher, insbesondere biologischer, Fragestellungen.

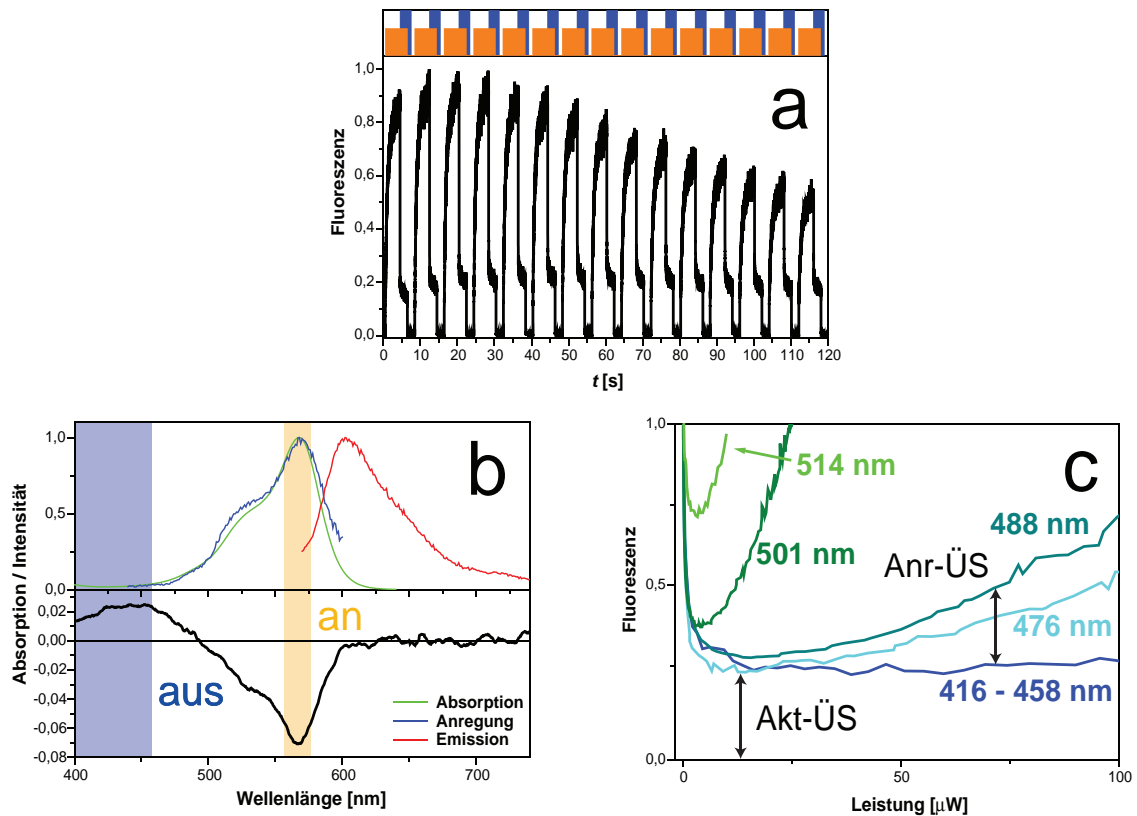
## 2 Das photoschaltbare Protein asFP595

Das Protein asFP595 [51] kommt in der Seeanemone *anemonia sulcata* vor. Zur Erläuterung der Nomenklatur: „as“ steht für *anemonia sulcata*, „FP“ steht für Fluoreszierendes Protein (oder Fluorescent Protein im Englischen), „595“ bezieht sich auf das Maximum des Emissionsspektrums in nm. Die Sekundärstruktur ist ähnlich zu der des GFP (englisch: Green Fluorescent Protein), das Chromophor ist eingebettet in die so genannte „beta-can“ (Abbildung 2.1), d.h. das Chromophor wird durch eine Art „Tonne“ aus beta-Faltblättern umschlossen. Insgesamt sind 20% der DNA-Sequenz identisch mit der des GFP [51]. Das Chromophor wird durch Autokatalyse [54] gebildet, ähnlich wie bei GFP.

Die Fluoreszenz von asFP595 lässt sich durch Licht ein- und ausschalten. Licht im grün-gelben Spektrum (ca. 530-580 nm) führt zu einer Erhöhung, blaues Licht (ca. 400-500 nm) zu einer Erniedrigung der Fluoreszenz-Emission. Als zu Grunde liegende Zustandsänderung konnte eine Konformationsänderung, in diesem Fall eine cis-trans Isomerie nachgewiesen werden [55].



**Abbildung 2.1:** Struktur von asFP595. a: Die Gesamtstruktur in einer schematischen Band-Darstellung der quaternären Tetramerstruktur zeigt die vier Moleküle in unterschiedlichen Farben und die Chromophore in Rot. b und c: Trans und cis Konformation des Chromophors im An- und Auszustand. Dargestellt ist die Mutante asFP595-A143S, deren Struktur im Auszustand zum Wildtyp sehr ähnlich ist. Die Atome sind farblich kodiert: C lachsfarben, O rot, N blau. Die Gitterstruktur repräsentiert die Elektronendichte. Übernommen von [55].



**Abbildung 2.2:** Kontrollierte Unterdrückung der Fluoreszenz von asFP595. (a) Kontrolle der Fluoreszenz von asFP595 durch eine periodische Abfolge von gelbem (568 nm, Intensität  $I_g = 80 \text{ W/cm}^2$ ) Aktivierungs- und blauem (458 nm, Intensität  $I_b = 60 \text{ W/cm}^2$ ) Deaktivierungslicht. (b) Absorptionsspektrum von deaktiviertem asFP595 (grün), Fluoreszenz-Emissionsspektrum von aktiviertem asFP595 (rot, Anregung bei 550 nm), Fluoreszenz-Anregungsspektrum von asFP595 (blau, Detektion bei 610 nm) und differentielles Absorptionsspektrum des Aus- zum Anzustands. Die blau (aus) und gelb (an) schattierten Flächen zeigen den optimalen Wellenlängenbereich zur Deaktivierung beziehungsweise Aktivierung. (c) Relative maximale Fluoreszenz-Unterdrückung im ersten Ausschaltvorgang bei verschiedenen Wellenlängen des blauen Deaktivierungslichts und mit zunehmender Leistung des blauen Deaktivierungslichts. Der Übersprechen der Aktivierung (Akt-ÜS) und der Fluoreszenzanregung (Anr-ÜS) resultieren in einer unvollständigen Unterdrückung der Fluoreszenz beziehungsweise in einem Ansteigen der Fluoreszenz bei hohen Leistungen des blauen Lichts.

## 2.1 Spektroskopie

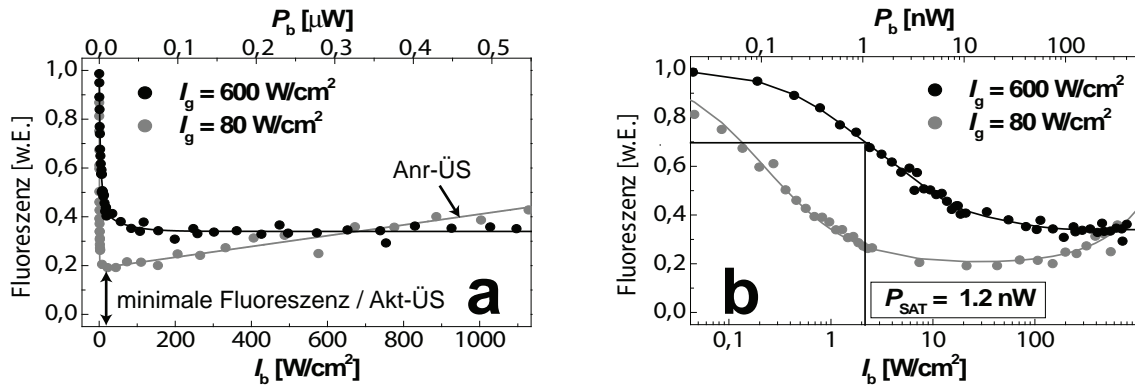
### 2.1.1 Ausschalt-Effizienz und Wellenlänge

Die durch gelbes Licht einschaltbare Fluoreszenz von asFP595 kann durch gleichzeitige Bestrahlung mit blauem Licht unterdrückt werden (Abbildung 2.2 a). Das gelbe Licht dient hier neben der Überführung von asFP595 in den zur Fluoreszenz anregbaren trans-Zustand auch zum Anregen eben dieser Fluoreszenz. Das blaue Licht führt den trans-Zustand in den cis-Zustand über, dessen Fluoreszenz-Emission wesentlich geringer ist. Dieser Vorgang ist nahezu reversibel und kann mehrmals bei einer geringen Abnahme der maximalen Fluoreszenz wiederholt werden.

reszenz wiederholt werden. Abbildung 2.2 b zeigt das Aktivierungs- und Emissionsspektrum der Fluoreszenz von asFP595 mit einem Maximum bei 572 nm beziehungsweise 605 nm. Das Fluoreszenz-Aktivierungsspektrum ist fast identisch zum Absorptionsspektrum des Aus-Zustands (Grundzustand). Es ist daher von Vorteil, Licht mit einer Wellenlänge um 570 nm für die Fluoreszenzaktivierung und -anregung zu verwenden (orange gefärbte Fläche, „an“). Andererseits zeigt das differentielle Absorptionsspektrum des An- und Auszustands (Abbildung 2.2 b unten), dass die Absorption beim Übergang in den Anzustand zwischen 400 und 480 nm zunimmt und bei 570 nm abnimmt. Auf Grund dessen wurden verschiedene Wellenlängen zwischen 400 und 480 nm auf ihre Deaktivierungs-Effizienz der Fluoreszenz von asFP595 untersucht. Abbildung 2.2 c zeigt die Fluoreszenz von asFP595 bei gleichzeitiger Bestrahlung mit gelbem (568 nm) Aktivierungs- und blauem Deaktivierungslicht bei verschiedenen Leistungen und Wellenlängen (416 bis 514 nm), wodurch die erreichbare Fluoreszenzunterdrückung dargestellt werden kann. Die Fluoreszenzunterdrückung steigt mit der Leistung des blauen Lichts, nimmt jedoch zu höheren Leistungen wieder ab. Beides, die maximal erreichbare Unterdrückung und der Rückgang der Unterdrückung bei hohen Leistungen unterscheiden sich bei den unterschiedlichen Wellenlängen. Bei den verwendeten blauen Wellenlängen zeigt das Aktivierungsspektrum der Fluoreszenz in Abbildung 2.2 b eine kleine Aktivierungs- und Anregungswahrscheinlichkeit (<5%). Solch eine nicht zu vernachlässigende Aktivierungswahrscheinlichkeit führt zu einem Übersprechen des blauen Lichts bei der Fluoreszenzaktivierung (Akt-ÜS) und -anregung (Anr-ÜS), was jeweils zu der beobachteten unvollständigen Unterdrückung beziehungsweise dem Rückgang der Unterdrückung bei hohen Leistungen führt. Wie vom Verlauf des Aktivierungsspektrum her erwartet werden kann, werden diese Übersprecheffekte dominanter für die größeren Wellenlängen, was zeigt, dass die blauen Wellenlängen kleiner 460 nm am besten für die RESOLFT-Mikroskopie geeignet sind (blau gefärbte Fläche, „aus“ in Abbildung 2.2 b). Da sich keine messbaren Unterschiede bei Wellenlängen von 416 bis 458 nm zeigten, wurde blaues Licht bei 458 nm verwendet, um die Deaktivierung von asFP595 zu kontrollieren. Diese Wellenlänge hat gegenüber den noch niedrigeren Wellenlängen mehrere Vorteile. Erstens mussten für die Wellenlängen bei 440 nm und 416 nm Halbleiterlaser (DL100, Toptica Photonics AG, Graefelfing) verwendet werden, dessen elliptisches Strahlprofil gegenüber der nahezu perfektem TEM-00 Mode des Argon-Ionen-Lasers bei 458 nm zu hohen Leistungsverlusten bei der Strahlreinigung (Teleskop mit Pinhole) führten. Weiterhin werden die Abbildungseigenschaften von handelsüblichen Mikroskop-Objektiven für Wellenlängen <450 nm üblicherweise erheblich schlechter, d.h. Aberrationen nehmen zu, wodurch die Intensitätsverteilung zum Ausschalten des fluoreszierenden Zustandes verzerrt wird, und insbesondere die für die RESOLFT-Mikroskopie erforderliche Nullstelle (Kapitel 1.3.1) aufgefüllt werden kann.

## 2.1.2 Sättigungsintensitäten und abgeschätzte Auflösung

Abbildung 2.3 zeigt die Fluoreszenz in Abhängigkeit der Leistung des blauen Ausschaltlichts von 458 nm bei zwei verschiedenen Leistungen des gelben Einschaltlichts. Die Sättigungsleistung  $P_{\text{Sat}}$  ist definiert als die Leistung, bei der die Fluoreszenz auf 50% abgefallen ist, wobei hier als Nulllinie die minimale Fluoreszenz definiert wird. Für  $I_g = 600 \text{ W/cm}^2$  ergibt

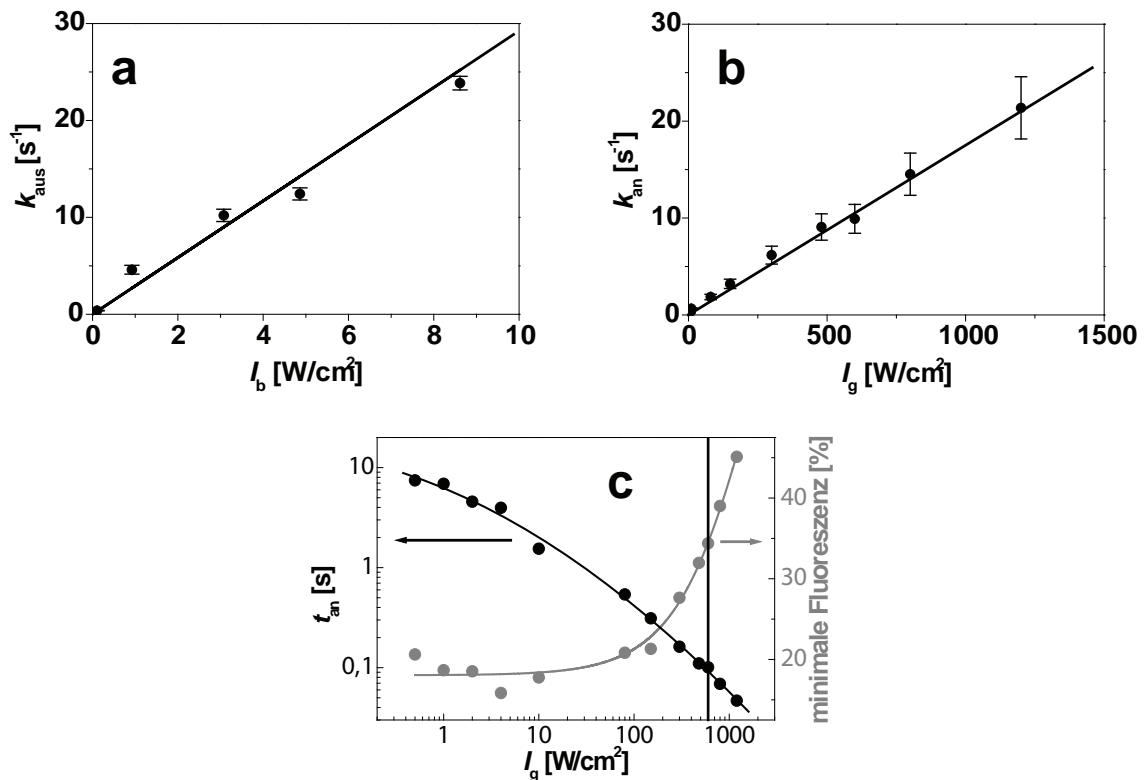


**Abbildung 2.3:** Unterdrückung der Fluoreszenz als Funktion der blauen Intensität  $I_b$  ( $\lambda = 458$  nm) für eine gelbe Intensität von  $I_g = 600$  W/cm<sup>2</sup> und  $I_g = 80$  W/cm<sup>2</sup> in linearer Darstellung (a) und in logarithmischer Darstellung (b) zur Hervorhebung der Sättigungsintensität. In (a) ist die minimale Fluoreszenz hervorgehoben, die durch das Aktivierung-Übersprechen (Akt-ÜS) des blauen Lichts ungleich Null ist. Das Anregungs-Übersprechen (Anr-ÜS) bedingt den Anstieg der Fluoreszenz bei hohen Leistungen  $I_b$ . Die Daten können sehr gut durch Gleichung 2.2 angepasst werden (graue und schwarze Linie, vergleiche Kapitel 2.1.4).

dies eine Sättigungsintensität von  $I_{\text{Sat}} = 2$  W/cm<sup>2</sup>, was durch eine Dauerstrichleistung von nur  $P_b = 1,2$  nW erreicht wird. Typische Sättigungsintensitäten in der STED-Mikroskopie sind demgegenüber um mehrere Größenordnungen größer und liegen im Bereich von einigen 10-100 MW/cm<sup>2</sup> [39]. Da das blaue Ausschaltlicht gleichzeitig mit dem gelben Einschaltlicht eingestrahlt wird, hängt die Fluoreszenzunterdrückung nicht nur von der Leistung des blauen Lichts, sondern auch von der Leistung des gelben Lichts ab. Dadurch skaliert die Sättigungsintensität mit der gelben Leistung  $I_g$  wie folgt:  $I_{\text{Sat}} = I_g/300$  (bei  $I_g = 80$  W/cm<sup>2</sup> ist  $I_{\text{Sat}} = 0,27$  W/cm<sup>2</sup>). Die erreichbare Auflösungserhöhung in der Bildgebung hängt nun vom Sättigungsfaktor  $\epsilon = I_b/I_{\text{Sat}}$  ab, da die Auflösung  $\Delta x$  durch die modifizierte Abbe-Gleichung gegeben ist (Kapitel 1.3.1):

$$\delta x \cong \frac{\lambda}{2n \sin \alpha \sqrt{1 + \epsilon}} \quad (2.1)$$

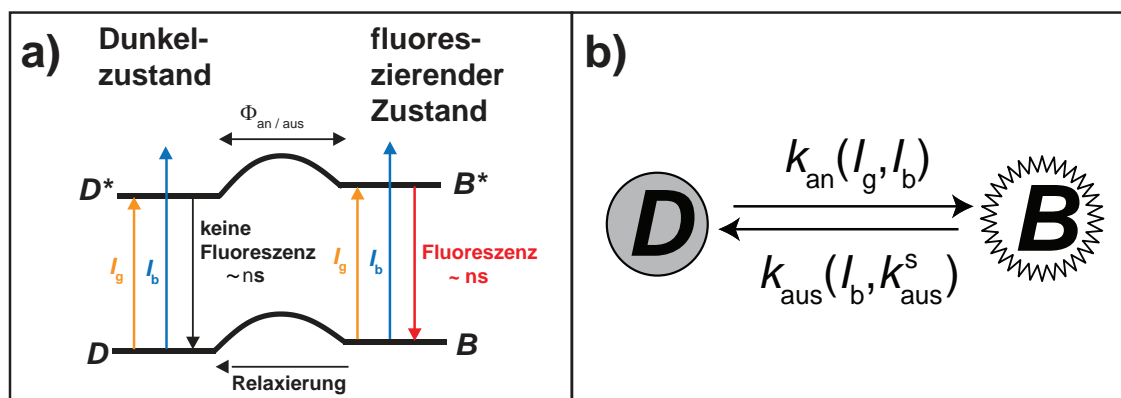
Nun ist der erreichbare Sättigungsfaktor jedoch durch den Wiederanstieg der Fluoreszenz, hervorgerufen durch das Anregungsübersprechen des blauen Lichts, begrenzt, was insbesondere in Abbildung 2.3 b deutlich zu sehen ist. Da die blaue Intensität beim Minimum der Sättigungskurve  $I_{\text{min}}$  auch wie die Sättigungsintensität  $I_{\text{Sat}}$  mit der gelben Intensität  $I_g$  skaliert, und zwar wie  $I_{\text{min}} = 0,9 \cdot I_g$  ( $I_{\text{min}} = 72$  W/cm<sup>2</sup> bei  $I_g = 80$  W/cm<sup>2</sup> und  $540$  W/cm<sup>2</sup> bei  $600$  W/cm<sup>2</sup>), liegt der erreichbare Sättigungsfaktor, bei dem noch kein Wiederanstieg der Fluoreszenz stattfindet, bei ca.  $\epsilon = 270$ . Dies entspricht nach Gleichung 2.1 einer 16-fachen Auflösungserhöhung gegenüber dem Abbe-Kriterium.



**Abbildung 2.4:** Geschwindigkeitskonstanten  $k_{\text{aus}} = 1/t_{\text{aus}}$  der Deaktivierung (a) und  $k_{\text{an}} = 1/t_{\text{an}}$  der Aktivierung als Funktion der blauen Intensität  $I_b$  beziehungsweise der gelben Intensität  $I_g$  (b) ermittelt aus einem exponentiellen Fit des Aus- bzw. Einschaltvorgangs. Zur Fluoreszenzanregung während des Ausschaltvorgangs wurde gleichzeitig eine niedrige Intensität  $I_g$  des gelben Lichts verwendet. c) Minimale Fluoreszenz im Vergleich zur Einschaltzeit  $t_{\text{an}}$  über der Intensität  $I_g$ , vertikale Linie: In dieser Arbeit zur Bildaufnahme verwendete Intensität  $I_g$ .

### 2.1.3 Abtastzeit und -leistung bei der Bildaufnahme

Bei der Abtastung des Bildes sollte die Zeit pro Abtastpunkt oder -linie auf die benötigte Zeit zur Deaktivierung oder Aktivierung der Fluoreszenz angepasst werden. Die Zeit, die zur Aktivierung ( $t_{\text{an}}$ ) beziehungsweise zur Deaktivierung ( $t_{\text{aus}}$ ) der Fluoreszenz von asFP595 benötigt wird nimmt mit der gelben ( $I_g$ ) beziehungsweise blauen ( $I_b$ ) Intensität ab (vergleiche Abbildung 2.4 a und b), wobei die Geschwindigkeitskonstanten  $k_{\text{aus}} = 1/t_{\text{aus}}$  und  $k_{\text{an}} = 1/t_{\text{an}}$  eine lineare Abhängigkeit von der Intensität  $I_b$  des blauen beziehungsweise  $I_g$  des gelben Lichts zeigen. Sollte dies auch bei höheren Intensitäten der Fall bleiben, könnte man also die Schaltdauern für die Besetzung im Ensemble durch beliebig hohe Intensitäten immer weiter verkürzen, bis hin zu der molekularen Dauer eines einzelnen Schaltvorgangs von ca. 100 ps [55, 56]. Während bei den hier verwendeten Leistungen  $t_{\text{aus}}$  unter 1ms liegt, dauert die Aktivierung der asFP595 Fluoreszenz 1-10 s, was die limitierende Zeit für das Abtasten des Bildes darstellt. Die Reduzierung von  $t_{\text{an}}$  mit der Leistung  $I_g$  legt nahe,  $I_g$  möglichst hoch zu wählen. Jedoch unterliegen die angewandten Leistungen einer Einschrän-



**Abbildung 2.5:** a) Einfaches Modell des Photoschaltens von asFP595 mit zwei Zuständen, einem Dunkelzustand und einem fluoreszierenden Zustand, jeweils dargestellt mit Grundzustand und angeregtem Zustand  $B$  und  $B^*$  beziehungsweise  $D$  und  $D^*$ . Der angeregte Zustand kann durch gelbes und blaues Licht mit der Intensität  $I_g$  beziehungsweise  $I_b$  aus dem Grundzustand angeregt werden. Im angeregten Zustand ist der Übergang zwischen Dunkel- und fluoreszierendem Zustand mit den Wahrscheinlichkeiten  $\Phi_{an}$  und  $\Phi_{aus}$  möglich, sowie im Grundzustand durch spontane Relaxation von  $B$  nach  $D$ . Die Emission von Fluoreszenz wird nur für den fluoreszierenden Zustand  $B$  angenommen, im Dunkelzustand soll keine Fluoreszenz emittiert werden, der Übergang von  $D^*$  nach  $D$  soll strahlungslos erfolgen. Die Energiebarriere zwischen den beiden Zuständen kann von der Richtung des Übergangs abhängen. b) Vereinfachtes Modell durch Zusammenfassen der Grund- und angeregten Zustände und der Einführung von effektiven Ratenkonstanten  $k_{an}$  und  $k_{aus}$ .  $k_{an}$  hängt von der Leistung des gelben und blauen Lichts ab,  $k_{aus}$  nur von der Leistung des blauen Lichts und von der spontanen Relaxationsrate  $k_{aus}^s$ .

kung. In Abbildung 2.3 sind typische Fluoreszenzunterdrückungskurven bei verschiedenen Leistungen  $I_g$  zu sehen. Das Anregungsübersprechen (Anr-ÜS) des blauen Lichts führt zu einer minimal erreichbaren Fluoreszenz, die mit zunehmender Leistung  $I_g$  schnell größer wird (Abbildungen 2.3 a und 2.4 c). Diese Charakteristik zwingt zu einem Kompromiss zwischen Unterdrückungseffizienz und Schaltzeit, was wiederum die Abtastzeit bei der Bildaufnahme begrenzt. In dieser Arbeit wurde eine Intensität  $I_g$  von  $600 \text{ W/cm}^2$  gewählt, was einer Abtastzeit von 100 ms pro Bildpunkt bei einer moderaten Unterdrückungseffizienz von 65% entspricht (Abbildung 2.4 c, vertikale Linie).

### 2.1.4 Photophysikalisches Modell der Schaltkinetik

Die beobachtete Schaltkinetik von asFP595 kann sehr gut durch ein einfaches photophysikalisches Modell beschrieben werden, das den Dunkelzustand  $D$  und den fluoreszierenden Zustand  $B$  sowie die zugehörigen angeregten Zustände  $D^*$  und  $B^*$  beinhaltet (Abbildung 2.5 a). Da die Abregung von  $D^*$  und  $B^*$  um einige Größenordnungen schneller ist als jeder andere im Modell berücksichtigte Prozess (ns gegenüber ms bis s), kann die relevante Schaltkinetik im Millisekunden bis Sekunden Bereich mit Hilfe eines vereinfachten Zwei-Zustände Modells mit der Aktivierungsrate  $k_{an}$  und Deaktivierungsrate  $k_{aus}$  beschrieben werden (Abbildung 2.5 b). Nach der theoretischen Beschreibung im Anhang (Kapitel A.1) kann die Intensitätsabhängigkeit von  $k_{an} = a_{an}^g \gamma_g I_g + a_{an}^b \gamma_b I_b$  und  $k_{aus} = a_{aus}^b \gamma_b I_b + k_{aus}^s$  durch

die Proportionalitätsfaktoren  $a_{\text{an}}^{\text{g}}$ ,  $a_{\text{an}}^{\text{b}}$  und  $a_{\text{aus}}^{\text{b}}$  (Einheit:  $\text{cm}^2$ ) beschrieben werden (g,b: gelbes bzw. blaues Licht; an,aus: Aktivierung bzw. Deaktivierung; s: spontan ohne Anregung durch Licht). Sie sollen im weiteren als effektive Wirkungsquerschnitte bezeichnet werden, um sie von den im Vier-Zustände Modell vorkommenden Absorptionswirkungsquerschnitten zu unterscheiden. Die inverse Photonenenergie  $\gamma$  ist eine nur von der Wellenlänge  $\lambda$  abhängige Konstante ( $\gamma = \lambda/(hc)$ ,  $h$ : Planckkonstante,  $c$ : Lichtgeschwindigkeit im Vakuum). Diese wird verwendet da der Wirkungsquerschnitt hier die Proportionalitätskonstante zur Photonenzahl pro Sekunde und Fläche, und nicht zur Intensität  $I$ , darstellt. Der spontane nicht von Licht getriebene Übergang  $B \rightarrow D$  wird durch die Ratenkonstante  $k_{\text{aus}}^{\text{s}}$  berücksichtigt. Insofern alle asFP595 Moleküle sich ursprünglich im Dunkelzustand befinden, kann der spontane Übergang  $D \rightarrow B$  vernachlässigt werden. Weiterhin wird angenommen, dass das gelbe Licht den Deaktivierungsprozess nicht beeinflusst, da seine Wellenlänge gewählt wurde um die Fluoreszenzaktivierung möglichst effektiv zu halten, d.h.  $a_{\text{an}}^{\text{g}} \gg a_{\text{aus}}^{\text{g}} \approx 0$ . Die Effizienz der Fluoreszenzunterdrückung kann dann ausgedrückt werden durch das Verhältnis  $F_{\text{n}}$  der Fluoreszenz bei blauem Licht ( $F(I_{\text{b}})$ ) zu der Fluoreszenz ohne blauem Licht  $F(I_{\text{b}} = 0)$  (Kapitel A.1).

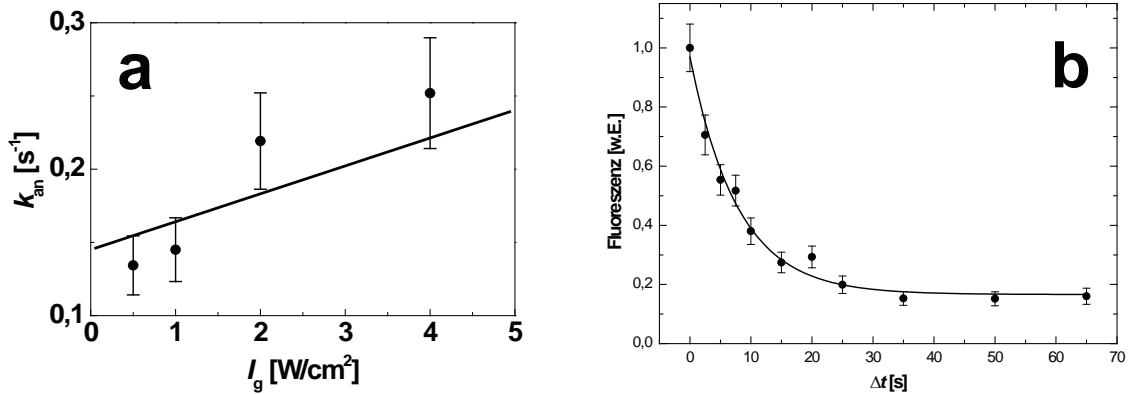
$$\bar{F}_{\text{n}} = \frac{\bar{F}(I_{\text{b}})}{\bar{F}(0)} = \left(1 + R \frac{I_{\text{b}}}{I_{\text{g}}}\right) \frac{a_{\text{an}}^{\text{g}} I_{\text{g}} + a_{\text{an}}^{\text{b}} I_{\text{b}}}{a_{\text{an}}^{\text{g}} I_{\text{g}} + (a_{\text{an}}^{\text{b}} + a_{\text{aus}}^{\text{b}}) I_{\text{b}} + k_{\text{aus}}^{\text{s}}} \quad (2.2)$$

Im Idealfall regt das gelbe Licht selektiv die Aktivierung  $D \rightarrow B$  sowie die Fluoreszenz  $B \rightarrow B^*$  an, wohingegen blaues Licht nur die Deaktivierung  $B \rightarrow D$  anregt. Jedoch unterliegen die Übergänge einer spektralen Verbreiterung, so dass die Spektren der unterschiedlichen Übergänge überlappen (vergleiche Abbildung 2.2 c). Dadurch verlieren die verwendeten unterschiedlichen Wellenlängen ihre Selektivität und können jeweils beide Übergänge induzieren, was als Übersprechen bezeichnet wird. Während das Übersprechen durch gelbes Licht vernachlässigt werden kann ( $a_{\text{aus}}^{\text{g}} \approx 0$ ), induziert blaues Licht ein nennenswertes Übersprechen der Aktivierung und der Fluoreszenzanregung (vergleiche Akt-ÜS und Anr-ÜS in Abbildung 2.2 c und Abbildung 2.3 a). In Gleichung 2.2 quantifiziert  $R = \sigma_{\text{b}}^{\text{b}} \gamma_{\text{b}} / (\sigma_{\text{b}}^{\text{g}} \gamma_{\text{g}})$ , mit den Absorptionswirkungsquerschnitten des An-Zustands ( $B$ )  $\sigma_{\text{b}}^{\text{b}}$  und  $\sigma_{\text{b}}^{\text{g}}$  für blaues beziehungsweise gelbes Licht, die Wahrscheinlichkeit für unerwünschte Fluoreszenz durch blaues Licht, d.h. das Fluoreszenzanregungs-Übersprechen. Das Aktivierungs-Übersprechen des blauen Lichts, welches zu unerwünschten aus-an ( $D \rightarrow B$ ) Übergängen führt, wird durch  $a_{\text{an}}^{\text{b}}$  quantifiziert.

Diesen Ansatz bestätigend, zeigt die experimentell bestimmte Ratenkonstante der Aktivierung  $k_{\text{an}} = 1/t_{\text{an}}$  einen linearen Zusammenhang mit der gelben Intensität  $I_{\text{g}}$ , was einem effektiven Wirkungsquerschnitt von  $a_{\text{an}}^{\text{g}} = 0,12 \cdot 10^{-19} \text{ cm}^2$  entspricht (Abbildung 2.4 b). Die Ratenkonstante der spontanen Deaktivierung kann aus dem y-Achsenabschnitt ( $I_{\text{g}} = 0$ ) zu  $k_{\text{aus}}^{\text{s}} = 0,15 \text{ s}^{-1}$  bestimmt werden (Abbildung 2.6 a), da  $k_{\text{an}} = a_{\text{an}}^{\text{g}} I_{\text{g}} + k_{\text{aus}}^{\text{s}}$  gilt. Dementsprechend wird die Fluoreszenz innerhalb von  $t_{\text{aus}}^{\text{s}} \approx 7 \text{ s}$  deaktiviert, was sehr gut mit den publizierten Werten in [57], sowie mit eigenen Anregungs-Abfrage Messungen übereinstimmt (Abbildung 2.6 b).

Weiterhin kann die Sättigungskurve bei  $I_{\text{g}} = 600 \text{ W/cm}^2$  in Abbildung 2.3 sehr gut durch



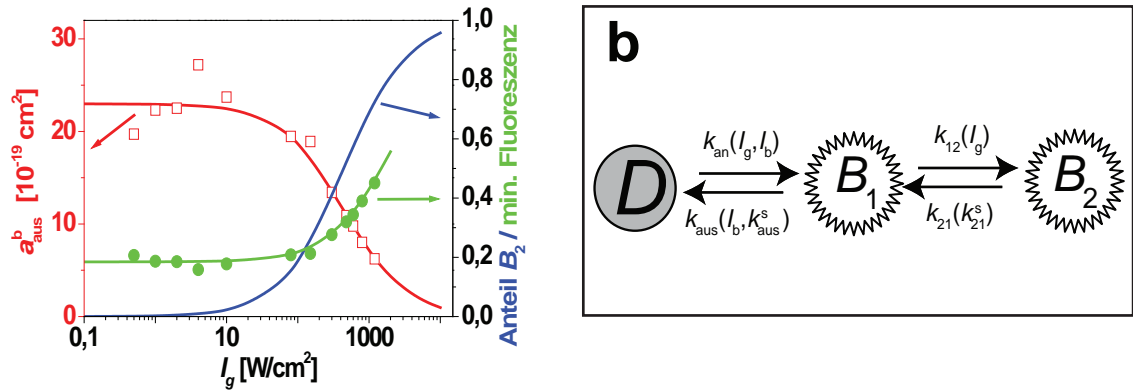


**Abbildung 2.6:** a) Bestimmung von  $t_{aus}^s$  der spontanen Relaxation aus dem y-Achsen-Abschnitt von  $k_{an}$  (Ausschnitt von Abbildung 2.4 b).

b) einer Anregung-Abfrage Messung der Relaxation aus dem An- in den Auszustand. Nach vollständigem Einschalten mit gelbem Licht wurde dies für eine Zeit  $\Delta t$  ausgeschaltet, und danach wieder angeschaltet. Aufgetragen ist die Fluoreszenz  $F$  bei  $\Delta t$ , normiert auf die Fluoreszenz bei  $\Delta t = 0$ . Die durchgezogene Linie ist eine Anpassung der Funktion  $A \cdot \exp(-\Delta t/t_{aus}^s) + F_0$ , mit  $A, F_0$  und  $t_{aus}^s$  als freie Parameter, wodurch sich  $t_{aus}^s$  zu  $(7,8 \pm 0,8)$  s bestimmen lässt.

die Gleichung 2.2 beschrieben werden, mit einem Anregungsübersprechen von  $R = 0,03$  und einem Aktivierungsübersprechen von  $a_{an}^b = 5,1 \cdot 10^{-19} \text{ cm}^2$ , sowie dem zuvor bestimmten effektiven Wirkungsquerschnitt für die Aktivierung durch gelbes Licht  $a_{an}^g$ . Wohingegen die Analyse von weiteren Sättigungskurven bei anderen gelben Intensitäten  $I_g$  zu den gleichen Werten für  $R = (0,03 \pm 0,02)$ ,  $a_{an}^b = (5,1 \pm 0,2) \cdot 10^{-19} \text{ cm}^2$  und  $a_{an}^g = (0,12 \pm 0,01) \cdot 10^{-19} \text{ cm}^2$  führt, zeigt der effektive Wirkungsquerschnitt der Deaktivierung  $a_{aus}^b$  eine Abhängigkeit von  $I_g$ , wie in Abbildung 2.7 a, rote Punkte und Linien, dargestellt. Aus dieser Abhängigkeit resultiert das beobachtete Anwachsen der minimalen Fluoreszenz mit anwachsender Intensität  $I_g$  (Abbildung 2.7 a, grüne Punkte, und 2.4c). Während die experimentellen Daten zeigen, dass die blaue Deaktivierungsintensität bei maximaler Unterdrückung der Fluoreszenz linear proportional zur gelben Aktivierungsintensität  $I_g$  ist, was bedeutet, dass die blaue Intensität im Prinzip an jede verwendete gelbe Intensität angepasst werden kann, verhindert die Abhängigkeit des effektiven Wirkungsquerschnitts  $a_{aus}^b$  den Gebrauch hoher gelber Intensitäten  $I_g$ .

Dieses komplexere Verhalten der Photophysik von asFP595 kann beschrieben werden durch zwei fluoreszierende Zustände  $B_1$  und  $B_2$ , wobei der Übergang von  $B_1$  nach  $B_2$  durch gelbes Licht getrieben wird mit der Ratenkonstante  $k_{12}(I_g) = a_{12}^g \gamma_g I_g$  und dem effektivem Wirkungsquerschnitt  $a_{12}^g$ , der Übergang  $B_2 \rightarrow B_1$  jedoch nur spontan mit der Ratenkonstante  $k_{21} = k_{21}^s$  erfolgt und nicht durch blaues Licht getrieben wird (Abbildung 2.7 b). Basierend auf diesem Modell kann die Unterdrückung der Fluoreszenz  $F_n$  durch blaues Licht durch Gleichung 2.2 beschrieben werden, jedoch muss der effektive Wirkungsquerschnitt der Deaktivierung als intensitätsabhängig angenommen werden:



**Abbildung 2.7:** a) Effektiver Wirkungsquerschnitt  $a_{\text{aus}}^b$  der Fluoreszenz-Deaktivierung durch blaues Licht in Abhängigkeit der gelben Leistung zur Aktivierung der Fluoreszenz  $I_g$  (rote Quadrate) bestimmt aus der Anpassung von Gleichung 2.2 an  $F_n(I_b, I_g)$  sowie Anpassung der Gleichung 2.3 an  $a_{\text{aus}}^b$ . Experimentelle Daten der minimalen Fluoreszenz wie in Abbildung 2.4 c) (grüne Punkte) sowie Anpassung von Gleichung 2.4 (grüne Linie). Anteil der Moleküle im Zustand  $B_2$  nach dem Modell in b). Für alle Kurven gelten die gleichen Parameter (siehe Text). b) Erweiterung des Modells aus Abbildung 2.5 durch einen weiteren fluoreszierenden Zustand  $B_2$ , der direkt nur an  $B_1$  gekoppelt ist. Der Übergang  $B_1 \rightarrow B_2$  wird durch gelbes Licht getrieben, der Übergang  $B_2 \rightarrow B_1$  erfolgt nur spontan.

$$a_{\text{aus}}^b(I_g) = \frac{a_{\text{aus-max}}^b}{((a_{12}^g \gamma_g / k_{21}^s) I_g + 1)}. \quad (2.3)$$

Dieser Ausdruck kann sehr gut an die experimentellen Daten  $a_{\text{aus}}^b(I_g)$  (rote Linie in Abbildung 2.7 a) sowie an den Anstieg der minimalen Fluoreszenz (grüne Linie in Abbildung 2.7 a) angepasst werden mit  $a_{\text{aus-max}}^b = (23 \pm 2) \cdot 10^{-19} \text{ cm}^2$  und  $a_{12}^g \gamma_g / k_{21}^s = (1,6 \pm 0,1) \cdot 10^{-21} \text{ cm}^2$ .

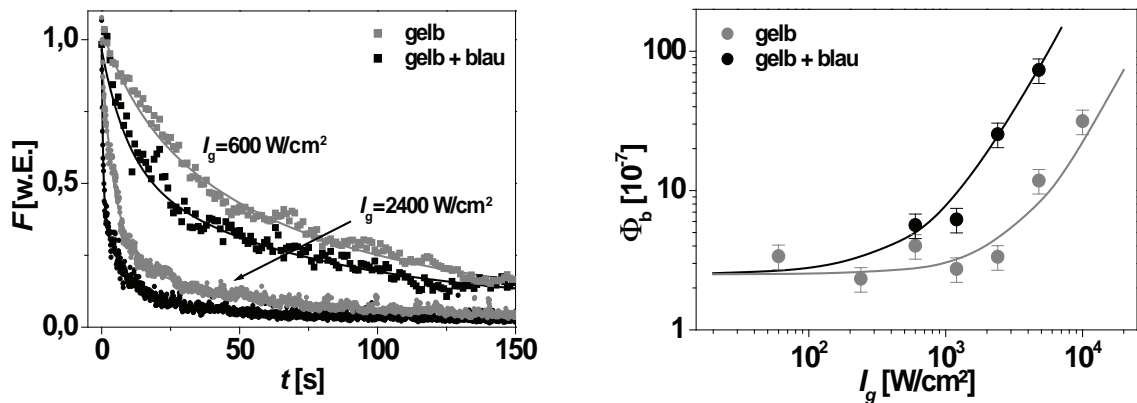
Die minimale Fluoreszenz  $\min(F_n)$  kann der Fluoreszenz  $F_n$  für  $I_b \rightarrow \infty$  bei Vernachlässigung des Anregungs-Übersprechen gleichgesetzt werden. Dies ist möglich, da bei den hier verwendeten Leistungen der Anstieg der Fluoreszenz durch Anregung mit blauem Licht erst bei sehr viel höheren blauen Intensitäten als der Intensität  $I_b$  bei  $\min(F_n)$  messbar ist, was durch das ausgeprägte Plateau um  $\min(F_n)$  bei  $I_g = 600 \text{ W/cm}^2$  in Abbildung 2.3 erkennbar ist. Setzt man folglich in Gleichung 2.2 das Anregungs-Übersprechen  $R = 0$  so gilt für die minimale Fluoreszenz:

$$\min(F_n) \cong \lim_{I_b \rightarrow \infty} F_n(R = 0) = \frac{a_{\text{an}}^b}{a_{\text{an}}^b + a_{\text{aus}}^b} \quad (2.4)$$

Bei hohen Aktivierungsintensitäten  $I_g$  liegt die Bevölkerungsrate von  $B_2$  weit über der Rate für den spontanen Übergang von  $B_2$  nach  $B_1$ , was zu einer erheblich erhöhten Bevölkerung von  $B_2$  führt (blaue Linie in Abbildung 2.7 a), die nicht durch blaues Licht in einen Dunkelzustand überführt werden kann. Dies vermindert  $a_{\text{aus}}^b(I_g)$  und führt somit zu einer höheren minimalen Fluoreszenz.

Die effektiven Wirkungsquerschnitte der Aktivierung und Deaktivierung  $a_{\text{an/aus}}^{\text{g/b}}$  sind willkürliche Parameter und sollten nicht mit den Wirkungsquerschnitten der Absorption  $\sigma_{\text{g/b}}$  verwechselt werden. Wie im Anhang (Kapitel A.1) und in Abbildung 2.5 a dargestellt wird, sind die effektiven Wirkungsquerschnitte verknüpft mit den Absorptionseffizienzen  $\sigma_{\text{D/B}}^{\text{g/b}}$  für die lichtgetriebenen Übergänge  $D \rightarrow D^*$  und  $B \rightarrow B^*$  über die Wahrscheinlichkeiten der  $\Phi_{\text{an/aus}}^{\text{g/b}}$  Übergänge  $D^* \rightarrow B$  beziehungsweise  $B^* \rightarrow D$ :  $a_{\text{an/aus}}^{\text{g/b}} = \Phi_{\text{an/aus}}^{\text{g/b}} \sigma_{\text{D/B}}^{\text{g/b}}$ . Die experimentell bestimmten effektiven Wirkungsquerschnitte  $a_{\text{an/aus}}^{\text{g/b}} \approx 10^{-19} - 10^{-21} \text{ cm}^2$  sind eine bis drei Größenordnungen kleiner als die Absorptionseffizienzen des Aus-Zustands  $\sigma_{\text{D}}^{\text{g}} \approx 10^{-16} \text{ cm}^2$  und  $\sigma_{\text{D}}^{\text{b}} \approx 10^{-18} \text{ cm}^2$ , die anhand Abbildung 2.2 b und Literaturwerten [51] abgeschätzt werden können. Diese Werte führen zu Schaltwahrscheinlichkeiten von  $\Phi_{\text{an}}^{\text{g}} \approx 0,0001$  und  $\Phi_{\text{an}}^{\text{b}} \approx 0,05$  für die Aktivierung in den An-Zustand durch gelbes beziehungsweise blaues Licht. Angesichts der Änderungen in den Absorptionseffizienzen vom An- zum Aus-Zustand ( $\sigma_{\text{b}}^{\text{g}} < \sigma_{\text{D}}^{\text{g}}$  und  $\sigma_{\text{b}}^{\text{b}} > \sigma_{\text{D}}^{\text{b}}$ , unteres Diagramm in Abbildung 2.2 b) sind die Wahrscheinlichkeiten für den Ausschaltvorgang  $\Phi_{\text{aus}}^{\text{g}}$  und  $\Phi_{\text{aus}}^{\text{b}}$  vermutlich ähnlich groß, wobei der durch gelbes Licht induzierte Ausschaltvorgang vernachlässigt werden kann und die Wahrscheinlichkeit des durch blauen Lichts induzierten Ausschaltvorgangs aus oben genannten Gründen sehr stark von der Intensität des gelben Lichts  $I_{\text{g}}$  abhängt, d.h.  $\Phi_{\text{aus}}^{\text{g}} \approx 0$  und  $\Phi_{\text{aus}}^{\text{b}}(I_{\text{g}}) \approx \Phi_{\text{an}}^{\text{b}} \approx 0,01 - 0,1$ . Obwohl die Absorptionseffizienzen sehr viel größer sind, sind die Übergangswahrscheinlichkeiten für gelbes Licht sehr viel kleiner als für blaues Licht, da die Anregung durch gelbes Licht zu einem niedrigeren Anregungsniveau, und somit zu einer niedrigeren Wahrscheinlichkeit für das Überwinden der Energiebarriere zwischen den beiden Zuständen  $B$  und  $D$  führt (Abbildung 2.5 a). Es soll hier angemerkt werden, dass das reversible Schalten durch gelbes und blaues Licht somit nur durch die Veränderung in den Absorptionsspektren und den Wahrscheinlichkeiten für die Übergänge zwischen den Zuständen  $B$  und  $D$  möglich ist.

Eine Eigenschaft, die bisher nicht in der Photophysik von asFP595 berücksichtigt wurde, ist das Vorhandensein eines nicht reversiblen An-Zustands. Auf solch eine Charakteristik kann durch den leichten Anstieg des unterdrückten Signals während der ersten zwei bis drei Schaltzyklen geschlossen werden (vergleiche Abbildung 2.2 a) und wurde bereits ansatzweise bei den Schaltvorgängen in einer kristallisierten asFP595 Mutante beobachtet [55]. Diese Eigenschaft tritt eindeutiger zu Tage bei hohen Intensitäten, wie bereits bei einer Mutante von asFP595, dem fluoreszierenden Protein KFP1 [58], gezeigt wurde. Die Schalteigenschaften von asFP595 gehen komplett verloren in wasserfreien Proben, beispielsweise wenn als Medium Polyvinylalkohol (PVA) verwendet wird. Jedoch ist das Ausmaß des nicht-reversiblen Schaltens sehr abhängig von der Probenpräparation und deshalb nur schwer zu reproduzieren. Außerdem ist der Effekt bei den hier verwendeten Intensitäten zu schwach, um bei der Verwendung von asFP595 als Fluoreszenzmarker in der RESOLFT-Mikroskopie eine Rolle zu spielen.



**Abbildung 2.8:** a) Abnahme der Fluoreszenz bei konstanter Bestrahlung mit gelbem Licht (Intensität  $I_g$ ) oder gelben und blauem Licht (Intensität  $I_b = 0,9 \cdot I_g$ ), experimentelle Daten und Anpassung der Daten durch Gleichung 2.5. b) Wahrscheinlichkeit des Photobleichens  $\Phi_b$  (Punkte) und Anpassung der Daten durch  $\Phi_b = \Phi_b^0 + \Phi_b(I)$ , wobei  $\Phi_b(I) \propto I^{1,7}$

### 2.1.5 Photobleichen

Die maximal anwendbaren Intensitäten sind neben dem Rückgang der Unterdrückungseffizienz bei hohen gelben Intensitäten durch auftretende Photozerstörung beschränkt. Photozerstörung führt zu einem kompletten Verlust der molekularen Fluoreszenz. Solange die Photozerstörungsreaktion linear von der Intensität  $I_g$  abhängt, kann  $I_g$  ohne Bedenken hinsichtlich der Photozerstörung erhöht werden, da die Fluoreszenz ebenso linear zunimmt, und somit bei gleichen Signal und Ausmaß des Photobleichens die Abtastrate zur Bildaufnahme erhöht und die Beleuchtungsdauer verkürzt werden kann. Dies ist nicht der Fall für nicht-lineare Bleichprozesse, bei denen die Reaktionsfähigkeit auf Grund von Zwei-Photonen-Prozessen bei zunehmender Intensität ansteigt [59]. Dieses intensitätsabhängige Photobleichen wird verursacht durch Absorption von Photonen im ersten elektronisch angeregten Zustand ( $D^*$ ,  $B^*$ ), was zur Anregung in höhere elektronische Zustände mit größerer Reaktivität führt. Im Allgemeinen findet Photobleichen mit einer Ratenkonstante  $k_b$  aus dem ersten elektronisch angeregten Zustand des Fluorophors von asFP595 statt. Eine effektive Konstante der Bleichrate  $k_z$  kann definiert werden über die Wahrscheinlichkeit des Photobleichens  $\Phi_b = k_b \tau_0$ , wobei  $\tau_0$  die Lebensdauer des angeregten Zustandes darstellt. Die effektive Bleichrate ist  $k_z = \Phi_b \sigma_B^g \gamma_g I_g (1 + R)$  [59], wobei  $\sigma_B^g$  den Absorptionsquerschnitt im Zustand  $B$  für gelbes Licht,  $\gamma_g$  die inverse Photonenenergie und  $R = \sigma_B^b \gamma_b / (\sigma_{DB}^g \gamma_g)$  darstellt.  $k_b$  und  $\Phi_b$  können wegen nicht-linearer Bleichprozesse von der Intensität abhängen:  $\Phi_b = \Phi_b^0 + \Phi_b(I)$ , wobei  $\Phi_b^0$  das Limit zu niedrigen Intensitäten und  $\Phi_b(I)$  die nicht-lineare Charakteristik des Photobleichens darstellt. Messungen bei hohen gelben Leistungen zeigten nach der Aktivierung einen zeitlichen Rückgang der Fluoreszenz auf Grund von Photobleichen (Abbildung 2.8 a). Dieser Abfall der Fluoreszenz konnte bei verschiedenen Intensitäten  $I_g$  sowohl ohne und auch bei gleichzeitiger Bestrahlung durch blaues Licht sehr gut durch einen 3-exponentiellen Abfall mit Amplituden  $A_i$  ( $i=1-3$ ), Ratenkonstanten  $k_i$  und einem Untergrund  $c$  angepasst werden:

$$F(t) = A_1 \exp(-k_1 t) + A_2 \exp(-k_2 t) + A_3 \exp(-k_3 t) + c. \quad (2.5)$$

Bei Zeiten unter einer Sekunde pro Bildpunkt kann der anfängliche Abfall der Fluoreszenz als der entscheidende Photobleichprozess angesehen werden. Nimmt man an, dass der entsprechende Exponent  $k_1$  die effektive Konstante der Bleichrate  $k_z$  darstellt, kann man daraus die Wahrscheinlichkeit für das Photobleichen bestimmen (typischer Absorptionswirkungsquerschnitt für fluoreszierende Proteine:  $\sigma_B^g = 10^{-16} \text{ cm}^2$ , vergleiche [60] und Tabelle 3.1;  $R = 0,03$ , vergleiche Kapitel 2.1.4). Die Intensitätsabhängigkeit von  $\Phi_b$  (Abbildung 2.8 b) zeigt, dass der Photobleichprozess nichtlinear ist. Das Photobleichen bei der Bildaufnahme nimmt durch diese Nichtlinearität bei Intensitäten von  $I_g > 1000 \text{ W/cm}^2$  erheblich zu, was vermieden werden sollte. Die Werte von  $\Phi_b \approx 10^{-7} - 10^{-6}$ , die für asFP595 bestimmt wurden, sind vergleichbar mit Wahrscheinlichkeiten für Photobleichen bei anderen fluoreszierenden Proteinen [61]. Jedoch weicht die beobachtete Intensitätsabhängigkeit mit einem Exponenten von 1,7 von den in der Literatur genannten Werten von organischen Farbstoffen ab, bei denen ein einfacher linearer Zusammenhang vorgeschlagen wurde [59]. Diese Charakteristik und die Abweichung von einem einfachen mono-exponentiellem Abfall könnte auf relativ komplexe Photobleich-Prozesse hindeuten, deren Ursache(n) in der komplexen Photophysik [62] und/oder der oligomeren Struktur [55, 63, 64] von asFP595 zu finden sein könnten.

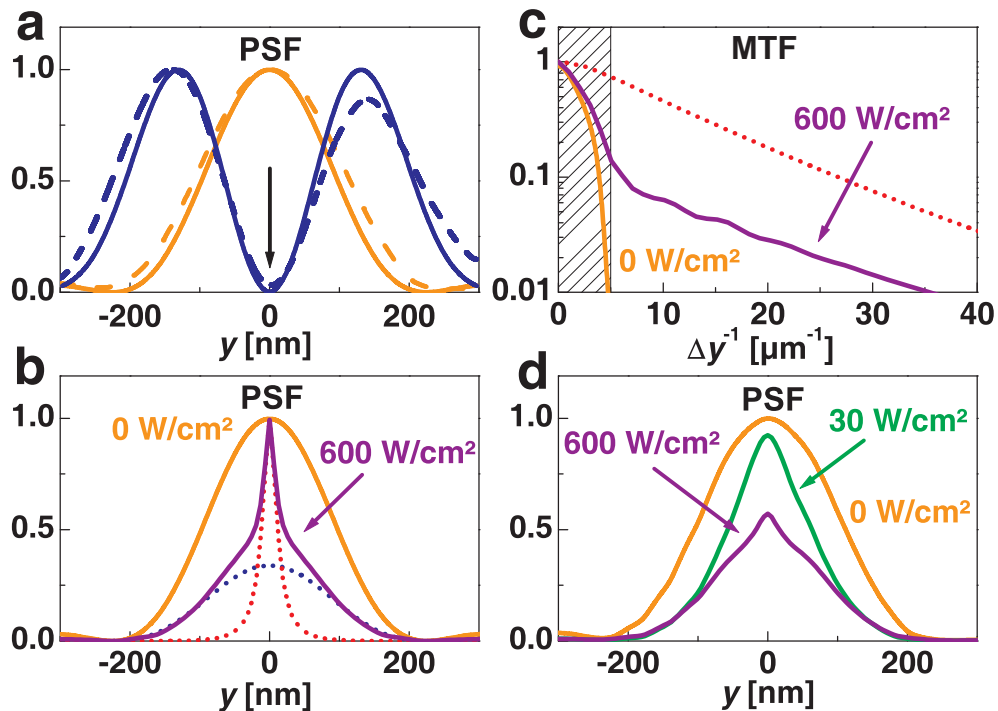
### 2.1.6 Relevanz der spektroskopischen Ergebnisse für die Bildaufnahme

Für die Anwendung von asFP595 in der Raster-RESOLFT-Mikroskopie kann man aus obigen Ergebnissen für das Photobleichen, die Einschaltzeit und die Unterdrückungseffizienz ablesen, dass eine Abtastzeit von 100 ms pro Bildpunkt mit einer Intensität von  $I_g = 600 \text{ W/cm}^2$  einen geeigneten Kompromiss zwischen maximaler Einschaltgeschwindigkeit, maximaler Unterdrückungseffizienz und minimalem Bleichen darstellt, und deshalb zur Aufnahme von Bildern nach dem RESOLFT-Prinzip in dieser Arbeit verwendet wurde.

## 2.2 RESOLFT-Mikroskopie mit asFP595

### 2.2.1 Fokale Fluoreszenzverteilung unterhalb des Beugungslimits

Im Gegensatz zum gelben Licht, das normal auf die Probe fokussiert wurde, wurde das blaue Licht so präpariert, dass eine Null-Intensitätslinie in x-Richtung entstand, die von zwei Intensitätsspitzen in der y-Richtung umgeben ist. Abbildung 2.9 a zeigt das berechnete und gemessene y-Profil dieser Doppelspitze, die als Ausschalt-PSF ( $h_{\text{aus}}$ ) bezeichnet wird. Die Rechnungen wurden für die benutzten Wellenlängen von 568 nm und 458 nm mit Hilfe einer vektoriellen Beugungstheorie durchgeführt [65]. Die gemessene Ausschalt-PSF (gestri-



**Abbildung 2.9:** Nicht beugungsbegrenzte Punktverteilungsfunktion (englisch: Point-Spread Function, PSF) und Modulations -Transfer-Funktion (MTF) durch Photoschalten von asFP595. (a) Gemessene und berechnete Ausschalt-PSF (blau) zusammen mit der Anschalt-PSF, die auch die Fluoreszenz anregt (orange). Durchgezogene Linien wurden berechnet, gestrichelte Linien wurden gemessen. (b) Effektive PSF bei  $I_g = 600 \text{ W/cm}^2$  und verschiedenen Intensitäten  $I_b = 600 \text{ W/cm}^2$  (violett) und  $I_b = 0$  (orange). Im erstgenannten Fall besteht die effektive PSF aus einer beugungsbegrenzten  $PSF_{\text{beug}}$  (blaue Punkte) und der entsprechenden nicht beugungsbegrenzten  $PSF_{\text{RESOLFT}}$  (rote Punkte) ( $\epsilon = 0.3$ , Gleichung 2.6). Die  $PSF_{\text{RESOLFT}}$  kann berechnet werden, in dem man das Aktivierungsübersprechen des blauen Lichts auf Null setzt. (c) Die entsprechenden effektiven MTF (violett) und  $MTF_{\text{RESOLFT}}$  (rot) geben den Zuwachs der Raumfrequenzbandweite über das Beugungslimit (schraffiert) bzw. über der Referenz-MTF bei  $I_b = 0$  (orange) an. (d) Effektive PSFs, die in der selben Weise wie in (b) berechnet wurden, jedoch unter der Benutzung der experimentellen Ausschalt-PSF.

chelte Linie) ist ähnlich zu ihrem berechneten Gegenstück. Ein entscheidender Unterschied besteht jedoch in der Tatsache, dass das Minimum nicht Null ist, sondern 1.5% des Spitzenwertes beträgt. Die Funktion der Ausschalt-PSF besteht darin, die asFP-Moleküle in den Aus-Zustand zu schalten, so dass der Bereich, in dem Fluoreszenz entstehen kann, unter die Beugungsgrenze entlang der  $y$ -Achse verkleinert wird. Die so erhaltene Wahrscheinlichkeit für Fluoreszenz in Abhängigkeit der Raumkoordinaten wird als effektive PSF ( $h_{\text{eff}}$ ) des Mikroskopes bezeichnet. Abbildung 2.9 b zeigt die effektive PSF, die aus der gemessenen Ausschaltkurve (Abbildung 2.3) mit Hilfe der berechneten Ausschalt-PSF aus Abbildung 2.9 a bestimmt wurde (hier ohne Berücksichtigung der konfokalen Detektion, die in lateraler Richtung vernachlässigt werden kann). Ausschaltkurven wie in (Abbildung 2.3) wurden noch für weitere Anschaltintensitäten  $I_g$  gemessen, so dass die Fluoreszenz für jede Kombination der lokalen Intensitäten von gelben und blauem Licht in Abhängigkeit der Raumko-

ordinate  $y$  bestimmt werden konnte. Abbildung 2.9 b zeigt die simulierte Verkleinerung des Fluoreszenzflecks für  $I_g = I_b = 600 \text{ W/cm}^2$ . Die ursprünglich beugungsbegrenzte Größe der PSF von 195 nm FWHM (gelb) ist nun auf 40 nm (violett) verkleinert. Die unvollständige Unterdrückung der Fluoreszenz durch das Übersprechen der Aktivierung in den beiden verwendeten Wellenlängen macht sich am Rand der PSF bemerkbar (Abbildung 2.9 b). Wäre dieses Übersprechen nicht vorhanden, würde die effektive PSF aus einer einzelnen schmalen Spitze ohne beugungsbegrenzten Untergrund bestehen, deren FWHM 20 nm beträgt (Abbildung 2.9 b, gestrichelte rote Linie). Die Auflösung, die durch das Photoschalten erreicht wird, ist immer besser als die beugungsbegrenzte Auflösung, da die effektive PSF diesen Anteil, der unterhalb der Beugungsgrenze liegt, enthält. In einer guten Näherung kann die effektive PSF in einen beugungsbegrenzten Anteil ( $h_{\text{beug}}$ ) und in einen Anteil, der unterhalb der Beugungsgrenze liegt ( $h_{\text{RESOLFT}}$ ), unterteilt werden:

$$h_{\text{eff}} = \epsilon h_{\text{beug}} + (1 - \epsilon) h_{\text{RESOLFT}} \quad (2.6)$$

mit  $0 < \epsilon < 1$ , und mit allen Funktionen  $h$  auf 1 normiert. Diese Zerlegung ist beispielhaft in Abbildung 2.9 b für  $\epsilon = 0,3$  gezeigt; die blau gestrichelte Linie markiert die beugungsbegrenzte PSF  $h_{\text{beug}}$  und die rote Linie die unterhalb der Beugungsgrenze liegende RESOLFT-PSF  $h_{\text{RESOLFT}}$ . Man beachte die 10-fach kleinere FWHM der RESOLFT-PSF in dieser Simulation. Die Auflösung unterhalb der Beugungsgrenze kann auch mit Hilfe der effektiven Modulationstransferfunktion (MTF) des Mikroskops verdeutlicht werden. Die effektive MTF  $|H_{\text{eff}}(y^{-1})|$  ist der Betrag der Fouriertransformierten  $H_{\text{eff}}(y^{-1})$  der effektiven PSF, und beschreibt somit die relative Güte der Übertragung der Raumfrequenzen. Auch hier wird deutlich, dass die Beugungsbegrenzung durch Anwendung der Ausschalt-PSF überwunden wird. Im Gegensatz zu einem konventionellen oder konfokalen Mikroskop ist die Bandbreite eines RESOLFT-Mikroskops an sich unlimitiert, da die relative Amplitude der hohen Frequenzen mit der Steigerung der Intensität  $I_b$  und damit der Sättigung der Fluoreszenzunterdrückung ansteigt. Nehmen wir als Kriterium die Frequenz, die mit einer relativen Amplitude von 1% übertragen wird (Abbildung 2.9 c), so ist die Bandbreite der effektiven MTF bei einer Ausschaltintensität von  $I_b = 600 \text{ W/cm}^2$  um ungefähr den Faktor 7,8 erhöht. Wie die effektive PSF kann auch die effektive MTF in einen beugungsbegrenzten Anteil und in einen Anteil unterhalb der Beugungsgrenze zerlegt werden:  $|H_{\text{eff}}| = \epsilon |H_{\text{beug}}| + (1 - \epsilon) |H_{\text{RESOLFT}}|$ . Nimmt man das 1%-Kriterium, so zeigt  $|H|_{\text{RESOLFT}}$  eine Bandweitenvergrößerung um den Faktor 13 gegenüber  $|H|_{\text{beug}}$ . Falls die Frequenzanteile unterhalb der Beugungsgrenze nicht durch Rauschen überlagert werden, dass durch die beugungsbegrenzte PSF  $|h_{\text{beug}}|$  hervorgerufen wird, kann die Amplitude von  $|H_{\text{RESOLFT}}|$  im Bild durch Multiplikation im Fourierraum gesteigert werden. Eine direkte Lösung beruht auf der Tatsache, dass das Bild  $B$  durch die Faltung der Objektfunktion  $O$  mit der effektiven PSF  $h_{\text{eff}}$  gegeben ist:

$$B = [\epsilon h_{\text{beug}} + (1 - \epsilon) h_{\text{RESOLFT}}] \otimes O = \epsilon B_{\text{beug}} + (1 - \epsilon) B_{\text{RESOLFT}} \quad (2.7)$$

wobei  $B_{\text{beug}}$  und  $B_{\text{RESOLFT}}$  das beugungsbegrenzte beziehungsweise das Bild unterhalb der Beugungsgrenze darstellen. Folglich kann  $B_{\text{RESOLFT}}$  aus dem ebenfalls aufgenommenen

beugungsbegrenzten Bild  $B_{\text{beug}}$  und anschließender Subtraktion berechnet werden, ein genügendes Signal-zu-Rausch Verhältnis vorausgesetzt.

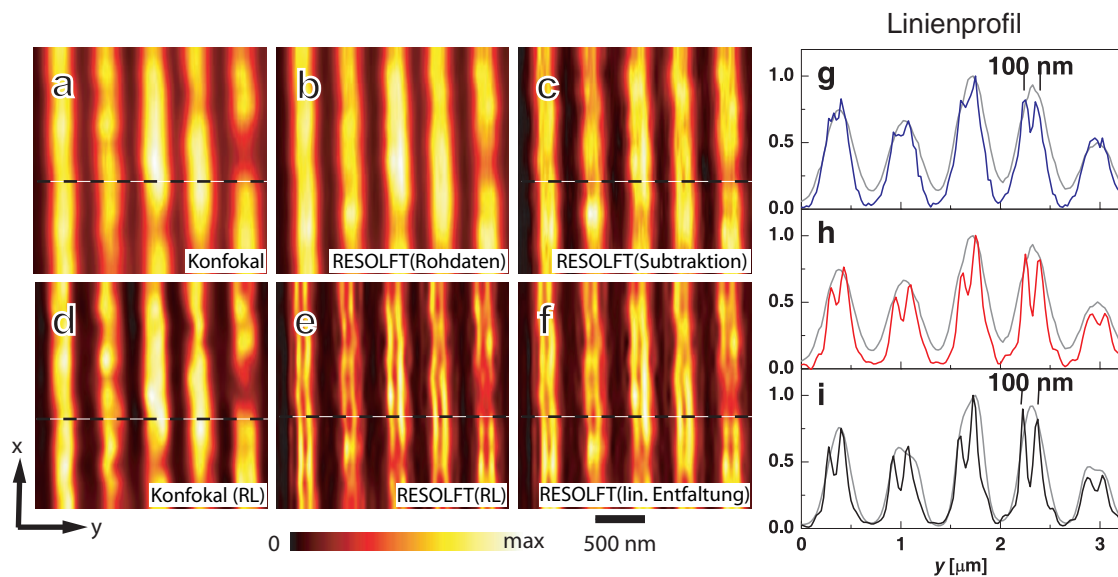
Schwieriger ist es hingegen, die 1,5%ige, nicht erwünschte Intensität im zentralen Minimum der experimentellen Ausschalt-PSF zu berücksichtigen (Abbildung 2.9 a). Um dies zu zeigen, ist in Abbildung 2.9 d die berechnete effektive PSF dargestellt, die aus der gemessenen Ausschalt-PSF in Abbildung 2.9 a resultiert. Verwendet man  $I_b = 30 \text{ W/cm}^2$ , so kann man erwarten, dass sich die effektive PSF in y-Richtung von 210 nm auf 120 nm FWHM einschnüren lässt. Verwendet man jedoch  $I_b = 600 \text{ W/cm}^2$ , so zeigt diese Simulation, daß die verbleibende 1,5%ige blaue Intensität auch im zentralen Minimum Fluoreszenz löscht und den Anteil der RESOLFT-PSF an der effektiven PSF erheblich verringert. Der Auflösungsgewinn bei hohen Intensitäten ist folglich eingeschränkt, wodurch wiederum die Anwendung von sehr hohen Sättigungsfaktoren mit asFP595 nicht sinnvoll ist und somit keine hohen Auflösungen erreicht werden. Nichtsdestotrotz kann man bei der Anwendung von  $I_b = 30 \text{ W/cm}^2$  erwarten, dass sich die effektive PSF um den Faktor 1,7 auf ungefähr 120 nm einschnüren lässt. Nach Gleichung 2.6 bedeutet dies für die RESOLFT-PSF eine Einschnürung um den Faktor 2,3, also auf ca. 90 nm FWHM.

## 2.2.2 Fluoreszenz-Mikroskopie unterhalb der Beugungsgrenze

Das Protein asFP595 existierte zur Zeit der hier entstandenen Aufnahmen nur als Tetramer, was seinen Einsatz als Fluoreszenzmarker in der Biologie einschränkt. Nichtsdestotrotz kann die Funktionsfähigkeit dieses RESOLFT-Mikroskops durch den Einsatz von Teststrukturen gezeigt werden. Zu diesem Zweck wurden speziell modifizierte Mikroskopiedeckgläser verwendet, in die durch ein Ionenstrahlbearbeitungsverfahren parallele Vertiefungen eingearbeitet wurden (Fraunhofer Institut IISB, Erlangen), die 10  $\mu\text{m}$  lang, 0,5-1  $\mu\text{m}$  tief und 100-200 nm breit waren. Die Abstände zwischen den Vertiefungen variierten von 100 nm bis 300 nm. Um die Struktur zu markieren, wurde das Deckglas in eine gepufferte asFP-Lösung eingetaucht, wodurch sich das asFP durch Adsorption an das Glas und somit auch in den Strukturen anlagerte. Der Proteinüberstand, der nicht adsorbiert wurde, konnte abgespült werden. Nachdem die Ausschalt-PSF mit ihrem zentralen Minimum mit der Anschalt-PSF überlagert wurde und die Vertiefungen in der y-Richtung ausgerichtet wurden, konnte die Probe mit einer Bildpunktgröße von 20 nm in y-Richtung, der Richtung der zu erwartenden Auflösungserhöhung, abgerastert werden. Die Bilder wurden mit einer Verweilzeit von 50ms pro Bildpunkt aufgenommen, die Intensitäten betragen  $I_g = 600 \text{ W/cm}^2$  und  $I_b = 30 \text{ W/cm}^2$ .

In Abbildung 2.10 sind Bilder eines gleichen Bereichs der Probe dargestellt, die nacheinander ohne (a) und mit (b) Anwendung der blauen Ausschalt-PSF aufgenommen wurden. Durch die Markierung mit asFP595 werden die Vertiefungen als helle Linien sichtbar. Vergleicht man die beiden Bilder, so kann man eine moderat höhere y-Auflösung in (b) feststellen. Der Grund für die nur mäßige Verbesserung liegt in der Tatsache, dass der unbearbeitete Bilddatensatz aus (b) Anteile der beugungsbegrenzten  $PSF_{\text{beug}}$  enthält, welche die im Bild enthaltenen feineren Elemente verschleiern. Aus diesem Grund wurde Gleichung 2.7 angewandt, mit  $\epsilon = 0.3$ , entnommen aus Abbildung 2.4 c. Das so erhaltene Bild (c) legt nun Strukturen offen, die in (b) nur schwer erkennbar sind und in (a) vollkommen fehlen. Die





**Abbildung 2.10:** Nicht beugungsbegrenzte Fluoreszenzmikroskopie mit asFP595. Mit asFP595 markierte nanofabrizierte Rillen in SiO<sub>2</sub>, aufgenommen ohne (a) und mit (b) der blauen Ausschalt-PSF. In c wurde b mit entsprechender Wichtung von a abgezogen. d stellt den durch einen Richardson-Lucy (RL) Algorithmus bearbeiteten Datensatz aus a dar, e ist das entsprechende Gegenstück basierend auf b. f zeigt das Bild aus b nach der Bearbeitung mit einem Wiener-Filter (lineare Entfaltung). g vergleicht Linienprofile an den gestrichelt markierten Stellen in den Bildern a und c, in grau beziehungsweise blau. h zeigt den analogen Vergleich für a und f; i vergleicht die Profile aus d und e. Die 35%ige Modulationstiefe der Fluoreszenzmaxima des linear entfalten Datensatzes (h) im 100nm Abstand zeigen, dass die Auflösung auf Distanzen <100nm extrapoliert werden kann. Der scharfe Abfall des Signals neben den Maxima sind das Kennzeichen eines Sättigungsprozess und von RESOLFT-Mikroskopie im Allgemeinen.

Verbesserung wird auch im Profil (g) sichtbar. Hier wird deutlich, dass durch die Anwendung der Ausschalt-PSF klar voneinander getrennte lokale Maxima des Fluoreszenzsignals in 100 nm Abstand sichtbar werden. Beleuchtet man die Probe nur mit gelbem Licht, so ist diese Information im Fluoreszenzsignal nicht enthalten. Die lokalen Maxima des Fluoreszenzsignals befinden sich an den Rändern der Vertiefungen, dazwischen ist jeweils ein lokales Minimum sichtbar. Daraus lässt sich schließen, dass in den Vertiefungen selber das Protein nicht homogen verteilt ist. Die Proteinkonzentration an den Rändern der einzelnen Vertiefungen ist durch Adsorption am Glas größer als in der Mitte der jeweiligen Vertiefung.

Deutlicher als durch die Subtraktion wird diese Bildinformation noch durch die Anwendung einer linearen Entfaltung (Wiener-Filter) hervorgehoben (Abbildung 2.10 f,h), und nochmals effizienter durch die Anwendung eines nichtlinearen iterativen Richardson-Lucy Algorithmus (Abbildung 2.10 e) [66]. Um einen angemessenen Vergleich zu gewährleisten, wurden beide unbearbeiteten Datensätze aus (a) und (b) diesem Algorithmus unterzogen. Das Ergebnis in (d) bzw. (e) bestätigt noch einmal die erreichte Auflösungserhöhung. Abbildung 2.10 i zeigt typische Linienprofile an den gestrichelten Linien in (d) und (e). Ein wichtiges Ergebnis dieser Bearbeitung ist, dass der Richardson-Lucy Algorithmus alleine

nicht in der Lage ist, die Strukturen in einem 100 nm Abstand aufzuzeigen, wohingegen der RESOLFT-Datensatz diese Strukturen mit einer Modulationstiefe von bis zu 30% klar voneinander trennt.

Um diese Ergebnisse weiter zu bestätigen wurden zwei Negativ-Kontrollexperimente durchgeführt. Zum einen wurde das asFP595 aus den Vertiefungen entfernt, und diese danach mit einer Lösung eines organischen Fluorophors gefärbt, welches ein ähnliches Emissionsspektrum wie das Protein aufweist (Atto 532, Atto-Tec GmbH, Siegen). Die Bilder, die durch Anregung bei 568 nm erhalten wurden, waren praktisch mit den beugungsbegrenzten Bildern in Abbildung 2.10 a identisch. Im zweiten Kontrollexperiment wurde die Form der Ausschalt-PSF in eine normale PSF übergeführt. Es wurde kein Auflösungsgewinn beobachtet. Alle gewonnenen Daten deuten somit darauf hin, dass die Steigerung der Auflösung zurückgeführt werden kann auf das gesättigte Schalten des asFP595 vom An- in den Auszustand.

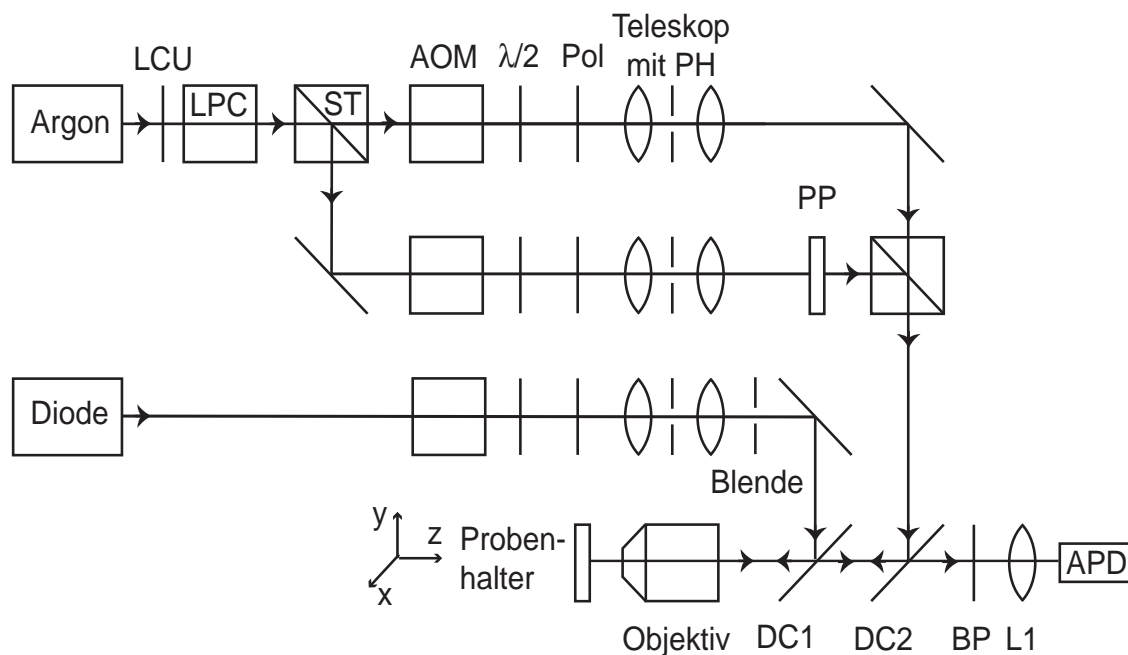
### 2.2.3 Ergebnisse der RESOLFT-Mikroskopie mit asFP595

Es konnte gezeigt werden, dass durch die Anwendung des Fluoreszenzproteins asFP in der RESOLFT-Mikroskopie eine Auflösung von 50-100 nm erreicht werden kann, und somit die Beugungsgrenze durchbrochen wurde. Trotz der experimentellen Probleme wie einer 1,5%igen Intensität im idealerweise 0%igen Minimum der Ausschalt-PSF und der unvollständigen Fluoreszenzunterdrückung mit einer Effektivität von nur 70% konnte gezeigt werden, dass neben der Ausnutzung der stimulierten Emission bei der STED-Mikroskopie, die sehr hohe Intensitäten erfordert ( $\approx \text{GW}/\text{cm}^2$ , Kapitel 1.3.2), auch die RESOLFT-Mikroskopie mit reversibel schaltbaren Fluoreszenzzuständen bei sehr niedrigen Intensitäten ( $\approx \text{W}/\text{cm}^2$ ) realisierbar ist. Zu dem wurde die RESOLFT-Mikroskopie zum ersten Mal durch den Einsatz eines fluoreszenten Proteins als Marker realisiert, wodurch im Prinzip auch die Markierung lebender Zellen zu Untersuchungszwecken in der Biologie möglich ist.

# 3 Die photoschaltbaren Proteine

## Dronpa und rsFastLime

Das Ziel ist es, schaltbare Proteine zur Markierung biologischer Zellen zu verwenden. Dies ist mit asFP595 nur eingeschränkt möglich, da es sich um ein Tetramer handelt. Durch die Größe und die vernetzenden Eigenschaften des Proteins kann die Struktur und die Funktion der Zelle stark beeinflusst werden, was natürlich im allgemeinen unerwünscht ist. Im Hinblick auf biologische Anwendungen wurde deshalb als weiteres photoschaltbares Protein Dronpa untersucht. Dronpa ist ein Monomer und wurde 2004 zum ersten Mal in einer Publikation veröffentlicht [53]. Das Chromophor sitzt wie bei asFP595 in dem so genannten „beta-barrel“ [67] und besitzt zwei Zustände, einen fluoreszierenden (*B*) und einen nicht fluoreszierenden (*A*), zwischen denen durch Licht unterschiedlicher Wellenlänge reversibel geschaltet werden kann. *A* und *B* unterscheiden sich im Gegensatz zu asFP595 stark in ihren Absorptionseigenschaften. Das Absorptionsmaximum befindet sich bei 390 nm für *A* und 503 nm für *B* mit einem isosbetschen Punkt bei 428 nm [53]. Das Maximum des Emissionsspektrums von *B* befindet sich bei 522 nm. Der fluoreszierende Zustand *B* kann mit Licht der Wellenlänge 488 nm in den Dunkelzustand *A* überführt werden. Der umgekehrte Prozess von *A* nach *B* findet spontan auf einer Zeitskala von Stunden statt [68], kann jedoch angeregt durch Licht der Wellenlänge 405 nm auf sehr viel kürzeren Zeitskalen stattfinden. Dieser Prozess ist reversibel und wurde bei Messungen an einzelnen Molekülen bis zu 100mal nacheinander beobachtet [69]. Eine für die Aufnahme von Bildern wichtige Eigenschaft ist die Geschwindigkeit dieses Schaltvorgangs im Ensemble, da ein schnelles Schalten die Aufnahmezeit pro Bild verkürzt sowie das irreversible Photobleichen, d.h. die Fluoreszenzabnahme im Ensemble über mehrere Schaltvorgänge, verringern könnte. Es wurde deshalb in unserer Arbeitsgruppe gezielt nach Mutanten von Dronpa gesucht, die eine schnellere Schaltzeit besitzen, d.h. dessen Übergangswahrscheinlichkeiten von Zustand *A* nach *B* und/oder *B* nach *A* bei gleicher Intensität des treibenden Lichts höher liegen als die von Dronpa. Durch Austausch der Aminosäure Valin, codiert an der Stelle 157 der Gensequenz von Dronpa, gegen Glycin konnte eine solche Mutante gefunden werden [70]. Auf den Austausch der Aminosäure bezieht sich die Bezeichnung der Mutante als Dronpa-V157G. In der Literatur [70] wurde dieser Mutante die Bezeichnung „rsFastLime“ verliehen (rs: reversible photoswitching, Fast: schnelleres Schalten, Lime: sichtbare Farbe des Proteins in einer hochkonzentrierten Wasserlösung im Tageslicht). Dieser Name wird auch in dieser Arbeit verwendet. Die Halbwertszeit des Ausschaltvorgangs bei gleicher Intensität von Licht der Wellenlänge 488 nm ist bei rsFastLime um den Faktor 50 kleiner als bei Dronpa, das Photobleichen ist um einen Faktor 4 reduziert [70].



**Abbildung 3.1:** Experimenteller Aufbau zu Realisierung des RESOLFT Konzepts mit den photoschaltbaren Proteinen Dronpa und rsFastLime. Für Details siehe Text.

## 3.1 Experimenteller Aufbau

Für die spektroskopischen Untersuchungen und die Aufnahme von Bildern mit Auflösungserhöhung nach dem RESOLFT Prinzip mit Dronpa und rsFastLime wurde ein experimenteller Aufbau entworfen und realisiert (Abbildung 3.1).

### 3.1.1 Optik

Für die Fluoreszenzanregung und das Ausschalten von Dronpa und rsFastLime wurde die 488 nm Linie eines luftgekühlten Argon-Lasers verwendet, für das reversible Einschalten ein Diodenlaser mit einer Wellenlänge von 405 nm (DL100, Toptica Photonics AG, München). Ein schmalbandiger Bandpass-Filter („Laser Clean Up“, LCU) trennte die 488 nm Linie des Argon-Laser von den restlichen emittierten Laserlinien. Schwankungen in der Ausgangsleistung des Argon-Lasers wurden mit einem „Laser Power Controller“ (LPC, Brockton Electro-Optics Corp., Brockton, MA, USA) ausgeglichen. Ein Strahlteilerwürfel ST spaltete den 488 nm Strahl im Verhältnis 50 zu 50. In allen 3 Strahlarmen befand sich ein akustooptischer Modulator (AOM; für 488 nm: AOTF.nC und AA.MOD.nC, für 405 nm: AA.MTS.130AA, beide: AA Optoelectronic, St Remy les Chevreuse, France) zur Leistungsregulierung sowie zum schnellen An- und Ausschalten des Strahls im  $\mu\text{s}$ -Bereich. Zur manuellen, groben Regulierung der Leistung diente eine drehbare  $\lambda/2$ -Platte mit einem nachgeschalteten Polarisator (Pol). Das Teleskop, bestehend aus 2 Linsen und einem Pinhole (PH), diente zur

Aufreinigung und Aufweitung des Strahls. Vor der Überlagerung der beiden 488 nm Strahlen durch einen weiteren 50:50 Strahlteiler wurde die Phasenplatte (PP) in einen Strahlengang zur Modulation der PSF für das Ausschalten gesetzt. Im 405 nm Strahlarm wurde eine regulierbare Blende eingesetzt, wodurch die Pupille des Objektivs unterleuchtet werden konnte, und somit die Größe der Anschlag-PSF reguliert wurde. Dadurch konnte eine möglichst homogene Leistungsverteilung für den Anschlag-Vorgang im Bereich der Abfrage-PSF erreicht werden. Die Überlagerung der beiden Farben geschah durch einen Dichroiten (DC1; 440dcxr, AHF Analystechnik AG, Tübingen). Das Objektiv fokussierte alle 3 Wellenfronten auf die Probe, die über einen piezogetriebenen Tisch (scanning table 17ANC001/MD, Melles Griot, Cambridge, England; Genauigkeit nach Herstellerangabe: 5 nm, aktive Rückkopplung) in allen drei Raumrichtungen bewegt werden konnte. Das von der Probe kommende Fluoreszenzlicht wurde durch einen weiteren Dichroiten (DC2; 495dcxr, AHF Analystechnik AG, Tübingen) und einen Bandpass (BP; HQ523/70, AHF Analystechnik AG, Tübingen) vom Laserlicht getrennt. Die Tubuslinse L1 fokussierte das Fluoreszenzlicht auf die Öffnung des Detektors (APD, avalanche photodiode; SPCM-AQR-13 FC, PerkinElmer Optoelectronics, Fremont, CA, USA), die gleichzeitig als konfokales Pinhole diente.

### 3.1.2 Elektronik

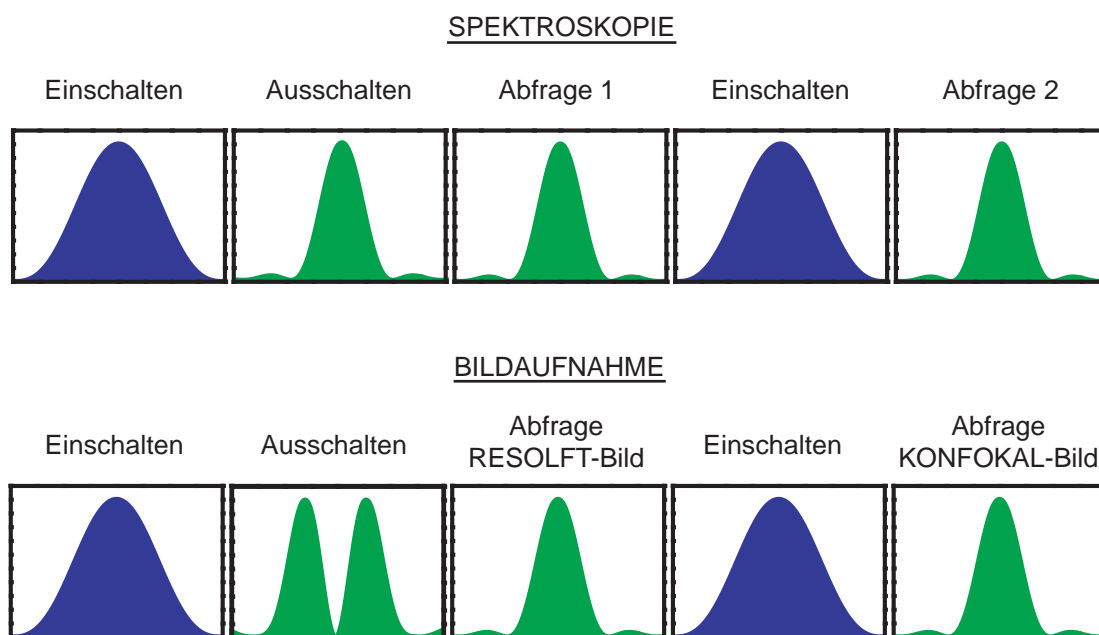
Das Signal der APD wurde über einen Multikanal-Analysator (MCD-2, FAST ComTec Communication Technology GmbH, Oberhaching; minimale Zeitauflösung: 125ns) in den Computer eingelesen. Der Start-Trigger dieses Analysators diente als globaler Trigger für das Experiment. Hierauf wurde die Steuerung des piezogetriebenen Probehalters und die Abfolge der Lichtpulse synchronisiert. Der Piezotisch wurde durch eine Digital/Analog Wandlerkarte (PCI-6733, National Instruments Corporation, Austin, TX, USA) angesteuert. Diese lieferte auch die Analogspannungen, mit deren Hilfe die Leistungen, die durch die AOM transmittiert wurden, geregelt werden konnten. Die Pulsabfolge wurde durch einen Pulsgenerator (Model 9514 Pulse Generator, Quantum Composers, Bozeman, MT, USA) gesteuert, der zeitlich variable TTL-Pulse erzeugte. Hierdurch wurde eine in Eigenbau hergestellte Schaltung angesteuert, die bei TTL-high die Spannung der Digital/Analog Wandlerkarte zur Leistungsregulierung an den AOM durchschaltete, ansonsten diese aber blockierte, d.h. den AOM blockte.

## 3.2 Dronpa

Ein grundsätzlicher Unterschied von Dronpa gegenüber asFP595 ist das unterschiedliche Übersprechverhalten der zum Ein- und Ausschalten sowie zur Anregung der Fluoreszenz verwendeten Wellenlängen. Bei asFP595 wird durch die Einschaltwellenlänge von 568 nm auch gleichzeitig die Fluoreszenzemission effizient angeregt. Bei der Ausschaltwellenlänge von 458 nm findet hingegen kaum Fluoreszenzanregung statt. Die Abfrage-PSF mit ihrem lateralem Maximum bei  $y=0$  (Abbildung 2.9 a) kann somit auch zur Fluoreszenzanregung genutzt werden. Die Ausschalt-PSF mit ihrer Nullstelle bei  $y=0$  schaltet bei gleichzeitiger An-

wendung die Fluoreszenz wie gewünscht nur in den Randbereichen der Einschalt-PSF aus. Anders verhält sich dies bei Dronpa. Hier regt die Ausschaltwellenlänge von 488 nm auch gleichzeitig effektiv die Fluoreszenz an, wo hingegen die Einschaltwellenlänge im Vergleich dazu nur sehr ineffektiv die Fluoreszenz anregt. Dadurch kann die Fluoreszenz nicht mit der Einschalt-PSF bei 405 nm abgefragt werden. Die Ausschalt-PSF mit ihren zwei Maxima neben  $x=0$  regt wiederum die Fluoreszenz effektiv in den Randbereichen der Einschalt-PSF an, wodurch die effektive Unterdrückung der Fluoreszenz in den Randbereichen gegenüber der Mitte der Einschalt-PSF bei gleichzeitiger Anwendung beider PSFs nicht möglich ist. Dieses Problem kann umgangen werden, in dem man das Einschalten, das Ausschalten und die Fluoreszenzanregung zeitlich entkoppelt. Zudem wurden zur Abfrage und zur Anregung der Fluoreszenz unterschiedliche PSFs benutzt. Die zeitliche Abfolge der PSFs ist in Abbildung 3.2 dargestellt. Im weiteren soll dieses Verfahren als Anregungs-Abfrage Methode bezeichnet werden. Zunächst wurde Dronpa in einem möglichst homogenen, breiten Bereich eingeschaltet (405 nm). Danach erfolgte das Ausschalten (488 nm). Bei spektroskopischen Messungen wurde bei diesem Ausschalten eine „normale“ PSF angewandt, wie sie durch eine möglichst homogene, phasengleiche Ausleuchtung der Objektivpupille entsteht. Bei der Bildaufnahme im RESOLFT Modus wurde diese PSF durch eine geeignete Phasenverteilung in der Objektivpupille so geformt, dass durch destruktive Interferenz eine Nullstelle der Intensität in der Mitte der PSF des 488 nm Ausschalt-Lichts entsteht, so dass dort nichts ausgeschaltet wird. Nach diesem Ausschalten folgte eine Abfrage mit Fluoreszenzanregungslicht (488 nm) mit einer normalen PSF. Die zeitliche Länge der Abfrage durch 488 nm ist durch das gleichzeitige Ausschalten begrenzt, im Fall der RESOLFT-Bildaufnahme wird durch das Ausschalten der Fluoreszenz in der Mitte der Abfrage-PSF der durch die Ausschalt-PSF bedingte Unterschied zur Stärke des Fluoreszenzsignals am Rand der Abfrage-PSF mit der Abfragezeit kleiner, was wiederum die Auflösung verkleinert. Es muss deshalb ein Kompromiss zwischen Signalthöhe (bedingt durch Ausschaltzeit und -intensität) und Abfall des Fluoreszenzsignals während der Abfragezeit gefunden werden. Nach der 1. Abfrage wurde Dronpa wieder durch eine breite Einschalt-PSF (405 nm) möglichst homogen aktiviert. Zum Schluss erfolgte zum Vergleich noch eine Abfrage (488 nm) zur Erfassung des konfokalen Referenzbildes.

Zunächst wurde die Effizienz des Pumpen von Dronpa in den Dunkelzustand bei verschiedenen 488 nm-Intensitäten untersucht. Dronpa wurde dazu in einer PVA-Schicht auf einem Mikroskopiedeckglas immobilisiert (Kapitel A.3.2). Ein exemplarisches zeitaufgelöstes Fluoreszenzsignal ist in Abbildung 3.3 a und b zu sehen. Zunächst wurde durch blaues Licht (405 nm,  $400 \text{ W/cm}^2$ , 20 ms) Dronpa eingeschaltet. Die durch blaues Licht angeregte Fluoreszenz ist auf der Skala von 3.3a nicht zu erkennen. Danach erfolgt das Ausschalten durch grünes Licht (488 nm,  $2,7 \text{ kW/cm}^2$ , 100 ms). Durch die gleichzeitige effektive Anregung der Fluoreszenz ist der Ausschaltvorgang sehr gut zu beobachten. Die durch die weiteren Pulse angeregte Fluoreszenz ist nur sehr schwach, weshalb dieser Abschnitt in 3.3b vergrößert dargestellt ist. Der erste Puls (Abfrage, 488 nm,  $80 \text{ W/cm}^2$ , 5 ms) dient der Abfrage der verbleibenden Fluoreszenz am Ende des Ausschaltimpulses. Die Abfragezeit und -leistung wurden so klein gewählt, dass innerhalb der Messgenauigkeit kein Ausschalten während der Abfrage erkennbar ist. Es folgten nun nacheinander ein weiterer Einschalt- (405 nm,  $400 \text{ W/cm}^2$ )



**Abbildung 3.2:** Typische zeitliche Folge der PSFs bei Spektroskopie-Messungen und zum direkten Vergleich der RESOLFT-Bildaufnahme mit der konfokalen Bildaufnahme.

und Abfragepuls (488 nm, 80 W/cm<sup>2</sup>), um das Referenzsignal des eingeschalteten Zustandes zu erhalten. Die Aufnahme des Referenzsignals erfolgt erst nach dem Ausschalten, da während dieser hohen Intensität auch der Hauptteil des irreversiblen Photobleichens über einen gesamten Anregungs-Abfrage Zyklus stattfindet. Zur Bestimmung der Effizienz des Ausschaltens (mit Korrektur des irreversiblen Photobleichens) wurde das relative Verhältnis des Signals durch Abfrage 1 im Vergleich zum Signal durch Abfrage 2 herangezogen. Da das Fluoreszenzsignal durch die begrenzte Intensität und Dauer der Abfragepulse sehr niedrig ist, wurden in Abbildung 3.3 a und b 30 Anregungs-Abfrage Zyklen aufaddiert, um ein befriedigendes Signal-zu-Rausch Verhältnis zu erreichen. Durch das anfängliche Einschalten bei jedem Zyklus wurde sichergestellt, dass das reversible Ausschalten durch die Abfrage 2 wieder invertiert wurde.

Für die Darstellung der Effizienz des Ausschaltens bei verschiedenen Leistungen wurde das Signal über die einzelnen Abfragepulse zeitlich summiert und der Quotient aus Abfragepuls 1 zu Abfragepuls 2 gebildet. Die erhaltene Kurve des Quotienten über der Ausschaltleistung (Abbildung 3.3 c) wird als Sättigungskurve bezeichnet, da die Fluoreszenz zur Ausschaltintensität stark nichtlinear ist und das Ausschalten bei hohen Leistungen gesättigt wird, d.h. im Idealfall auf Null absinkt und auch für ein weiteres Ansteigen der Ausschaltintensität diesen Wert beibehält (Kapitel 1.3.1). Zur Charakterisierung der Sättigungskurve definiert man die Sättigungsintensität  $I_S$ , bei der für die Fluoreszenz  $F(I_S)$  gilt:  $F(I_S) = [F(0) + F_{\min}]/2$ , wobei das Minimum der Sättigungskurve  $F_{\min}$  nicht notwendigerweise Null sein muss, wie im Fall von asFP595 dargestellt (Kapitel 2.1.2). Da die erreichte Unterdrückung der Fluoreszenz am Ende des Ausschaltimpulses nicht nur von dessen Inten-

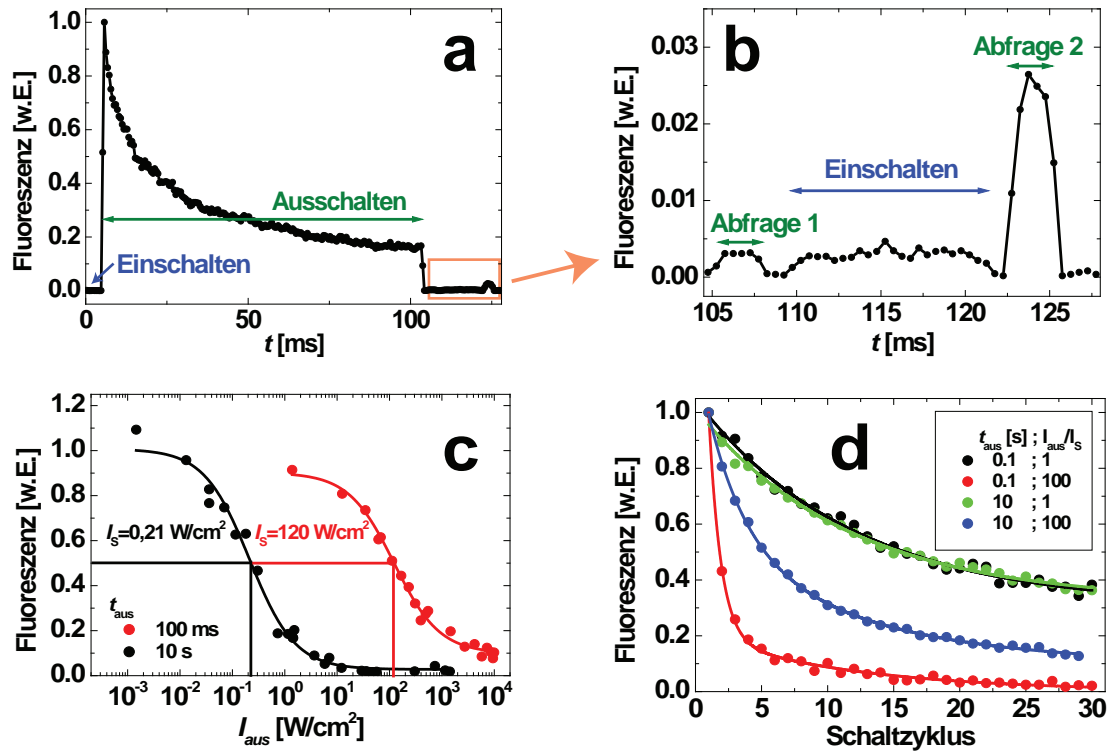
sität  $I_{\text{aus}}$  sondern auch von der Ausschaltdauer  $t_{\text{aus}}$  abhängt, ergibt sich für eine längere Ausschaltdauer von  $t_{\text{aus}} = 10 \text{ s}$  eine Verschiebung der Sättigungskurve zu niedrigeren Leistungen (Abbildung 3.3) c. Die erreichbare Auflösung mit einem RESOLFT-Mikroskop ist abhängig von der jeweiligen Sättigungsintensität des verwendeten schaltbaren Farbstoffes, da für die Auflösung  $\Delta x$  in Fall von Dronpa näherungsweise gilt (Gleichung 1.8):

$$\Delta x \cong \frac{\lambda}{2n \sin \alpha \sqrt{1 + \epsilon}} \quad (3.1)$$

mit  $\epsilon = I_{\text{aus}}/I_S$ ,  $\lambda = 488 \text{ nm}$ , dem Brechungsindex  $n$  des Immersionsmediums, dem Aperturwinkel  $\alpha$  und der Intensität  $I_{\text{aus}}$  des Ausschaltimpulses. Die Auflösung kann bei Dronpa nicht nur durch Erhöhen der Intensität  $I_{\text{aus}}$  gesteigert werden, die technisch durch die maximale Laserleistung begrenzt ist, sondern auch durch Verkleinern der Sättigungsintensität  $I_S$  bei verlängerter Ausschaltzeit  $t_{\text{aus}}$ . Zum Beispiel musste die Aufnahme der Sättigungskurve für  $t_{\text{aus}} = 100 \text{ ms}$  bei einer maximalen Leistung von  $I_{\text{aus}}^{\text{max}} = 10000 \text{ W/cm}^2$  abgebrochen werden (3.3c), da die maximal verfügbare Leistung der Aperatur in diesem Fall erreicht war. Der maximale Sättigungsfaktor  $\epsilon_{\text{max}}$  liegt bei  $\epsilon_{\text{max}} = I_{\text{aus}}^{\text{max}}/I_S = 83$ , wohingegen bei  $t_{\text{aus}} = 10 \text{ s}$  und  $I_{\text{aus}}^{\text{max}} = 10000 \text{ W/cm}^2$  ein Sättigungsfaktor von  $\epsilon = 47600$  erreicht werden kann (3.3c). Dies entspricht nach Gleichung 3.1 einer theoretischen Auflösung von  $\Delta x \approx 10 \text{ nm}$  bei  $t_{\text{aus}} = 100 \text{ ms}$  und einer Auflösung von  $\Delta x \approx 1 \text{ nm}$  bei  $t_{\text{aus}} = 10 \text{ s}$  (Öl-Objektiv wie in dieser Arbeit verwendet,  $n = 1,51$ ,  $\alpha = 68^\circ$ ,  $\lambda = 488 \text{ nm}$ ). Ein weiterer Vorteil einer niedrigeren Ausschaltintensität liegt vor, falls das irreversible Photobleichen nicht-linear von der Ausschaltintensität abhängt (Kapitel 2.1.5), da die hohe Intensität beim Ausschaltvorgang den Hauptteil zum irreversiblen Bleichen während eines Anregungs-Abfrage Zyklus beiträgt. Falls man die Photonenzahl pro Ausschaltimpuls wie bei den Sättigungskurven in Abbildung 3.3 c beibehält ( $I_{\text{aus}} \cdot t_{\text{aus}} = \text{const}$ ), dafür aber eine längere Ausschaltzeit wählt, erhält man im Falle von nichtlinearem Photobleichen bei kleineren Leistungen nach Gl.3.1 die gleiche Auflösung, da die Sättigungsintensität  $I_S$  kleiner wird. Als Nachteil muss man dabei jedoch eine längere Aufnahmezeit pro Bild in Kauf nehmen, da die Zeit pro Pixel, die direkt mit der Zeit pro Anregungs-Abfrage Zyklus korreliert ist, größer wird.

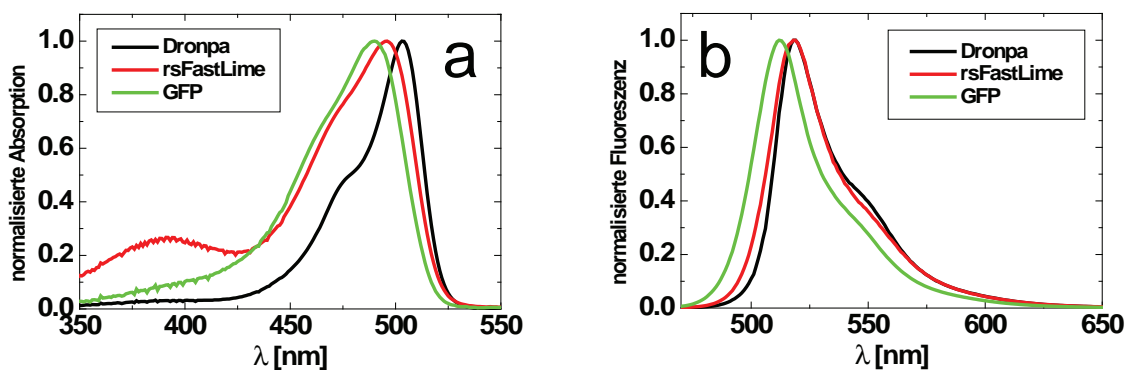
Es soll nun auf das irreversible Photobleichen von Dronpa näher eingegangen werden. Trägt man das Signal des zweiten Abfragepuls über aufeinander folgende Anregungs-Abfrage Zyklen auf, erhält man die in Abbildung 3.3 d zu sehenden Kurven bei den zwei verschiedenen Ausschaltzeiten, die auch zur Ermittlung der Sättigungskurven in Abbildung 3.3 c verwendet wurden. Bei einer Ausschaltintensität von  $I_{\text{aus}} = I_S$  ist das irreversible Photobleichen noch moderat, nach ca. 15 Schaltzyklen ist die Fluoreszenz auf die Hälfte abgesunken. Geht man jedoch zu höheren Intensitäten, in diesem Fall zu  $I_{\text{aus}} = 100 \cdot I_S$ , nimmt das irreversible Bleichen erheblich zu. Eine Intensität  $I_{\text{aus}} = 100 \cdot I_S$  würde nach Gleichung 3.1 bei der RESOLFT-Mikroskopie einer Auflösungserhöhung um den Faktor 10 entsprechen. Jedoch nimmt auch das Photobleichen pro Zyklus bei dieser Intensität erheblich zu, bereits nach einem Zyklus ist bei  $t_{\text{aus}} = 0,1 \text{ s}$  die Fluoreszenz bereits auf die Hälfte abgefallen. Dies lässt den Einsatz von Dronpa in der RESOLFT-Mikroskopie bei Schaltzeiten  $t_{\text{aus}} = 100 \text{ ms}$  als unmöglich erscheinen. Für größere  $t_{\text{aus}}$  wird das irreversible Photobleichen geringer, bei  $t_{\text{aus}} = 10 \text{ s}$  ist die Fluoreszenz erst nach 7 Zyklen bei  $I_{\text{aus}} = 100 \cdot I_S$  auf





**Abbildung 3.3:** a) Zeitaufgelöstes Fluoreszenzsignal, gemittelt über 30 Anregungs-Abfrage Zyklen, normiert auf das Maximum zu Beginn des Ausschaltimpulses. b) Vergrößerte Darstellung von a) ab erstem Abfragepuls. c) Sättigungskurven für eine Ausschaltzeit  $t_{\text{aus}} = 100 \text{ ms}$  wie in a) sowie einer um 100fach längeren Ausschaltzeit von  $t_{\text{aus}} = 10 \text{ s}$ . Neben der Ausschaltdauer wurde auch die Länge der restlichen Anregungs-Abfrage Pulse (Einschalten und Abfrage) mit dem gleichen Faktor 100 gegenüber  $t_{\text{aus}} = 100 \text{ ms}$  skaliert. Die Intensitäten wurden dabei so skaliert, dass die Photonenzahl pro Puls konstant blieb ( $I_{\text{aus}} \cdot t_{\text{aus}} = \text{const}$ ). Die Striche geben die jeweilige Sättigungsintensität  $I_S$  an. d) Abnahme der Fluoreszenz während des 2. Abfragepulses (Abfrage 2) über aufeinander folgende Anregungs-Abfrage Zyklen zur Charakterisierung des irreversiblen Photobleichens bei 2 verschiedenen Abfragedauern und jeweils zwei verschiedenen Sättigungsfaktoren  $\epsilon = I_{\text{aus}}/I_S$ .

die Hälfte abgesunken, d.h. die Wahrscheinlichkeit für irreversibles Photobleichen nimmt mit abnehmender Intensität ab. Jedoch müsste man hierdurch wiederum eine sehr lange Aufnahmezeit pro Bildpunkt in Kauf nehmen. Die Anzahl der Zyklen, die man pro Bildpunkt durchlaufen kann, um somit ein akzeptierbares Signal-zu-Rausch Verhältnis zu erreichen, ist also durch das irreversible Photobleichen begrenzt. Eine weitere Optimierung des Signal-zu-Rausch Verhältnis kann durch die Verlängerung der Abfragezeit und/oder Erhöhung der Abfrageintensität erreicht werden, so dass man ein möglichst großes Signal bei noch akzeptierbarem Ausschalten der Fluoreszenz erhält. Diese Optimierung wurde jedoch für Dronpa nicht mehr durchgeführt, da während dieser experimentellen Phase bereits bei einer gezielten Suche nach optimierten Mutanten von Dronpa die Mutante rsFastLime gefunden wurde, die bessere Schalt- und Bleicheigenschaften als Dronpa besitzt [70]. Diese Mutante rsFastLime wird in den weiteren Kapiteln näher beschrieben werden, wobei zunächst auf die für die



**Abbildung 3.4:** Absorptions- (a) und Emissionsspektren (b) von Dronpa, rsFastLime und GFP im neutralen pH-Bereich, normiert auf das jeweilige Maximum. Anregungswellenlänge für Emissionsspektrum: 488 nm.

RESOLFT-Mikroskopie verbesserten Eigenschaften gegenüber Dronpa eingegangen wird.

### 3.3 rsFastLime

Da die RESOLFT-Mikroskopie grundsätzlich eine Weiterentwicklung bereits bekannter Fluoreszenzmikroskope ist, bei der die Verbesserung der Auflösung auf photophysikalischen Effekten beruht, die durch die Photophysik des Farbstoffes vorgegeben sind, kann eine Optimierung hauptsächlich nur durch eine optimale Ausnutzung dieser Effekte und eine gezielte Auswahl des eingesetzten Farbstoffes stattfinden. Bei der Verwendung von fluoreszierenden Proteinen ist man in der Lage, durch Mutationen eine gezielte Optimierung des Proteins im Hinblick auf die Verwendung als Farbstoff in der RESOLFT-Mikroskopie durchzuführen. Dies wurde in unserer Arbeitsgruppe erfolgreich durch Mutagenese an Dronpa und der daraus resultierenden Mutante rsFastLime durchgeführt (Stiel et.al. [70]). Stiel et.al. haben bereits gezeigt, dass rsFastLime unter Bestrahlung mit Licht niedriger Intensität ( $<1 \text{ W/cm}^2$ ), Quecksilberdampfampe) um ca. den Faktor 50 schneller ausschaltet als Dronpa (bezogen auf die Halbwertszeit des Ausschaltvorgangs), wohingegen die Geschwindigkeit des Einschaltens nahezu unverändert ist. Diese Messungen wurden an Kolonien von *Escherichia coli* vorgenommen, die das jeweilige Protein exprimierten. Die Schaltgeschwindigkeit für einen Ausschaltvorgang reduzierte sich dabei von 30 min bei Dronpa auf 30 s bei rsFastLime. Durch die schnellere Ausschaltgeschwindigkeit ist eine schnellere Bildaufnahme als bei der Verwendung des Wildtyps von Dronpa als Fluoreszenzmarker in der RESOLFT-Mikroskopie möglich. Zudem haben Stiel et.al. eine Reduzierung des irreversiblen Photobleichens beobachtet. Bei Dronpa nimmt die Fluoreszenz nach ca. 20 Schaltzyklen auf die Hälfte ab, bei rsFastLime dauert dies ca. 75 Schaltzyklen. Bei Anwendung dieses Kriteriums ist das irreversible Photobleichen also um den Faktor 4 bei niedrigen Intensitäten ( $<1 \text{ W/cm}^2$ ) reduziert. Das reduzierte irreversible Photobleichen und die schnellere Ausschaltgeschwindigkeit machen rsFastLime als Fluoreszenzmarker in der RESOLFT-Mikroskopie gegenüber Dronpa wesentlich interessanter.

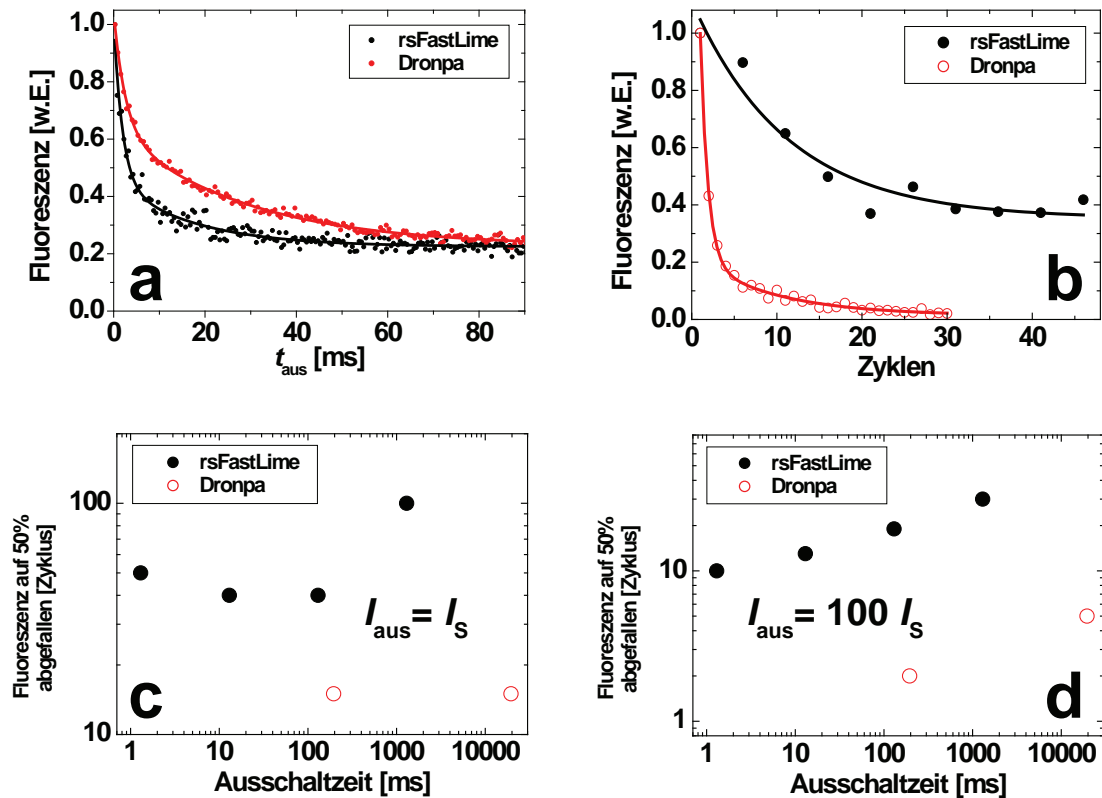
	$\epsilon$ [L mol <sup>-1</sup> cm <sup>-1</sup> ]	$\sigma$ [10 <sup>-16</sup> cm <sup>2</sup> ]	$\Phi$	$\lambda_{\max}^{\text{Abs}}$ [nm]	$\lambda_{\max}^{\text{Emi}}$ [nm]
Dronpa	58000	2,23	0,85	503	522
rsFastLime	36000	1,40	0,78	496	518
GFP	71000	2,74	0,79	490	512

**Tabelle 3.1:** Extinktionskoeffizient  $\epsilon$ , Photonenwirkungsquerschnitt  $\sigma$  (jeweils bei 488 nm), Fluoreszenzquantenausbeute  $\Phi$  sowie die Wellenlänge beim Maximum der Absorption und Emission von Dronpa, rsFastLime und GFP im Vergleich.

Zunächst sollen nun einige allgemeine spektrale Eigenschaften von rsFastLime mit Dronpa und GFP verglichen werden. GFP wurde als Vergleichsprotein herangezogen, da die Struktur und der Chromophor von GFP Ähnlichkeiten zu Dronpa und rsFastLime zeigen und GFP als Fluoreszenzmarker in der Biologie eine herausgehobene Rolle spielt [17]. In Abbildung 3.4 sind zum Vergleich die Absorptions- sowie Emissionsspektren von Dronpa, rsFastLime und GFP im neutralen pH-Bereich zu sehen. Die aus den Spektren berechneten Extinktionskoeffizienten  $\epsilon$ , Absorptionswirkungsquerschnitte  $\sigma$  bei 488 nm und Fluoreszenzquantenausbeuten  $\Phi$  sowie das Maximum der Absorption und Emission sind in Tabelle 3.1 zusammengefasst. Um Konzentrationsunterschiede in den eingesetzten Lösungen bei der Auswertung zu berücksichtigen wurden die Absorptions- und Emissionsspektren auf ein Maximum des Absorptionsspektrums bei 280 nm, also auf gleiche Konzentration, normiert. Bei 280 nm liegt ein typisches Absorptionsmaximum von Doppelbindungen im so genannten „backbone“ von Proteinen und von aromatischen Gruppen in manchen Aminosäuren. Die Emissionsspektren wurden zusätzlich auf den Extinktionskoeffizienten normiert. Als Referenzwert für  $\epsilon$  und  $\Phi$  wurden die Werte für Dronpa aus [53] verwendet.

Der Extinktionskoeffizient  $\epsilon$  von Dronpa und rsFastLime ist gegenüber dem Extinktionskoeffizienten von GFP zwar kleiner, die Quantenausbeute  $\Phi$  ist jedoch ähnlich hoch. Auch das Maximum der Absorption und Emission liegt bei allen drei Proteinen im selben Wellenlängenbereich. Dronpa und rsFastLime zeigen somit den Charakter eines GFP-ähnlichen Fluoreszenzmarkers für die RESOLFT-Mikroskopie.

Im weiteren sollen die Vorteile von rsFastLime gegenüber Dronpa bei der Verwendung als Fluoreszenzmarker in der RESOLFT Mikroskopie an Hand von Messungen belegt werden. Zunächst sollen die Ausschaltgeschwindigkeiten verglichen werden. In Abbildung 3.5 ist der zeitliche Abfall der Fluoreszenz  $F$  auf Grund des Ausschaltens bei Bestrahlung mit Licht der Wellenlänge 488 nm und einer Leistung von 10  $\mu\text{W}$  zu sehen. An die Daten (Punkte) wurde die folgende biexponentielle Funktion angepasst:  $F = A_1 \exp(t_{\text{aus}}/t_1) + A_2 \exp(t_{\text{aus}}/t_2) + c$  mit den freien Fitparametern  $A_1$ ,  $A_2$ ,  $t_1$ ,  $t_2$  und  $c$ . Zum groben Vergleich der Ausschaltgeschwindigkeit dienen die beiden Parameter  $t_1$  und  $t_2$ . Bei rsFastLime ergibt der Fit  $t_1 = 1,9$  ms und  $t_2 = 17$  ms, bei Dronpa  $t_1 = 2,6$  ms und  $t_2 = 29$  ms. Nach diesem Vergleich schaltet rsFastLime um einen Faktor von ca. 1,5 schneller aus als Dronpa. Dieses Ergebnis weicht sehr stark von den zuvor beschriebenen Ergebnis von Stiel et.al ab, die ein 50fach schnelleres Ausschalten von rsFastLime gegenüber Dronpa beobachteten. Grund hierfür könnten die unterschiedlichen experimentellen Bedingungen sein, wie beispielsweise die unterschiedliche Art der Proben. Bei Stiel et.al. wurde das Protein in *Escherichia coli* un-



**Abbildung 3.5:** a) Vergleich der Ausschaltgeschwindigkeit von rsFastLime und Dronpa in PVA bei einer Leistung von  $P_{\text{aus}} = 10 \mu\text{W}$  (zur Umrechnung der Leistung in Intensität: siehe Kapitel A.2) und einer Wellenlänge des Ausschaltlichts von  $\lambda = 488 \text{ nm}$ . Die Linien stellen einen biexponentiellen Fit an die Daten dar. b-d) Vergleich des irreversiblen Photobleichens von rsFastLime und Dronpa. b) Fluoreszenz summiert über die Dauer des 2. Abfragepuls aufgetragen über aufeinander folgender Anregungs-Abfrage Zyklen. Die Ausschaltdauer betrug 130 ms bei Dronpa und 195 ms bei rsFastLime. Der Sättigungsfaktor  $\epsilon = I_{\text{aus}}/I_s$  betrug  $\epsilon = 100$ . c-d) Anzahl der Zyklen bis zur Abnahme der Fluoreszenz auf 50% des Anfangswerts. Die Ausschaltzeit gibt die Länge des Ausschaltpulses während eines Zyklus an. Die Ausschaltintensität war gleich der Sättigungsintensität bei der jeweiligen Ausschaltdauer (c) bzw. betrug das 100fache der Sättigungsintensität (d).

tersucht, bei den Messungen zu dieser Arbeit wurde das aufgereinigte Protein in PVA auf ein Mikroskopiedeckglas mit Hilfe der Rotationsbeschichtung aufgebracht (Kapitel A.3.2). Des weiteren sind die Intensitäten, die bei den Messungen zu dieser Arbeit verwendet wurden, um zwei bis drei Größenordnungen höher als bei den Messungen von Stiel et.al. Dies könnte bedeuten, dass je nach Einbettmedium oder angewandter Intensität der Vorteil des schnelleren Ausschaltens von rsFastLime unterschiedlich ausgeprägt ist. Auch eine komplexere Photophysik mit weiteren Dunkelzuständen könnte für die Diskrepanz dieser Messergebnisse verantwortlich sein [71]. Dennoch bleibt der Vorteil bestehen, dass rsFastLime bei den hier gezeigten Messungen um einen Faktor von ca. 1,5 schneller ausschaltet als Dronpa.

Ein weiterer Vorteil von rsFastLime, den Stiel et.al. angeben, ist das gegenüber Dronpa reduzierte irreversible Photobleichen über mehrere Schaltzyklen. Bei ihren Messungen ergab sich ein um den Faktor 4 reduziertes irreversible Photobleichen, allerdings wurden die

Messungen bei sehr geringen Intensitäten ( $<1 \text{ W/cm}^2$ ) durchgeführt. Hier soll nun das irreversible Photobleichen unter experimentellen Bedingungen untersucht werden, die näher an den Bedingungen liegen, wie sie auch bei der RESOLFT-Bildaufnahme in dieser Arbeit vorlagen, d.h. insbesondere bei sehr viel höheren Intensitäten ( $>100 \text{ W/cm}^2$ ). Jedoch ist es hier sinnvoller, nicht absolute Intensitäten anzugeben, sondern die Intensität  $I_{\text{aus}}$  auf die so genannte Sättigungsintensität  $I_S$  zu beziehen. Die Sättigungsintensität ist die Intensität  $I_{\text{aus}}$  bei der die Fluoreszenzunterdrückung 50% der maximalen Unterdrückung beträgt und geht in die theoretische Auflösung der RESOLFT-Mikroskopie ein (Gleichung 3.1). Da die Sättigungsintensitäten von Dronpa (Abbildung 3.3) und rsFastLime (Kapitel 3.4.1) bei gleicher Ausschaltzeit unterschiedlich sind, muss man das irreversible Photobleichen unter RESOLFT-Bedingungen bei dem gleichem Sättigungsfaktor  $\epsilon = I_{\text{aus}}/I_S$  bei beiden Proteinen angeben. Da zudem die Sättigungsintensität noch von der Ausschaltdauer abhängt, wurde das irreversible Photobleichen zudem bei unterschiedlichen Ausschalt Dauern untersucht. In Abbildung 3.5 b ist das Fluoreszenzsignal des 2. Abfragepuls über der Zahl aufeinander folgender Anregungs-Abfrage Zyklen dargestellt. Der Sättigungsfaktor  $\epsilon$  betrug 100, was nach Gleichung 3.1 einer theoretischen Auflösungserhöhung in der RESOLFT-Mikroskopie um den Faktor 10 entspricht. Um das irreversible Photobleichen quantitativ zu vergleichen kann man die Anzahl der Zyklen betrachten, nach denen das Fluoreszenzsignal auf 50% des anfänglichen Fluoreszenzsignals abgesunken ist (Abbildung 3.5). Bei Dronpa ist dies bereits beim 2. Zyklus der Fall (vergleiche auch Abbildung 3.3 d), bei rsFastLime erst beim 15. Zyklus. Dieser quantitative Vergleich wurde nun bei Ausschalt Dauern von 1,3 ms bis 195 s durchgeführt, jeweils für  $I_{\text{aus}} = I_S$  und  $I_{\text{aus}} = 100I_S$ . Bei  $I_{\text{aus}} = I_S$  ist die theoretische Auflösungserhöhung nach Gleichung 3.1 mit einem Faktor von ca. 1,5 noch sehr moderat, bei  $I_{\text{aus}} = 100I_S$  ist die theoretische Auflösung eines RESOLFT-Mikroskops bereits um den Faktor 10 besser als die Auflösung eines vergleichbaren beugungsbegrenzten Mikroskops. In Abbildung 3.5 c und d wurde nun das irreversible Photobleichen für diese beiden Sättigungsfaktoren charakterisiert. Nach diesem Kriterium ist das irreversible Photobleichen bei rsFastLime gegenüber Dronpa bei einem Sättigungsfaktor  $\epsilon = 1$  beziehungsweise 100 um einen Faktor von ca. 3 beziehungsweise ca. 10 reduziert.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass der entscheidende Vorteil von rsFastLime gegenüber Dronpa beim Einsatz als Fluoreszenzmarker in der RESOLFT-Mikroskopie also das bis zu einem Faktor von 10 reduzierte irreversible Photobleichen ist. Da durch das gleichzeitige Ausschalten während der Abfrage die Dauer und die Intensität des Abfragepulses begrenzt ist, bietet das reduzierte irreversible Photobleichen einen entscheidenden Vorteil. Hierdurch kann die Anzahl der Zyklen, die pro Rasterpunkt in der Bildaufnahme durchlaufen werden können, um einen Faktor 10 gegenüber Dronpa bei gleichem irreversiblen Photobleichen erhöht werden. Dies führt zu einem wesentlich besserem Signal-zu-Rausch Verhältnis, da die Quanteneffizienz und der Extinktionskoeffizient (Tabelle 3.1) bei rsFastLime im Vergleich dazu nur unwesentlich schlechter sind als bei Dronpa.

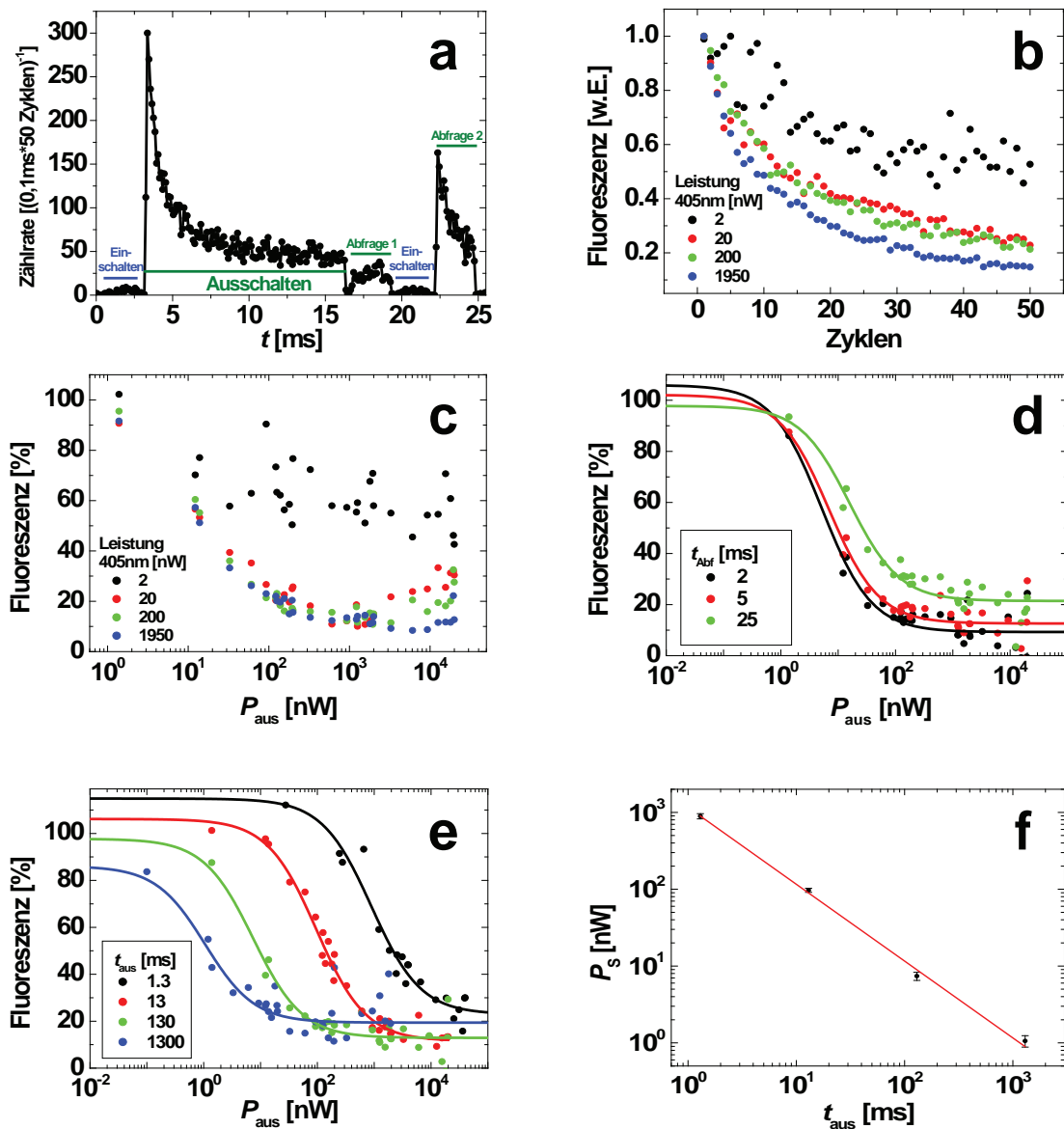
## 3.4 Spektroskopie rsFastLime

In diesem Abschnitt soll zunächst die Unterdrückung der Fluoreszenz von rsFastLime näher charakterisiert und im Hinblick auf die Anwendung in der RESOLFT-Mikroskopie optimiert werden. Dies geschieht durch Optimierung der Unterdrückung und Minimierung des auftretenden irreversiblen Photobleichens. Es wird dabei ein Anregungs- Abfrage Schema verwendet, wie es bereits in Kapitel 3.2 für Dronpa dargestellt wurde. Im weiteren Verlauf soll die Photophysik von rsFastLime untersucht werden. Zur theoretischen Beschreibung der am Schaltprozess beteiligten Zustände und Übergangsraten wird ein zu [69, 72] ähnliches Modell verwendet und durch Experimente und Simulationen belegt. Insbesondere soll dabei das Auftreten von zwei Dunkelzuständen untersucht werden, besonders im Hinblick darauf, inwieweit das Auftreten von mehreren Dunkelzuständen die Anwendung dieses Farbstoffes in der RESOLFT-Mikroskopie beeinflusst im Vergleich zu der einfachen Annahme, dass nur ein Dunkelzustand beteiligt ist, wie es in der Darstellung des Grundprinzips der RESOLFT-Mikroskopie dargestellt wurde (Kapitel 1.3.1).

### 3.4.1 Fluoreszenzunterdrückung: Charakterisierung und Optimierung

Die Charakterisierung und Optimierung der reversiblen Fluoreszenzunterdrückung eines Farbstoffes ist die Grundlage einer optimalen Bildaufnahme mit der RESOLFT-Mikroskopie. Mit rsFastLime wird der zu dem Zeitpunkt des Anfertigen dieser Arbeit beste Farbstoff aus der Familie der Dronpa-Varianten verwendet, wie in Kapitel 3.3 bereits dargestellt. rsFastLime wurde mit Glutaraldehyd auf einem silanisierten Deckglas immobilisiert (Kapitel A.3.3). Zur Charakterisierung der Fluoreszenzunterdrückung wurde eine Abfolge der Lichtpulse wie bereits für Dronpa verwendet (Anregungs-Abfrage Zyklus, Kapitel 3.2, Abbildung 3.6 a). Zunächst wird rsFastLime mit einem blauem Lichtpuls ( $\lambda = 405 \text{ nm}$ ) eingeschaltet, danach mit einem grünem Lichtpuls ausgeschaltet ( $\lambda = 488 \text{ nm}$ ), dessen Intensität variiert werden kann, um die Effizienz des Ausschaltens für verschiedene Intensitäten zu bestimmen. Es folgt die erste Abfrage der Fluoreszenz durch einen Lichtpuls (488 nm) niedriger Intensität, um den gleichzeitigen Effekt des Ausschaltens möglichst gering zu halten. Nun wird rsFastLime wieder durch blaues Licht (405 nm) eingeschaltet, um danach das Referenzniveau der Fluoreszenz im eingeschalteten Zustand zu bestimmen, was durch einen 2. Abfragepuls, identisch zum 1. Abfragepuls, erfolgt. Ein weiterer Zyklus kann nun erfolgen, in dem zunächst wieder blaues Licht (405 nm) eingestrahlt wird, um rsFastLime wieder auf ein als „Eingeschalten“ definiertes Referenzniveau der Fluoreszenz zu bringen, da während der 2. Abfrage auch ein möglicherweise nicht zu vernachlässigendes Ausschalten stattfinden kann.

Zunächst soll nun auf die Charakterisierung und die Optimierung des irreversiblen Photobleichens eingegangen werden. Jeder Puls kann dabei zum irreversiblen Photobleichen während eines Anregungs-Abfrage Zyklus beitragen. Die Veränderung des irreversiblen Bleichens bei unterschiedlichen Intensitäten des Ausschaltimpulses, d.h. unterschiedlichen Sät-



**Abbildung 3.6:** Messungen zur Optimierung von rsFastLime für RESOLFT. a) Detektierte Fluoreszenz während der Dauer eines Anregungs-Abfrage Zyklus (summiert über 50 Anregungs-Abfrage Zyklen). Leistungen der einzelnen Pulse:  $P_{\text{ein}}=100$  nW,  $P_{\text{Abf}}=1000$  nW,  $P_{\text{aus}}=2000$  nW. b) Bleichverhalten bei unterschiedlichen Einschaltleistungen. Dauer des Einschaltimpulses:  $t_{\text{ein}}=10$  ms. Weitere Parameter:  $t_{\text{aus}}=100$  ms,  $t_{\text{Abf}}=12$  ms,  $P_{\text{aus}}=930$  nW,  $P_{\text{Abf}}=200$  nW. c) Sättigungskurven bei unterschiedlichen Einschaltleistungen. Dauer des Einschaltimpulses:  $t_{\text{ein}}=10$  ms. Für andere Parameter siehe c. d) Sättigungskurven bei verschiedenen Abfragedauern. Leistung des Abfragepulses:  $P_{\text{Abf}}=100$  nW. Weitere Parameter:  $t_{\text{aus}}=130$  ms,  $t_{\text{ein}}=20$  ms,  $P_{\text{ein}}=10$  nW. e) Sättigungskurven bei unterschiedlichen Ausschalt Dauern. Punkte: Daten, Linien: Fit (siehe Text). Leistung und Dauer der einzelnen Pulse während eines Anregungs-Abfrage Zyklus siehe Tabelle 3.2. f) Sättigungsleistung in Abhängigkeit der Ausschalt dauer mit Fit (siehe Text).

tigungsfaktoren  $\epsilon = I_{\text{aus}}/I_{\text{S}}$ , wurde bereits in Kapitel 3.3 untersucht. Im weiteren soll nun der Einschaltvorgang durch das blaue Licht ( $\lambda = 405 \text{ nm}$ ) untersucht werden. Dieses Licht soll auf der einen Seite einen möglichst vollständigen Einschaltvorgang aller Moleküle im Fokus gewährleisten, andererseits soll das irreversible Photobleichen, welches durch den Einschaltvorgang hervorgerufen wird, minimiert werden. Die Bedingung, dass das Einschalten möglichst vollständig sein soll, wurde an Hand von Sättigungskurven bei unterschiedlichen Leistungen  $P_{\text{ein}}$  des blauen Einschaltlichts untersucht (Abbildung 3.6 c). Bei der niedrigsten Einschaltleistung von  $P = 2 \text{ nW}$  (schwarze Punkte) weicht die Sättigungskurve deutlich von den Sättigungskurven bei höherer Leistung ab. Dies liegt am unvollständigen Einschalten, so dass der Unterschied zwischen dem Fluoreszenzniveau nach dem Ausschalten und dem Fluoreszenzniveau nach dem Einschalten geringer wird als bei vollständigem Einschalten, und somit die minimale Fluoreszenz normiert auf die Fluoreszenz im eingeschalteten Zustand größer ist (die Kurve bei  $P_{\text{ein}} = 2 \text{ nW}$  liegt deutlich über den Kurven bei  $P_{\text{ein}} > 2 \text{ nW}$ ). Bei den höheren Leistungen ( $P_{\text{ein}} > 2 \text{ nW}$ ) gibt es keine gravierenden Unterschiede mehr in der Sättigungskurve, lediglich bei Leistungen des Ausschaltlichts von ungefähr  $P_{\text{aus}} > 1000 \text{ nW}$  lassen sich Unterschiede feststellen, nämlich dass die Sättigungskurven bei niedrigeren Einschaltleistungen bereits bei niedrigeren Ausschaltleistungen wieder ansteigen. Dies könnte an der ungleichen Intensitätsverteilung im Fokus liegen. Bei hohen Ausschaltleistungen wird rsFastLime auch in den Randbereichen der Ausschalt-PSF effektiv ausgeschaltet. Verwendet man nun zu niedrige Einschaltleistungen, so werden diese Randbereiche nicht mehr vollständig eingeschaltet, was effektiv zu einer Erniedrigung der Ausschalteffizienz führt, also zu einem Ansteigen der Sättigungskurve. Empirisch kann man nun an den Sättigungskurven ablesen, dass bei einer Ausschaltleistung  $P_{\text{aus}} < 1000 \text{ nW}$  (entspricht einem Sättigungsfaktor von  $\epsilon \approx 100$ ) eine Einschaltleistung von  $P_{\text{ein}} = 20 \text{ nW}$  ausreicht, um ein möglichst vollständiges Einschalten zu gewährleisten. Dass eine höhere Einschaltleistung zu einem höheren irreversiblen Photobleichen bei ansonsten gleichen Bedingungen führen kann, ist in Abbildung 3.6 b zu erkennen, die Abnahme pro Zyklus nimmt für höhere Einschaltleistungen zu. Damit liegt bei einer Einschaltzeit von  $t_{\text{ein}} = 10 \text{ ms}$  die optimale Einschaltleistung bei ungefähr  $P_{\text{ein}} = 20 \text{ nW}$ . Dies entspricht einer Photonenzahl pro Puls, die bei einer Änderung der Einschaltdauer beibehalten werden muss, um den gleichen Einschalteffekt zu erzielen, was durch ein Anpassen der Einschaltleistung gewährleistet werden kann ( $P_{\text{ein}} \cdot t_{\text{ein}} = \text{const}$ ). Dadurch kann die Optimierung der Einschaltleistung auch für andere Einschaltdauern übernommen werden, beispielsweise um die Länge der Einschaltdauer an die Länge des gesamten Ausschalt-Abfrage Zyklus, und somit die Aufnahmezeit pro Bildpunkt, anzupassen.

Zur weiteren Optimierung der Sättigungskurve wurde nun untersucht, wie sich das unvermeidliche Ausschalten bei der Abfrage direkt auf die Sättigungskurve auswirkt. Das Ausschalten während der Abfrage ist deutlich in Abbildung 3.6 a während des 2. Abfragepuls zu sehen. Während des ersten Abfragepuls ist keine merkliches Ausschalten zu sehen, da die maximale Effizienz des Ausschaltens bereits durch den vorhergehenden Ausschaltimpuls erreicht ist. Es ist somit klar, dass bei einer Mittelung der Zählrate über die Dauer des Abfragepuls die mittlere Zählrate beim 2. Abfragepuls mit zunehmender Dauer abnimmt, beim 1. Abfragepuls jedoch nahezu konstant bleibt. Somit nimmt auch das als „Eingeschalten“ definierte Niveau zur Normierung der Sättigungskurve ab, was sich auf die Sättigungskur-



$t_{\text{aus}}$ [ms]	$t_{\text{ein}}$ [ms]	$t_{\text{Abf}}$ [ms]	$P_{\text{ein}}$ [nW]	$P_{\text{Abf}}$ [nW]
1.3	0.2	0.25	1000	10000
13	2	2.5	100	1000
130	20	25	10	100
1300	200	250	1	10

**Tabelle 3.2:** Puls-Parameter der Sättigungskurven in Abbildung 3.6 d

ve ähnlich auswirkt wie das bereits weiter oben beschriebene unvollständige Einschalten durch blaues Licht. Dies ist in Abbildung 3.6 d dargestellt. Die Sättigungsintensität nimmt für eine Summation des Signals über eine längere Dauer der Abfragepulse zu, die maximal erreichbare Fluoreszenzunterdrückung nimmt ab. Deshalb muss man einen Kompromiss finden zwischen einem möglichst hohem Gesamtsignal bei langer Integration und einem möglichst geringem Ausschalten während der Abfrage. Dies kann jedoch endgültig nur direkt bei der eigentlichen Bildaufnahme für jede Probe individuell entschieden werden, da die Höhe des Fluoreszenzsignal auch von der Farbstoffkonzentration und -verteilung der jeweiligen Probe abhängt. Zur Messung der Sättigungskurven (Abbildung 3.6 e) wurde eine Leistung von  $P_{\text{aus}} = 100 \text{ nW}$  bei einer Abfragezeit von  $t_{\text{Abf}} = 25 \text{ ms}$  gewählt, um zu zeigen, dass selbst bei einem nennenswerten Ausschalteffekt während der Abfrage noch eine zufrieden stellende Sättigung der Fluoreszenzunterdrückung erreicht werden kann. Bei einer Änderung der Abfragezeit muss die Abfrageleistung so angepasst werden, dass die Photonenzahl pro Abfragepuls erhalten bleibt ( $P_{\text{Abf}} \cdot t_{\text{Abf}} = \text{const}$ ), wie bereits bei der Optimierung der Einschaltleistung (s.o.) beschrieben. Dies gewährleistet eine Vergleichbarkeit der Sättigungskurven bei unterschiedlichen Ausschaltdauern und darauf angepasster Abfragezeit ( $t_{\text{aus}}/t_{\text{Abf}} = \text{const}$ ).

Auf Grund der oben dargestellten Untersuchung und Optimierung der Einschalt- und Abfragepulse wurde für einen Vergleich der Sättigungskurven bei unterschiedlichen Ausschaltzeiten die in Tabelle 3.2 dargestellten Dauern und Leistungen für die Einschalt- und Abfragepulse verwendet ( $t_{\text{ein}}/t_{\text{aus}} = \text{const}$ ,  $t_{\text{Abf}}/t_{\text{aus}} = \text{const}$ ,  $P_{\text{ein}} \cdot t_{\text{ein}} = \text{const}$ ,  $P_{\text{Abf}} \cdot t_{\text{Abf}} = \text{const}$ ).

Aus Gleichung 1.6 ergibt sich, dass die Sättigungskurven sehr gut durch folgende Funktion angepasst werden können:

$$F = A \cdot \frac{1}{1 + \frac{P_{\text{aus}}}{P_{\text{S}}}} + F_0 \quad (3.2)$$

wobei  $F$  die Fluoreszenz,  $P_{\text{aus}}$  die Leistung des Ausschaltimpulses und  $P_{\text{S}}$  die Sättigungsleistung ist. Da die Fluoreszenz nicht vollständig ausgeschaltet wurde, musste ein Untergrund  $F_0$  eingeführt werden.  $A + F_0$  gibt somit das Verhältnis der Fluoreszenz summiert über Ausschaltimpuls 2 zu Ausschaltimpuls 1 bei  $P_{\text{aus}} = 0$  an. Die Sättigungsleistungen wurde durch Anpassung dieser Funktion bestimmt (Abbildung 3.6 f). Es ergibt sich ein reziproker Zusammenhang zwischen Ausschaltzeit  $t_{\text{aus}}$  und Sättigungsleistung  $P_{\text{S}}$  der durch einen Fit (rote Linie in Abbildung 3.6 f) bestimmt werden konnte:

$$P_S = \frac{1200 \text{ ms}}{t_{\text{aus}}} \text{ nW.} \quad (3.3)$$

Diese Gleichung ermöglicht eine variable Handhabung der Ausschaltzeiten bei der Bildaufnahme. Durch eine Steigerung der Ausschaltzeit kann die Zeit pro Bildpunkt und somit die Aufnahmezeit für ein Bild verkürzt werden. Gleichzeitig kann die nötige Leistung zur Erreichung eines bestimmten Sättigungsfaktors  $\epsilon = P_{\text{aus}}/P_S$  bei der jeweiligen Ausschaltzeit bestimmt werden.

### 3.4.2 Photophysik von rsFastLime

Um ein besseres photophysikalisches Verständnis von rsFastLime zu erhalten wurde ein Modell der am Schaltvorgang beteiligten Zustände von Dronpa [72] auf rsFastLime übertragen und mit Experimenten und Simulationen belegt. Neben den durch 488 nm und 405 nm schaltbaren, stabilen Zuständen  $A$  und  $B$  wurde die Existenz eines weiteren, durch 488 nm bevölkerbaren Zustands  $D$  gezeigt, der sich nicht durch Licht der Wellenlänge 405 nm entvölkern lässt, aber mit einer Lebenszeit von ca. 1 ms nach  $B$  relaxiert. Dies muß bei der RESOLFT-Bildaufnahme berücksichtigt werden, für die bis jetzt von einem reversiblen Photoschalten von langlebigen Zuständen ausgegangen wurde. Eine nennenswerte Besetzung von  $D$  kann unter Umständen zu ungewünschten Nebeneffekten führen. So kann durch Relaxation aus  $D$  der fluoreszierende Zustand  $B$  wieder besetzt werden, wodurch eine effektive Fluoreszenzunterdrückung verhindert wird.

#### Theorie

Das Modell der am Schaltvorgang beteiligten Zustände und Übergänge mit den jeweiligen Geschwindigkeitskonstanten  $k$  ist in Abbildung 3.7 a zu sehen. Es besteht aus drei Zuständen  $A$ ,  $B$  und  $D$ , wobei  $A$  und  $D$  Dunkelzustände sind und  $B$  ein fluoreszierender Zustand ist. Der fluoreszierende Zustand  $B$  wird in diesem Modell noch detaillierter betrachtet, in dem die Übergänge zwischen dem elektronischen Grundzustand  $S_0$  und dem ersten elektronisch angeregten Zustand  $S_1$  berücksichtigt werden. Die Übergänge zwischen den Zuständen sind entweder spontan oder werden durch grünes Licht der Wellenlänge  $\lambda = 488 \text{ nm}$  und der Intensität  $I$  getrieben (Abbildung 3.7). Bei den spontanen Übergängen sind die Geschwindigkeitskonstanten  $k$  konstant, bei den durch Licht getriebenen Übergängen ist die Geschwindigkeitskonstante proportional zur Intensität des Lichts ( $k \sim I$ ). Die eigentliche Anregung des Systems findet durch den Übergang  $S_0 \rightarrow S_1$  mit der Ratenkonstante  $k_{01} \sim I$  statt. Der Übergang  $S_1 \rightarrow S_0$  findet durch Fluoreszenz und nicht strahlende Übergänge statt,  $k_{10}$  ist über die Fluoreszenzlebensdauer  $t_{10}$  bestimmt ( $k_{10} = t_{10}^{-1}$ ). Da bei den in diesem Unterabschnitt beschriebenen Experimenten und Simulationen nur eine Bestrahlung mit Licht der Wellenlänge  $\lambda = 488 \text{ nm}$  stattfindet, werden in diesem Modell auch nur die dadurch getriebenen Übergänge berücksichtigt und nicht die durch blaues Licht der Wellenlänge  $\lambda = 405 \text{ nm}$  getriebenen Übergänge. Die Geschwindigkeitskonstanten werden mit dem

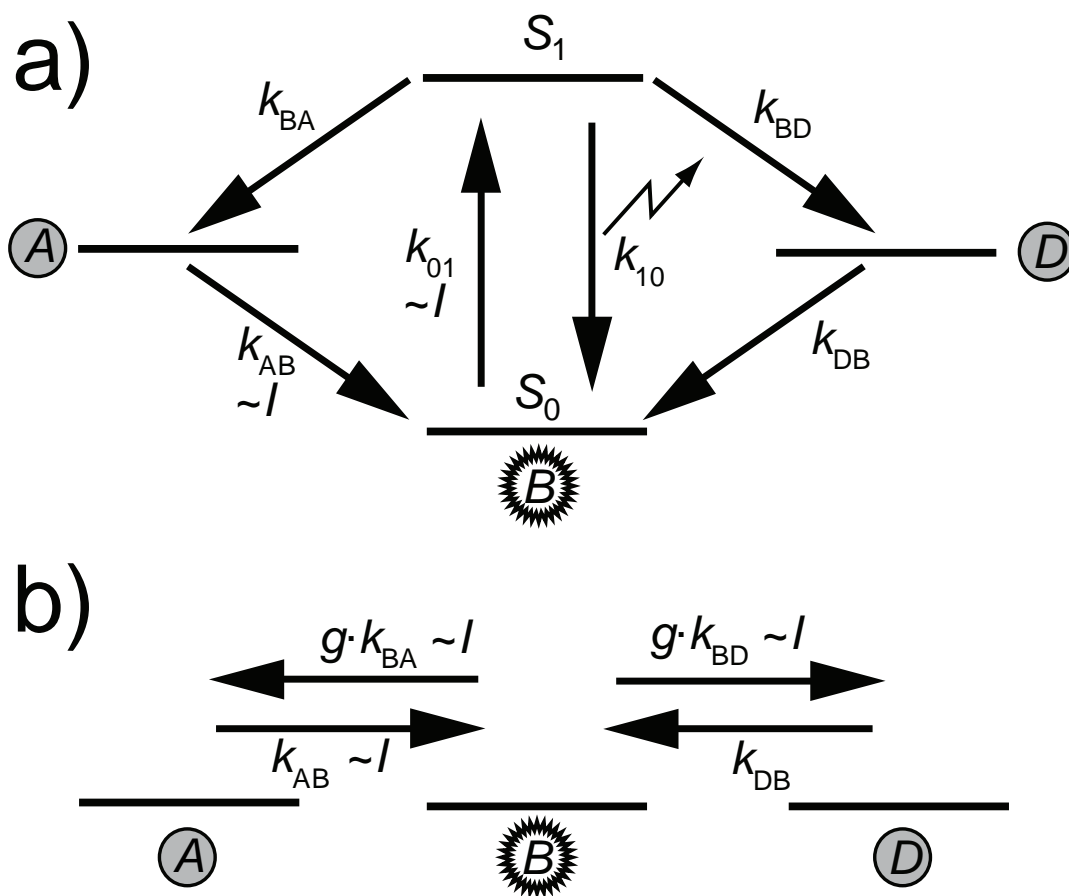
jeweiligen Ausgangs- und Endzustand indexiert, zum Beispiel  $k_{DB}$ :  $D$  ist der Ausgangszustand,  $B$  ist der Endzustand, bei  $S_0$  und  $S_1$  werden nur 0 und 1 als Index verwendet. Die Besetzung des jeweiligen Zustandes wird mit  $N$  bezeichnet, die Dynamik der Besetzungen kann durch ein System von gekoppelten Differentialgleichungen 1. Ordnung beschrieben werden, dass hier in Matrixdarstellung angegeben werden soll:

$$\frac{d}{dt} \begin{pmatrix} N_0 \\ N_1 \\ N_A \\ N_D \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} -k_{01} & k_{10} & k_{AB} & k_{DB} \\ k_{01} & -(k_{10} + k_{BA} + k_{BD}) & 0 & 0 \\ 0 & k_{BA} & -k_{AB} & 0 \\ 0 & k_{BD} & 0 & -k_{DB} \end{pmatrix} \begin{pmatrix} N_0 \\ N_1 \\ N_A \\ N_D \end{pmatrix} \quad (3.4)$$

Es wird angenommen, dass im Ausgangszustand ( $t = 0 = t_0$ ) sich alle Moleküle im Grundzustand von  $B$  befinden ( $N_0 = 1, N_1 = N_A = N_D = 0$ ).  $B$  wird durch 488 nm von seinem elektronischen Grundzustand  $S_0$  in seinen 1. elektrisch angeregten Zustand  $S_1$  angeregt ( $k_{01} = \sigma_{01} \cdot N_P$ ).  $\sigma_{01}$  ist ein Photonenwirkungsquerschnitt und kann aus Tabelle 3.1 entnommen werden,  $N_P$  ist die Anzahl der eingestrahelten Photonen (488 nm) pro Sekunde. Vernachlässigt man weitere Übergänge vom  $S_1$  in andere Zustände (z.B Triplet), kann  $k_{10}$  aus der Fluoreszenzlebensdauer  $t_{10}$  bestimmt werden ( $k_{10} = 1/t_{10}$ ). Die Fluoreszenzlebensdauer  $t_{10}$  wurde experimentell durch zeitkorrelierte Einzelphotonenzählung zu 2,7ns bestimmt. Vom angeregten Zustand  $S_1$  gibt es zwei weitere Relaxationswege: In den Dunkelzustand  $D$ , der spontan weiter nach  $B$  relaxieren kann, oder in den Dunkelzustand  $A$ . Die spontane Relaxation von  $A$  nach  $B$  kann vernachlässigt werden, da sie im Bereich von Tagen liegt [70]. Jedoch besteht eine nicht zu vernachlässigende Wahrscheinlichkeit dafür, dass dieser Übergang (neben Licht von 405 nm, jetzt nicht betrachtet) auch durch Licht der Wellenlänge 488 nm induziert wird ( $k_{AB} = \sigma_{AB} \cdot N_P$ ).

Dieses Modell kann noch vereinfacht werden. Die Übergänge im Singuletsystem von  $B$  finden auf sehr viel kleineren Zeitskalen (ns) statt wie alle weiteren Übergänge, beispielsweise liegt die Lebensdauer von  $D$  nach  $B$  bei Dronpa in PVA bei 65 ms [69]. Im ns-Bereich stellt sich somit zwischen  $S_0$  und  $S_1$  ein Gleichgewicht ein, so dass diese Zustände für Simulationen im ms-Bereich zusammengefasst werden können. Die relative Besetzung  $g$  von  $S_1$  im Untersystem  $B$  ergibt sich aus den beiden Geschwindigkeitskonstanten der Übergänge im Untersystem  $B$  zu  $g = k_{01}/(k_{01} + k_{10})$ . Die effektiven Geschwindigkeitskonstanten von  $B$  nach  $A$  und  $D$  sind somit im reduzierten Modell gegeben durch  $g \cdot k_{BA}$  beziehungsweise  $g \cdot k_{BD}$  (Abbildung 3.7 b). Das lineare Differentialgleichungssystem zur Beschreibung dieses reduzierten Modells lässt sich analog zu dem Gleichungssystem 3.4 aufstellen ( $N_B = N_0 + N_1$ ):

$$\frac{d}{dt} \begin{pmatrix} N_A \\ N_B \\ N_D \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} -k_{AB} & g \cdot k_{BA} & 0 \\ k_{AB} & -g \cdot (k_{BA} + k_{BD}) & k_{DB} \\ 0 & g \cdot k_{BD} & -k_{DB} \end{pmatrix} \begin{pmatrix} N_A \\ N_B \\ N_D \end{pmatrix} \quad (3.5)$$



**Abbildung 3.7:** Modell der Zustände und Übergänge bei Anregung mit 488 nm (a) und reduziertes Modell (b).

### Experiment und Simulation

Durch Anregungs-Abfrage Experimente und Simulationen konnten die im Modell angegebenen unbekanntes Geschwindigkeitskonstanten bestimmt werden ( $k_{BA}$ ,  $k_{AB}$ ,  $k_{BD}$ ,  $k_{DB}$ ). Das Protein rsFastLime wurde dazu in Polyacrylamid (Kapitel A.3.4) eingebettet, da diese Immobilisierung auch bei den Experimenten zur Auflösungserhöhung verwendet wurde.

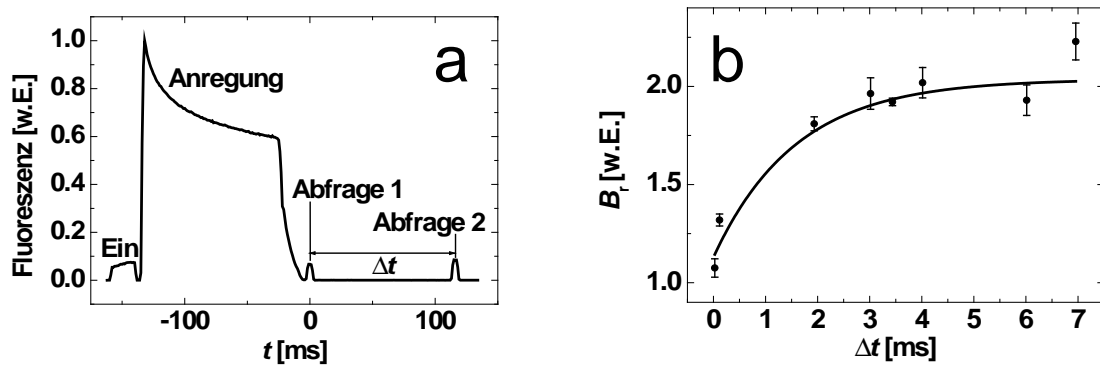
Zunächst wurde  $k_{DB}$  bestimmt. Da der Übergang vom Zustand  $D$  in den Zustand  $B$  der einzige Übergang ist, der im reduzierten Modell nach Abbildung 3.7 b nicht durch Licht getrieben wird, lässt sich dessen Relaxation durch die in der zeitaufgelösten Spektroskopie weit verbreitete Anregung-Abfrage Technik beobachten. Dazu wird rsFastLime zunächst in den Zustand  $D$  angeregt und danach die Relaxation in den Zustand  $B$  beobachtet. Da  $B$  der einzige fluoreszierende Zustand ist, ist die Fluoreszenz bei Anregung durch Licht der Wellenlänge  $\lambda = 488 \text{ nm}$  proportional zur Besetzung von  $B$ . Somit kann die Relaxation von  $D$  nach  $B$  durch die zeitliche Abfrage der Fluoreszenz von  $B$  beobachtet werden, nachdem eine Besetzung von  $D$  stattgefunden hat. Im einzelnen ist der Ablauf des Experiments aus

Abbildung 3.8 a ersichtlich. Zunächst soll die Abfolge der einzelnen Lichtpulse bei der Anwendung der Anregung-Abfrage Technik erläutert werden. Ein erster Puls (Ein, 405 nm, 20  $\mu$ s, 70  $\mu$ W) dient zunächst dazu, das System zu initialisieren, d.h. eine evtl. vorhandene Besetzung des Zustands  $A$  wird nach  $B$  übergeführt, wodurch die im Modell angenommene Anfangsbedingung von  $B = 1, A = D = 0$  sichergestellt werden soll. Danach folgt der Anregungspuls (Anregung, 488 nm, 100 $\mu$ s, 850 $\mu$ W), wodurch der Zustand  $D$  besetzt wird. Direkt nach dem Abklingen des Anregungspuls (abfallende Endflanke, technisch bedingt) wird die Fluoreszenz, d.h. die Besetzung des Zustand  $B$ , durch einen kurzen Puls mit niedriger Leistung abgefragt (Abfrage 1, 488 nm, 5  $\mu$ s, 20  $\mu$ W). Dies bestimmt den Referenzwert der Besetzung von  $B$  zum Zeitpunkt  $\Delta t = 0$ . Nach einer variablen Verzögerungszeit  $\Delta t$  wird durch einen zweiten Abfragepuls gleicher Intensität (Abfrage 2, 488 nm, 5  $\mu$ s, 20  $\mu$ W) erneut die Fluoreszenz und somit die Besetzung des Zustands  $B$  abgefragt. Um ein besseres Signal-zu-Rausch Verhältnis zu erreichen, wurde der dargestellte Zyklus an 225 verschiedenen Stellen der Probe jeweils 10mal durchgeföhren und das Signal aufaddiert. Der Quotient  $B_r$  aus der Fluoreszenz während des zweiten Abfragepuls zur Fluoreszenz während des ersten Abfragepuls über  $\Delta t$  ist in Abbildung 3.8 b dargestellt und entspricht der relativen Besetzung von  $B$ , normiert auf die Besetzung von  $B$  zum Zeitpunkt  $\Delta t = 0$ . Zur Berechnung der Fehlerbalken wurde der Fehler der Fluoreszenz in einem Abfragepuls mit Hilfe der Poissonstatistik angenommen (Fluoreszenz=Zählrate  $F$  der APD, Fehler:  $\sqrt{F}$ ). Da während der Verzögerungszeit  $\Delta t$  keine Lichteinwirkung stattfindet, ist der einzige Übergang, der zu einer Veränderung von  $B_r$  führt nach dem reduzierten Modell (Abbildung 3.7 b) der Übergang von  $D$  nach  $B$ . Folglich gilt für die relative Besetzung  $B_r$  in Abhängigkeit von  $\Delta t$ :

$$B_r(\Delta t) = 1 + A(1 - e^{(-k_{DB} \cdot \Delta t)})$$

wobei  $A$  eine nicht weiter betrachtete Amplitude darstellt und  $k_{DB}$  die Ratenkonstante des Übergangs von  $D$  nach  $B$  ist. Durch Anpassen dieser Funktion (freie Parameter:  $A$  und  $k_{DB}$ ) ließ sich die Lebensdauer  $t_D = 1/k_{DB}$  von  $D$  zu  $(1,6 \pm 0,4)$  ms bestimmen.

Um die restlichen freien Parameter des Modells ( $k_{BD}, k_{BA}, k_{AB}$ ) zu bestimmen und dadurch die Besetzung der unterschiedlichen Zustände modellieren zu können, um die geeigneten Parameter zur Bildaufnahme mit der RESOLFT-Technik zu finden, wurden zwei weitere unabhängige Messungen durch eine numerische Simulation angepasst. Zudem bestimmte eine Messung davon direkt die Abhängigkeit des Anteils der Moleküle, die sich nach einem Ausschaltvorgang im eigentlich ungewollten Zustand  $D$  befinden. Dies ist insoweit von Interesse für das eigentliche Ziel der Bildaufnahme mit der RESOLFT-Technik, da dadurch auch nach dem Ausschaltvorgang eine Dynamik im System stattfindet, nämlich durch die Relaxation des Dunkelzustands  $D$  in den fluoreszierenden Zustand  $B$ . Insofern könnte also die Ausschalteffizienz nicht nur von der Dauer und Leistung des Ausschaltimpulses abhängen, sondern auch von der Zeit, die nach dem Ende des Ausschaltvorgangs bis zur eigentlichen Bildaufnahme durch den Abfragepuls vergangen ist. Außerdem könnte eine Besetzung von  $D$  einen negativen Effekt auf die Effizienz des Einschaltvorgangs haben, da Moleküle, die sich im Zustand  $D$  befinden, nicht durch blaues Licht eingeschaltet werden können, sondern



**Abbildung 3.8:** Anregungs-Abfrage Experiment zur Bestimmung von  $k_{DB}$ . a) Zeitliche Abfolge der Pulse verschiedenster Intensität. b) Relative Fluoreszenz in Abhängigkeit der Verzögerungszeit  $\Delta t$  (Punkte) und exponentieller Fit (Linie) zur Bestimmung von  $k_{DB}$  zu  $1,6 \text{ ms}^{-1}$ .

nur über spontane Relaxation in den Zustand  $B$  übergehen. Dadurch könnte es vorkommen, dass nicht alle Moleküle sich im Zustand  $B$  befinden, obwohl bereits alle Moleküle, die sich im Zustand  $A$  befunden haben durch blaues Licht wieder in den Zustand  $B$  gepumpt wurden. Da die Ratenkonstante  $k_{DB}$  der Relaxation von  $D$  nach  $B$  bereits bestimmt wurde und sich daraus die Lebensdauer des Zustands  $D$  zu  $t_D = 1,6 \text{ ms}$  (rsFastLime in PAA) bestimmen lässt, lässt sich abschätzen, dass für Ausschaltzeiten  $t_{\text{aus}} > 10 \text{ ms}$  der Anteil der Moleküle im Zustand  $D$  nach dem Ausschalten vernachlässigbar ist, da durch wiederholtes Zurückfallen in den Zustand  $B$  die Gesamtwahrscheinlichkeit für einen Übergang in den Zustand  $A$  sehr viel größer ist als bei einer Ausschaltdauer  $t_{\text{aus}} < 1 \text{ ms}$ , da hierbei ein Molekül, das in den Zustand  $D$  gepumpt wurde mit einer hohen Wahrscheinlichkeit nicht einen weiteren Zyklus über  $B$  durchlaufen kann, und somit auch nicht in  $A$  übergehen kann. Um dies experimentell zu untersuchen wurde ein Anregungs-Abfrage Experiment durchgeführt wie in Abbildung 3.9 a dargestellt. Zunächst werden durch einen kurzen Einschaltimpuls (405 nm) die Moleküle nach  $B$  übergeführt. Danach erfolgt ein Ausschaltimpuls (488 nm) variabler Länge ( $220 \mu\text{s}$  bis  $110 \text{ ms}$ ) mit relativ hoher Leistung, wobei die Leistung so angepasst wurde, dass bei den Pulsen unterschiedlicher Dauer jeweils die Photonenzahl pro Puls gleich blieb ( $P_{\text{aus}} \cdot t_{\text{aus}} = \text{const}$ ). Dadurch ist es möglich, die Effizienz des Ausschaltens in den Zustand  $A$  am Ende der Pulse direkt miteinander zu vergleichen. Nach dem Ausschaltimpuls folgt der erste Abfragepuls (488 nm) mit relativ niedriger Leistung. Die gemessene Fluoreszenz ist direkt der Besetzung des fluoreszierenden Zustandes  $B$  proportional. Zwischen dem ersten und zweiten Abfragepuls (beide 488 nm, gleiche niedrige Leistung) liegt eine feste Zeitspanne von  $10 \text{ ms}$ , wodurch Moleküle, die sich nach dem Ausschalten im Zustand  $D$  befinden praktisch komplett in den Zustand  $B$  relaxieren können, da die Lebensdauer  $t_D$  von  $D$  wie bereits gemessen  $1,6 \text{ ms}$  beträgt. Der Quotient aus der Fluoreszenz während des zweiten Abfragepuls und der Fluoreszenz während des ersten Abfragepuls ist somit der Besetzung von  $D$  am Ende des Ausschaltimpulses proportional. Dies ist in Abbildung 3.9 b dargestellt. Die gezeigten Fehlerbalken ergeben sich durch die Annahme einer Poissonstatistik für den Fehler in der Zählrate der APD. Der Quotient beträgt bei Ausschaltzeiten von  $t_{\text{aus}} > 10 \text{ ms}$

ungefähr 1, was darauf schließen lässt, dass die Besetzung von  $D$  für diese Ausschalt Dauern wie erwartet vernachlässigbar ist. Für Ausschalt Dauern  $t_{\text{aus}} \approx 1$  ms beträgt der Quotient 2, d.h. es befindet sich ein deutlich messbarer Anteil der Moleküle im Zustand  $D$  am Ende der Ausschaltzeit, jedoch lässt sich allein mit dieser Messung noch nicht der relative Anteil der Moleküle im Zustand  $D$  angeben. Um dies zu erreichen wurde die Messung mit Hilfe einer numerischen Simulation des reduzierten Modells (Abbildung 3.7 b) beschrieben. Eine Lösung des Gleichungssystems 3.5 kann dazu wie folgt angegeben werden:

$$\begin{pmatrix} N_A(t) \\ N_B(t) \\ N_D(t) \end{pmatrix} = e^{M \cdot t} \begin{pmatrix} N_A^0 \\ N_B^0 \\ N_D^0 \end{pmatrix} \quad (3.6)$$

mit

$$M = \begin{pmatrix} -k_{AB} & g \cdot k_{BA} & 0 \\ k_{AB} & -g \cdot (k_{BA} + k_{BD}) & k_{DB} \\ 0 & g \cdot k_{BD} & -k_{DB} \end{pmatrix} \quad (3.7)$$

$N^0$  ist die Anfangsbedingung für den jeweiligen Zustand, mit  $N_B^0 = 1$ ,  $N_A^0 = N_D^0 = 0$  falls, wie bei dieser Simulation, sich alle Moleküle am Anfang im Zustand  $B$  befinden sollen. Die Exponentialfunktion  $e^M$  kann als Taylorreihe aufgefasst werden:

$$e^{M \cdot t} = \sum_{i=0}^{\infty} \frac{M^i \cdot t^i}{i!}, \quad (3.8)$$

anhand derer durch Ableitung Gleichung 3.6 als Lösung des Differentialgleichungssystems (Gleichung 3.5) bestätigt werden kann. Das Lösen des Differentialgleichungssystems hat sich nun also auf die Bestimmung von  $e^{M \cdot t}$  reduziert. Um die Exponentialfunktion mit einer Matrix zu berechnen gibt es in dem Programm „Matlab“ eine vorgefertigte numerische Routine mit dem Namen „expm“. Diese Methode ist hinsichtlich ihrer Berechnungsgeschwindigkeit auf dem Computer gegenüber anderen numerischen Methoden der Lösung von Differentialgleichungen wie dem Runge-Kutta-Verfahren wesentlich schneller, da die Lösung für jeden beliebigen Zeitpunkt  $t$  immer den gleichen Rechenschritt benötigt, nämlich das Lösen von  $e^M \cdot t$ , und nicht wie beispielsweise beim Runge-Kutta-Verfahren proportional zur Zeit  $t$  und zur Anzahl  $n$  der Zwischenzeitschritte mit dem Intervall  $\Delta t = t/n$ , und somit der Genauigkeit, anwächst. Durch diese schnellere Geschwindigkeit wurde es erst praktikabel, die Simulation orts aufgelöst mit einer durch die PSF angegebenen Intensitätsverteilung durchzuführen. Das Differentialgleichungssystem wurde an jeder Stelle der PSF zur jeweiligen Intensität gelöst. Dies ermöglichte die genauere Bestimmung der gesuchten Ratenkonstanten. Hätte man die Ortsabhängigkeit der Intensität, die durch die PSF beschrieben wird, nicht berücksichtigt, könnte man nur effektive, d.h. über eine konkrete Intensitätsverteilung gemittelte Ratenkonstanten angeben, die nur für eine bestimmte Intensitätsverteilung, in diesem Fall eine konfokale PSF, gültig wären. Da das durch die Simulation beschriebene Experiment in einem homogenen Medium, nämlich rsFastLime in Polyacrylamid (PAA), durchgeführt

wurde, konnte für die Simulation eine vektorieLL berechnete [65] konfokale 3D-PSF verwendet werden. Die Lösung des Gleichungssystems erfolgte orts aufgelöst in 50 nm Schritten auf einer Länge von 1  $\mu\text{m}$  in allen drei Raumrichtungen, wobei das Maximum der PSF bei  $x = y = z = 500 \text{ nm}$  lag. Die Polarisation der PSF wurde dabei nicht berücksichtigt, die Intensitäten in den drei Polarisationsrichtungen der PSF wurden zur Vereinfachung aufaddiert. Eine beispielhafte Studie darüber, wie der Einfluss der Polarisation selbst bei einer uniformen Verteilung der Übergangsdipole der Moleküle eigentlich berücksichtigt werden müsste kann in [73] gefunden werden. Dort wird gezeigt, dass nicht nur die ortsabhängige Verteilungsfunktion der Intensität, d.h. die PSF, bei der Simulation von lichtgetriebenen molekularen Übergängen eigentlich berücksichtigt werden muss, sondern auch die Verteilungsfunktion der Dipolmomente der Moleküle gegenüber der Polarisation des Lichts, da der Wirkungsquerschnitt der Anregung eines Übergangs auch von dem Winkel zwischen der Polarisation und dem Dipolmoment abhängt.

Durch Anpassen der Ratenkonstanten  $k_{BA}$ ,  $k_{AB}$  und  $k_{BD}$  konnten nun die in Abbildung 3.9 b gezeigten Daten durch die Lösung des Differentialgleichungssystems (Gleichung 3.6) sehr gut beschrieben werden. Das Verhältnis der Fluoreszenz während der Abfrage 2 zu der Fluoreszenz während der Abfrage 1 entspricht dabei in der Simulation am Ende des Ausschaltvorgangs folgendem Verhältnis  $V$  der Besetzungen der Zustände  $D$  und  $B$ :  $V = (N_B + N_D)/N_B$ . Jedoch gab es mehrere Wertekonstellationen der Ratenkonstanten, die die Daten richtig beschrieben. Dies bedeutet, dass das Verhältnis  $V$  für verschiedene Tripel der Ratenkonstanten  $k_{BA}$ ,  $k_{AB}$  und  $k_{BD}$  den gleichen Wert annimmt. Um die Zahl der möglichen Tripel einzuschränken, wurde als weitere unabhängige Messung eine Sättigungskurve herangezogen (Abbildung 3.9 c). Die Sättigungskurve beschreibt die Besetzung von  $N_B$  am Ende des Ausschaltvorgangs. Beide Messungen zusammen konnten empirisch nur mit den in Tabelle 3.3 angegebenen Werten durch die Simulation beschrieben werden. Aus der Fluoreszenzlebensdauer  $t_{10}$  (s.o.) und den Ratenkonstanten  $k_{BA}$  und  $k_{BD}$  können die Quanteneffizienten der zugehörigen Übergänge  $B \rightarrow A$  beziehungsweise  $B \rightarrow D$  zu  $\Phi_{BA} = 6,75 \cdot 10^{-4}$  beziehungsweise  $\Phi_{BD} = 0,27 \cdot 10^{-4}$  bestimmt werden (zum Rechenweg siehe [74]). Dies ist vergleichbar mit in der Literatur genannten Werten [69].

Für Bildaufnahmen im RESOLFT Verfahren kann nun mit Hilfe dieser Parameter abgeschätzt werden, in welchem Schaltzeitbereich der fluoreszierende Zustand  $B$  praktisch vollständig in den Dunkelzustand  $A$  gepumpt wird. Bei einer Besetzung von  $D$  kann es zu ungewünschten Effekten kommen, beispielsweise kann der Zustand  $B$  nach dem Ausschalten durch Relaxation von  $D$  nach  $B$  wieder besetzt werden, wodurch sich die Ausschalt-effizienz effektiv verschlechtert. Weiterhin kann der Zustand  $D$  nicht durch blaues Licht in den Zustand  $B$  übergeführt werden, sondern nur durch spontane Relaxation, wodurch die Reversibilität des Schaltvorgangs bei ungünstig gewählten Schaltzeiten eingeschränkt sein könnte. Insgesamt kann man sagen, dass der stabile, durch Licht kontrollierbare Dunkelzustand  $A$  durch den instabilen, nicht durch Licht kontrollierbaren Dunkelzustand  $D$  überlagert werden könnte, was im Allgemeinen zu den unerwünschten, oben beschriebenen Effekten bei der RESOLFT-Bildaufnahme führen könnte. An Hand der oben dargestellten Experimente und Simulationen soll nun abgeschätzt werden, welche Ausschaltzeiten bei der RESOLFT-Aufnahme diese Effekte vermeiden. Wie in Abbildung 3.9 zu sehen, ist dies für Ausschalt-



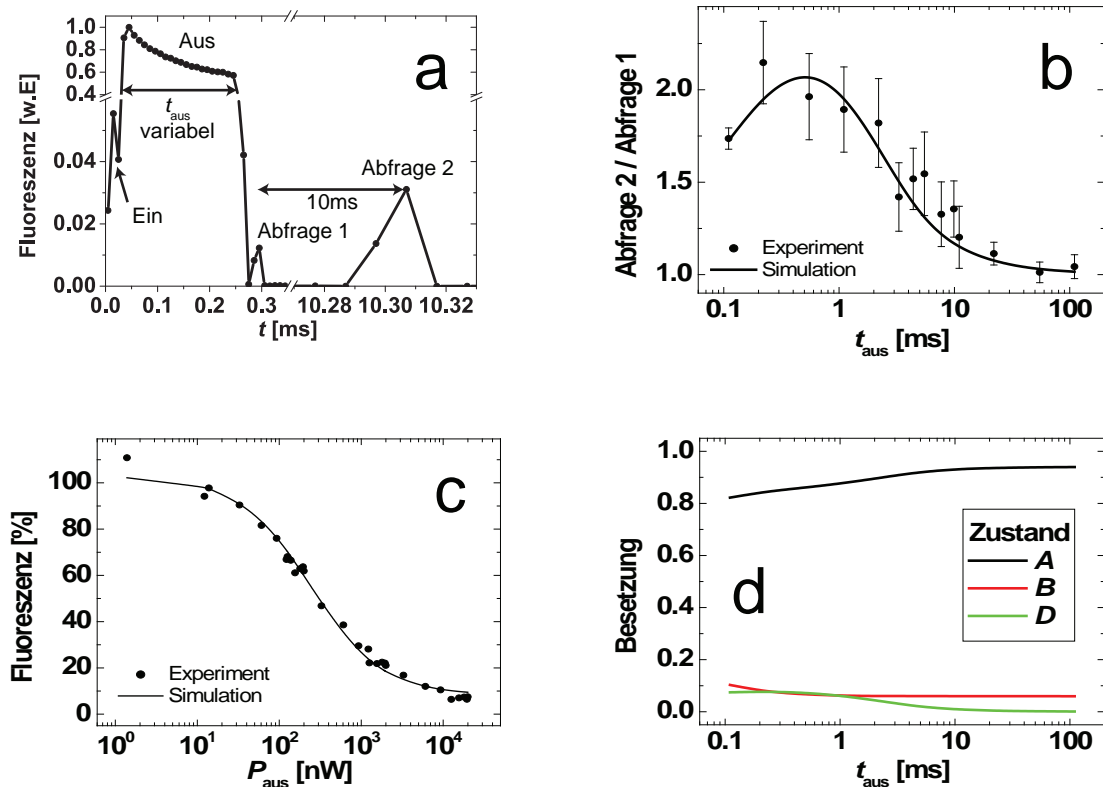
$k_{BA}$ [ $\text{ms}^{-1}$ ]	$k_{BD}$ [ $\text{ms}^{-1}$ ]	$\sigma_{AB}$ [ $10^{-21} \text{ cm}^2$ ]	$t_{DB}$ [ms]
250	10	5	1,6

**Tabelle 3.3:** Durch Experimente und Simulationen bestimmte Geschwindigkeitskonstanten des Modells in Abbildung 3.7.

dauern um die 100 ms, wie sie auch zur Bildaufnahme (Abbildung 3.11) genutzt wurden, mit Sicherheit gegeben. Der Zustand  $D$  ist am Ende der Ausschaltzeit praktisch nicht besetzt. Kürzere Ausschaltzeiten könnten zu etwas geringeren Sättigungseffizienzen führen, da der Zustand  $D$  bei gleicher Photonenzahl mehr bevölkert wird. Der absolute Effekt kann an den hier vorgenommenen Messungen nur abgeschätzt werden, da man für die genaue Ermittlung Sättigungskurven bei der jeweiligen Ausschaltzeit aufnehmen müsste. Bei den Ausschaltleistungen zu der Aufnahme der Daten in Abbildung 3.9 b kann die Ausschalt-effizienz bei Ausschalt-dauern von ( $t_{\text{aus}} > 10 \text{ ms}$ ) durch Wiederbevölkerung von  $B$  aus  $D$  um bis zu 10% (absolut) verschlechtert werden.

### 3.5 RESOLFT-Mikroskopie mit rsFastLime

Für die Bildaufnahmen zur Demonstration der Auflösungserhöhung durch die RESOLFT-Mikroskopie mit rsFastLime gegenüber der konventionellen konfokalen Bildaufnahme wurde die gleiche Pulsabfolge verwendet wie zur Aufnahme der Sättigungsfunktion, d.h zur Ermittlung der Unterdrückung der Fluoreszenz in Abhängigkeit der Ausschaltleistung. Dies ist noch einmal in Abbildung 3.10 dargestellt. Die Ausschalt-PSF wurde jedoch durch das Einsetzen einer Phasenplatte in die gezeigte Form übergeführt. Durch die gesättigte Unterdrückung der Fluoreszenz im Randbereich der Anregungs-PSF entsteht somit eine in einer lateralen Richtung verkleinerte effektive RESOLFT-PSF. Mit dieser RESOLFT-PSF kann die zu untersuchende Probe nun abgerastert werden, wobei in jedem Pixel die Pulsabfolge mindestens einmal durchgefahren wird. Durch mehrmaliges Durchfahren der Pulsfolge an einem Pixel und Addition der einzelnen Fluoreszenzsignale während der Abfrage kann die Helligkeit pro Pixel erhöht werden. Dadurch nimmt man jedoch ein erhöhtes irreversibles Photobleichen pro Pixel in Kauf, so dass hier immer ein Kompromiß gefunden werden muss. Das letztendliche Bild erhält man dann durch Addition der zeitaufgelösten Fluoreszenz während dem 1. Abfragepuls für das RESOLFT-Bild und dem 2. Abfragepuls für das konfokale Referenzbild. Hierbei kann es sinnvoll sein, nicht über die gesamte Zeitdauer der Abfrage zu summieren, da durch die Abfrage rsFastLime ausgeschaltet wird. Wie bereits bei den Aufnahmen der Sättigungskurven gezeigt (Abbildung 3.6 e), führt das gleichzeitige Ausschalten zu einer Erhöhung der Sättigungsintensität und somit zu einer effektiv niedrigeren Auflösung. Hier muss wiederum ein Kompromiß zwischen Auflösung (kurzer Abfrage -> wenig Ausschalten -> bessere Auflösung) und Helligkeit (lange Abfrage -> mehr Photonen -> besseres Signal-zu-Rausch Verhältnis) gefunden werden. Die genauen Parameter der einzelnen Pulse (Dauer, Leistung) können aus Tabelle 3.4 entnommen werden. Die gewählte Einschaltleistung und -zeit ergibt ein möglichst vollständiges Einschalten von rsFastLime im



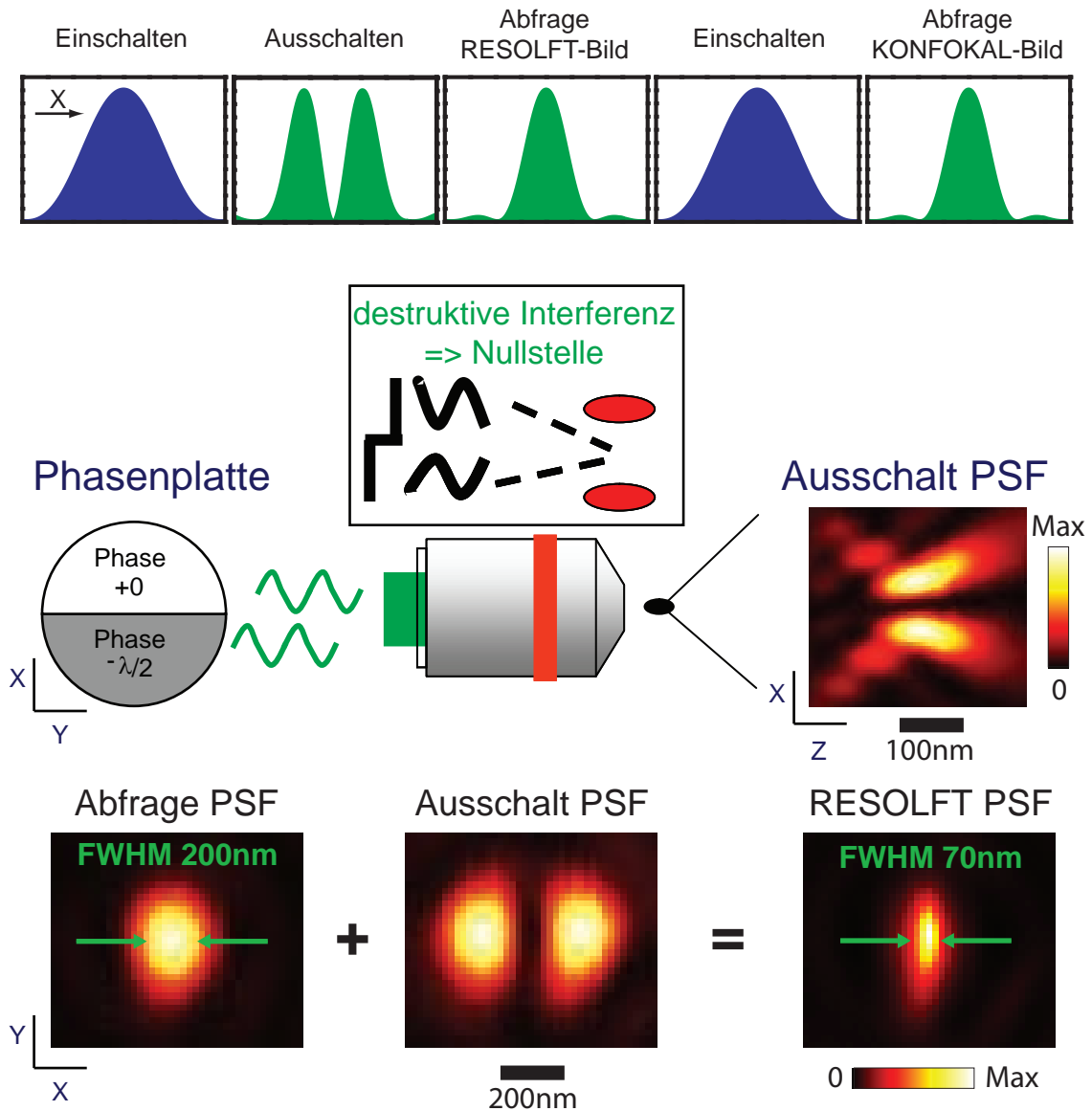
**Abbildung 3.9:** a) Beispiel einer Messung zur Bestimmung der Besetzung von  $D$  nach einem Ausschaltvorgang. Dargestellt ist die Fluoreszenz, die durch die Abfolge der Pulse (Ein (405 nm), Aus, Abfrage 1, Abfrage 2 (alle 488 nm)) erzeugt wird. Die Länge des Ausschaltimpuls wurde in einem Zeitbereich von 0,1 ms bis 100 ms variiert, wobei die Photonenzahl pro Ausschaltimpuls konstant gehalten wurde ( $P_{\text{aus}} \cdot t_{\text{aus}} = \text{const}$ ). Der Abstand der Abfragepulse wurde konstant bei 10 ms gehalten. b) Fluoreszenz während der Abfrage 2 im Verhältnis zu der Fluoreszenz während der Abfrage 1 über der Ausschaltdauer (Punkte, die Fehler ergeben sich aus einer angenommenen Poissonverteilung der gemessenen Fluoreszenz  $F$ , Standardabweichung  $\sigma_F$  des Messsignals  $F$ :  $\sigma_F = \sqrt{F}$ , vergleiche Kapitel 1.2.1). Anpassung der Daten durch einer numerischen Simulation (Gleichung 3.6). Gezeigt ist das Verhältnis  $V = (N_B + N_D)/N_B$  am Ende der Ausschaltzeit (Linie). c) Messung der Fluoreszenzunterdrückung von rsFastLime in PAA in Abhängigkeit der Ausschaltleistung  $P_{\text{aus}}$  (Punkte; Einschalten: 100 nW, 2 ms; Abfrage: 1000 nW, 2,5 ms, Ausschalten: 13 ms). Anpassung der Daten durch die Besetzung  $N_B$  am Ende der Ausschaltzeit einer numerischen Simulation (Gleichung 3.6). d) Simulierte Besetzung der Zustände am Ende der Ausschaltzeit (Gleichung 3.6).

$t_{\text{aus}}$ [ms]	$t_{\text{ein}}$ [ms]	$t_{\text{Abf}}$ [ms]	$P_{\text{aus}}$ [nW]	$P_{\text{ein}}$ [nW]	$P_{\text{Abf}}$ [nW]
130	20	25	200	200	10

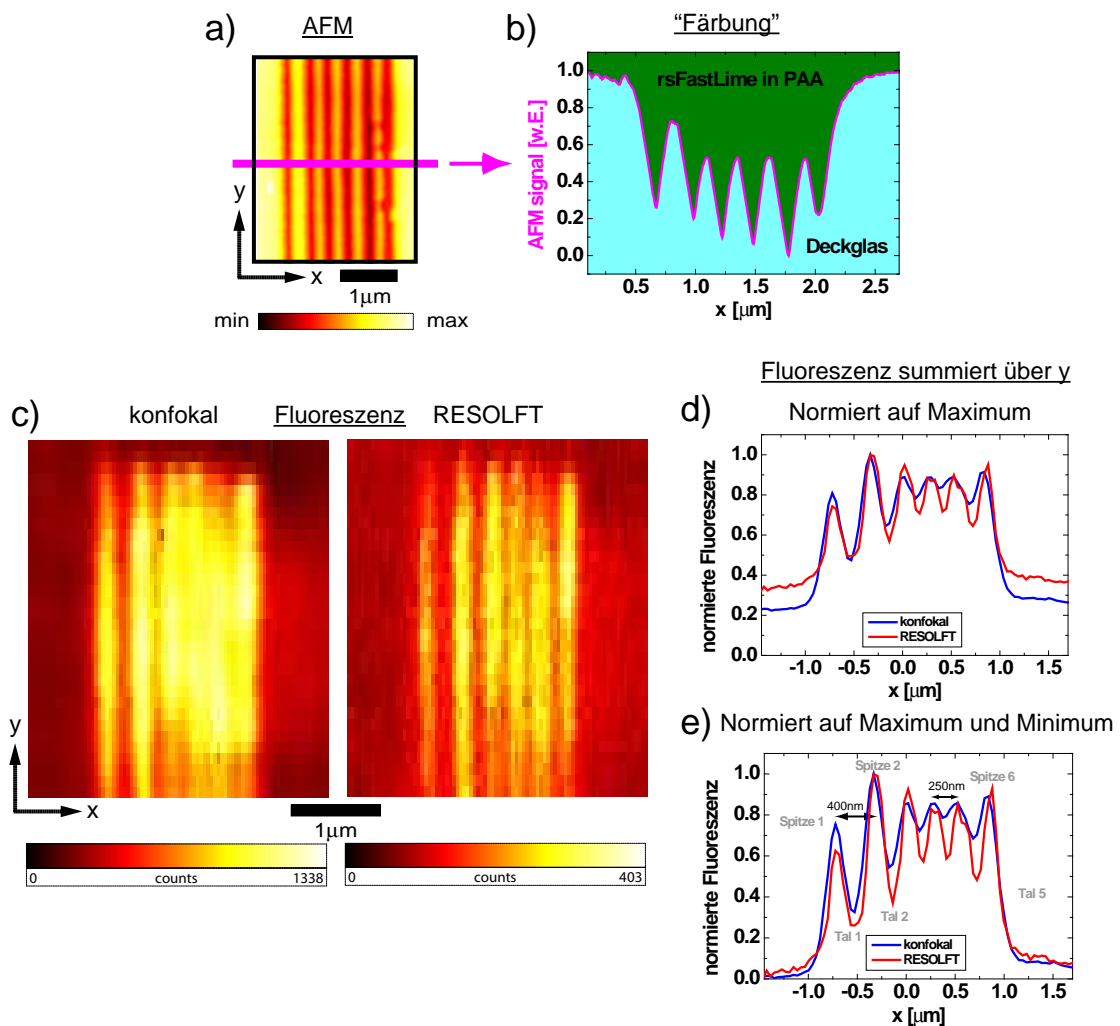
**Tabelle 3.4:** Puls-Parameter zur Aufnahme von Abbildung 3.11.

Bereich der Abfrage-PSF bei gleichzeitiger Minimierung des durch das Einschalten auftretenden Photobleichens (Abbildung 3.6 b,c). Die gewählte Ausschaltleistung und -zeit ergibt ein möglichst geringes Ausschalten während der Abfrage und ermöglicht so eine niedrige Sättigungsleistung  $P_S$  (Abbildung 3.6 d). Die lange Ausschaltzeit von  $t_{\text{aus}} = 130$  ms gewährleistet, dass der nicht durch blaues Licht (405 nm) schaltbare, mit einer Lebenszeit von  $t_D = 1,6$  ms (Abbildung 3.8 b) spontan relaxierende Zustand  $D$  (Abbildung 3.7) am Ende der Ausschaltzeit praktisch nicht besetzt ist (Abbildung 3.9 d), und somit zu keinen Artefakten führen kann (vergleiche Kapitel 3.4.2). Bei einer Ausschaltzeit von  $t_{\text{aus}} = 130$  ms beträgt die Sättigungsleistung  $P_S$  nach Abbildung 3.4.1 f ca. 10 nW. Dies entspricht somit nach Gleichung 1.8 einer Auflösungserhöhung um den Faktor 4,5 gegenüber dem Abbe-Limit, d.h. die theoretische Auflösung beträgt ca. 50nm.

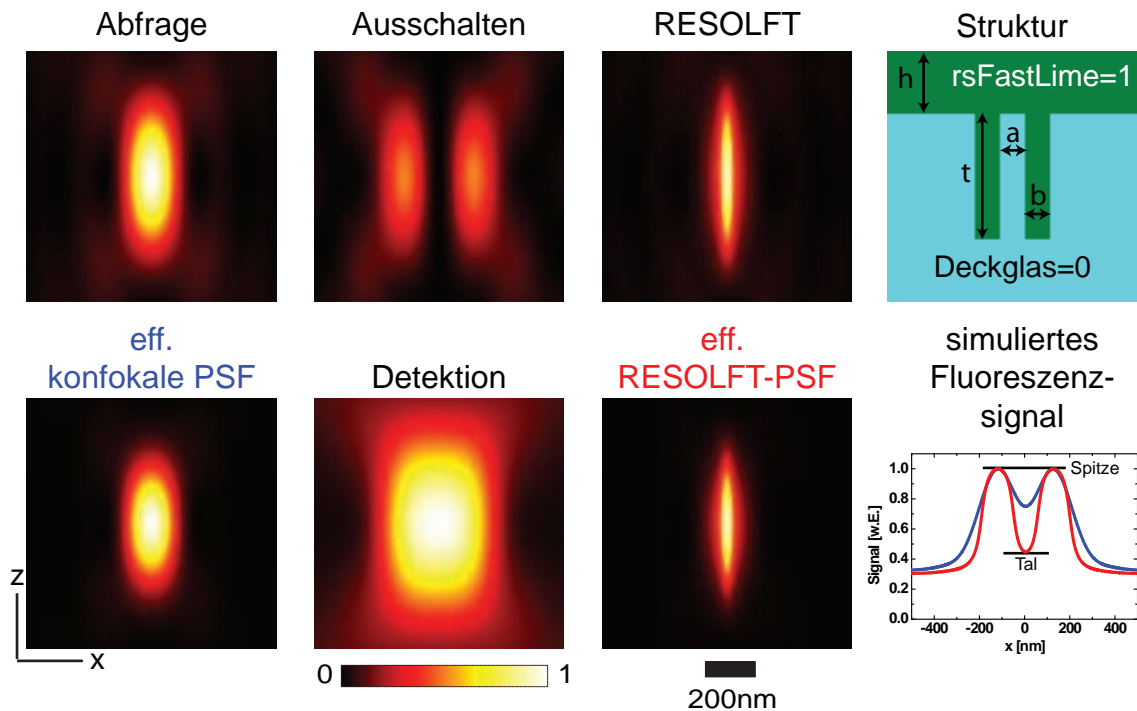
Als Probe zur Demonstration der Auflösungserhöhung wurde ein Mikroskopiedeckglas verwendet, in das mit einem Ionenstrahlverfahren Vertiefungen eingearbeitet wurden (Abbildung 3.11 a). Diese Struktur konnte mit rsFastLime, das in PAA (Polyacrylamid) immobilisiert wurde, ausgefüllt werden (Abbildung 3.11 b). Vom Fraunhofer-Institut für Integrierte Systeme und Bauelementetechnologie (IISB) in Erlangen wurden die Vertiefungen im Deckglas nach folgenden Vorgaben hergestellt: Breite der Vertiefung: 100 nm; Abstand zwischen zwei Vertiefungen: 100 nm (zwischen erster und zweiter Vertiefung), 125 nm, 150 nm, 175 nm, 200 nm (zwischen fünfter und sechster Vertiefung); Länge: 10  $\mu\text{m}$ ; Tiefe: 500 nm bis 1  $\mu\text{m}$  (kann nur sehr schwer spezifiziert werden). Abbildung 3.11 c zeigt das über die Abfragepulse summierte Fluoreszenzsignal (RESOLFT: Abfrage-Puls 1, konfokal: Abfrage-Puls 2). Gegenüber dem konfokalen Bild sind in der RESOLFT-Aufnahme die Furchen der Struktur, in die sich rsFastLime eingelagert hat, deutlicher voneinander getrennt zu sehen. Insbesondere die vier rechten Furchen (Distanz der Fluoreszenzmaxima: ca. 200 nm) sind nur im RESOLFT-Bild über die gesamte Ausdehnung in  $y$  deutlich getrennt voneinander zu sehen. Die beiden weiter entfernt voneinander liegenden linken Furchen (Distanz der Fluoreszenzmaxima ca. 400 nm) sind dagegen in beiden Bildern deutlich getrennt voneinander zu sehen. Da durch die Ausdehnung der PSF in  $z$  auch die Verteilung von rsFastLime außerhalb der Strukturierung des Deckglas erfasst wird, d.h. die praktisch homogene Verteilung oberhalb des Deckglases, sieht man in den Bildern einen deutlichen, außerhalb der Furchen nahezu konstanten, aber niedrigen Hintergrund im Fluoreszenzsignal. Zieht man diesen noch zusätzlich von den Bildern ab, so werden die einzelnen Fluoreszenzspitzen im RESOLFT-Bild noch besser voneinander getrennt (3.11e). Der hier abgezogene Hintergrund wurde durch das Fluoreszenzsignal außerhalb des durch Ionenstrahlen bearbeiteten Bereichs des Deckglas gegeben. Sieht man sich jedoch das AFM-Bild (3.11a) an, so stellt man fest, dass die eigentliche Struktur nicht bis zu diesem ursprünglichen Deckglasrand reicht, sondern insgesamt etwas tiefer liegt. Dies verschlechtert noch einmal die Auflösung der einzelnen Furchen, da dieser



**Abbildung 3.10:** oben: Schematische Darstellung der Abfolge der durch die einzelnen Pulse erzeugten PSF (1-dimensional) zur Bildaufnahme. darunter: Erzeugung der Ausschalt-PSF durch Anwendung einer Phasenplatte. Die Phasenverschiebung um  $\lambda/2$  wird durch eine aufgedampfte Schicht  $\text{MgF}_2$  geeigneter Dicke auf einer Glasplatte erzeugt. Die gezeigte Ausschalt-PSF wurde gemessen und unterliegt starken Abberationen. unten: Laterale 2-dimensionale resultierende RESOLFT-PSF, entstanden aus dem gesättigten Photoschalten in den Dunkelzustand durch die Ausschalt-PSF und anschließender Abfrage der Fluoreszenz durch die Abfrage-PSF (Abfrage- und Ausschalt-PSFs gemessen, RESOLFT-PSF berechnet nach Gleichung 3.10 mit  $A = 0,9$ ,  $F_0 = 0,1$ , entnommen aus dem Fit der Sättigungskurve bei  $t_{\text{aus}} = 130 \text{ ms}$  in Abbildung 3.6 e, und  $P_S = 10 \text{ nW}$ , entnommen aus Abbildung 3.6 f.



**Abbildung 3.11:** Experimentelle Demonstration des RESOLFT Prinzips mit rsFastLime. Als Struktur mit lateralen Dimensionen nahe an der Auflösungsgrenze einer konfokalen PSF wurde ein mit einem Ionenstrahlverfahren bearbeitetes Standard-Mikroskopiedeckglas verwendet und mit rsFastLime in PAA gefüllt. a) AFM Aufnahme einer ähnlichen Struktur [75], nicht exakt identisch mit der Struktur, die für die hier gezeigten Fluoreszenzaufnahmen benutzt wurde, aber unter gleichen Herstellungsbedingungen gefertigt. b) X-Achsen-Schnitt an der lila markierten Stelle. Die Verteilung des Farbstoffes in der Struktur ist schematisch dargestellt. c) Fluoreszenzsignal einer so gefärbten Probe bei einer Bildaufnahme nach dem RESOLFT-Prinzip und konfokales Vergleichsbild. Die Farbkodierung reicht von 0 bis zum Maximum des jeweiligen Bildes. d) Über der y-Achse aufsummiertes Signal. Es wurde jeweils auf das Maximum normiert. e) Normierung auf Maximum und Minimum, wodurch effektiv der Untergrund abgezogen wird. Die bessere Trennung der einzelnen Fluoreszenzspitzen bei der RESOLFT-Bildaufnahme tritt durch die Unterdrückung des Untergrunds deutlicher hervor. Die Abstände der einzelnen Fluoreszenzspitzen variieren, von maximal 400 nm bis ca. 250 nm. Die Angabe und die Nummerierung der Spitzen und Täler bezieht sich auf die Ermittlung der Modulationstiefe  $M$  (siehe Text).



**Abbildung 3.12:** Schematische Darstellung der Simulation der gezeigten Auflösungserhöhung an den Teststrukturen. Oben: Nach einer vektoriellen Theorie [65] berechnete Abfrage- und Ausschalt-PSF. Die RESOLFT-PSF wurde nach Gleichung 3.10 berechnet ( $P_S = 10 \text{ nW}$ ,  $A = 0.86$ ,  $F_0 = 0.14$ , vergleiche Abbildung 3.11 unten, hier  $P_{\text{aus}} = 200 \text{ nW}$ ). Zur Ermittlung der effektiven PSF wurde die Anregungs-PSF (Abfrage und RESOLFT) mit der Detektions-PSF multipliziert (Gleichung 1.4). Die Detektions-PSF ergibt sich aus der Skalierung der Abfrage-PSF auf die mittlere Wellenlänge der Fluoreszenzdetektion (525 nm) und einer Faltung mit einer Kreisscheibe, deren Durchmesser durch die konfokale Detektionsblende bestimmt ist. Das simulierte Fluoreszenzsignal entsteht durch eine Faltung der PSF mit der Struktur. Die Struktur wird dabei durch eine Matrix mit den Werten 0 und 1 dargestellt, wobei 0 dem Deckglas entspricht (kein rsFastLime) und 1 der angenommenen homogenen Verteilung von rsFastLime. Die Struktur ist definiert durch folgende Parameter:  $h$  - Lage der Deckglaskante,  $t$  - Tiefe der Furchen,  $a$  - Abstand der Furchen,  $b$  - Breite der Furchen. Diese Parameter werden zur Anpassung der Daten in Abb3.13a,b variiert. Die Faltung der dreidimensionalen effektiven PSF mit der dreidimensionalen Struktur erfolgt dabei in der Abtastrichtung  $x$ , zur Ermittlung des erhaltenen Signals muss nach der Faltung noch in  $y$  und  $z$  summiert werden. unten: Vergleich der simulierten konfokalen und RESOLFT-Bildaufnahme, normiert auf das jeweilige Maximum. Die Modulationstiefe  $M$  ist durch Gleichung 3.9 definiert, in die das Signal in der Spitze und im Tal eingeht.

Hintergrund nicht abgezogen werden kann, da kein entsprechendes Referenzsignal erfasst werden kann. Die mit rsFastLime gewonnenen RESOLFT-Bilder dieser Struktur können also nicht direkt mit Bildern verglichen werden, die keinen solchen Untergrund zeigen, da sich die Färbung bei diesen nur auf die Oberfläche des Deckglas beschränkt, wie zum Beispiel bei der Färbung einer ähnlichen Struktur mit asFP595 in dieser Arbeit (Kapitel 2.2.2). Zudem besitzt die dort gezeigte Struktur zum Teil andere Abmessungen, so ist besonders der Abstand zwischen den Mitten der einzelnen Vertiefungen bei der Färbung mit asFP595 wesentlich größer (ca. 500 nm), und durch die Adsorptionseigenschaften von asFP595 sind die Strukturen nicht vollständig ausgefüllt, es zeigt sich eine erhöhte Konzentration von asFP595 an den Rändern der Vertiefung. Bei rsFastLime ist es hingegen wahrscheinlich, dass die Vertiefungen wegen der geringen Adsorption des Monomers rsFastLime an Glas und der homogenen Immobilisierung durch PAA praktisch homogen ausgefüllt sind. Die kleinsten Strukturdetails sind somit durch die Abstände der einzelnen Vertiefungen gegeben, von Mitte zu Mitte messen diese zwischen 250 nm und 400 nm und können somit bereits im konfokalen Modus aufgelöst werden, jedoch nur bei der Aufsummierung des Signals in y-Richtung (Abbildung 3.11 f). Im xy-Bild (Abbildung 3.11 c) sind die nahe beieinander liegenden Vertiefungen im rechten Teil des Bildes nicht über die gesamte Länge in y getrennt voneinander wahrnehmbar, wo hingegen dies im RESOLFT Modus über die ganze Länge in y möglich ist.

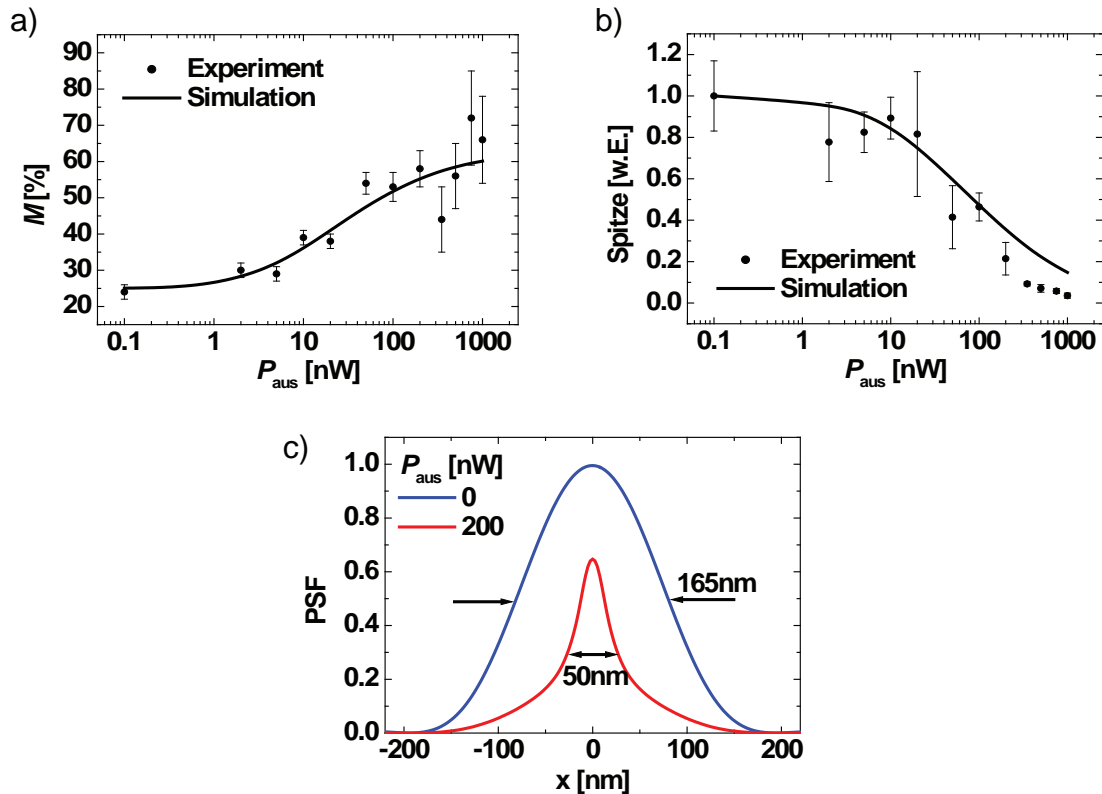
Die Modulationstiefe  $M$  zwischen den Spitzen  $S$  des und den Täler  $T$  des Fluoreszenzsignals ist im weiteren wie folgt definiert:

$$M_x = 1 - \frac{2 \cdot T_x}{S_x + S_{x+1}}, \quad (3.9)$$

wobei  $x$  die Durchnummerierung der Spitzen und der Täler angibt (Abbildung 3.11 e). Die Modulationstiefe  $M$  sollte bei einer Erhöhung der Auflösung zunehmen. Im RESOLFT-Modus liegt eine wesentlich höhere mittlere Modulationstiefe mit steil abfallenden Flanken vor, insbesondere bei den im konfokalen Modus bereits kaum mehr auflösbaren Vertiefungen im Abstand von 250 nm (Tal 2-5, Abbildung 3.11 f). Beim Tal mit der Nr.1 ist keine wesentliche Steigerung der Modulationstiefe erkennbar, vermutlich da die beiden zugehörigen Furchen durch den großen Abstand (Abstand der Fluoreszenzmaxima: 400 nm) bereits im konfokalen Bild deutlich voneinander getrennt sind.

Um nun eine Abschätzung der zugrunde liegenden PSF bei der Bildaufnahme zu erhalten, und dadurch eine Abschätzung der maximal erreichten Auflösung bei den hier gezeigten Aufnahmen zu ermöglichen, wurde nun die Modulationstiefe in Abhängigkeit der Ausschaltleistung aus Bildern wie in Abbildung 3.11 bestimmt und durch eine Simulation, der eine berechnete PSF zu Grunde liegt, angepasst (zur Erläuterung der Simulation siehe Abbildung 3.12). Die RESOLFT-PSF wurde aus den berechneten PSFs mit Hilfe der Fluoreszenzunterdrückung in Abhängigkeit der Ausschaltleistung (Sättigungskurve, Gleichung 3.2) nach folgender Formel berechnet:

$$h_{\text{res}}(x, y, z) = \left( \frac{A}{1 + \frac{P_{\text{aus}}}{P_{\text{S}}}} h_{\text{aus}}(x, y, z) + F_0 \right) h_{\text{Abf}}(x, y, z) \quad (3.10)$$



**Abbildung 3.13:** a) Vergleich der Ergebnisse der Simulation der Modulationstiefe mit experimentellen Daten. b) Fluoreszenz in der Spitze (normiert auf den Wert bei  $P_{\text{aus}} = 0$ ). c) In der Simulation verwendete PSF bei  $P_{\text{aus}} = 0$  und  $P_{\text{aus}} = 200$  nW mit Angabe der FWHM.

mit der Intensitätsverteilung der RESOLFT-PSF  $h_{\text{res}}$ , der Abfrage-PSF  $h_{\text{Abf}}$ , der Ausschalt-PSF  $h_{\text{aus}}$ , der Amplitude der Sättigungskurve  $A$ , der Ausschaltleistung  $P_{\text{aus}}$ , der Sättigungsleistung  $P_{\text{S}}$  und dem Minimum der Sättigungskurve  $F_0$ . Alle PSF wurden dreidimensional berechnet ( $h = h(x, y, z)$ ).

In Abbildung 3.13 a ist die gemessene Modulationstiefe in Abhängigkeit der Ausschaltleistung gezeigt, gemittelt über  $M_3$  bis  $M_5$ . Es wurde nun versucht, die Ergebnisse der Simulation an diese gemessenen Werte anzugleichen. Dazu wurde die Struktur variiert (Abstand  $a$ , Breite  $b$ , Länge  $l$ , Tiefe des Hintergrunds  $t$ , der Wert von  $a + b$  wurde konstant bei 250 nm gehalten, was dem Abstand der Fluoreszenzspitzen  $S_3$  bis  $S_6$  in Abbildung 3.11 e entspricht). Nun wurde versucht, durch geeignete Wahl der Parameter der Struktur zum einen den Verlauf der Modulationstiefe bestmöglich anzupassen, zum anderen wurde darauf geachtet, dass die Höhe des Hintergrunds außerhalb der Struktur bei  $P_{\text{aus}} = 0$  ungefähr dem experimentellen Wert entspricht (ca. 0.3, siehe Abbildung 3.11 e). Die beste Übereinstimmung wurde für folgende Werte gefunden:  $a = 110$  nm,  $b = 140$  nm,  $l = 650$  nm,  $t = 350$  nm. Dies deckt sich weitestgehend mit den Vorgaben zur Anfertigung der Struktur ( $a = 100 - 150$  nm,  $b = 100$  nm,  $l = 500 - 1000$  nm). Es ist eine stetige, eindeutige Verbesserung von  $M$  bis ca.  $P_{\text{aus}} = 200$  nW zu sehen. Danach werden die Fehler der Messdaten zu groß um die



Modulationstiefe noch verlässlich zu messen, da das Signal mit zunehmender kleinerer PSF entsprechend abnimmt, wie in Abbildung 3.13 b gezeigt. Die Simulation zeigt hier bereits eine deutliche Abnahme bei hohen Ausschaltleistungen, die komplett auf diese Verkleinerung der PSF zurückgeführt werden kann. Für die noch größere Abnahme der Fluoreszenz in den Spitzen bei den experimentellen Ergebnissen für  $P_{\text{aus}} > 200 \text{ nW}$  dürfte zum einen irreversibles Photobleichen verantwortlich sein, zum anderen eine Auffüllung der Nullstelle in der Ausschalt-PSF durch Aberrationen, und damit eine zusätzliche Reduktion der Intensität der RESOLFT-PSF (vergleiche Abbildung 2.9). Da verlässliche Messergebnisse also nur bis zu einer Ausschaltleistung von  $P_{\text{aus}} = 200 \text{ nW}$  erhalten werden konnten, und somit bei dieser Leistung die beste Auflösung vorliegt, die experimentell verifiziert werden kann, wurden die Bildaufnahmen in Abbildung 3.11 c bei dieser Leistung durchgeführt. Um die zugehörige Auflösungserhöhung abzuschätzen zu können, sind in Abbildung 3.13 c die zur Simulation der Modulationstiefe verwendeten theoretischen PSF bei  $P_{\text{aus}} = 0 \text{ nW}$  und  $200 \text{ nW}$  zum Vergleich gezeigt. Die FWHM der PSF hat sich bei einer Leistung von  $P_{\text{aus}} = 200 \text{ nW}$  ungefähr um den Faktor 3 verkleinert, was somit ungefähr auch der erzielten Auflösungssteigerung in Abbildung 3.13 c entsprechen dürfte. Eine absolute Angabe der erzielten Auflösung ist jedoch nur schwer möglich, da in die hier gezeigte Simulation, mit der die Modulationstiefe angepasst wurde, viele vereinfachende Annahmen eingehen, wie die Darstellung der Struktur oder die Verwendung von berechneten PSFs. So ist z.B die FWHM der gemessenen Abfrage-PSF (200 nm, Abbildung 3.10), möglicherweise auf Grund von Aberrationen, größer als die der berechneten Abfrage-PSF (165 nm, Abbildung 3.13 c). Es kann jedoch abgeschätzt werden, dass eine Auflösung zwischen 50 nm und 100 nm erreicht wurde.

## 4 Diskussion und Ausblick

In dieser Arbeit wurde zum ersten Mal experimentell gezeigt, dass die Fernfeld-Mikroskopie unterhalb der physikalischen Beugungsgrenze mit Hilfe von photoschaltbaren Fluoreszenzmarkern realisiert werden kann. Mit den in dieser Arbeit verwendeten photoschaltbaren Proteinen asFP595 und rsFastLime wurde eine Auflösung in einer Dimension der Fokalebene von 50-100 nm erreicht. Theoretisch ist die Auflösung jedoch in allen Dimensionen unbegrenzt.

Neben der seit einigen Jahren realisierten und bereits auch für biologische Fragestellungen angewandten STED-Mikroskopie wurde somit zum ersten Mal die Funktionsfähigkeit einer weiteren Unterart der Familie der RESOLFT-Mikroskopie gezeigt und somit deren Generalität bewiesen [38]. Da die Konkurrenzprozesse zur Fluoreszenzunterdrückung um mehrere Größenordnungen kleiner sind als bei der stimulierten Emission (STED), konnte eine vergleichbare, zur Auflösungserhöhung nötige Sättigung der Fluoreszenzunterdrückung bereits bei Intensitäten erreicht werden, die um ca. neun Größenordnungen kleiner sind als bei der STED-Mikroskopie (STED:  $\text{GW}/\text{cm}^2$ , photoschaltbare Proteine:  $\text{W}/\text{cm}^2$ ). Die hohen Intensitäten beim STED-Verfahren führen zu einem erheblichen Photostress der abzubildenden Objekte, beispielsweise durch Photobleichen, welches somit durch den vorgestellten Ansatz vermieden wird.

Der Beweis, das RESOLFT nicht nur durch die Ausnutzung des Grundzustand des Singulett-Systems, wie bei STED, sondern auch prinzipiell durch die Ausnutzung anderer Dunkelzustände verwirklicht werden kann, stimulierte die experimentelle Umsetzung weiterer RESOLFT-Unterarten wie beispielsweise die Ausnutzung des Triplett-Zustands als Dunkelzustand (Ground State Depletion, GSD, [44]) oder die Verwendung von optisch bistabilen organischen Fluoreszenzmarkern [76].

In der Folge der veröffentlichten RESOLFT-Verfahren haben sich weitere Techniken in der nanoskopischen Bildgebung entwickelt [77, 78], die auch photoschaltbare Proteine und Farbstoffe wie beispielsweise rsFastLime [75, 79] verwenden und auf deren gezielten Aktivierung und Lokalisierung einzelner fluoreszenter Marker basieren. Da auch bei dieser nanoskopischen Methode neue Erkenntnisse des generellen Schaltverhaltens von photoschaltbaren Proteinen wie rsFastLime oder asFP595 von Vorteil sind, leisten die in dieser Arbeit erarbeiteten experimentellen und theoretischen Ergebnisse zur Photophysik auch hier einen Beitrag.

Bei STED kommen wegen der benötigten hohen Leistungen üblicherweise gepulste fs - ps Laser zum Einsatz. Zudem muss die Fluoreszenzunterdrückung auf einer Zeitskala kleiner der Fluoreszenzlebensdauer des angeregten Zustandes, die bei den meisten Farbstoffen bei wenigen Nanosekunden liegt, stattfinden. Dies erfordert eine Synchronisation der Anregungs- und Abregungspulse im Bereich von Pikosekunden. Durch die hohe Stabilität

des Dunkel- und fluoreszierenden Zustands bei den in dieser Arbeit verwendeten photoschaltbaren Proteinen, deren Relaxationszeiten im Bereich von Sekunden bis Tagen liegen, können hier Dauerstrichlaser mit sehr niedriger Leistung verwendet werden, wie sie in jedem herkömmlichen konfokalen Mikroskop zum Einsatz kommen, zum Beispiel luftgekühlte Argon-, Festkörper- oder Diodenlaser, eventuell sogar einfache Lichtquellen wie Quecksilberdampflampen. Die Abfolge und Dauer des Lichts zum Einschalten, Ausschalten und zur Fluoreszenzanregung der Proteine kann in nahezu beliebiger Weise durch akustooptische Modulatoren oder mechanische Verschlüsse und einer einfachen Synchronisation im ms-Bereich erfolgen.

Neben dieser einfachen und kostengünstigen technischen Handhabung kann wegen der niedrigen benötigten Intensität zur Fluoreszenzunterdrückung die Leistung des in die Pupille eintretenden Lichts auch ohne technisch hohen Aufwand auf eine sehr große Fläche in der Objektebene verteilt werden. Dies hat als Folge der hier präsentierten Ergebnisse den Einsatz von photoschaltbaren Proteinen in der Weitfeld-Mikroskopie unterhalb der Beugungsgrenze möglich gemacht [80]. Im Gegensatz zur Verwendung von nur einer Nullstelle der Ausschaltintensität (wie in dieser Arbeit) können durch die weitflächige Beleuchtung mit einer sinusförmigen Ausschaltintensität mehrere Nullstellen erzeugt werden, wodurch eine parallelisierte und damit wesentlich schnellere Bildaufnahme möglich ist. Solch eine beschleunigte Bildaufnahme ist insbesondere bei der Bilderzeugung von dynamischen Vorgängen in Zellen ein entscheidendes Kriterium. Daneben ist die Verwendung von fluoreszierenden Proteinen generell eine der wenigen und bei weitem die am meisten angewandte Methode, Zellen im lebenden Zustand für die Fluoreszenz-Mikroskopie zu markieren.

Zu Anfang dieser Arbeit wurde die RESOLFT-Mikroskopie im STED-Verfahren hauptsächlich mit organischen Farbstoffen durchgeführt. Die zu untersuchenden Zellen konnten mit einer Antikörperfärbung markiert werden, was im allgemeinen jedoch eine spezielle Präparation der Zellen voraussetzt, bei der wiederum die Zellen abgetötet werden. Es konnte jedoch während der Anfertigung dieser Arbeit gezeigt werden, dass die STED-Mikroskopie auch mit dem bei weitem am meisten eingesetzten grün fluoreszierenden Protein GFP möglich ist [81]. Der Einsatz von GFP als Fluoreszenzmarker ist jedoch bei der STED-Mikroskopie wiederum durch den auftretenden Photostress eingeschränkt.

In dieser Arbeit wurde nun gezeigt, dass auch der Einsatz von photoschaltbaren Proteinen in der RESOLFT-Mikroskopie möglich ist, wodurch sich der Anwendungsspielraum der Fluoreszenzproteine für die Mikroskopie unterhalb der Beugungsgrenze noch einmal erheblich erweitert hat. Zudem bietet der „Werkzeugkasten“ der Natur bei Proteinen die einzigartige Möglichkeit, diese durch gezielte Mutation ihres Genoms für die jeweilige Anwendung zu optimieren. Im Fall von asFP595 und Dronpa wurde dies bereits intensiv betrieben [70, 55]. Wie in dieser Arbeit gezeigt, konnte erst die verbesserte Variante von Dronpa, rsFastLime, zur hochauflösenden Mikroskopie verwendet werden. rsFastLime weist gegenüber Dronpa ein schnelleres Ausschalten und zudem ein reduziertes Photobleichen auf. Bei den in dieser Arbeit untersuchten mit rsFastLime gefärbten Teststrukturen konnte hiermit ein gegenüber der Färbung mit Dronpa erheblich gesteigertes Fluoreszenzsignal erreicht werden. Dies ermöglichte erst die experimentelle Umsetzung der Auflösungserhöhung in der RESOLFT-Mikroskopie im Ausschalt-Abfrage Verfahren mit einer Mutante des bekannten

photoschaltbaren Proteins Dronpa.

Bei der Anwendung des Ausschalt-Abfrage Verfahrens muss beachtet werden, daß während der Abfrage auch ein gleichzeitiges Ausschalten der Fluoreszenz stattfindet, welches effektiv zu einer Verbreiterung des fokalen Spots und damit zu einer Verringerung der erreichbaren Auflösung führt. Der spektroskopische Grund für diesen Nachteil liegt in dem Übersprechen der Ausschaltwellenlänge mit der Wellenlänge zur Anregung der Fluoreszenz. Somit könnte die RESOLFT-Mikroskopie mit rsFastLime durch eine spezifisch trennbare Fluoreszenzanregung und -unterdrückung verbessert werden, was beispielsweise durch eine geeignete Mutagenese möglich sein könnte.

Es wäre auch bereits vorteilhaft, wenn man im Fall von rsFastLime das Übersprechen so verschieben könnte, dass nicht die Ausschaltwellenlänge, sondern die Einschaltwellenlänge mit der Wellenlänge zur Fluoreszenzanregung zusammenfällt, wie es bei asFP595 erfolgt. Hier war in der RESOLFT-Mikroskopie, wie in dieser Arbeit gezeigt, die einfache, gleichzeitige Anwendung der Einschalt-PSF und der Ausschalt-PSF möglich, wodurch ein dynamisches Gleichgewicht in der Besetzung der Zustände erreicht wurde, in dem im Prinzip eine beliebig lange Abfrage der Fluoreszenz möglich ist, welche nur durch das Photobleichen beschränkt wäre. Signalprobleme wie bei der Ausschalt-Abfrage Methode würden vermieden werden.

rsFastLime bietet gegenüber asFP595 jedoch einen entscheidenden Vorteil bei der Färbung von Zellen, da es nicht wie asFP595 als Tetramer, sondern als Monomer vorliegt. Bei der Fusion eines Zellproteins mit einem Fluoreszenzprotein entsteht ein so genanntes Tandemprotein. Durch die starke Affinität von asFP595 zur Bildung von Tetrameren kann es somit vorkommen, dass mehrere Tandemproteine miteinander verknüpft werden. Dies könnte die Funktionalität des Zellproteins in der Zelle stören und somit zu biologischen Artefakten durch die Markierung führen. Das Protein asFP595 weist, wie in dieser Arbeit gezeigt (siehe die Färbung der Teststruktur zu den Bildaufnahmen, Kapitel 2.2.2) eine Tendenz zur Agglomeration auf, die in Zusammenhang mit der Affinität zur Tetramerbildung gesehen werden kann. Die Tetramerbildung von asFP595 könnte durch gezielte Mutagenese und der Bildung eines funktionstüchtigen Monomers in Zukunft behoben werden. So wurde bereits das fluoreszierende Protein DsRed von einem Tetramer durch gezielte Mutation in ein Monomer übergeführt [82].

Die Verbesserung der RESOLFT-Mikroskopie mit photoschaltbaren Proteinen wird von zwei Entwicklungen abhängen:

- Verbesserung der photophysikalischen Eigenschaften der fluoreszierenden Proteine im Hinblick auf ihre Anwendung in der RESOLFT-Mikroskopie, insbesondere als Marker in lebenden Zellen zur Klärung biologischer Fragestellungen. Konkret sind dies optimiertes Schalten mit wenig Überlapp zwischen Fluoreszenzanregung, Aktivierung und Unterdrückung, Minimierung des Photobleichens, Monomerisierung der Proteinstruktur und Maximierung der Fluoreszenzausbeute. Durch Optimierung können dann sehr hohe Sättigungsfaktoren der Fluoreszenzunterdrückung und somit sehr hohe Auflösungen erreicht werden, da eine technische Intensitätsbeschränkung durch eine be-

schränkte Laserleistung im Grunde nicht besteht.

- Der Einsatz von photoschaltbaren Proteinen in der Weitfeld-Mikroskopie unterhalb der Beugungsgrenze bietet das Potential, zeitaufgelöst Vorgänge in lebenden Zellen über ein großes Bildfeld aufzunehmen, und somit Vorgänge in lebenden Proben auf zellorganeller Ebene sichtbar zu machen.

Das Potential der in dieser Arbeit erstmals realisierten RESOLFT-Mikroskopie mit photoschaltbaren Proteinen ist somit noch lange nicht ausgeschöpft, und es kann in der Zukunft mit weiteren bemerkenswerten Entwicklungen und Einblicken gerechnet werden.

# Literaturverzeichnis

- [1] R. Hooke. *Micrographia: or, Some physiological descriptions of minute bodies made by magnifying glasses*. J. Martyn and J. Allestry, London, first edition, 1665.
- [2] P. Ehrlich. Methodologische Beiträge zur Physiologie und Pathologie der Leukozyten. *Zeitschrift für klinische Medizin*, 1:553, 1880.
- [3] E. Abbe. Beiträge zur Theorie des Mikroskops und der mikroskopischen Wahrnehmung. *Arch. f. Mikr. Anat.*, 9:413–420, 1873.
- [4] M. Knoll and E. Ruska. Beitrag zur geometrischen Elektronenoptik I. *Annalen der Physik*, 12(5):607–640, 1932.
- [5] M. Knoll and E. Ruska. Beitrag zur geometrischen Elektronenoptik II. *Annalen der Physik*, 12(6):641–661, 1932.
- [6] M. Knoll and E. Ruska. Das Elektronenmikroskop. *Zeitschrift für Physik*, 78:318–339, 1932.
- [7] A.I. Kirkland and L. Hutchinsons. Atomic resolution transmission electron microscopy. In P.W. Hawkes and J.C. Spence, editors, *Science of Microscopy*, volume 1, pages 3–64. Springer, 2007.
- [8] G. Binnig, C.F. Quate, and C. Gerber. Atomic force microscope. *Phys. Rev. Lett.*, 56:930–933, 1986.
- [9] G. Binnig and H. Rohrer. Scanning tunneling microscopy. *Helv. Phys. Acta*, 55:726–735, 1982.
- [10] E.H. Syngé. A suggested method for extending microscopic resolution into the ultra-microscopic region. *Philos. Mag.*, 6:356, 1928.
- [11] A. Lewis, M. Isaacson, A. Harootunian, and A. Murray. Development of a 500 Å Resolution Light Microscope. *Ultramicroscopy*, 13:227–231, 1984.
- [12] D.W. Pohl, W. Denk, and M. Lanz. Optical stethoscopy: Image recording with resolution  $1/20$ . *Appl. Phys. Lett.*, 44:651–653, 1984.
- [13] F. de Lange, A. Cambi, R. Huijbens, B. de Bakker, W. Rensen, M. Garcia-Parajo, N. van Hulst, and C.G. Figdor. Cell biology beyond the diffraction limit: near-field scanning optical microscopy. *J. Cell Sci.*, 114(23):4153–4160, 2001.

- [14] H. Siedentopf and R. Zsigmondy. Visualisation and determination of size of ultra microscopic particles, with special use of Goldrubin glasses. *Annalen der Physik*, 10(1):1–39, 1902.
- [15] F. Zernike. Inflection theory of the cutting method and its improved form, the phase contrast method. *Physica*, 1:689–704, 1934.
- [16] F. Zernike. The phase contrast process in microscopic examinations. *Physikalische Zeitschrift*, 36:848–851, 1935.
- [17] R.Y. Tsien. The green fluorescent protein. *Annu. Rev. Biochem.*, 67(1):509–544, 1998.
- [18] M. Minsky. Microscopy apparatus, US Patent 3,013,467, 1961.
- [19] D. Magde, E.L. Elson, and W.W. Webb. Thermodynamic fluctuations in a reacting system - measurement by fluorescence correlation spectroscopy. *Phys. Rev. Lett.*, 29(11):705–708, 1972.
- [20] M. Eigen and R. Rigler. Sorting single molecules: applications to diagnostics and evolutionary biotechnology. *P. Natl. Acad. Sci. USA*, 91:5740–5747, 1994.
- [21] S.W. Paddock. *Confocal microscopy*. Humana Press, Totowa, NJ, USA, 1999.
- [22] T. Wilson (ed.). *Confocal microscopy*. Academic Press Ltd., London, 1990.
- [23] M. Born and E. Wolf. *Principles of Optics*. Cambridge University Press, Cambridge, seventh (expanded) edition, 1999.
- [24] J.B. Pawley. Fundamental and practical limits in confocal light microscopy. *Scanning*, 13:184–198, 1991.
- [25] S. Hell and E.H.K. Stelzer. Properties of a 4Pi-confocal fluorescence microscope. *J. Opt. Soc. Am. A*, 9:2159–2166, 1992.
- [26] S.W. Hell, S. Lindek, C. Cremer, and E.H.K. Stelzer. Measurement of the 4Pi-confocal point spread function proves 75 nm resolution. *Appl. Phys. Lett.*, 64(11):1335–1338, 1994.
- [27] B. Albrecht, A.V. Failla, A. Schweizer, and C. Cremer. Spatially modulated illumination microscopy allows axial distance resolution in the nanometer range. *Appl. Optics*, 41(1):80–87, 2002.
- [28] A. Egner, S. Verrier, A. Goroshkov, H.-D. Söling, and S.W. Hell. 4Pi-microscopy of the Golgi apparatus in live mammalian cells. *J. Struct. Biol.*, 147(1):70–76, 2004.
- [29] G. Hildenbrand, R. Rapp, S. U., C. Wagner, C. Cremer, and M. Hausmann. Nano-sizing of specific gene domains in intact human cell nuclei by Spatially Modulated Illumination (SMI) light microscopy. *Biophys. J.*, 88:4312–4318, 2005.

- [30] S.W. Hell. Far-Field Optical Nanoscopy. *Science*, 316(5828):1153–1158, 2007.
- [31] Y.R. Shen. *The principles of nonlinear optics*. John Wiley And Sons, 1 edition, 1984.
- [32] S.W. Hell and J. Wichmann. Breaking the diffraction resolution limit by stimulated emission: stimulated emission depletion microscopy. *Opt. Lett.*, 19(11):780–782, 1994.
- [33] S.W. Hell and M. Kroug. Ground-state depletion fluorescence microscopy, a concept for breaking the diffraction resolution limit. *Appl. Phys. B*, 60:495–497, 1995.
- [34] T.A. Klar, S. Jakobs, M. Dyba, A. Egner, and S.W. Hell. Fluorescence microscopy with diffraction resolution limit broken by stimulated emission. *P. Natl. Acad. Sci. USA*, 97:8206–8210, 2000.
- [35] S.W. Hell, S. Jakobs, and L. Kastrup. Imaging and writing at the nanoscale with focused visible light through saturable optical transitions. *Appl. Phys. A*, 77:859–860, 2003.
- [36] S.W. Hell, M. Dyba, and S. Jakobs. Concepts for nanoscale resolution in fluorescence microscopy. *Curr. Opin. Neurobio.*, 14(5):599–609, 2004.
- [37] S.W. Hell. Strategy for far-field optical imaging and writing without diffraction limit. *Phys. Lett. A*, 326(1-2):140–145, 2004.
- [38] M. Hofmann, C. Eggeling, S. Jakobs, and S.W. Hell. Breaking the diffraction barrier in fluorescence microscopy at low light intensities by using reversibly photoswitchable proteins. *P. Natl. Acad. Sci. USA*, 102(49):17565–17569, 2005.
- [39] G. Donnert, J. Keller, R. Medda, M.A. Andrei, S.O. Rizzoli, R. Lührmann, R. Jahn, C. Eggeling, and S.W. Hell. Macromolecular-scale resolution in biological fluorescence microscopy. *P. Natl. Acad. Sci. USA*, 103(31):11440–11445, 2006.
- [40] V. Westphal and S.W. Hell. Nanoscale Resolution in the Focal Plane of an Optical Microscope. *Phys. Rev. Lett.*, 94:143903, 2005.
- [41] R.J. Kittel, C. Wichmann, T.M. Rasse, W. Fouquet, M. Schmidt, A. Schmid, D.A. Wagh, C. Pawlu, R. Kellner, K.I. Willig, S.W. Hell, E. Buchner, M. Heckmann, and S.J. Sigrist. Bruchpilot Promotes Active Zone Assembly, Ca<sup>2+</sup>-Channel Clustering, and Vesicle Release. *Science*, 312:1051–1054, 2006.
- [42] K.I. Willig, S.O. Rizzoli, V. Westphal, R. Jahn, and S.W. Hell. STED-microscopy reveals that synaptotagmin remains clustered after synaptic vesicle exocytosis. *Nature*, 440(7086):935 – 939, 2006.
- [43] M. Dyba and S.W. Hell. Photostability of a fluorescent marker under pulsed excited-state depletion through stimulated emission. *Appl. Optics*, 42(25):5123–5129, 2003.
- [44] S. Bretschneider, C. Eggeling, and S.W. Hell. Breaking the Diffraction Barrier in Fluorescence Microscopy by Optical Shelving. *Phys. Rev. Lett.*, 98:218103, 2007.



- [45] R. Heintzmann, T.M. Jovin, and C. Cremer. Saturated patterned excitation microscopy - A concept for optical resolution improvement. *J. Opt. Soc. Am. A*, 19(8):1599–1609, 2002.
- [46] M.G.L. Gustafsson. Nonlinear structured-illumination microscopy: Wide-field fluorescence imaging with theoretically unlimited resolution. *P. Natl. Acad. Sci. USA*, 102(37):13081–13086, 2005.
- [47] M. Bossi, V. Belov, S. Polyakova, and S.W. Hell. Reversible red fluorescent molecular switches. *Angew. Chem. Int. Ed.*, 45(44):7462–7465, 2006.
- [48] J.C. Crano and R.J. Guglielmetti, editors. *Organic Photocromic and Thermocromic Compounds, Volume 1: Photochromic Families*. Topics in Applied Chemistry. Springer, Berlin, 1999.
- [49] B.L. Feringa, editor. *Molecular Switches*. Wiley-VCH, Weinheim, 2001.
- [50] M. Irie, T. Fukaminato, T. Sasaki, N. Tamai, and T. Kawai. A digital fluorescent molecular photoswitch. *Nature*, 420(6917):759–760, 2002.
- [51] K.A. Lukyanov, A.F. Fradkov, N.G. Gurskaya, M.V. Matz, Y.A. Labas, A.P. Savitsky, M.L. Markelov, A.G. Zaraisky, X. Zhao, Y. Fang, W. Tan, and S.A. Lukyanov. Natural animal coloration can be determined by a nonfluorescent green fluorescent protein homolog. *J. Biol. Chem.*, 275(34):25879–25882, 2000.
- [52] R.A.G. Cinelli, V. Pellegrini, A. Ferrari, P. Faraci, R. Nifosi, M. Tyagi, M. Giacca, and F. Beltram. Green fluorescent proteins as optically controllable elements in bioelectronics. *Appl. Phys. Lett.*, 79(20):3353–3355, 2001.
- [53] R. Ando, H. Mizuno, and A. Miyawaki. Regulated Fast Nucleocytoplasmic Shuttling Observed by Reversible Protein Highlighting. *Science*, 306(5700):1370–1373, 2004.
- [54] V.I. Martynov, A.P. Savitsky, N.Y. Martynova, P.A. Savitsky, K.A. Lukyanov, and S.A. Lukyanov. Alternative cyclization in GFP-like proteins family. The formation and structure of the chromophore of a purple chromoprotein from *Anemonia Sulcata*. *J. Biol. Chem.*, 276(24):21012–21016, 2001.
- [55] M. Andresen, M.C. Wahl, A.C. Stiel, F. Gräter, L.V. Schäfer, S. Trowitzsch, G. Weber, C. Eggeling, H. Grubmüller, S.W. Hell, and S. Jakobs. Structure and mechanism of the reversible photoswitch of a fluorescent protein. *P. Natl. Acad. Sci. USA*, 102(37):13070–13074, 2005.
- [56] I.V. Yampolsky, S.J. Remington, V.I. Martynov, V.K. Potapov, S. Lukyanov, and K.A. Lukyanov. Synthesis and Properties of the Chromophore of the asFP595 Chromoprotein from *Anemonia sulcata*. *Biochem.*, 44:5788–5793, 2005.

- [57] D.M. Chudakov, A.V. Feofanov, N.N. Mudriku, S. Lukyanov, and K.A. Lukyanov. Chromophore environment provides clue to "kindling fluorescent protein" riddle. *J. Biol. Chem.*, 278(9):7215–7219, 2003.
- [58] D.M. Chudakov, V.V. Belousov, A.G. Zaraisky, V.V. Novoselov, D.B. Staroverov, D.B. Zorov, S. Lukyanov, and K.A. Lukyanov. Kindling fluorescent proteins for precise in vivo photolabeling. *Nat. Biotechnol.*, 21(2):191–194, 2003.
- [59] C. Eggeling, J. Widengren, R. Rigler, and C.A.M. Seidel. Photobleaching of fluorescent dyes under conditions used for single-molecule detection: Evidence of two-step photolysis. *Anal. Chem.*, 70:2651–2659, 1998.
- [60] M.F. Garcia-Parajo, G.M.J. Segers-Nolten, J.-A. Veerman, J. Greve, and N.F. van Hulst. Real-time light-driven dynamics of the fluorescence emission in single green fluorescent protein molecules. *P. Natl. Acad. Sci. USA*, 97(13):7237–7242, 2000.
- [61] G.S. Harms, L. Csognet, P.H.M. Lommerse, G.A. Blab, and T. Schmidt. Autofluorescent proteins in single-molecule research: Applications to live cell imaging microscopy. *Biophys. J.*, 80:2396–2408, 2001.
- [62] M. Prummer and M. Weiss. Bulk fluorescence measurements cannot probe the survival-time distribution of single molecules. *Phys. Rev. E*, 74(2):–, 2006.
- [63] M.F. Garcia-Parajo, M. Koopman, E.M.H.P. van Dijk, V. Subramaniam, and N.F. van Hulst. The nature of fluorescence emission in the red fluorescent protein DsRed revealed by single-molecule detection. *P. Natl. Acad. Sci. USA*, 98(25):14392–14397, 2001.
- [64] B. Lounis, J. Deich, F.I. Rosell, S.G. Boxer, and W.E. Moerner. Photophysics of DsRed, a red fluorescent protein, from the ensemble to the single-molecule level. *J. Phys. Chem. B*, 105:5048–5054, 2001.
- [65] B. Richards and E. Wolf. Electromagnetic diffraction in optical systems II. Structure of the image field in an aplanatic system. *P. R. Soc. A*, 253:358–379, 1959.
- [66] W.H. Richardson. Bayesian-based iterative method of image restoration. *J. Opt. Soc. Am.*, 62:55–59, 1972.
- [67] P.G. Wilmann, K. Turcic, J.M. Battad, M.C.J. Wilce, R.J. Devenish, M. Prescott, and J. Rossjohn. The 1.7 angstrom crystal structure of Dronpa: A photoswitchable green fluorescent protein. *J. Mol. Biol.*, 364(2):213–224, 2006.
- [68] M. Andresen, A.C. Stiel, S. Trowitzsch, G. Weber, C. Eggeling, M.C. Wahl, S.W. Hell, and S. Jakobs. Structural basis for reversible photoswitching in Dronpa. *P. Natl. Acad. Sci. USA*, 104:13005–13009, 2007.

- [69] S. Habuchi, R. Ando, P. Dedecker, W. Verheijen, H. Mizuno, A. Miyawaki, and J. Hofkens. Reversible single-molecule photoswitching in the GFP-like fluorescent protein Dronpa. *P. Natl. Acad. Sci. USA*, 102(27):9511–9516, 2005.
- [70] A.C. Stiel, S. Trowitzsch, G. Weber, M. Andresen, C. Eggeling, S.W. Hell, S. Jakobs, and M.C. Wahl. 1.8 Å bright-state structure of the reversibly switchable fluorescent protein Dronpa guides the generation of fast switching variants. *Biochem. J.*, 402(1):35–42, 2007.
- [71] C. Eggeling, M. Hilbert, H. Bock, C. Ringemann, M. Hofmann, A.C. Stiel, M. Andresen, S. Jakobs, A. Egner, A. Schönle, and S.W. Hell. Reversible photoswitching enables single-molecule fluorescence fluctuation spectroscopy at high molecular concentration. *Microsc. Res. Techniq.*, DOI 10.1002/jemt.20505, 2007.
- [72] S. Habuchi, P. Dedecker, J. Hotta, C. Flors, R. Ando, H. Mizuno, A. Miyawaki, and J. Hofkens. Photo-induced protonation/deprotonation in the GFP-like fluorescent protein Dronpa: mechanism responsible for the reversible photoswitching. *Photoch. Photobio. Sci.*, 5:567–576, 2006.
- [73] E. Füreder-Kitzmüller, J. Hesse, A. Ebner, H.J. Gruber, and G.J. Schutz. Non-exponential bleaching of single bioconjugated Cy5 molecules. *Chem. Phys. Lett.*, 404(1-3):13–18, 2005.
- [74] B. Valeur. *Molecular fluorescence*. Wiley-VCH Verlag, Weinheim, 1st edition, 2002.
- [75] C. Geisler, A. Schönle, C. von Middendorff, H. Bock, C. Eggeling, A. Egner, and S.W. Hell. Resolution of 1/10 in fluorescence microscopy using fast single molecule photoswitching. *Appl. Phys. A*, 88(2):223–226, 2007.
- [76] J. Fölling, V. Belov, R. Kunetsky, R. Medda, A. Schönle, A. Egner, C. Eggeling, M. Bossi, and S.W. Hell. Photochromic Rhodamines Provide Nanoscopy with Optical Sectioning. *Angew. Chem. Int. Ed.*, 46:6266–6270, 2007.
- [77] E. Betzig, G.H. Patterson, R. Sougrat, O.W. Lindwasser, S. Olenych, J.S. Bonifacino, M.W. Davidson, J. Lippincott-Schwartz, and H.F. Hess. Imaging Intracellular Fluorescent Proteins at Nanometer Resolution. *Science*, 313(5793):1642–1645, 2006.
- [78] M.J. Rust, M. Bates, and X. Zhuang. Sub-diffraction-limit imaging by stochastic optical reconstruction microscopy (STORM). *Nat. Methods*, 3:793–796, 2006.
- [79] A. Egner, C. Geisler, C. von Middendorff, H. Bock, D. Wenzel, R. Medda, M. Andresen, A.-C. Stiel, S. Jakobs, C. Eggeling, A. Schönle, and S.W. Hell. Fluorescence nanoscopy in whole cells by asynchronous localization of photoswitching emitters. *Biophys. J.*, DOI: 10.1529/biophysj.107.112201, 2007.

- [80] M. Schwentker, H. Bock, M. Hofmann, S. Jakobs, J. Bewersdorf, C. Eggeling, and S.W. Hell. Wide-field subdiffraction RESOLFT microscopy using fluorescent protein photoswitching. *Microsc. Res. Techniq.*, 70(3):269–280, 2007.
- [81] K.I. Willig, R.R. Kellner, R. Medda, B. Hein, S. Jakobs, and S.W. Hell. Nanoscale resolution in GFP-based microscopy. *Nat. Methods*, 3(9):721–723, 2006.
- [82] R.E. Campbell, O. Tour, A.E. Palmer, P.A. Steinbach, G.S. Baird, D.A. Zacharias, and R.Y. Tsien. A monomeric red fluorescent protein. *P. Natl. Acad. Sci. USA*, 99(12):7877–7882, 2002.
- [83] C. Eggeling, A. Volkmer, and C.A.M. Seidel. Molecular Photobleaching Kinetics of Rhodamine 6G by One- and Two-Photon Induced Confocal Fluorescence Microscopy. *ChemPhysChem*, 6:791–804, 2005.
- [84] R.A.G. Cinelli, A. Ferrari, V. Pellegrini, M. Tyagi, M. Giacca, and F. Beltram. The Enhanced Green Fluorescent Protein as a Tool for the Analysis of Protein Dynamics and Localization: Local Fluorescence Study at the Single-molecule Level. *Photochem. Photobiol.*, 71(6):771–776, 2000.

# A Anhang

## A.1 Theorie des Photoschaltens von asFP595

Im allgemeinen bedeutet der Terminus „photoschaltbar“, dass ein und derselbe chemische Stoff zwei Zustände mit unterschiedlichen Absorptionsspektren besitzt. Der Übergang zwischen beiden Zuständen ist reversibel und wird durch elektromagnetische Strahlung induziert. Reversibilität ist hier besonders hervorzuheben, da bei nicht reversibler Veränderung des Absorptionsspektrum häufig auch eine chemische Veränderung des Stoffes vorliegt [48]. Im Fall von asFP595 ist der chemische Stoff ein Chromoprotein mit einem nichtfluoreszierenden Dunkel- (Aus-) und einem fluoreszierendem (An-) Zustand. Als einfachster Ansatz zur theoretischen Beschreibung des Schaltvorgangs dient daher ein Modell mit zwei Zuständen, dem Dunkelzustand  $D$  und dem fluoreszierenden Zustand  $B$  ( $B$  für englisch „Bright“). Die Übergänge zwischen den angeregten Zustände  $B^*$  und  $D^*$  können dabei vernachlässigt werden, solange keine Sättigung dieser Zustände stattfindet, d.h. so lange die Besetzung der angeregten Zustände linear zur Intensität ist, was bei den verwendeten niedrigen Intensitäten anzunehmen ist.

Der Übergang nach  $B$  mit der Ratenkonstante  $k_{\text{an}}$  wird als „Aktivierung“, der entgegengesetzte Vorgang mit der Ratenkonstante  $k_{\text{aus}}$  als „Deaktivierung“ bezeichnet. Idealerweise wird Licht bei unterschiedlichen Wellenlängen verwendet, um selektiv zu aktivieren und zu deaktivieren oder um die Fluoreszenz von  $B$  anzuregen. Jedoch unterliegen die Übergänge, wie bei den meisten photophysikalischen Prozessen bei Raumtemperatur, einer spektralen Verbreiterung, und somit überlappen die unterschiedlichen Übergänge spektral. Auf Grund dessen können die unterschiedlichen Wellenlängen ihre Selektivität verlieren. Die Wahrscheinlichkeit, dass Licht einer bestimmten Wellenlänge einen Übergang antreibt, für den es, technisch gesehen, nicht gedacht ist, nennt sich „Übersprechen“ und muss in jedem mehrfarbigen Fluoreszenzexperiment berücksichtigt werden. Im hier beschriebenen Fall kann es beispielsweise bedeuten, dass eine Wellenlänge beide Übergänge treibt. Für das Schalten von asFP595 wurden folgende Wellenlängen gewählt: gelbes Licht bei 568 nm zur Aktivierung und blaues Licht bei 458 nm zur Deaktivierung. Das gelbe Licht wird auch zur Anregung der

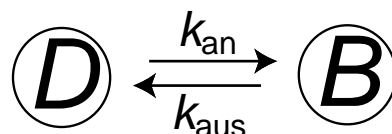


Abbildung A.1:

Fluoreszenz verwendet. Die Größe der Ratenkonstanten  $k_{\text{an}}$  und  $k_{\text{aus}}$  hängt zum einen von der angewandten Laserintensität  $I_g$  des gelben und  $I_b$  des blauen Lichts (Einheit:  $\text{W}/\text{cm}^2$ ), zum anderen von der thermisch induzierten spontanen Konversion ab.

$$\begin{pmatrix} k_{\text{an}} \\ k_{\text{aus}} \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} a_{\text{an}}^g \\ a_{\text{aus}}^g \end{pmatrix} \gamma_g I_g + \begin{pmatrix} a_{\text{an}}^b \\ a_{\text{aus}}^b \end{pmatrix} \gamma_b I_b + \begin{pmatrix} k_{\text{an}}^s \\ k_{\text{aus}}^s \end{pmatrix}$$

$$\begin{pmatrix} k_{\text{an}} \\ k_{\text{aus}} \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} a_{\text{an}}^g \\ 0 \end{pmatrix} \gamma_g I_g + \begin{pmatrix} a_{\text{an}}^b \\ a_{\text{aus}}^b \end{pmatrix} \gamma_b I_b + \begin{pmatrix} 0 \\ k_{\text{aus}}^s \end{pmatrix}$$

$a_{\text{an}}^X$  und  $a_{\text{aus}}^X$  sind die Aktionswirkungsquerschnitte (Einheit:  $\text{cm}^{-2}$ ) des Übergangs X für blaues (b) beziehungsweise gelbes (g) Licht,  $\gamma$  ist die inverse Photonenenergie der jeweiligen Wellenlänge (Index b beziehungsweise g,  $\gamma = \lambda/hc$ , mit der Wellenlänge  $\lambda$ , der Planckkonstanten  $h$  und der Lichtgeschwindigkeit  $c$ ),  $k_X^s$  ist die Ratenkonstante für den spontanen, nicht lichtgetriebenen Übergang zu X (=an oder aus). Da sich im Ausgangszustand praktisch alle asFP595 Moleküle im Dunkelzustand befinden, ist die spontane Konversion in den fluoreszierenden Zustand zu vernachlässigen ( $k_{\text{an}}^s = 0$ ). Weiterhin kann angenommen werden, dass das gelbe Licht den Deaktivierungsprozess nicht beeinflusst, da die Wellenlänge so gewählt wurde, dass eine sehr effiziente Aktivierung stattfindet (d.h.  $a_{\text{an}}^g \gg a_{\text{aus}}^g \approx 0$ ). Im Gegensatz dazu ist das Übersprechen des blauen Lichts nicht zu vernachlässigen ( $a_{\text{an}}^b \neq 0$ ). Folgt man dem Modell mit zwei Zuständen, kann ein System von Ratengleichungen für die molekularen Konzentrationen von  $D$  und  $B$  aufgestellt werden, was im konfokalen Mikroskop durch die mittlere Anzahl der Moleküle im Detektionsvolumen ( $N_D$  und  $N_B$ ) ausgedrückt werden kann.

$$\frac{d}{dt} \begin{pmatrix} N_D \\ N_B \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} -k_{\text{an}} & k_{\text{aus}} \\ k_{\text{an}} & -k_{\text{aus}} \end{pmatrix} \begin{pmatrix} N_D \\ N_B \end{pmatrix} \quad (\text{A.1})$$

führt zu einer exponentiellen Abhängigkeit von  $N_B(t)$

$$N_B(t) = \bar{N}_B [1 - \exp(-(k_{\text{aus}} + k_{\text{an}})t)] + N_B(0) \quad (\text{A.2})$$

Nach einer Zeit  $t \gg 1/(k_{\text{aus}} + k_{\text{an}})$  erreicht die Besetzung von  $D$  und  $B$  ein Gleichgewichtsniveau, dass für  $B$  den Wert  $\bar{N}_B$  annimmt.

$$\bar{N}_B = \frac{k_{\text{an}}}{k_{\text{an}} + k_{\text{aus}}} N_{\text{ges}} \quad (\text{A.3})$$

wobei  $N_{\text{ges}} = N_D + N_B$  die mittlere Gesamtzahl der Moleküle im Detektionsvolumen ist. Vernachlässigt man die Anregungsättigung, was bei den angewandten niedrigen Intensitäten möglich ist, ist die detektierte Fluoreszenzintensität  $F$  proportional zur Detektionseffizienz  $\Psi_F$ , zur Fluoreszenzquantenausbeute  $\Phi_F$ , zum Absorptionswirkungsquerschnitt  $\sigma$ , zur inversen Photonenenergie  $\gamma$  und zur mittleren Anzahl  $N_B$  der Moleküle im fluoreszierenden Zustand  $B$ .

$$F = \Psi_F \Phi_F (\sigma_g \gamma_g I_g + \sigma_b \gamma_b I_b) N_B \quad (\text{A.4})$$

Aus dem Fluoreszenzanregungsspektrum (Abbildung 2.2 b) ist ersichtlich, dass die Fluoreszenzanregung für gelbes Licht zwar am effektivsten ist, jedoch auch für blaues Licht, obwohl unerwünscht, nicht zu vernachlässigen ist. Dieses Übersprechen der Fluoreszenzanregung durch blaues Licht kann durch das Verhältnis  $R = (\sigma_b \gamma_b) / (\sigma_g \gamma_g)$  von Absorptionswirkungsquerschnitt und inverser Photonenenergie bei der blauen zur gelben Wellenlänge ausgedrückt werden. Um die Deaktivierungseffizienz, und damit die Unterdrückungseffizienz der Fluoreszenz, mit blauem Licht anzugeben, ist es vorteilhaft, die Fluoreszenz bei einer bestimmten Intensität des blauen Lichts mit der Fluoreszenz ohne blaues Licht zu vergleichen

$$\bar{F}_n = \frac{\bar{F}(I_g, I_b)}{\bar{F}(I_g, 0)} = \left(1 + R \frac{I_b}{I_g}\right) \frac{a_{an}^g I_g + a_{an}^b I_b}{a_{an}^g I_g + (a_{an}^b + a_{aus}^b) I_b + k_{aus}^s} \quad (\text{A.5})$$

Während das Anregungsübersprechen  $R$  zu einem Ansteigen der Fluoreszenz und somit zu einer Verminderung der Deaktivierungseffizienz und Fluoreszenzunterdrückung bei höheren blauen Intensitäten  $I_b$  führt, resultiert das Aktivierungsübersprechen  $a_{an}^b$  in einer unvollständigen maximalen Deaktivierung und Fluoreszenzunterdrückung.

$$\bar{F}_n(\min) \propto \frac{a_{an}^b}{a_{an}^b + a_{aus}^b} \quad (\text{A.6})$$

Es ist offensichtlich, dass diese maximal erreichbare Fluoreszenzunterdrückung optimiert wird, d.h. gegen Null geht, für  $a_{an}^b \ll a_{aus}^b$ , d.h. für ein möglichst kleines Aktivierungsübersprechen durch blaues Licht. Hier soll angemerkt werden, dass die Aktivierungs- und Deaktivierungswirkungsquerschnitte  $a_{an/aus}^{g/b}$  willkürliche Parameter sind und sich von den Absorptionswirkungsquerschnitten  $\sigma^{g/b}$  unterscheiden. Es ist jedoch nahe liegend, dass die Aktionswirkungsquerschnitte für die Übergänge zwischen dem dunklen und hellem Zustand mit  $\sigma^{g/b}$  über eine Quanteneffizienz  $\Phi_{an/aus}$  verknüpft sind,  $a_{an/aus}^{g/b} = \Phi_{an/aus}^{g/b} \sigma^{g/b}$ , wobei eine kleine Differenz für  $\sigma^{g/b}$  zwischen An- und Aus-Zustand berücksichtigt werden muss (Abbildung 2.2). Weiterhin ist auch  $\Phi$  von der Wellenlänge abhängig, da die Anregung für gelbes Licht in andere Energieniveaus erfolgt wie für blaues, wodurch sich die Höhe der Energiebarrieren unterscheiden, die zwischen den Zuständen  $D$  und  $B$  liegen [83]. Einige der oben angeführten Ratenkonstanten hängen von der Intensität  $I$  ab. Bei Verwendung eines hochnumerischen Objektivs, wie in dieser Arbeit, ist die Intensität im Detektionsvolumen stark ortsabhängig, und somit variieren auch die Ratenkonstanten innerhalb des Detektionsvolumen stark. Es wurde jedoch gezeigt [59], dass über das ganze Detektionsvolumen effektive Ratenkonstanten  $k(I/2)$  definiert werden können, wobei  $I$  die Spitzenleistung im Volumen darstellt.  $I$  ist definiert über die durchschnittliche Laserleistung  $P$  nach der Objektivlinse und dem lateralen  $1/e^2$ -Radius der PSF  $\omega_0$ . In einer vergleichenden Studie konnten die Werte der Ratenkonstanten  $k_{an}$  und  $k_{aus}$ , die durch Integration über eine typische PSF berechnet wurden, sehr gut durch den Wert von  $k(I/2)$  beschrieben werden. Die Ortsabhängigkeit der Ratenkonstanten im Detektionsvolumen kann somit bei der Bestimmung der Ratenkonstanten durch die Annahme einer mittleren effektiven Ratenkonstante  $k(I/2)$  berücksichtigt werden.

## A.2 Messung der Leistung und daraus berechnete Intensität im Fokus

Im den Abschnitten zu asFP595 (Kapitel 2) und Dronpa (Kapitel 3.2) wurden die Intensitäten im Fokus angegeben, im den Abschnitten zu rsFastLime (ab Kapitel 3.3) die direkt gemessenen Leistungen. Die Messung der Leistung  $P$  erfolgte direkt vor der Pupille des Objektivs, wobei durch eine Blende die Fläche des Leistungsdetektors auf die Pupillenfläche abgestimmt wurde. Für die Leistung im Fokus wurde die Transmission  $T$  des Objektivs berücksichtigt. Diese ist wellenlängenabhängig, Messungen zeigten jedoch, dass die Transmission  $T$  über einen großen Wellenlängenbereich (400-600 nm) mit  $T=0.8$  angenähert werden kann. Die daraus resultierenden Intensitätsangaben  $I$  im Kapitel zu asFP595 beziehen sich auf eine Fläche, die durch die FWHM  $d$  der Airy-Scheibe im Fokus bestimmt ist. Es gilt:

$$I = T \frac{P}{\pi(d/2)^2} \quad (\text{A.7})$$

Die FWHM  $d$  der Airy-Scheibe wurde durch eine PSF-Messung bestimmt. Da linear polarisiertes Licht verwendet wurde, sind die Breiten der Airy-Scheibe in x- und y-Richtung leicht unterschiedlich, die hier angegebenen FWHM  $d$  stellt die mittlere FWHM dar. Die Leistungs- und Intensitätsangaben können mit Gleichung A.7 und Tabelle A.1 umgerechnet werden.

PSF	Einschalt	Abfrage
FWHM[nm]	400	225

**Tabelle A.1:** Gemessene mittlere FWHM der PSF in Kapitel 3.2.

Für die Ausschalt-PSF gilt bei einer homogenen Phasenverteilung in der Pupille die gleiche FWHM wie bei der Abfrage-PSF

Bei der RESOLFT-Mikroskopie gilt wegen der Umformung der Ausschalt-PSF mittels einer inhomogenen Phasenverteilung in der Pupille (Abbildung 3.12) ungefähr folgende Relation:

$$I_{\text{aus}} = 0.5 \cdot 0.8 \frac{P_{\text{aus}}}{\pi(225 \text{ nm}/2)^2} \quad (\text{A.8})$$

Die Spitzenintensität  $I_0$ , wie sie bei der Darstellung des RESOLFT-Konzepts in der Einleitung benutzt wurde (Kapitel 1.3.1, ergibt sich aus den Intensitäten bezogen auf das FWHM durch die Multiplikation mit einem konstanten Faktor. Dies soll im folgenden hergeleitet werden. Die Airy-Scheibe der PSF kann wie in der Einleitung beschrieben (Kapitel 1.2) durch eine zweidimensionale Gaußfunktion  $I(x, y)$  angenähert werden. Deshalb gilt im Fokus:

$$I(x, y) = I_0 \exp\left(-2 \frac{\sqrt{x^2 + y^2}}{\omega_0^2}\right) \quad (\text{A.9})$$



wobei ungefähr gilt:

$$\omega_0 = \frac{d}{\sqrt{2 \ln 2}} \quad (\text{A.10})$$

Die Integration über die zweidimensionale Gaußfunktion ergibt die Leistung  $P_F$  im Fokus:

$$P_F = I_0 \frac{\pi}{2} \omega_0 \quad (\text{A.11})$$

Aus Gleichung A.10 und Gleichung A.11 ergibt sich somit folgende Relation zwischen der Intensität  $I$  und der Spitzenintensität  $I_0$ :

$$I_0 = \ln 2 \cdot I \approx 0,7 \cdot I \quad (\text{A.12})$$

Da  $P, I$  und  $I_0$  sich nur durch konstante Faktoren unterscheiden, kann anstatt der Sättigungsintensität  $I_{\text{Sat}}$ , die sich auf die Spitzenintensität bezieht, auch die zugehörige direkt gemessene Sättigungsleistung  $P_S$  oder die Sättigungsintensität  $I_S = TP_S / (\pi(d/2)^2)$  (Gleichung A.7) angegeben werden. Der für die Auflösungserhöhung wichtige Sättigungsfaktor (Kapitel 1.3.1)  $\epsilon = I_0/I_{\text{Sat}} = I/I_S = P/P_S$  ist unabhängig von der Angabe als Intensität oder Leistung.

## A.3 Protokolle

### A.3.1 Pufferlösung PBS

PBS (englisch: Phosphated Buffered Saline) ist eine Pufferlösung, deren Zusammensetzung in Tabelle A.3.1 gegeben ist. Der pH-Wert wurde durch Zugabe von Salzsäure (HCl) und Natronlauge (NaOH) auf 7,4 eingestellt.

Substanz	$M_{\text{rel}}$	$c[\text{mM}]$	$c[\text{g/l}]$
NaCl	58.44	137	8.0
KCl	74.50	2.7	0.2
$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	268	10	2.68
$\text{KH}_2\text{PO}_4$	136	1.76	0.24

**Tabelle A.2:** Inhaltsstoffe der PBS-Lösung.  $M_{\text{rel}}$ : relative Molekülmasse.  $c$ : Konzentration in der Lösung.

### A.3.2 Rotationsbeschichtung

Das hier gewählte Protokoll lehnt sich an das in [69] dargestellte Protokoll an. Polyvinyl-Alkohol (PVA) wurde in PBS (pH 7,4) mit einer Konzentration von 1% aufgelöst (1 g PVA auf 100 ml PBS). Eine hochkonzentrierte Lösung des jeweiligen Proteins (30  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ) wurde

im Verhältnis 1 zu 10 mit dieser PVA-Lösung gemischt. Ein Mikrokopiedeckglas wurde mit Hilfe von Unterdruck auf einem Halter in einem Rotationsbeschichter festgesaugt. Es wurde ein Tropfen von ca. 60  $\mu\text{l}$  der Protein-PVA-Lösung auf das Deckglas gegeben, und dieses bei 3000 U/min für 20 s rotationsbeschichtet.

### A.3.3 Immobilisierung mit Glutaraldehyd

Auf ein silanisiertes Deckglas (zur Verfügung gestellt von Donald Ouw, Abt. Nanobiophotonik, MPI-BPC Göttingen) wurden ca. 60  $\mu\text{l}$  Glutaraldehyd für 10 min gegeben und danach mit deionisiertem Wasser abgespült. Auf die mit Glutaraldehyd benetzte Stelle wurde nun ca. 60  $\mu\text{l}$  einer hochkonzentrierten Proteinlösung (30  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ) für 10 min gegeben und danach mit deionisiertem Wasser abgespült. Das Deckglas wurde auf einem Objektträger fixiert, zwischen Deckglas und Objektträger befand sich PBS (pH 7,4).

### A.3.4 Immobilisierung in Polyacrylamid

Bei der Immobilisierung in Polyacrylamid (PAA) wird die natürliche Konformation des Proteins in Wasser beibehalten [84].

Das folgende Protokoll wurde von einem Protokoll zur Herstellung eines Elektrophoresegels abgeleitet. Dieses Gel wird in der sogenannten Laemmli-PAGE eingesetzt (PAGE: PolyAcrylamide Gel Electrophoresis).

Eine hochkonzentrierte Proteinlösung (30  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ) wurde zunächst mit PBS-Puffer (pH 7,4) in einem Verhältnis 1:100 verdünnt. In diese Lösung wurden nun 62,5  $\mu\text{l}$  einer 30%igen Acrylamidlösung (Rotiphorese Gel 30, ROTH) gegeben. Zur Einleitung der Polymerisation wurden 15  $\mu\text{l}$  Ammoniumpersulfat (APS, 1%ige Lösung) und 15  $\mu\text{l}$  Tetramethylethylendiamin (TEMED, 1%ige Lösung) hinzugefügt. Das flüssige Gemisch (15  $\mu\text{l}$ ) polymerisierte zwischen einem Deckglas und einem Objektträger innerhalb von 5 min aus.

# Danksagung

Ich möchte mich hiermit bei allen bedanken, die direkt oder indirekt zum Erfolg dieser Arbeit beigetragen haben

Mein besonderer Dank gilt Prof. Dr. Stefan Hell, der mir dieses Thema vorgeschlagen hat. Sein Interesse an dieser Arbeit und seine kompetenten Anregungen waren eine große Unterstützung. Die hervorragenden Arbeitsbedingungen am Max-Planck-Institut für biophysikalische Chemie bildeten eine ideale Forschungsumgebung.

Prof. Dr. Dr. Christoph Cremer möchte ich herzlich für seine schnelle Zustimmung, als Zweitgutachter zur Verfügung zu stehen, und für sein Interesse an dieser Arbeit sowie für sein langjähriges Interesse an der Mikroskopie im Allgemeinen danken.

Dr. Christian Eggeling danke ich für seine andauernde Unterstützung und exzellente Betreuung dieser Arbeit. Ohne seine geduldige und unermüdliche Hilfsbereitschaft hätte diese Arbeit bestimmt nicht in der jetzigen Form realisiert werden können.

Des Weiteren möchte ich folgenden Personen danken:

- Prof. Iring Bender für seine unkomplizierte Bereitschaft, mich zu prüfen.
- Dr. Stefan Jakobs, Martin Andresen, André-Christian Stiel und Sylvia Löbermann für ihre Arbeiten zu den photoschaltbaren Proteinen sowie für die Bereitstellung zahlreicher Proben, ohne die Teile dieser Arbeit überhaupt nicht möglich gewesen wären. Zudem haben sie sie stets alle biologischen Fragen meinerseits geduldig beantwortet.
- Andreas Schönle für die Bereitstellung und Betreuung seiner Software „Inspector“, und für einige spezielle Anpassungen dieser Software auf die Anforderungen meiner Experimente. Ausserdem für viele Diskussionen über das Leben und alles weitere.
- Jan Keller für Hilfe bei der PSF-Berechnung und bei weiteren Software-Fragen sowie für aufschlussreiche Diskussionen zu theoretischen Problemen und für das Korrekturlesen dieser Arbeit.
- Den Mitarbeitern der elektronischen, mechanischen und optischen Werkstätten für die schnelle und kompetente Herstellung zahlreicher für die Messapparatur benötigter Komponenten.
- Allen Mitgliedern der Abteilung Nanobiophotonik für die stete Hilfsbereitschaft und die angenehme und freundschaftliche Atmosphäre in der Gruppe.
- Meinen Eltern für die Liebe, die sie mir immer entgegengebracht haben, und für die moralische Unterstützung während dieser Arbeit.

## Publikationsliste

Teile dieser Arbeit wurden wie folgt veröffentlicht.

1. M. Hofmann, C. Eggeling, S. Jakobs, and S.W. Hell. Breaking the diffraction barrier in fluorescence microscopy at low light intensities by using reversibly photoswitchable proteins. *P. Natl. Acad. Sci. USA* 102(49): 17565-17569, 2005.
2. M. Schwentker, H. Bock, M. Hofmann, S. Jakobs, J. Bewersdorf, C. Eggeling, and S.W. Hell. Wide-Field Subdiffraction RESOLFT Microscopy Using Fluorescent Protein Photoswitching. *Microsc. Res. Techniq.* 70(3): 269-280, 2007.
3. C. Eggeling, M. Hilbert, H. Bock, C. Ringemann, M. Hofmann, A. C. Stiel, M. Andresen, S. Jakobs, A. Egner, and S.W. Hell. Reversible Photoswitching Enables Single-Molecule Fluorescence Fluctuation Spectroscopy at High Molecular Concentration. *Microsc. Res. Techniq.* DOI 10.1002/jemt.20505