

Diplomarbeit zum Thema

„Neue Methoden der multikonfokalen Mikroskopie“

vorgelegt dem
**Institut für Physik
der Universität Kassel**

angefertigt am
**Max-Planck-Institut für biophysikalische Chemie
- Abteilung NanoBiophotonik -
Göttingen, 2007**

von
Nicole Ehrmann
aus Kassel

Die vorliegende Arbeit wurde am Max-Planck-Institut für biophysikalische Chemie in der Abteilung NanoBiophotonik in der Zeit von Oktober 2006 bis Oktober 2007 unter der Anleitung von Herrn Prof. Dr. Stefan Hell ausgeführt.

Gutachter: Prof. Dr. Stefan W. Hell
Prof. Dr. Frank Träger

Abgabe-Datum: 23.10.2007

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und ohne unerlaubte Hilfsmittel angefertigt und keine anderen als die angegebenen Hilfsmittel verwendet habe. Alle Stellen, die wörtlich oder sinngemäß aus anderen Arbeiten entnommen wurden, habe ich als solche kenntlich gemacht.

Ort, Datum

Unterschrift

Neue Methoden der multikonfokalen Mikroskopie:

In den vergangenen Jahren hat sich gezeigt, dass die 4Pi-Mikroskopie eine sehr effiziente Methode ist, das axiale Auflösungsvermögen deutlich im Vergleich zu konventionellen Konfokal- oder Zweiphotonen-Mikroskopen zu steigern. Bisher war die Aufnahmegeschwindigkeit bei Einstrahl-4Pi-Mikroskopen aufgrund des kleinen Detektionsvolumens recht langsam und hauptsächlich durch das Signal-zu-Rauschverhältnis limitiert. Die parallele Nutzung mehrerer Fokusse ist daher eine bewährte Methode, die Aufnahmegeschwindigkeit zu steigern. Die Kombination eines 4Pi-Aufbaus mit multifokaler Zweiphotonen-Anregung in einem Multifokalen-Multiphotonen-Mikroskop (MMM) verbindet eine hohe dreidimensionale Auflösung mit einer schnellen Datenaufnahme. In dieser Arbeit werden die Abbildungseigenschaften eines MMM-4Pi-Mikroskops sowohl theoretisch als auch experimentell untersucht. Die schnelle laterale Rasterung der Probe erfolgt in der hier verwendeten Variante durch ein Mikrolinsenrad. Das Mikroskop kann sowohl im Typ A als auch im Typ C Modus betrieben werden, wobei die Justage im Typ C Modus sehr mühsam und zeitaufwendig ist. Daher wurde hier strukturierte Beleuchtung mit entsprechender Bildrekonstruktion eingesetzt, was zu einer Konfokalisierung auch ohne eine konfokale Lochblende führt. Auf diese Weise werden im Typ A Modus die relativen Höhen der Nebenmaxima stabil unterhalb von 50% gehalten, wodurch diese einfach mit einer Dreipunktentfaltung entfernt werden können. Durch Verwendung einer EMCCD-Kamera, die eine 25-fach höhere Bildrate als die zuvor verwendete CCD-Kamera besitzt, konnte die Aufnahmegeschwindigkeit bei strukturierter Beleuchtung beibehalten werden. Mit dem hier vorgestellten Aufbau konnte erstmals ein dreidimensionaler Datensatz bei einer Auflösung im Bereich von 100 nm in nur 24 s erfasst werden. Somit ist nun die hochauflösende dreidimensionale Erfassung der Dynamik von lebenden Zellen möglich. Dies wird anhand der Messung von lebenden *Saccharomyces cerevisiae*-Zellen (Bäckerhefe) demonstriert.

New methods of multi-confocal microscopy:

It has been shown in recent years that 4Pi-microscopy is an efficient method to increase the axial resolution in comparison to conventional confocal or two-photon-microscopes. So far the data acquisition speed has been low for single-ray 4Pi-microscopes because of the smaller detection volume and it is also limited by the signal-to-noise-ratio. The parallel use of many foci is the preferred method to increase the imaging speed. The combination of a 4Pi-setup with multifocal two-photon excitation in a multifocal-multiphoton-microscope (MMM) combines high three-dimensional resolution with fast data acquisition. This thesis considers the theoretical and experimental analysis of the imaging properties of a MMM-4Pi-microscope. In this version the sample is laterally scanned with a microlens-wheel. The microscope can be used in both type A and C modes, but the alignment is very exhausting and time-consuming in type C mode. Therefore structured illumination is used together with image reconstruction, which leads to a confocalization without a confocal pinhole. The relative height of the sidelobes is suppressed under the critical limit of 50% even in type A mode. Thus the sidelobes can be eliminated easily with a three-point-deconvolution. By using an EMCCD-camera which has a 25-times higher framerate than the CCD-camera which was previously used, the speed of data acquisition is retained in spite of the structured illumination. For the first time, the acquisition of a three-dimensional data set at an resolution in the 100 nm range needs only 24 s with this setup. Hence this MMM setup enables three-dimensional highly resolved live cell imaging, which is demonstrated by measuring living *Saccharomyces cerevisiae*-cells (baker's yeast).

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
2	Grundlagen der Mikroskopie	7
2.1	Punktbildfunktion und optische Übertragungsfunktion	7
2.2	Auflösungsvermögen optischer Systeme	10
2.3	Z- und See-Antwort	11
2.4	Konfokal-Mikroskop	12
2.5	Multiphotonen-Mikroskop	14
3	4Pi-Mikroskopie	15
3.1	Prinzip der 4Pi-Mikroskopie	15
3.2	Multifokale 4Pi-Mikroskopie	22
3.3	Strukturierte Beleuchtung	24
4	Experimenteller Aufbau	28
4.1	Beleuchtungseinheit	29
4.2	Anregungskavität	30
4.3	Detektionskavität	32
4.4	Detektion	33
4.5	Ansteuerung	37
4.6	Phasenkompensation	39
4.7	Automatik-Justage-Einheit	40
5	Messungen und Ergebnisse	42
5.1	Messungen in verschiedenen Aufnahme-Modi	42
5.2	Probenpräparation	44
5.3	Messung technischer Proben	46
5.4	Messung biologischer Proben	49
5.5	Dreipunktentfaltung	53
6	Diskussion und Ausblick	55
A	Aufbau	58
	Literaturverzeichnis	60

Abkürzungen

1P	Einphotonen
2P	Zweiphotonen
SWM	Standing Wave Microscopy (Stehende-Wellen-Mikroskopie)
I⁵M	Incoherent Illumination Interference Image Interference Microscopy (Inkohärente-Beleuchtungs-Interferenz-Bild-Interferenz-Mikroskopie)
MMM	Multifokales-Multiphotonen-Mikroskop
UV	Ultraviolett
PDT	Pixel Dwell Time (Aufnahmezeit für ein einzelnes Pixel)
NIR	Nahes Infrarot
CCD	Charge Coupled Device (Photodetektor)
EMCCD	Electron Multiplying Charge Coupled Device (Photodetektor mit elektronischer Verstärkung)
PSF	Point Spread Function (Punktbildfunktion)
OTF	Optical Transfer Function (Optische Übertragungsfunktion)
NA	Numerische Apertur
FWHM	Full Width at Half Maximum (Halbwertsbreite)
SNR	Signal to Noise Ratio (Signal-zu-Rausch-Verhältnis)
GFP	Green Fluorescent Protein (Grün fluoreszierendes Protein)
fps	Frames per Second (Bilder pro Sekunde)

1 Einleitung

Lichtmikroskope waren die ersten Instrumente, die es dem Menschen ermöglichten, die Welt zu entdecken, die jenseits der Auflösungsgrenze des menschlichen Auges liegt. Mit ihrer Hilfe ist es möglich kleine Strukturen, wie z. B. biologische Zellen zu beobachten und zu erforschen. Seither geht der Fortschritt in den verschiedenen naturwissenschaftlichen Disziplinen und der Medizin einher mit der Entwicklung neuer Mikroskope und mikroskopischer Methoden.

Die klassische Lichtmikroskopie hat jedoch den Nachteil, dass sie aufgrund der Wellennatur des Lichtes und den damit verbundenen Beugungserscheinungen in ihrem Auflösungsvermögen begrenzt ist. Bis zum Ende des letzten Jahrhunderts glaubte man, dass das Auflösungsvermögen, wie von Ernst Abbe bereits 1873 erkannt und publiziert [1] wurde, von ca. 200 nm lateral und ca. 500 nm axial eine unüberwindbare Grenze in der Lichtmikroskopie sei. Nach Abbes Gesetz korreliert das Auflösungsvermögen einerseits mit der Wellenlänge des verwendeten Lichtes und andererseits mit dem Öffnungswinkel der verwendeten Optiken. Beides lässt sich jedoch aus technischen und anwendungsspezifischen Gründen nicht beliebig wählen.

Neben der Lichtmikroskopie wurden auch andere mikroskopische Verfahren entwickelt, wie z.B. die Elektronenmikroskopie oder die Rastersondenmikroskopie [2]. In der Elektronenmikroskopie haben sich die Transmissionselektronenmikroskopie (TEM) und die Rasterelektronenmikroskopie (REM) etabliert. Die Bildentstehung erfolgt hier durch die Wechselwirkung eines Elektronenstrahls mit der Probe. Bei der Elektronenmikroskopie hängt die Auflösung wie bei der Lichtmikroskopie von der Wellenlänge der verwendeten Strahlungsquelle ab. Da die Wellenlänge von Elektronenstrahlen im Pikometerbereich ist, wird bei der Elektronenmikroskopie ein sehr hohes Auflösungsvermögen in derselben Größenordnung erwartet. Dieses wird jedoch aufgrund von Aberrationen der verfügbaren elektronenoptischen Bauteile auf ca. 0.1 nm verschlechtert. Bei elektronenmikroskopischen Aufnahmen wird außerdem ein Hochvakuum benötigt, wodurch die Aufnahme von lebenden Zellen nicht möglich ist. Ebenso ist die Probenpräparation meistens sehr aufwendig.

Bei der Rastersondenmikroskopie unterscheidet man die Rastertunnelmikroskopie (RTM) und die Rasterkraftmikroskopie (AFM: Atomic Force Microscopy). Beide Techniken beschränken sich jedoch auf die Aufnahme der Probenoberfläche. Die Bildentstehung basiert bei der RTM auf einem Tunnelstrom und bei der AFM auf einer Kraftwirkung zwischen der Sonde des Mikroskops und der Probenoberfläche. Da beide Techniken kein

Vakuum benötigen und keine Schnitte der Probe angefertigt werden müssen, ist hier die Probenpräparation im Vergleich zur Elektronenmikroskopie wesentlich einfacher. Bei der Rastersondenmikroskopie werden ebenfalls Auflösungen bis zur atomaren Größenordnung erreicht.

Einer der größten Vorteile der Lichtmikroskopie gegenüber all diesen Verfahren ist jedoch die Möglichkeit, sehr schonende Aufnahmen von lebenden Zellen mit einer Auflösung von wenigen 100 nm zu erzielen.

Bei der Lichtmikroskopie haben sich seither verschiedene Kontrastverfahren etabliert. Davon ist besonders die Fluoreszenzmikroskopie zu einem der wichtigsten Forschungsinstrumente in der Zellbiologie geworden [3]. Dafür werden Zellen oder Teile von ihnen gezielt mit fluoreszierendem Farbstoff markiert und mit Licht entsprechend des Anregungsspektrums des Farbstoffes angeregt. Die angeregten Farbstoffmoleküle kehren unter Aussendung von Fluoreszenzlicht in ihren elektronischen Grundzustand zurück. Durch Detektion dieses Fluoreszenzlichtes erhält man Informationen aus dem Inneren der Zelle. Das Problem des Epifluoreszenzmikroskops ist jedoch, dass es kein axiales Trennvermögen besitzt, da auch Farbstoffmoleküle außerhalb der Fokalebene angeregt werden und fluoreszieren und so deutlich zum Signal beitragen.

Einen großen Fortschritt in der Lichtmikroskopie brachte die Erfindung des Konfokal-Mikroskops durch Marvin Minsky 1957 [4]. Dieses ermöglichte erstmals axiales Trennvermögen und die Aufnahme von „optischen“ Schnitten, ohne die Probe zerschneiden zu müssen. Bei diesem Verfahren wird die Probe nicht mehr flächig, sondern mit fokussiertem Licht beleuchtet. Somit werden störende laterale Fluoreszenzbeiträge in der Fokusebene reduziert. Durch eine zusätzliche konfokale Blende vor dem Detektor wird unerwünschtes Fluoreszenzlicht aus den Regionen über- und unterhalb der Fokalebene herausgefiltert, so dass nur die Beiträge aus dem Fokus den Detektor erreichen. Durch das Abrastern der Probe in allen drei Raumrichtungen erhält man dreidimensionale Bilder der Probe.

Eine andere Variante, die dem Mikroskop axiales Trennvermögen verleiht, ist die 2P-Anregung (2P: Zweiphotonen) [5]. Hier wird die Probe mit Licht der ca. doppelten Wellenlänge der 1P-Absorptionswellenlänge (1P: Einphotonen) beleuchtet. Da die Wahrscheinlichkeit für die gleichzeitige Absorption von zwei Photonen quadratisch von der Beleuchtungsintensität abhängt, erfolgt die Anregung der Farbstoffmoleküle nur im Bereich hoher Intensität und somit im Fokus der Beleuchtung. Daher entsteht kein störendes Fluoreszenzlicht in anderen Bereichen der Probe und eine konfokale Blende vor dem Detektor ist nicht nötig. Bei 2P-Mikroskopen werden meist gepulste Laser mit hohen Pulssintensitäten eingesetzt, da der Wirkungsquerschnitt der 2P-Anregung wesentlich kleiner als der 1P-Anregungsquerschnitt ist.

Da sowohl die Konfokal-Mikroskopie als auch die 2P-Mikroskopie die beugungsbedingte Auflösungsgrenze nicht überwinden können, wurden in den letzten 20 Jahren weitere Konzepte zur Auflösungssteigerung entwickelt.

Einige Verfahren nahmen sich dem Problem der im Vergleich zur lateralen Auflösung schlechteren axialen Auflösung an, wodurch nicht nur das axiale Trennvermögen des Mikroskops, sondern auch der Kontrast in der Bildebene beeinflusst wird [3]. Im Wesentlichen sind drei Konzepte zur axialen Auflösungssteigerung entwickelt worden: die „Standing Wave Microscopy“ (SWM), die „4Pi konfokale Mikroskopie“, sowie die „Incoherent Illumination Interference Image Interference Microscopy“ (I⁵M) [6]. Diese Verfahren haben gemeinsam, dass sie die Interferenz von sich aufeinander zu bewegendem kohärenten Lichtwellen für die Beleuchtung und / oder die Detektion nutzen. Durch die Interferenz entstehen entlang der optischen Achse Nebenmaxima, die das Hauptmaximum in der Fokalebene umgeben. Dies führt an diesen Stellen zu Geisterbildern. Ist die relative Höhe der Nebenmaxima unterhalb eines Wertes von 50% des Hauptmaximums, so können die Geisterbilder jedoch mittels Bildrekonstruktion entfernt werden. Die zu den Nebenmaxima zugehörigen Raumfrequenzen werden im Frequenzraum von dem Mikroskop nur schlecht oder gar nicht übertragen. An diesen Stellen hat die optische Übertragungsfunktion, die den Abbildungsprozess eines Mikroskops im Frequenzraum beschreibt, Minima oder Nullstellen in Abhängigkeit von der relativen Höhe der Nebenmaxima. Bei der Bildrekonstruktion können diese Frequenzbereiche angehoben werden, solange es sich nicht um Nullstellen handelt.

Bei der SWM-Mikroskopie [7] wird in der Probe eine stehende ebene Welle entlang der optischen Achse erzeugt, wodurch die Probe in z-Richtung strukturiert beleuchtet wird und nur bestimmte Ebenen zur Fluoreszenz angeregt werden. Die Detektion erfolgt als Weitfeld-Detektion, wie in einem konventionellen Epifluoreszenzmikroskop. Aufgrund der strukturierten Beleuchtung der Probe in axialer Richtung entspricht das Fluoreszenzlicht einer Intensitätsmodulation, die ihr Maximum in der Fokalebene hat und umgeben ist von stark ausgeprägten Nebenmaxima. Durch die starke Ausprägung der Nebenmaxima werden die zugehörigen Raumfrequenzen nicht übertragen und die optische Übertragungsfunktion besitzt Nullstellen. Daher kann das Bild nicht eindeutig rekonstruiert werden. Nur bei sehr dünnen Proben kann der Einfluss der Nebenmaxima vernachlässigt werden. Somit führt die SWM-Mikroskopie zu keiner fundamentalen Verbesserung der axialen Auflösung bei der dreidimensionalen Aufnahme von Zellen [3].

Bei der I⁵M-Mikroskopie [8] erfolgt die Anregung der Probe durch Köhlersche Beleuchtung mit einer räumlich inkohärenten Lampe durch zwei sich gegenüberstehende Objektive. Das Fluoreszenzlicht aus der Probe wird von den beiden Objektiven aufgesammelt und kohärent auf der Kamera zur Interferenz vereint. Die I⁵M-Mikroskopie hat den Vorteil, dass im Vergleich zum Einsatz eines teuren Lasers durch die Verwendung einer konventionellen Lampe deutlich Kosten gespart werden können. Bei der I⁵M-Mikroskopie ist die Ausprägung der Nebenmaxima ebenfalls groß, so dass die zugehörigen Raumfrequenzen nur schwach übertragen werden. Ein weiterer Nachteil ist ein sehr hohes Hintergrundsignal aus anderen Bereichen der Probe, hervorgerufen durch die Köhlersche Beleuchtung. Dies macht die Rekonstruktion des Bildes kompliziert und aufwendig, da das Signal der nur schwach übertragenen Raumfrequenzen mathematisch von dem ho-

hen Hintergrundsignal getrennt werden muss. Für eine erfolgreiche Bildrekonstruktion ist daher ein hohes Signal-zu-Rausch-Verhältnis erforderlich. Da große Öffnungswinkel benötigt werden, konnte bisher die I⁵M-Mikroskopie nur mit Ölimmersions-Objektiven betrieben werden [9]. Verwendet man Objektive mit kleineren Öffnungswinkeln steigt die Anzahl und die relative Höhe der Nebenmaxima, die dann nicht mehr mathematisch entfernt werden können. Der Brechungsindex des Einbettmediums muss an den des Immersionsmediums angepasst sein, da sonst sphärische Aberrationen auftreten würden [10]. Diese würden zu einem Intensitätsverlust des Anregungs- und des Fluoreszenzlichtes, sowie zu einer Verschlechterung des axialen und lateralen Auflösungsvermögen führen. Zellen können jedoch nicht in Öl-haltigen Einbettmedien überleben, daher konnten mit der I⁵M-Mikroskopie bisher nur fixierte Zellen beobachtet werden. Mit der I⁵M-Mikroskopie konnte das axiale Auflösungsvermögen im Vergleich zu einem Konfokal-Mikroskop deutlich gesteigert werden, wobei jedoch die Werte des zuvor entwickelten 4Pi-Mikroskops bisher nicht erreicht wurden.

Bei der 4Pi-Mikroskopie wird die Probe durch zwei sich gegenüberstehende Objektive beleuchtet und das entstandene Fluoreszenzlicht durch eines der beiden oder durch beide Objektive detektiert [11]. Dabei wird entweder das Beleuchtungslicht in einem Punkt der Probe kohärent zur Interferenz vereint und durch eines der Objektive detektiert (Typ A) oder die Detektion erfolgt kohärent durch beide Objektive und beleuchtet wird nur durch eines der Objektive (Typ B). Ebenso kann auch die Beleuchtung und die Detektion kohärent durch beide Objektive (Typ C) erfolgen. Durch die von beiden Seiten einfallenden kugelförmigen Wellenfronten wird der vollständige Raumwinkel von 4Pi besser abgedeckt und somit die numerische Apertur vergrößert. Dies führt zu einer im Vergleich zur Konfokal-Mikroskopie drei- bis siebenfachen Steigerung des axialen Auflösungsvermögens [12]. Durch die Interferenz des Beleuchtungslichtes in der Probe und des Fluoreszenzlichtes auf dem Detektor entstehen ebenfalls Nebenmaxima, die jedoch im Unterschied zur SWM- und I⁵M-Mikroskopie eine wesentlich geringere Ausprägung in ihrer relativen Höhe und ihrer Anzahl aufweisen. Dadurch enthält die optische Übertragungsfunktion weniger Minima und besitzt keine Nullstellen. Daher werden die entsprechenden Raumfrequenzen im Vergleich zur SWM- und I⁵M-Mikroskopie besser übertragen. Dies erleichtert die Entfernung der Geisterbilder mittels Bildrekonstruktion. Bei der 4Pi-Mikroskopie bieten sich besonders schnelle, lineare Entfaltungsmethoden, wie die so genannte Dreipunktentfaltung an [6, 13]. Auch hier müssen die relativen Höhen der Nebenmaxima deutlich unterhalb von 50% des Hauptmaximums liegen. Diese Höhen sind, wie bereits erwähnt, von dem Öffnungswinkel der verwendeten Objektive abhängig. Durch die Verwendung von Ölimmersions-Objektiven, die große Öffnungswinkel von bis zu 74° besitzen, können die relativen Höhen der Nebenmaxima reduziert werden. Da Wasserimmersions-Objektive nur Öffnungswinkel von 64° besitzen, konnten vorerst keine Zellen in wässrigen Medien untersucht und damit wie bei der I⁵M-Mikroskopie nur fixierte Zellen mit dieser Mikroskop-Technik aufgenommen werden.

Durch die Kombination von 2P-Anregung mit konfokaler Detektion in einem 4Pi-Mikroskop vom Typ A ist dagegen auch die Verwendung von Wasserimmersions-Objektiven möglich, da hier die relativen Höhen der Nebenmaxima nur bei 40% liegen. Somit können nun auch lebende Zellen mit einem 4Pi-Mikroskop aufgenommen werden [14].

Bei den bisher erwähnten 4Pi-Mikroskopen wurde jeweils nur mit einem einzelnen Fokus über die Probe gerastert. Durch die verbesserte Auflösung ist jedoch das Beleuchtungs- und das Detektionsvolumen kleiner, d. h. in dem kleineren Fokus befinden sich weniger Farbstoffmoleküle und es entsteht im Vergleich zum Konfokal-Mikroskop ein geringeres Fluoreszenzsignal. Die Erstellung eines dreidimensionalen Datensatzes der Probe wird somit sehr zeitaufwendig, da einerseits die Probe in kleineren Schritten gerastert und andererseits die Aufnahmedauer für einen Punkt aufgrund des niedrigeren Fluoreszenzsignals gesteigert werden muss. Um dem entgegenzuwirken, besteht die Möglichkeit der Parallelisierung [15, 16]. Hier wird die Probe nicht mehr nur mit einem Fokus, sondern mit mehreren Fokussen gleichzeitig abgerastert. Dies verkürzt die Aufnahmedauer, hat jedoch den Nachteil, dass mehr Hintergrundsignal entsteht und dass das axiale Trennvermögen verschlechtert wird. Durch 2P-Anregung kann jedoch unerwünschte Interferenz der verschiedenen Fokusse miteinander in der Probe reduziert und somit das Auflösungsvermögen des 4Pi-Mikroskops beibehalten werden.

2002 wurde ein MMM-4Pi-Aufbau (MMM: Multifokale-Multiphotonen-Mikroskopie) vom Typ A publiziert [16, 17]. In diesem erfolgt die Teilung des Laserstrahls durch ein Mikrolinsen-Array mit 16 bis 64 Mikrolinsen und einem entsprechenden Lochblenden-Array, das sowohl für die Beleuchtung, als auch zur Konfokalisierung der Detektion dient. Die Rasterung der Probe erfolgt mit einem galvanometrischen Spiegelscanner. Die hier erreichte axiale Auflösung beträgt (150 ± 10) nm. Dieser Aufbau erzielt eine Aufnahme-geschwindigkeit von 0.5 Bildern pro Sekunde bei einem Bildfeld von maximal $32 \times 32 \mu\text{m}^2$ und ist somit in etwa genauso schnell wie ein Konfokal-Mikroskop. Die Aufnahmedauer ist im Wesentlichen nur noch durch den Fluss der Fluoreszenzphotonen und das Ausle-
serauschen der Kamera bestimmt.

2007 wurde erstmals ein 4Pi-Aufbau mit 1P-Anregung gezeigt [18, 19]. In dem Aufbau sind die relativen Höhen der Nebenmaxima unter dem kritischen Wert von 50%, da hier neue Ölimmersions-Objektive mit einem Öffnungswinkel von 74° und ein neues Einbettmedium mit angepasstem Brechungsindex zum Einsatz kommen. Ein großer Vorteil dieses Aufbaus sind die niedrigeren Kosten, da nicht wie bei der 2P-Anregung ein teurer gepulster Laser verwendet werden muss. Hinzu kommt, dass durch die kürzere Beleuchtungswellenlänge das axiale Auflösungsvermögen mit 95 nm noch besser ist, als mit einem 4Pi-Aufbau mit 2P-Anregung. Dennoch ist diese Variante aufgrund des zu verwendenden Immersionsmediums bisher nur für fixierte Zellen geeignet.

Neben den Entwicklungen bei der 4Pi-Mikroskopie sind noch viele weitere Konzepte zur Auflösungssteigerung entwickelt worden. Es wurde unter anderem versucht, bei einfachen Fernfeldmikroskopen mit strukturierter Beleuchtung gepaart mit anschließender Bildrekonstruktion eine Verbesserung des axialen Auflösungsvermögens zu erreichen. Dadurch ist eine Konfokalisierung ohne Detektionsblende möglich [20]. Ebenso kann durch Ausnutzung des Moiré-Effektes in Kombination mit Bildrekonstruktion das klassische laterale Auflösungsvermögen um einen Faktor zwei gesteigert werden [21].

Ausgehend von den bisher verwirklichten Aufbauten, besteht ein großes Interesse an Mikroskopen, die es ermöglichen sollen, dreidimensionale Echtzeitaufnahmen von lebenden Zellen zu erlangen.

Ziel dieser Arbeit ist es daher, einen 4Pi-Aufbau zu realisieren, dessen Aufnahme-geschwindigkeit im Vergleich zu dem MMM-4Pi-Aufbau von 2002 weiter gesteigert wird und dessen räumliches und zeitliches Auflösungsvermögen die dreidimensionale Aufnahme von lebenden Zellen und deren zelluläre Dynamik ermöglicht.

Im zweiten Kapitel dieser Arbeit werden die allgemeinen Grundlagen mikroskopischer Abbildungen genannt. In dem anschließenden Kapitel wird gezielt auf die 4Pi-Mikroskopie und auf die verschiedenen Konzepte eingegangen, die es ermöglichen, die relative Höhe der Nebenmaxima zu reduzieren und die Aufnahmegeschwindigkeit zu erhöhen. Des Weiteren wird der hier verwendete Aufbau vorgestellt und im Anschluss die verwendeten Messmethoden beschrieben. Die erreichte Aufnahmegeschwindigkeit von 12.5 Bildern pro Sekunde gepaart mit einem hohen dreidimensionalen Auflösungsvermögen im Bereich von 100 nm werden durch die Aufnahme der mitochondrialen Struktur von *Saccharomyces cerevisiae* Zellen (Bäckerhefe) und deren Dynamik demonstriert.

2 Grundlagen der Mikroskopie

In der idealisierten Beschreibung der geometrischen Optik ist das Bild eines infinitesimal kleinen Punktes wiederum ein infinitesimal kleiner Punkt. In der Realität kann ein Punktobjekt durch ein optisches System nie als idealer Punkt abgebildet werden, sondern besitzt immer eine dreidimensionale Ausdehnung. Die Ursache dieser „Verwaschung“ liegt in der Wellennatur des Lichtes. Mit Hilfe der Theorie der Fraunhofer Beugung wird das Bild eines Punktes durch die so genannte Punktbildfunktion (PSF: Point Spread Function) beschrieben, die im folgenden Paragraphen näher erläutert wird [22].

2.1 Punktbildfunktion und optische Übertragungsfunktion

Das Mikroskop ist ein lineares, ortsinvariantes System, dessen Eigenschaften vollständig durch die Punktbildfunktion beschrieben werden können. In der Fluoreszenzmikroskopie ist die Bildentstehung inkohärent. In diesem Fall verhält sich das System linear bezüglich der Intensität [22] und die Punktbildfunktion $h(\vec{r})$ ist gegeben durch:

$$h(\vec{r}) = \left| \vec{E}(\vec{r}) \right|^2 \quad (2.1)$$

$\vec{r} = (r, \theta, \phi)$ ist in diesem Fall ein Ortsvektor in der Bildregion. $h(\vec{r})$ entspricht der räumlichen Intensitätsverteilung im Fokus eines Objektivs, wobei \vec{E} die elektrische Feldverteilung bezeichnet. Die elektrische Feldverteilung in der Fokusregion von polarisiertem Licht wird für Objektive mit großem Öffnungswinkel, wie sie in der Mikroskopie verwendet werden, nach der vektoriellen Beugungstheorie von Richards und Wolf berechnet [23, 24]:

$$\vec{E}(\vec{r}) = A \begin{pmatrix} i(I_0(\vec{r}) + I_2(\vec{r}) \cos(2\phi_r)) \\ iI_2(\vec{r}) \sin(2\phi_r) \\ 2I_1(\vec{r}) \cos(\phi_r) \end{pmatrix} \quad (2.2)$$

In diesem Fall ist A eine Konstante und ϕ_r der Azimutwinkel des Ortsvektors \vec{r} in der Bildregion.

Die zugehörigen Beugungsintegrale sind gegeben durch:

$$\begin{aligned} I_0(\vec{r}) &= \int_0^\alpha \sqrt{\cos(\theta)} \sin(\theta) (1 + \cos(\theta)) J_0(kr_r \sin(\theta) \sin(\theta_r)) \exp(ikr_r \cos(\theta) \cos(\theta_r)) d\theta \\ I_1(\vec{r}) &= \int_0^\alpha \sqrt{\cos(\theta)} \sin^2(\theta) J_1(kr_r \sin(\theta) \sin(\theta_r)) \exp(ikr_r \cos(\theta) \cos(\theta_r)) d\theta \\ I_2(\vec{r}) &= \int_0^\alpha \sqrt{\cos(\theta)} \sin(\theta) (1 - \cos(\theta)) J_2(kr_r \sin(\theta) \sin(\theta_r)) \exp(ikr_r \cos(\theta) \cos(\theta_r)) d\theta \end{aligned} \quad (2.3)$$

Hier ist α der halbe Öffnungswinkel des Objektivs (Aperturwinkel), θ ist ein Polarwinkel, $J_{0,1,2}$ sind Besselfunktionen erster Ordnung und $k = 2\pi/\lambda$ ist die Vakuum-Wellenzahl des Lichtes mit der Wellenlänge λ . In Abbildung 2.1 ist die Lichtintensitätsverteilung hinter einer Linse dargestellt.

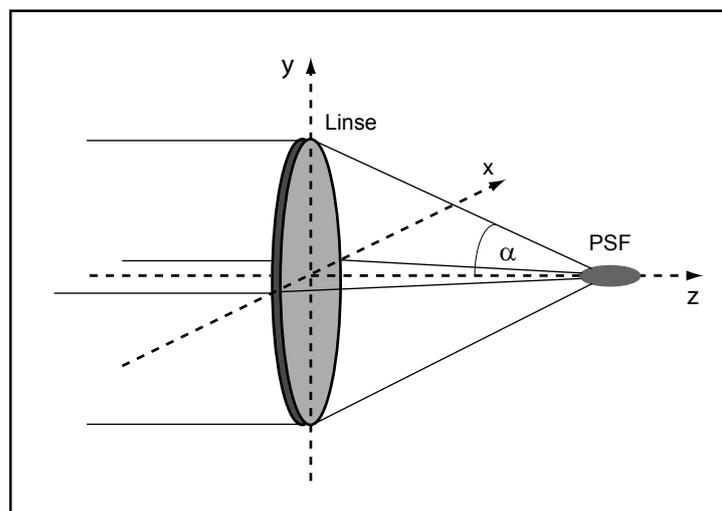


Abbildung 2.1: Intensitätsverteilung hinter einer Linse. Das parallel einfallende Licht wird von der Linse im Abstand der Brennweite f gebündelt. Bedingt durch die Beugung des Lichtes erhält man eine endlich ausgedehnte Lichtverteilung, die mit der Punktbildfunktion (PSF) beschrieben wird. Diese ist hier stark vergrößert dargestellt.

In der Fokalebene hat die Intensitätsverteilung h die Form einer so genannten Airy-Scheibe¹, umgeben von mehreren Ringen höherer und niedrigerer Intensität. Abbildung 2.2 zeigt die Airy-Scheibe, wie sie bei Beugung an einer kreisförmigen Apertur entsteht.

¹Als Airy-Scheibe wird das kreisförmige Hauptmaximum in der Fokalebene bezeichnet.

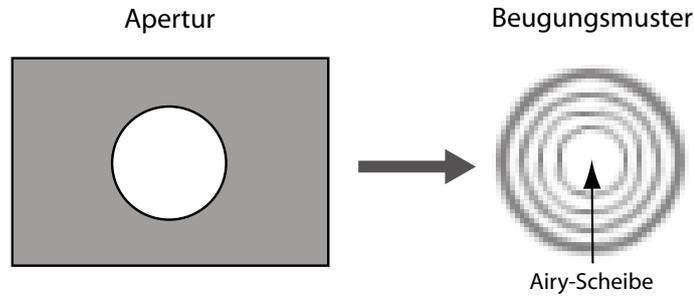


Abbildung 2.2: Beugungsmuster nach einer kreisförmigen Apertur.

Bei inkohärenter Beleuchtung entspricht das Bild $b(\vec{r})$ eines Objektes, das durch ein räumlich invariantes System wie z.B. ein Mikroskop erzeugt wurde, der Faltung der Objektfunktion $o(\vec{r})$ mit der Punktbildfunktion $h(\vec{r})$ [22]:

$$b(\vec{r}) = o(\vec{r}) \otimes h(\vec{r}) = \int o(\vec{r}') \cdot h(\vec{r} - \vec{r}') d\vec{r}' \quad (2.4)$$

Die Punktbildfunktion dient folglich der Beschreibung des Abbildungsprozesses im Ortsraum.

Bei der Betrachtung des Abbildungsprozesses im Fourierraum wird die Abbildung eines Objektes durch die Übertragung von Raumfrequenzen beschrieben [22]. Überträgt man Gleichung (2.4) in den Frequenzraum, erhält man:

$$F(b(\vec{r})) = F(o(\vec{r}) \otimes h(\vec{r})) = F(o(\vec{r})) \cdot F(h(\vec{r})) \quad (2.5)$$

Somit ist das Frequenzspektrum des Bildes $F(b(\vec{r}))$ gegeben aus dem Produkt des Frequenzspektrums des Objektes $F(o(\vec{r}))$ mit der Fouriertransformierten der PSF $F(h(\vec{r}))$. Die Fouriertransformierte der PSF wird auch als optische Übertragungsfunktion (OTF: Optical Transfer Function) bezeichnet. Hat diese Funktion für bestimmte Raumfrequenzen Minima oder Nullwerte, so werden diese durch das optische System schlecht oder überhaupt nicht übertragen. Objektdetails, die in diesen Frequenzbereichen liegen, können dann nicht mehr mit dem optischen System abgebildet werden.

2.2 Auflösungsvermögen optischer Systeme

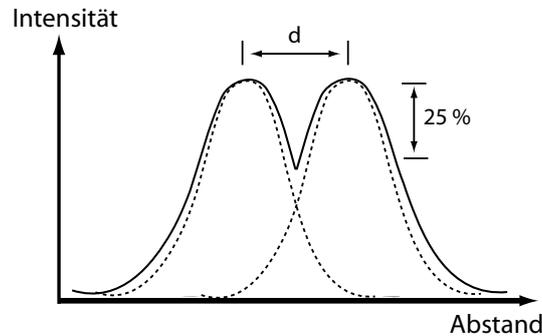


Abbildung 2.3: Visualisierung des Rayleigh-Kriteriums. Zwei benachbarte Punkte können noch getrennt voneinander wahrgenommen werden, wenn der Intensitätsabfall zwischen ihren Beugungsbildern mindestens 25% beträgt.

Das Auflösungsvermögen eines optischen Systems ist maßgeblich durch Beugung limitiert. Betrachtet man zwei Punktobjekte, die durch ein optisches System abgebildet werden, so können diese nur aufgelöst werden, wenn sie einen gewissen Abstand zueinander besitzen. Überlappen sich ihre Beugungsbilder zu stark, so können sie nicht mehr als getrennte Objekte wahrgenommen werden. Nach dem Rayleigh-Kriterium [25] ist der minimale Abstand beider Punktobjekte, unter dem sie noch als getrennte Objekte erkennbar sind, gegeben durch:

$$\begin{aligned}\Delta x &= 0.61 \cdot \frac{\lambda_0}{NA} \\ \Delta z &= 2.00 \cdot \frac{n \cdot \lambda_0}{NA^2}\end{aligned}\quad (2.6)$$

Hier beschreibt Δx die Auflösung eines Epifluoreszenzmikroskops in lateraler und Δz die Auflösung in axialer Richtung. λ ist die Vakuumwellenlänge des Lichtes, $NA = n \sin(\alpha)$ ist die numerische Apertur des Objektivs und n der Brechungsindex. Die Abbildung 2.3 zeigt die Beugungsbilder zweier Punktobjekte, die nach dem Rayleigh-Kriterium gerade noch getrennt sind. Durch die Gleichungen (2.6) wird deutlich, dass in idealen Systemen das Auflösungsvermögen neben der Wellenlänge des Lichtes hauptsächlich durch die numerische Apertur NA und damit dem halben Öffnungswinkel α des verwendeten Objektivs bestimmt wird. Daher werden in der Mikroskopie möglichst Objektivs mit großer numerischer Apertur verwendet, soweit es die Technik zulässt. Die numerische Apertur wird weitgehend von der verwendeten Immersionsflüssigkeit, dem Brechungsindex des verwendeten Glases und der Bauart der Objektivs bestimmt. Die größten technisch möglichen numerischen Aperturen betragen bei Ölimmersions-Objektiven $NA = 1.46$ [19] und bei Wasserimmersions-Objektiven $NA = 1.2$.

Die von Rayleigh definierte Auflösung entspricht dem Radius der Airy-Scheibe, die von dem Hauptmaximum der Lichtverteilung in der Fokalebene gebildet wird. Die Auflösung kann ebenso über die Halbwertsbreite (FWHM: Full Width at Half Maximum) der

Punktbildfunktion in lateraler und axialer Richtung definiert werden, wodurch sich die folgenden Werte ergeben:

$$\begin{aligned}\Delta x &= 0.51 \cdot \frac{\lambda_0}{NA} \\ \Delta z &= 1.77 \cdot \frac{n \cdot \lambda_0}{NA^2}\end{aligned}\quad (2.7)$$

Bei experimentellen Aufbauten ist jedoch das eigentliche Signal immer auch mit einem Rauschen behaftet, welches den Bildkontrast und damit die Auflösung verschlechtert. Solange die Signalentstehung und die Detektion rein auf Quanten-Wechselwirkungen beruhen, kann die Poisson-Statistik zur Beschreibung des Signalrauschens herangezogen werden [26]. Nach dem Rose-Kriterium sollte das Signal-zu-Rausch-Verhältnis SNR (signal to noise ratio) einen Wert von fünf nicht unterschreiten:

$$SNR = \frac{S}{N} \geq 5 \quad (2.8)$$

wobei sich das Rauschen $N = \sqrt{S+B}$ aus dem Signalrauschen S und dem Hintergrundrauschen B zusammensetzt. Dieser Wert sollte nur als Anhaltspunkt dienen, da das menschliche Auge oft schon bei kleineren Werten des SNR Objekte erkennen kann.

Dennoch sollte das Ziel ein niedriges Rauschen sein, da eine Steigerung des Auflösungsvermögens zu einer Reduzierung des Detektionsvolumens führt. In diesem fluoreszieren weniger Farbstoffmoleküle, wodurch das Signal schwächer und das SNR wiederum verschlechtert wird.

2.3 Z- und See-Antwort

Um das axiale Trennvermögen eines Mikroskops zu charakterisieren, wird oft die Z-Antwort herangezogen. Sie beschreibt den Verlauf des Signals einer fluoreszierenden Schicht mit infinitesimaler Dicke, die entlang der optischen Achse (z-Achse) verschoben wird.

$$I_Z(z) = \int_{-\infty}^{+\infty} h(\vec{r}) dx dy \quad (2.9)$$

Die Halbwertsbreite (FWHM) der Z-Antwort ist dabei ein Maß für das axiale Trennvermögen des Mikroskops [27].

Bei dem Epifluoreszenzmikroskop wird anhand der Z-Antwort deutlich, dass es kein axiales Trennvermögen besitzt, da sie konstant ist. Es werden auch in allen Ebenen außerhalb der Fokalebene Farbstoffmoleküle zur Fluoreszenz angeregt. Das dort entstandene Fluoreszenzlicht wird jedoch im Gegensatz zu dem aus der Fokalebene nur unscharf auf den Detektor abgebildet. Es wird so ein scharfes Bild aus der Fokalebene auf einem hellen diffusen Untergrund detektiert. Bei Mikroskopen mit axialem Trennvermögen hingegen fällt die Z-Antwort stark ab, sobald sich die fluoreszierende Schicht außerhalb der Fokalebene befindet. Ein Beispiel dafür ist das Konfokal-Mikroskop.

Man kann neben der Z-Antwort auch die See-Antwort eines Mikroskops als Maß für dessen axiales Trennvermögen heranziehen. Die See-Antwort enthält im Vergleich zur Z-Antwort keine zusätzlichen Informationen, aber sie verdeutlicht, ab welchem Abstand ein

„dunkles“ Objekt in axialer Nachbarschaft eines „hellen“ Objektes getrennt wahrnehmbar ist. Dies wird bei der Abbildung von dichten Proben relevant. Die See-Antwort entspricht dem gemessenen Signal, das bei der axialen Verschiebung eines fluoreszierenden Halbraumes entsteht:

$$I_{\text{See}}(z) = \int_{-\infty}^z I_Z(z) dz \quad (2.10)$$

2.4 Konfokal-Mikroskop

Marvin Minsky schaffte durch die Entwicklung des Konfokal-Mikroskops (1961) zum ersten Mal, dem Mikroskop axiales Trennvermögen zu verleihen [4].

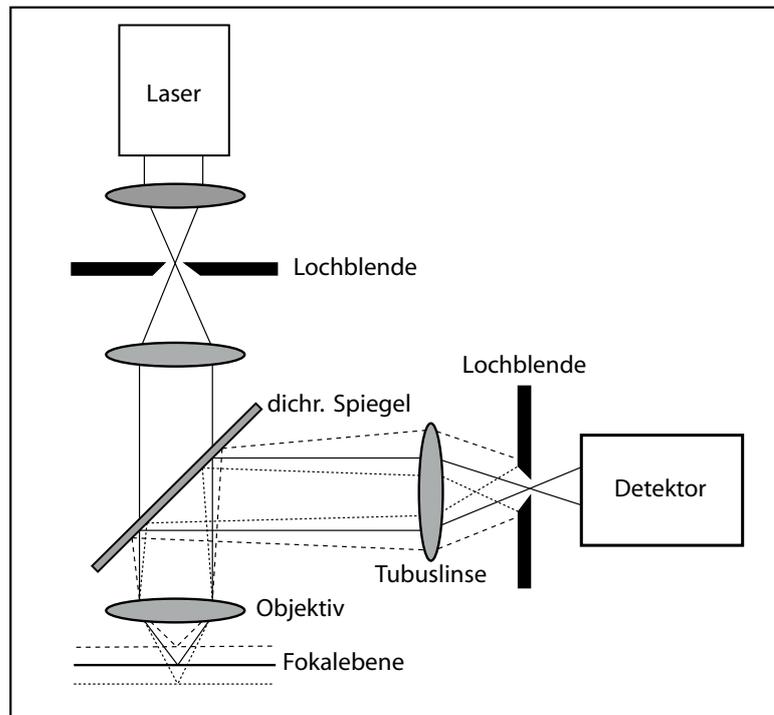


Abbildung 2.4: Schemazeichnung eines Konfokal-Mikroskops. Bei dem Konfokal-Mikroskop wird eine Punktlichtquelle in die Probe abgebildet. Eine zusätzliche Lochblende vor dem Detektor verhindert, dass Licht von außerhalb der Fokalebene detektiert wird.

Der schematische Aufbau eines Konfokal-Mikroskops ist in Abbildung 2.4 dargestellt. Die Lichtquelle in einem Konfokal-Mikroskop wird auf eine Anregungslochblende fokussiert und fungiert somit als Punktlichtquelle. Diese wird in die Probe abgebildet und erzeugt dort die Intensitätsverteilung $h_{\text{Bel}}(\vec{r})$. Die Moleküle in der Probe werden durch diese Intensitätsverteilung angeregt und emittieren Fluoreszenzlicht. Dieses wird von demselben Objektiv gesammelt, durch einen dichroitischen Spiegel von dem Anregungslicht getrennt und auf einen Detektor abgebildet. Die zusätzliche Lochblende vor dem Detektor sorgt dafür, dass nur Licht aus der Fokalebene den Detektor erreicht und die Beiträge aus anderen Ebenen der Probe herausgefiltert werden. Aufgrund der Umkehrbarkeit der Lichtwege entspricht dies auch einer Abbildung der Detektionslochblende in die Probe. Das Bild der Lochblende kann mit der Detektions-PSF $h_{\text{Det}}(\vec{r})$ beschrieben werden, die der Wahrscheinlichkeit entspricht, dass ein am Ort \vec{r} emittiertes Photon den Detektor erreicht. Die PSF des Konfokal-Mikroskops ergibt sich aus dem Produkt von Beleuchtungs- und Detektions-PSF:

$$h_{\text{konf}}(\vec{r}) = h_{\text{Bel}}(\vec{r}) \cdot h_{\text{Det}}(\vec{r}) \quad (2.11)$$

In einem idealen System wird von einer infinitesimalen kleinen Detektionslochblende ausgegangen. Dies kann natürlich in der Praxis nicht realisiert werden, da sie eine gewisse Ausdehnung haben muss, damit genügend Fluoreszenzsignal den Detektor erreicht. Die Lochblendenfunktion kann mit folgender Funktion beschrieben werden:

$$p(\vec{r}) = p(x, y, z = 0) = \begin{cases} 1 & \text{für } \sqrt{x^2 + y^2} \leq p_0 \\ 0 & \text{sonst} \end{cases} \quad (2.12)$$

wobei p_0 der Lochblendenradius ist.

Die Faltung der idealen Detektions-PSF mit der Lochblendenfunktion ergibt schließlich die reale Detektions-PSF des Konfokal-Mikroskops:

$$h_{\text{Det, real}}(\vec{r}) = h_{\text{Det}}(\vec{r}) \otimes p(\vec{r}) \quad (2.13)$$

Diese Gleichung kann nun in Gleichung (2.11) eingesetzt werden, um die PSF des Konfokal-Mikroskops mit endlicher Lochblende zu erhalten.

Indem die Probe mit dem Konfokal-Mikroskop Ebene für Ebene abgerastert wird, ist es nun möglich, optische Schnitte anzufertigen, ohne die Probe zerschneiden zu müssen. Das Abrastern kann durch Strahlbewegung (Strahlraster-System) oder durch Bewegung des Probestisches (Tischraster-System) erfolgen.

2.5 Multiphotonen-Mikroskop

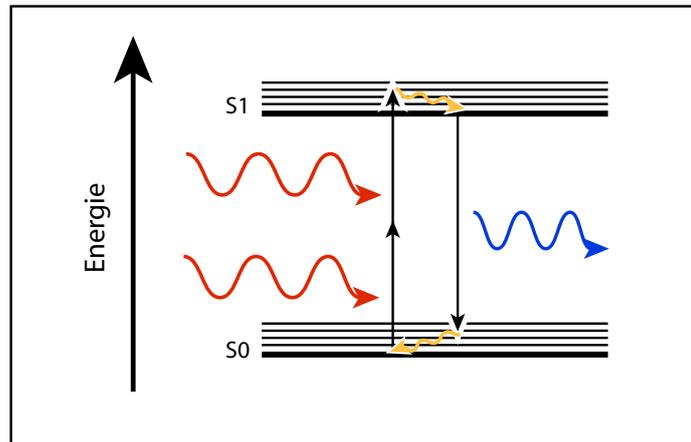


Abbildung 2.5: Jablonski-Diagramm zur 2P-Anregung.

Bei einem Zweiphotonen-Mikroskop werden die Fluoreszenzmoleküle durch die gleichzeitige Absorption von zwei Photonen mit ungefähr der doppelten Anregungswellenlänge der Einphotonen-Anregung angeregt [5]. Abbildung 2.5 zeigt das entsprechende Jablonski-Diagramm für die 2P-Anregung. Aufgrund des geringeren Wirkungsquerschnitts für die 2P-Anregung sind sehr hohe Lichtintensitäten nötig. Aus diesem Grund werden bei 2P-Mikroskopen vorwiegend gepulste Laser mit hohen Pulsintensitäten eingesetzt. Die 2P-Absorption erfolgt nur im Fokus, da hier die Intensität am höchsten ist. Dies kommt einer intrinsischen Konfokalisierung gleich, wodurch eine Detektionslochblende zur Erzeugung axialen Trennvermögens nicht nötig ist. Dies hat den Vorteil, dass das gesamte Fluoreszenzlicht zur Detektion zur Verfügung steht. Da nur die Farbstoffmoleküle im Fokus der 2P-Beleuchtung angeregt werden, kann es auch nur in diesem Bereich zu einem Bleichen des Farbstoffes kommen. Die Farbstoffmoleküle außerhalb der Fokalebene bleiben davon verschont. Bei der 2P-Anregung ist jedoch das Bleichen in der Fokusregion im Vergleich zur 1P-Anregung stärker.

Die Punktbildfunktion des 2P-Mikroskops ist aufgrund der quadratischen Intensitätsabhängigkeit gegeben durch das Quadrat der Beleuchtungs-PSF:

$$h_{2P}(\vec{r}) = h_{\text{Bel}}^2(\vec{r}) \quad (2.14)$$

Durch die längere Wellenlänge ist das 2P-Mikroskop auch für die Aufnahme von stark streuenden Proben geeignet, da der Streuquerschnitt mit größerer Wellenlänge abnimmt.

3 4Pi-Mikroskopie

Nach dem Rayleigh-Kriterium (siehe Gleichung (2.6)) hängt die Auflösung sowohl von der verwendeten Wellenlänge des Anregungslichtes, als auch von der numerischen Apertur des verwendeten Objektivs ab [25]. Die Wellenlänge kann nicht beliebig klein gewählt werden, da UV-Licht lebende Zellen schädigen würde. Hinzu kommt, dass die Objektive nur für einen bestimmten Wellenlängenbereich geeignet sind, da die Dispersion im UV-Bereich stark zunimmt. Die Objektive sollten außerdem sowohl für das Anregungs- als auch für das Fluoreszenzlicht bezüglich chromatischer Aberrationen korrigiert sein [9]. Ein weiteres Problem ist die Diskrepanz zwischen lateralem und axialem Auflösungsvermögen. Dieses Problem resultiert aus der schlechten Abdeckung des kompletten Raumwinkels bei der Beleuchtung und Detektion von einer Seite durch ein Objektiv [3]. Aus diesem Grund hat die PSF eines Konfokal-Mikroskops eine elliptische und keine runde Form mit einer Elongation in axialer Richtung. Die numerische Apertur eines Objektivs lässt sich jedoch nicht beliebig steigern, da aus technischen Gründen keine größeren Öffnungswinkel als 74° realisiert werden können. Ebenso sollte der Brechungsindex des Immersionsmediums zu dem Einbettmedium der Probe passen, da sonst sphärische Aberrationen auftreten würden [10]. Das hier vorgestellte Prinzip nutzt daher physikalische Effekte zur Steigerung der numerischen Apertur.

3.1 Prinzip der 4Pi-Mikroskopie

Bei der 4Pi-Mikroskopie wird durch die Verwendung von zwei sich gegenüberstehenden Objektiven mit gemeinsamem Fokus und durch kohärente Beleuchtung und / oder Detektion der Aperturwinkel vergrößert [11]. Beide Objektive zusammen wirken so wie ein Objektiv mit doppeltem Aperturwinkel, wodurch das axiale Auflösungsvermögen gesteigert wird. Dieses Mikroskopie-Verfahren erhält seinen Namen, da es durch den beidseitigen Einfall von zwei kugelförmigen Wellen besser den vollständigen Raumwinkel von 4π abdeckt. Es werden drei Varianten der 4Pi-Mikroskopie unterschieden:

4Pi Typ A

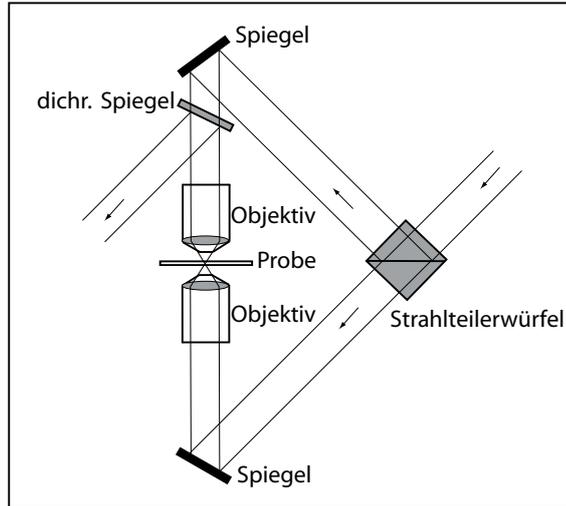


Abbildung 3.1: Schemazeichnung zum 4Pi Typ A Modus. Die Beleuchtung erfolgt kohärent durch beide Objektive, die Detektion dagegen nur durch eines der beiden Objektive.

Wie in Abbildung 3.1 dargestellt, erfolgt bei Typ A die Anregung der Probe kohärent durch beide Objektive. Das entstandene Fluoreszenzlicht wird dagegen nur von einem der beiden Objektive gesammelt und auf den Detektor abgebildet. Üblicherweise wird bei Typ A konfokal detektiert. Die Teilung des Beleuchtungsstrahls erfolgt meist durch einen Strahlteilerwürfel. Die Teilstrahlen, die sich im gemeinsamen Fokus beider Objektive in der Probe treffen, müssen zur Interferenz gebracht werden. Da meist 2P-Anregung mit einem gepulsten Laser verwendet wird, muss ein Weglängenabgleich der Interferometerarme innerhalb der Pulslänge durchgeführt werden. Diese liegt beispielsweise bei einem Laser mit Pulsbreiten von 140 fs bei ca. 42 μm .

Die Punktbildfunktion ergibt sich wie bei der Konfokal-Mikroskopie aus dem Produkt der Beleuchtungs-PSF und der Detektions-PSF (siehe zum Vergleich Gleichung (2.11) und Gleichung (2.13)):

$$h_{4\text{Pi-A}}(\vec{r}) = h_{4\text{Pi-Bel}}^2(\vec{r}) \cdot h_{\text{Det,real}}(\vec{r}) = \left[\left| \vec{E}_{1,\text{Bel}}(\vec{r}) + \vec{E}_{2,\text{Bel}}(\vec{r}) \right|^4 \right] \cdot [h_{\text{Det}}(\vec{r}) \otimes p(\vec{r})] \quad (3.1)$$

Aufgrund der 2P-Anregung geht die Beleuchtungs-PSF h_{Bel} quadratisch in die Berechnungen ein. Die Beziehung zwischen den elektrischen Feldverteilungen der beiden Ob-

jektive ist gegeben durch:

$$\vec{E}_{1,\text{Bel}}(\vec{r}) = \hat{M} \cdot \vec{E}_{2,\text{Bel}}(\hat{M} \cdot \vec{r}) \quad (3.2)$$

\hat{M} ist die Transformationsmatrix, die durch die jeweilige Geometrie des Interferometers gegeben ist. Bei einer Dreiecksanordnung des Interferometers gilt:

$$\hat{M} := \begin{pmatrix} 1 & 0 & 0 \\ 0 & 1 & 0 \\ 0 & 0 & -1 \end{pmatrix} \quad (3.3)$$

4Pi Typ B

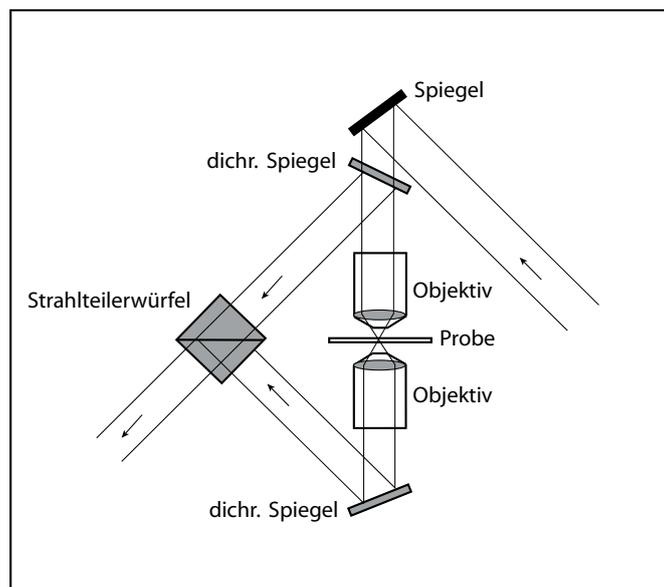


Abbildung 3.2: Schemazeichnung zum 4Pi Typ B Modus. Die Probe wird durch ein Objektiv beleuchtet und die Detektion erfolgt kohärent durch beide Objektive.

Beim Typ B Modus wird die Probe nur durch eines der beiden Objektive angeregt. Dafür wird das Fluoreszenzlicht von beiden Objektiven aufgesammelt, in dem Detektionsstrahlteilerwürfel zur Interferenz vereint und letztlich auf dem Detektor abgebildet. Dieser Zusammenhang wird in Abbildung 3.2 gezeigt. Die Kohärenzlänge des Fluoreszenzlichtes

ist mit ca. $5 \mu\text{m}$ im Vergleich zu der Pulslänge des Anregungslichtes viel kleiner. Daher ist der Weglängenabgleich der Detektions-Interferometerarme schwieriger. Die Punktbildfunktion für den Typ B-Aufbau wird nach der folgenden Gleichung berechnet:

$$h_{4\text{Pi-B}}(\vec{r}) = h_{\text{Bel}}^2(\vec{r}) \cdot h_{4\text{Pi-Det}}(\vec{r}) = \vec{E}_{\text{Bel}}^A \cdot \left[\left| \vec{E}_{1,\text{Det}}(\vec{r}) + \vec{E}_{2,\text{Det}}(\vec{r}) \right|^2 \right] \quad (3.4)$$

Auch hier gilt die Beziehung $\vec{E}_{1,\text{Det}}(\vec{r}) = \hat{M} \cdot \vec{E}_{2,\text{Det}}(\hat{M} \cdot \vec{r})$ zwischen den Feldverteilungen des Fluoreszenzlichts der beiden Objektive.

4Pi Typ C

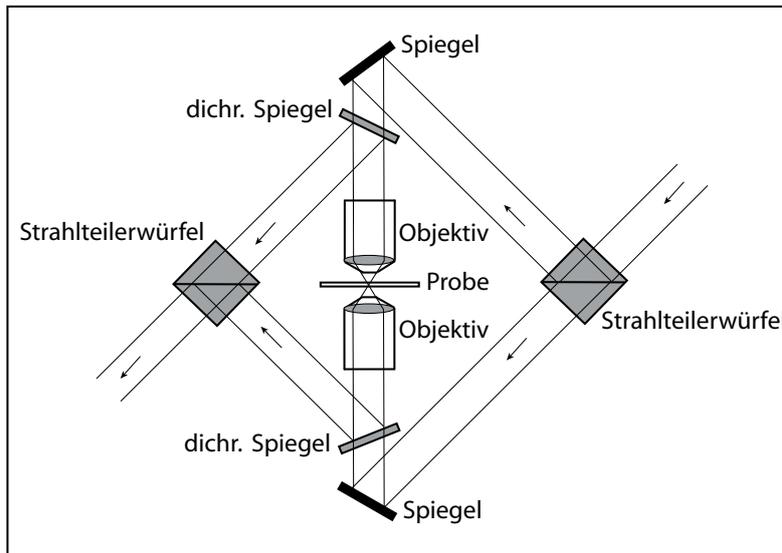


Abbildung 3.3: Schemazeichnung zum 4Pi Typ C Modus. Hier erfolgt sowohl die Anregung der Probe als auch die Detektion kohärent durch beide Objektive.

Wie in Abbildung 3.3 zu sehen ist, erfolgt im Typ C Modus sowohl die Anregung, als auch die Detektion kohärent durch beide Objektive. Die Punktbildfunktion ergibt sich daher aus dem Produkt der Typ A Beleuchtungs-PSF und der Typ B Detektions-PSF:

$$\begin{aligned} h_{4\text{Pi-C}}(\vec{r}) &= h_{4\text{Pi-Bel}}^2(\vec{r}) \cdot h_{4\text{Pi-Det}}(\vec{r}) \\ &= \left[\left| \vec{E}_{1,\text{Bel}}(\vec{r}) + \vec{E}_{2,\text{Bel}}(\vec{r}) \right|^4 \right] \cdot \left[\left| \vec{E}_{1,\text{Det}}(\vec{r}) + \vec{E}_{2,\text{Det}}(\vec{r}) \right|^2 \right] \quad (3.5) \end{aligned}$$

Alle drei Varianten der 4Pi-Mikroskopie haben gemeinsam, dass ihre Punktbildfunktionen aufgrund der Interferenz der Teilstrahlen entlang der optischen Achse moduliert sind. Jede der Punktbildfunktionen besitzt ein Hauptmaximum, das von mehreren Nebenmaxima umgeben ist. Der Abstand der ersten Nebenmaxima von dem Hauptmaximum entspricht ca. der halben Wellenlänge des Anregungs- oder des Fluoreszenzlichtes. Das axiale Auflösungsvermögen ist durch die Halbwertsbreite des Hauptmaximums der PSF bestimmt und ist im Vergleich zu einem Konfokal-Mikroskop in allen drei Fällen drei- bis siebenmal besser. Im Allgemeinen wird die laterale Auflösung bei der Aufnahme im 4Pi-Modus nicht verbessert, jedoch ist der laterale Bildkontrast durch die bessere axiale Auflösung in der Regel ebenfalls erhöht. Abbildung 3.4 zeigt eine Übersicht über die theoretischen Punktbildfunktionen der verschiedenen 4Pi-Varianten im Vergleich zum Konfokal-Mikroskop.

Bei Typ A wird die Probe entlang der optischen Achse moduliert angeregt und das in den PSF-Maxima entstandene Fluoreszenzlicht wird durch eines der Objektive und durch eine konfokale Lochblende auf den Detektor abgebildet. Die effektive PSF von Typ A ist daher stark moduliert und hat ausgeprägte Minima. Bei der 2P-Anregung ist die Halbwertsbreite des Hauptmaximums aufgrund der längeren Wellenlänge etwas größer und damit das axiale Auflösungsvermögen etwas schlechter als bei 1P-Anregung.

Bei Typ B erfolgt die Anregung wie bei einem Konfokal oder 2P-Mikroskop nur von einer Seite. Daher weist die Beleuchtungs-PSF keine Modulation auf. Durch die Interferenz des Fluoreszenzlichts ist die Detektions-PSF moduliert, d.h. das entlang der optischen Achse entstandene Fluoreszenzlicht wird moduliert detektiert. Die effektive PSF hat im Vergleich zu der von Typ A höhere Nebenmaxima und weniger stark ausgeprägte Minima. Die Halbwertsbreite des Hauptmaximums ist aufgrund der kürzeren Wellenlänge des Fluoreszenzlichtes im Vergleich zum Anregungslicht kleiner als bei Typ A.

Bei Typ C ist sowohl die Beleuchtungs- als auch die Detektions-PSF moduliert. Dadurch wird die Probe moduliert angeregt und moduliert detektiert. Durch den Wellenlängenunterschied zwischen Anregungs- und Fluoreszenzlicht, haben die Nebenmaxima beider Punktbildfunktionen unterschiedliche Positionen auf der optischen Achse. Dadurch wird das Signal der Nebenmaxima der Anregung nicht vollständig durch die Detektions-PSF detektiert und somit sehr wirkungsvoll reduziert. Auch hier ist das axiale Auflösungsvermögen aufgrund der kürzeren Wellenlänge der Fluoreszenz besser als bei Typ A.

Die optischen Übertragungsfunktionen aller drei 4Pi-Varianten sind im Vergleich zu Konfokal- und 2P-Mikroskopen entlang der optischen Achse wesentlich ausgedehnter, d.h. es werden mehr Raumfrequenzen durch 4Pi-Mikroskope übertragen. Durch die Nebenmaxima weisen die optischen Übertragungsfunktionen jedoch deutliche Minima auf. In den Rohdaten sind daher Geisterbilder vorhanden, die jedoch durch verschiedenen Entfaltungsmethoden entfernt werden können. Um diese anwenden zu können, müssen einige Kriterien erfüllt sein. Unter anderem gehen die meisten Entfaltungsmethoden, wie die Dreipunktentfaltung von einer Ortsinvarianz der Punktbildfunktion aus. Daher muss

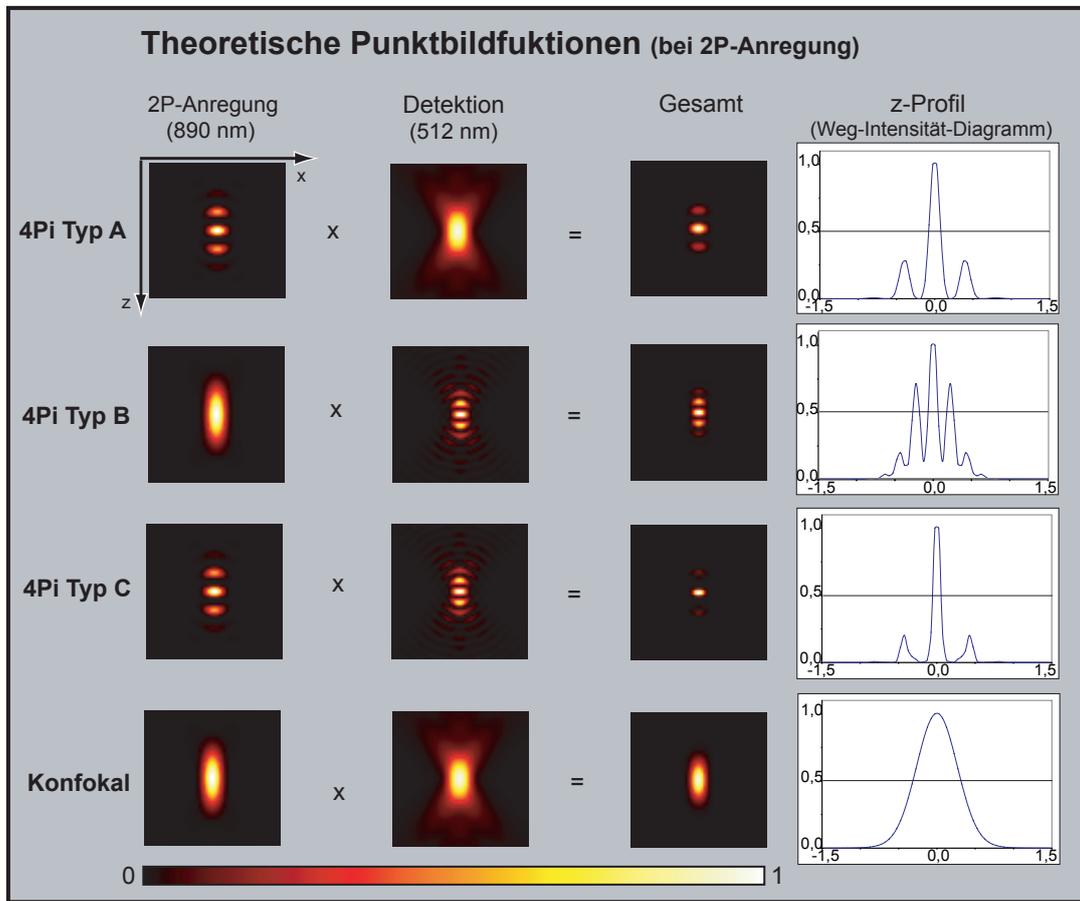


Abbildung 3.4: Übersicht über die theoretischen 4Pi-Punktbildfunktionen für Typ A, B und C im Vergleich zum Konfokal-Mikroskop. Da bei den in dieser Arbeit durchgeführten Messungen ausschließlich Proben mit GFP (*green fluorescent protein*) verwendet wurden, wurden für die simulierten Punktbildfunktionen eine 2P-Anregungswellenlänge von 890 nm und für das Fluoreszenzlicht eine Wellenlänge von 512 nm gewählt. Bei der Simulation der Detektions-PSF des 4Pi Typ A Mikroskops und des Konfokal-Mikroskops wurde jeweils eine konfokale Lochblende mit der Größe des Radius einer Airy-Scheibe verwendet.

während der Datenaufnahme die relative Phase zwischen den interferierenden Teilstrahlen konstant bleiben. Es gibt jedoch auch neue Verfahren, die Daten mit variierender Phase entfalten können [28].

Ein weiteres Kriterium bezieht sich auf die optische Übertragungsfunktion. Diese darf innerhalb des von ihr übertragenen Bereichs keine Nullstellen aufweisen, da eine Entfaltung der Daten sonst zur Entstehung von Artefakten führen würde. Als Faustregel für die Einhaltung dieser Bedingung gilt, dass die relativen Höhen der Nebenmaxima der Punktbildfunktion kleiner als 50% sein sollten.

Reduzierung der relativen Höhe der Nebenmaxima

Wie im vorherigen Abschnitt beschrieben, müssen für die Anwendbarkeit der Entfaltungsmethoden die relativen Höhen der Nebenmaxima möglichst niedrig sein. Durch verschiedene Techniken können diese sehr effektiv reduziert werden.

- **Konfokale Detektion.** Durch eine konfokale Blende vor dem Detektor wird sehr effektiv das Fluoreszenzlicht aus den Nebenmaxima der Anregungs-PSF herausgefiltert, da diese sich nicht in der Fokalebene befinden.
- **2P-Anregung.** Durch die quadratische Abhängigkeit der Anregungseffizienz von der Beleuchtungsintensität bei Verwendung von 2P-Anregung können die Nebenmaxima der Beleuchtungs-PSF vermindert werden [29]. Ein weiterer Vorteil ist, dass die Nebenmaxima aufgrund der längeren Wellenlänge einen größeren Abstand zum Hauptmaximum entlang der optischen Achse besitzen.
- **4Pi Typ C.** Wie im letzten Abschnitt gezeigt wurde, können durch die Kombination aus kohärenter Beleuchtung und Detektion die relative Höhe der Nebenmaxima deutlich reduziert werden. Dies ist durch den Wellenlängenunterschied von dem 2P-Anregungs- und Fluoreszenzlicht möglich, da sich die Nebenmaxima der Anregungs-PSF an anderen Positionen auf der optischen Achse befinden als die Nebenmaxima der Detektions-PSF. Dadurch werden die Anregungs-Nebenmaxima nicht vollständig detektiert und somit ihr Signal reduziert.

In der Regel werden zwei dieser drei Methoden kombiniert, um ein robustes System zu erhalten. Die Kombination aus diesen drei Methoden in dem 2P-4Pi Typ C Aufbau ermöglicht die beste axiale Auflösung mit den niedrigsten relativen Höhen der Nebenmaxima. Dadurch können schnelle lineare Entfaltungsmethoden zur Entfernung der Nebenmaxima eingesetzt werden. Die axiale Auflösung des 2P-4Pi Typ C Aufbaus ist bis zu 30% besser wie bei einem 2P-4Pi Typ A Aufbau [30].

Abgesehen von dem verbesserten räumlichen Auflösungsvermögen hat die 4Pi-Mikroskopie den Nachteil, dass sie im Vergleich zur Konfokal- oder 2P-Mikroskopie eine schlechtere zeitliche Auflösung besitzt. Die Aufnahmedauer eines Datensatzes mit $200 \times 200 \times 100$ Voxeln bei einer Aufnahmezeit eines Punktes (PDT: Pixel Dwell Time) von 2 ms beträgt 133 Minuten. Für die Aufnahme von lebenden Zellen sind jedoch kürzere Aufnahmezeiten von Interesse, da einerseits Prozesse in der Zelle auf einer viel kürzeren Zeitskala stattfinden und andererseits die Lebenszeit der präparierten Zellen oft gar nicht die Zeitspanne der Messung abdeckt. Ein großes Ziel ist es daher einen Aufbau zu entwickeln, der Echtzeitaufnahmen von lebenden Zellen ermöglicht. Eine Möglichkeit zur Steigerung der Aufnahmegeschwindigkeit bietet die Parallelisierung [16].

3.2 Multifokale 4Pi-Mikroskopie

Ein wichtiges Kriterium der 4Pi-Mikroskopie ist die Invarianz der Punktbildfunktion und damit die Konstanz der Phasenbeziehung zwischen den interferierenden Strahlen während der Datenaufnahme.

Bei den bisherigen einfokalen Aufbauten wurden vor der Messung die Objektive zueinander ausgerichtet und während der Messung wurde dann die Probe relativ zum Strahl bewegt und so gerastert (Tischraster-System). Die Strahllage und die relative Position der Objektive zueinander wurden während der Messung nicht verändert. So musste die Phasenbeziehung der beiden Objektiv-Fokusse nur für den einen Punkt konstant gehalten werden. Die laterale Bewegung der Probe beeinflusste die Phasenbeziehung solange nicht, wie die Probe eine homogene Verteilung des Brechungsindex besaß. Bei der axialen Rasterung der Probe konnte die Phasenbeziehung durch eine Phasenkompensation, auf die in Abschnitt 4.6 näher eingegangen wird, konstant gehalten werden.

Um die Aufnahmegeschwindigkeit zu erhöhen, wird die Probe nun mit mehreren Strahlen simultan beleuchtet und abgerastert. Die Teilung des aufgeweiteten und kollimierten Laserstrahls in mehrere Teilstrahlen kann unter anderem mit einem Mikrolinsen-Array oder einem Mikrolinsenrad vom Nypkow-Typ¹ erfolgen. Die laterale Rasterung der Probe wird im ersten Fall durch einen schnell oszillierenden galvanometrischen Spiegelscanner und im zweiten Fall durch die Drehung des Rades hervorgerufen. Es handelt sich somit also um ein Strahlraster-System. Die Rasterung der Probe entlang der optischen Achse erfolgt weiterhin durch Verschieben der Probe.

Da die Datenaufnahme nun an mehreren Punkten erfolgt, muss bei dem multifokalen 4Pi-Aufbau die Phase nicht mehr nur für einen Punkt konstant gehalten werden, sondern über das gesamte Bildfeld des Mikroskops. Die Ortsinvarianz der Phase über das gesamte Bildfeld ist erfüllt, wenn die folgende Gleichung gilt [16]:

$$\phi_2 \left(\hat{M} \cdot \vec{r} \right)_{z=0} = \phi_1 \left(\vec{r} \right)_{z=0} + konst \quad (3.6)$$

Die Gleichung beschreibt, dass die Phasenebenen des einen Objektivs (ϕ_2) einer Spiegelung an der Fokalebene oder an einer dazu parallelen Ebene der Phasenebenen des anderen Objektivs (ϕ_1) entsprechen müssen. In diesem Fall sind die Flächen gleicher Phasenbeziehung parallel zur Bildebene. Die Gleichung (3.6) ist erfüllt, wenn die Komponenten und die Geometrie des Interferometers keinen Einfluss auf die Form der Phase $\phi(\vec{r})$ haben. Für eine Dreiecksanordnung des Interferometers mit \hat{M} wie in Gleichung (3.3) ist dies erfüllt. Die Phasenebenen können mittels eines Spiegels in einem der Interferometerarme und durch Nachregeln der Objektive in einem iterativen Prozess vor der Messung plan gestellt werden. Die Phasenbeziehung während der axialen Rasterung der Probe kann wie bei dem einfokalen System durch eine Phasenkompensation erfolgen.

¹Die Nypkow-Scheibe, die 1884 von Nypkow erfunden wurde, ist eine Scheibe mit Lochblenden, die als archimedische Spirale angeordnet sind. Durch Drehung beleuchtet jede Lochblende eine Linie in der Probe, so dass ein Lochblenden-Segment der Scheibe das gesamte Bildfeld abrastert.

Die Punktbildfunktion des multifokalen 4Pi-Mikroskops ergibt sich durch die Faltung der Beleuchtungs-PSF mit der vektoriellen Gitterfunktion $\vec{g}(\vec{r})$ und der anschließenden Multiplikation mit der Detektions-PSF:

$$h_{4\text{Pi}}(\vec{r}) = \left[\left| \left(\vec{E}_{\text{Bel}}(\vec{r}) + \hat{M} \cdot \vec{E}_{\text{Bel}}(\hat{M} \cdot \vec{r}) \right) \otimes \vec{g}(\vec{r}) \right|^4 \right] \cdot h_{\text{Det,real}}(\vec{r}) \quad (3.7)$$

Bei einem 4Pi-Aufbau vom Typ A kann $h_{\text{Det,real}}$ aus Gl. (3.1) und bei einem 4Pi-Aufbau vom Typ C aus Gl. (3.5) entnommen werden. Die vektorielle Gitterfunktion beschreibt die Strahlaufteilung und entspricht einer Summe aus mehreren δ -Funktionen in der Fokalebene, wobei jede δ -Funktion für einen Fokus steht:

$$\vec{g}(\vec{r}) = \begin{pmatrix} 1 \\ 1 \\ 1 \end{pmatrix} \cdot g(\vec{r}) \quad (3.8)$$

In Abbildung 3.5 ist die Punktbildfunktion für ein MMM-4Pi-Mikroskop vom Typ A dargestellt.

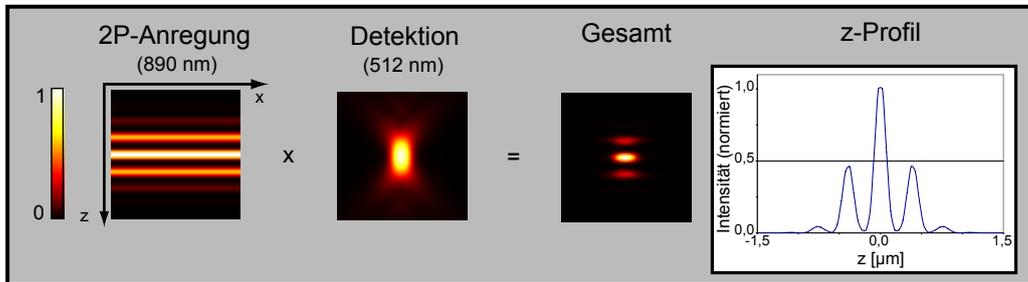


Abbildung 3.5: Theoretische Punktbildfunktion für ein MMM 4Pi Typ A. Die Anregungs-PSF hat die dargestellte Form, da die Probe nun in einer Ebene flächig und nicht punktwise beleuchtet wird. Die Anregungswellenlänge für die 2P-Anregung beträgt 890 nm und die Wellenlänge der Fluoreszenz 512 nm. Bei der Simulation der Detektions-PSF wurde eine konfokale Lochblende mit der Größe des Radius einer Airy-Scheibe verwendet.

Der Vorteil der Parallelisierung ist natürlich die Reduzierung der Aufnahmedauer, so dass auch Echtzeitaufnahmen von lebenden Zellen möglich werden. Hinzu kommt, dass die Laser für die 2P-Anregung oft eine viel größere Leistung besitzen, als für die Beleuchtung eines Punktes in der Probe nötig ist. Durch die Parallelisierung wird jedoch die gesamte Leistung des Lasers nutzbar, da jeder Teilstrahl nur eine kleine Portion der Gesamtleistung in die Probe bringt. Dennoch darf die über alle Fokusse gemittelte Laserleistung nicht zu

groß sein, weil es sonst zu einer Aufheizung in der Probe kommen könnte [31, 32]. Ein Nachteil der Parallelisierung ist eine unerwünschte Interferenz zwischen den einzelnen Fokussen in der Probe [33]. Dies erfolgt vor allem, wenn die Abstände der Fokusse zu dicht gewählt sind. Bei der kohärenten Beleuchtung von periodisch angeordneten Mikrolinsen kommt es auch in Ebenen, die nicht zur Fokusebene gehören, zur konstruktiven Interferenz mit periodischem Muster des Anregungslichtes. Dies entspricht der wiederholten Selbstabbildung der Fokusse in charakteristischen Ebenen parallel zur Fokusebene, d. h. es werden auch Ebenen außerhalb der Fokalebene sehr effektiv angeregt. Diese Ebenen werden als Talbot-Ebenen, bzw. partielle Talbot-Ebenen bezeichnet. Durch das unerwünschte Signal wird das axiale Auflösungsvermögen verschlechtert. Das Fluoreszenzsignal aus den Talbotebenen kann jedoch mittels konfokaler Detektion sehr effektiv herausgefiltert werden. Dennoch sollte zwischen dem Grad der Parallelisierung (Anzahl der Fokusse) und der stärkeren Interferenz zwischen den Fokussen in der Probe und dem damit gesteigerten Untergrundsignal abgewogen werden. Das Auftreten der Interferenz hängt von dem Verhältnis zwischen der verwendeten Wellenlänge, dem Abstand der Fokusse und der Apertur ab. Der Abstand der Fokusse sollte in Abhängigkeit von der fluoreszierenden Probe einen Wert zwischen $5 \cdot \lambda_0$ und $7 \cdot \lambda_0$ (λ_0 : Vakuumwellenlänge des Anregungslichtes) nicht unterschreiten. Der Grad der Parallelisierung lässt sich vor allem aufgrund der vorhandenen Laserleistung nicht beliebig wählen [16].

Die Aufnahmezeit ist im Allgemeinen langsamer als die Rastergeschwindigkeit. So wird die Fokalebene meist mehrfach während der Aufnahme eines Bildes abgerastert. Die Aufnahmedauer hängt praktisch nur noch von der Anzahl der Fluoreszenzphotonen ab, um ein genügend großes Signal-zu-Rauschverhältnis zu erhalten. Neue EMCCD-Kameras bieten eine Signal-Verstärkung, so dass die Aufnahme praktisch ohne Ausleserauschen erfolgt. Dadurch wird eine kürzere Aufnahmezeit mit Bildraten möglich, bei denen früher das gemessene Signal vom Ausleserauschen dominiert war [31, 34].

3.3 Strukturierte Beleuchtung

In dem vorherigen Absatz wurde gezeigt, dass sich die Aufnahmezeit verkürzen lässt, wenn eine Probe mit mehreren Strahlen simultan beleuchtet und abgerastert wird. Dabei erfolgt üblicherweise die laterale Abrasterung der Probe mehrfach während der Aufnahme eines Bildes. Es wird konfokal detektiert, um Hintergrundsignal herauszufiltern.

Bei den Methoden der strukturierten Beleuchtung wird von einem anderen Ansatz ausgegangen. Hier wird die Probe mit einem Muster strukturiert beleuchtet und für jede Position des Beleuchtungsmusters ein Bild mittels Fernfeld-Detektion aufgenommen. Mit der strukturierten Beleuchtung können zwei Effekte erzielt werden. Einerseits wird die strukturierte Beleuchtung eingesetzt, um das laterale Auflösungsvermögen unter Ausnutzung des „Moiré“-Effektes zu steigern [21] und andererseits, um einem Mikroskop axiales Trennvermögen auch ohne konfokale Detektion zu verleihen [20].

Um eine Steigerung des axialen Trennvermögens zu erhalten, wird für jede axiale Position der Probe eine ganze Bildserie aufgenommen, wobei jedes Bild der Serie einer anderen Position des Beleuchtungsmusters entspricht. Das eigentliche Bild der Probe ergibt sich durch anschließende Berechnung aus der aufgenommenen Bildserie.

Es gibt verschiedene Berechnungsmethoden, durch deren Anwendung aus einer Bildserie das eigentliche Bild berechnet wird. Die meisten Berechnungsmethoden haben gemeinsam, dass sie sich auf die Intensitätsmodulation in jedem einzelnen Pixel beziehen. Dabei gilt, dass die Bereiche der Fokusebene während der Aufnahme einer Bildserie eine hohe Modulation aufweisen und Bereiche außerhalb der Fokusebene nur schwach moduliert sind. Die Regionen außerhalb der Fokusebene sind im Vergleich zur Fokusebene mit den vielen Fokussen homogener und schwächer beleuchtet. Dies wird in Abbildung 3.6 verdeutlicht. Durch Berechnung der Modulation für jedes Pixel für die verschiedenen Bilder der Serie kann das schwach modulierte Hintergrundsignal von dem stark modulierten Fokussignal sehr effektiv getrennt werden. Dies kommt einer Konfokalisierung gleich und verleiht dem Mikroskop axiales Trennvermögen.

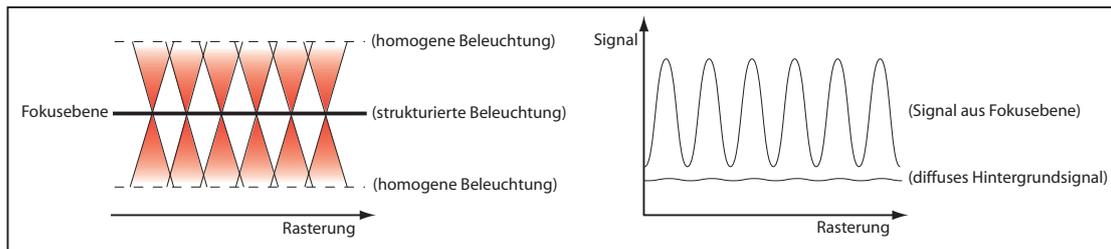


Abbildung 3.6: Schematische Abbildung zur strukturierten Beleuchtung. Die Fokusebene wird strukturiert beleuchtet und weist bei der Detektion eine hohe Modulation auf. Die Regionen außerhalb der Fokusebene sind dagegen eher homogen beleuchtet und sind bei der Detektion nur schwach moduliert.

Dies hat den Vorteil gegenüber der konfokalen Mikroskopie, dass nicht im Vorfeld die konfokale Lochblenden-Größe festgelegt werden muss. Durch einfache Parameteränderung im gewählten Algorithmus können die Bilder der Probe flexibler und gezielter bearbeitet werden. Nachteile der Methode der strukturierten Beleuchtung sind jedoch die große Datenmenge, die bei der Aufnahme von langen Bildserien entsteht und die längere Aufnahmedauer einer Bildserie im Vergleich zur Aufnahme eines Bildes bei einem schnell rasternden multifokalen Mikroskop. Die Anzahl der benötigten Bilder einer Serie in einer Ebene der Probe richtet sich nach dem gewählten Beleuchtungsmuster. Bei der Aufnahme einer Bildserie muss jeder Bereich der Probe mindestens einmal beleuchtet worden sein. Ebenso muss gewährleistet sein, dass sich die Probe während der Detektion einer Bildserie nicht bewegt.

Der „Konfokal-Algorithmus“ [35] eignet sich besonders für die strukturierte Beleuchtung mit im Vergleich zu der Ausdehnung der PSF großen Abständen zwischen den Beleuchtungseinheiten (Punkte oder Linien).

Es wird unter anderem ein Maximum-Bild berechnet, indem jedem Pixel aus den N Bildern der Serie seine maximal detektierte Intensität zugewiesen wird:

$$I_{\text{Max}}(x, y) = \text{Max}_{n=1 \dots N} [I_n(x, y)] \quad (3.9)$$

Die maximale Intensität jedes Pixels setzt sich sowohl aus dem Signal aus der Fokusebene, als auch aus dem Hintergrundsignal und dem Signal aus den multifokalen Talbot-Ebenen zusammen. Daher ist das berechnete Maximum-Bild nur semikonfokal. Analog dazu kann ein Minimum-Bild berechnet werden, indem jedem Pixel aus den N Bildern der Serie seine minimal detektierte Intensität zugewiesen wird. Diese resultiert hauptsächlich aus dem Hintergrundsignal und aus dem Talbot-Signal.

$$I_{\text{Min}}(x, y) = \text{Min}_{n=1 \dots N} [I_n(x, y)] \quad (3.10)$$

Durch Subtraktion der minimal detektierten Intensität von der maximal detektierten Intensität für jedes Pixel werden die ungewollten Signalbeiträge von dem Fokussignal getrennt. Die jedem Pixel auf diese Art zugewiesene Information ist nun konfokal und entspricht in etwa der Information, die mit einem konfokalen Mikroskop mit einem Fokus aufgenommen wird.

$$I_{\text{konf}}(x, y) = \text{Max}_{n=1 \dots N} [I_n(x, y)] - \text{Min}_{n=1 \dots N} [I_n(x, y)] \quad (3.11)$$

Der „Superkonfokal-Algorithmus“ geht von der Annahme aus, dass die Fokusregionen für die meisten Positionen des Beleuchtungsmusters nicht beleuchtet werden und dies somit zu einem verzerrten Histogramm von detektierten Intensitäten führt. Er berechnet sich nach folgender Gleichung:

$$I_{\text{superkonf}}(x, y) = \text{Max}_{n=1 \dots N} [I_n(x, y)] + \text{Min}_{n=1 \dots N} [I_n(x, y)] - 2 \cdot \text{Avg}_{n=1 \dots N} [I_n(x, y)] \quad (3.12)$$

Das Mittelwert-Bild wird berechnet, indem für jedes Pixel der Mittelwert aus den N Bildern der Serie berechnet wird:

$$I_{\text{Avg}}(x, y) = \frac{1}{N} \cdot \sum_{i=1}^N [I_n(x, y)] \quad (3.13)$$

Die Berechnung des Bildes aus der Serie erfolgt in allen Fällen lokal für jedes einzelne Pixel, ohne die Intensitäten von benachbarten Pixeln zu berücksichtigen und ist in sich nichtlinear [36]. Dadurch kann das erzeugte Bild nicht ohne weiteres als Faltung der Objektfunktion mit der PSF beschrieben werden. Die PSF ist abhängig von der exakten räumlichen Verteilung der Fluoreszenz in der Probe. Ebenso ist das Intensitätsverhältnis von der Form des Objektes abhängig. Durch die Nichtlinearität kann es zu unerwünschten Effekten kommen. Ist z. B. der Abstand der Fokusse ähnlich zu der Ausdehnung der

PSF und ist die Beleuchtung sinusförmig bei einer flachen Probe, so kann es bei dem Superkonfokal-Algorithmus dazu kommen, dass das Signal von dem Objekt komplett unterdrückt wird [35]. Daher sollte der Abstand der Fokusse größer im Vergleich zur PSF-Ausdehnung sein. Im Falle von einem schlechten Signal-zu-Rausch-Verhältnis wird das berechnete Bild durch hohe Minimum-Werte sehr kleine Intensitäten aufweisen. Bei einem großen Signal-zu-Rausch-Verhältnis hingegen wird die Nichtlinearität vernachlässigbar [36]. Bei dem Superkonfokal-Algorithmus kann es dazu kommen, dass in dem berechneten Bild noch Strukturen im Fluoreszenzsignal zu sehen sind. Dies entspricht der Raumfrequenz, die durch die Überlappung der einzelnen Positionen des Beleuchtungsmusters übertragen wird. Ein großer Vorteil des Superkonfokal-Algorithmus ist, dass er sehr schnell und leicht berechnet werden kann und zu einer hohen axialen Auflösung führt.

4 Experimenteller Aufbau

In diesem Kapitel werden die verwendeten Elemente des MMM-4Pi-Aufbaus vorgestellt und beschrieben. Der Aufbau kann grob in sechs Teile untergliedert werden. Dazu zählen die Beleuchtungseinheit, die Anregungskavität, die Detektionskavität, die Detektion, die Ansteuerung, sowie eine Automatik-Justage-Einheit.

Abbildung 4.1 entspricht einer schematischen Darstellung des Prinzips eines MMM-4Pi-Aufbaus vom Typ A und Typ C.

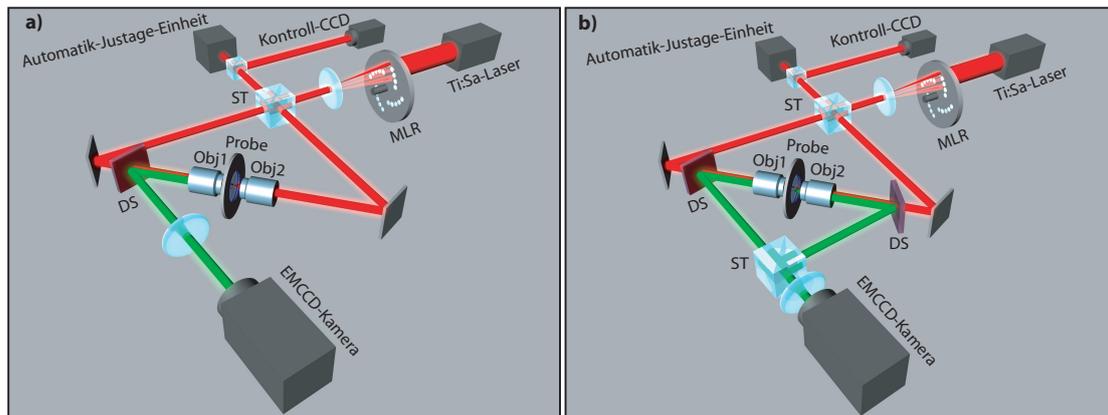


Abbildung 4.1: Schematische Abbildung des MMM-4Pi-Aufbaus. Der aufgeweitete Laserstrahl wird für die multifokale Anwendung von einem rotierenden Mikrolinienrad (MLR) in viele Teilstrahlen geteilt. Über einen Strahlteilerwürfel (ST) werden diese auf die Rückapertur zweier sich gegenüberstehender Objektive abgebildet und auf dieselbe Ebene innerhalb der Probe fokussiert. a) Bei Typ A wird das Fluoreszenzlicht von einem der beiden Objektive gesammelt und mit einem dichroitischen Spiegel (DS) vom Anregungslicht getrennt. Durch eine Tubuslinse wird das Fluoreszenzlicht schließlich auf den Detektor abgebildet. b) Bei Typ C wird das Fluoreszenzlicht von beiden Objektiven gesammelt, von zwei dichroitischen Spiegeln (DS) vom Anregungslicht getrennt und in einem weiteren Strahlteilerwürfel (ST) kohärent vereint. Über eine Tubuslinse wird das Fluoreszenzlicht ebenfalls auf den Detektor abgebildet.

4.1 Beleuchtungseinheit

Die Beleuchtungseinheit beinhaltet neben der Lichtquelle Elemente zur Strahlformung und Strahlteilung für die multifokale Anwendung des Mikroskops.

Als Lichtquelle wird ein modengekoppelter Titan-Saphir-Laser (*Chameleon Ultra*, *Coherent Inc., Santa Clara, Ca, USA*) verwendet, der Pulsbreiten von 140 fs mit einer Wiederholungsrate von 80 MHz liefert. Es können Wellenlängen im Bereich von 690 – 1040 nm ausgewählt werden und die Laserleistung kann je nach Wellenlänge bis zu 2 W betragen. Die Raum-Mode ist TEM_{00} und das Laserlicht ist linear horizontal polarisiert.

Zum Schutz des Lasers vor rückreflektierten Strahlen wird ein Faraday-Rotator (*FL500/1100-8SI*, *LINOS Photonics GmbH & Co. KG, Göttingen*) benutzt. Dieser dreht die Polarisationsrichtung um 45° .

Um die Stabilität der Laserleistung zu gewährleisten wurde nachträglich ein LPC (*Laser Power Controller*, *CRi Inc., Woburn, USA*) eingebaut. Da dieser nur mit einer vertikalen Polarisationsrichtung arbeitet, wird die Polarisation des Laserlichtes vorher mittels eines Fresnel-Rhombus eingestellt.

Der Laserstrahl wird mit einem stufenlos verstellbaren Zoom-Strahlaufweiter (*S6ASS2075/94*, *Sill Optics GmbH & Co. KG, Wendelstein*) kollimiert und aufgeweitet.

Die Teilung des Laserstrahls erfolgt durch ein Mikrolinsenrad vom Nypkow-Typ mit 5624 Mikrolinsen. Der mittlere Abstand der Linsen liegt bei $(512 \pm 33) \mu\text{m}$. Die Fokusslänge der Linsen beträgt 12 mm. Die Mikrolinsen sind in einem hexagonalen Muster angeordnet und bilden acht spiralförmige Segmente, so dass eine Drehung des Rades einem achtfachen lateralen Rastern des Bildfeldes entspricht. In Abbildung 4.2 ist die schematische Zeichnung eines Mikrolinsenrades dargestellt.

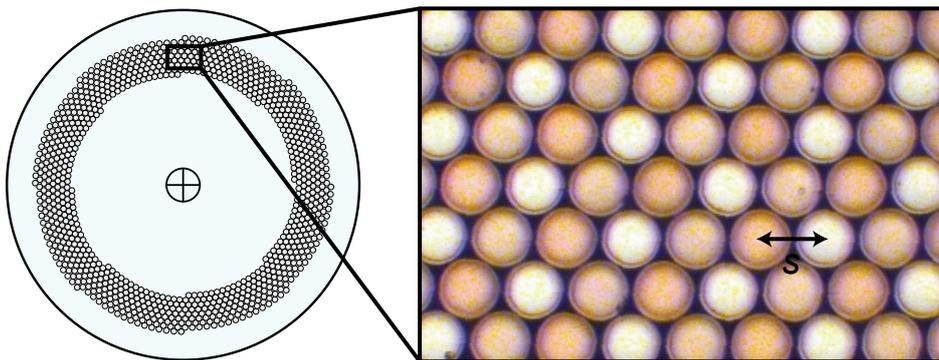


Abbildung 4.2: Schematische Abbildung des Mikrolinsenrades. Dieses besteht aus acht Segmenten, wobei bei einer Rotation des Rades die Probe achtmal in einer Ebene flächig abgerastert wird.

Das Mikrolinsenrad wird von einem DC-Servomotor (*Series 3565K, Faulhaber GmbH & Co. KG, Schönaich*) über eine Magnetkopplung angetrieben. Die Drehzahl des Motors und somit des Mikrolinsenrades wird mit einem Potentiometer geregelt. Bei einer Drehzahl von $3000 \frac{\text{U}}{\text{min}}$ wird das Bildfeld 400 mal pro Sekunde abgerastert. Die Drehzahl kann mit einem digitalen Drehzahlmesser (*DT1L, Conrad Electronic, Hirschau*) abgelesen werden.

Die einzelnen Teilstrahlen werden mit drei Achromatlinsen kollimiert und die Strahlweite auf die Rückapertur der beiden Objektive angepasst.

4.2 Anregungskavität

Dieser Teil des Aufbaus befindet sich im Gegensatz zu der Beleuchtungseinheit auf einer vertikalen Platte, die auf demselben optischen Tisch wie die Beleuchtungseinheit angebracht ist. Diese Anordnung hat den Vorteil, dass die Probe horizontal in den Aufbau eingesetzt werden kann. Dadurch wird die Justage der Probe erleichtert und die Anordnung ist auch für die Verwendung von Tauchobjektiven geeignet.

Die Anregungskavität hat die zuvor erwähnte Dreiecksanordnung, für die die Stabilität der Phasenbeziehung über das gesamte Bildfeld gewährleistet ist. Hier werden die Teilstrahlen der Mikrolinsen mit einem Strahlteilerwürfel geteilt und jeweils über zwei Spiegel auf die Rückapertur von zwei sich gegenüberstehenden Wasserimmersions-Objektiven (*HXC PLAPO 63X, 1.20 W CORR CS, Leica Mikrosysteme GmbH, Wetzlar*) gelenkt.

Die Objektive besitzen einen Öffnungswinkel von $\alpha = 64^\circ$ und sind mit einem Korrekturring ausgestattet. Um sphärische Aberrationen aufgrund von Brechungsindexunterschieden zu vermeiden, werden die Objektive mit dem Korrekturring auf die jeweilige Deckglasdicke eingestellt. Dies ist nötig, da das Glas der Deckgläser mit $n = 1.518$ einen anderen Brechungsindex als das Immersions- und das Einbettmedium der Probe (bei Wasser $n = 1.33$) besitzt [10]. Die Wellenfronten werden durch die Objektive so voraberriert, dass nach den Medienübergängen von Wasser-Glas-Wasser keine Aberrationen mehr vorhanden sind. Ebenso ist es wichtig, dass die Deckgläser der Probe orthogonal zur optischen Achse der Objektive liegen, da durch die Objektive nur sphärische Aberrationen ausgeglichen werden können. Ist dies nicht gegeben, so kann es auch zu Koma oder Astigmatismus kommen. Die Objektive besitzen eine gemeinsame optische Achse und ihr Abstand zueinander entspricht der doppelten Fokallänge für die verwendete Wellenlänge, so dass sie eine gemeinsame Fokalebene besitzen. Für die multifokale Anwendung bei 4Pi-Mikroskopen ist es wichtig, dass die Objektive plan sind. So ist gewährleistet, dass die Flächen ihrer Bildpunkte in einer Ebene liegen. Das untere Objektiv befindet sich in einem Halter (*LP-1A Series, Newport Spectra-Physics GmbH, Darmstadt*), der justiert und dann geklemmt werden kann. Das obere Objektiv kann durch eine Piezo-gesteuerte Halterung (*P-733K034, Physik Instrumente GmbH & Co. KG, Karlsruhe*) in x- und y-Richtung verstellt werden. Der Verstellbereich beträgt $30 \mu\text{m}$ im closed-loop-Betrieb. Die z-Verstellung des Objektivs erfolgt ebenfalls über einen Piezohalter (*MIPOS 100 PL, Pie-*

zosystem GmbH, Jena), dessen Verstellweg $140\ \mu\text{m}$ entspricht. Die relative Justage der Objektive zueinander wird während der Messung durch eine Automatik-Justage-Einheit gewährleistet, auf die in Abschnitt 4.7 eingegangen wird.

Die Probe befindet sich horizontal zwischen den Objektiven auf einem Proben­tisch. Durch die Bewegung entlang der optischen Achse (z-Richtung) kann die axiale Rasterung der Probe erfolgen. Der Proben­tisch liegt an drei Punkten auf drei Piezos (*PA65-14SG, Piezosystem Jena GmbH, Jena*) auf, durch die die z-Verstellung der Probe durchgeführt werden kann. Der Verstellbereich entspricht $75\ \mu\text{m}$ im closed-loop-Betrieb. Falls der Verstellbereich nicht ausreicht, kann der Proben­tisch zusätzlich mit drei Pikomotoren (*Model 8321, New Focus, San Jose, USA*) entlang der optischen Achse verstellt werden. Der Verstellbereich beträgt $12.7\ \text{mm}$. In x- und y-Richtung kann der Tisch ebenfalls mit solchen Pikomotoren bewegt werden.

Ein wichtiges Kriterium bei der Justage des Interferometers ist, dass die Ebenen gleicher Phasenbeziehung senkrecht zur optischen Achse verlaufen. Die Einstellung der Phasenebenen kann durch das Kippen des oberen Interferometer-Spiegels erfolgen. Der auftretende Strahlversatz wird durch Nachregeln des oberen Objektivs ausgeglichen. Da eine Verschiebung des Objektivs wiederum zu einer leichten Verkippung der Phasenebenen führt, erfolgt das Einstellen der Phasenebenen somit sukzessiv durch Verkippen des Spiegels und Nachregeln des Objektivs in einem iterativen Prozess. Die Weglängen der Interferometerarme können durch Verschieben des Strahlteilerwürfels abgeglichen werden. Dies erfolgt ebenfalls mit einem Piezo (*P-841.20, Physik Instrumente GmbH & Co. KG, Karlsruhe*), dessen Verstellbereich $30\ \mu\text{m}$ im closed-loop-Betrieb beträgt.

Der Aufbau beinhaltet zusätzlich ein Fernfeld-Mikroskop. Als Lichtquelle wird eine externe Fluoreszenzlampe (*EL6000, Leica Mikrosysteme GmbH, Wetzlar*) verwendet, deren Licht über einen Klappspiegel und den oberen Dichroiten in das obere Objektiv gelenkt wird. Das Fluoreszenzlicht wird ebenfalls von dem oberen Objektiv aufgesammelt und über die beiden Spiegel und mehrere Optiken auf eine Webcam (*PCVC 840K/20, Philips GmbH, Hamburg*) abgebildet. Das Fernfeld-Mikroskop eignet sich durch sein großes Bildfeld, in der Probe nach interessanten Zellen für die Messung zu suchen und den Proben­tisch lateral so zu verschieben, dass die Zelle sich im Bildfeld des 4Pi-Mikroskops befindet.

4.3 Detektionskavität

Die Detektionskavität befindet sich auf der gleichen vertikalen Platte, wie die Anregungskavität. Sie bildet ebenfalls eine Dreiecksform analog zu der Anregungskavität. Das Fluoreszenzlicht wird hier von den beiden Objektiven aufgesammelt, die auch für die Anregung genutzt werden. Da die Wellenlänge des Fluoreszenzlichtes sich von der des 2P-Anregungslichtes unterscheidet und normalerweise Objektiv auf Grund von Dispersion bei unterschiedlichen Wellenlängen einen chromatischen Längsfehler aufweisen, werden hier speziell für NIR-Licht (NIR: nahes Infrarot) gepaarte APO-Objektive verwendet. Idealerweise sollte die Fokusverschiebung bezüglich der Wellenlänge bei beiden Objektiven denselben Verlauf haben. Ebenfalls sollte die Fokusverschiebung für die Wellenlängen, die für die Anregung und Fluoreszenz auftreten, denselben Wert aufweisen. Ist dies der Fall, so sind die Fokusebene der 2P-Anregung und die Fokusebene für die Detektion identisch. Falls die zuletzt genannte Bedingung nicht erfüllt ist, kann ein Ausgleich der Fokusverschiebung mit Hilfe der beiden Tubuslinsen versucht werden. Ansonsten wird es schwierig sein, im Typ C Modus die Fokuse aus beiden Interferometerarmen gleichzeitig scharf auf die Kamera abzubilden. Für die Typ A Anwendung spielt dies keine Rolle, da nur die Fokuse aus einem Interferometerarm scharf auf die Kamera abgebildet werden müssen. In Diagramm 4.3 ist der chromatische Längsfehler der beiden verwendeten Objektive in Abhängigkeit von der Wellenlänge dargestellt.

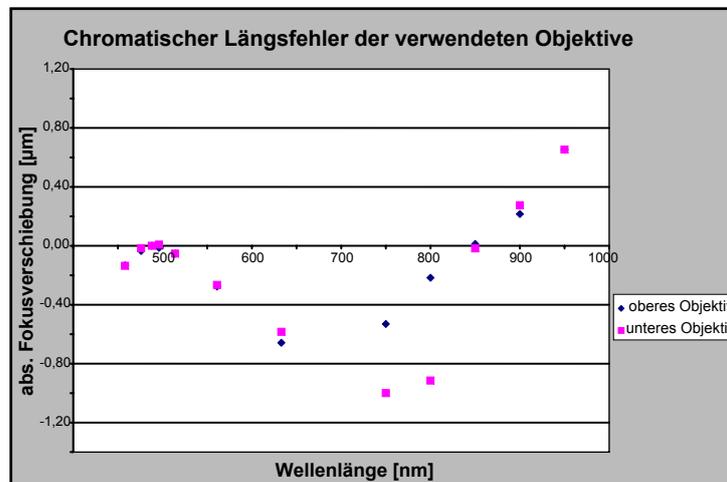


Abbildung 4.3: Diagramm zum chromatischen Längsfehler der verwendeten Objektive. Hier ist zu erkennen, dass beide Objektive einen ähnlichen Verlauf des chromatischen Längsfehlers in Abhängigkeit von der Wellenlänge besitzen. Für die verwendete Anregungswellenlänge von 890 nm und für die Fluoreszenzwellenlänge von 512 nm ist der chromatische Längsfehler beider Objektive nahezu identisch.

Nachdem das Fluoreszenzlicht von beiden Objektiven aufgesammelt wurde, wird es durch zwei dichroitische Langpassfilter (650 DCXR, AHF analysentechnik AG, Tübingen, 460–635 nm, $R \geq 95\%$) von dem Anregungslicht getrennt und auf den Detektionsstrahlteilerwürfel gelenkt, wo sich die zueinander gehörenden Fluoreszenzfokuse treffen sollten. Für die Typ C Anwendung können die Fokuse durch Verkippen des unteren Dichroits zur Deckung gebracht werden. Der Weglängenabgleich der Detektionsinterferometerarme erfolgt durch Verschieben des Strahlteilerwürfels. Dies kann durch einen Piezo (*P-841.20, Physik Instrumente GmbH & Co. KG, Karlsruhe*) mit einem Verstellweg von 30 μm im closed-loop-Betrieb geschehen. Falls dies nicht ausreicht, kann ein Pikomotor (*Model 8351 Tiny, New Focus, San Jose, USA*) mit einem Verstellweg von 12.7 mm genutzt werden.

Auch hier müssen die Phasenebenen plan gestellt werden. Dies wird durch Verkippen des Strahlteilerwürfels erreicht. Der dadurch auftretende Strahlversatz wird daraufhin durch Verkippen des Dichroits ausgeglichen. Eventuell müssen die Weglängen der Detektionsinterferometerarme zwischendurch wieder abgeglichen werden. Die Einstellung der Phasenebenen erfolgt also sukzessiv durch Verkippen des Dichroits, des Strahlteilerwürfels und durch den Weglängenabgleich. Die von dem Strahlteilerwürfel ausgehenden Strahlen werden jeweils über einen Spiegel und durch eine Tubuslinse abgebildet. Zwei weitere Spiegel sorgen dafür, dass die Strahlen aus dem 4Pi-Modul ausgekoppelt werden.

Soll nur Typ A genutzt werden, so kann man durch eine schwenkbare Klappe den Strahl im oberen Interferometerarm vor dem Strahlteilerwürfel blocken.

4.4 Detektion

Für die Erfassung der zellulären Dynamik von lebenden Zellen ist es nötig, möglichst schnell viele Aufnahmen machen zu können. Wie in Abschnitt 4.1 bereits erwähnt wurde, kann die laterale Rasterung der Probe bereits sehr schnell erfolgen. Die limitierenden Faktoren bei der Aufnahmedauer sind jedoch immer noch die verfügbaren Detektionssysteme. CCD-Kameras (CCD, Charge Coupled Device) sind sehr gut für eine schnelle Aufnahme geeignet, da sie aus einem Array von Pixeln bestehen, wobei jedes Pixel als eigener kleiner Photosensor aufgefasst werden kann. Die Quanteneffizienz ist bei den heute verfügbaren Systemen sehr gut, dennoch besitzen viele CCD-Kameras ein hohes Ausleserauschen, so dass lange Aufnahmezeiten nötig sind, bis das detektierte Signal das Rauschsignal übertrifft. Die Quanteneffizienz beschreibt das Verhältnis zwischen der Anzahl der detektierten Photonen zur Anzahl der auftreffenden Photonen.

Ein weiteres wichtiges Kriterium bei der Auswahl der Kamera ist deren Pixelanzahl und Pixelgröße. Die Pixelgröße sollte zu dem Auflösungsvermögen des Mikroskops und dem Bildfeld in der Probe passen. Wenn zwei von dem Mikroskop abgebildete Objekte getrennt wahrnehmbar sind, sollte ein Pixel nicht größer sein, als der durch das Mikroskop vergrößerte Abstand der beiden Objekte. Sonst würde ein Pixel gleichzeitig das Signal beider Objekte detektieren und sie nicht getrennt darstellen. Dies wird durch das Nyquist Kriterium beschrieben [37].

Dieser Zusammenhang zwischen Auflösungsvermögen und Pixelgröße ist in Abbildung 4.4 dargestellt.

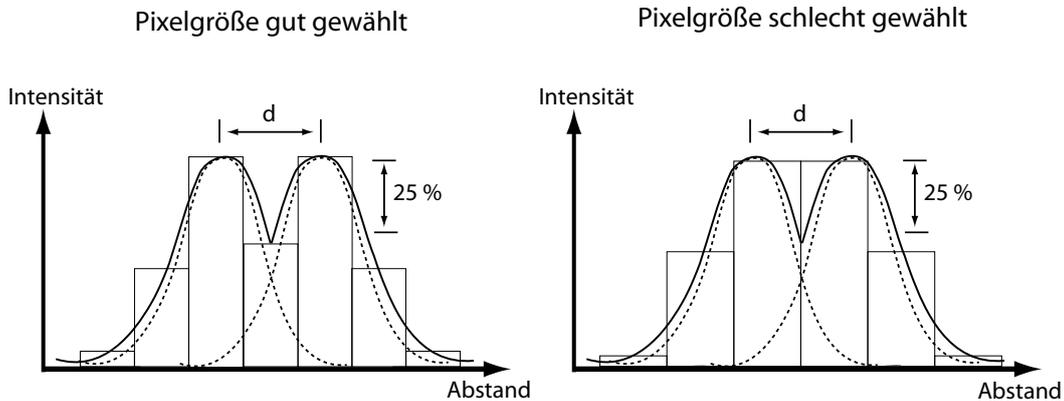


Abbildung 4.4: Schematische Darstellung zum Nyquist-Kriterium. In dem linken Bild ist die Pixelgröße passend zur Vergrößerung und zum Auflösungsvermögen des Mikroskops gewählt. Die Punktobjekte sind auch mit der verwendeten Pixelgröße getrennt detektierbar. Dagegen ist im rechten Bild die Pixelgröße zu groß gewählt. Obwohl die Punktobjekte nach dem Auflösungsvermögen des Mikroskops getrennt wahrnehmbar wären, werden sie aufgrund der Pixelgröße als ein Objekt detektiert.

In diesem Teil des Aufbaus kann zwischen zwei Kameras gewählt werden, wobei durch geeignete Linsenabbildungen das Bild der Probe, entsprechend dem Auflösungsvermögen des Mikroskops, auf die jeweilige Pixelgröße angepasst wird. Die effektive Pixelgröße in der Probe sollte bei beiden Kameras ca. 100 nm entsprechen.

Durch den Einbau eines zusätzlichen Spiegels mit Magnetfuß wird das Fluoreszenzlicht auf die CCD-Kamera (*Imager Intense, La Vision GmbH, Göttingen*) abgebildet. Diese Kamera kann einen Spektralbereich von 290 – 1100 nm detektieren. Sie besitzt eine Quanteneffizienz von mehr als 62%. Die Kamera hat eine räumliche Auflösung von 1376×1040 Pixel mit einer Pixelgröße von $6.45 \times 6.45 \mu\text{m}^2$ und ihr Ausleserauschen beträgt weniger als 5 Elektronen pro Pixel. Durch so genanntes „Binning“ können mehrere Pixel kombiniert werden. Das Signal der kombinierten Pixel wird aufaddiert und die Pixelgröße entspricht ebenfalls der Summe der beteiligten Pixel. Hier wurden 2×2 Pixel kombiniert, so dass eine effektive Pixelgröße von $12.9 \times 12.9 \mu\text{m}^2$ bei 688×520 Pixeln entsteht. Die maximale Bildrate der Kamera beträgt in diesem Fall 20 Bilder pro Sekunde. Die Messung an einem Referenz-Gitter ergab eine effektive Pixelgröße in der Probe von 116 nm. Aufgrund der Größe des Pixelarrays können hier beide vom Detektionsstrahlteilerwürfel ausgehende Strahlen detektiert werden. Durch den Phasensprung um $\pi/2$ bei der Reflexion am Strahlteilerwürfel sind beide Signale phasenverschoben. Zeigt das eine Signal

konstruktive Interferenz, so ist das andere Interferenzsignal destruktiv. Mit dieser Kamera kann das gesamte Bildfeld des Mikroskops von $20 \times 20 \mu\text{m}^2$ betrachtet werden. Das Bildfeld ist hier definiert als die xy-Fläche eines detektierten Farbstoff-Sees, für die die Fluoreszenzintensität größer als $1/4$ der maximalen Intensität ist, da 2P-Anregung verwendet wurde.

Wird der Spiegel mit Magnetfuß entfernt, so kann die EMCCD-Kamera (*Andor iXon, Andor Technology, Belfast, Northern Ireland*) verwendet werden. Das Fluoreszenzsignal wird vorher mit einer 1 : 2-Abbildung auf die Pixelgröße der Kamera von $24 \times 24 \mu\text{m}^2$ angepasst. Die Messung eines Referenz-Gitters ergab eine effektive Pixelgröße in der Probe von 103 nm. Da das Pixelarray mit 128×128 Pixel im Vergleich zur Imager-Kamera viel kleiner ist, wird hier nur der untere Ausgang von dem Detektionsstrahlteiler abgebildet. Das detektierte Bildfeld entspricht somit $13.2 \times 13.2 \mu\text{m}^2$.

Eine EMCCD-Kamera (EMCCD, Electron Multiplying Charge Coupled Device) [38] basiert auf einem Halbleiterchip auf Silikonbasis, der wie eine CCD-Kamera aus einem Pixel-Array besteht. Bei Abbildung 4.5 ist eine Schemazeichnung eines EMCCD-Chips zu sehen.

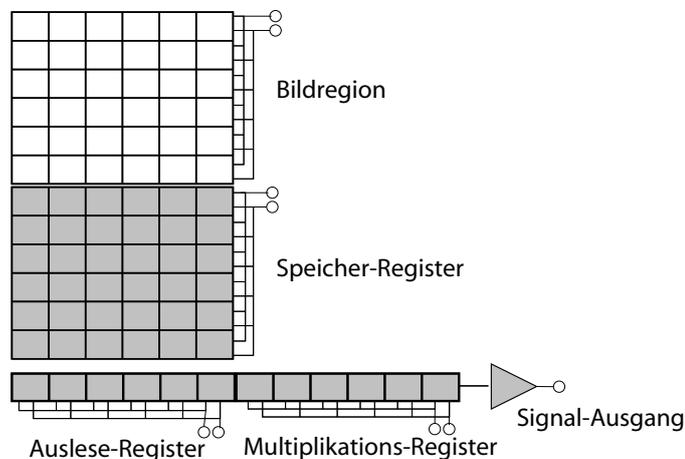


Abbildung 4.5: Schematische Abbildung eines EMCCD-Chips. Der ungefärbte Bildbereich ist der lichtempfindliche Teil des EMCCD-Chips. Die grau-gefärbten Teile sind dagegen abgedeckt und werden somit von dem einfallenden Licht nicht beeinflusst.

Der Unterschied zu einer CCD-Kamera ist, dass sie ein Multiplikationsregister (Gain) enthält. In dem Multiplikationsregister werden die Elektronen zur Stoß-Ionisierung gebracht, wodurch weitere Elektronen freigesetzt werden. Auch wenn die Multiplikation

pro Transfer nur gering ist, kann die Multiplikation durch die große Anzahl der auftretenden Ionisationen doch ausreichen, das Signal über das Ausleserauschen zu verstärken und somit das Ausleserauschen effektiv zu reduzieren.

Bei zusätzlicher Einstellung des EM-Gains beträgt das effektive Ausleserauschen bei dieser Kamera weniger als ein Elektron pro Pixel.

Die hier verwendete Kamera verfügt außerdem über einen Frame-Transfer-Modus. Durch ein zusätzliches Speicherregister, das die gleiche Anzahl an Pixel wie der photoaktive Teil des Chips enthält, kann die Bildrate der Kamera erhöht werden.

Bei einer Kamera ohne diesen Modus werden durch Photoneneinfall Elektronen freigesetzt, die jedoch in dem jeweiligen Pixel verharren. Wird eine Struktur auf den CCD-Chip abgebildet, entsteht ein Elektronenmuster in dem Pixel-Array. Um ein Bild mit dem Computerspeicher auszulesen, muss das Ladungsmuster über transparente Elektroden, die über das Pixel-Array verteilt sind, abtransportiert werden. Erst nach Abschluss dieses Prozesses können neue Photonen detektiert werden.

Bei einer Kamera mit Frame-Transfer-Modus wird dagegen das Ladungsmuster von dem photoaktiven Teil des Chips in bestimmten Takten Pixelreihe für Pixelreihe in das Speicherregister verschoben. Das Speicherregister ist ebenfalls mit Elektroden überzogen, die die Ladungspakete in das Ausleseregister transportieren. Daher kann ein Bild ausgelesen werden, während das nächste schon aufgenommen wird. Die maximale Bildrate der Kamera beträgt somit 515 Bilder pro Sekunde.

Der CCD-Chip wird von hinten beleuchtet, wodurch eine hohe Quanteneffizienz von 92.5% erreicht wird. Bei Kameras mit von hinten beleuchteten CCD-Chips ist das Substrat des Chips so stark verdünnt, dass das Licht die photoaktiven Bereiche durch das Substrat hindurch erreicht und den Chip somit von hinten beleuchtet. So kann die gesamte Oberfläche des Chips zur Detektion genutzt werden, da keine Verdrahtungen und Kontakte stören, wie bei von vorne beleuchteten CCD-Kameras.

Vor jeder Kamera werden zwei Filter verwendet. Ein Kurzpassfilter (*E 720 SP, AHF analysentechnik AG, Tübingen*) sorgt dafür, dass das NIR-Licht des Lasers, das eventuell doch von den Dichroiten reflektiert wurde, nicht den Kamera-Chip erreicht. Ein Bandpassfilter (*HQ 532/70, AHF analysentechnik AG, Tübingen*) wird verwendet, um das Umgebungslicht und ebenfalls NIR-Licht herauszufiltern, so dass nur das Fluoreszenzlicht detektiert wird.

4.5 Ansteuerung

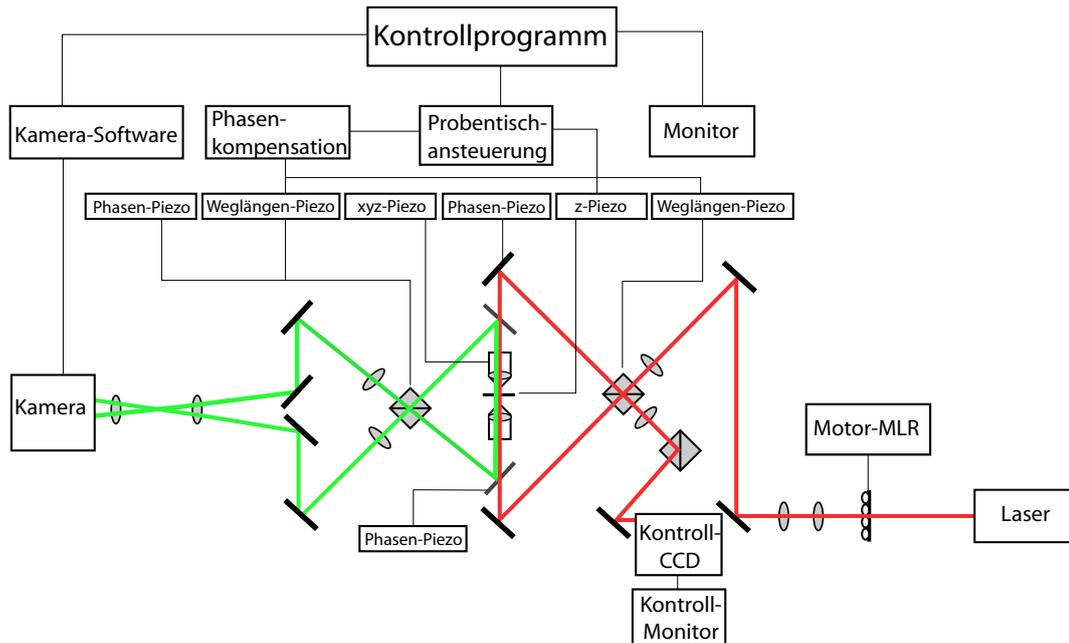


Abbildung 4.6: Schematische Abbildung zur Steuereinheit des Aufbaus.

In diesem Abschnitt wird beschrieben, wie der Aufbau während der Aufnahmen angesteuert wird. Abbildung 4.6 gibt einen Überblick über die bei der Ansteuerung beteiligten Komponenten. Eine zentrale Rolle spielt das Kontrollprogramm (Inspector, von Dr. Andreas Schönle [39]), bei dem vor der Messung alle nötigen Parameter eingestellt werden. Dazu zählen unter anderem die Aufnahmedauer pro Bild, der axiale Verfahrensweg des Probentisches mit der entsprechenden Anzahl der Schritte, die Anzahl der Bilder pro Schritt, sowie Kamera spezifische Parameter, wie z.B. die Temperatur des Chips, die Binning-Einstellung, der Gain-Wert und noch weitere Parameter. Das Kontrollprogramm gibt dann die Kamera-spezifischen Daten an die jeweilige Kamera weiter. Die Daten für die Probentischsteuerung werden von dem Kontrollprogramm bei Nutzung der Imager-Kamera an eine Parallelbox und bei Nutzung der Andor-iXon-Kamera an eine PCI-Karte mit BNC-Terminal-Block (*NI-PCI-6031/BNC-2110, National Instruments Corporation, Austin, USA*) weitergegeben. Je nach genutzter Kamera ist entweder die Parallelbox oder der BNC-Terminal-Block mit den Piezo-Controllern des Probentisches verbunden, wodurch der Probentisch sehr präzise axial verfahren werden kann. Die gewählte Schrittweite be-

trägt 50 nm. Während der Messung sind die Aufnahmesequenzen der jeweiligen Kamera und die axiale Bewegung des Probenstisches synchronisiert. Die Aufnahmen erfolgen während der Probenstisch an einer Stelle der optischen Achse verharrt. Während ein Schritt des Probenstisches durchgeführt wird, nimmt die Kamera dagegen keine Bilder auf.

Vor dem Start einer Messung muss die manuelle Einstellung der Objektive, der Weglängen, der Phasenebenen, der Mikrolinsenrad-Drehzahl und der Anfangsposition des Probenstisches erfolgen. Die relative Position der Objektive zueinander kann über einen Teststrahl und über eine CCD-Kamera der Automatik-Justage-Einheit, auf die in Abschnitt 4.7 eingegangen wird, auf einem Kontrollmonitor überprüft werden. Eine weitere Kontroll-CCD-Kamera befindet sich im Aufbau, mit der die Einstellung der Phasenebenen erfolgen kann. Hierfür wird die Reflexion des Anregungslichtes auf einem Spiegel (mit Silber beschichteter Teil eines Deckglases) betrachtet.

In dem Kontrollprogramm kann ebenfalls ausgewählt werden, ob die Messung mit oder ohne strukturierte Beleuchtung erfolgen soll. Wird ohne strukturierte Beleuchtung aufgenommen, wird eine Mikrolinsenrad-Drehzahl eingestellt, bei der während einer Aufnahme die Probe mehrfach lateral abgerastert wird. Pro Schritt des Probenstisches wird dann jeweils eine Aufnahme gemacht. Die Anzahl der Bilder entspricht somit der Anzahl der Schritte des Probenstisches. Bei der strukturierten Beleuchtung wird dagegen die Mikrolinsenrad-Drehzahl und die Aufnahmedauer so gewählt, dass während einer Aufnahme die Probe nur von einigen Streifen beleuchtet wird. Durch die Drehung des Rades wandern die Streifen der Beleuchtung über die Probe. Werden nun mehrere Bilder aufgenommen, wobei bei jedem Bild die Beleuchtungs-Streifen an einer anderen Position sind, so kann man unter Anwendung des Superkonfokal-Algorithmus ein vollständiges Bild der Probe erhalten. Die Aufnahmedauer, die Dicke der Streifen, die Geschwindigkeit mit der sie über die Probe wandern und die Anzahl der Bilder müssen so abgestimmt sein, dass jeder Teil der Probe mindestens einmal beleuchtet wurde. Ist dies nicht gegeben, würden nach Anwendung des Superkonfokal-Algorithmus im Bild noch Strukturen von der Beleuchtung zu sehen sein. Während der Probenstisch an einer axialen Position verharrt, wird nun also eine ganze Bildserie aufgenommen. Da ein sehr großer vierdimensionaler Datensatz entstehen würde, kann bei dem Kontrollprogramm eingestellt werden, dass das Superkonfokal-Bild schon während der Messung nach Gleichung (3.12) berechnet und nur dieses gespeichert wird. So werden die Daten wieder auf einen dreidimensionalen Datensatz reduziert, wobei die berechneten Bilder alle notwendigen Informationen enthalten.

4.6 Phasenkompensation

Wie bereits erwähnt, ist während der axialen Rasterung einer Probe darauf zu achten, dass die Phasenbeziehung zwischen den einzelnen Teilstrahlen konstant bleibt. Ist das Einbettmedium jedoch nicht exakt an den Brechungsindex des Immersionsmediums angepasst, so ändern sich bei der axialen Bewegung der Probe die optischen Weglängen der Teilstrahlen. Es kommt somit auch zu einer Änderung der Phasenbeziehung der beiden Teilstrahlen. Je nach Abhängigkeit von den Weglängenunterschieden wird die Phase der 4Pi-PSF verschoben. Da die Änderung der Phasenbeziehung eine lineare Funktion der axialen Rasterung der Probe ist, kann die Änderung durch eine synchrone Nachführung der Strahlteilerwürfel in der Anregungskavität und der Detektionskavität kompensiert werden [40]. Dafür wird für die Anregung und die Detektion jeweils ein Phasenkompensationsfaktor ermittelt, der auch von dem jeweiligen Brechungsindex in der Probe abhängt. Bei eingestellter Phasenkompensation wird ein von der axialen Position des Probenstückes abhängiges Signal an die Piezo-Controller der beiden Piezos der Strahlteilerwürfel weitergegeben, wodurch die Strahlteilerwürfel entsprechend nachgeführt werden und die Phasenbeziehung konstant gehalten wird.

In Abbildung 4.7 ist die Punktbildfunktion zweier Farbstoffschichten mit dem Abstand d bei eingestellter Phasenkompensation dargestellt. Die Aufnahme ist im Typ C Modus erstellt worden.

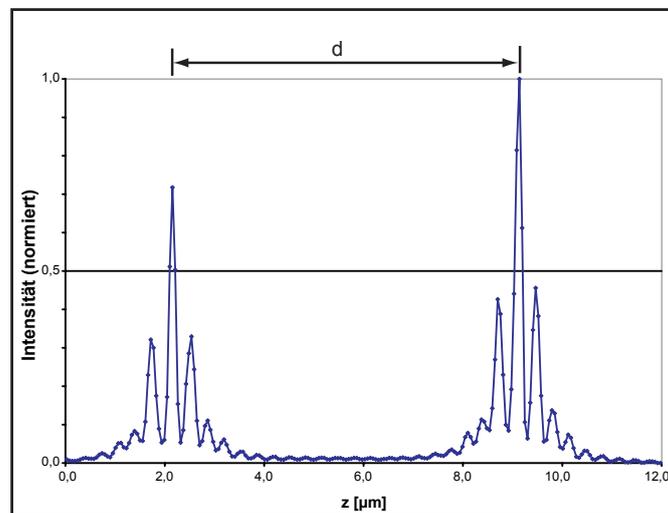


Abbildung 4.7: Phasenkompensation. Im Typ C Modus gemessene Punktbildfunktion zweier Farbstoffschichten mit dem Abstand d mit eingestellter Phasenkompensation.

4.7 Automatik-Justage-Einheit

Während der Messung ist es wichtig, dass sich die relative Position der beiden Objektive zueinander nicht ändert. Aus diesem Grund ist eine Automatik-Justage-Einheit nötig, die während der Messung mögliche relative Verschiebungen der Objektive zueinander kompensiert. Dabei ist das untere Objektiv im Aufbau festgestellt und die Position des oberen Objektivs wird nachgeregelt.

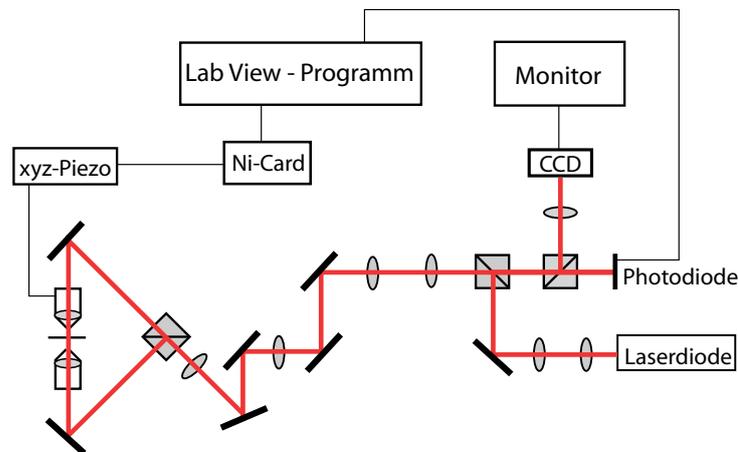


Abbildung 4.8: Schematische Abbildung der Automatik-Justage-Einheit.

In Abbildung 4.8 wird die Automatik-Justage-Einheit gezeigt. Als Lichtquelle wird eine Laserdiode (*x.ldm 785-12, LINOS Photonics GmbH & Co. KG, Göttingen*) mit einer Wellenlänge von 785 nm und einer Ausgangsleistung von 12 mW verwendet. Über mehrere Achromatlinsen, die den Strahl kollimieren und die Strahlgröße auf die Rückapertur der Objektive anpassen, sowie mehrere Spiegel wird der Teststrahl in den 4Pi-Aufbau eingekoppelt. Dort wird der Teststrahl über den Strahlteilerwürfel in der Anregungskavität aufgeteilt und wie das Anregungslicht in die Objektive gelenkt. Man betrachtet das Licht, das von dem einen Objektiv in die Probe fokussiert und von dem anderen Objektiv aufgesammelt wird und umgekehrt. Der Teststrahl sollte allerdings nicht in der Mitte des Bildfeldes durch die Probe gehen, da man dort üblicherweise die zu messende Zelle platziert und der Teststrahl durch die Struktur der Zelle beeinflusst werden könnte. Die beiden Strahlen werden über denselben Weg zurück aus der 4Pi-Einheit ausgekoppelt, wobei die Teilstrahlen bei dem Strahlteilerwürfel wieder zusammengeführt werden. Der Strahl wird nach Transmission durch einen weiteren Strahlteilerwürfel auf eine Photodiode abgebildet. Befinden sich die Fokusse der Objektive nicht in Deckung, so laufen die zwei Teilstrahlen aus den 4Pi-Interferometerarmen auf der Photodiode auseinander und die Photodiode empfängt weniger Intensität. Der reflektierte Anteil des Strahls an dem

letzten Strahlteilerwürfel wird über eine Achromatlinse auf eine CCD-Kamera abgebildet. Das Bild entspricht der Intensitätsverteilung in der Pupillenebene der beiden Objektive. Sind die Objektive nicht in Deckung, sind in dem Bild auf der CCD-Kamera Streifen zu erkennen. Das Signal der Photodiode und das Bild auf der CCD-Kamera können genutzt werden, um die relative Position der beiden Objektive zueinander nach Einsetzen einer neuen Probe richtig einzustellen und während der Messung zu kontrollieren.

Das Signal der Photodiode wird über eine Elektronikeinheit und eine PCI-Karte mit Schrauben-Terminal-Block (*NI-PCI-6154/CB-37F-HVB, National Instruments Corporation, Austin, USA*) an den Computer weitergegeben. Die Automatik-Justage-Einheit wird mit einem LabView-Programm (von Dr. Johann Engelhardt) gesteuert. Hier können sowohl das Signal der Photodiode abgelesen, als auch die Regelungsparameter festgelegt werden. Mit dem Programm wird die Position des oberen Objektivs in allen drei Raumrichtungen geregelt. Die Regelung erfolgt als iterativer Prozess. Das obere Objektiv wird zuerst in die x-Richtung um einen kleinen Schritt von 20 nm verschoben. Dann erfolgt ein Schritt in die y-Richtung und ein Schritt in die z-Richtung. Wird das Signal der Photodiode schwächer, so erfolgt ein Schritt in die jeweilige Richtung zurück. Bei stärker werdendem Signal wird dagegen ein Schritt mit der doppelten Schrittlänge gemacht. Dies geschieht abwechselnd in allen drei Richtungen, bis das Objektiv um seine optimale Position in 20 nm Schritten bewegt wird. Diese Abweichung ist so gering, dass sie keinen Einfluss auf die Messung hat. Wird das Objektiv durch äußere Einflüsse etwas von seiner optimalen Position entfernt, so regelt die Automatik-Justage-Einheit das Objektiv durch diesen iterativen Prozess zurück. Die Regelung sollte allerdings erst eingeschaltet werden, nachdem die Probe eingesetzt und die Objektive manuell vorjustiert wurden.

5 Messungen und Ergebnisse

In diesem Kapitel wird unter anderem auf die Probenpräparation eingegangen. Es werden die verschiedenen Aufnahme-Arten und ihre Ergebnisse vorgestellt und diskutiert und letztlich wird auf die Auswertung der Daten eingegangen.

5.1 Messungen in verschiedenen Aufnahme-Modi

Wie in Abschnitt 3.1 bereits erwähnt wurde, gibt es drei Konzepte zur Reduzierung der relativen Höhen der Nebenmaxima. In der Regel werden zwei dieser Konzepte kombiniert, um stabile Werte zu erhalten.

In der multifokalen 4Pi-Mikroskopie mit einem Mikrolinsenrad ist die Kombination von 2P-Anregung mit konfokaler Detektion schwer umzusetzen, da entweder das Mikrolinsenrad und ein konfokales Lochblendenrad synchronisiert werden oder ein entsprechendes „Descanning“¹ vor der Kamera erfolgen müsste. In diesem Fall wären viele Optiken in dem Detektionsstrahlengang nötig. Durch die Lochblenden und die zusätzlichen Optiken wäre die Transmission des Fluoreszenzlichtes durch den Aufbau nur sehr gering. Dies würde wiederum eine längere Aufnahmedauer erfordern, um ein genügend großes Signal-zu-Rauschverhältnis zu erhalten.

Daher wurde der hier vorgestellte Aufbau zuerst als Typ C Aufbau realisiert. Bei dem Typ C Modus wird die 2P-Anregung mit kohärenter Detektion durch beide Objektive kombiniert. Auf konfokale Lochblenden kann in diesem Fall verzichtet werden. Da das Fluoreszenzlicht nun durch beide Objektive aufgesammelt wird und es keine Verluste durch Lochblenden gibt, ist das detektierte Signal hier wesentlich höher.

Ein großes Problem bei der Messung im Typ C Modus stellen jedoch die hohen Anforderungen an die Justage und Stabilität der Detektionskavität dar. Für die kohärente Detektion müssen unter anderem die Weglängen der Interferometerarme der Detektionskavität bezüglich der Kohärenzlänge des Fluoreszenzlichtes abgeglichen werden. Da die Kohärenzlänge jedoch nur wenige μm beträgt, ist der Weglängenabgleich sehr kompliziert. Weiterhin müssen die Fluoreszenzfokusse auf der Kamera in Deckung und zur Interferenz gebracht werden. Um die Ortsinvarianz der Detektions-Punktbildfunktion über das gesamte Bildfeld zu gewährleisten, müssen die Phasenebenen für die Detektionskavität

¹Bei einem Strahlraster-System, wo der Strahl abgelenkt und über die Probe gerastert wird, wird das Fluoreszenzlicht nicht automatisch die konfokale Lochblende passieren. Daher ist ein Entrastern, das so genannte „Descanning“ vor der Kamera nötig.

plan gestellt werden. Das Planstellen erfolgt durch den in Abschnitt 4.3 bereits beschriebenen iterativen Prozess. Für die Messung sollten die Weglängen derart abgeglichen sein, dass sich die Probe ungefähr in der Mitte der Kohärenzlänge befindet, da hier die Modulation der Detektions-Punktbildfunktion am stärksten ist. Dadurch wird sehr effektiv die relative Höhe der Nebenmaxima der Beleuchtungs-Punktbildfunktion bei der Detektion reduziert (siehe auch Abbildung 3.4). Die Phasenbeziehung während der Messung sollte sowohl für die Anregungskavität als auch für die Detektionskavität konstruktiv sein. Daraus folgt, dass zuerst die Phasenebenen und die Phasenbeziehung im Typ A Modus optimal eingestellt werden müssen, um anschließend auch für Typ C die Einstellungen vornehmen zu können. Um die Phasenbeziehung in der Detektionskavität isoliert betrachten zu können, können durch eine schwenkbare Klappe auch Aufnahmen im Typ B Modus durchgeführt werden. Dieser ganze Justage-Prozess ist sehr langwierig und muss bei jeder Probe erneut durchgeführt werden, bevor die eigentliche Messung erfolgen kann. Dies kann bei der Messung von lebenden Zellen zu einem ernsthaften Problem werden, da die Lebenszeit von präparierten Zellen begrenzt ist. Ein weiterer Nachteil ist, dass die Punktbildfunktion bei dem Typ C Modus empfindlicher auf Störungen reagiert. Ändert sich die Phasenbeziehung leicht für eine der beiden Kavitäten, d.h. für die Anregung oder die Detektion, so wird die Gesamt-Punktbildfunktion nicht mehr konstruktiv sein und es muss nachgeregelt werden. Da es bei diesem Aufbau keine automatische Regelung für die Phasenbeziehung gibt, muss dies manuell erfolgen, was zusätzlich Zeit in Anspruch nimmt.

Ein weiteres Problem bei den Einstellungen für den Typ C Modus stellt der chromatische Längsfehler der Objektive dar. Bei den verwendeten Objektiven handelt es sich zwar um gepaarte Objektive, bei denen der chromatische Längsfehler bei beiden Objektiven für die Anregungs- und die Fluoreszenzwellenlänge identisch sein sollte, dennoch konnte eine leichte Fokusverschiebung für diese beiden Wellenlängen festgestellt werden, wie bereits in Abbildung 4.3 gezeigt wurde. Dies führt dazu, dass die Fluoreszenzfokuse aus beiden Objektiven nicht gleichzeitig scharf auf der Kamera abgebildet werden können. Dadurch ist der Typ C Aufbau nicht optimal einstellbar.

Ein wichtiges Kriterium bei der Messung sind die relativen Höhen der Nebenmaxima. Wird die Probe während der Aufnahme eines Bildes mehrfach lateral gerastert, so betragen die relativen Höhen der Nebenmaxima ca. 60% des Hauptmaximums bei der Messung im Typ A Modus. Da so die 50%-Grenze für die Entfaltbarkeit der Daten überschritten wird, kann der Aufbau auf diese Weise nicht im Typ A Modus betrieben werden. Der Typ C Modus bringt hier eine Reduzierung der relativen Höhen der Nebenmaxima von ca. 10% gegenüber dem Typ A Modus. In den Abschnitten 5.3 und 5.4 werden die entsprechenden Aufnahmen von technischen und biologischen Proben gezeigt.

Durch die Verwendung der schnellen EMCCD-Kamera ist es nun jedoch möglich, die Probe ohne Zeitverlust während der Aufnahme eines Bildes nur mit einzelnen Streifen zu beleuchten. Während einer vollständigen lateralen Rasterung der Probe wird eine ganze Bildserie aufgenommen und das eigentliche laterale Bild der Probe mit dem Superkonfokal-Algorithmus berechnet. Auf diese Art erhält man eine Konfokalisierung

ohne die zuvor genannten Nachteile, die durch konfokale Lochblenden und der Synchronisation oder das „Descanning“ entstehen würden.

Obwohl bei der Beleuchtung mit einzelnen Streifen in gleicher Zeit ein geringeres Fluoreszenzsignal entsteht, wird das Signal-zu-Rauschverhältnis aufgrund der Berechnung des Superkonfokal-Algorithmus verbessert, da die berechneten Pixel nur Rauschsignal enthalten, wenn wirklich ein Fluoreszenzsignal vorhanden war. Es resultiert daher nur ein sehr geringes Untergrundsignal. In Kombination mit der EMCCD-Kamera, die selbst bei niedrigen Photonenzahlen und kurzen Aufnahmezeiten nur ein sehr geringes Ausleserauschen besitzt, kann somit die effektive PDT verkürzt werden.

Kombiniert mit 2P-Anregung erhält man bei dieser Art der Beleuchtung und Detektion, sowie anschließender Bildberechnung relative Höhen der Nebenmaxima im Typ A Modus von nur 40% des Hauptmaximums. Die Rohdaten sind somit mit der Dreipunktentfaltung entfaltbar und es reicht aus, die Messungen im Typ A Modus durchzuführen. Dies erleichtert die Justage bei Einsetzen einer neuen Probe und während der Messung im Vergleich zu Messungen im Typ C Modus enorm. Da die Kohärenzlänge für das Anregungslicht mit $42 \mu\text{m}$ recht groß ist, ist der Weglängenabgleich der Interferometerarme einfach. Auch die Phasenebenen in Typ A lassen sich schnell und leicht einstellen, indem die Reflexion beider Strahlen auf dem Spiegel des unteren Deckglases auf der Kontroll-Kamera im Aufbau während der Justage beobachtet werden. Im Anschluss muss nur noch eine Zelle mit dem Fernfeld-Mikroskop gesucht und im Bildfeld des 4Pi-Mikroskops platziert werden. Die Phasenbeziehung wird anschließend durch Verschieben des Beleuchtungs-Strahlteilerwürfels konstruktiv eingestellt. Danach kann mit der Messung begonnen werden. So wird im Vergleich zur Typ C Anwendung viel Zeit bei der Justage eingespart, die nun sinnvoll für die Messungen genutzt werden kann.

5.2 Probenpräparation

Da in diesem Aufbau die Probe durch zwei Objektive betrachtet wird, muss sie zwischen zwei Deckgläsern eingebettet sein. Wie in Abschnitt 4.2 beschrieben wurde, müssen die Korrekturringe der Objektive auf die jeweilige Deckglasdicke eingestellt werden. Um diesen Prozess nicht bei jeder neuen Probe wiederholen zu müssen, werden die Korrekturringe für eine bestimmte Deckglasdicke eingestellt und nur Deckgläser mit einer entsprechenden Dicke verwendet. Für das obere Deckglas wurde eine Dicke von $(146 - 147) \mu\text{m}$ und für das untere Deckglas eine Dicke von $(145 - 146) \mu\text{m}$ gewählt. Ein Viertel des unteren Deckglases ist verspiegelt, da so in Reflexion die Phasenebenen für das Anregungslicht eingestellt werden können. Außerdem fällt es bei Einsetzen einer neuen Probe mit der Reflexion an dem verspiegelten Deckglas leichter, die Position des Probenisches bezüglich der Objektive einzustellen.

Die beiden Deckgläser, mit der zu untersuchenden Probe zwischen ihnen, werden in einen metallischen Halter mit einem 2-Komponenten-Silikonkleber festgeklebt. Alle hier verwendeten Proben werden auf diese Art eingebettet.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden technische Proben für die Justage und Kalibrierung des Mikroskops und der Automatik-Justage-Einheit verwendet.

Um die See-Antwort (siehe Gl. (2.10)) zu messen und die Automatik-Justage-Einheit auf die optimale Regelung der Objektive in axialer Richtung einzustellen, wird ein Farbstoff-See aus Oregon-Green (Oregon-Green-Farbstoff gelöst in einem PBS-Puffer²) verwendet. Hierfür werden einige μl der Farbstofflösung zwischen die beiden Deckgläser gegeben.

Für die Messung der dreidimensionalen PSF des Mikroskops werden auf das obere Deckglas eine Schicht aus fluoreszierenden Beads³ aufgetragen. Dafür wird zuvor eine Schicht Poly-L-Lysine aufgetragen, indem einige μl auf das Deckglas gebracht werden. Nach ein paar Minuten wird das Poly-L-Lysine wieder abgesaugt, wobei eine Schicht auf dem Deckglas zurück bleibt, welche die Beads immobilisiert. Je nach Messung kann die Größe der Beads und die Konzentration gewählt werden. Hier werden Beads mit einem Durchmesser von 100 nm oder 200 nm verwendet. Die Beads werden zuvor in Wasser (H_2O , dest.) verdünnt und dann einige μl der Lösung auf die Poly-L-Lysine-Schicht gegeben. Nach ein paar Minuten wird auch diese wieder abgesaugt. Auf der Poly-L-Lysine-Schicht befindet sich nun eine Lage von den immobilisierten Beads. Zwischen die beiden Deckgläser werden noch einige μl Wasser (H_2O , dest. mit $n=1.33$) gegeben.

Für die Bestimmung der Phasenkompensationsfaktoren wird auf beide Deckgläser eine Bead-Schicht aufgetragen und zwischen die Schichten einige μl desselben Einbettmediums gegeben, welches auch bei der Aufnahme der Hefezellen verwendet wird. Dabei handelt es sich um eine 1%-Agarose-Mischung (1%-Anteil Agarosepulver in dem zuvor genannten PBS-Puffer gelöst). Die Agarose-Mischung ist bei 40°C flüssig und wird bei Raumtemperatur fest. Je nach zugegebener Menge der Agarose-Mischung wird für einen gewissen Abstand der Bead-Schichten von einigen μm gesorgt. Es werden mehrere Messungen für verschiedene Abstände der Bead-Schichten durchgeführt, bei denen jeweils die Punktbildfunktionen der beiden Bead-Schichten bestimmt werden. Bei richtig eingestellten Phasenkompensationsfaktoren besitzen beide Punktbildfunktionen dieselbe Phasenbeziehung.

Neben den technischen Proben wurden auch biologische Proben untersucht. Es wurden Aufnahmen des Mitochondrien-Netzwerkes von *Saccharomyces cerevisiae*-Zellen (Bäckerhefe) erstellt. Bei den Hefezellen handelt es sich um eukaryotische Zellen, deren Mitochondrien für die Energieversorgung der Zelle verantwortlich sind. Die Energieversorgung basiert auf oxidativer Phosphorylierung [41]. Mitochondrien bilden mehr oder weniger zusammenhängende, röhrenförmige Netzwerke, die eine kontinuierliche Dyna-

²PBS-Puffer: 137 mM NaCl, 2.68 mM KCl, 8 mM Na_2HPO_4 und 1.47 mM KH_2PO_4

³Beads sind Carboxylat-modifizierte Kügelchen (*FluoSpheres*, *Invitrogen GmbH, Karlsruhe*), die mit gelb-grün fluoreszierendem Farbstoff (505 nm / 515 nm) gefüllt sind.

mik besitzen. In einer Hefezelle finden im Mittel zwei Mitochondrienteilungen und -fusionen pro Minute statt [42]. Daher besteht ein großes Interesse, schnelle Messungen von den Hefezellen machen zu können, um die Dynamik der Zellen untersuchen zu können. Durch die Mitochondrienteilungen und -fusionen scheinen sich die Zellen an ihren Energiebedarf und an ihre Umgebungseinflüsse anzupassen. Innerhalb des Netzwerkes können frei bewegliche Proteine diffundieren. Durch das gezielte Einbringen des *green fluorescent protein* (GFP) in das mitochondriale Netzwerk ist die Abbildung dieses Netzwerkes durch fluoreszenzmikroskopische Methoden möglich, ohne dass die Zellen zerstört werden. Daher können Aufnahmen von lebenden Hefezellen erfolgen. Die mit GFP markierten Hefezellen fluoreszieren in dem Bereich von (500 – 550) nm.

Die Hefekulturen werden über Nacht in einem Kolben mit glukosehaltigem Nährmedium (SC-URA⁴) bei 30 °C gezogen. Morgens werden die Zellen mit dem Nährmedium verdünnt. Wenn sie sich in der Mitte der logarithmischen Wachstumsphase befinden, kann etwas Medium mit den Hefezellen entnommen werden. Dieses Medium wird zentrifugiert, abpipettiert und die Zellen mit 1%-Agarose (1%-Anteil Agarosepulver in SD-Medium⁵ gelöst) zwischen die zwei Deckgläser eingebettet. Durch die Agarose werden die Hefezellen immobilisiert und es können keine Bewegungen stattfinden, die die Messung stören würden. Der Brechungsindex der Agarose-Mischung wurde zuvor durch Zugabe von Glycerol auf den Brechungsindex der Hefezellen von $n = 1.34$ angepasst. Dies ist nötig, um Phasenschwankungen innerhalb der Probe aufgrund von Brechungsindexunterschieden zu reduzieren.

5.3 Messung technischer Proben

Bei der Messung der technischen Proben, wie z.B. Bead-Proben, wird als Anregungswellenlänge 890 nm verwendet. Die Laserleistung bei dieser Wellenlänge entspricht ca. 1 W. Durch die Verluste bei der Strahlformung, durch den LPC, das Mikrolinsenrad und durch das Entfernen von Aberrationen kann jedoch nur eine mittlere Leistung von ca. 25 mW für die Anregung in der Probe genutzt werden. Wie in Abschnitt 4.4 beschrieben, hat das Bildfeld eine Größe von $20 \times 20 \mu\text{m}^2$. In diesem Bereich werden 19 Mikrolinsenfokusse abgebildet. Daher besitzt jeder 4Pi-Fokus in der Probe eine durchschnittliche Leistung von ca. 1.3 mW.

Je nach Art der technischen Probe wird unabhängig von dem Aufnahmemodus bei der Messung eine axiale Rasterung von einigen μm durchgeführt. Die Schrittweite des Probentisches beträgt dabei 50 nm.

⁴SC-Medium: 70% Glukose, 17% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 6% Yeast Nitrogen Base, 7% Drop-Out-Mix ohne Uracil

⁵SD-Medium: 74% Glukose, 18.5% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 6.3% Yeast Nitrogen Base, 1.2% Aminosäuren

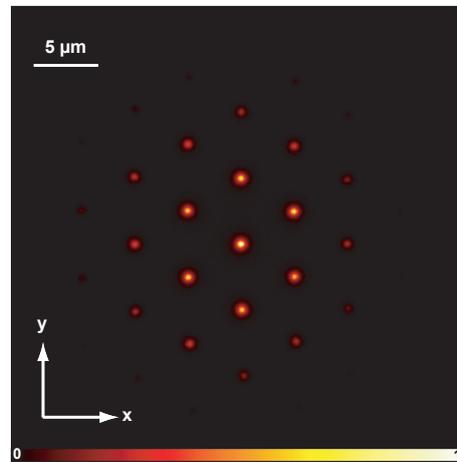


Abbildung 5.1: Fluoreszenz der Mikrolinsenfokusse bei einem Oregon-Green-Farbstoffsee.

Bei der Messung im Typ C Modus wird eine Aufnahmedauer pro Bild von 80 ms gewählt. Die Drehzahl des Mikrolinsenrades beträgt $3000 \frac{\text{U}}{\text{min}}$. Da eine Umdrehung des Rades acht vollständigen lateralen Rasterungen der Probe entspricht, wird während der Aufnahme eines Bildes die Probe somit 32 mal lateral abgerastert. Abbildung 5.2 zeigt die aufgenommenen Punktbildfunktionen von einer Bead-Schicht von Beads mit einem Durchmesser von 100 nm im Typ A und C Modus bei den zuvor genannten Parametern.

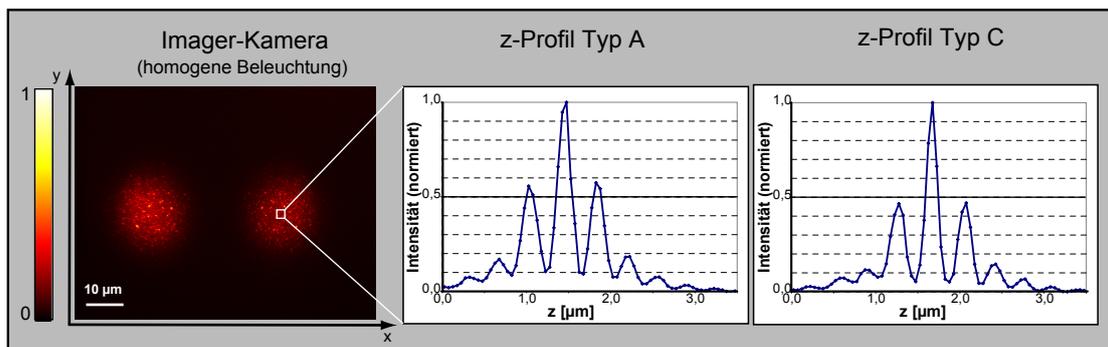


Abbildung 5.2: Messung einer Bead-Schicht von 100 nm Beads bei homogener Beleuchtung im Typ A und C Modus. Dargestellt sind das xy-Bild der Bead-Schicht aufgenommen im Typ A Modus, sowie die zugehörigen z-Profile für den Typ A und den Typ C Modus. Im Typ A Modus sind die relativen Höhen der Nebenmaxima bei 57% und im Typ C Modus bei 47% .

Bei der Messung im Typ A Modus mit strukturierter Beleuchtung werden die Drehzahl des Mikrolinsenrades auf $380 \frac{\text{U}}{\text{min}}$ und die Aufnahmedauer pro Bild auf 2 ms reduziert, so dass während der Aufnahme eines Bildes nur einzelne Streifen einer Ebene in der Probe beleuchtet werden. Die Streifen haben einen Abstand von $3.5 \mu\text{m}$ und eine Breite von $0.5 \mu\text{m}$. Ein gesamtes Bild einer Ebene in der Probe setzt sich dann aus einer Bildserie von 40 Bildern zusammen, wobei jeder Streifen von Aufnahme zu Aufnahme um $1/5$ der Breite verschoben wird. So ist keine Modulation durch das Beleuchtungsmuster in dem berechneten Bild erkennbar. Bei der Aufnahme einer Bildserie pro Schritt des Probentisches entsteht während der axialen Rasterung einer Probe ein vierdimensionaler Datensatz. Durch Anwendung des Superkonfokal-Algorithmus kann der Datensatz wieder auf drei Dimensionen reduziert werden, wenn nur die berechneten Bilder gespeichert werden. In Abbildung 5.3 wird die Messung einer Beadschicht mit strukturierter Beleuchtung gezeigt, wobei hier einerseits ein xy-Bild der Bead-Schicht aus der Bildserie mit der streifenförmigen Beleuchtung dargestellt wird und andererseits das mit dem Superkonfokal-Algorithmus berechnete xy-Bild der Bead-Schicht. Weiterhin ist das zugehörige z-Profil für die Messung mit und ohne superkonfokale Berechnung zu sehen. Bei der Messung ohne Berechnung wurden die Bilder der Bildserie aufaddiert.

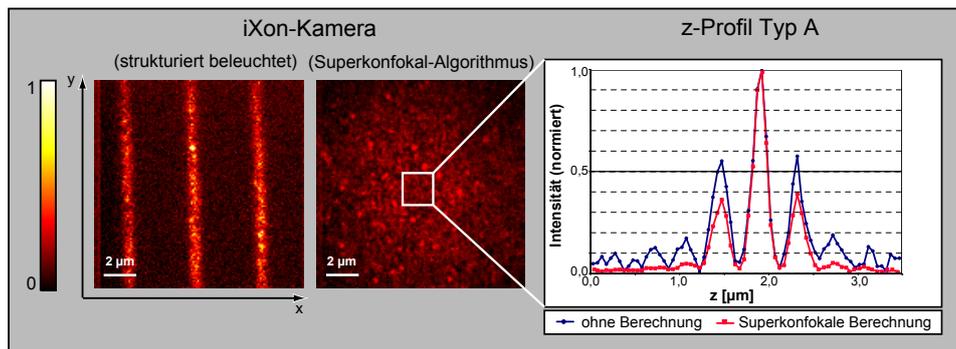


Abbildung 5.3: Messung einer Beadschicht von 100 nm Beads bei strukturierter Beleuchtung im Typ A Modus. Hier ist sowohl die streifenförmig angeregte Beadschicht und das nach dem Superkonfokal-Algorithmus berechnete xy-Bild der Beadschicht, als auch das z-Profil für den markierten Bereich mit und ohne superkonfokaler Berechnung dargestellt. Die relativen Höhen der Nebenmaxima betragen mit superkonfokaler Berechnung 38% und ohne Berechnung 57%.

In Abbildung 5.4 ist die Messung eines einzelnen 100 nm Beads als xy- und xz-Ansicht für die Rohdaten und Dreipunkt-entfalteten Daten, sowie die zugehörigen z-Profile dargestellt.

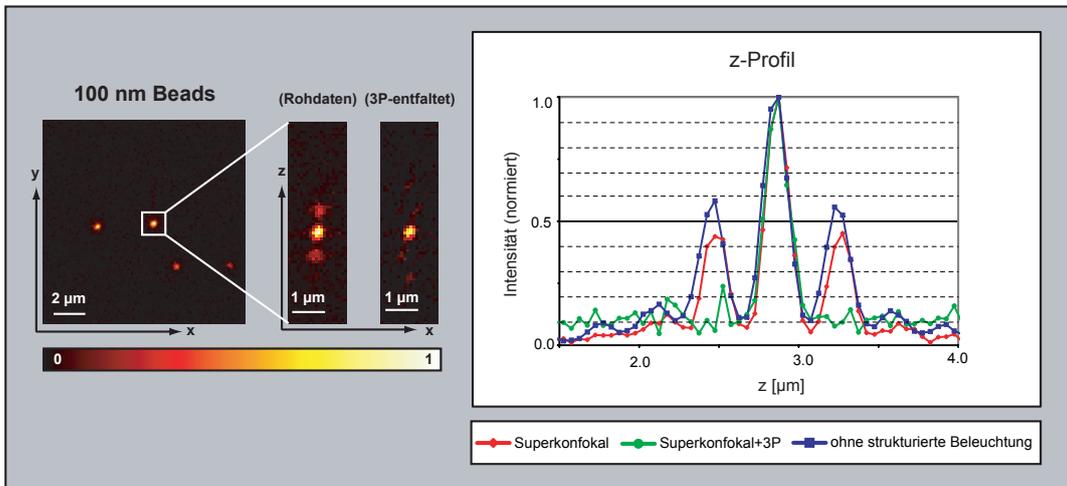


Abbildung 5.4: Messung einzelner 100 nm Beads mit und ohne strukturierte Beleuchtung im Typ A Modus. Hier sind die xy- und xz-Ansicht des Beads bei der Messung mit strukturierter Beleuchtung und gleichzeitiger Berechnung des Superkonfokal-Algorithmus für die Rohdaten und die Dreipunkt-entfalteten Daten abgebildet. In dem Diagramm sind die zugehörigen z-Profile im Vergleich zu der Messung ohne strukturierte Beleuchtung im Typ A Modus dargestellt. Die relativen Höhen der Nebenmaxima betragen bei der superkonfokalen Messung 45% und bei der Messung ohne strukturierte Beleuchtung 58%.

5.4 Messung biologischer Proben

Bei der Messung der biologischen Proben wird ebenfalls eine Anregungswellenlänge von 890 nm verwendet. Somit sind die Werte der Laserleistung analog zu den Messungen der technischen Proben. Bei der Messung von lebenden Zellen wird eine Serie von mehreren axialen Rasterungen der Probe durchgeführt. Eine axiale Rasterung entspricht einem dreidimensionalen Datensatz der Probe und die Serie dieser Datensätze stellt dann die zeitliche Entwicklung der Probe dar.

Bei der Messung von Hefezellen beträgt der Verfahrweg des Probenstisches aufgrund der durchschnittlichen Größe des Mitochondrien-Netzwerkes einer Zelle 10 µm, mit einer Schrittweite von 50 nm. Es werden 10 vollständige axiale Rasterungen der Zelle hintereinander ausgeführt.

Bei den Messungen im Typ C Modus wird eine Aufnahmedauer pro Bild von 80 ms gewählt. Die Drehzahl des Mikrolinsenrades beträgt wie bei der Messung der technischen Proben $3000 \frac{\text{U}}{\text{min}}$, so dass während der Aufnahme eines xy-Bildes die Probe 32 mal lateral gerastert wird. Hier wird pro Schritt des Probenstisches ein Bild aufgenommen, so dass pro axialer Rasterung ein dreidimensionaler Datensatz der Probe mit 200 xy-Bildern entsteht. Da während eines Schrittes des Probenstisches 38 ms keine Aufnahme erfolgt, ergibt sich

eine Aufnahmedauer für einen Datensatz von 23.6 s. Die Gesamt-Aufnahmedauer für 10 axiale Rasterungen beträgt 3.9 min. In Abbildung 5.5 wird die Aufnahme einer Hefezelle im Typ C Modus als Maximums-Projektion in z-Richtung gezeigt. Maximum-Projektion bedeutet, dass für jedes Pixel aus den Bildern, die bei der Rasterung entlang der optischen Achse aufgenommen wurden, der hellste Wert verwendet wird. So erhält man ein zweidimensionales Bild der Probe. In dem gemessenen z-Profil sind aufgrund von Aberrationen selbst im Typ C Modus die relativen Höhen der Nebenmaxima größer als 50% des Hauptmaximums. Aus diesem Grund wurde auf eine Entfaltung der Rohdaten verzichtet.

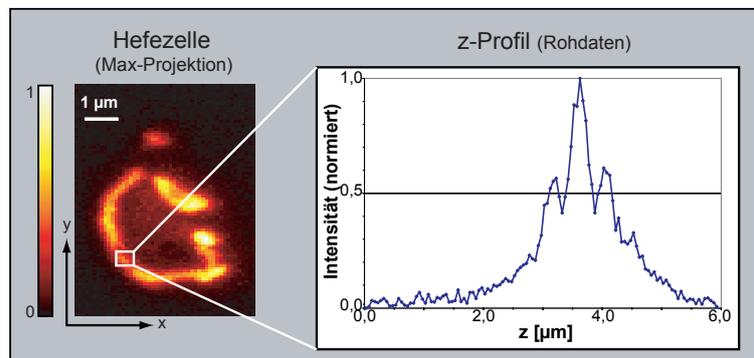


Abbildung 5.5: Messung einer Hefezelle im Typ C Modus bei mehrfacher lateraler Rasterung pro Kamerabild. Hier sind die Aufnahme des Mitochondrien-Netzwerkes einer Hefezelle als Maximum-Projektion in z-Richtung und das z-Profil für die markierte Stelle dargestellt. Die relativen Höhen der Nebenmaxima betragen auch im Typ C Modus über 50%, so dass auf eine lineare Entfaltung verzichtet wurde.

Bei den Aufnahmen im Typ A Modus mit strukturierter Beleuchtung wird wie bei den technischen Proben eine Drehzahl des Mikrolinsenrades von $380 \frac{\text{U}}{\text{min}}$ und eine Aufnahmedauer pro Bild von 2 ms verwendet. D. h. die Probe wird während der Aufnahme eines Bildes ebenfalls nur mit einzelnen Streifen beleuchtet und bei der axialen Rasterung der Probe wird pro Schritt des Probentisches eine Bildserie von 40 Bildern aufgenommen. Bei einem Verfahrensweg des Probentisches von $10 \mu\text{m}$ mit einer Schrittweite von 50 nm entsteht so ein vierdimensionaler Datensatz, der 8000 xy-Bilder mit einem Speichervolumen von 768 MB umfasst. Um das Datenvolumen zu reduzieren, kann in dem Kontrollprogramm der Superkonfokal-Algorithmus schon während der Messung ausgeführt werden, so dass nur die berechneten xy-Bilder gespeichert werden müssen. Es entsteht so wiederum ein dreidimensionaler Datensatz mit 200 Bildern, der einen Speicherplatz von nur 5 MB beansprucht.

Bei einer Aufnahmedauer von 2 ms pro Bild und einer Bildserie von 40 Bildern entspricht die Dauer für die Erfassung eines vollständigen xy-Bildes 82 ms, da zwischen den einzelnen Aufnahmen eine Totzeit der Kamera von $50 \mu\text{s}$ erfolgt. Die Zeit, in der der

Probentisch um einen Schritt verschoben wird und keine Aufnahme erfolgt, liegt bei 38 ms. Daraus folgt, dass innerhalb von 24 s ein gesamter Datensatz der Zelle aufgenommen wird. Die Aufnahme von 10 axialen Rasterungen dauert 4.0 min. Somit ist diese Aufnahmedauer mit der Aufnahmedauer einer Messung im Typ C Modus, bei der während der Aufnahme eines xy-Bildes die Probe mehrfach lateral gerastert wird, vergleichbar. Durch die gleichzeitige Berechnung des Superkonfokal-Algorithmus während der Messung wird der Messvorgang für eine axiale Rasterung um 1 s verlangsamt. Dies sind weniger als 5% der Dauer für eine axiale Rasterung ohne Berechnung.

In Abbildung 5.6 sind die Aufnahme einer Hefezelle ebenfalls als Maximum-Projektion in z-Richtung, sowie das gemessene z-Profil und die entfalteten Daten dargestellt.

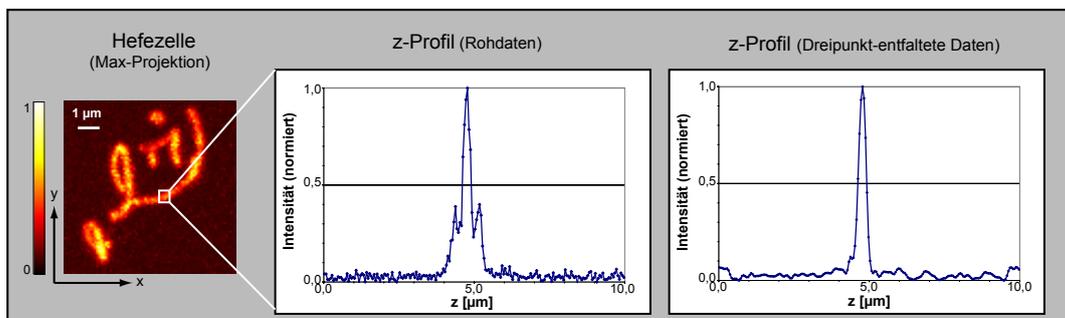


Abbildung 5.6: Messung des Mitochondrien-Netzwerkes einer Hefezelle bei strukturierter Beleuchtung im Typ A Modus. Die Aufnahme der Hefezelle ist als Maximum-Projektion in z-Richtung dargestellt. Es wird ebenso das aufgenommene z-Profil für den ausgewählten Bereich gezeigt, sowie das z-Profil der Dreipunkt-entfalteten Daten. Die relativen Höhe der Nebenmaxima beträgt vor der Entfaltung 40%.

Auf der folgenden Seite ist die zeitliche Entwicklung der Hefezelle dargestellt, die während zehn axialer Rasterungen der Zelle gemessen wurde. Die Rohdaten wurden zunächst Dreipunkt-entfaltet, geglättet und anschließend mit der Visualisierungs-Software Amira dreidimensional dargestellt. Zu sehen ist das Mitochondrien-Netzwerk einer Hefezelle, das während der Aufnahmezeit Netzwerk-Fusionen und -Teilungen durchführt. Der Feil markiert beispielsweise einen Bereich, bei dem eine Mitochondrien-Teilung zu sehen ist.

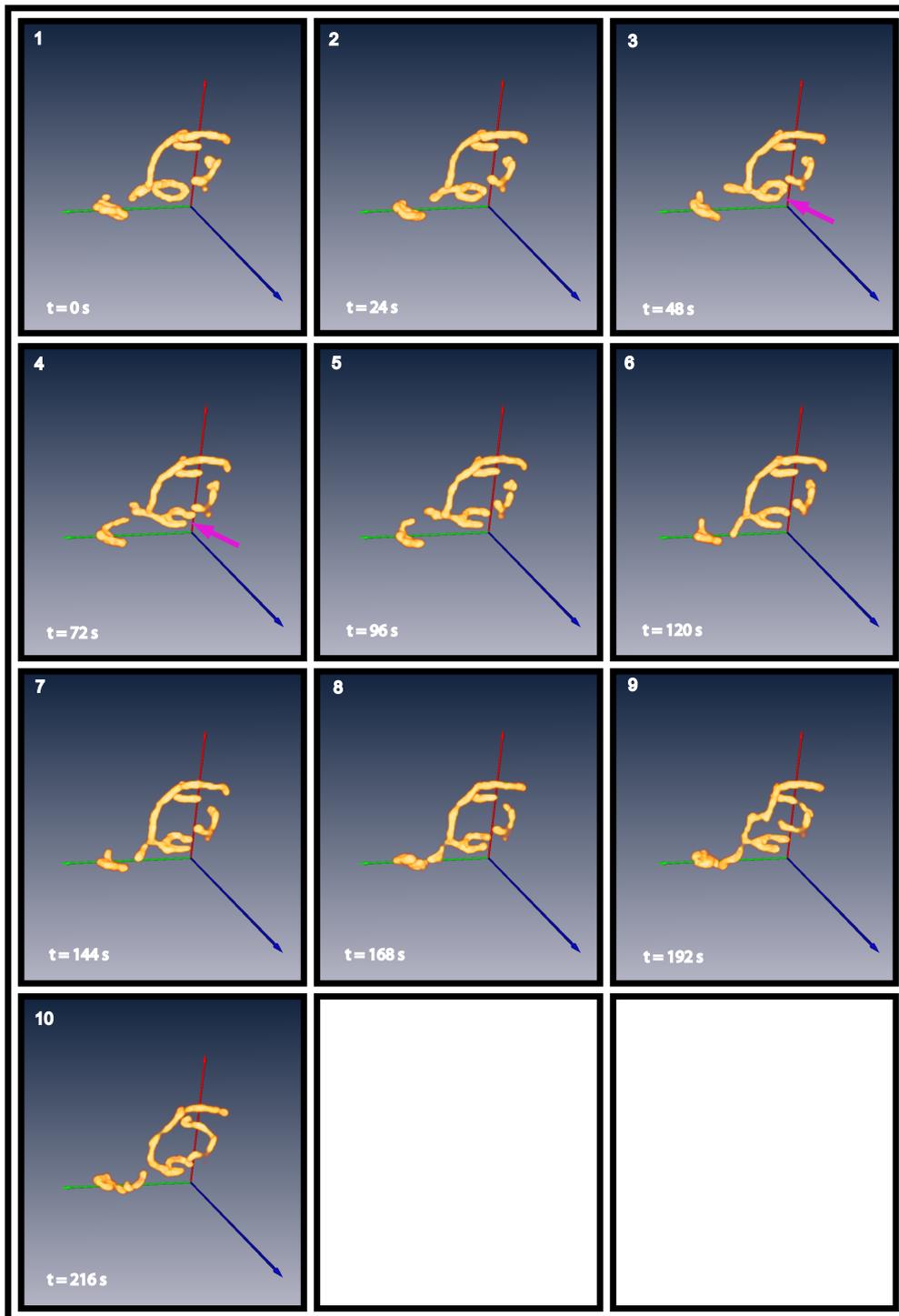


Abbildung 5.7: Dreidimensionale Darstellung der zeitlichen Entwicklung des Mitochondrien-Netzwerkes einer Hefezelle. Da die Aufnahmedauer für ein dreidimensionales Bild der Probe 24 s beträgt, ist die Zeitspanne zwischen den einzelnen Bildern ebenfalls 24 s. Die dreidimensionalen Darstellungen wurden mit der Software Amira erstellt.

5.5 Dreipunktentfaltung

Wie bereits erwähnt, entstehen bei den 4Pi-Aufnahmen in der Punktbildfunktion Nebenmaxima, die zu Geisterbildern führen. Diese können jedoch leicht mit einer linearen Entfaltung aus den Bilddaten entfernt werden, wenn die relative Höhe der Nebenmaxima weniger als 50% des Hauptmaximums beträgt. Die Dreipunktentfaltung macht sich zu nutze, dass die 4Pi-PSF als Produkt aus einer radialen und axialen Funktion approximiert werden kann [13, 43]. Da die Nebenmaxima nur entlang der optischen Achse auftreten, reicht somit eine eindimensionale Entfaltung in axialer Richtung aus. Die axiale 4Pi-Punktbildfunktion kann als Faltung einer Funktion $h_{\text{Peak}}(z)$, die die Form eines einzelnen Maximums beschreibt, mit einer Lobe-Funktion $l(z)$, die die Information über die Position und die relative Höhe der Nebenmaxima enthält, beschrieben werden:

$$h_{4\text{Pi}}(z) = h_{\text{Peak}}(z) \otimes l(z) \quad (5.1)$$

Die Lobe-Funktion ist eine Kammfunktion [13], die sich aus gewichteten Delta-Funktionen zusammensetzt:

$$l(z) = \delta(z) + w[\delta(z-d) + \delta(z+d)] \quad (5.2)$$

Hier ist w der Gewichtungsfaktor, der die relative Höhe der Nebenmaxima bestimmt und d die Distanz der Nebenmaxima zu dem Hauptmaximums. Bei der Bildentstehung ist $h_{\text{Peak}}(z)$ für die Verbreiterung des Hauptmaximums und $l(z)$ für die Entstehung von Geisterbildern verantwortlich. Die Geisterbilder treten im Abstand der Nebenmaxima entlang der optischen Achse vor und nach der Fokalebene auf. Um nun die Nebenmaxima aus den Bilddaten zu entfernen, muss der Effekt der Lobe-Funktion eliminiert werden [6]. Dies kann mit einem einfachen inversen Filter $l^{-1}(z)$ geschehen, wobei gilt:

$$l(z) \otimes l^{-1}(z) = \delta(z) \quad (5.3)$$

Hier steht δ für das Kronecker Delta. Nach Anwendung dieses linearen Filters besteht die effektive 4Pi-PSF nur noch aus der Peak-Funktion $h_{\text{Peak}}(z)$. Das Prinzip der Dreipunktentfaltung ist auch in Abbildung 5.8 schematisch dargestellt.

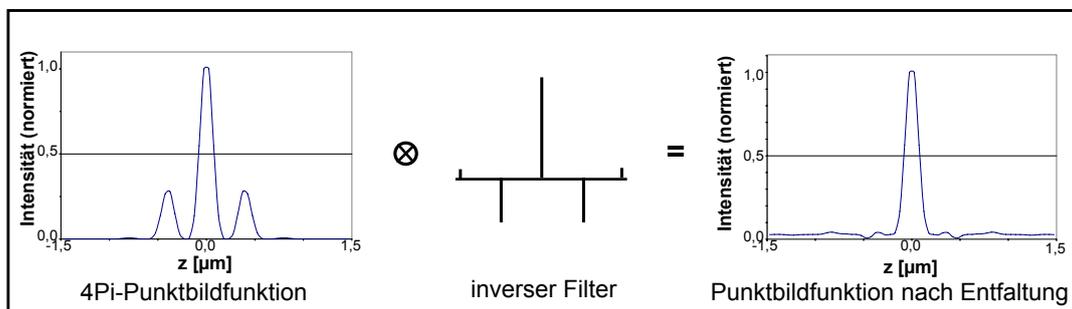


Abbildung 5.8: Prinzip der Dreipunktentfaltung

Wie in Abschnitt 3.3 bereits erwähnt, ist bei der strukturierten Beleuchtung durch die Anwendung des Superkonfokal-Algorithmus der Abbildungsprozess nicht linear. Die Abweichungen zur Linearität des Abbildungsprozesses sind hier jedoch vernachlässigbar. Somit ist die Dreipunkt-Entfaltung auf den gesamten Datensatz anwendbar. Dafür muss jedoch auch die Konstanz der Phasenbeziehung während der gesamten Messung gewährleistet sein.

Die Dreipunktentfaltung sorgt nur in axialer Richtung für die Entfernung der Nebenmaxima und hat keinen Einfluss auf die axiale oder laterale Auflösung.

6 Diskussion und Ausblick

Fluoreszenzmikroskopische Verfahren sind bis heute das Mittel der Wahl für die Untersuchung von lebenden Zellen. Da diese Verfahren beugungsbedingt jedoch nur eine Auflösung von 200 – 500 nm bieten, sind in den vergangenen Jahren viele Verfahren zur Auflösungssteigerung entwickelt worden. Einen großen Fortschritt bei der Steigerung des axialen Auflösungsvermögens hat dabei die 4Pi-Mikroskopie erzielt. Bei auflösungssteigernden mikroskopischen Verfahren führt die Reduktion des Fokalvolumens jedoch zu einer Steigerung der Aufnahmedauer eines dreidimensionalen Datensatzes im Vergleich zu einem Konfokal-Mikroskop. Daher lässt sich die Dynamik lebender Zellen nur schwer mit einer hohen räumlichen Auflösung erfassen.

Um die Aufnahmegeschwindigkeit zu steigern, besteht jedoch die Möglichkeit der Parallelisierung. Wird ein 4Pi-Aufbau mit multifokaler Beleuchtung kombiniert, so kann ein hohes dreidimensionales Auflösungsvermögen mit einer schnellen Datenaufnahme verbunden werden. Bei dem 2002 verwirklichten System, dem MMM-4Pi Typ A [16], wurde eine axiale Auflösung von (150 ± 10) nm erreicht. Hier dauerte die Aufnahme eines xy-Bildes der Probe 2 s und die Aufnahme einer axialen Rasterung, bestehend aus 65 xy-Bildern, beanspruchte 150 s. Die Steigerung der Aufnahmegeschwindigkeit wurde durch die synchrone Rasterung der Probe mit bis zu 64 Fokussen durch einen galvanometrischen Spiegelscanner erreicht. Dabei hing die Aufnahmegeschwindigkeit dieses Mikroskops ausschließlich von dem Signal-zu-Rausch-Verhältnis und damit von dem Ausleserauschen der verwendeten CCD-Kamera ab.

Der in dieser Arbeit vorgestellte Aufbau wurde zunächst als MMM-4Pi Typ C Aufbau realisiert. Die einzelnen Fokusse werden mit Hilfe eines Mikrolinsenrades vom Nypkow-Typ erzeugt, wodurch Totzeiten bei der Datenaufnahme vermieden werden. Mit der verwendeten CCD-Kamera beträgt die Aufnahmedauer 80 ms pro xy-Bild und 24 s für einen dreidimensionalen Datensatz. Somit ist die Aufnahmedauer um das 25-fache kürzer im Vergleich zu dem Vorgänger-Aufbau und bietet daher eine deutlich höhere zeitliche Auflösung.

Durch die Kombination von 2P-Anregung mit der kohärenten Detektion durch beide Objektivs (Typ C) sollten die relativen Höhen der Nebenmaxima unterhalb der 50%-Grenze gehalten werden. Dies wird in der Praxis jedoch nur knapp erreicht.

Ein weiteres Problem bei der Typ C Anwendung in diesem Aufbau ist die mühsame und zeitaufwendige Justage nach Einsetzen einer neuen Probe.

Als Alternative zur Typ C Anwendung wurde hier nun der Typ A Modus mit strukturierter Beleuchtung und anschließender Bildberechnung mit dem Superkonfokal-Algorithmus [35] eingesetzt. Dies führt zu einer Konfokalisierung des Bildes, wodurch die relative Höhe der Nebenmaxima reduziert wird. Die in Typ A erreichte relative Höhe der Nebenmaxima liegt bei 40% bis 45% des Hauptmaximums und ist somit mit einem ein-fokalen System vergleichbar [14]. Die Nebenmaxima können daher ohne Probleme mit einer Dreipunktentfaltung entfernt werden. Die Typ C Nutzung ist nun nicht mehr nötig. Dadurch kann viel Zeit für die Justage gespart werden, die nun gezielt für die Messung genutzt werden kann.

Durch die Implementierung einer schnellen EMCCD-Kamera mit Frame-Transfer-Modus kann die Aufnahme eines dreidimensionalen Datensatzes ohne Zeitverlust zu einer Messung ohne strukturierte Beleuchtung stattfinden.

Wie in Abschnitt 5.1 bereits erwähnt, entsteht bei der strukturierten Beleuchtung im Vergleich zu einer Messung ohne strukturierte Beleuchtung in gleicher Zeit ein geringeres Fluoreszenzsignal. Mit der EMCCD-Kamera können jedoch selbst geringe Photonenzahlen mit einem sehr niedrigen Ausleserauschen zuverlässig detektiert werden. Aufgrund der Berechnung des Superkonfokal-Algorithmus wird das Signal-zu-Rauschverhältnis sogar verbessert, da die berechneten Pixel nur Rauschsignal enthalten, wenn auch ein Fluoreszenzsignal vorhanden war. Ein weiterer Vorteil der strukturierten Beleuchtung ist, dass die Probe in gleicher Zeit weniger beleuchtet und dadurch nicht so stark gebleicht wird.

Neben Messungen mit Farbstoffkügelchen auf Silikonbasis wurden auch Messungen mit lebenden *Saccharomyces cerevisiae* Zellen (Bäckerhefe) durchgeführt, wobei sowohl bei den technischen, als auch bei den biologischen Proben relative Höhen der Nebenmaxima von 40% bis 45% erreicht wurden. Trotz der schnellen Aufnahmezeit kann nicht vollständig ausgeschlossen werden, dass sich die Hefezellen während der Aufnahme eines dreidimensionalen Datensatzes bewegen. Dies wird jedoch nur Auswirkungen auf die axiale Komponente der Bilder haben, da die Aufnahmedauer für ein xy-Bild mit 82 ms sehr kurz ist. Die Erfassung der Zelldynamik erfolgt durch mehrfaches axiales Rastern der Probe. Bei einer Aufnahme von zehn axialen Rasterungen konnte eine deutliche Dynamik der Mitochondrien beobachtet werden. Da die Formationsänderung des Mitochondrien-Netzwerkes von axialer Rasterung zu axialer Rasterung doch recht groß war, wäre eine noch kürzere Aufnahmedauer von Vorteil, um die tatsächliche Bewegung genauer darstellen zu können. Bei der Aufnahme von zehn axialen Rasterungen war das Bleichen der Probe vernachlässigbar und eine photoneninduzierte Schädigung der Zelle konnte nicht beobachtet werden. Durch die Aufnahme des GFP-markierten Mitochondrien-Netzwerkes der lebenden Hefezellen konnte somit gezeigt werden, dass der Aufbau eine hohe räumliche Auflösung mit einer schnellen Datenaufnahme vereint. Mit diesem Aufbau konnte erstmals eine dreidimensionale Aufnahme einer lebenden Zelle bei einer Auflösung im Bereich von 100 nm innerhalb von nur 24 s erstellt werden. Die erreichbare Aufnahmedauer hängt auch hier im Wesentlichen von dem Signal-zu-Rauschverhältnis ab.

Eine weitere interessante Anwendung der strukturierten Beleuchtung könnte ebenfalls die Ausnutzung des Moiré Effektes für eine laterale Auflösungssteigerung bis zu einem Faktor zwei bezüglich des klassischen Auflösungsvermögens sein [21].

Um diesen Effekt in dem hier vorgestellten Mikroskop nutzen zu können, müsste die strukturierte Beleuchtung bezüglich der Bildaufnahme synchronisiert sein, da bei jedem Bild die genaue Position des Beleuchtungsmusters bekannt sein muss. Dafür müsste entweder das Mikrolinsenrad durch einen synchronisierbaren galvanometrischen Scanner ersetzt oder für jede Aufnahme der Probe zusätzlich das Streifenmuster der Beleuchtung detektiert werden. Gleichzeitig müsste das Beleuchtungsmuster feiner gewählt und damit auch die Aufnahmegeschwindigkeit gesteigert werden. Bei einer streifenförmigen Beleuchtung würde das Auflösungsvermögen in einer Dimension (x-Richtung) gesteigert werden. Um eine Steigerung des Auflösungsvermögens in zwei Dimensionen (x- und y-Richtung) zu erreichen, wäre es wünschenswert, die Probe nur mit Punkten statt mit Streifen zu beleuchten. Um dabei einen Anstieg der Aufnahmedauer zu vermeiden, benötigt man daher im Vergleich zu der verwendeten EMCCD-Kamera noch schnellere Detektionssysteme.

Ein großes Ziel bei der Entwicklung der Mikroskopie ist die weitere Steigerung der Aufnahmegeschwindigkeit verbunden mit einer hohen räumlichen Auflösung, bis es möglich sein wird, dreidimensionale „Videoaufnahmen“ von lebenden Zellen zu erhalten. Für ein Video ist eine Bildrate von 25 fps (fps: Frames per Second) nötig. Bei dem hier vorgestellten System liegt die Bildrate für die berechneten xy-Bilder bei 12.5 fps. Würde man nur eine Ebene in der Probe betrachten wollen, müsste man die Aufnahmegeschwindigkeit verdoppeln, um die Videobildrate zu erhalten. Wird jedoch die Aufnahmedauer für einen ganzen dreidimensionalen Datensatz von 24 s mit der Videobildrate verglichen, so wird deutlich, dass die dreidimensionale Aufnahmegeschwindigkeit dieses Mikroskops von der Videobildrate und damit von Echtzeitaufnahmen lebender Zellen noch entfernt ist.

Der Fortschritt auf diesem Gebiet ist im Wesentlichen durch die vorhandenen Detektoren, die Qualität der Mikrolinsen und der Optiken bestimmt. Dabei ist zu beachten, dass die erhältlichen Detektoren mit einer Detektionseffizienz von über 90% nur noch in ihrer Bildrate steigerbar sind. Bei verkürzter Aufnahmedauer werden jedoch pro Bild von der Probe weniger Fluoreszenzphotonen emittiert und detektiert, wodurch sich das Signal-zu-Rauschverhältnis verschlechtert. Um dennoch ein genügend großes Signal-zu-Rauschverhältnis zu erlangen, müssen in kürzerer Zeit mehr Fluoreszenzphotonen emittiert werden. Dies wird beispielsweise durch eine höhere Anregungsintensität des Lasers erreicht. Dabei stellt sich jedoch die Frage, ob eine Steigerung der Anregungsintensität zu einer Schädigung der zu untersuchenden Zellen und zu stärkerem Bleichen des jeweiligen Farbstoffes führen wird. Um den Farbstoff zu schonen, können andere Rasterverfahren zum Einsatz kommen, bei denen z. B. punktweise und in zufälliger Reihenfolge gerastert wird.

Es bleibt daher abzuwarten, welche Entwicklungen es bei den verschiedenen Systemen und Verfahren zukünftig geben wird.

A Aufbau

Im Folgenden sind zwei Fotos des Aufbaus zu sehen:

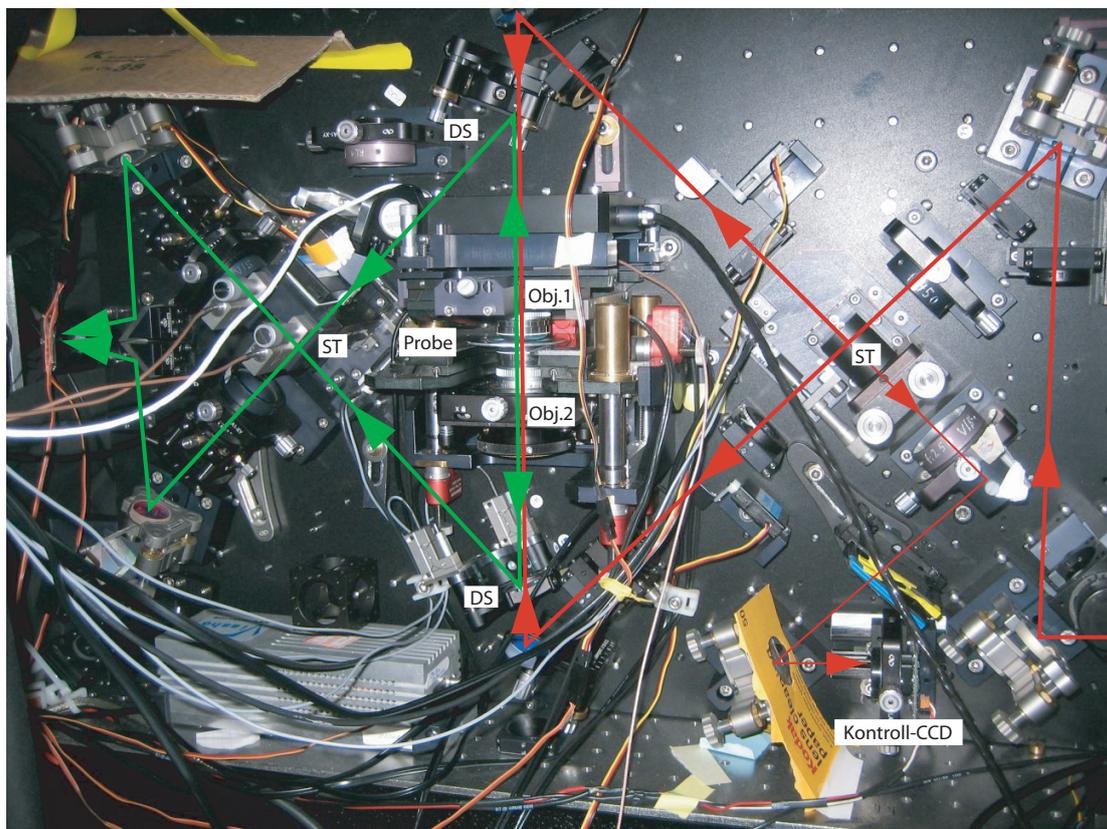


Abbildung A.1: Foto der Anregungs- und Detektionskavität. Über einen Strahlteilerwürfel (ST) wird der einfallende Strahl geteilt und auf die Rückapertur zweier sich gegenüberstehender Objektive (Obj.1 und 2) abgebildet und auf dieselbe Ebene innerhalb der Probe fokussiert. Bei Typ C wird das Fluoreszenzlicht von beiden Objektiven gesammelt, von zwei dichroitischen Spiegeln (DS) vom Anregungslicht getrennt und in einem weiteren Strahlteilerwürfel (ST) kohärent vereint. Über eine Tubuslinse wird das Fluoreszenzlicht schließlich auf den Detektor abgebildet. Für Typ A kann über eine schwenkbare Klappe der obere Interferometerarm der Detektionskavität geblockt werden, so dass die Detektion nur durch das untere Objektiv erfolgt.

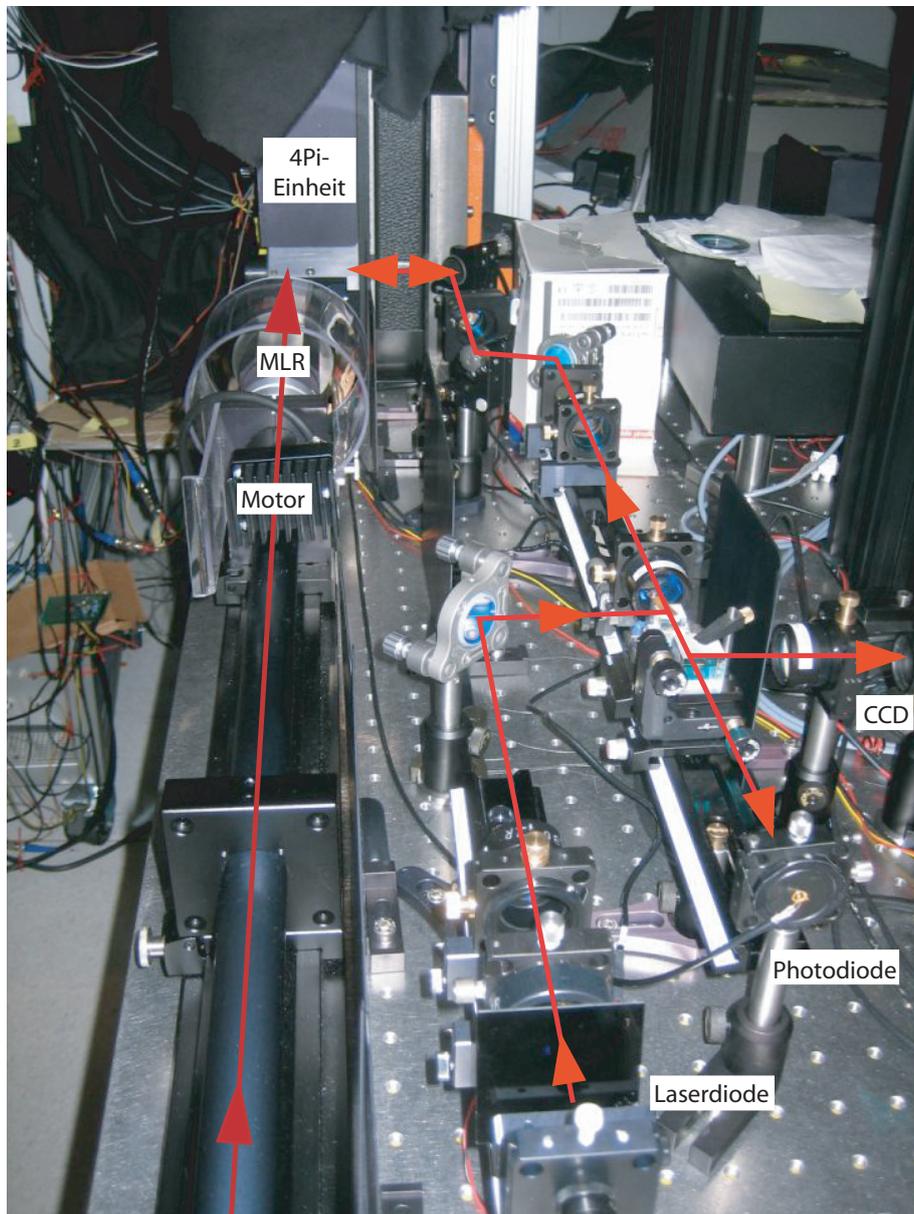


Abbildung A.2: Foto des Mikrolinsenrades und des optischen Teils der Automatik-Justage-Einheit. Der von dem Ti:Sa-Laser kommende Strahl wird von dem rotierenden Mikrolinsenrad (MLR) geteilt und dann in die 4Pi-Einheit eingekoppelt. Der Strahl der Laserdiode der Automatik-Justage-Einheit wird über mehrere Linsen auf die Rückapertur der Objektivseite angepasst und ebenfalls in die 4Pi-Einheit eingekoppelt. Nachdem der Strahl in der 4Pi-Einheit durch einen Strahlteilerwürfel aufgeteilt wurde und von beiden Seiten die Objektivseite passiert hat, wird er über die Optiken zurück auf eine Photodiode und eine CCD-Kamera abgebildet.

Literaturverzeichnis

- [1] E. Abbe. Beiträge zur Theorie des Mikroskops und der mikroskopischen Wahrnehmung. *Arch. Mikroskop. Anat.*, 9:413–468, 1873.
- [2] S. L. Flegler, J. W. Heckman, and K.L. Klomparens. *Elektronenmikroskopie: Grundlagen - Methoden - Anwendungen*. Spektrum Akademischer Verlag, 1995.
- [3] A. Egner and S. W. Hell. Fluorescence microscopy with super-resolved optical sections. *Trends in Cell Biology*, 15(4):207–215, 2005.
- [4] M. Minsky. Memoir on inventing the confocal scanning microscope. *Scanning*, 10:128–138, 1988.
- [5] W. Denk, J. H. Strickler, and W. W. Webb. 2-photon laser scanning fluorescence microscopy. *Science*, 248:73–76, 1990.
- [6] M. Nagorni and S. W. Hell. Coherent use of opposing lenses for axial resolution increase in fluorescence microscopy. i. comparative study of concepts. *J. Opt. Soc. Am. A*, 18:36–48, 2001.
- [7] B. Bailey, D. L. Farkas, D. L. Taylor, and F. Lanni. Enhancement of axial resolution in fluorescence microscopy by standing-wave excitation. *Nature*, 366:44–48, 1993.
- [8] M. G. L. Gustafsson et al. Sevenfold improvement of axial resolution in 3d widefield microscopy using two objective lenses. *Proc. SPIE*, 2412:147–156, 1995.
- [9] J. Bewersdorf, R. Schmidt, and S. W. Hell. Comparison of I⁵M and 4Pi-microscopy. *J Microsc-Oxford*, 222:105–117, 2006.
- [10] A. Egner and S. W. Hell. Aberrations in confocal and multi-photon fluorescence microscopy induced by refractive index mismatch. In J. B. Pawley, editor, *Handbook of Biological Confocal Microscopy*, pages 404–413. Springer, 3rd edition, 2006.
- [11] S. W. Hell and E. H. K. Stelzer. Properties of a 4pi confocal fluorescence microscope. *J. Opt. Soc. Am. A.*, 9(12):2159–2166, 1992.
- [12] H. Gugel, J. Bewersdorf, S. Jakobs, J. Engelhardt, R. Storz, and S. W. Hell. Co-operative 4pi excitation and detection yields sevenfold sharper optical sections in live-cell microscopy. *Biophysical Journal*, 87:4146–4152, 2004.

- [13] P. E. Hänninen, S. W. Hell, J. Salo, and E. Soini. Two-photon excitation 4pi confocal microscope: Enhanced axial resolution microscope for biological research. *J. Opt. Soc. Am. A.*, 9(12):2159–2166, 1992.
- [14] K. Bahlmann, S. Jakobs, and S. W. Hell. 4pi-confocal microscopy of live cells. *Ultramicroscopy*, 87:155–164, 2001.
- [15] J. Bewersdorf, R. Pick, and S. W. Hell. Multifocal multiphoton microscopy. *Opt. Lett.*, 23:655–657, 1998.
- [16] A. Egner. *Multifokale hochauflösende 3D-Fluoreszenzmikroskopie*. PhD thesis, Ruprecht-Karls-Universität Heidelberg, 2002.
- [17] A. Egner, S. Jakobs, and S. W. Hell. Fast 100-nm resolution three-dimensional microscope reveals structural plasticity of mitochondria in live yeast. *P Natl Acad Sci USA*, 99:3370–3375, 2002.
- [18] M. C. Lang, J. Engelhardt, and S. W. Hell. 4pi microscopy with linear fluorescence excitation. *Opt. Lett.*, 32(3):259–261, 2007.
- [19] M. C. Lang, T. Müller, J. Engelhardt, and S. W. Hell. 4Pi microscopy of type A with 1-photon excitation in biological fluorescence imaging. *Opt. Exp.*, 15(5):2459–2467, 2007.
- [20] M. A. A. Neil, R. Juškaitis, and T. Wilson. Method of obtaining optical sectioning by using structured light in a conventional microscope. *Opt. Lett.*, 22(24):1905–1907, 1997.
- [21] M. G. L. Gustafsson. Surpassing the lateral resolution limit by a factor of two using structured illumination microscopy. *J Microsc-Oxford*, 198:82–87, 2000.
- [22] J. W. Goodman. *Introduction to Fourier optics*. The McGraw-Hill Companies, INC., 2nd edition, 1996.
- [23] E. Wolf. Electromagnetic diffraction in optical systems .1. an integral representation of the image field. *Proc R Soc Lon Ser-A*, 253(1274):349–357, 1959.
- [24] B. Richards and E. Wolf. Electromagnetic diffraction in optical systems .2. structure of the image field in an aplanatic system. *Proc R Soc Lon Ser-A*, 253(1274):358–379, 1959.
- [25] M. Born and E. Wolf. *Principles of Optics*. Cambridge University Press, 7th edition, 2002.
- [26] J. B. Pawley. Fundamental limits in confocal microscopy. In J. B. Pawley, editor, *Handbook of Biological Confocal Microscopy*, pages 20–42. Springer, 3rd edition, 2006.

- [27] M. Schrader, U. G. Hofmann, and S. W. Hell. Ultrathin fluorescent layers for monitoring the axial resolution in confocal and two-photon fluorescence microscopy. *J Microsc-Oxford*, 191:135–140, 1998.
- [28] D. Baddeley, C. Carl, and C. Cremer. 4pi microscopy deconvolution with a variable point-spread function. *Appl. Opt.*, 45(27):7056–7064, 2006.
- [29] S. W. Hell and E. H. K. Stelzer. Fundamental improvement of resolution with a 4pi-confocal fluorescence microscope using two-photon excitation. *Opt. Commun.*, 93:277–282, 1992.
- [30] J. Bewersdorf, A. Egner, and S. W. Hell. 4pi microscopy. In J. B. Pawley, editor, *Handbook of Biological Confocal Microscopy*, pages 561–569. Springer, 3rd edition, 2006.
- [31] J. Bewersdorf, A. Egner, and S. W. Hell. Multifocal multi-photon microscopy. In J. B. Pawley, editor, *Handbook of Biological Confocal Microscopy*, pages 550–560. Springer, 3rd edition, 2006.
- [32] A. Enger, V. Andresen, and S. W. Hell. Comparison of the axial resolution of practical nipkow-disc confocal fluorescence microscopy with that of multifocal multiphoton microscopy: theory and experiment. *J Microsc-Oxford*, 206:24–32, 2001.
- [33] A. Egner and S. W. Hell. Time multiplexing and parallelization in multifocal multiphoton microscopy. *J. Opt. Soc. Am. A.*, 17(7):1192–1201, 2000.
- [34] D. Toomre and J. B. Pawley. Disc-scanning confocal microscopy. In J. B. Pawley, editor, *Handbook of Biological Confocal Microscopy*, pages 221–238. Springer, 3rd edition, 2006.
- [35] R. Heintzmann and P. A. Benedetti. High-resolution image reconstruction in fluorescence microscopy with patterned excitation. *Appl. Optics*, 45(20):5037–5045, 2006.
- [36] R. Heintzmann. Structured illumination methods. In J. B. Pawley, editor, *Handbook of Biological Confocal Microscopy*, pages 265–279. Springer, 3rd edition, 2006.
- [37] J. B. Pawley. Points, pixels and gray levels: Digitizing image data. In J. B. Pawley, editor, *Handbook of Biological Confocal Microscopy*, pages 59–79. Springer, 3rd edition, 2006.
- [38] Andor™ Technology. *iXon*, 3.5 edition, 2006.
- [39] A. Schönle. Inspector image acquisition and analysis software. v0.1, 2006.
- [40] A. Egner, M. Schrader, and S. W. Hell. Refractive index mismatch induced intensity and phase variations in fluorescence confocal, multiphoton and 4pi-microscopy. *Opt. Commun.*, 153:211–217, 1998.

-
- [41] S. Jakobs, N. Martini, A. C. Schauss, A. Egner, B. Westermann, and S. W. Hell. Spatial and temporal dynamics of budding yeast mitochondria lacking the division component *fis1p*. *J. Cell Sci.*, 116(10):2005–2014, 2003.
- [42] S. Jakobs. Mitochondrien - Dynamische Kraftwerke der Zelle. *MPIbp News*, 12:1–4, 2004.
- [43] K. Bahlmann and S. W. Hell. Polarization effects in 4pi confocal microscopy studied with water-immersion lenses. *Appl. Opt.*, 39(10):1652–1658, 2000.

Danksagung

An dieser Stelle sei all denen herzlich gedankt, die mich bei der Anfertigung dieser Arbeit unterstützt und somit maßgeblich zu deren Gelingen beigetragen haben.

Ich möchte mich bei folgenden Personen im Einzelnen bedanken:

- Prof. Dr. Stefan Hell für die Themenstellung und die Betreuung der Arbeit. Durch die exzellenten Arbeitsbedingungen in den Laboren und das angenehme Arbeitsklima in seiner Arbeitsgruppe „NanoBiophotonik“ war die Arbeit stets motivierend, lehrreich und sehr interessant.

- Prof. Dr. Frank Träger für das Interesse an meiner Arbeit, seine Hilfsbereitschaft in organisatorischen Fragen und für die freundliche Übernahme des Zweitgutachtens.

- Dr. Alexander Egner insbesondere für die hervorragende Betreuung, die Einarbeitung in die 4Pi-Mikroskopie, die vielen Ratschläge und Erklärungen, sowie für das Korrekturlesen meiner Arbeit.

- Claudia Geisler ebenso für die gute Betreuung, die vielen praktischen Tipps im Umgang mit dem 4Pi-Mikroskop und ihre ständige Hilfsbereitschaft, sowie für das Korrekturlesen meiner Arbeit.

- Dr. Andreas Schönle für die Bereitstellung seiner Datenaufnahme- und Datenverarbeitungssoftware Inspector und die schnelle Implementierung zusätzlicher Funktionen.

- Dr. Johann Engelhardt für die Hilfestellung bei der Automatik-Justage-Einheit und für das zugehörige Steuerungsprogramm.

- Harald Meyer und Jaydev Jethwa für die Hilfestellung bei allen technischen und elektronischen Fragen.

- Rainer Pick für die Unterstützung bei optischen Fragestellungen.

- Rita Schmitz-Salue, Christian Wurm, Rebecca Medda und Alicia Patricia Castano Mantas für die Unterstützung bei biologischen Fragestellungen.

- Roman Schmidt für die nette Labor-Nachbarschaft und die vielen hilfreichen Tipps im Laboralltag.

- Jessica Schilde, Jana Schmitz-Salue, Ida Suppanz und Daniel Neumann, mit denen ich viele nette Stunden in einem gemeinsamen Büro verbracht habe, sowie Eva Rittweger, die alle immer ein offenes Ohr für mich hatten.

- insbesondere meinen Eltern und meiner Großmutter, die mir stets bei kleineren und größeren Problemen beiseite stehen, mich immer ermutigen und mir das Studium ermöglicht haben, sowie meinem Freund Martin und meinen Freunden für ihre Unterstützung.