

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

vorgelegt von  
Dipl.-Phys. Jörg Bewersdorf  
aus Marburg an der Lahn

Tag der mündlichen Prüfung: 16.10.2002

# 4Pi-konfokale Fluoreszenzmikroskopie mit 1-Photonen-Anregung

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

#### **4Pi-konfokale Fluoreszenzmikroskopie mit 1-Photonen-Anregung:**

Die 4Pi-konfokale Laserrastermikroskopie besitzt im Vergleich zu herkömmlichen konfokalen Mikroskopen eine 4- bis 7-fach höhere axiale Auflösung. Bisher war sie jedoch auf die problembehaftete 2-Photonen-Anregung (aufwändig, erhöhtes Photobleichen) beschränkt, da nur so eine lückenlose Abdeckung des Raumfrequenzspektrums durch die optische Transferfunktion (OTF) realisierbar schien. In dieser Arbeit wird die Eignung der 1-Photonen-Anregung in der 4Pi-Mikroskopie theoretisch und experimentell untersucht. Es wird gezeigt, dass im 4Pi-Typ C-Modus, der sowohl die Interferenz des Anregungs- als auch des Detektionslichts von beiden Objektiven nutzt, bei gleichzeitiger Optimierung von Stokes-Shift, Lochblendengröße und Objektiv-Öffnungswinkel die OTF lückenlos abgedeckt werden kann. Ebenso werden Pupillenfilter untersucht und angegeben, die zur Glättung der OTF führen. Die artefaktfreien Bilder biologischer Strukturen, die mit einem strahlrasternden 4Pi-Typ C-Mikroskop aufgenommen wurden, zeigen eine axiale Auflösung von 70 - 95 nm, was einer Steigerung von 30% gegenüber typischen 2-Photonen-Typ A-Aufnahmen entspricht. Zusätzlich ermöglicht dieses 4Pi-Mikroskop, die axiale Position einzelner Objekte genauer zu bestimmen. Eine Lokalisierungsgenauigkeit von ca. 2 nm wird zur Vermessung der Abstände sekretorischer Granula zur neuroendokrinen Plasmamembran genutzt und eröffnet neue Ansätze zur Erforschung des Fusionsprozesses intrazellulärer Membranen.

#### **4Pi-confocal fluorescence microscopy with 1-photon excitation:**

Compared to standard confocal microscopes 4Pi-confocal laser scanning microscopy features a 4- to 7-fold increased axial resolution. However, so far it has been constrained to 2-photon excitation, because this was the only way to obtain a contiguous optical transfer function (OTF). Unfortunately, 2-photon excitation requires complex laser systems and increases photobleaching. In this work the feasibility of 1-photon excitation in 4Pi-microscopy is investigated. By using the interference of the excitation and the detection light of both objective lenses (4Pi-type C mode), as well as by optimising important parameters, such as the Stokes-shift, the size of the detection pinhole and the aperture angle of the objective lens, a continuous OTF has been established also for 1-photon excitation. Dedicated pupil filters further smooth the OTF. Images of biological structures recorded with a 4Pi-type C beam-scanning confocal microscope exhibit a resolution of 70 to 95 nm, thus displaying a 30% increase over its 2-photon 4Pi-type A counterpart. The 4Pi-microscope also localises discrete objects more precisely. In a biological application, a localisation accuracy of  $\sim 2$  nm has been used to measure the distances between secretory granules and the neuroendocrine plasma membrane. These studies open up new opportunities for studying membrane fusion in a cell.

# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung und Motivation</b>	<b>1</b>
<b>2</b>	<b>Grundlagen</b>	<b>3</b>
2.1	Die Punktbildfunktion des 4Pi-konfokalen Laserrastermikroskops . . . . .	3
2.2	Die Optische Transferfunktion des 4Pi-konfokalen Laserrastermikroskops . . .	5
2.2.1	Die Optische Transferfunktion . . . . .	5
2.2.2	Entstehung der OTF im Fourierraum . . . . .	5
2.2.3	Die OTF-beeinflussenden Parameter . . . . .	6
2.2.4	Zusammenhang zwischen OTF und PSF im 4Pi-konfokalen Mikroskop .	8
2.2.4.1	Die kritische Raumfrequenz $k_c$ . . . . .	8
2.2.4.2	Phasenbestimmung über die OTF . . . . .	9
2.3	Lokalisierungsgenauigkeit und Auflösungsvermögen . . . . .	9
2.3.1	Methoden zur Lokalisierung von Punktobjekten . . . . .	11
2.3.2	Grundsätzlicher Einfluss der OTF . . . . .	11
2.3.3	Lokalisierung unter dem Einfluss von Rauschen . . . . .	13
2.3.3.1	Ohne Hintergrundrauschen . . . . .	14
2.3.3.2	Mit Hintergrundrauschen. . . . .	15
2.3.4	Einfluss des Gesamtsignals . . . . .	16
<b>3</b>	<b>Optische Instrumentation</b>	<b>18</b>
3.1	Das konfokale Laserrastermikroskop . . . . .	18
3.2	Das 4Pi-konfokale Modul . . . . .	19
3.2.1	Konzept . . . . .	19
3.2.2	Kritische Bildfeldparameter . . . . .	20
3.2.2.1	Vergrößerung und Ebenheit des Bildfeldes . . . . .	21
3.2.2.2	Konstanz der Phasendifferenz im Bildfeld . . . . .	21

3.2.3	Chromatische Effekte und ihre Korrektur . . . . .	22
3.2.3.1	Chromatische Querfehler . . . . .	23
3.2.3.2	Chromatische Längsfehler . . . . .	23
3.2.3.3	Dispersion . . . . .	25
3.2.3.4	Chromatische Phasenverzögerung an dielektrischen Strahlteilern	25
3.2.4	Mechanische Justagevorrichtungen . . . . .	27
3.3	Objektive . . . . .	28
3.4	Avalanche-Photodiode . . . . .	29
<b>4</b>	<b>Konzepte zur OTF-Modellierung</b>	<b>30</b>
4.1	Verschiedene 4Pi-Betriebsmodi . . . . .	30
4.2	Der Einfluss von Objektiven und Detektionslochblende auf PSF und OTF . . .	30
4.3	Der Stokes-Shift in der 4Pi-Mikroskopie . . . . .	33
4.3.1	Abhängigkeit der PSF und OTF vom Stokes-Shift . . . . .	33
4.3.2	Konzepte zur Erzeugung ungewöhnlicher Stokes-Shifts . . . . .	34
4.4	Pupillenfilter in der 4Pi-Mikroskopie . . . . .	35
4.4.1	Konzept . . . . .	35
4.4.2	Simulationen für 1- und 2-Photonen-Anregung . . . . .	36
4.4.2.1	Auswahl der Simulationsmethode . . . . .	36
4.4.2.2	Durchführung . . . . .	37
4.4.2.3	Ergebnisse . . . . .	39
4.4.3	Experimentelle Realisierung . . . . .	44
4.4.3.1	Reduzierung der Nebenmaxima . . . . .	45
4.4.3.2	Phasenbestimmung mit Hilfe von Pupillenfiltern . . . . .	45
4.4.4	Mögliche Realisierungen im strahlrasternden Gerät . . . . .	47
4.5	Konstruktiv-destruktive Interferenz . . . . .	48
4.6	OTF-Kombination . . . . .	50
4.6.1	Prinzip . . . . .	50
4.6.2	Simulation . . . . .	50
4.6.3	Realisierungsmöglichkeiten . . . . .	51
<b>5</b>	<b>Experimentelle Bestimmung der Auflösungserhöhung</b>	<b>53</b>
5.1	Untersuchungen anhand der <i>z</i> -Antwort . . . . .	53
5.2	Aufnahmen von <i>Escherichia coli</i> Bakterien . . . . .	55

<b>6</b>	<b>Abstandsmessung an sekretorischen Granula</b>	<b>57</b>
6.1	Biologischer Hintergrund . . . . .	57
6.2	Messprotokoll . . . . .	58
6.2.1	Präparation . . . . .	58
6.2.2	Aufnahmeprozedur . . . . .	59
6.3	Auswertung . . . . .	60
6.4	Meßgenauigkeit . . . . .	61
6.4.1	Systematische Fehler physikalischen Ursprungs . . . . .	61
6.4.1.1	Übersprechen zwischen den Fluoreszenzkanälen (Crosstalk) . . . . .	61
6.4.1.2	Farblängsfehler . . . . .	61
6.4.1.3	Phasendifferenz und Dispersion . . . . .	62
6.4.1.4	Sonstige Einflüsse . . . . .	64
6.4.2	Biologische Parameter . . . . .	64
6.4.2.1	Durchmesser der Granula . . . . .	64
6.4.2.2	Abstand der Cy3-Farbstoffmoleküle von der Plasmamembran . . . . .	64
6.4.2.3	Unebenheit der Plasmamembran und nicht senkrechte Bindung . . . . .	65
6.5	Ergebnisse . . . . .	66
<b>7</b>	<b>Zusammenfassung und Ausblick</b>	<b>68</b>

## Verwendete Abkürzungen

GFP	<i>Green fluorescent protein</i> (Grün fluoreszierendes Protein)
NA	Numerische Apertur
OTF	<i>Optical transfer function</i> (Optische Übertragungsfunktion)
MTF	Modulations-Transferfunktion; entspricht dem Betrag der OTF
PSF	<i>Point spread function</i> (Punktbildfunktion)
SNR	<i>Signal to noise ratio</i> (Signal-zu-Rausch-Verhältnis)

# Kapitel 1

## Einleitung und Motivation

Die konfokale Fluoreszenz-Laserrastermikroskopie [1] hat sich zu einem leistungsfähigen Werkzeug in der modernen Biologie entwickelt [2]. Im Gegensatz zum gewöhnlichen Epifluoreszenzmikroskop erlaubt sie die dreidimensionale Auflösung biologischer Strukturen. Diese Auflösung kann in der 4Pi-konfokalen Mikroskopie [3] durch die optisch kohärente Verwendung zweier einander gegenüberstehender Objektive axial um ungefähr einen Faktor 5 auf ca. 100 nm gesteigert werden. Die Beobachtung deutlich kleinerer Strukturen und deren Funktion im Inneren lebender Zellen wird dadurch ermöglicht. In den letzten Jahren sind mit dieser Technik beachtliche Erfolge erzielt worden und sie hat sich vom anfänglichen Nachweis des Funktionsprinzips bis hin zur erfolgreichen Anwendung in der Biologie entwickelt [4].

Nach anfänglichen Versuchen mit der in der Fluoreszenzmikroskopie üblichen 1-Photonen-Anregung [3] konzentrierte sich die Forschung in der 4Pi-konfokalen Mikroskopie alsbald ausschließlich auf die Verwendung von 2-Photonen-Anregungsprozessen. Der Grund lag darin, dass die Fluoreszenzanregung auf die Bereiche hoher Leistungsdichten konzentriert wird. Dadurch erscheinen die Nebenmaxima im Fokus des 4Pi-Mikroskops weniger ausgeprägt. Allerdings sind mit dem nichtlinearen Prozess auch gravierende Nachteile verbunden. Neben den benötigten teuren und aufwendigen modengekoppelten Lasersystemen bereitet vor allem die Anregung an sich Probleme. Bei den verfügbaren Farbstoffen kann im Gegensatz zur gewöhnlichen Fluoreszenzanregung nicht auf eine entsprechend langjährige und breit gefächerte Erfahrung zurückgegriffen werden. Insbesondere die nichtlineare Natur des 2-Photonen-Übergangs wirkt sich negativ aus: In den letzten Jahren gewonnene Erfahrungen zeigen, dass der 2-Photonen-Anregungsprozess eine bis zu zehnfach geringere Signalausbeute durch verstärktes Photobleichen hat [5]. Hohe chromatische Aberrationen bilden ein weiteres Problem. Der Vorteil einer erhöhten möglichen Eindringtiefe durch die Verwendung des langwelligeren Infrarotlichts in der 2-Photonen-Anregung kommt dagegen in der 4Pi-Mikroskopie nicht zum Tragen, da die Verwendung von Objektiven mit hoher numerischer Apertur, die naturgemäß einen geringen freien Arbeitsabstand besitzen, Voraussetzung ist. Bedenkt man zusätzlich, dass die 1-Photonen-Anregung durch die niedrigere Wellenlänge eine höhere Auflösung erlaubt, so ist die Realisierung eines 1-Photonen-4Pi-konfokalen Mikroskops durchaus wünschenswert.

Zwei mögliche Vorgehensweisen bieten sich an: Erstens können neue Wege verfolgt werden, um die Nebenmaxima im 4Pi-Fokus zu verringern, zweitens kann man über Anwendungen nachdenken, bei denen die Höhe der Nebenmaxima keine bestimmende Rolle spielt. Beide Aspekte



entkräften den Haupteinwand zu hoher Nebenmaxima gegen die 1-Photonen-Anwendung und werden im Rahmen dieser Arbeit verfolgt, um ein neuartiges 1-Photonen-4Pi-Mikroskop zu realisieren.

Neben der Untersuchung verschiedener Ansätze zur Reduzierung der Nebenmaxima (Kapitel 4) wird ein im Rahmen dieser Arbeit konstruiertes Mikroskop beschrieben, das durch die Verbindung mit einem ausgereiften, handelsüblichen Laserrastermikroskop, optimierte optische Komponenten und die konsequente Verwendung stabilisierender Maßnahmen eine gegenüber vorhandenen 4Pi-Aufbauten deutlich erhöhte Funktionalität und Stabilität aufweist (Kapitel 3). Desweiteren wird die Funktionstüchtigkeit dieses Mikroskops nachgewiesen (Kapitel 5) und eine biologische Anwendung vorgestellt, bei der die Vorteile des aufgebauten Mikroskops zum Tragen kommen und diese Messungen damit erst ermöglicht werden (Kapitel 6).

# Kapitel 2

## Grundlagen

### 2.1 Die Punktbildfunktion des 4Pi-konfokalen Laserrastermikroskops

Das mit einem optischen System aufgenommene Bild  $b(\mathbf{r})$  ergibt sich aus der Faltung der beobachteten Struktur  $s(\mathbf{r})$  mit der Punktbildfunktion  $h(\mathbf{r})$  (engl.: *point spread function*, PSF) des Systems:

$$b(\mathbf{r}) = s(\mathbf{r}) \otimes h(\mathbf{r}) \quad (2.1)$$

Das Auflösungsvermögen eines konfokalen Laserrastermikroskops, das sich in  $h(\mathbf{r})$  widerspiegelt, ergibt sich aus der Verbindung der räumlichen Anregungswahrscheinlichkeit, ausgedrückt durch die Anregungs-PSF  $h_{Anrg}$  des Laserfokusses, mit der Detektionswahrscheinlichkeit, die durch die Detektions-PSF  $h_{Det}$  der konfokalen Lochblende vor dem Detektor beschrieben wird:

$$h(\mathbf{r}) = h_{Anrg}(\mathbf{r}) \cdot h_{Det}(\mathbf{r}) \quad (2.2)$$

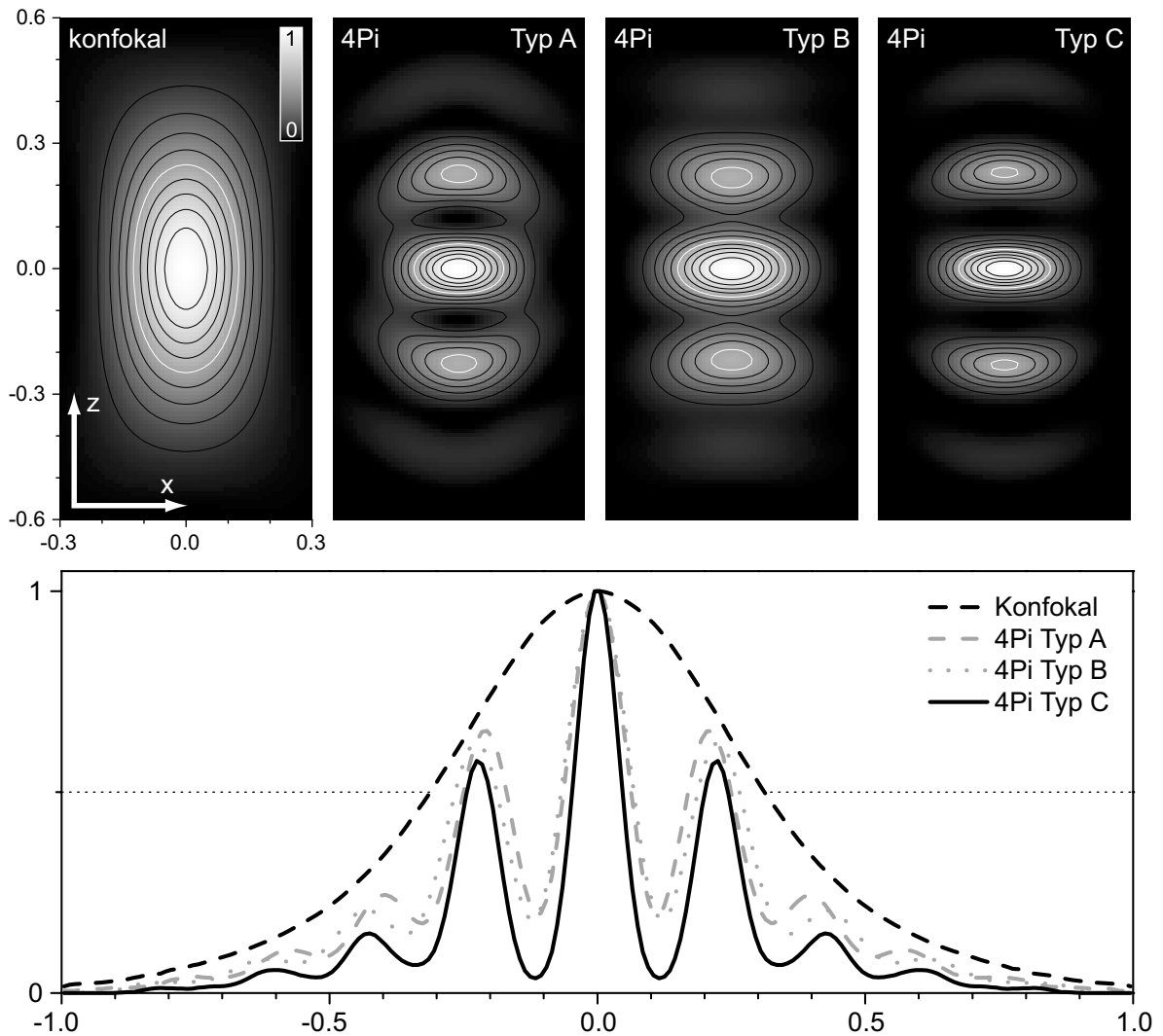
Bei der 1-Photonen-Anregung ist  $h_{Anrg}$  unter Vernachlässigung von Sättigungseffekten proportional zur Intensität im Laserfokus. Diese ist wiederum proportional zum Betragsquadrat des elektromagnetischen Feldes:

$$h_{Anrg}(\mathbf{r}) = const \cdot \sigma \cdot |\mathbf{E}(\mathbf{r})|^2 \quad (2.3)$$

$\sigma$  bezeichnet den Wirkungsquerschnitt der 1-Photonen-Absorption. Die Berechnung elektromagnetischer Felder im Fokus von Objektiven mit hoher numerischer Apertur wird z.B. in [6, 7] beschrieben.

$h_{Det}$  wird maßgeblich vom Radius  $\rho$  der Detektionslochblende beeinflusst. Dazu wird die PSF einer infinitesimal kleinen Lochblende  $h'_{Det, \rho=0}$  mit der Lochblendenfunktion  $l_\rho$  gefaltet:

$$h_{Det}(\mathbf{r}) = h'_{Det, \rho=0}(\mathbf{r}) \otimes l_\rho(\mathbf{r}) \quad (2.4)$$



**Abbildung 2.1:** Theoretische PSFs des konfokalen Mikroskops und der verschiedenen 4Pi-konfokalen Betriebsmodi. Gezeigt sind berechnete xz-Schnitte durch die Punktbildfunktionen mit eingezeichneten Höhenlinien bei 10%, 20%, ..., 90% der maximalen Leistungsdichte. Die Längen sind in Mikrometern angegeben. Das Profil zeigt die dazugehörigen normierten z-Antworten (siehe Gl. 2.5). Bei der Berechnung wurde von einem Wasser-Immersionsobjektiv ( $n = 1.33$ ) mit einer numerischen Apertur ( $NA$ ) von 1.2, einer Anregungswellenlänge von 488 nm und einer Detektionswellenlänge von 530 nm ausgegangen. Der Lochblendendurchmesser  $\rho$  entspricht dem einer Airyscheibe ( $\rho \approx 1.22\lambda_{Det}/NA$ ).

Gl. 2.2 - 2.4 gelten mit dem Unterschied, dass dort zwei einander gegenüberstehende Objektive benutzt werden, auch in der 4Pi-konfokalen Mikroskopie. Je nachdem, ob die beiden Objektive in der Beleuchtung und/oder der Detektion kohärent genutzt werden, ändern sich  $h_{Anrg}$  und  $h_{Det}$ . Es wird zwischen drei Betriebsarten des 4Pi-konfokalen Mikroskops unterschieden:

Typ A im Falle der kohärenten Beleuchtung mit zwei Objektiven aber gewöhnlicher konfokaler Detektion mit einem Objektiv (oder aber inkohärent mit beiden Objektiven),

Typ B bei kohärenter Detektion über beide Objektiven aber Beleuchtung nur über ein

Objektiv (oder aber inkohärent mit beiden Objektiven) und

Typ C bei kohärenter Beleuchtung und Detektion mit beiden Objektiven.

Während der Typ A die Standardmethode in der 4Pi-konfokalen Mikroskopie darstellt, ist der Typ C gerade wegen seiner erhöhten Auflösung und der gesenkten Nebenmaxima trotz seiner anspruchsvolleren Realisierbarkeit eine attraktive Alternative. Die Typ B-Variante ist hauptsächlich von akademischem Interesse<sup>1</sup>.

Die Halbwertsbreite der PSF ist ein Maß für das Auflösungsvermögen. In der für die 4Pi-konfokale Mikroskopie wichtigsten Richtung entlang der optischen Achse gibt man gewöhnlich die sogenannte z-Antwort als Größe der Auflösung an, die in der Praxis der Aufnahme einer lateral ausgedehnten homogenen Fläche entspricht:

$$I(z) = \int_0^{2\pi} \int_0^\infty r d\varphi dr h(r, \varphi, z) \quad (2.5)$$

Abb. 2.1 zeigt typische PSFs und ihre z-Antworten.

## 2.2 Die Optische Transferfunktion des 4Pi-konfokalen Laser-rastermikroskops

### 2.2.1 Die Optische Transferfunktion

Besser noch als die PSF  $h(\mathbf{r})$  beschreibt ihre Fourier-Transformierte  $H(\mathbf{k})$ , die Optische Transferfunktion (OTF), das Auflösungsvermögen eines Mikroskops.

$$H(\mathbf{k}) = FT \{h(\mathbf{r})\} \quad (2.6)$$

Anhand des Betrags von  $H(\mathbf{k})$ , der sogenannten Modulations-Transferfunktion (MTF), lässt sich für jede Raumfrequenz die Güte der Übertragung direkt ablesen [8, 9]. Einige Mikroskoptypen, wie das I<sup>5</sup>M- oder das standing wave Mikroskop [10, 11] übertragen ebenso wie das 4Pi-konfokale System deutlich höhere Raumfrequenzen als herkömmliche Konfokalmikroskope. Die Analyse anhand der OTF zeigt aber, dass diese Systeme mehr oder weniger große Lücken in der OTF aufweisen [12]. Die 4Pi-konfokale Mikroskopie ist z.Zt. das einzige Konzept neben der STED-Mikroskopie [13, 14], dass eine hinreichende Abdeckung des gesamten Bereiches von niedrigen Frequenzen bis zu hohen Frequenzen erreicht.

### 2.2.2 Entstehung der OTF im Fourierraum

Aus der Betrachtung der elektromagnetischen Feldverteilung im Fourierraum kann analog Gl. 2.2 - 2.4 im Ortsraum die OTF des 4Pi-konfokalen Mikroskops abgeleitet werden. Es muss jedoch folgender Punkt beachtet werden: Die Fouriertransformierte ist formal nur definiert,

---

<sup>1</sup>aber durchaus realisierbar

wenn das Integral des Betrags der zu transformierenden Funktion über den gesamten Definitionsbereich existiert. Für  $h(\mathbf{r})$  ist dies aufgrund der konfokalen Eigenschaft der betrachteten Mikroskope der Fall, nicht aber für die Einzelkomponenten  $h_{Anrg}$  und  $h_{Det}$  ihrer PSF, wie bei unendlich ausgedehnten sphärischen Wellen leicht erkannt werden kann. Für die qualitative Betrachtung kann dies allerdings unter Nutzung eines nur endlichen Integrationsbereiches außer acht gelassen werden, und man kann mit Hilfe des Faltungstheorems folgende Aussage in Verbindung mit Gl. 2.2 und 2.4 machen:

$$H(\mathbf{k}) = H_{Anrg}(\mathbf{k}) \otimes [H_{Det}(\mathbf{k}) \cdot L_\rho(\mathbf{k})] \quad (2.7)$$

Dabei ist  $L_\rho(\mathbf{k})$  die Fourier-Transformierte der Lochblendenfunktion  $l_\rho(\mathbf{r})$ .

Geht man einen Schritt weiter, kann man die OTF auf die elektromagnetischen Felder zurückführen. Im Falle der skalaren Näherung des elektromagnetischen Feldes ( $\mathbf{E} \Rightarrow E_x$ ) sieht die Beziehung dann unter Zuhilfenahme von Gl. 2.3 folgendermaßen aus:

$$H_{Anrg}(\mathbf{k}) = const \cdot \tilde{E}_{x, Anrg}(\mathbf{k}) \otimes \tilde{E}_{x, Anrg}(-\mathbf{k}) \quad (2.8)$$

Eine entsprechende Relation gilt für die Detektion.<sup>2</sup> Abbildung 2.2 zeigt die verschiedenen Fouriertransformierten und macht deutlich, wie die OTF des 4Pi-konfokalen Mikroskops des Typs C aus den Einzelkomponenten entsteht.

$\tilde{E}_{x, Anrg}(\mathbf{k})$  kann bei monochromatischer Beleuchtung ohne Aberrationen als

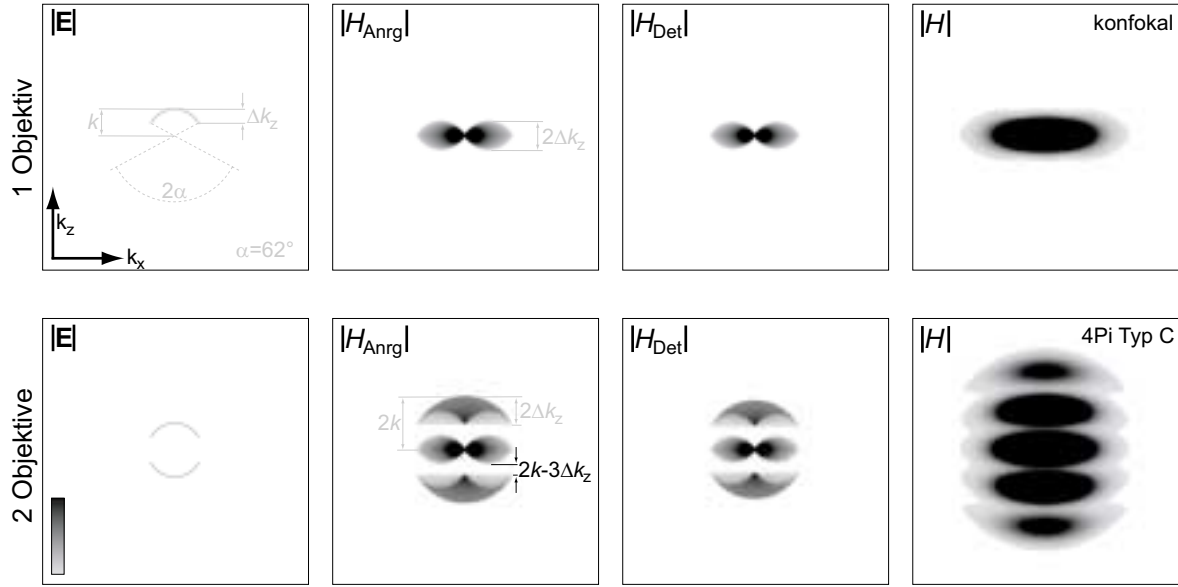
$$\tilde{E}_{x, Anrg}(\mathbf{k}) = \tilde{E}_0 \delta(k - k_0) P(\varphi, \vartheta) \quad (2.9)$$

dargestellt werden.  $P(\varphi, \vartheta)$  stellt dabei die Pupillenfunktion dar und beschreibt die Modulation der einfallenden elektromagnetischen Welle über die Pupille des Objektivs. Die Funktion existiert also nur innerhalb des Öffnungswinkels der Objektivs  $\vartheta \leq \alpha$  bzw.  $\vartheta \geq \pi - \alpha$  und ist normalerweise rotationssymmetrisch. Dadurch nimmt  $\tilde{E}_{x, Anrg}(\mathbf{k})$  eine sehr einfache Form an: Der Anteil  $\neq 0$  liegt auf dem Ausschnitt einer Kugelschale mit dem Radius  $k = 2\pi n/\lambda_0$  mit  $\lambda_0$  als Vakuumwellenlänge und  $n$  als Brechungsindex. Der halbe Öffnungswinkel  $\alpha$  des Kugelschalenausschnitts entspricht dabei dem halben Öffnungswinkel der Objektivs, der über die Gleichung  $NA = n \sin \alpha$  mit der numerischen Apertur ( $NA$ ) verbunden ist (siehe auch Abb. 2.2). Die spektrale Breite des Lichts äußert sich in der radialen Dicke der Kugelschale.

### 2.2.3 Die OTF-beeinflussenden Parameter

Aus Abb. 2.2 wird deutlich, dass  $|H_{Anrg}(\mathbf{k})|$  und  $|H_{Det}(\mathbf{k})|$  im 4Pi-konfokalen Mikroskop des Typs C zwar deutlich höhere axiale Frequenzen enthalten als in konventionellen Konfokalmikroskopen, zwischen diesen und dem Bereich der niedrigen Raumfrequenzen aber einen Bereich besitzen, in dem das Mikroskop keine Raumfrequenzen überträgt. Ist die Lücke schmal genug, so wird sie bei der Faltung der beiden Komponenten zu  $H(\mathbf{k})$  geschlossen. Die Amplitude der entstehenden OTF ist allerdings in dem kritischen Bereich gering und hängt stark von der Form der Ausgangskomponenten ab.

<sup>2</sup>Nur zur Vervollständigung des Bildes soll hier erwähnt werden, dass bei Nutzung der 2-Photonen-Anregung vor Anwendung von Formel 2.7  $H_{Anrg}$  mit sich selbst gefaltet wird.



**Abbildung 2.2:** Die Entstehung der MTFs des konfokalen und des 4Pi-konfokalen (Typ C) Mikroskops. Dargestellt sind die Beträge der einfallenden Wellenfronten im Ortsfrequenzraum und die der Fouriertransformierten von  $h_{Anrg}$ ,  $h_{Det}$  und  $h$ . Man kann gut erkennen, wie sich die Form von  $H_{Anrg}$  und  $H_{Det}$  aus der Faltung von  $|\tilde{E}(\mathbf{k})|$  mit sich selbst ergibt, und  $H$  wiederum aus der Faltung von  $H_{Anrg}$  mit  $H_{Det}$ . Entscheidend für das Aussehen der OTFs sind letztendlich die Beträge  $k$  der Wellenvektoren aus Anregung und Detektion sowie der vom Öffnungswinkel der Objektive (hier z.B.  $62^\circ$ ) abhängige Wert  $\Delta k_z$ .

Zur Abgrenzung zwischen Bereichen mit sehr kleinen Werten nahe 0 und Bereichen, in denen die Funktionswerte exakt 0 annehmen, beginnt die Farbtabelle für Werte  $> 0$  bei Grau. Nur die 0 wird weiß dargestellt.  $|H_{Anrg}(\mathbf{k})|$  und  $|H_{Det}(\mathbf{k})|$  wurden aufgrund der erwähnten Probleme der quantitativen Betrachtung auf die Maximalwerte ihrer 4Pi-Nebenmaxima normiert, da eine Normierung auf den Wert im Ursprung nicht sinnvoll ist.  $|H(\mathbf{k})|$  dagegen kann auf 10% seines Maximalwertes im Ursprung normiert werden.

$|H_{Anrg}(\mathbf{k})|$  und  $|H_{Det}(\mathbf{k})|$  wurden anhand Gl. 2.8 und  $|H(\mathbf{k})|$  nach Gl. 2.7 berechnet, wobei hier von einer punktförmigen Lochblende ausgegangen wurde ( $L_\rho(\mathbf{k}) = const.$ ).

Es ergibt sich, dass für  $\lambda_{Det} > \lambda_{Anrg}$  die Relation

$$2k_{Anrg} - (2k_{Det} - 2\Delta k_{z,Det}) \leq (2k_{Det} - 2\Delta k_{z,Det}) - \Delta k_{z,Anrg} \quad (2.10)$$

erfüllt sein muss, damit die Lücke in der resultierenden OTF überhaupt geschlossen wird. Man erhält diese Ungleichung aus der anschaulichen Betrachtung der Faltung von  $H_{Anrg}(\mathbf{k})$  mit  $H_{Det}(\mathbf{k})$ , bei der man die beiden Funktionen übereinanderlegt und gegeneinander verschiebt:

$H_{Det}$  wird soweit gegen  $H_{Anrg}$  verschoben, dass sich die beiden Außenbereiche der OTFs gerade nicht mehr überschneiden. Dies ist der Fall, wenn die Innenkante des Außenbereichs der Detektions-OTF bei  $k_z^{(1)} = (2k_{Det} - 2\Delta k_{z,Det})$  nicht mehr die Außenkante der Anregungs-OTF bei  $k_z^{(2)} = 2k_{Anrg}$  berührt. Die OTFs sind in diesem Fall gerade um die Differenz  $k_z^{(1)} - k_z^{(2)}$  verschoben worden. Daneben betrachtet man, ob der Rand des Mittelbereichs von  $H_{Anrg}$  bei  $k_z^{(3)} = \Delta k_{z,Anrg}$  bereits schon die Innenseite des Außenbereichs von  $H_{Det}$  bei  $k_z^{(1)}$  erreicht hat, die Differenz  $k_z^{(3)} - k_z^{(1)}$  zwischen den beiden Werten insofern kleiner als die zuvor ermittelte Differenz ist. In diesem Fall gibt es keine Lücke in der effektiven OTF.

Durch Umformen von Gl. 2.10 kommt man auf die zu erfüllende Bedingung

$$\alpha \geq \arccos \frac{3}{4 \frac{\lambda_{Det}}{\lambda_{Anrg}} + 1}. \quad (2.11)$$

Aus der Ungleichung kann man entnehmen, dass durch eine Erhöhung des Stokes-Shifts, die  $\lambda_{Det}/\lambda_{Anrg}$  anwachsen lässt, geringere Werte für  $\alpha$  zulässig sind. Im Grenzfall  $\lambda_{Det} = \lambda_{Anrg}$  nimmt Gl. 2.11 die einfache Form  $\alpha = \arccos \frac{3}{5} = 53,1^\circ$  an. Dieser Winkel liegt deutlich unterhalb des Öffnungswinkels der verfügbaren Objektive. Bei diesen Objektiven ist die OTF daher grundsätzlich – wenn auch nur mit geringer Amplitude – geschlossen.

Die Lücke in den Einzel-OTFs  $H_{Anrg}(\mathbf{k})$  und  $H_{Det}(\mathbf{k})$  wird erst bei einem Winkel von  $\alpha = \arccos \frac{1}{3} = 70,5^\circ$  geschlossen<sup>3</sup>. Dieser wird bisher nur von den exotischen NA=1.45 Öl-Immersionsobjektiven überschritten. Die üblichen, verfügbaren Objektive mit hoher Bildfeld- und Farbkorrektur kommen diesem Wert zwar nahe, überschreiten ihn aber nicht. Die Überschreitung dieses Winkels bedeutet allerdings auch keinen Qualitätssprung in der OTF, sondern hilft nur kontinuierlich bei der Glättung der OTF.

Diese Betrachtung verdeutlicht, dass eine Erhöhung des Öffnungswinkels der Objektive verantwortlich für die Verbesserung der OTF ist. Eine weitere Rolle kann der Stokes-Shift zwischen Anregung und Detektion spielen. Ein großer Stokes-Shift verstärkt den Skalierungsunterschied zwischen  $|H_{Anrg}(\mathbf{k})|$  und  $|H_{Det}(\mathbf{k})|$  und glättet somit auch die OTF. Desweiteren kann man sich leicht vorstellen, dass durch eine Modifizierung der Pupillenfunktion  $P(\varphi, \vartheta)$  innerhalb der durch den Öffnungswinkel  $\alpha$  gegebenen Grenzen Einfluss auf die OTF-Bildung genommen werden kann. Auf diese Möglichkeiten wird detailliert in Kap. 4 eingegangen.

## 2.2.4 Zusammenhang zwischen OTF und PSF im 4Pi-konfokalen Mikroskop

### 2.2.4.1 Die kritische Raumfrequenz $k_c$

Das 4Pi-konfokale Mikroskop erzeugt zwischen den beiden Objektiven eine axial orientierte stehende Welle der Raumfrequenz  $k_0 \approx 4\pi n/\lambda$ , mit der die Probe angeregt wird.<sup>4</sup> Die dem Fokus eines Objektives dadurch aufgeprägte Modulation ist für die hohen Frequenzen in der OTF verantwortlich. Bei einem sehr kleinen Öffnungswinkel der Objektive nimmt die Zahl der Nebenmaxima in der PSF stark zu und ihre Höhen tendieren gegen die des Hauptmaximums. Im Extremfall  $\alpha \rightarrow 0$  wird eine ebene Welle erzeugt. Die dadurch eingeführte regelmäßige Wiederholung verhindert, dass ein Objekt, das neben einem konstanten Untergrund nur Strukturen mit der halben Raumfrequenz der stehenden Welle aufweist, von einem homogenen Objekt mit dem selben Durchschnittswert unterschieden werden kann. Die von dem Objekt repräsentierte kritische Raumfrequenz

$$k_c \approx 2\pi n/\lambda \quad (2.12)$$

<sup>3</sup>Es gilt dann  $2k - 3\Delta k_z \leq 0$  (s. Abb. 2.2).

<sup>4</sup>Hohe numerische Aperturen schieben die Maxima der stehenden Welle in der Nähe des Fokusses etwas nach außen und führen somit zu etwas kleineren Werten von  $k_0$  bei lokaler Betrachtung dieses Bereichs. Dieser Effekt kann durchaus 20-30% betragen [15].

wird von dem Mikroskop folglich nicht übertragen.

Im Grenzfall der ebenen Welle kann nur ein Objekt mit exakt der selben Periode wie die der stehenden Welle von einem homogenen Objekt unterschieden werden. Verantwortlich für das Minimum zwischen Haupt- und ersten Nebenmaxima in der OTF ist folglich das periodische Auftreten bestimmter Strukturen in der PSF. Durch Vergrößern des Objektivöffnungswinkels sinkt die Zahl der Nebenmaxima, wodurch sich auch die Lücke der OTF bei  $k_c$  verringert. Eine Strategie zur Verringerung der Höhe der Nebenmaxima der 4Pi-PSF entspricht somit einer Erhöhung der OTF bei der Raumfrequenz  $k_c$  und kommt daher einer Methode zur Glättung der OTF sehr nahe. Die Betrachtung im Ortsraum lässt allerdings weiter außen liegende Nebenmaxima außer acht. Die direkte Betrachtung der OTF ist deshalb dieser Methode vorzuziehen.

#### 2.2.4.2 Phasenbestimmung über die OTF

Betrachtet man eine PSF mit einem Hauptmaximum im Zentrum und symmetrischen, sehr niedrigen Nebenmaxima und ändert nun die Phasendifferenz zwischen den beiden Armen des 4Pi-Interferenzaufbaus um  $180^\circ$ , so wechselt die PSF von der soeben beschriebenen konstruktiven Interferenz zu destruktiver Interferenz mit einem Minimum im Zentrum und symmetrisch dazu zwei axial angeordneten Maxima. Für die Interpretation und Restaurierung der Bilddaten ist wegen der unterschiedlichen PSFs die Kenntnis der Phasendifferenz daher essentiell.

Wie im letzten Kapitel veranschaulicht, ist die Amplitude der OTF bei der Raumfrequenz  $k_c$  aber ein Maß für die regelmäßige Wiederholung bestimmter Strukturen in der PSF und muss sich somit in Abhängigkeit von der Phasendifferenz ändern. Umgekehrt lassen sich daher über die Messung von  $|H(0, 0, k_c)|$  Rückschlüsse auf die Phasenbeziehung der 4Pi-Interferenz ziehen.

Die Übertragung von Gl. 2.1 in den Fourierraum zeigt, dass sich die Fouriertransformierte des aufgenommenen Bildes  $B(\mathbf{k})$  aus der Multiplikation der OTF  $H(\mathbf{k})$  mit  $S(\mathbf{k})$ , der Fouriertransformierten der Struktur, ergibt.

$$B(\mathbf{k}) = H(\mathbf{k}) \cdot S(\mathbf{k}) \quad (2.13)$$

Ändert sich  $|H(0, 0, k_c)|$ , verändert sich daher  $|B(0, 0, k_c)|$  im gleichen Maße. Da  $|H(0, 0, k_c)|$  im konstruktiven Fall maximal ist, muss folglich  $|B(0, 0, k_c)|$  nur durch Phasenänderung maximiert werden, um die konstruktive Interferenz einzustellen. Die Phasenbeziehung ist zur Interpretation der Daten essentiell, wodurch die OTF weiter an Bedeutung gewinnt.<sup>5</sup>

### 2.3 Lokalisierungsgenauigkeit und Auflösungsvermögen

Auch wenn in vielen Veröffentlichungen die Grenze nicht scharf gezogen wird, muss eine klare Unterscheidung zwischen der Lokalisierungsgenauigkeit und der Auflösung gemacht werden.

<sup>5</sup>In Kap. 4.4.3.2 wird die experimentelle Realisierung dieses Konzepts angesprochen.



Die Auflösung eines Mikroskops ergibt sich direkt aus den Abmessungen seiner Punktbildfunktion und ermöglicht eine Aussage über das Trennungsvermögen benachbarter Objekte. Strukturen in der Probe kann man sich aus Objekten mit einer Größe unterhalb der Auflösungsgrenze zusammengesetzt vorstellen. Somit bestimmt die Auflösung die Größe der kleinsten, gerade noch erkennbaren Strukturen. Von den verschiedenen Auflösungsdefinitionen werden am häufigsten das Rayleighsche Auflösungskriterium, dass die Auflösung als halben Durchmesser der Airy-Scheibe definiert, und das Sparrowsche Auflösungskriterium genannt. Letzteres bezeichnet zwei Punkte als gerade noch aufgelöst, wenn ihr beugungsbegrenztes Bild nicht mehr aus zwei Maxima besteht, sondern die Punkte so nahe zusammengerückt sind, dass das Minimum dazwischen gerade verschwunden ist. In der konfokalen Mikroskopie wird typischerweise die Halbwertsbreite der PSF in eine bestimmte Richtung als Auflösungsvermögen in dieser Dimension angegeben. Wie bereits in Kap. 2.1 aufgeführt, nutzt man in axialer Richtung sinnvollerweise das schärfere Kriterium der z-Antwort (s. Gl. 2.5).

Die Lokalisierungsgenauigkeit beschreibt dagegen, mit welcher Präzision man die Position eines Objektes mit *bekannter Struktur* bestimmen kann. Während dieser Wert auch von der Größe der PSF abhängt, spielt zusätzlich das Signal-zu-Rausch-Verhältnis (engl. *signal to noise ratio*, SNR) eine entscheidende Rolle. Typischerweise wird die Lokalisierung von Objekten bei sehr einfachen, bekannten Strukturen wie Punktobjekten, Kugeln oder Flächen verwendet. Die Kenntnis der beobachteten Struktur erlaubt z.B. die Bewegungsdetektion unterhalb der Auflösungsgrenze oder die Abstandsbestimmung zweier bekannter Objekte mit einer Genauigkeit unterhalb des Auflösungslimits. Die sequentielle oder chromatisch getrennte Aufnahme der beiden Objekte ist dabei extrem hilfreich, da man das auflösungsbegrenzte Trennungsvermögen umgehen kann.

Die beiden Größen Auflösungsvermögen und Lokalisierungsgenauigkeit verhalten sich wie die Standardabweichung einer Messreihe, die die Streuung einzelner Messergebnisse um den Mittelwert angibt und von der Zahl der Messungen unabhängig ist, zur Standardabweichung des Mittelwerts der Messreihe, die die Zuverlässigkeit des ermittelten Wertes ausdrückt und mit einer steigenden Zahl von Messungen immer genauer wird. Die Standardabweichung verbirgt, ob evtl. zwei oder mehr Subpopulationen mit Unterschieden zwischen ihren Mittelwerten unterhalb dieses Wertes vorhanden sind. Im zweiten Fall dagegen nutzt man die Kenntnis, dass es sich um nur eine Population handelt, um ihren Mittelwert mit einer höheren Genauigkeit zu bestimmen.

Typische Auflösungswerte eines konfokalen Mikroskops<sup>6</sup> liegen in der Praxis um die 250 nm in lateraler Richtung und bei ca. 670 nm als Halbwertsbreite der z-Antwort. Das 4Pi-konfokale Mikroskop verbessert die laterale Auflösung nicht, erzielt aber in axialer Richtung 4- bis 7-fach bessere Werte zwischen ungefähr 150 nm (Typ A mit 2-Photonen-Anregung) und ca. 90 nm (Typ C mit 1-Photonen-Anregung). Die entsprechende Lokalisierungsgenauigkeit hängt vom SNR ab. Bei Punktobjekten nimmt sie typischerweise 10- bis 100-mal kleinere Werte an als die entsprechende Auflösung [16, 17, 18, 19].

---

<sup>6</sup>Wasser-Immersionsobjektiv (NA=1,2), Detektionswellenlänge 530 nm, Durchmesser der Detektionslochblende 1 Airyscheibe (bezogen auf 530 nm), 1-Photonen-Anregungswellenlänge 488 nm, 2-Photonen-Anregungswellenlänge 840 nm

### 2.3.1 Methoden zur Lokalisierung von Punktobjekten

Nimmt man punktförmige Farbstoffverteilungen in hinreichendem Abstand voneinander auf, so erhält man einzelne, von einander getrennte Intensitätsverteilungen, die jeweils die Form der PSF besitzen. Der Ort jeder dieser PSFs bezeichnet gleichzeitig den Ort des jeweiligen Punktobjekts. Die naheliegendste Methode ist daher eine Schwerpunktsbestimmung. Problematisch dabei ist allerdings, dass bei Hintergrundrauschen die Wahl des betrachteten Bereiches einen Einfluss hat. Außerdem werden spezielle Eigenschaften der PSF wie z.B. die Modulation der 4Pi-PSF nicht berücksichtigt.

Höhere Genauigkeiten liefern daher Methoden, die die Form der PSF berücksichtigen [20, 21, 22]. Das Standardverfahren hierzu ist die Verwendung von Maximum-Likelyhood-Methoden [23, 24] unter Ausnutzung der bekannten PSF. Dabei wird als Gütekriterium  $\chi^2$  minimiert (s. Kap. 2.3.3). Einer der dabei variierten Parameter ist die Position der theoretischen PSF, die nach dem Optimierungsprozess die beste Schätzung für die Position des aufgenommenen Punktobjekts darstellt.

Ist keine dreidimensionale Lokalisierung notwendig, da bestimmte Raumrichtungen uninteressant oder bekannt sind, bietet es sich an, die Daten sowie die theoretische PSF in diesen Richtungen aufzuintegrieren und die Methode auf weniger Dimensionen anzuwenden und dadurch Rechenaufwand einzusparen.

### 2.3.2 Grundsätzlicher Einfluss der OTF

Qualitativ kann man das Lokalisierungsvermögen auf die OTF zurückführen. Ohne die Einbeziehung von statistischem Rauschen und anderen Rauschquellen soll dies in diesem Kapitel skizziert werden. Eine Herleitung unter Berücksichtigung des statistischen Rauschens, die auf eine exaktere Abschätzung der Lokalisierungsgenauigkeit führt, wird in Kap. 2.3.3 gegeben. Es wird hier wie auch in den nächsten Kapiteln nur der eindimensionale Fall betrachtet, da er in der Arbeit vorgestellten Anwendung entspricht und anschaulicher ist. Bei dreidimensionalen Aufnahmen wird z.B. über die z-Antwort (s. Gl. 2.5) der Datensatz auf eine Dimension reduziert.

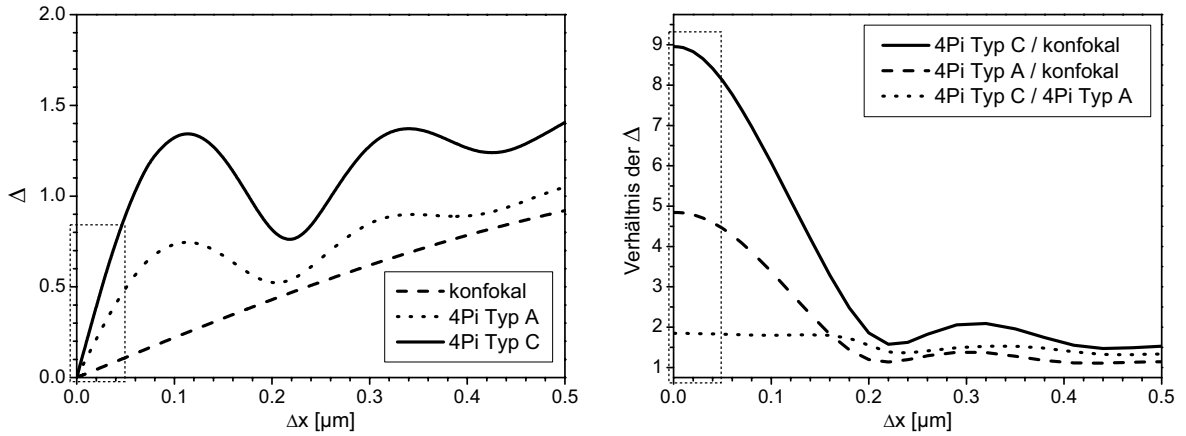
Ein Maß für die mögliche Lokalisierungsgenauigkeit bei einer vorliegenden PSF  $h(x)$  ist die quadratische Abweichung  $\Delta$  zu einer leicht verschobenen PSF  $h'(x) = h(x - \Delta x)$ :

$$\Delta = \sqrt{\int dx |h(x) - h(x - \Delta x)|^2} \quad (2.14)$$

Die verschobene PSF kann als Faltung der eigentlichen PSF mit einer verschobenen  $\delta$ -Distribution verstanden werden und lässt sich folglich als  $h'(x) = h(x) \otimes \delta(x - \Delta x)$  ausdrücken. Ihre Fouriertransformation ergibt  $FT\{h'(x)\} = H(k) e^{-ik\Delta x}$ .

Um  $\Delta$  durch die OTF  $H(k)$  ausdrücken zu können, wird die Fouriertransformation und ihre Inverse eingesetzt:

$$\Delta^2 = \int dx |FT^{-1}\{FT[h(x) \otimes (\delta(x) - \delta(x - \Delta x))]\}|^2$$



**Abbildung 2.3:** Verhalten von  $\Delta$  in Abhängigkeit von  $\Delta x$  für die drei Betriebsmodi konfokal, 4Pi Typ A und 4Pi Typ C. Die rechte Abbildung zeigt die Verhältnisse der Werte von  $\Delta$  für die verschiedenen Betriebsmodi. Die benutzten OTFs  $H(\mathbf{k})$  wurden auf  $H(0) = N$  normiert. Dies entspricht einer Normierung der PSF auf ihr Volumenintegral  $\int d^3 r h_{eff}(\mathbf{r}) = N$  und damit auf das Gesamtsignal. Dieser Fall (s. Kap. 2.3.4) wurde gewählt, um Raumfrequenzeffekte in der Steigerung der Lokalisierungsgenauigkeit von signalsteigernden Effekten zu trennen. Letztere werden in Kap. 2.3.4 behandelt.

Wie man an dem Kurvenverlauf erkennen kann, hat die in Gl. 2.16 gemachte Näherung nur für den Bereich von  $\Delta x = 0$  bis  $\Delta x \approx 0,05 \mu\text{m}$  Gültigkeit. bei größeren Werten kommt der oszillierende Charakter des Sinus in Verbindung mit dem der 4Pi-OTF zum Tragen.

Die Fouriertransformation wird ausgeführt und unter Ausnutzung der Beziehung  $|C|^2 = CC^*$  kann das Betragsquadrat ausgeschrieben werden. Desweiteren wird das Integral für die inverse Fouriertransformation eingesetzt:

$$\Delta^2 = \frac{1}{4\pi^2} \int dx \int dk e^{ikx} H(k) \left(1 - e^{-ik\Delta x}\right) \int dk' e^{-ik'x} H^*(k') \left(1 - e^{+ik'\Delta x}\right)$$

Dadurch kann die Integration der von  $x$  abhängigen Komponenten über  $x$  durchgeführt werden. Sie ergibt  $\delta(k - k')$ . Dieses Ergebnis ermöglicht die triviale Integration über  $k'$ . Es bleibt:

$$\Delta^2 = \frac{1}{4\pi^2} \int dk H(k) H^*(k) \left[2 - \left(e^{-ik\Delta x} + e^{+ik\Delta x}\right)\right]$$

Unter Ausnutzung der Eulerschen Formel kann  $\left(e^{-ik\Delta x} + e^{+ik\Delta x}\right)$  zu  $2 \cos(k\Delta x)$  vereinfacht werden. Die weitere Vereinfachung führt auf die endgültige Form

$$\Delta^2 = \frac{1}{\pi^2} \int dk |H(k)|^2 \sin^2\left(\frac{1}{2}k\Delta x\right). \quad (2.15)$$

Für kleine Abweichungen  $\Delta x$  kann aufgrund der endlichen Ausdehnung von  $H(k)$  der  $\sin^2$  problemlos entwickelt werden und es ergibt sich

$$\Delta^2 \approx \frac{\Delta x^2}{4\pi^2} \int dk |H(k)|^2 k^2. \quad (2.16)$$

Dieses Ergebnis zeigt sehr deutlich, dass die hohen Raumfrequenzen der OTF durch die zusätzliche Wichtung mit  $k$  entscheidend für die Lokalisationsgenauigkeit sind. Abb. 2.3 zeigt das Verhalten von  $\Delta$  (nicht  $\Delta^2$ !) in Abhängigkeit von der Verschiebung  $\Delta x$ . Da die OTFs auf  $H(0) = N$  normiert wurden, was einer Normierung des Gesamtsignals  $\int dx h(x) = N$  entspricht, sind die deutlich größeren Werte von  $\Delta$  im 4Pi Typ C-Fall gegenüber dem konfokalen oder dem 4Pi Typ A-Modus ein Resultat der Raumfrequenzverteilung. Insbesondere für den für die Abschätzung der Lokalisierungsgenauigkeit relevanten Fall  $\Delta x \rightarrow 0$  wird das Verhältnis  $\Delta_{x_{4PiC}}/\Delta_{x_{konf}}$  mit ca. 9 maximal.

### 2.3.3 Lokalisierung unter dem Einfluss von Rauschen

Berücksichtigt man Rauschen, so ist die Chi-Quadrat-Funktion gegeben durch

$$\chi^2 = \sum_{i=1}^n \left( \frac{h_i - h(x_i - \Delta x)}{\sigma_i} \right)^2. \quad (2.17)$$

Sie bezeichnet die Güte der Anpassung einer theoretischen Funktion  $h(x)$ , die um  $\Delta x$  gegen den Ursprung verschoben ist, an die  $n$  Messwerte  $h_i$  an den Positionen  $x_i$ .<sup>7</sup> Im Gegensatz zu dem in Gl. 2.14 eingeführten  $\Delta$  werden die Abweichungen zwischen Theorie und den einzelnen Messwerten mit der Standardabweichung  $\sigma_i$  der gemessenen Werte gewichtet. Bei einer Normalverteilung entspricht  $\sigma_i = \sqrt{h(x_i - \Delta x_0)} \approx \sqrt{h_i}$ , wobei  $\Delta x_0$  den wahren Mittelpunkt der gemessenen PSF darstellt und ohne Beschränkung der Allgemeinheit hier auf 0 gesetzt werden kann.

Die Meßwerte  $h_i$  können als die Summe aus dem korrekten theoretischen Wert an der Stelle  $x_i$  und einer rauschbedingten Abweichung  $r_i$  von diesem aufgefaßt werden:

$$h_i = h(x_i) + r_i$$

Für sehr kleine  $\Delta x$  kann die Differenz  $h(x_i) - h(x_i - \Delta x)$  näherungsweise als Produkt aus der Ableitung  $\frac{dh}{dx}(x_i)$  und  $\Delta x$  ausgedrückt werden. Damit kann  $\chi^2$  folgendermaßen formuliert werden:

$$\chi^2 = \sum_{i=1}^n \left( \frac{r_i + \Delta x \frac{dh}{dx}(x_i)}{\sigma_i} \right)^2$$

$\chi^2$  wird minimiert, um die Lösung von  $\Delta x$  zu finden, d.h.  $\frac{d\chi^2}{d\Delta x}$  wird auf 0 gesetzt. Es ergibt sich daraus folgende Gleichung:

$$\sum_{i=1}^n \frac{r_i \frac{dh}{dx}(x_i)}{\sigma_i^2} + 2\Delta x \sum_{i=1}^n \frac{\left(\frac{dh}{dx}(x_i)\right)^2}{\sigma_i^2} = 0$$

Für  $\Delta x$  folgt daraus:

---

<sup>7</sup>Der Übersichtlichkeit halber wird davon ausgegangen, dass kein Fit der Amplitude notwendig ist.

$$\Delta x = \frac{-\sum_{i=1}^n \frac{r_i \frac{dh}{dx}(x_i)}{\sigma_i^2}}{2 \sum_{i=1}^n \frac{\left(\frac{dh}{dx}(x_i)\right)^2}{\sigma_i^2}} \quad (2.18)$$

Für die Genauigkeit der Lokalisierung  $\Delta x$  ist der Fehler  $\sigma_{\Delta x}$  von  $\Delta x$  entscheidend. Er ergibt sich aus den Fehlern der einzelnen Meßwerte:

$$\sigma_{\Delta x}^2 = \sum_{j=1}^n \left( \frac{\partial \Delta x}{\partial r_j} \sigma_{r_j} \right)^2$$

Damit kann  $\sigma_{\Delta x}^2$  ausgerechnet werden:

$$\sigma_{\Delta x}^2 = \frac{\sum_{j=1}^n \frac{\left(\frac{dh}{dx}(x_j)\right)^2}{\sigma_j^2} \sigma_{r_j}^2}{\left(2 \sum_{i=1}^n \frac{\left(\frac{dh}{dx}(x_i)\right)^2}{\sigma_i^2}\right)^2}$$

Da  $\sigma_{r_j} = \sigma_j$  gilt, vereinfacht sich die Gleichung zu

$$\sigma_{\Delta x}^2 = \frac{1}{4 \sum_{i=1}^n \frac{\left(\frac{dh}{dx}(x_i)\right)^2}{\sigma_i^2}}. \quad (2.19)$$

Dies ist die allgemeine Formulierung der Lokalisierungsgenauigkeit unter Vorhandensein von Rauschen.

### 2.3.3.1 Ohne Hintergrundrauschen

Bei Vernachlässigung des Hintergrundrauschens und unter der Annahme einer Gauß- oder Poissonstatistik gilt  $\sigma_i^2 = h(x_i)$ . Somit kann man schreiben:

$$\sigma_{\Delta x}^2 = \frac{1}{4 \sum_{i=1}^n \frac{\left(\frac{dh}{dx}(x_i)\right)^2}{h(x_i)}} \quad (2.20)$$

Damit ist  $\sigma_{\Delta x}$  nur abhängig von dem Quadrat der Ableitung der PSF geteilt durch ihren Wert.

Zum Vergleich der  $\sigma_{\Delta x}$  soll hier die Näherung von  $h(x)$  als gaußsche Glockenkurve gemacht werden:

$$h(x) \approx A e^{-\frac{x^2}{2b^2}}$$

$b$  ist dabei ein Maß für die Auflösung. Entsprechend gilt für ein Wasser-Immersionsobjektiv mit einer  $NA$  von 1,2 (Anregungswellenlänge 488 nm, Detektionswellenlänge 520 nm, Detektionsblendendurchmesser 1 Airyscheibe)<sup>8</sup>  $b_{APIC} \approx b_{konf}/6.8$ .

<sup>8</sup>Die Werte wurden numerisch ermittelt.

Die 4Pi-PSF kann man sich aus mehreren solcher Gaußkurven zusammengesetzt vorstellen. Der Einfachheit halber sollen sich diese Kurven nicht überlappen. Dadurch kann jede Kurve in der Summation in Gl. 2.20 einzeln betrachtet werden. Da die Verschiebung der einzelnen Kurven bei der Summation über den ganzen Bereich keine Rolle spielt, können folglich für die Berechnung von  $\sigma_{\Delta x}$  die Kurven als eine gemeinsame gaußsche Glockenkurve mit der Breite  $b$  und der Amplitude  $\sum_n A_n$  betrachtet werden.

Bei einer großen Zahl gleichmäßig verteilter Meßwerte, kann man die Summe näherungsweise als Integral ausdrücken. Die im letzten Kapitel eingeführte Normierung  $\int dx h(x) = N$  über das Gesamtsignal soll auch hier gelten. Somit folgt aus der bekannten unbestimmten Integration über eine Gaußsche Glockenkurve  $A = N / (\sqrt{2\pi}b)$ .

Setzt man diesen Ansatz in Gl. 2.20 ein, so ergibt sich

$$\sigma_{\Delta x}^2 = \frac{1}{4 \int_{-\infty}^{\infty} dx A \frac{x^2}{b^4} e^{-\frac{x^2}{2b^2}}}. \quad (2.21)$$

Dieses Integral kann analytisch gelöst werden. Mit  $\int_{-\infty}^{\infty} dx x^2 e^{-a^2 x^2} = \sqrt{\pi}/2a^3$  ergibt sich für  $\sigma_{\Delta x}$  die einfache Lösung:

$$\sigma_{\Delta x} = \frac{b}{2\sqrt{N}}. \quad (2.22)$$

Wichtige Schlußfolgerung ist, dass die Lokalisierungsgenauigkeit ausgedrückt durch  $\sigma_{\Delta x}$  unter der Bedingung statistischen Rauschens (ohne Hintergrundsignal) mit der Auflösung skaliert. Die Lokalisierungsgenauigkeit ist also bei gleichem Gesamtsignal im 4Pi-konfokalen Typ C Fall einen Faktor 6,8 besser als im konfokalen Mikroskop. Diesen Wert erhält man auch bei der numerischen Analyse der eigentlichen PSFs anstelle der Gaußkurven-Approximation.

### 2.3.3.2 Mit Hintergrundrauschen.

Hintergrundrauschen addiert sich quadratisch zu dem statistischen Rauschen des Signals.

$$\sigma_i^2 = h(x_i) + \sigma_H^2$$

Damit ergibt sich folgende Relation für die Lokalisierungsgenauigkeit aus Gl. 2.19:

$$\sigma_{\Delta x}^2 = \frac{1}{4 \sum_{i=1}^n \frac{\left(\frac{dh}{dx}(x_i)\right)^2}{h(x_i) + \sigma_H^2}}$$

Führt man die vom Gesamtsignal unabhängige Funktion  $\tilde{h}(x) = h(x)/N$  ein, so ergibt sich:

$$\sigma_{\Delta x}^2 = \frac{1}{4N \sum_{i=1}^n \frac{\left(\frac{d\tilde{h}}{dx}(x_i)\right)^2}{\tilde{h}(x_i) + \sigma_H^2/N}}$$

Wie zu erwarten, verliert das Hintergrundrauschen bei starkem Signal  $N$  an Bedeutung, im Normalfall verschlechtert es aber die Lokalisierungsgenauigkeit.

	lin. Abh.	quadr. Abh.	extrem nicht-lin. Abh.
$\lim_{V \rightarrow \infty} \frac{\int_V d^3 r h_{Anrg}^{(4Pi)}(\mathbf{r})}{\int_V d^3 r h_{Anrg}^{(konf)}(\mathbf{r})}$	1	0,85	0,5

**Tabelle 2.1:** Normierungen der 4Pi-Anregungs-PSFs relativ zur konfokalen Anregungs-PSF in Abhängigkeit von unterschiedlichem Bleichverhalten.

### 2.3.4 Einfluss des Gesamtsignals

Anhand Gl. 2.19 oder noch deutlicher an Gl. 2.22 sieht man die Abhängigkeit der Lokalisationsgenauigkeit  $\sigma_{\Delta x}$  von der Höhe des Gesamtsignals  $N$ . In Gl. 2.22 ist  $\sigma_{\Delta x} \propto N^{-1/2}$ . In der Gegenwart von Hintergrundrauschen ist für kleine Gesamtsignalwerte diese Relation nicht so klar erfüllt, aber auch dort verbessert sich die Genauigkeit der Lokalisation mit wachsendem Signal.

Die bisher gemachte Normierung des Gesamtsignals  $\int d^3 r h_{Anrg}(\mathbf{r}) h_{Det}(\mathbf{r})$  auf den gleichen Wert für alle betrachteten Mikroskoptypen ermöglicht keinen gerechten Vergleich. Stattdessen muss betrachtet werden, welches maximale Gesamtsignal die verschiedenen Mikroskoptypen im Vergleich erlauben. Limitierend sind hierbei Bleichprozesse der Fluoreszenzfarbstoffe, die die Zahl der Anregungen pro Molekül begrenzen. Bei der Analyse sind die durch  $h_{Anrg}$  und  $h_{Det}$  repräsentierte Anregungsintensität und Detektionseffizienz getrennt zu betrachten.

Bei der Anregungsintensität spielt das Bleichverhalten der benutzten Fluoreszenzfarbstoffe eine Rolle. Die Anregungsleistung muss daher so angepasst werden, dass alle Mikroskopie-Betriebsmodi das gleiche Bleichen verursachen. Dabei spielt die noch nicht ausreichend verstandene Natur des Bleichprozesses eine Rolle. Von Belang ist die Abhängigkeit der Bleichwahrscheinlichkeit von der lokalen Laserlichtintensität. Denkbar sind eine lineare Abhängigkeit oder eine nicht-lineare Abhängigkeit wie 2- oder 3-Photonen-Prozesse. In der Praxis unterscheidet sich das Bleichverhalten unterschiedlicher Farbstoffe und kann sich außerdem aus mehreren konkurrierenden Prozessen zusammensetzen. In den hier vorgenommenen Untersuchungen werden daher drei Szenarien betrachtet:

- Die lineare Abhängigkeit macht eine Normierung der Anregungs-PSF auf ihr Volumenintegral  $\int_V d^3 r h_{Anrg}(\mathbf{r})$  nötig,
- eine quadratische Abhängigkeit erfordert eine Normierung auf  $\int_V d^3 r h_{Anrg}^2(\mathbf{r})$  und
- einer extrem nicht-linearen Abhängigkeit kann durch die Normierung auf  $\max(h_{Anrg}(\mathbf{r}))$  Rechnung getragen werden.

$V$  stellt dabei das Aufnahmevolumen dar. Da die unbestimmten Integrale über  $h_{Anrg}(\mathbf{r})$  und über  $h_{Det}(\mathbf{r})$  nicht definiert sind, kann beim volumenunabhängigen Vergleich nur das Verhältnis der bestimmten Integrale über  $V$  im Limes gegen  $\infty$  betrachtet werden. Das Integral über das Produkt von  $h_{Anrg}(\mathbf{r})$  und  $h_{Det}(\mathbf{r})$  konvergiert dagegen für  $V \rightarrow \infty$ .

Tab. 2.1 zeigt, wie bei gleicher Bleicheffizienz das 4Pi-Anregungssignal gegenüber dem konfokalen Anregungssignal mit zunehmender Nichlinearität des Bleichprozesses bis auf maximal die Hälfte abnimmt. Der Grund dafür sind die Spitzen der 4Pi-PSF, die im nicht-linearen Bleichprozess stärker zu Buche schlagen als dies im linearen Anregungsprozess der Fall ist.

	lin. Abh.	quadr. Abh.	extrem nicht-lin. Abh.
4Pi Typ A	1	0,85	0,5
4Pi Typ C	1,35	1,15	0,68

**Tabelle 2.2:** Normierung des effektiven 4Pi-Signals relativ zum Signal eines konfokalen Mikroskops in Abhängigkeit von unterschiedlichem Bleichverhalten. Die angegebenen Werte stellen das Verhältnis der Integrale  $N = \int d^3r h_{Anrg}(\mathbf{r}) h_{Det}(\mathbf{r})$  des jeweiligen 4Pi-Modus zum konfokalen Referenzfall  $N_{konf}$  dar.

In der Detektion kann die unterschiedliche Raumwinkelabdeckung durch die Objektive ausgenutzt werden. Das 4Pi-konfokale Mikroskop detektiert durch seine beiden Objektive über den doppelten Raumwinkel. Im 4Pi Typ A-Fall verliert man allerdings die Hälfte des Signals bei der derzeitigen Realisierung wieder bei der Strahlzusammenführung über den Strahlteilerwürfel. Eine effektivere Realisierung ist zwar denkbar, soll hier aber nicht weiter ausgeführt werden. Im Typ C-Fall muss die Strahlzusammenführung aufgrund der Interferenz genauer betrachtet werden:

Bei nur einem Strahl wird die Hälfte der Leistung vom Strahlteilerwürfel transmittiert, die andere Hälfte reflektiert.<sup>9</sup> Für die elektromagnetischen Felder bedeutet dies, dass sie mit jeweils dem  $\frac{1}{2}\sqrt{2}$ -fachen Teil ihrer einfallenden Amplitude den Strahlteiler an zwei Seiten wieder verlassen. Die Felder der beiden von den Objektiven stammenden Strahlen treffen im Strahlteilerwürfel zusammen und interferieren im Typ C-Fall in den beiden emittierten Strahlen. Bei konstruktiver Interferenz addieren sich die beiden Amplituden zu dem  $2 \cdot \frac{1}{2}\sqrt{2} = \sqrt{2}$ -fachen der aus jedem Objektiv kommenden Amplituden.<sup>10</sup> Die Intensität im Zentrum der Detektions-PSF im konstruktiven 4Pi-Typ C beträgt also das  $\sqrt{2}^2$ -fache und damit das Doppelte der Intensität im Fokus der Detektions-PSF eines gewöhnlichen Konfokalmikroskops:

$$h_{Det}^{(4PiC)}(0) = 2 \cdot h_{Det}^{(konf)}(0)$$

Dieser Gewinn an Signal im Zentrum gleicht sich allerdings mit dem in den Minima der 4Pi-PSF fehlenden Signal aus. Dadurch kommt es zur gleichen Detektionseffizienz wie in der konfokalen Detektion. Entscheidend ist aber das effektiv detektierte Signal  $\int_V d^3r h_{Anrg}(\mathbf{r}) h_{Det}(\mathbf{r})$ . Durch die gute Überlappung von  $h_{Anrg}$  und  $h_{Det}$  ist in den Detektionsmaxima auch der Hauptanteil der Anregung enthalten und die gegenüber einer konfokalen Detektions-PSF niedrigeren Minima fallen für die Effizienz nicht so stark ins Gewicht. Tab. 2.2 zeigt analog zu Tab. 2.1 die Werte für die effektiven PSFs. Es wird deutlich, dass der Typ C-Modus gegenüber dem Typ A-Modus einen Signalvorteil von 35% hat.

Die in Tab. 2.2 aufgeführten Werte fassen die relativen Gesamtsignale  $N$  der 4Pi-Typen gegenüber einer konfokalen Aufnahme zusammen. Diese Werte modifizieren die in Kapitel 2.3.3 errechnete Lokalisierungsgenauigkeit und verändern damit  $\sigma_{4PiC}$  je nach Bleichverhalten um einen weiteren Faktor  $1/\sqrt{0,68} \approx 1,21$  bis  $1/\sqrt{1,35} \approx 0,86$  gegenüber  $\sigma_{konf}$ .

<sup>9</sup>Absorptionsverluste sollen hier vernachlässigt werden.

<sup>10</sup>Die Phasenbeziehung für die Interferenz unterscheidet sich bei den beiden an den Austrittseiten emittierten Strahlen dabei um  $180^\circ$ .



## Kapitel 3

# Optische Instrumentation

Im Rahmen dieser Arbeit wurde ein 4Pi-konfokales Modul entwickelt, das an ein kommerziell verfügbares Laserrastermikroskop der Firma Leica Microsystems Heidelberg GmbH angeschlossen ist. Als mechanische und optische Schnittstelle wurde die Fläche des mechanischen Anschlags des Objektivrevolvers eines aufrechten Stativs gewählt. Der Objektivrevolver ist von dem Mikroskopstativ leicht abnehmbar und die Schnittstelle liegt sehr nah an der Eintrittspupille des Objektivs, wodurch dort ein relativ klar definierter Strahl vorliegt.

### 3.1 Das konfokale Laserrastermikroskop

Das als Basis dienende Gerät ist ein TCS SP2-Mikroskop<sup>1</sup> an einem Leica DM-R Stativ. Dieses strahlrasternde Lasermikroskop besitzt verschiedene Eigenschaften, die für die 4Pi-konfokale Mikroskopie von großem Nutzen sind:

- Die Rastergeschwindigkeit kann höher als in einem probenrasternden Gerät gewählt werden (bis zu 2000 Zeilen/sec).
- Die Rastergeschwindigkeit, die Zahl der zu rasternden Pixel und der Rasterbereich ist problemlos einstellbar.
- Es kann zwischen verschiedenen Orientierungen der Rasterebenen gewählt werden. In der 4Pi-Anwendung stellt es sich als vorteilhaft heraus, nacheinander xz-Schnitte (parallel zur optischen Achse) bei verschiedenen y-Stellungen aufzunehmen, anstatt den üblichen Rastervorgang (xy-Schnitte mit verschiedenen z-Positionen) zu wählen.
- Das Gerät verfügt über bis zu 4 interne Detektoren (Photomultiplier Tubes) zur gleichzeitigen Aufnahme spektral getrennter Signale.

---

<sup>1</sup>Im Rahmen der Arbeit wurde aus Gründen der Verfügbarkeit auch mit den älteren Modellen TCS SP und TCS NT gearbeitet. Die Schnittstelle ist jeweils die gleiche. Bis auf den Unterschied, dass im TCS NT noch kein Spektrometer-Detektor integriert ist, spielen die Unterschiede für die 4Pi-konfokale Mikroskopie keine entscheidende Rolle.

- Die spektralen Detektionsfenster der Kanäle sind über verschiebbare Spiegel stufenlos einstellbar und relativ scharfkantig (ca. 5 nm-Kante). Dadurch kann der Detektionsbereich flexibel auf die vorliegenden Farbstoffe angepasst werden – eine Eigenschaft, die sich in der Praxis als sehr hilfreich herausstellt.
- Als Lichtquellen dienen verschiedene Linien eines oder mehrerer fasergekoppelter Laser. Die Leistung der einzelnen Linien kann über einen akustooptischen Modulator in allen beliebigen Kombinationen stufenlos eingestellt werden.
- Der Lochblenden-Durchmesser in der Detektion ist stufenlos zwischen der Bruchteil eines Airy-Scheibendurchmessers und seinem Vielfachen einstellbar.
- Das Gerät ist im Vergleich zu den meisten Laboraufbauten stabiler und muss nur selten nachjustiert werden.
- Durch das zugrunde liegende Mikroskopstativ stehen eine ausgereifte Epifluoreszenz-Beleuchtung mit wechselbaren Filtern und ein Okularstrahlengang mit großem Bildfeld zur Verfügung.

## 3.2 Das 4Pi-konfokale Modul

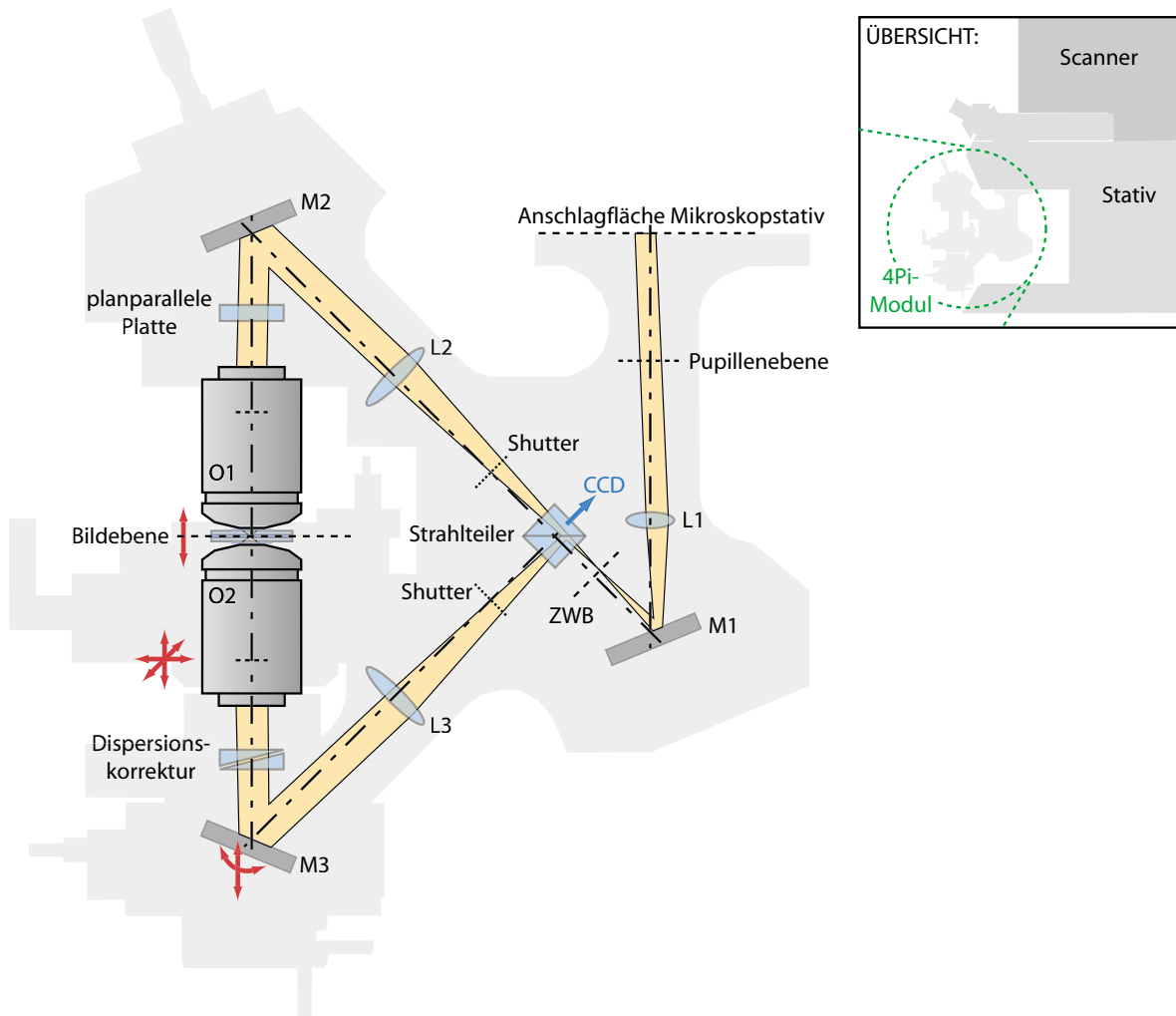
### 3.2.1 Konzept

Das 4Pi-konfokale Modul wird anstelle des Objektivrevolvers an ein TCS-Gerät angeschlossen (s. Abb. 3.1). Die im 4Pi-Modus benötigte Strahlaufteilung erfordert eine Verlängerung des Strahlengangs. Diese wird durch ein zusätzliches, die Eintrittspupille verlagerndes Teleskop erreicht.

Es wurde größter Wert auf Stabilität gegenüber mechanischer Drift und thermischen Schwankungen gelegt. Das Modul wurde daher so klein gebaut, wie es die optische Strahlführung gerade noch erlaubt. Durch einen möglichst symmetrischen Aufbau der beiden Strahlenarme werden thermische Einflüsse auf die Justage minimiert. Die verwendeten Piezo-Elemente zur Feinjustage wurden so ausgewählt, dass eine mechanische Grobverstellung, die in der Praxis oft zu lange nachwirkender, mechanischer Drift führt, im täglichen Betrieb unnötig ist. Es wurde darauf geachtet, dass keine starken Wärmequellen an das Modul angebracht wurden, um eine mit der Erwärmung verbundene Drift zu vermeiden.

Das Modul ist Typ C-tauglich wobei zugunsten eines kompakten und stabilen Aufbaus auf eine Realisierung mit getrennten Beleuchtungs- und Detektionsarmen verzichtet wurde. Diese würde zwar eine flexiblere Justage erlauben, erfordert aber deutlich mehr Platz und eine zu Instabilität neigende, deutlich kompliziertere Strahlführung. Durch die vorliegende Bauart konnte die Größe minimiert werden. Limitierend für die Baugröße sind einzig die Länge (und der Durchmesser) der verfügbaren Objektive.

Da das System strahl- und nicht probenrasternd arbeitet, musste bei der Konzeption besondere Aufmerksamkeit auf die Bildfeld- und die chromatischen Eigenschaften (insbesondere im Hinblick auf die Typ C-Realisierung) gelegt werden. Beide Bereiche stellen Neuland in der 4Pi-konfokalen Mikroskopie dar. Unter diesem Gesichtspunkt werden die folgenden Erläuterungen besonders auf diese Aspekte abheben. Grundsätzliches zur 4Pi-Justage kann z.B. in [25] nachgelesen werden.

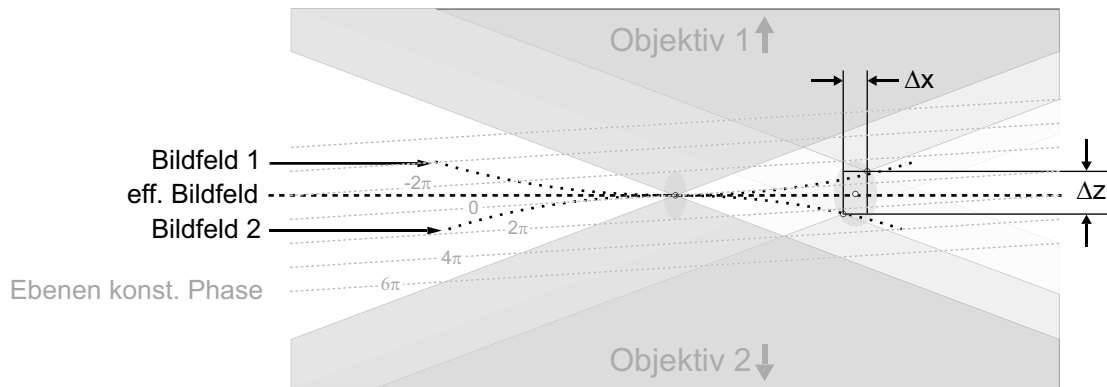


**Abbildung 3.1:** Das 4Pi-konfokale Modul. Der kollimierte Laserstrahl tritt über die Schnittstelle zum Mikroskopstativ in das Modul ein. Die pupillenverlagernde Optik mit reellem Zwischenbild (ZWB) bestehend aus L1 und L2 (bzw. L1 und L3) projiziert die ursprüngliche Pupillenebene des Objektivs in die neue Lage in den Objektiven O1 und O2. Die beiden Arme des 4Pi-Strahlengangs können getrennt über Shutter geblockt werden. Die Strahlauftteilung in der Anregung und Strahlvereinigung in der Detektion erfolgen über den selben Strahlteilerwürfel. Über die vierte Seite des Strahlteilerwürfels werden die Eintrittspupillen von O1 und O2 auf eine Justage-CCD-Kamera abgebildet (nicht eingezeichnet). Der eingezeichnete Strahl entspricht in etwa dem Laser-/Detektionstrahl bei maximalem Rasterwinkel. Die roten Pfeile repräsentieren die piezoelektrischen Verstellmöglichkeiten von M3, O2 und dem Probenstisch während des Betriebs des Mikroskops. Die Übersichtsskizze zeigt die Anbindung des 4Pi-Moduls an das konfokale System sowie die relativen Größenverhältnisse.

### 3.2.2 Kritische Bildfeldparameter

Die Nutzung des gesamten korrigierten Bildfeldes der Objektive ist auch im 4Pi-konfokalen Modus wünschenswert. Moderne Objektive und die dazugehörige Optik sind so ausgefeilt, dass über einen ausreichend großen Bereich<sup>2</sup> die Qualität der Wellenfronten keine Limitierung

<sup>2</sup>Bei einem modernen 100x Objektiv mit maximal realisierbarer numerischer Apertur sind das typischerweise mehr als 100  $\mu\text{m}$  mal 100  $\mu\text{m}$ .



**Abbildung 3.2:** Kritische Bildfeld-Parameter im 4Pi-konfokalen Mikroskop. Das Mikroskop ist in der Abbildung so justiert, dass für den Rasterwinkel  $0^\circ$  die Fokusse der beiden Objektive genau übereinander liegen. Aufgrund der Krümmungen der Objektivbildfelder entfernen sich die Fokusschwerpunkte mit zunehmendem Rasterwinkel um die Strecke  $\Delta z$  voneinander. Unterschiede in der Vergrößerung der beiden Strahlarme bewirken zusätzlich ein laterales Auseinanderlaufen der Fokusse um die Strecke  $\Delta x$ . Bei schlechter Justage des Mikroskops liegen außerdem die Ebenen konstanter Phasendifferenz nicht parallel zur effektiven Bildfeldebene, so dass sich die Phasendifferenz während des Rastervorgangs ändert. (Im gezeigten Fall herrscht konstruktive Interferenz im Zentrum und destruktive Interferenz für den eingezeichneten Rasterwinkel.)

darstellt. Es muss aber im Hinblick auf die synchrone Nutzung zweier Fokusse darauf geachtet werden, dass ihre relative Lage zueinander über das genutzte Bildfeld konstant bleibt.

### 3.2.2.1 Vergrößerung und Ebenheit des Bildfeldes

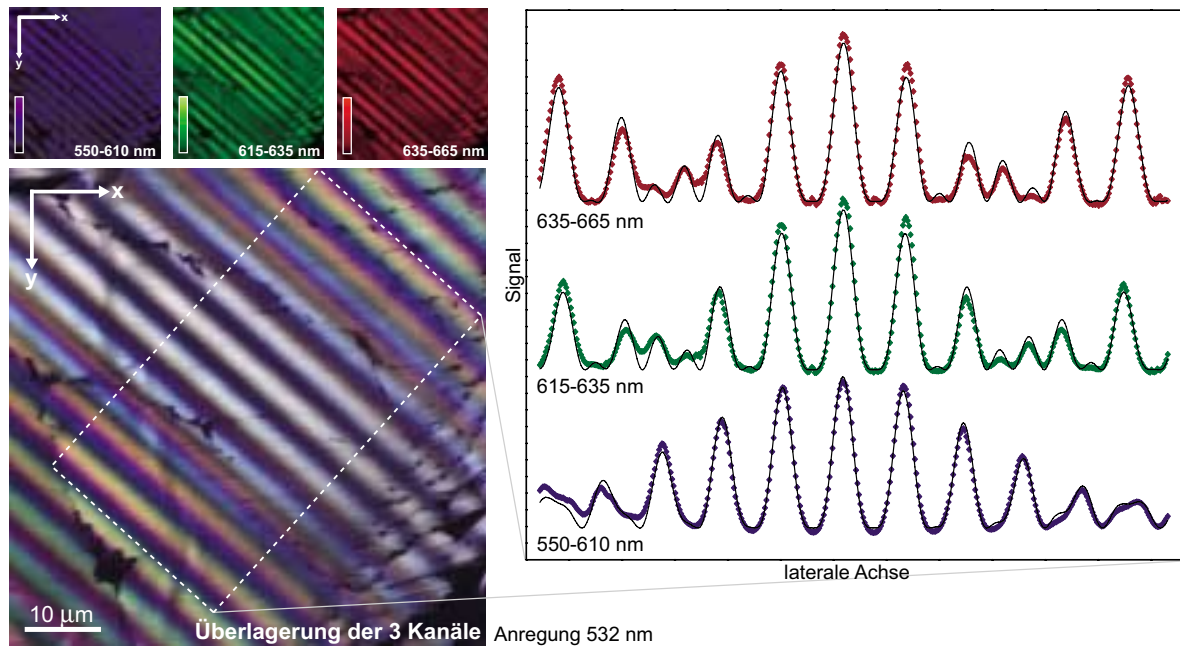
Die Fokusse der beiden Objektive müssen bei jedem genutzten Rasterwinkel hinreichend genau übereinander liegen. Abweichungen von lateral 50 nm und axial 100 nm sind in typischen Anwendungen noch tolerierbar. Um diese Werte jedoch erreichen zu können, muss bei der Auswahl der Objektive für ein strahlrasterndes 4Pi-konfokales Mikroskop auf folgende Eigenschaften geachtet werden (s. auch Abb. 3.2):

- Beide Objektive sollten jeweils mit der Tubuslinse bis auf eine Genauigkeit von ca. 0,1% die gleiche Vergrößerung besitzen und daher paarweise ausgesucht werden. Ansonsten kommt es mit größer werdenden Rasterwinkeln zu einer immer stärker werdenden, lateralen Abweichung der Fokusse.
- Die Bildfeldebene der Objektive sollte möglichst gut sein, so dass die Fokusse für große Auslenkwinkel des rasternden Strahls nicht axial auseinanderlaufen.

Werden die Fokusse auseinander bewegt, so wird zunächst die gemeinsame 4Pi-PSF breiter und die Nebenmaxima höher, bevor die Qualität des Interferenzmusters der 4Pi-konfokalen PSF merklich abnimmt.

### 3.2.2.2 Konstanz der Phasendifferenz im Bildfeld

Neben der Lage der Schwerpunkte der Fokusse müssen sich auch die Phasen der elektromagnetischen Wellen von beiden Seiten entsprechen. Um eine ortsinvariante PSF zu erhalten,



**Abbildung 3.3:** *xy-Aufnahme eines fluoreszierenden Langmuir-Blodgett-Films bei dejustierten Phasenebenen.* Die Ebenen konstanter Phase liegen nicht parallel zur Bildfeldebene, die durch die dünne, annähernd homogene, fluoreszierende Polydiacetylen-Schicht repräsentiert ist. Dadurch kommt es zu einer  $\cos^2$ -artigen Modulation der Intensität.

Da die Aufnahme im Typ C-Modus gemacht wurde, spielen an jedem Rasterpunkt die Phasendifferenzen von Anregung und Detektion eine Rolle. Die Ebenen konstanter Phase sind zwar nicht gegeneinander verkippt, doch aufgrund des Stokes-Shifts unterscheiden sie sich prinzipiell für Phasendifferenzen  $\neq 0$  und es kommt zu einer Modulation der ansonsten gleichmäßigen  $\cos^2$ -Welle.

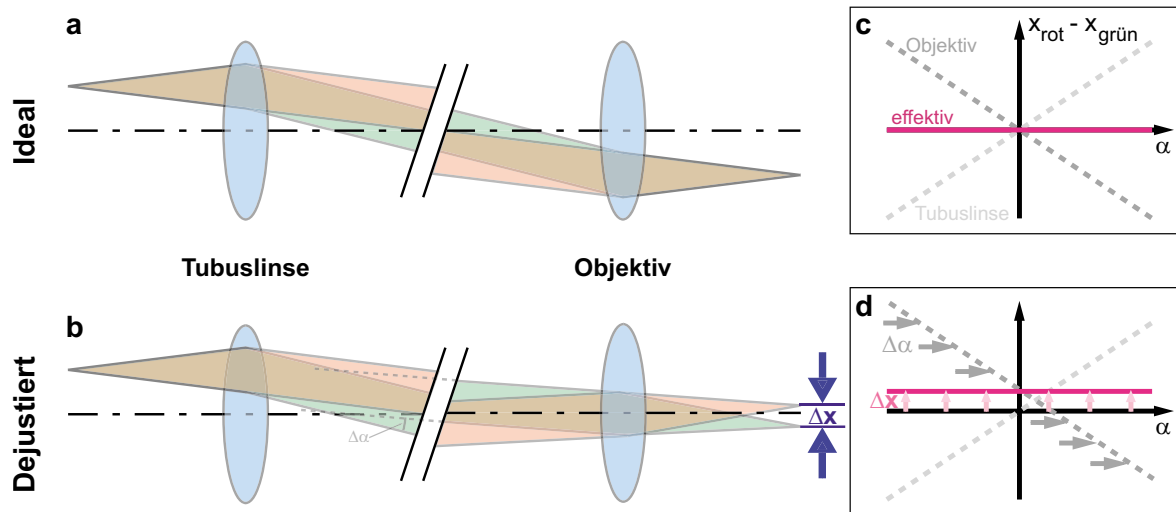
Dargestellt sind drei simultan aufgenommene Detektionskanäle im Bereich von 550 - 610 nm, 615 - 635 nm und 635 - 665 nm bei einer Anregungswellenlänge von 532 nm. Die drei gezeigten Profile wurden entlang der langen Kante des eingezeichneten Rechtecks bestimmt. Dabei wurde über den durch die kurze Kante gekennzeichneten Bereich gemittelt. Beim Vergleich der drei Kanäle ist gut zu erkennen, wie der Stokes-Shift die Modulationsfrequenz beeinflusst.

Die durchgezogenen Kurven stammen aus einem Fit des theoretischen Modells an die Daten. Berücksichtigt wurde eine endliche Kohärenzlänge in der Detektion sowie ein geringer Abfall der Intensität zum Bildrand hin. Die Abweichungen zwischen Theorie und Experiment lassen sich zum Großteil durch Inhomogenitäten in der aufgenommenen Schicht erklären.

muss für jeden genutzten Rasterwinkel die gleiche Phasendifferenz zwischen den beiden Armen herrschen, d.h. die Ebenen konstanter Phase müssen in der gemeinsamen Bildfeldebene liegen. Ansonsten bewirkt die laterale Rasterung der Probe eine gleichzeitige Veränderung des Weglängenunterschieds zwischen den beiden Interferometerarmen. Abb. 3.3 stellt ein Beispiel dar, bei dem die Ebenen konstanter Phase nicht parallel zur Bildfeldebene liegen.

### 3.2.3 Chromatische Effekte und ihre Korrektur

Der Wunsch nach einem System, das über einen breiten Spektralbereich nutzbar ist, erfordert die Berücksichtigung chromatischer Effekte. Sie spielen eine Rolle, wenn die Anregung und die spektral verschobene Detektion über nahezu den gleichen optischen Strahlengang verlaufen oder wenn mit mehreren Anregungs- und/oder Detektionskanälen gearbeitet werden soll. In



**Abbildung 3.4:** Entstehung des chromatischen Querfehlers. Bei richtiger Justage wird der Farbvergrößerungsfehler des Objektivs durch den daran angepassten Farbvergrößerungsfehler der Tubuslinse aufgehoben (a). (c) zeigt beispielhaft Farbvergrößerungsfehler von Tubuslinse und Objektiv, die jeweils zu einer Positionsdifferenz  $x_{rot} - x_{gruen}$  zwischen zwei Fokussen unterschiedlicher Farbe in Abhängigkeit vom Rasterwinkel  $\alpha$  führen. Der effektive Farbquerfehler, der sich aus der Summe der beiden Farbquerfehler von Objektiv und Tubuslinse ergibt, ist hier Null.

Wird der Strahl zwischen den beiden Linsen relativ zur optischen Achse um einen zusätzlichen Winkel  $\Delta\alpha$  verkippt, so kann der zu diesem Winkel gehörende Farbvergrößerungsfehler des Objektivs durch die Tubuslinse nicht ausgeglichen werden (b). Die Verschiebung einer der Farbquerfehlerkurven um  $\Delta\alpha$  führt zu einem effektiven Farbquerfehler  $\Delta x \neq 0$  (d). Die Orientierung dieses über das Bildfeld konstanten Farbquerfehlers zeigt in Richtung von  $\Delta\alpha$ .

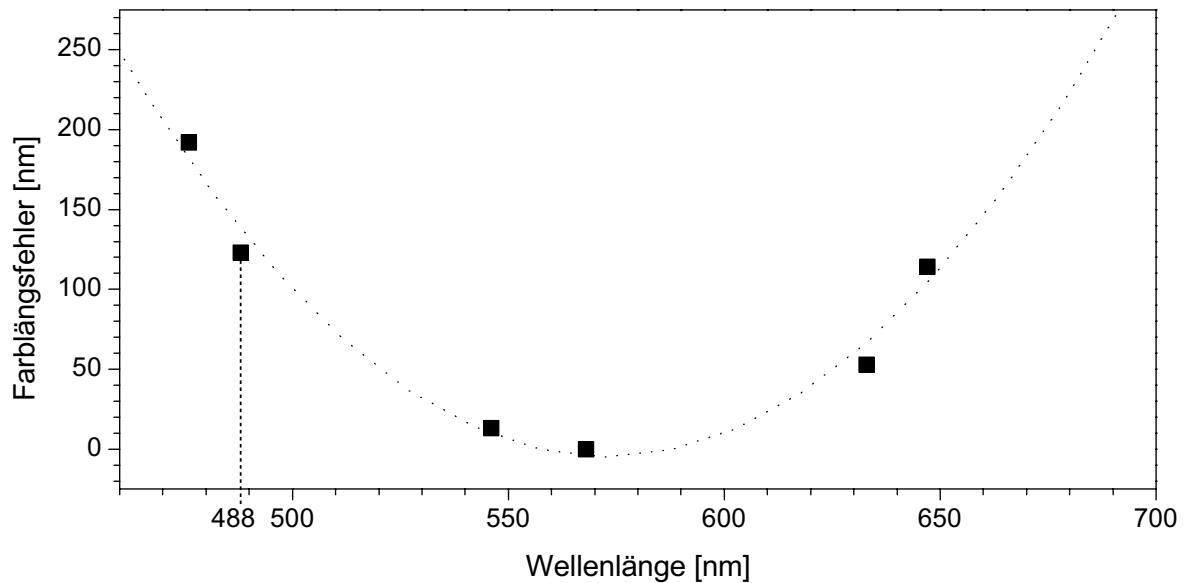
bisher realisierten 4Pi-Systemen trat diese Konfiguration nicht auf, im vorliegenden Aufbau führt allerdings kein Weg daran vorbei.

### 3.2.3.1 Chromatische Querfehler

Neben einem chromatischen Längsfehler besitzen die Objektive einen relativ großen Farbvergrößerungsfehler in der Größenordnung von 1%. Dieser Fehler wird durch die Tubuslinse mit einem entsprechend entgegengesetzten Farbvergrößerungsfehler korrigiert. Probleme treten allerdings bei einer Verkipfung zwischen Objektiv und Tubuslinse auf. Das Resultat ist ein Farbquerfehler, der nahezu homogen über das Bildfeld eine Orientierung in Richtung der Verkipfung aufweist. Dadurch, dass die Objektive beim vorliegenden Aufbau von der Tubuslinse durch 2 Spiegel getrennt sind, ist eine Verkipfung ohne Beachtung des Farbquerfehlers kaum zu vermeiden. Andererseits stellt der Farbquerfehler eine sehr empfindliche und gut messbare Größe dar, mit deren Hilfe die Verkipfung und damit auch weitere Fehler im Bildfeld vermieden werden können.

### 3.2.3.2 Chromatische Längsfehler

Die axialen chromatischen Aberrationen Objektive hoher Qualität sind im sichtbaren Spektralbereich auf wenige hundert Nanometer optimiert (s. Abb. 3.5). In der Standardanwendung



**Abbildung 3.5:** Gemessener Farblängsfehler eines Glycerin-Immersionsobjektivs hoher numerischer Apertur (Leica HCX PL APO 100x/1.35 GLYC CORR). Die Nullposition der Daten wurde willkürlich gewählt. Die gestrichelte Kurve zeigt den Fit eines Polynoms 2. Grades, um den ungefähren Verlauf zu verdeutlichen. Über größere Wellenlängenbereiche treten allerdings deutliche Abweichungen von dieser Näherung auf.

ist dies durchaus ausreichend. Nur in wenigen konfokalen Anwendungen, bei denen z.B. die Kolokalisation verschiedener Farbstoffe gemessen wird, ist eine Kalibrierung des Systems notwendig, um die chromatischen Längsfehler herausrechnen zu können. Im 4Pi-konfokalen Mikroskop muss dagegen berücksichtigt werden, dass durch diesen Effekt die Fokusse der beiden Objektive, obwohl sie bei einer bestimmten Wellenlänge exakt übereinanderliegen, einen nicht zu vernachlässigenden Abstand bei einer anderen Wellenlänge haben können. Dieser Abstand wird typischerweise um so größer, je weiter man sich spektral von der Referenzwellenlänge entfernt. Insbesondere UV- und IR-Anwendungen werden dadurch erschwert. Eine kompensierende Vor- oder Defokussierung im Anregungs- oder Detektionsstrahlengang kann hier in einem gewissen Rahmen Abhilfe schaffen.

Eine Vor- oder Defokussierung kann nur in einem Teil des Strahlengangs vorgenommen werden, in dem Beleuchtungs- und Detektionslicht getrennt sind. Dies ist in der vorliegenden Realisierung nur in relativ großer Entfernung von den Objektiven der Fall. Eine Veränderung der Kollimation bedeutet daher immer auch eine starke Änderung des Strahldurchmessers in der Ebene der Eintrittspupille des Objektivs und ist daher sehr problematisch. Großes Gewicht wurde deshalb auf das Objektiv-Design bzw. die Auswahl der Objektive für die 4Pi-Anwendung gelegt.

Neben den generellen Eigenschaften bestimmter Objektiv-Typen kommt auch der Umstand zum Tragen, dass beim "Setzen" der Objektive eine gewisse Freiheit in der Farbkorrektur liegt und sich daher die meisten Objektive in diesen Werten etwas unterscheiden. Im 4Pi-konfokalen Mikroskop führt das dazu, dass sich der gemeinsame Schwerpunkt der Fokusse der Objektive wellenlängenabhängig verschieben kann. Es ist daher bei der Auswahl der Objektive auf eine chromatische Paarung zu achten.

### 3.2.3.3 Dispersion

Die Dicken von Linsen haben einen relativ geringen Einfluss auf ihre abbildenden Eigenschaften und somit unterliegen die Linsendicken bei der Herstellung keinen stringenten Spezifikationen. Typischerweise können sich 2 “baugleiche” Linsen in der Dicke um bis zu 100  $\mu\text{m}$  unterscheiden. Das gleiche gilt folglich auch für die im 4Pi-Modul eingebauten Objektive und Linsen. Dieser in der gewöhnlichen Anwendung bedeutungslose Umstand spielt im 4Pi-konfokalen Mikroskop aufgrund seiner interferometrischen Eigenschaften eine wichtige Rolle: Ein Unterschied in der Glasdicke wird zum Abgleich der Weglängen der beiden Interferometerarme typischerweise durch Verschieben eines Spiegels und somit durch eine Veränderung des Weges in Luft ausgeglichen. Aufgrund der unterschiedlichen Dispersionseigenschaften zwischen Luft und den Gläsern funktioniert diese nur für eine Wellenlänge. Für eine multichromatische, interferometrische Anwendung ist daher neben einer Weglängenkorrektur auch eine Dispersionskorrektur nötig.

Im vorliegenden Gerät wurde ein gegeneinander verschiebbares Keilpaar aus BK7 in den einen Interferometerarm und als Gegenstück in den anderen Arm eine planparallele Platte mit der gleichen mittleren Dicke wie das Keilpaar eingebaut. Diese Realisierung mit nur einem Keilpaar trotz der vielen in den Objektiven und Linsen enthaltenen Glassorten wird dadurch möglich, dass das Dispersionsverhalten der verschiedenen Gläser, das sich in  $dn/d\lambda$  ausdrückt, in erster Näherung mit dem Brechungsindex  $n$  skaliert. Dadurch kann der zwischen den beiden Interferometerarmen vorliegende Glasdickenunterschied  $d_1$  in einer Glassorte mit Brechungsindex  $n_1$  näherungsweise durch einen Unterschied  $d_2 = n_2/n_1 \cdot d_1$  einer Glasart mit dem Brechungsindex  $n_2$  ausgeglichen werden.

Anhand von Bildern, wie der schon zur Diskussion über die Ebenen konstanter Phase gezeigten Abb. 3.3 kann auch die Dispersion untersucht werden. Bei einer genauen Betrachtung der Profile in Abb. 3.3 kann eine geringfügige Asymmetrie des roten und des blauen Profils in den Maxima beobachtet werden, die im grünen Profil nicht auftritt. Dieser wellenlängenabhängige Unterschied lässt sich auf Restfehler in der Dispersionskorrektur zurückführen, beweist aber andererseits die Funktionsfähigkeit des Korrekturkonzepts.

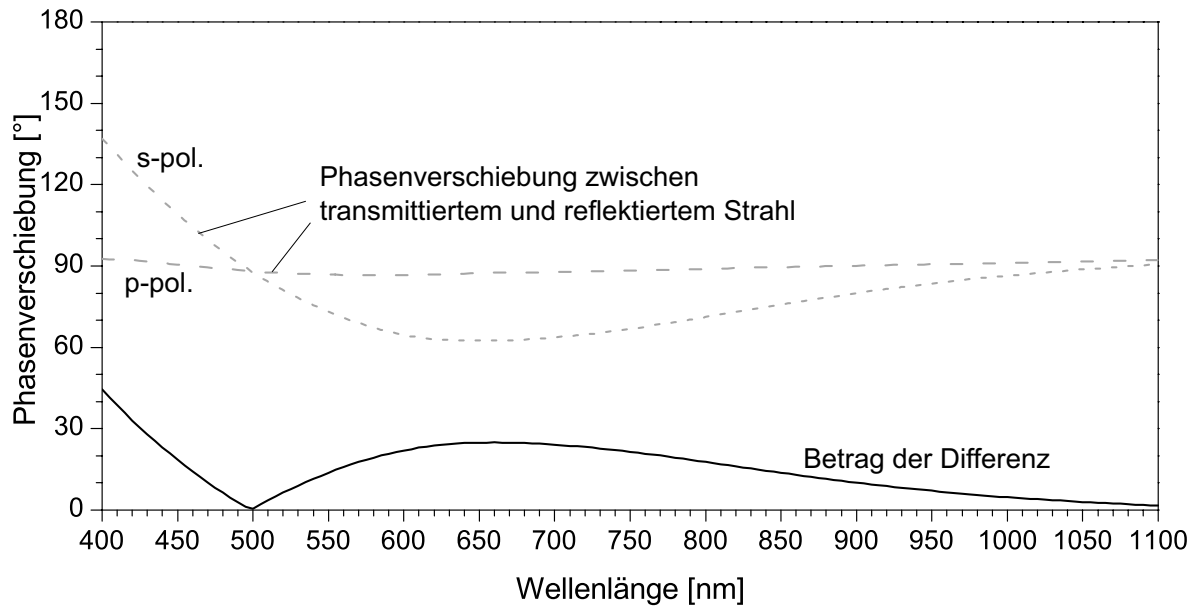
Die Dispersionskorrektur wird nicht benötigt, wenn Interferenz nur bei einer Wellenlänge stattfindet. Dies ist in der Typ A-Realisierung des 4Pi-konfokalen Mikroskops der Fall, falls nur eine Anregungswellenlänge pro Aufnahme genutzt wird. Zwischen verschiedenen Aufnahmen kann die Wellenlänge gewechselt werden, wenn die Phasendifferenz entsprechend angepasst wird.

### 3.2.3.4 Chromatische Phasenverzögerung an dielektrischen Strahlteilern

Dielektrische Strahlteiler weisen aufgrund ihres Aufbaus aus vielen Schichten verschiedener Dielektrika ein komplexes chromatisches Verhalten der Phasenverzögerung zwischen reflektiertem und transmittiertem Licht auf. Zusätzlich besteht eine Abhängigkeit der Phasenverzögerung von der Polarisation des Lichts [26].

Für die Anwendung im 4Pi-Block müssen diese Effekte insbesondere für die Interferenz des unpolarisierten, breitbandigen Fluoreszenzlichts im Typ C-Modus berücksichtigt werden. Besteht z.B. eine Phasendifferenz von  $180^\circ$  zwischen den beiden Polarisationsrichtungen, so





**Abbildung 3.6:** Theoretische Phasenverzögerung der dielektrisch-metallischen Hybridschicht des verwendeten Strahlteilerwürfels. Dargestellt ist die Phasenverzögerung des reflektierten im Vergleich zum transmittierten Strahl für die beiden Polarisationsrichtungen  $s$  und  $p$  sowie die Differenz aus den beiden Kurven.

wird das Licht der einen Polarisationsrichtung destruktiv interferieren, wenn das der anderen konstruktiv interferiert. Auf diese Weise kann keine verwertbare axiale Modulation der Detektions-PSF erzeugt werden. Daneben führen chromatische Effekte zur unterschiedlichen Interferenz zweier Detektionskanäle. Ist dieser Effekt sehr groß, kann es sogar zu merklichen Interferenzunterschieden innerhalb des Spektrums eines Detektionskanals kommen und somit kann wiederum die axiale Modulation der Detektions-PSF verwaschen werden.

Die geschilderten Effekte sind insbesondere deshalb problematisch, weil das typische Phasenverzögerungsverhalten dielektrischer Schichten nicht demjenigen von typischen optischen Gläsern entspricht und somit auch nicht durch die Dispersionskorrektur (s. Kap. 3.2.3.3) korrigiert werden kann.

Aus diesen Gründen wurde zusammen mit Leica Microsystems Wetzlar ein Strahlteilerwürfel entwickelt, der die genannten Effekte möglichst vermeidet. Zusätzliche Randbedingungen waren

- ein möglichst konstantes Teilungsverhältnis von 50:50 über den Wellenlängenbereich von ca. 400 nm bis 1100 nm zur Nutzung des Würfels sowohl in der 1-Photonen-Anregung als auch in der 2-Photonen-Anwendung,
- möglichst geringe Absorptionsverluste und
- Oberflächenqualitäten von  $\lambda/20$ .

Abb. 3.6 zeigt die errechnete Phasenverzögerung über das nutzbare Spektrum. Wichtig ist insbesondere, dass die Differenz zwischen den Polarisationsrichtungen im typischen Wellenlängenbereich oberhalb von 488 nm besser als  $30^\circ$  ist. Auch die anderen Randbedingungen

konnten erfüllt werden: Die Absorption liegt über den gesamten Bereich bei ca. 10%. Das Teilungsverhältnis weicht im sichtbaren Bereich nur um weniger als 5% von den idealen Werten ab (im schlimmsten Fall 46:43). Oberhalb von 900 nm nimmt die Absorption etwas zu und das Teilungsverhältnis wird schlechter. Aufgrund der modulationsverstärkenden Eigenschaften der 2-Photonen-Anregung hat das schlechtere Teilungsverhältnis aber praktisch keine Auswirkungen und der Strahlteilerwürfel kann ohne nennenswerte Kompromisse bis 1100 nm genutzt werden.

### 3.2.4 Mechanische Justagevorrichtungen

Am 4Pi-Modul sind mehrere Verstellmöglichkeiten vorgesehen, um die genannten Randbedingungen erfüllen zu können. Es wird dabei zwischen Justagevorrichtungen, die prinzipiell nur beim Aufbau des Systems oder einer grundlegenden Neujustage genutzt werden, und solchen, die während des Betriebs zur Feinkorrektur dienen, unterschieden. Letztere eignen sich potentiell zur Automatisierung.

Zur grundlegenden Justage können folgende Elemente genutzt werden:

- Der 1. Spiegel (M1) lässt sich zur allgemeinen Strahlzentrierung verkippen sowie in seiner Höhe verstellen.
- Der obere Spiegel (M2) ist verkippar. Ein Linearverschiebetisch, auf dem M2 angebracht ist, ermöglicht einen relativen Weglängenabgleich des oberen Armes relativ zum unteren Arm bis auf wenige Mikrometer.
- Der Strahlteilerwürfel ist zur Verstellung des Strahlengangs im unteren Strahlenarm verkippar.
- Der untere Spiegel (M3), der zusätzlich noch piezogetrieben fein eingestellt werden kann, ist über Unterlegscheiben verkippar.
- Die Linsen des Teleskops in den beiden Armen lassen sich zur Kollimation des Strahlengangs axial verschieben.
- Das obere Objektiv ist in einem lateral verstellbaren Festkörperelement eingeschraubt. Eine Verkipparung und die axiale Verstellung des oberen Objektivs O1 bis in den Feinverstellbereich des unteren Objektivs O2 hinein wird durch Unterlegscheiben ermöglicht.
- Im unteren Interferometerarm kann durch Verschieben eines Glaskeils relativ zu seinem Gegenüber der optische Glasweg verlängert oder verkürzt werden. Diese Einstellmöglichkeit wird zur Dispersionskorrektur benötigt (s. Kap. 3.2.3.3).

Zur Feinabstimmung des Systems während oder zwischen einzelnen Messungen sind drei Feinverstellmöglichkeiten integriert:

- Ein dreiachsiger Piezoverstelltisch (TRITOR 102, Piezosystem Jena GmbH, Jena), auf dem das untere Objektiv angebracht ist, dient dazu, die Objektive relativ zueinander mit einer Genauigkeit von ca. 10 nm zu positionieren. Der Tisch besitzt im geregelten Modus

einen Verstellweg von  $80 \mu\text{m}$  in alle drei Richtungen. Das System wird quasistatisch betrieben. Es müssen also keine dynamischen Randbedingungen erfüllt werden. Eine Öffnung in der Mitte erlaubt die Strahlführung durch den Tisch hindurch.

- Ein Spiegelkippsystem (S316.10, Physik Instrumente GmbH & Co., Walldbronn) aufbauend auf 3 piezoelektrischen Aktuatoren ermöglicht durch simultane Bewegung aller drei Stapel eine Veränderung der unteren Armlänge gegenüber der oberen und damit eine Einstellung der relativen Phase zwischen den beiden Strahlengängen. Die Ansteuerung einzelner Aktuatoren erlaubt die Verkippung des Spiegels. Diese wird in Verbindung mit der Objektivjustage dazu genutzt, die Ebenen konstanter Phase parallel zum Bildfeld auszurichten.

Jeder der geregelten Piezostapel hat einen Verstellweg von  $12 \mu\text{m}$ . Bei entgegengesetzter Bewegung der Aktuatoren erlaubt dies einen maximalen mechanischen Kippwinkel von  $\pm 0.6 \text{ mrad}$ . Der Betrieb erfolgt nur quasistatisch.

- Ein einachsiges Piezosystem (PX400, Piezosystem Jena GmbH, Jena) dient der Bewegung der Probe entlang der optischen Achse. Zwei Piezoaktuatoren links und rechts der Objektiv bilden mit der Probenaufgabe eine Brücke zwischen den Objektiven. Zur Regelung der beiden synchron angesteuerten Piezotische dient ein kapazitiver Sensor. Da die Proben teilweise sehr unterschiedlich präpariert sein können und auf eine grobe manuell-mechanische axiale Verstellmöglichkeit ganz verzichtet wurde, wurde auf einen relativ großen Verstellbereich Wert gelegt. Das vorhandene System erreicht im geregelten Modus  $360 \mu\text{m}$ .

### 3.3 Objektive

Drei Objektive der Firma Leica Microsystems eignen sich aufgrund ihrer hohen numerischen Apertur für die 4Pi-Mikroskopie: Das Öl-Immersionsobjektiv HCX PL APO 100x/1.4 OIL, das Wasser-Immersionsobjektiv HCX PL APO 63x/1.2 W CORR (als Ausführung für Standard-Deckgläser mit einer Dicke von  $0,17 \text{ mm}$  oder als Tauchobjektiv erhältlich) und das eigens für das 4Pi-Modul entwickelte Glycerin-Immersionsobjektiv HCX PL APO 100x/1.35 GLYC CORR. Diese Objektive weisen halbe Öffnungswinkel im Immersionsmedium von ungefähr  $64,1^\circ$  (Wasser-Immersionsobjektiv,  $NA=1,2$ ),  $67,3^\circ$  (Öl-Immersionsobjektiv,  $NA=1,4$ ) und  $68,5^\circ$  (Glycerin-Immersionsobjektiv,  $NA=1,35$ ) auf.

Objektive anderer Hersteller sind, obwohl sie in ihrer optischen Qualität den Leica-Objektiven nicht unbedingt nachstehen, im 4Pi-Modul nicht nutzbar, da die Abstimmung mit der Tubusoptik und damit verbundenen Aberrations-Korrekturen nicht vorhanden ist.

Das neu entwickelte Glycerin-Immersionsobjektiv HCX PL APO 100x/1.35 GLYC CORR [27] wurde speziell für die Anforderungen von biologischen Proben entwickelt, die in Glycerin oder in Polyvinylalkohol-basierten Medien (z.B. Mowiol) eingebettet sind. Der dadurch vermeidbare Brechungsindexunterschied zwischen Immersions- und Einbettmedium verhindert von der Eindringtiefe abhängige sphärische Aberrationen und sorgt für eine hohe Strahlqualität bei Eindringtiefen auch über wenigen Mikrometern. Die Glycerin-Immersionsobjektive wurden auf Quarzdeckgläser mit einer Dicke von  $(220 \pm 10) \mu\text{m}$  ausgelegt. Aufgrund des geringen Brechungsindexunterschiedes zwischen dem Quarz-Deckglas ( $n \approx 1,46$ ) und Glycerin

( $n_e = 1,451$  bei einer Konzentration von 80%) muss im Objektivdesign keine starke sphärische Aberrationskorrektur integriert werden, die auf Kosten anderer Korrekturen stattfindet. Zusätzlich können dadurch Aberrationen, die normalerweise durch eine Deckglasverkipfung hervorgerufen werden, (Koma und Astigmatismus) vermieden werden.

Wie das Wasser-Immersionsobjektiv besitzt auch das Glycerin-Immersionsobjektiv einen Verstellring zur Minimierung sphärischer Aberrationen. Während dieser bei Wasserimmersion hauptsächlich zur Anpassung auf die vorliegende Deckglasdicke benötigt wird, kann im Glycerin-Immersionsobjektiv damit die Optik auf den vorliegenden Brechungsindex eingestellt werden. Die Korrekturring erlaubt eine Anpassung auf den Brechungsindexbereich zwischen  $n_e \approx 1,44$  und  $\approx 1,46$ . Dies entspricht Glycerin-Konzentrationen in Wasser von ungefähr 72% bis 88%. Das als Immersionsmedium verwendete Glycerin wird dabei an den Brechungsindex des Einbettmediums angepasst. Zusätzlich erlaubt( der Korrekturring eine Anpassung der Optik an die herrschende Temperatur und die damit verbundenen Brechungsindexänderungen.

Der Arbeitsabstand von  $100 \mu\text{m}$ , die Bildfeldebenheit und die chromatischen Korrekturen (s. Abb. 3.5) liegen im Bereich anderer Objektive mit einem ähnlich großen Öffnungswinkel.

Mit diesen Eigenschaften ist das HCX PL APO 100x/1.35 GLYC CORR ideal für die 4Pi-Mikroskopie an Proben deren Brechungsindex im Bereich von 1,45 liegt.

### 3.4 Avalanche-Photodiode

In der Detektion existiert hinter der Detektionslochblende ein externer Port, an den weitere Detektoren angeschlossen werden können. Zur Erhöhung der Empfindlichkeit wurde im Rahmen dieser Arbeit eine Avalanche-Photodiode (APD) mit Photonenzählwerk, die im sichtbaren Spektrum zwischen 500 und 700 nm eine 4- bis 10-fach höhere Quanteneffizienz aufweist als die verfügbaren Photomultiplier, angeschlossen und das Signal in die Elektronik des Mikroskops eingespeist. Durch die mit Zählwerken verbundenen Totzeiten ist das Signal pro Zeiteinheit allerdings nach oben begrenzt. Zwei Umstände halten das verfügbare Signal im 4Pi-konfokalen Mikroskop jedoch gering: Zum einen nimmt man typischerweise kleine und damit tendenziell lichtschwache Strukturen auf, zum anderen muss man durch die Forderung nach niedrigen Nebenmaxima in der Anregungsintensität unterhalb der Farbstoffsättigungsgrenze bleiben<sup>3</sup>.

Die APD wurde in dieser Arbeit in ein älteres konfokales Laserrastermikroskop vom Typ Leica TCS NT mit 4Pi-Modul integriert. Der provisorische Anschluss simuliert einen analogen Photomultiplier, indem das Signal der APD elektronisch in einem variierbaren Zeitfenster integriert und als Analogsignal in die Mikroskopelektronik eingespeist wird. Diese Elektronik verursacht eine Zeitverzögerung von einigen Mikrosekunden, die sich in einer Verschiebung des APD-Bildes um ein paar Pixel entlang der schnellen Rasterachse äußert. Dieser Versatz kann leicht anhand von Kolokalisationsmessungen bestimmt und nachträglich korrigiert werden.

---

<sup>3</sup>Dies ist ein Aspekt, der in der täglichen konfokalmikroskopischen Anwendung oft vernachlässigt wird, obwohl darunter die Auflösung leidet.

## Kapitel 4

# Konzepte zur OTF-Modellierung

Die OTF des 4Pi-konfokalen Mikroskops bei 1-Photonen-Anregung besitzt ausgeprägtere Minima bei der kritischen Raumfrequenz  $k_c$ , die zwischen dem Hauptmaximum und den ersten Nebenmaxima liegt, als die OTFs der 4Pi-konfokalen 2-Photonen-Techniken. Bei der meist erforderlichen Bildrestaurierung muss insbesondere das Signal bei diesen Raumfrequenzen verstärkt werden. Bei schlechtem Signal-zu-Rausch-Verhältnis sind daher diese Bereiche des Raumfrequenzspektrums bei der Rekonstruktion besonders anfällig, störende Artefakte zu erzeugen, die die Bildinterpretation schwierig bis unmöglich machen.

Gegenstand dieses Kapitels sind Methoden, um die OTF in diesem kritischen Bereich anzuheben und dadurch die 4Pi-konfokale 1-Photonen-Mikroskopie praktikabler zu machen.

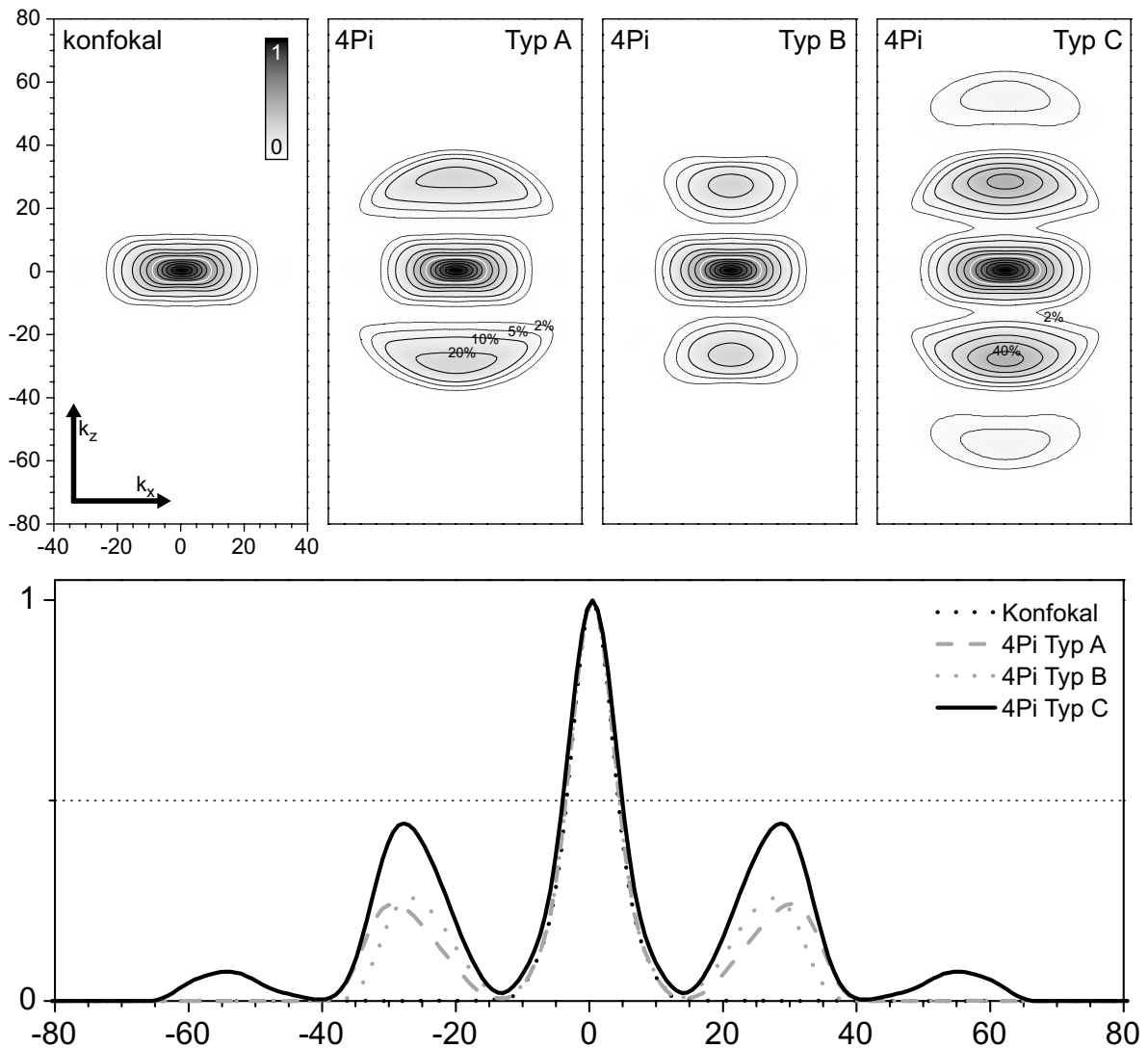
### 4.1 Verschiedene 4Pi-Betriebsmodi

Die in Kapitel 2.1 erläuterten drei Betriebsmodi des 4Pi-konfokalen Mikroskops führen zu OTFs mit unterschiedlichem Potenzial zur OTF-Modellierung. So erzeugt der Typ C-Modus deutlich höhere Raumfrequenzen als die beiden anderen Alternativen. Dies äußert sich im Ortsraum in einem schärferen Hauptmaximum der PSF (s. Abb. 2.1). Die Lücken der OTF werden durch die Verwendung eines Typ C-Aufbaus allerdings nicht prinzipiell geschlossen (s. Abb. 4.1).

Die Lage der Nebenmaxima der OTFs von Anregung und Detektion ergibt sich aus den Wellenlängen des entsprechenden Lichts. Im Typ C-Modus erlaubt die Kombination der Anregungs- und der Detektions-OTF daher, über die Wahl des Wellenlängenverhältnisses Einfluss auf die effektive OTF zu nehmen. Diesem Aspekt wird in Kapitel 4.3 nachgegangen.

### 4.2 Der Einfluss von Objektiven und Detektionslochblende auf PSF und OTF

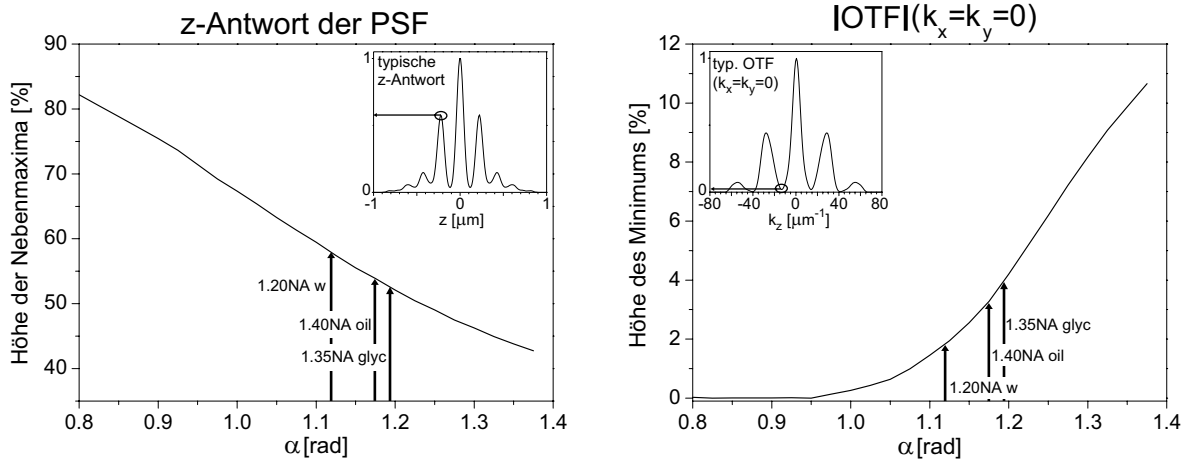
Die Ausdehnung der PSF eines konfokalen Mikroskops skaliert lateral mit dem Inversen der numerischen Apertur des Systems (also  $\frac{1}{NA}$ ) und axial mit  $\frac{1}{NA^2}$ . Daraus folgt, dass sich insbesondere in axialer Richtung die Auflösung durch Erhöhung der numerischen Apertur steigern



**Abbildung 4.1:** Berechnete OTFs der verschiedenen 4Pi-konfokalen Betriebsmodi und des konfokalen Mikroskops. Die Konturlinien wurden bei 90%, 80%, ..., 50% (weiß), ..., 10%, 5% (gestrichelt) und 2% (gepunktet) eingezeichnet. Die dargestellten Profile zeigen die Werte der MTF auf der reziproken z-Achse. Klar zu erkennen ist, dass der Typ C-Modus höhere Frequenzen überträgt, die hohen Frequenzen der Typen A und B besser überträgt und das Minimum bei der kritischen Frequenz  $k_c$  einen ca. zweifach höheren Wert aufweist. Die Skala ist in  $\mu\text{m}^{-1}$  aufgetragen.

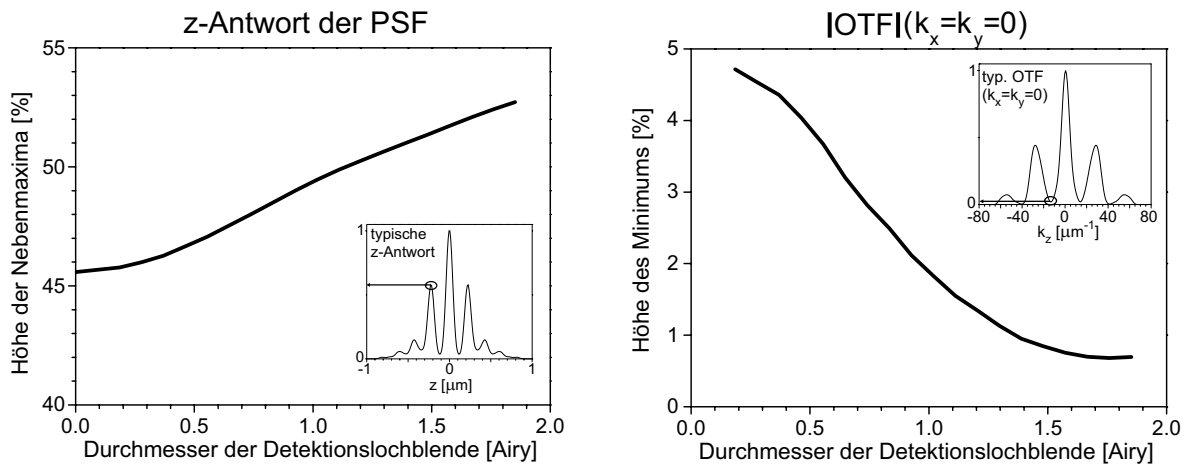
Es wurde von 1.2 NA Wasserimmersionsobjektiven bei einer Beleuchtungswellenlänge von 488 nm und der Detektion bei 530 nm ausgegangen. Die Detektionslochblende hatte den Durchmesser einer Airy-Scheibe bezogen auf 530 nm.

lässt. Im 4Pi-konfokalen Mikroskop wird die axiale Auflösung dagegen hauptsächlich durch die Interferenz der beiden einander entgegenlaufenden Wellen bestimmt und ergibt sich daher praktisch ausschließlich aus der Wellenlänge des interferierenden Lichts. Da die konfokale PSF aber die Einhüllende der 4Pi-konfokalen PSF darstellt, senkt somit eine Verringerung ihrer Halbwertsbreite die Höhe der Nebenmaxima. Dadurch wird die Übertragung hoher Raumfrequenzen insbesondere bei der kritischen Raumfrequenz  $k_c$  im 4Pi-konfokalen Mikroskop verstärkt (siehe Abb. 4.2).

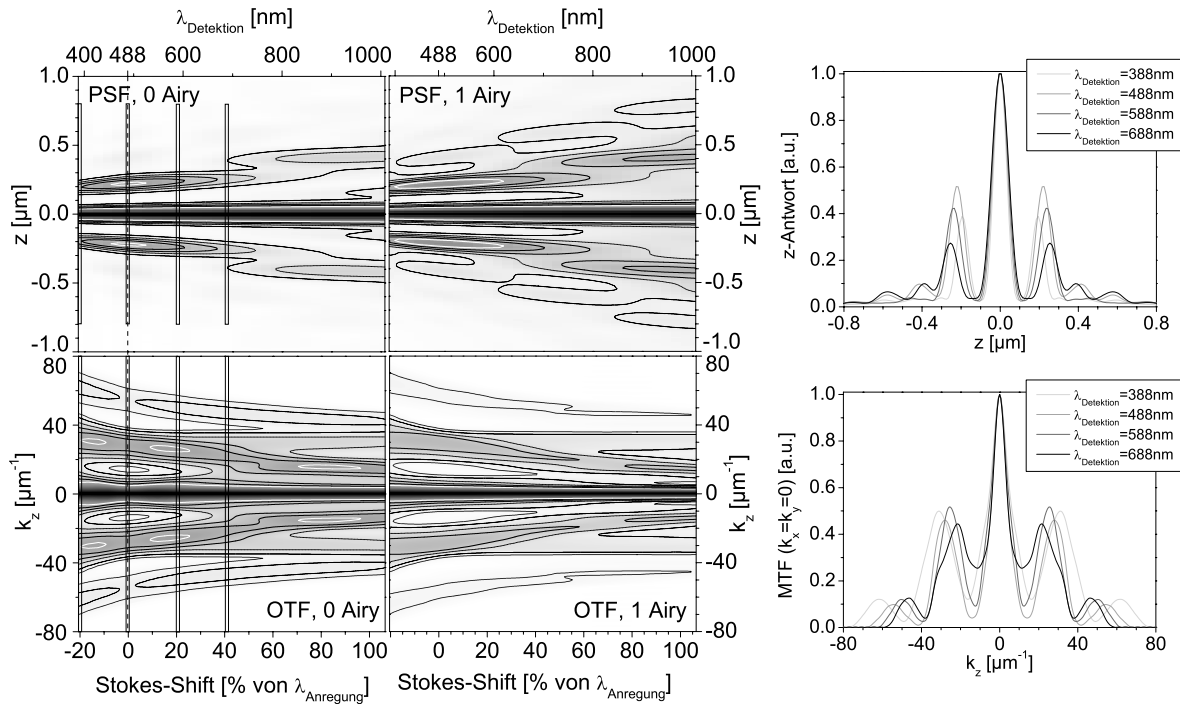


**Abbildung 4.2:** *Abhängigkeit der Nebenmaxima der 1-Photonen-4Pi-Typ C-PSF und der Minima der OTF vom Öffnungswinkel der Objektiv. Die theoretischen Werte sind gegen den halben Öffnungswinkel  $\alpha$  der Objektiv aufgetragen. Bei der Berechnung wurde von einer Anregungswellenlänge von 488 nm und einer Detektionswellenlänge von 530 nm bei einem Lochblendendurchmesser von 1 Airy-Scheibe ausgegangen. Öffnungswinkel typischer Objektiv sind ebenfalls angegeben. Die Minima der OTF nehmen bei diesem Stokes-Shift unterhalb von  $\alpha \approx 0.88$  rad den Wert 0 an.*

Ebenso wie durch die Vergrößerung des Öffnungswinkels des Objektiv lässt sich auch über die Größe der Detektions-Lochblende die Auflösung eines konfokalen Mikroskops beeinflussen [28]. Der gleiche Mechanismus führt zu einer verbesserten Übertragung hoher Raumfrequenzen um  $k_c$  (siehe Kap. 2.2.4) und zur Reduzierung der Höhe der Nebenmaxima im 4Pi-konfokalen Mikroskop (siehe auch Abb. 4.3).



**Abbildung 4.3:** *Abhängigkeit der Nebenmaxima in der PSF und der OTF von der Größe der Detektions-Lochblende im 1-Photonen-4Pi-konfokalen Mikroskop vom Typ C. Die berechneten Werte wurden gegen den Durchmesser der Detektions-Lochblende in Einheiten des Airy-Scheibendurchmessers bezogen auf die Detektionswellenlänge von 530 nm aufgetragen. Links ist die Höhe der Nebenmaxima der z-Antwort bezogen auf die Höhe des Hauptmaximums aufgetragen, rechts der relative Wert des Minimums in der MTF.*



**Abbildung 4.4:** Theoretische Typ C-OTFs und PSFs des 4Pi-konfokalen Mikroskops in Abhängigkeit vom Stokes-Shift. Die z-Antworten und die Profile entlang der  $k_z$ -Achse der OTF sind gegen die Detektionswellenlänge aufgetragen. Die beiden Fälle einer Detektionslochblende von 0 (punktförmig) und 1 Airy-Scheibe Durchmesser sind jeweils dargestellt. Es wurde von  $\alpha=63^\circ$  (1,1 rad),  $n = 1,33$  und einer Anregungswellenlänge von 488nm ausgegangen. Auf diese Wellenlänge beziehen sich auch die angegebenen Werte für den relativen Stokes-Shift. Die Konturlinien liegen bei 50% (weiß), 40%, 30%, 20%, 10% (gestrichelt) und 5% (gepunktet; nur OTFs) der Maximalwerte.

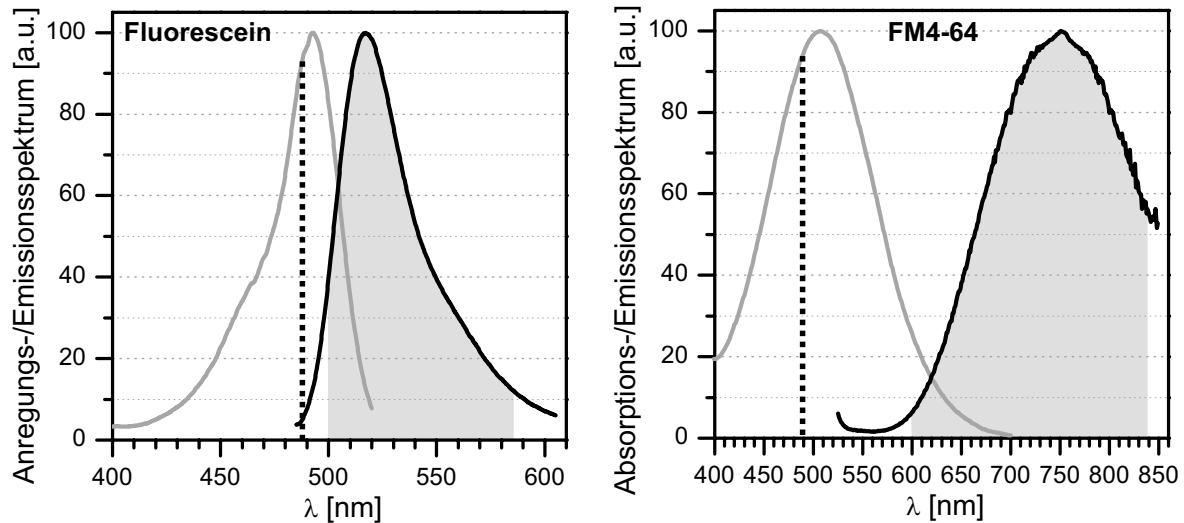
## 4.3 Der Stokes-Shift in der 4Pi-Mikroskopie

### 4.3.1 Abhängigkeit der PSF und OTF vom Stokes-Shift

Ein großer Unterschied zwischen Anregungs- und Detektionswellenlänge im 4Pi-konfokalen Typ C-Modus kann die OTF glätten und Bereiche mit schwacher Amplitude beseitigen, wie dies schon in Kapitel 2.2 erläutert wurde. Abb. 4.4 zeigt die Abhängigkeit von PSF und OTF vom Stokes-Shift am Beispiel der z-Antwort und der Amplitude auf der reziproken optischen Achse. Wie zu erwarten, werden die schlechtesten Ergebnisse bei einem kleinen Stokes-Shift erreicht. Wellenlängenunterschiede in die eine oder andere Richtung senken die Nebenmaxima und glätten zunehmend die OTF. Erst bei sehr großen Stokes-Shifts, bei denen  $\lambda_{Det}$  in den Bereich von  $2\lambda_{Anrg}$  kommt, nimmt der Effekt wieder ab.

Der in der Praxis zugängliche Stokes-Shift-Bereich ist leider gegenüber dem in der Abbildung dargestellten Wellenlängenbereich sehr eingeschränkt. Typische, grün emittierende Farbstoffe weisen einen Unterschied zwischen Anregungs- und Emissionsmaximum von ca. 20 - 30 nm auf (s. Abb. 4.5). Die spektrale Bandbreite beträgt bei der Anregung und im Fluoreszenzspektrum jeweils ca. 50 nm. Verzichtet man auf den Großteil des kurzwelligen Fluoreszenzlichts und nutzt den Farbstoff zusätzlich im schwer anregbaren blauverschobenen Anregungsspektrum, so kann man auf diesem Weg einen Stokes-Shift von maximal ca. 120 nm erreichen.





**Abbildung 4.5:** Spektren des typischen Fluoreszenzfarbstoffs Fluorescein und des Farbstoffs FM4-64 mit einem außergewöhnlich großen Stokes-Shift. Die Emissionsspektren sind schwarz eingezeichnet, die Anregungs- bzw. Absorptionsspektren grau.

Rote Farbstoffe weisen typischerweise einen größeren Stokes-Shift auf, doch da es auf den Wert relativ zur Anregungswellenlänge ankommt, gewinnt man dadurch normalerweise nicht viel. Beim Versuch einen möglichst großen Anti-Stokes-Shift zu erzielen, scheitert man normalerweise am kleinen Überlappungsbereich der Anregungs- und Emissionsspektren, so dass man mit keiner Anti-Stokes-Verschiebung von über 50 nm rechnen kann.

Einige wenige Farbstoffe sind allerdings verfügbar, die auch bei Anregung im blau-grünen Bereich noch einen akzeptablen Stokes-Shift, bzw. ein sehr breitbandiges Emissionsspektrum aufweisen. Die in der 4Pi-konfokalen Mikroskopie standardmäßig zur Justage genutzten Polydiacethylenschichten [29] besitzen beispielsweise diese Eigenschaft.<sup>1</sup>

Die an sich sehr problematische Effizienzeinbuße bei der Nutzung eines kleinen Ausschnitts des Fluoreszenzspektrums erscheint in einem weniger kritischen Licht, wenn man sie mit der etablierten 2-Photonen-Mikroskopie vergleicht, die eine aufgrund von Photobleichen geringere Ausbeute hat als die konfokale Mikroskopie mit 1-Photonen-Anregung [5].

### 4.3.2 Konzepte zur Erzeugung ungewöhnlicher Stokes-Shifts

Eine Alternative, die nicht auf einer Einschränkung des Fluoreszenzspektrums beruht, ist die Anregung direkt in den zweiten elektronischen Anregungszustand  $S_2$ . Meist erfolgt ein strahlungsloser Relaxations-Übergang vom  $S_2$ - in den  $S_1$ -Zustand vor der Fluoreszenz. Dadurch wird ein sehr großer Stokes-Shift erzeugt. Die Anwendbarkeit dieser Methode hängt an der Frage, inwieweit das Bleichen durch diese relativ hochenergetische Anregung verstärkt wird.

<sup>1</sup>Ein weiteres Beispiel ist der Farbstoff FM4-64 (Molecular Probes Inc.), dessen Spektrum in Abb. 4.5 gezeigt ist, oder der kalzium-sensitive Farbstoff Fura-Red (Molecular Probes Inc.). Nutzt man das blaue Ende des Anregungsspektrum auf Kosten einer effektiven Anregungseffizienz, kommen auch die roten Varianten der populären Alexa-Farbstoffe (Molecular Probes Inc.) in Frage.

Denkbar ist außerdem, gekoppelte Farbstoffe zu verwenden, bei denen ein hochenergetisch anregbarer Farbstoff (der Donor) über resonanten Energietransfer die Anregungsenergie auf einen niederenergetischeren Farbstoff (den Akzeptor) abgibt, der dann im stark rot-verschobenen Bereich fluoresziert. Auch die Nutzung einer Farbstoffkette unter Ausnutzung mehrfacher Kopplung ist denkbar. Förster-Energietransfer (FRET) [30] zwischen zwei Farbstoffmolekülen wird zur Abstandsbestimmung zwischen diesen Molekülen in mittlerweile weitverbreiteten FRET-Experimenten genutzt [31]. Transfereffizienzen von fast 100% werden in der Praxis erreicht. Im Unterschied zu diesen Experimenten ist im 4Pi-Fall eine permanente Kopplung nötig.<sup>2</sup> Über einen Antikörper, der spezifisch diese beiden Farbstoffmoleküle bindet, ist dies aber prinzipiell möglich.

Der Anti-Stokes-Bereich eines Farbstoffs kann möglicherweise durch eine künstliche Anhebung der Moleküle aus dem Vibrationsgrundzustand des elektronischen Grundzustands  $S_0$  in einen höheren Vibrationszustand leichter ausgenutzt werden. Werden die Farbstoffe aus diesem angeregten Zustand in den  $S_1$ -Zustand gebracht und detektiert man nur das kurzwellige Fluoreszenzlicht aus dem Zerfall in einen möglichst niedrigen Zustand, so ist die Wellenlänge des Fluoreszenzlichts deutlich kürzer als die des Anregungslichts. Durch IR-Strahlung ist eine Anregung dieser Vibrationszustände möglich.

## 4.4 Pupillenfilter in der 4Pi-Mikroskopie

### 4.4.1 Konzept

Wie in Kapitel 2.2.3 schon angedeutet wurde, kann die OTF eines Mikroskops durch eine Veränderung der in Gl. 2.9 eingeführten Pupillenfunktion optimiert werden. Durch Betonung der Bereiche mit extremen  $k_z$ -Werten, das sind der äußerste Ring sowie die Mitte der Pupille, wird tendenziell die OTF geglättet. Die Frage ist, welches die optimalen Werte der Pupillenfunktion sind, und ob andere, evtl. nicht so offensichtliche Funktionen nicht noch bessere Ergebnisse liefern.

Das Prinzip strukturierter Pupillenfunktionen zur Auflösungserhöhung wurde schon Anfang der 50-er Jahre von G. Toraldo di Francia in der Hellfeld-Mikroskopie verfolgt [32]. Den Filter-Optimierungsprozess kann man sich im Ortsraum so vorstellen, dass man die Apertur des Objektivs in konzentrische Ringe aufteilt. Jeder der Ringe erzeugt entsprechend seines Radius unterschiedliche laterale Raumfrequenzen in der Fokusebene. Durch geeignete Kombination zweier Ringe kann daher für einen Punkt im Abstand  $\rho$  vom Zentrum der PSF erreicht werden, dass er einerseits Teil des  $n$ -ten Beugungsmaximums des einen Ringes ist, andererseits aber zum  $n + (2m + 1)$ -ten Beugungsmaximum des anderen Ringes gehört. Die Amplituden der beiden Beugungsmaxima sind in diesem Fall einander entgegengerichtet und durch geeignete Ringbreiten- oder Amplitudenwahl kann es daher zu einer völligen Auslöschung des aus diesem Punkt emittierten elektromagnetischen Feldes kommen.

Auf diese Weise können sukzessive benachbarte Radien minimiert werden. Mit diesen sogenannten Toraldo-Filtern können theoretisch sehr scharfe Feldverteilungen um den Ursprung geschaffen werden, deren ringförmiges Umfeld in einem frei wählbaren Bereich beliebig stark

---

<sup>2</sup>Es sei denn, man möchte 4Pi-FRET-Experimente machen.

gegen Null gesenkt werden kann. Allerdings nimmt das Signal aus dem Zentrum dabei ebenfalls drastisch ab. Bereiche außerhalb des optimierten Bereichs werden dagegen teilweise stark in den Innenbereich hineingebeugt und können bei entsprechender Helligkeitsverteilung der Probe das Signal im Zentrum leicht übertreffen. Dadurch wird schnell eine experimentell verwirklichte Grenze erreicht.

Prinzipiell kann nicht nur die Amplitude sondern auch die Phase des elektromagnetischen Feldes durch die Pupillenfunktion verändert werden. In einer praktischen Realisierung benutzt man hierzu phasenverzögernde Elemente wie z.B.  $\lambda/2$ -Platten. Zusätzlich lässt sich das Prinzip auch ohne weiteres auf Kosten der beiden lateralen Dimensionen auf die dritte Dimension ausweiten.

In der konfokalen Mikroskopie bietet sich eine Anwendung insofern an, da z.B. die hellen Außenbereiche der Anregungs-PSF mit Toraldo-Filtern durch die konfokale Detektions-PSF unterdrückt werden können [33, 34, 35, 36]. Die dort erreichbaren Effekte bewegen sich allerdings nur im Prozentbereich, so dass in den meisten Fällen die Nachteile des Toraldo-Konzepts überwiegen.

In der 4Pi-konfokalen Mikroskopie soll mit Hilfe der Toraldo-Filter nicht primär die Auflösung gesteigert werden. Ziel ist stattdessen, die auftretenden Nebenmaxima in der PSF zu reduzieren, um auf diesem Weg die schwachen Bereiche der OTF um die kritische Frequenz  $k_c$  zu heben. Die Vorgehensweise ist dabei analog. Es kann jedoch auf einem relativ eingeschränkten axialen Bereich agiert werden, wodurch die negativen Nebeneffekte nicht so drastisch ausfallen.

## 4.4.2 Simulationen für 1- und 2-Photonen-Anregung

### 4.4.2.1 Auswahl der Simulationsmethode

Teilt man die Aperturen der Objektive im 4Pi-konfokalen Mikroskop in  $n$  Ringe auf, so berechnet sich die elektromagnetische Feldverteilung  $\mathbf{E}_{eff}$  an einem Punkt  $\mathbf{r}_j$  im Fokusbereich aus der Linearkombination der Feldvektoren  $\mathbf{E}_i(\mathbf{r}_j)$  der einzelnen Ringe  $i$ . Die komplexen Koeffizienten  $a_i$  ergeben sich dabei aus den Transmissionseigenschaften (Absorption und Phasenverzögerung) der einzelnen Ringe.

$$\mathbf{E}_{eff}(\mathbf{r}_j) = \sum_{i=1}^n a_i \mathbf{E}_i(\mathbf{r}_j) \quad (4.1)$$

Je nachdem wie die Filter eingesetzt werden, wirkt sich diese Linearkombination auf die PSF der Anregung und/oder der Detektion aus.

$\mathbf{E}_{eff}(\mathbf{r})$  soll möglichst einer idealen Feldverteilung  $\mathbf{E}_{ideal}(\mathbf{r})$  entsprechen, bei der die Nebenmaxima klein sind, überhaupt nicht existieren, oder nur in Bereichen vorhanden sind, die bei der Multiplikation mit der zweiten PSF keine Rolle spielen. Betrachtet man  $m$  Punkte  $\mathbf{r}_j$ , ergibt sich daraus ein lineares Gleichungssystem mit  $3m$  Gleichungen und  $n$  Unbekannten  $a_i$ , das numerisch z.B. mit Hilfe der *Singular Value Decomposition* Methode [23] gelöst werden kann.

Dieses lineare Gleichungssystem hat bei einer großen Zahl von Stützpunkten  $\mathbf{r}_j$  i.a. keine Lösung. Stattdessen kann aber ein bester Schätzer angegeben werden, der als physikalisch mögliche Lösung dem idealisierten elektromagnetischen Feld so nah wie möglich kommt.<sup>3</sup>

In diesem Zusammenhang bietet sich eine Wichtung der Gleichungen über zusätzliche Koeffizienten  $w_j$  an. Ansonsten würde sich bei gleicher Wichtung aller Stützpunkte z.B. bei einem Stützpunkt in der Fokusmitte ( $\mathbf{r} = 0$ ), in dem  $\mathbf{E}_{eff}$  auf 1 normiert sein soll, und  $m - 1$  Stützpunkten im Umfeld mit  $\mathbf{E}_{eff} = 0$  mit steigendem  $m$  die triviale Lösung  $a_i = 0$  für alle  $i \in \{1, \dots, n\}$  als bester Schätzer herausstellen. Durch eine Wichtung des Stützpunktes bei ( $\mathbf{r} = 0$ ), die ebenfalls mit wachsendem  $m$  ansteigt, ist dies zu vermeiden.

In dem Fall, dass die Toraldo-Filter nur in der Anregung oder der Detektion genutzt werden, kann man die jeweils andere PSF, die ja nicht von  $a_i$  abhängt, als zusätzliche Wichtung nutzen. Wirken die Toraldo-Filter nur auf die Anregungs-PSF, ergibt sich dann mit Hilfe von 2.2 folgende Gleichung:

$$\mathbf{E}_{ideal}(\mathbf{r}_j) = w_j \sqrt{h_{Det}(\mathbf{r}_j)} \sum_{i=1}^n a_i \mathbf{E}_{Anrg,i}(\mathbf{r}_j) \quad (4.2)$$

Toraldo-Filtern für die Verwendung sowohl in Anregung als auch in Detektion können mit dieser Methode nicht berechnet werden.

Darüber hinaus ist problematisch, dass die Lösungen praktisch kaum experimentell zu realisieren sind, da die  $a_i$  sehr niedrig ausfallen können,  $\mathbf{E}_{ideal}(\mathbf{r})$  aber sehr empfindlich auf kleine Schwankungen der Koeffizienten reagieren kann. Im Hinblick auf die experimentelle Realisierbarkeit wurde daher eine andere Methode weiterverfolgt:

Als Lösungen für die Koeffizienten  $a_i$  wurden nur  $a_i \in \{-1, 0, 1\}$  zugelassen. Die Vorzeichenänderung entspricht dabei einer ringförmigen  $\lambda/2$ -Platte und die 0 einer Strahlblockierung. Um eine starke Oszillation der Pupillenfunktion zu vermeiden, wurden außerdem nur Lösungen zugelassen, bei denen nicht mehr als  $k$  zusammenhängende Bereiche gleicher Werte vorkommen. Diese drastische Reduzierung der möglichen Lösungen erlaubt den einfachen numerischen Test aller möglichen Kombinationen der  $a_i$  in akzeptabler Zeit.

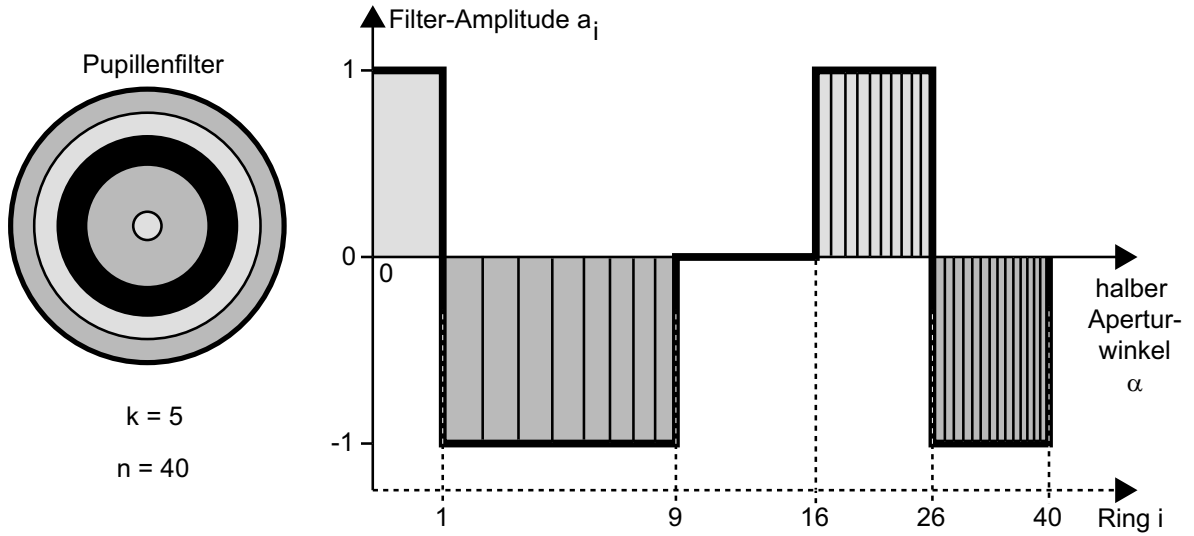
#### 4.4.2.2 Durchführung

Es wurden die folgenden praxisrelevanten Realisierungsmöglichkeiten getestet:

- Toraldo-Filter nur in der Anregung,
- der selbe Toraldo-Filter in der Anregung sowie in der Detektion,
- der invertierte Toraldo-Filter der Anregung in der Detektion ( $\{1, -1\} \rightarrow 0; 0 \rightarrow \{1, -1\}$ ).

Diese Konzepte wurden auf die Betriebsmodi 4Pi Typ A und 4Pi Typ C jeweils mit 1- und 2-Photonen-Anregung angewandt.

<sup>3</sup>Die *Singular Value Decomposition* Methode liefert diesen Wert automatisch.



**Abbildung 4.6:** Aufbauschema der Filter. Prinzipskizze des Aufbaus für die Berechnung eines optimalen Filters mit  $n = 40$  Aperturringen jeweils gleicher Fläche und  $k = 5$  zusammenhängenden Bereichen gleicher Amplitude

Als Bewertungskriterium für die Filter wurden die Abweichung ( $\Delta$ ) der mit dem Filter erzeugten PSF von einer idealen PSF und die im Fokussmittelpunkt errechnete PSF  $h_{eff}(0)$  genutzt. Da nur zweidimensionale axiale Schnitte der PSFs berechnet wurden, ging in  $\Delta$  für jeden Stützpunkt  $\mathbf{r}_j = (z_j, \rho_j, \varphi_j)$  die Wichtung  $\rho_j \delta \rho$  ein. Damit ergibt sich für  $\Delta$

$$\Delta = \sqrt{\frac{\sum_{j=1}^m \rho_j \delta \rho \left[ \frac{1}{N} h_{eff}(\mathbf{r}_j) - h_{ideal}(\mathbf{r}_j) \right]^2}{\sum_{j=1}^m \rho_j \delta \rho}} \quad (4.3)$$

mit  $N = h_{eff}(0) / h_{ideal}(0)$ .

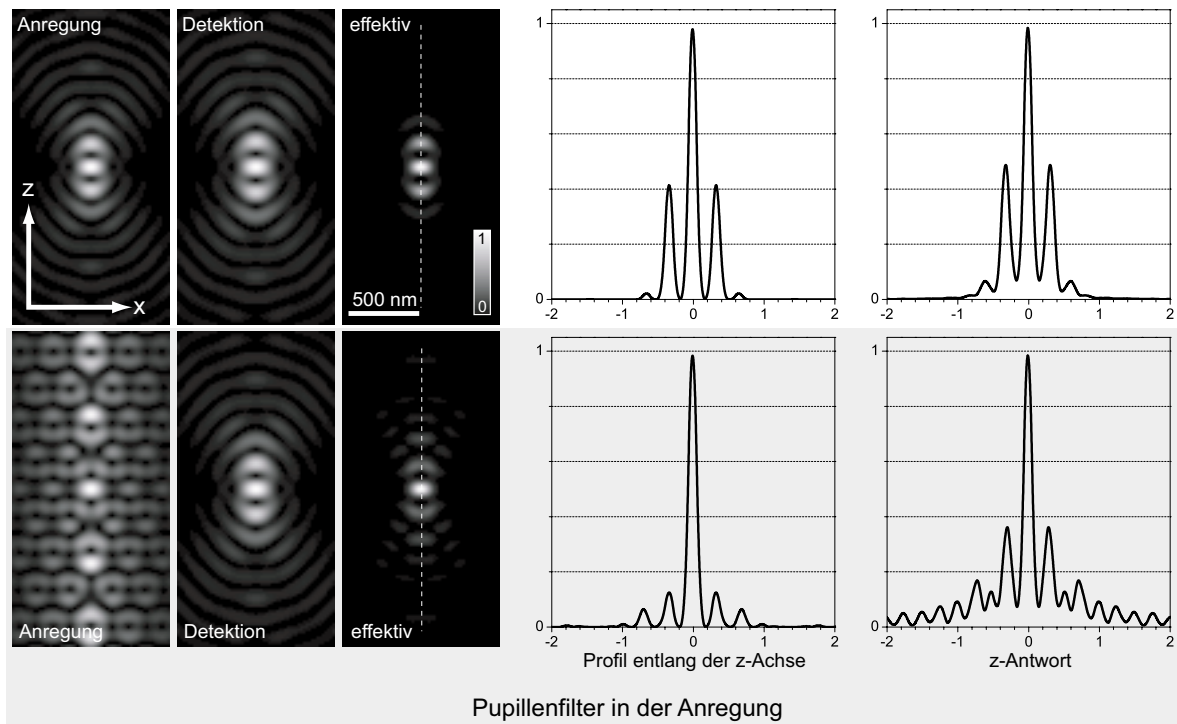
Dabei kann man  $h_{eff}$  z.B. im Fall des Filters nur im Anregungsstrahlengang folgendermaßen ausdrücken:

$$h_{eff}(\mathbf{r}_j) = h_{Det}(\mathbf{r}_j) \left[ \sum_{i=1}^n |a_i \mathbf{E}_{Anrg,i}(\mathbf{r}_j)| \right]^2. \quad (4.4)$$

Analog lässt sich  $h_{eff}$  für die anderen Fällen berechnen.

Außer dem Fokussmittelpunkt wurden als Stützpunkte  $m$  gleichmäßig verteilte Punkte  $\mathbf{r}_j$  in der x-z-Ebene gewählt. Die ideale PSF wurde als eine effektive PSF mit einem beliebig geformten Hauptmaximum in den Grenzen des gewöhnlichen Hauptmaximums und ohne Nebenmaxima definiert. Dazu wurde der Bereich des Hauptmaximums der 4Pi-PSF bis auf den Fokussmittelpunkt als Ort für Stützpunkte ausgeschlossen. Die ideale PSF  $h_{ideal}$  wurde im Fokussmittelpunkt auf den Wert 1 gesetzt, für alle anderen Stützpunkte auf den Wert 0.

Auf die Faltung der Detektions-PSF mit der Detektions-Lochblende wurde aus Rechenzeitgründen verzichtet. Die Daten entsprechen also einem Mikroskop mit infinitesimal kleiner Lochblende. Die Nebenmaxima sind in der Praxis ca. 10%-Punkte höher. Ansonsten sind die Ergebnisse gut übertragbar.



**Abbildung 4.7:** Theoretische Anregungs-, Detektions- und resultierende effektive PSF im 4Pi-konfokalen Typ C Mikroskop mit und ohne Pupillenfilter. Anregungswellenlänge ist 488 nm. Detektiert wird bei 535 nm mit infinitesimal kleiner Lochblende. Es wurde von einem Wasser-Immersionsobjektiv mit einem halben Öffnungswinkel  $\alpha=1,1$  rad ausgegangen. Als Filter dient der in Abb. 4.8 dargestellte Absorptionsring-Filter für die Anregung.

Die Profile zeigen sowohl die Werte der effektiven PSFs auf der optischen Achse als auch die z-Antworten. Insbesondere bei Einsatz des Filters wird der große Unterschied deutlich.

Die dargestellten Daten sind alle normiert. Die eigentliche Anregungs-PSF ist im Fokuspunkt bei gleicher in die Probe eintretender Leistung um ca. einen Faktor 16 kleiner als im Falle ohne Filter. Entsprechendes gilt für das Profil entlang der optischen Achse. Die z-Antwort ist bei Benutzung der Filter um einen Faktor von ca. 14 niedriger als ohne Filter.

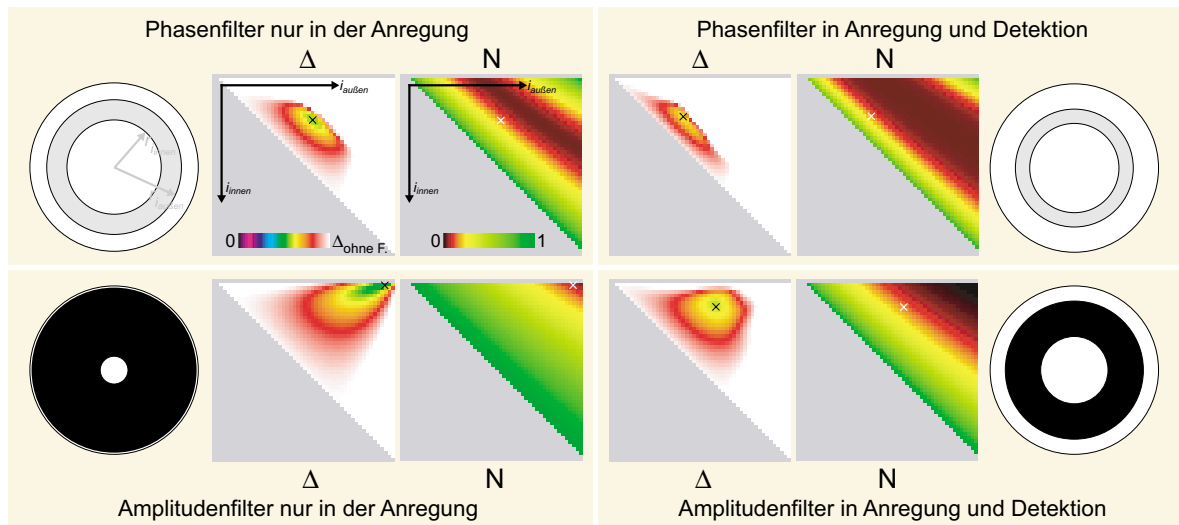
#### 4.4.2.3 Ergebnisse

In den Simulationen wurden die Stützpunkte  $\mathbf{r}_j$  gleichmäßig in beschränkten Bereichen der xz-Ebene verteilt. Die Wahl dieses Bereichs hat dabei großen Einfluss auf die Resultate des besten Filters. Ein Bereich in direkter Nähe des Hauptmaximums wurde ausgespart, um dort keine unnötigen Beschränkungen vorzunehmen.<sup>4</sup> Konkret war dies typischerweise die Fläche in der xz-Ebene in optischen Einheiten<sup>5</sup> bis  $u = 2$  und  $v = 2$  bezogen auf die Anregungswellenlänge. Die äußere Begrenzung des Bereichs stellten Werte von  $u$  zwischen 10 und 20 und  $v$  um die 10 dar.

Es zeigte sich, dass bei PSFs, die mit Pupillenfiltern erzeugt wurden, normalerweise einen relativ großen Signalanteil abseits der optischen Achse haben. Die Frage, ob man zur Beurteilung der PSF ein Profil der Werte auf der z-Achse darstellt oder die z-Antwort (s. Gl. 2.5), gewinnt dadurch an Bedeutung. Im Gegensatz zu [37] werden hier die unvoreilhafteren

<sup>4</sup>Die Ausnahme stellte das Zentrum selbst dar wie oben beschrieben.

<sup>5</sup> $u = \frac{2\pi n}{\lambda} \sin^2(\alpha) z$  und  $v = \frac{2\pi n}{\lambda} \sin(\alpha) r$



**Abbildung 4.8:** Die 4 besten 3-Zonen-Filter für ein 4Pi-konfokales Typ C Mikroskop bei 1-Photonen-Anregung. Die Pupillenfilter bestehen aus absorbierenden Ringen oder aus Ringen mit  $\lambda/2$  Phasenverzögerung. Sinnvolle Anwendungen sind entweder nur im Anregungsstrahlengang oder in Anregungs- und Detektionsstrahlengang zu realisieren. Die Ergebnisse mit den geeignetsten Radien sind dargestellt. Daneben ist das Verhalten von  $\Delta$  und  $N$  in Abhängigkeit von den Indizes, die die Ringradien bestimmen, dargestellt. Die Farbskala von  $\Delta$  endet oberhalb des Wertes, der ohne Filter erreicht wird. D.h. weiße Bereiche erzeugen effektive PSFs, die schlechter als im filterlosen Fall sind. Für die Berechnung wurden die gleichen Parameter, wie zu Abb. 4.7 geschildert, benutzt.

aber praxisrelevanteren  $z$ -Antworten dargestellt und auch die Höhe der Nebenmaxima anhand dieser ermittelt. Abb. 4.7 zeigt einen Vergleich.

**Vergleich der verschiedenen Filterarten** Es wurden alle Kombinationen von Phasen- und Amplitudenfilter mit 3 und 5 Zonen getestet. Eine gerade Zonenanzahl liefert prinzipiell schlechtere Ergebnisse. Die besten Resultate wurden mit Filtern erzielt, die separate absorbierende oder phasenverzögernde Ringe aufweisen. Beispielhaft ist eine so erzeugte PSF in Abb. 4.7 dargestellt.

Abbildung 4.8 zeigt die besten Ergebnisse bei 3-Zonen-Filtern. Es existiert jeweils eine Konstellation von Zonenparametern  $i_{innen}$ ,  $i_{außen}$ , die die Innen- und Außenradien der Ringe beschreiben, bei der das beste Ergebnis erzielt wird. Leichte Abweichungen von diesen idealen Werten liefern immer noch gute Ergebnisse, so dass trotz möglicher fertigungstechnischer Ungenauigkeiten eine Realisierung möglich ist.

Die zu den dargestellten Filtern gehörenden Zahlenwerte sind in Tabelle 4.1 zusammengefasst.

In der Typ A-Variante des 4Pi-konfokalen Mikroskops mit 1-Photonen-Anregung führt die Verwendung des selben Filters in Anregung und Detektion nur zu einer Erhöhung von  $\Delta$  gegenüber der gewöhnlichen Typ A-PSF. Die idealen Filter bei Verwendung nur im Anregungsstrahlengang entsprechen denen des Typ C. Die Verbesserung erreicht mit  $\Delta/\Delta_{ohne\ Filter}=0.63$  beim Phasenring bzw. 0.51 beim Absorptionsring fast die Werte der Typ C-Variante. Allerdings liegt  $\Delta_{ohne\ Filter}$  im Fall des Typs A zusätzliche 33% über dem Typ C-Wert.

	ohne Filter	Phase Anrg	Phase Anrg+Det	Abs Anrg	Abs Anrg+Det
$h_{Anrg}(0)$	1	0.127	0.352	0.063	0.494
$h_{Det}(0)$	1	1	0.352	1	0.243
$N = h_{eff}(0)$	1	0.127	0.124	0.063	0.121
$\Delta/\Delta_{ohne\ Filter}$	1	0.56	0.65	0.47	0.59
Höhe der Nebenmaxima auf der Achse	42%	17%	24%	13%	20%
Höhe der Nebenmaxima in der z-Antwort	47%	37%	35%	35%	33%

**Tabelle 4.1:** Daten zu den in Abb. 4.8 dargestellten Filtern. Neben den Vergleichswerten für den Fall ohne Filter sind die Werte für Phasenring-Filter und Absorptionsring-Filter nur im Anregungsstrahlengang und kombiniert in Anregungs- und Detektionsstrahlengang angegeben. Die Vergleichs-PSF ohne Filter ist dabei im Zentrum auf 1 normiert.

**2-Photonen-Anregung** Bei der Nutzung der 2-Photonen-Anregung ergeben sich bei der Anwendung nur im Anregungsstrahl ideale Filter, die den gezeigten Filtern für den 1-Photonen-Fall bis auf wenige Prozent Abweichung entsprechen. Verwendet man die Filter zusätzlich in der Detektion, verschieben sich die Radien insbesondere im Absorptionsring-Filter zu mittleren Werten hin. Dieser Effekt ist auf den veränderten Stokes-Shift zurückzuführen (s.u.).

Durch die quadratische Abhängigkeit der Fluoreszenzanregung von der Beleuchtungsintensität verlieren die Außenbereiche der Filter-PSF, die im 1-Photonen-Fall eine nicht zu vernachlässigende mittlere Intensität mit deutlichen Beiträgen zur z-Antwort aufweisen, an Bedeutung. Dadurch ist die z-Antwort stärker moduliert als bei der Nutzung von 1-Photonen-Anregung und in den Außenbereichen treten weniger Nebenmaxima auf.

4Pi Typ A:

	ohne Filter	Phase Anrg	Phase Anrg+Det	Abs Anrg	Abs Anrg+Det
Höhe der Nebenmaxima auf der Achse	15%	7%	5%	2%	4%
Höhe der Nebenmaxima in der z-Antwort	19%	11%	9%	7%	9%

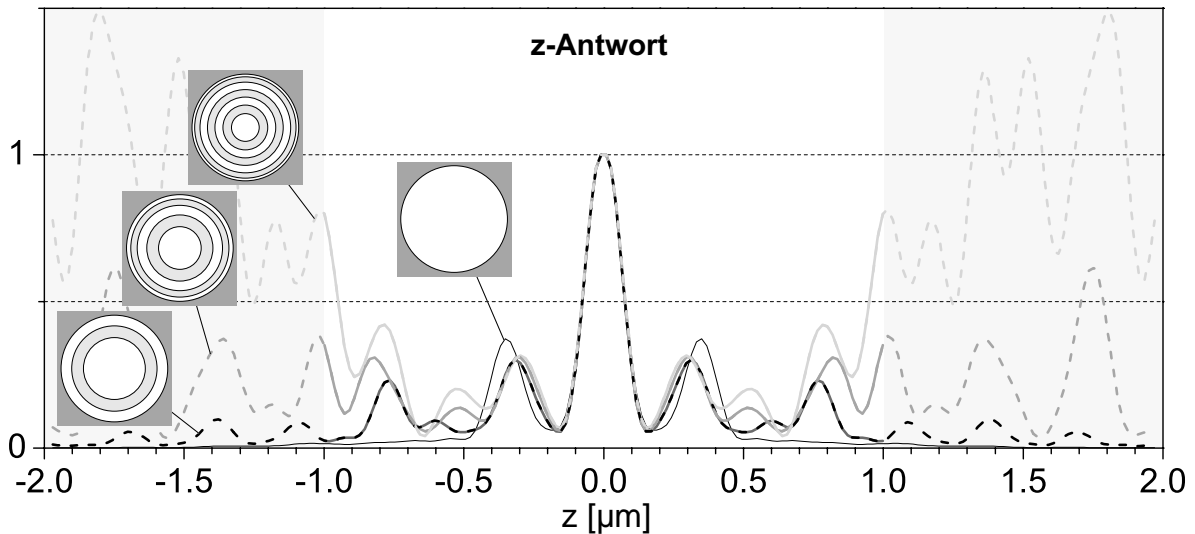
4Pi Typ C:

	ohne Filter	Phase Anrg	Phase Anrg+Det	Abs Anrg	Abs Anrg+Det
Höhe der Nebenmaxima auf der Achse	5%	2%	3%	1%	2%
Höhe der Nebenmaxima in der z-Antwort	9%	5%	5%	4%	4%

**Tabelle 4.2:** Einfluss der Pupillenfilter auf die Höhe der Nebenmaxima bei 2-Photonen-Anregung.

Es wurde von einem Stokes-Shift von -40% der Beleuchtungswellenlänge ausgegangen. Durch die Annahme einer infinitesimal kleinen Detektionslochblende liegen die Werte ca. 10 Prozentpunkte niedriger als sie in der Praxis mit einer endlichen Lochblende erreicht werden können. Die anderen Parameter entsprechen den bei Abb. 4.7 und 4.8 verwendeten.





**Abbildung 4.9:** *z*-Profile des  $4\pi$ -konfokalen Typ C-Betriebsmodus mit 1-Photonen-Anregung bei unterschiedlichen Zonenanzahlen der Pupillenfilter. Dargestellt sind die Profile für Phasenring-Filter im Anregungsstrahlengang mit 1, 2 und 3 getrennten Phasenringen sowie der Referenzfall ohne Pupillenfilter. Der grau unterlegte Bereich liegt außerhalb der optimierten Zone.

Die Verwendung mehrerer Zonen führt zu einem geringfügig niedrigeren  $\Delta$  innerhalb der optimierten Zone. (Die *z*-Antwort täuscht etwas darüber hinweg, da hier einzelne Punkte linear ins Gewicht fallen und nicht quadratisch wie bei der Berechnung von  $\Delta$ .) Dafür steigen die Außenbereiche relativ zum zentralen Maximum unverhältnismäßig stark an.

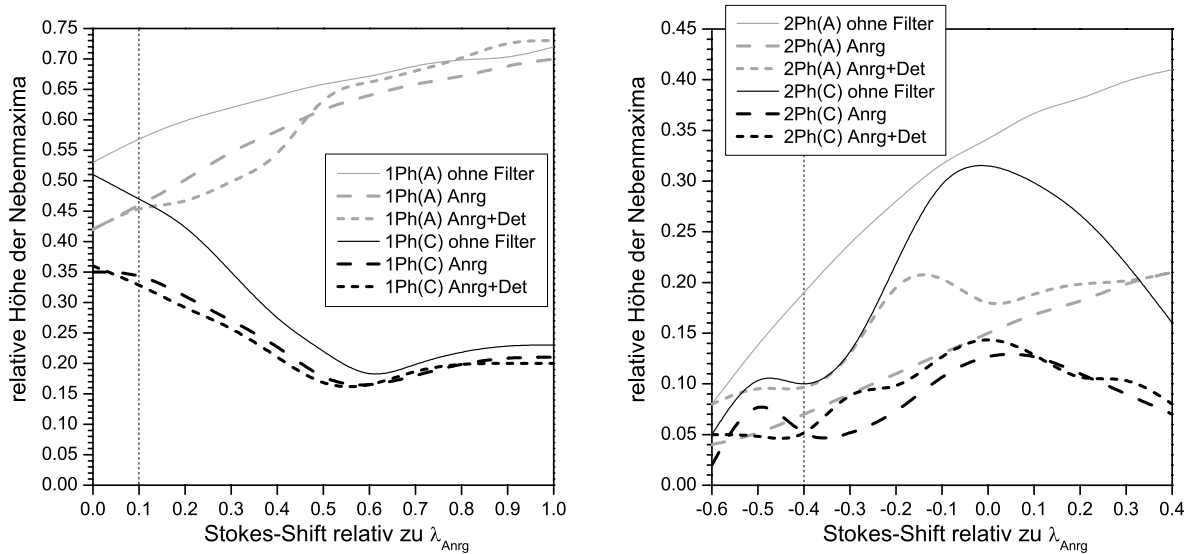
(Anregungswellenlänge 488 nm, Stokes-Shift 10%, infinitesimal kleine Detektionslochblende, Wasser-Immersionsobjektiv mit halbem Öffnungswinkel von 1,1 rad.)

Die Nebenmaxima lassen sich wie in Tab. 4.2 zusammengefasst wie auch in der 1-Photonen-Anwendung um ca. 10 bis 15 Prozentpunkte senken. Durch die niedrigen Ausgangswerte ohne Filter ist dies hier besonders interessant.

**Einfluss der Zonenanzahl des Filters** Durch eine Erhöhung der Zonenanzahl über 3 können keine deutlich besseren Ergebnisse erzielt werden. Als Beispiel sind in Abb. 4.9 die *z*-Antworten der effektiven PSFs für Phasenring-Filter mit 1, 2 und 3 Phasenringen gezeigt, die 3-, 5- und 7-Zonen-Filtern entsprechen. Die Verwendung von Filtern mit einer geraden Zonenanzahl wie 4- und 6-Zonenfilter führt zu schlechteren Ergebnissen.

**Einfluss des Stokes-Shifts** Das generelle Verhalten der  $4\pi$ -PSF unter Einfluss des Stokes-Shifts ändert sich auch bei Benutzung der Pupillenfilter nicht (s. Abb. 4.10). In der 1-Photonen-Mikroskopie ist der positive Effekt der Filter allerdings um so größer, umso geringer der Stokes-Shift ausfällt. Eine Kombination der nebenmaxima-reduzierenden Effekte durch einen hohen Stokes-Shift und die Nutzung von Filter ist daher nur bedingt möglich. Der gleiche Effekt, wenn auch nicht so offensichtlich, tritt bei Nutzung der 2-Photonen-Anregung auf.

Die optimalen Radien der Filterzonen sind geringfügig vom genutzten Stokes-Shift abhängig. Die Form der Filter ändert sich allerdings nicht grundsätzlich. Es ist daher problemlos



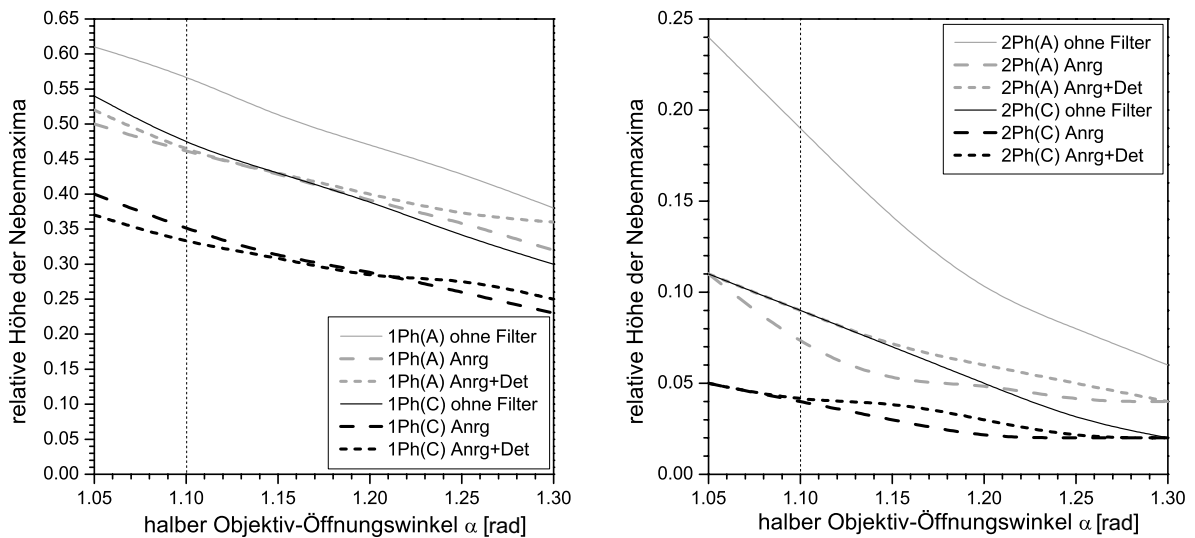
**Abbildung 4.10:** *Abhängigkeit der Sidelobehöhe vom Stokes-Shift bei Benutzung von Absorptionsring-Filtern (3 Zonen) für die 4Pi-Typen A und C in 1- und 2-Photonen-Anregung.* Die Werte sind relativ zur Höhe des jeweiligen Hauptmaximums angegeben. Es ist jeweils die Referenzkurve für die 4Pi-Mikroskopie ohne Pupillenfilter, die Kurve bei Verwendung der Filter nur in der Anregung und das Verhalten bei Filtern im Anregungs- und im Detektionsstrahlengang aufgeführt. Typische Stokes-Shifts sind durch die gestrichelte Senkrechten markiert.

Für die Berechnung wurde von Objektiven mit einem halben Objektivöffnungswinkel von 1,1 rad und einer infinitesimal kleinen Detektionslochblende ausgegangen.

möglich, für einen bestimmten Stokes-Shift-Bereich einen Filter mit durchweg akzeptablen Eigenschaften zu konstruieren.

**Einfluss des Objektiv-Öffnungswinkels** Der nebenmaximasenkende Effekt durch die Filter ist im Verhältnis zur ursprünglichen Nebenmaximumshöhe nahezu unabhängig vom Öffnungswinkel der verwendeten Objektive (s. Abb. 4.11). Die relative Senkung der Nebenmaxima beträgt unter Annahme typischer Stokes-Shifts von 0,1 bzw. -0,4 und einer infinitesimal kleinen Detektionslochblende ca. 20% im 1-Photonen-Fall und ca. 50% im 2-Photonen-Fall.

**Diskussion der Ergebnisse** Die dargestellten Resultate machen deutlich, dass die Form des optimalen Pupillenfilters von einer Vielzahl von Parametern abhängt. Am wichtigsten ist die Wahl des berücksichtigten Bereichs um die PSF bei der Optimierungsprozedur. Wie z.B. anhand Abb. 4.9 zu sehen ist, treten in der Anregung außerhalb des optimierten Bereichs hohe Intensitäten verglichen mit der Intensität im Zentrum auf. Die Folge ist, dass die Anregungseffizienz im gewollten Bereich und der Bleichprozess in den Außenbereichen die limitierenden Faktoren darstellen. Je stärker die Filter auf eine Nebenmaximaunterdrückung optimiert werden, umso stärker fallen diese Effekte ins Gewicht. Insbesondere in der 1-Photonen-Anwendung, bei der nicht wie im 2-Photonen-Fall die quadratische Abhängigkeit von der Anregungsintensität niedrige, auf große Bereiche verteilte, mittlere Intensitäten unterdrückt, muss dies berücksichtigt werden. In der Praxis muss daher bei der Filterauswahl ein von der geplanten Anwendung abhängender Kompromiss zwischen der Nebenmaximaunterdrückung und den negativen Eigenschaften gefunden werden.



**Abbildung 4.11:** Abhängigkeit der Sidelobehöhe vom Objektiv-Öffnungswinkel bei Benutzung von Absorptionsring-Filtern (3 Zonen) für die 4Pi-Typen A und C in 1- und 2-Photonen-Anregung. Die Werte sind relativ zur Höhe des jeweiligen Hauptmaximums angegeben. Es ist jeweils die Referenzkurve für die 4Pi-Mikroskopie ohne Pupillenfilter, die Kurve bei Verwendung der Filter nur in der Anregung und das Verhalten bei Filtern im Anregungs- und im Detektionsstrahlengang aufgeführt. Der typische Öffnungswinkel von 1,1 rad, der für die meisten Rechnungen verwendet wurde und dem eines Wasser-Immersionsobjektivs mit maximaler NA sehr nahe kommt, ist durch die gestrichelte Senkrechten markiert.

Für die Berechnung wurde von einem Stokes-Shift von 0,1 in der 1-Photonen-Anregung und -0,4 in der 2-Photonen-Anregung ausgegangen. Es wurde eine infinitesimal kleine Detektionslochblende angenommen.

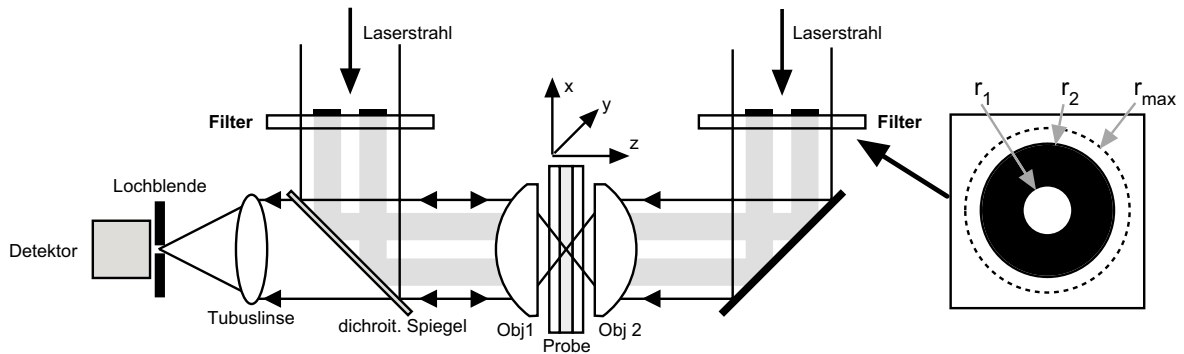
Mögliche Spezialanwendungen, bei denen auf hohe Intensitäten in Außenbereichen keine Rücksicht genommen werden muss, sind z.B. Untersuchungen an Proben, die sich auf Abmessungen innerhalb des optimierten Bereich der PSF beschränken. Dadurch, dass je nach Filter teilweise nur ein geringer Bruchteil der eingestrahlenen Leistung zur Intensität im Zentrum beiträgt, muss allerdings auch der Aspekt der zur Verfügung stehenden Laserleistung berücksichtigt werden.

Potenzial besitzen die Filter in der 1-Photonen-Anregung daher hauptsächlich in der Kombination mit anderen Effekten. Durch die Nutzung eines Pupillenfilters kann auf diese Weise der Effekt der Nebenmaximareduzierung durch einen großen Stokes-Shift unterstützt werden. Dadurch können ausreichend glatte OTFs schon bei geringeren Stokes-Shift-Werten, für die mehr Farbstoffe zur Verfügung stehen, erreicht werden.

#### 4.4.3 Experimentelle Realisierung

Die Funktionsfähigkeit des Filterkonzepts kann anhand eines einfachen probenrasternden Aufbaus gezeigt werden. Wie im letzten Kapitel gezeigt wurde, reichen einfache 3-Zonen-Amplitudenfilter aus. Die benutzten Filter wurden dadurch erzeugt, dass Aluminium-Ringe auf Quarzplatten mit einer Oberflächengenauigkeit von  $\lambda/10$  geklebt wurden. Dadurch wird das Licht auf einem breiten Ring geblockt und nur Licht in der Mitte der Apertur und auf einem schmalen Außenring wird transmittiert.

Da die Pupillenfilter in der 2-Photonen-Anregung einen deutlicheren Effekt zeigen, wurde in



**Abbildung 4.12:** Schema des Versuchsaufbaus. Es ist nur der hier wichtige Teil des Aufbaus mit den Pupillenfiltern gezeigt.

Die Pupillenfilter liegen nicht direkt in den Eintrittspupillen der Objektive, da diese nicht zugänglich sind. Stattdessen sind sie wenige Zentimeter davor eingebaut. Da der vorliegende Aufbau proben- und nicht strahlrasternd ist und die Pupillenfilter ausreichend groß sind, so dass Beugungseffekte auf diese Entfernung noch keine Rolle spielen, spielt der Abstand keine Rolle.

Die Anordnung ermöglicht außerdem, dass der Detektionsstrahl noch vor den Filtern ausgekoppelt werden kann. Der vorliegende Aufbau stellt ein 4Pi-konfokales Mikroskop vom Typ A mit Amplituden-Pupillenfiltern nur im Anregungsstrahlengang dar.

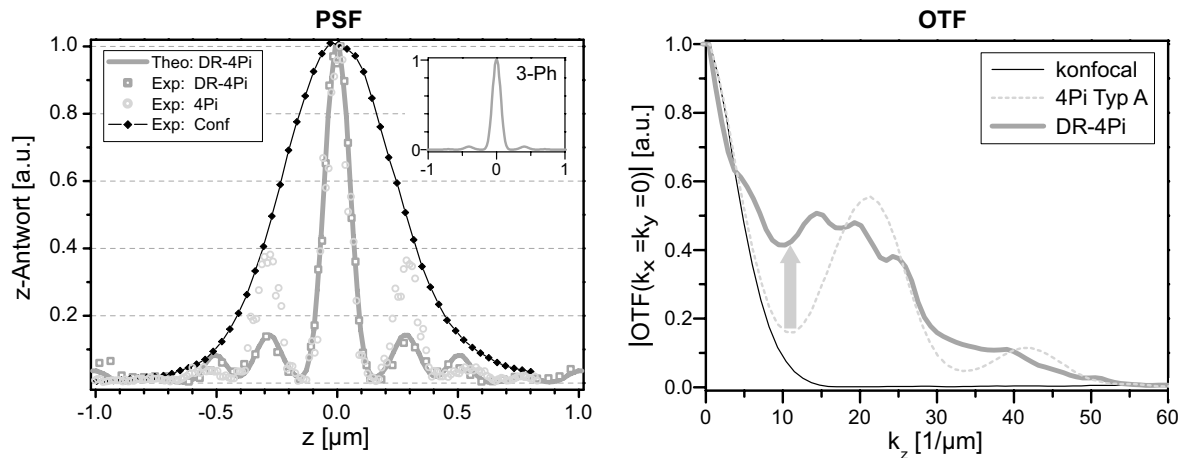
den durchgeführten Versuchen ein 4Pi-konfokaler Aufbau mit 2-Photonen-Anregung benutzt. Der Laserstrahl wurde mit einer Lochblende gereinigt, kollimiert und die Pupillen der Objektive deutlich überleuchtet, um ein möglichst perfektes Strahlprofil zu haben. Um den Aufbau einfach zu halten, wurde eine probenrasternde Realisierung gewählt. Detektiert wurde über eine Avalanche-Photodiode (Perkin&Elmer Inc.), deren angekoppelte Multimode-Glasfaser gleichzeitig als Detektionslochblende diente. Die Filter wurden so eingebaut, dass sie nur auf den Beleuchtungsstrahlengang wirken (s. Abb. 4.12).

#### 4.4.3.1 Reduzierung der Nebenmaxima

Der Effekt der Nebenmaximareduzierung konnte eindrucksvoll nachgewiesen werden (s. Abb. 4.13). Die Nebenmaxima ließen sich in ihrer relativen Höhe von 35% auf 13% senken [38]. Anhand von Aufnahmen von *Escherichia coli* Bakterien konnte bewiesen werden, dass sich das Konzept auch in der Anwendung nutzen lässt (s. Abb. 4.14). Die geringe Höhe der Nebenmaxima macht eine Entfaltung unnötig.

#### 4.4.3.2 Phasenbestimmung mit Hilfe von Pupillenfiltern

Der Unterschied zwischen einer PSF mit zentralem Hauptmaximum bei konstruktiver Interferenz (Phasendifferenz  $\phi = 0$ ) zu der mit zwei Maxima bei destruktiver Interferenz ( $\phi = \pi$ ) lässt sich an der Amplitude der OTF bei der kritischen Raumfrequenz  $k_c$  ablesen [15] (s. Kap. 2.2.4.2). Wie in Kap. 2 schon erörtert wurde, ist die sich ändernde periodische Wiederholung von Strukturen der PSF dafür verantwortlich. Eine Verringerung der Höhe der Nebenmaxima der konstruktiven PSF verändert nicht den Umstand, dass die destruktive PSF immer noch aus zwei symmetrischen Hauptmaxima besteht. Die OTF wächst daher im Bereich der kritischen Raumfrequenz im konstruktiven Fall deutlich stärker an als im destruktiven Fall. Somit



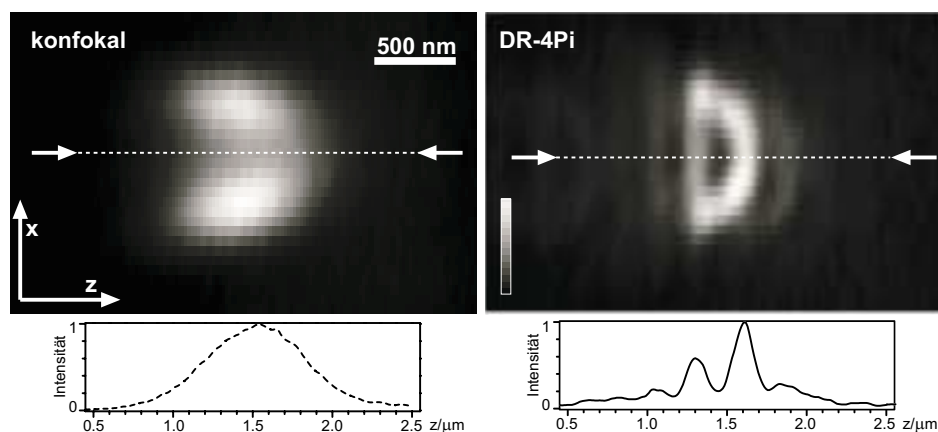
**Abbildung 4.13:** Experimentelle  $z$ -Antwort und Betrag der OTF entlang der  $k_z$ -Achse. Gemessen wurde mit einem konfokalen 2-Photonen-Mikroskop und einem 4Pi-konfokales 2-Photonen-Mikroskop mit und ohne Absorptionsring-Pupillenfilter ("dark ring" (DR) Filter). Die 2-Photonen-Anregung erfolgte mit einem modengekoppelten Titan:Saphir-Laser bei 760 nm. Als Probe diente ein fluoreszierender Langmuir-Blodgett-Film. Der Durchmesser der Detektionslochblende betrug ca. 0,65 Airy-Scheibendurchmesser. Die Daten wurden normiert.

reagiert die OTF umso sensitiver auf eine Phasenänderung, desto mehr sich die konstruktive PSF als einzelnes Maximum darstellt.<sup>6</sup>

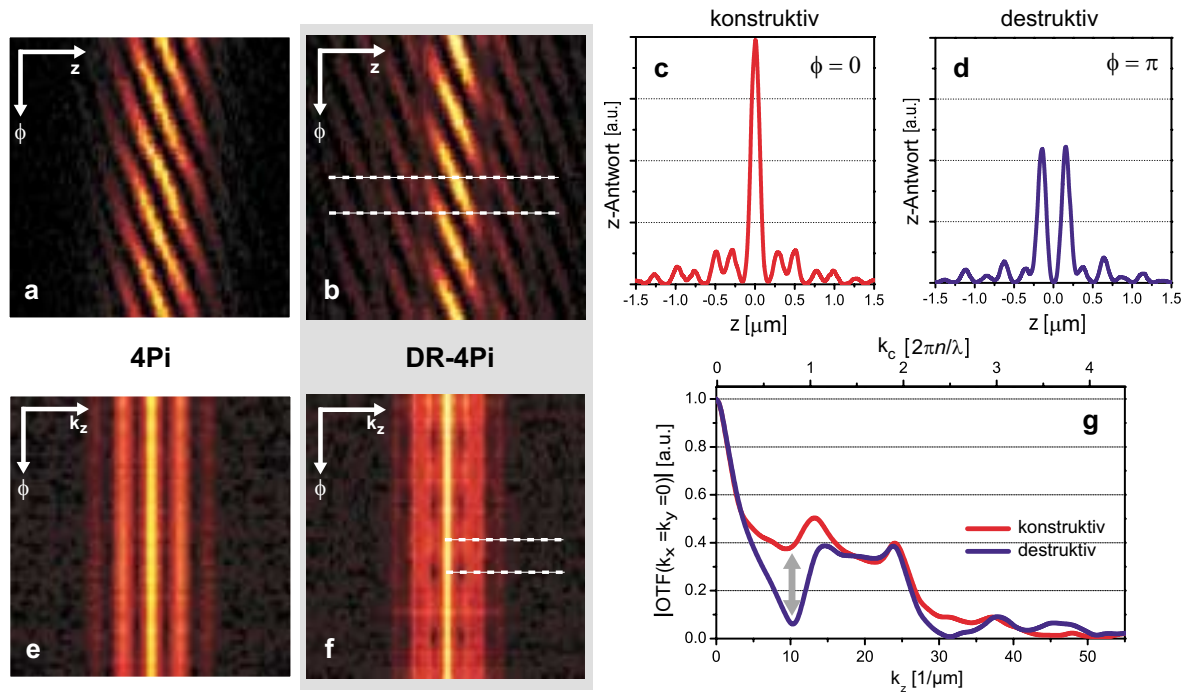
Abb. 4.15 zeigt die experimentelle Bestätigung, dass die Einführung der im vorigen Kapitel vorgestellten Absorptionsring-Filter eine deutlich stärkere Modulation der OTF bei einer Phasenänderung hervorrufen als im Standard-4Pi-System.

In der Praxis wird der selbe Bereich der Probe mehrmals mit verschiedenen Phasendifferenzen

<sup>6</sup>Ohne eine Fouriertransformation kann mit Hilfe der Pupillenfilter die Phasenbestimmung auch über die im Bild vorhandenen maximalen Intensitäten erfolgen [39]. Probleme wie Photobleichen während der Messung sprechen aber i.a. für die OTF-Methode.



**Abbildung 4.14:**  $xx$ -Schnitt durch ein *Escherichia coli* Bakterium mit einem konfokalen 2-Photonen-Mikroskop und dem 2-Photonen-4Pi-konfokalen Mikroskop unter Einsatz der Absorptionsring-Filter. Beide Aufnahmen zeigen die selbe Stelle des Bakteriums. Die 4Pi-Aufnahme wurde nicht entfaltet. Zur besseren Darstellung wurden beide Aufnahmen mit einem  $3 \times 3$ -Filter unterhalb des Auflösungslimits geglättet.



**Abbildung 4.15:** Änderung der z-Antwort und der OTF mit der Phasendifferenz  $\phi$ . (a) zeigt die Aufnahme eines fluoreszierenden Langmuir-Blodgett-Films mit einem 2-Photonen-4Pi-konfokalen Aufbau des Typs A. Die axiale Rasterachse ist horizontal orientiert, während über die vertikale Achse anstelle einer lateralen Verschiebung der Probe die Phasendifferenz  $\phi$  verändert wurde. Durch die Struktur der Probe stellt jede horizontale Linie eine z-Antwort bei einem anderen  $\phi$  dar.

In (b) wurde zusätzlich der Absorptionsring-Filter eingesetzt. Die gestrichelten Linien markieren die Positionen, von denen die in (c) und (d) gezeigten konstruktiven und destruktiven Profile genommen wurden. Durch eine axiale Fouriertransformation von (a) und (b) erhält man (e) und (f). Jede horizontale Linie entspricht hier dem Betrag der OTF auf der inversen z-Achse. Man kann in (f) im Gegensatz zu (e) gut eine starke Modulation erkennen. Die in (g) dargestellten Profile wurden an den in (f) eingezeichneten Positionen entnommen und verdeutlichen die Modulation der OTF in der Nähe der kritischen Raumfrequenz  $k_c$ .

Die Mikroskopparameter entsprechen denen in Abb. 4.13.

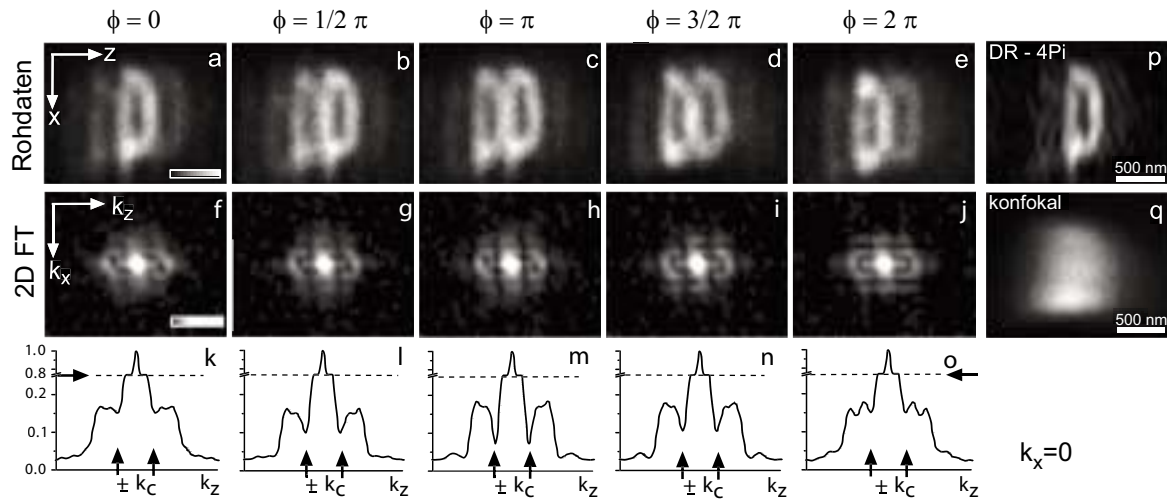
$\phi$  aufgenommen. Aus dem Betrag der Fouriertransformation der Bilder extrahiert man den Wert bei  $k_c$ . Man bestimmt das Maximum und stellt  $\phi$  auf den entsprechenden Wert bevor man mit der eigentlichen Messung anfängt.

Für diese Analyse reicht es aus, nur einen kleinen Teil der Probe, in dem die untersuchte Struktur die passenden Raumfrequenzen enthält, zu rastern. Dadurch kann man bevor die eigentliche, zeitaufwendige Messung beginnt, anhand relativ weniger Daten schnell und automatisiert  $\phi$  einstellen.

Abb. 4.16 zeigt ein solches Beispiel, bei dem aus dem Bild  $\phi$  gewonnen wurde.

#### 4.4.4 Mögliche Realisierungen im strahlrasternden Gerät

Bei der Implementierung der Pupillenfilter in den vorliegenden strahlrasternden Aufbau muss zwischen zwei Fällen unterschieden werden:

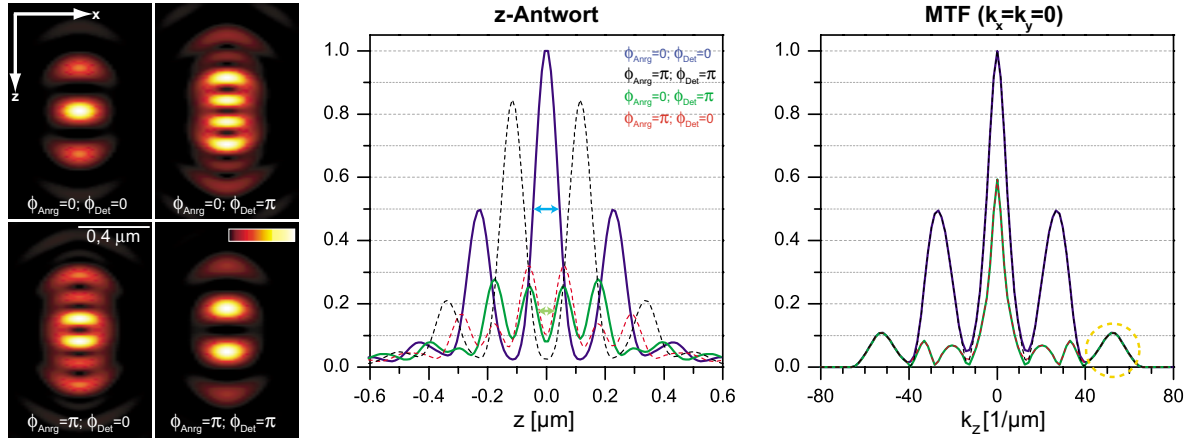


**Abbildung 4.16:** Phasenbestimmung anhand von Bilddaten. (a) - (e) zeigt eine Serie von  $zx$ -Schnitten eines *E. Coli* Bakteriums.  $\phi$  wurde zwischen den Bildern jeweils um  $\pi/2$  verschoben. Anhand der in (k) - (o) gezeigten Profile entlang der reziproken  $z$ -Achse der Fouriertransformationen (f) - (j) der Bilddaten kann man leicht die verschiedenen Phasendifferenzen unterscheiden. (p) und (q) zeigen zur Übersicht nochmals ein linear entfaltetes  $4\pi$ -konfokales Bild mit Absorptionsring-Filtern sowie die entsprechende konfokale Referenzaufnahme. Die Daten wurden mit dem bereits beschriebenen Versuchsaufbau mit 2-Photonen-Anregung und Absorptionsring-Filtern aufgenommen.

- Wird der gleiche Filter in der Anregung sowie in der Detektion genutzt, kann er entweder direkt vor den Objektiven eingebaut werden, oder aber in der ehemaligen Austrittspupillenebene des Stativs, die sich oberhalb der Linse L1 befindet.
- Sollen dagegen in Anregungs- und Detektionsstrahlengang unterschiedliche Filter genutzt werden, bzw. nur in einen der beiden Strahlengänge ein Filter eingebracht werden, so ist man aufgrund der kompakten Bauweise eingeschränkt. Entweder muss man auf die Nutzung dichroitischer Filter zurückgreifen, oder die Filter sind in dem Bereich einzubringen, in dem die Strahlen getrennt sind. Typischerweise haben dort die Strahlen einen geringen Durchmesser, so dass eine zusätzliche Strahlaufweitung nötig ist. Bei der Konstruktion eines dichroitischen Filters ist darauf zu achten, dass der Filter durch seine dielektrischen Schichten im transparenten Bereich keinen ungewollten Phasenfilter darstellt. Diese Schwierigkeit kann durch ein ausgleichendes dielektrisches Schichtensystem, das hauptsächlich nur eine Phasenverzögerung bewirkt, gemindert werden. Als Alternative kann mit absorbierenden Farbläsern gearbeitet werden, deren Brechungsindex genau bekannt ist und dessen räumlich inhomogener phasenverzögernder Effekt durch entsprechende farbneutrale Gläser kompensiert wird.

## 4.5 Konstruktiv-destruktive Interferenz

Abb. 4.17 zeigt die  $z$ -Antwort einer PSF mit konstruktiver Anregungs- und destruktiver Detektions-PSF (konstruktiv-destruktive PSF). Zu erkennen ist die schmalere Halbwertsbreite des Minimums verglichen mit der Halbwertsbreite des zentralen Maximums der konstruktiv-konstruktiven PSF. Dies legt nahe, dass in der konstruktiv-destruktiven PSF höhere Raum-



**Abbildung 4.17:** PSFs und OTFs bei verschiedenen Phasendifferenzen der Anregungs- und Detektionsstrahlen. In den z-Antworten der konstruktiv-konstruktiven PSF ( $\phi_{Anrg} = \phi_{Det} = 0$ ) und der konstruktiv-destruktiven PSF ( $\phi_{Anrg} = 0, \phi_{Det} = \pi$ ) sind die zentralen Halbwertsbreiten eingezeichnet. Diese ist im konstruktiv-destruktiven Fall schmäler, was sich in einer relativ stärkeren Übertragung hoher Frequenzen widerspiegelt. Allerdings ist diese relative Verstärkung nur auf die Dämpfung der niedrigeren Frequenzen der konstruktiv-destruktiven OTF zurückzuführen. Die Übertragung der hohen Frequenzen (gestrichelter Kreis) bleibt unverändert.

Die gezeigten MTFs wurden auf das Maximum der konstruktiv-konstruktiven MTF normiert. Durch die schlechte Überlappung von konstruktiven und destruktiven PSFs kommt es zu einem Signalverlust im gemischten Fall.

Die konstruktiv-destruktive und die destruktiv-konstruktive MTF sind fast gleich. Das selbe gilt für die konstruktiv-konstruktive und die destruktiv-destruktive MTF. Einziger Unterschied ist hier die Nullstelle bei  $k_c \approx 12 \mu\text{m}^{-1}$  im destruktiven Fall.

frequenzen stärker vertreten sind. Aus den dazugehörigen MTFs kann allerdings abgelesen werden, dass die Übertragung höherer Frequenzen zwar relativ verstärkt wird, dies allerdings allein durch die Reduzierung des Transfers niedrigerer Raumfrequenzen geschieht.

Eine Erklärung liefert die genauere Betrachtung des Zustandekommens der effektiven OTF analog zu Kap. 2.2: Die Phase der komplexen Anregungs- bzw. Detektions-OTF springt im destruktiven Fall in den MTF-Nebenmaxima auf  $\pi$ , während sie im konstruktiven Fall bei 0 bleibt. Dadurch können in der Faltung, bei der destruktive OTFs beteiligt sind, Frequenzen gedämpft oder sogar ausgelöscht werden.<sup>7</sup>

Eine Veränderung des Stokes-Shifts verändert die MTF der konstruktiv-destruktiven PSF hauptsächlich im ersten Maximum. Sind Anregungs- und Detektionswellenlänge identisch, entsteht ein ausgedehnter Bereich in der MTF, in dem diese Null ist. Mit zunehmendem Stokes-Shift wächst die MTF in diesem Bereich an. Im Gegensatz zum konstruktiv-konstruktiven Fall besitzt sie allerdings immer eine Nullstelle in der Mitte dieses ersten Nebenmaximums. Die Höhe des zweiten Nebenmaximums unterscheidet sich nicht von der im konstruktiv-konstruktiven Fall.

<sup>7</sup>Der Übergang von Phase 0 auf Phase  $\pi$  innerhalb einer OTF erzeugt immer auch eine Nullstelle in der Amplitude der OTF zwischen den beiden Bereichen. Dies ist auch eine Erklärung für das Verschwinden der Amplitude der OTF bei  $k_c$  im destruktiven Fall in Kap. 4.4.3.2.



## 4.6 OTF-Kombination

### 4.6.1 Prinzip

Um die schwachen Bereiche der OTF im Bereich um  $k_c$  zu stärken bzw. nicht nutzen zu müssen, liegt es nahe, zu versuchen, die hier fehlenden Raumfrequenzen auf anderem Weg zu erhalten. Bei festgehaltenem relativen Stokes-Shift skaliert die OTF mit den Wellenlängen von Anregung und Detektion. Es besteht daher die Option, die Probe bei verschiedenen  $\lambda_{Anregung} - \lambda_{Detektion}$ -Kombinationen mit entsprechend unterschiedlichen OTFs aufzunehmen und die Bilder zu kombinieren.

Um diese Kombination nicht auf Kosten erhöhten Rauschens durchzuführen, bietet es sich an, von den durch die OTFs gewichteten aufgenommenen Datensätzen (s. Gl. 2.13) jeweils nur die Bereiche zu nutzen, in denen die jeweilige OTF eine relevante Amplitude besitzt.

In einer konkreten Realisierung können z.B. zwei Datensätze  $b_1$  und  $b_2$  aufgenommen werden. Die Wellenlängen  $\lambda_{Anrg,2}$  und  $\lambda_{Det,2}$  des zweiten Datensatzes sollten dabei z.B. bei den doppelten Werten der ersten Aufnahme liegen. Dadurch befindet sich das erste Nebenmaximum der zweiten OTF bei der kritischen Raumfrequenz des ersten Datensatzes.

Eine einfache Realisierung ergibt sich z.B. mit folgender Formel

$$S(\mathbf{k}) = \sum_i B_i(\mathbf{k}) \frac{1}{H_i(\mathbf{k})} \frac{H_i(\mathbf{k})}{\sum_j H_j(\mathbf{k})} \theta(|H_i(\mathbf{k})| - \gamma_i \max(|H_i(\mathbf{k})|)) G(\mathbf{k}, \mathbf{k}')$$

Oder vereinfacht:

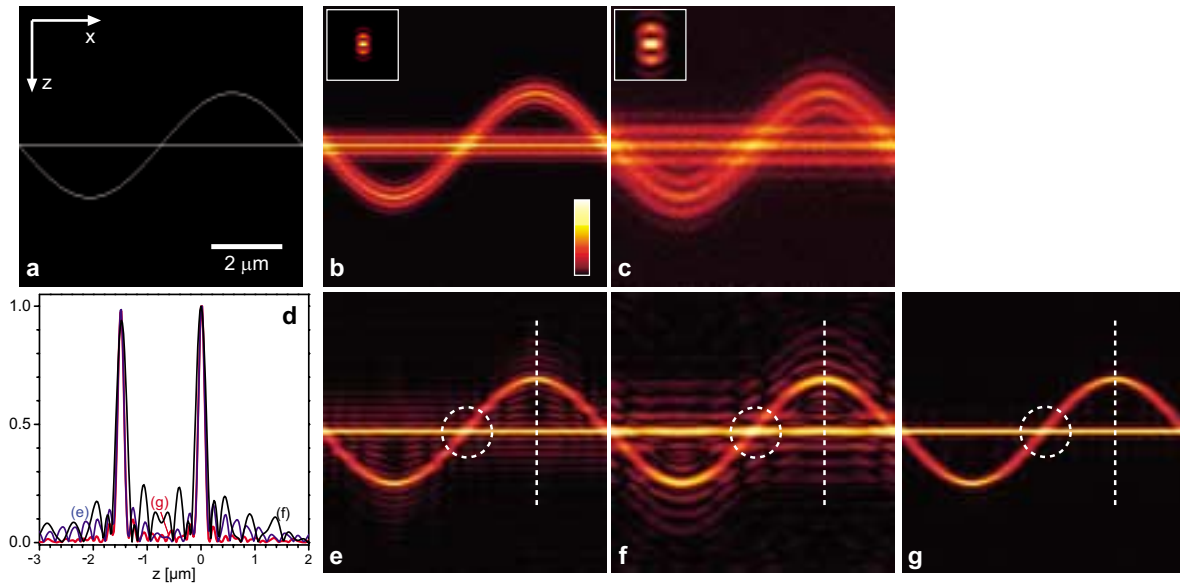
$$S(\mathbf{k}) = \frac{\sum_i B_i(\mathbf{k}) \theta(|H_i(\mathbf{k})| - \gamma_i \max(|H_i(\mathbf{k})|))}{\sum_j H_j(\mathbf{k})} G(\mathbf{k}, \mathbf{k}') \quad (4.5)$$

Sie lässt sich aus der Gleichung  $S(\mathbf{k}) = B(\mathbf{k})/H(\mathbf{k})$  motivieren, die aus Gl. 2.13 folgt: Die fouriertransformierte Struktur  $S(\mathbf{k})$  wird als Summe aus der Entfaltung der zwei Datensätze  $b_1$  und  $b_2$  dargestellt. Es werden allerdings die Beiträge durch  $H_i(\mathbf{k})/\sum_j H_j(\mathbf{k})$  unterschiedlich gewichtet, um der höheren Zuverlässigkeit bei großen OTF-Amplituden Rechnung zu tragen. Unterhalb einer bestimmten Schwelle, die durch  $\gamma_i$  ausgedrückt wird, wird ein Beitrag einer Frequenz zur Entfaltung durch die Heaviside-Funktion  $\theta(|H_i(\mathbf{k})| - \gamma_i \max(|H_i(\mathbf{k})|))$  ganz ausgeschlossen. Eine Verfeinerung erlaubt die Glättungsfunktion  $G(\mathbf{k}, \mathbf{k}')$ , die zu scharfe Ränder des inversen Filters verhindert und somit Überschwinger in der Entfaltung unterdrückt.

Die inverse Fouriertransformation von  $S(\mathbf{k})$  stellt den restaurierten Datensatz dar.

### 4.6.2 Simulation

Das Verfahren wurde an der in Abb. 4.18(a) gezeigten Struktur getestet. Sie besteht aus einer entlang der x-Achse orientierten Geraden, die von einer in der x-z-Ebene liegenden Sinuswelle mit Amplitude  $1,5 \mu\text{m}$  geschnitten wird. Der Datensatz besitzt eine Kantenlänge von  $8 \mu\text{m}$  in x- und z-Richtung sowie  $1 \mu\text{m}$  in y-Richtung. Die Pixelgröße beträgt  $20 \text{ nm}$  in axialer Richtung sowie  $40 \text{ nm}$  in lateraler Richtung.



**Abbildung 4.18:** Simuliertes Beispiel eines rekonstruierten Datensatzes mit Hilfe der Kombination zweier 1-Photonen-4Pi-Typ A OTFs. (a) zeigt die zugrunde liegende theoretische Struktur  $s_{Original}$  aus der die in (b) und (c) gezeigten simulierten Datensätze  $b_1$  und  $b_2$  gewonnen wurden. (d) zeigt das in (e) - (g) eingezeichnete Profil durch die rekonstruierten Strukturen  $s_{h_1}$  (e),  $s_{h_2}$  (f) und  $s_{kombiniert}$  (g). Für (e) und (f) wurde jeweils vom doppelten Signal in  $b_1$  bzw.  $b_2$  mit entsprechend verbesserten SNR ausgegangen.

Durch Faltung der theoretischen Struktur mit zwei 1-Photonen-4Pi-Typ A PSFs wurden zwei Datensätze erzeugt, die Aufnahmen simulieren. Für die erste PSF wurde von einer Anregungswellenlänge von 488 nm und einer Detektionswellenlänge von 530 nm ausgegangen. Die zweite PSF wurde für die doppelten Wellenlängen berechnet. In beiden Fällen wurde von einem Lochblendendurchmesser einer Airy-Scheiben und Wasser-Immersionsobjektiven mit einem halben Öffnungswinkel von  $63^\circ$  ausgegangen. Der erste Datensatz wurde auf ein Maximalsignal von 120 normiert, der andere mit dem selben Gesamtsignal auf einen Maximalwert von 32. Die Daten wurden mit Hilfe der Poisson-Statistik verrauscht und ein poissonisches Hintergrundrauschen mit Mittelwert 1 wurde addiert. Für die vergleichsweise Entfaltung mit jeweils nur einer PSF wurde die simulierte Aufnahmezeit entsprechend verdoppelt, um das SNR anzupassen.

Die Daten wurden gemäß Gl. 4.5 restauriert. Als Glättungsfunktion diente dabei eine gaussche Glockenkurve mit  $\sigma_{k_x} = \sigma_{k_y} = 10$  und  $\sigma_{k_z} = 20$ . Abb. 4.18 zeigt deutlich die Verbesserung in der Rekonstruktion durch Verwendung der beiden unterschiedlichen Datensätze.

### 4.6.3 Realisierungsmöglichkeiten

Die für die beiden Datensätze notwendigen stark unterschiedlichen Wellenlängen kann man durch eine Doppelfärbung erzeugen. Die zwei Anregungswellen erhält man z.B. durch Frequenzverdopplung eines Infrarotlasers bei gleichzeitiger Nutzung des restlichen Infrarotlichts.

Abb. 4.18 zeigt ein simuliertes Beispiel.

Alternativ zu der gezeigten 1-Photonen Typ A-Anwendung kann man auch das Signal aus

einer 2-Photonen Typ A- oder Typ C-<sup>8</sup> zusammen mit einer 1-Photonen Typ A-Anwendung (oder Typ C) nutzen. Die OTF der 2-Photonen-Aufnahme würde in dem Fall die Lücke der 1-Photonen-OTF bei  $k_c$  füllen, während diese für die Aufnahme höherer Frequenzen verantwortlich wäre und somit zu einer höheren Auflösung beitragen würde.

---

<sup>8</sup>ein relativ schwaches Signal bei relativ großer Detektionslochblende reicht

## Kapitel 5

# Experimentelle Bestimmung der Auflösungserhöhung

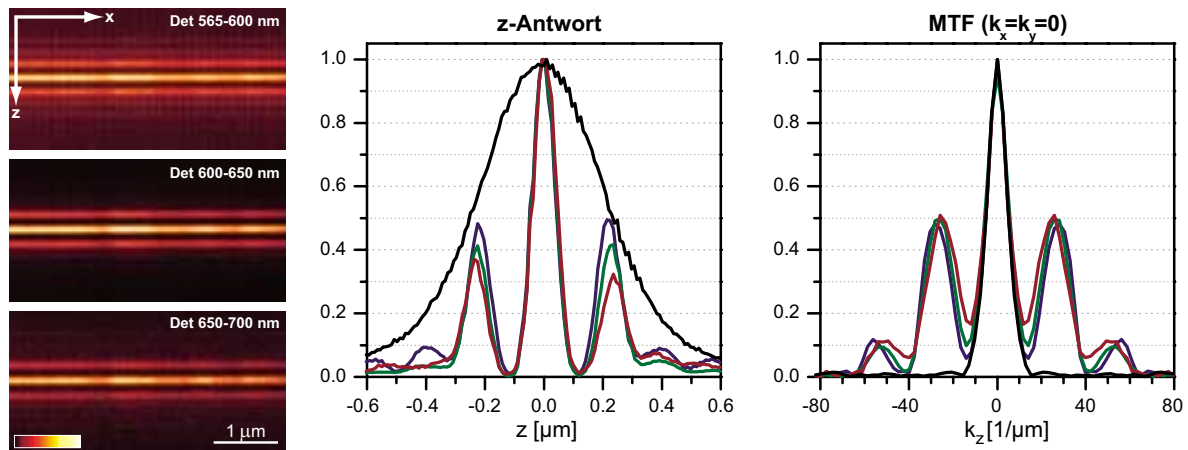
Neben den in Kapitel 4 dargestellten experimentellen Ergebnissen (Abb. 5.2 sowie Abb.4.13, 4.14, 4.15 und 4.16) werden hier die Messung der z-Antwort und erste biologische 4Pi-Aufnahmen mit 1-Photonen-Anregung an *Escherichia coli* Bakterien vorgestellt. Diese Messungen wurden alle mit dem in Kap. 3 geschilderten Gerät bei 1-Photonen-Anregung im Typ C-Modus durchgeführt.

### 5.1 Untersuchungen anhand der z-Antwort

Exemplarisch zeigt Abb. 5.1 die Aufnahme einer fluoreszierenden Polydiacetylen-Schicht. An ihr lässt sich sehr einfach das axiale Auflösungsvermögen in Form der z-Antwort messen [29]. In Übereinstimmung mit der Theorie ergibt sich eine axiale Halbwertsbreite des Hauptmaximums von  $(94 \pm 3)$  nm. Diese Auflösung liegt um etwas mehr als einen Faktor 5 unter der des konfokalen Mikroskops mit den gleichen Parametern und ca. 30% unter der des 2-Photonen-Typ A-Modus.

Aus dem Vergleich der 4Pi-konfokalen Profile ist deutlich die Abnahme der Nebenmaximahöhen mit steigendem Stokes-Shift zu erkennen. Der aus den experimentellen Daten bestimmte Betrag der OTF (die MTF) zeigt, dass die Lücke im Ortsfrequenzraum bei der eingestellten Lochblendengröße in der Detektion von ca. 0,67 Airy-Scheibendurchmessern schon bei einem Stokes-Shift von ca. 100 nm hinreichend geschlossen ist. Mit steigendem Stokes-Shift ergeben sich Werte im Minimum von bis zu 20%.

Der Vergleich der z-Antworten in der Abbildung bei verschiedenen Detektionswellenlängen zeigt außerdem, dass die Dispersionsunterschiede der Linsen bis auf praktisch vernachlässigbare Restfehler über die Dispersionskorrektur (s. Kap. 3.2.3.3) abzugleichen sind. Die Restfehler sind auf die unterschiedlichen Dispersionseigenschaften der bei der Linsenherstellung verwendeten Glasarten, die mit einem einzelnen Keilpaar nicht kompensierbar sind, zurückzuführen. Für die Bildrestauration kann die PSF für alle genutzten Detektionskanäle aufgenommen werden und so den verbliebenen chromatischen Unterschieden Rechnung getragen werden.

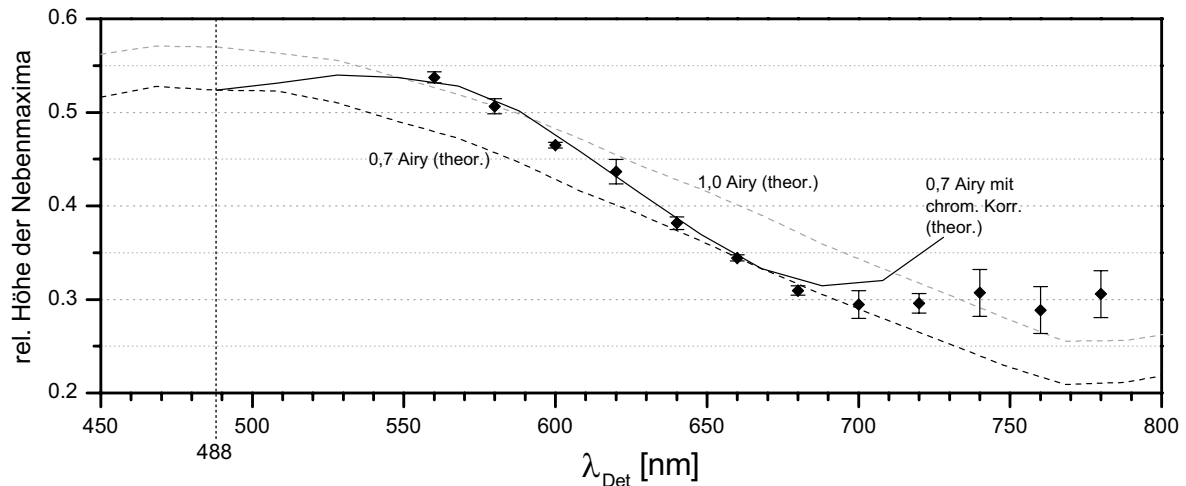


**Abbildung 5.1:** *xz*-Aufnahme einer Polydiacethylenschicht mit dem 4Pi-konfokalen Typ C Mikroskop mit 1-Photonen-Anregung sowie die experimentellen *z*-Antworten und OTFs. Die Aufnahmen wurden mit Öl-Immersionsoberflächen mit einer NA von 1.4 gemacht. Die Anregungswellenlänge betrug 532 nm. Detektiert wurde simultan auf drei Kanälen: Zwischen 565 und 600 nm, zwischen 600 und 650 nm sowie zwischen 650 und 700 nm. Die Detektionslochblende hatte einen Durchmesser von ca. 2/3 des Airy-Scheibendurchmessers bei 568 nm.

Die dargestellten *z*-Antworten sowie ihre Fouriertransformaten wurden aus den gezeigten Aufnahmen extrahiert. Schwarz ist die konfokale PSF bzw. MTF gezeigt; blau, grün und rot stellen die 4Pi-konfokalen Signale in den drei zuvor genannten Detektionskanälen (in dieser Reihenfolge) dar. Gut zu erkennen ist, wie die Höhe der Nebenmaxima mit wachsendem Stokes-Shift bis auf ca. 35% der Höhe des Hauptmaximums sinkt und entsprechend die Minima in der MTF weniger ausgeprägt erscheinen.

Die gezeigten *z*-Antworten wurden mit Leica Öl-Immersionsoberflächen HCX PL APO 100x/1.4 OIL aufgenommen. Mit den anderen in Kap. 3.3 aufgeführten für die 4Pi-Mikroskopie verwendbaren Objektiven konnten ebenfalls Nebenmaximahöhen von 35% erzielt werden.

Abb. 5.2 zeigt die aus Aufnahmen von Polydiacethylenschichten extrahierten Nebenmaximahöhen relativ zur Hauptmaximumshöhe in Abhängigkeit von der Detektionswellenlänge. Für die Messung wurde das Detektionsspektrum in 20 nm-Schritten mit Hilfe des Leica TCS SP-Detektors abgefahren und sukzessive Aufnahmen gemacht. Die gezeigten Werte sind die Mittelwerte von bis zu 4 Aufnahmen. Auch hier wurden die Öl-Immersionsoberflächen mit einer NA von 1,40 genutzt. Die Anregungswellenlänge war 488 nm. Die Detektionslochblende hatte einen Durchmesser von 0,7 Airy-Scheiben bezogen auf eine Wellenlänge von 568 nm. Der theoretische Verlauf bei Annahme der experimentellen Detektionslochblendengröße wird prinzipiell durch die experimentellen Daten bestätigt, doch sind Abweichungen insbesondere weit oberhalb und weit unterhalb von  $\lambda_{Det} = 660$  nm auffallend. Diese Abweichungen können nicht durch einen falsch gewählten Lochblendendurchmesser erklärt werden: Eine größere Lochblende führt unabhängig von der Wellenlänge zu einer Verschiebung zu größeren Nebenmaximahöhen. Theorie und Experiment stimmen jedoch gut überein, wenn man die chromatischen Längsfehler der Objektive berücksichtigt. Für die Simulation wurde näherungsweise von einem parabelförmigen Verlauf des Farblängsfehlers mit einem Wert von 0 bei  $\lambda = 668$  nm bezogen auf  $\lambda = 488$  nm ausgegangen. Das Minimum der Parabel liegt bei  $\lambda = 578$  nm und entspricht einer axialen Fokusverschiebung von 200 nm gegenüber  $\lambda = 488$  nm. Diese Annahme entspricht typischen Farblängsfehlerverläufen von Objektiven dieser oder ähnlicher Bauart. Die Abweichungen der experimentellen Daten oberhalb von 700 nm lassen sich durch die schlechte Näherung des Farblängsfehlers durch eine Parabel für diesen Wellenlängenbereich



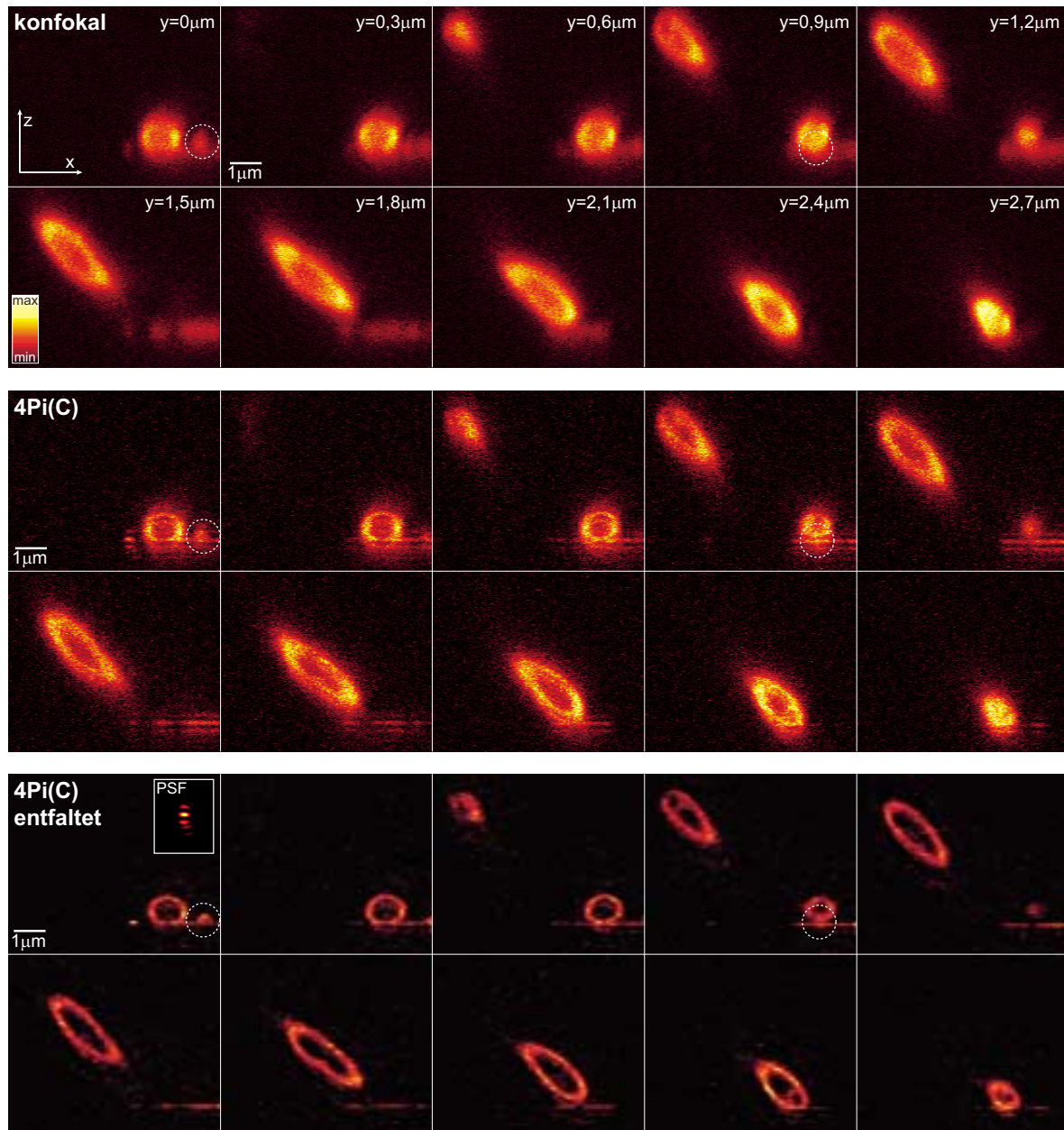
**Abbildung 5.2:** Experimentelle und theoretische relative Höhen der Nebenmaxima. Die experimentellen Daten wurden aus 4Pi-konfokalen Typ C Aufnahmen von Polydiacethylenschichten gewonnen. Schwarz gestrichelt ist der theoretische Verlauf bei Annahme des experimentell vorliegenden Lochblendendurchmesser eingezeichnet. Die graue, gestrichelte Linie zeigt den Verlauf bei einem etwas größeren Durchmesser der Fokulationslochblende. Am besten ist die Übereinstimmung mit den experimentellen Daten unter der Annahme eines parabelförmigen Farblängsfehlerverlaufs mit einem Minimum von 200 nm Tiefe bei  $\lambda=578$  nm relativ zu  $\lambda=488$  nm. Dieser Verlauf ist als schwarze, durchgehende Linie eingezeichnet.

erklären.

## 5.2 Aufnahmen von *Escherichia coli* Bakterien

Anhand der Aufnahmen von *Escherichia coli* Bakterien kann gezeigt werden, dass mit 1-Photonen-Anregung in der 4Pi-konfokale Mikroskopie artefaktarme, strukturaufgelöste Aufnahmen biologischer Objekte gemacht werden können.

Abb. 5.3 zeigt xz-Schnitte der dreidimensionalen Aufnahmen der mit dem Fluoreszenzfarbstoff DiA gefärbten Zellmembranen. Die stabförmigen Bakterien haben einen Durchmesser von ca. 800 nm. Zum Vergleich wurden Aufnahmen der gleichen Stelle mit nur einem Arm des 4Pi-Moduls gemacht, die einer gewöhnlichen konfokalen Aufnahme entsprechen. Die in 80%-igem Glycerin eingebetteten Bakterien wurden mit den in Kap. 3.3 beschriebenen Glycerin-Immersionsobjektiven mit einer numerischen Apertur von 1,35 aufgenommen. Angeregt wurde bei einer Wellenlänge von 488 nm bei einem Detektionslochblendendurchmesser von 0,7 Airy-Scheiben (bezogen auf 568 nm). Um den positiven Effekt des Stokes-Shifts auf die PSF auszunutzen, wurde bei der 4Pi-konfokalen Aufnahme zwischen 650 und 700 nm detektiert. Bei der konfokalen Referenzaufnahme wurde dagegen zum gerechteren Vergleich auf einem anderen Kanal im helleren Bereich zwischen 600 nm und 650 nm aufgenommen, um den Signalverlust durch die einseitige Detektion zu kompensieren. Anhand eines parallel aufgenommenen fluoreszierenden Kügelchens (“bead”) wurde die PSF bestimmt, die für die Entfaltung nach Richardson und Lucy [40, 41, 42] genutzt werden konnte.



**Abbildung 5.3:**  $xz$ -Schnitte aus einem dreidimensionalen Datensatz zweier *E. coli* Bakterien im Vergleich zwischen einer konfokalen und einer 4Pi-konfokalen Typ C-Aufnahme. Das eine Bakterium liegt auf dem horizontal orientierten Deckglas, auf dem sich stellenweise ein fluoreszierender Polydiacetylenfilm befindet, während das andere nur mit einem Ende das Deckglas berührt und diagonal im Einbettmedium schwebt.

Gezeigt sind jeweils 10 axiale Schnitte im Abstand von  $300\text{ nm}$  mit einer Kantenlänge von jeweils  $6,7\text{ }\mu\text{m}$  mal  $5,8\text{ }\mu\text{m}$ . Der erste Datensatz zeigt die Rohdaten der konfokalen Referenzaufnahme. In der Mitte sind die Rohdaten des gleichen Probenausschnitts aufgenommen im 4Pi-konfokalen Typ C-Modus dargestellt. Darunter ist der selbe Datensatz nach einer Maximum-Likelihood-Rekonstruktion unter Verwendung der dargestellten PSF gezeigt.

Der Auflösungsgewinn läßt sich am besten an den durch gestrichelte Ringe gekennzeichneten Strukturen erkennen. Es wurde jeweils die gleiche Farbtabelle benutzt, die auf die vorkommenden Minimal- und Maximalwerte normiert wurde.

## Kapitel 6

# Abstandsmessung an sekretorischen Granula

### 6.1 Biologischer Hintergrund

Fusionsprozesse intrazellulärer Membranen spielen in vielen zellulären Prozessen eine tragende Rolle. Verschiedene unter dem Oberbegriff SNARE (*SNAP* Rezeptoren<sup>1</sup>) zusammengefasste Proteine wurden die letzten Jahre als Motoren des Fusionsprozesses identifiziert. Die Vorstellung ist, dass ein Komplex aus zwei SNARE-Proteinen in der einen Membran mit einem korrespondierenden SNARE-Protein in der anderen Membran bindet (s. Abb. 6.1) und sie sich von den N-terminalen Enden her reißverschlussartig zusammenziehen. Dadurch nähern sich die beiden Membranen an und die Potenzienschwelle zwischen ihnen kann durch die bei der Konformationsänderung freiwerdende Energie überwunden werden.<sup>2</sup> Als Einführung wird auf den Artikel von Jahn und Hanson [43] verwiesen.

In den letzten Jahren konnte über funktionelle und strukturelle Studien (vor allem mit Elektronenmikroskopen, FRET und der Analyse der Kristallstruktur) dieses Modell gebildet und verfeinert werden. Keine Technik erlaubte jedoch bisher die direkte Beobachtung des Annäherungsprozesses zwischen den Membranen. Durch die deutlichen Fortschritte in der 4Pi-konfokalen Mikroskopie, die in den vorangegangenen Kapiteln geschildert wurden und die nun den Routineeinsatz dieser Mikroskopietechnik erlauben, konnte die Untersuchung der geschilderten komplexen biologischen Fragestellung angegangen werden. Die Möglichkeit der 1-Photonen-Anregung gemeinsam mit der Detektion mehrerer spektral unterschiedlicher Fluoreszenzkanäle erlaubt Lokalisierungsmessungen signalschwacher Proben mit einer gegenüber der Konfokalmikroskopie deutlich gesteigerten Präzision (s. Kap. 2.3). Konkret kann nun hier der Abstand zwischen den sekretorischen Granula und der Plasmamembran neuroendokriner Zellen (PC12) vermessen werden.<sup>3</sup>

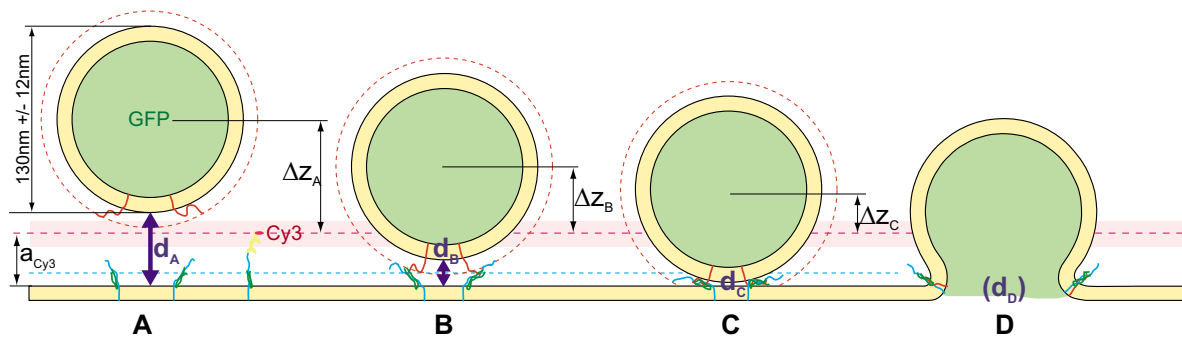
---

<sup>1</sup>SNAP steht für “soluble NSF-attachment proteins”. Die ATPase NSF kann gemeinsam mit SNAPs SNARE-Komplexe trennen.

<sup>2</sup>In der neuronalen Exocytose konnte als verantwortliches SNARE-Protein in der synaptischen Vesikelmembran Synaptobrevin identifiziert werden. Auf der Seite der Plasmamembran ist Syntaxin im Komplex mit (SNAP)-25 (synaptosome-associated protein) für den Fusionsprozeß maßgeblich.

<sup>3</sup>In diesen Zellen sind die gleichen SNAREs im Einsatz wie bei der neuronalen Exocytose.





**Abbildung 6.1:** Schema des Fusionsprozesses intrazellulärer Membranen am Beispiel der Exozytose in PC12-Zellen. Sekretorische Granula kommen an der Plasmamembran an (A). Nähern sie sich soweit, dass die Einflussbereiche der SNAREs sich überlappen (dargestellt durch die roten gestrichelten Kreise bzw. die blaue gestrichelte Linie), kann das SNARE Synaptobrevin (rot dargestellt) des Granulums an das im Komplex mit (SNAP)-25 (grün eingezeichnet) vorliegende SNARE Syntaxin (blau) der Plasmamembran ankoppeln (B). Die Konformationsänderung, die das Vesikel weiter an die Membran zieht (C), kann schließlich zur Fusion (D) führen. In den durchgeführten Versuchen waren die Granula mit dem mit GFP gekoppeltem Neuropeptid NPY gefüllt. Das Syntaxin war über eine Antikörperfärbung mit Cy3 markiert. Gemessen wurden folglich die Abstände  $\Delta z$ . Um daraus die Abstände  $d$  extrahieren zu können, muss der Durchmesser der Granula sowie der Abstand des Cy3 von der Plasmamembran berücksichtigt werden.

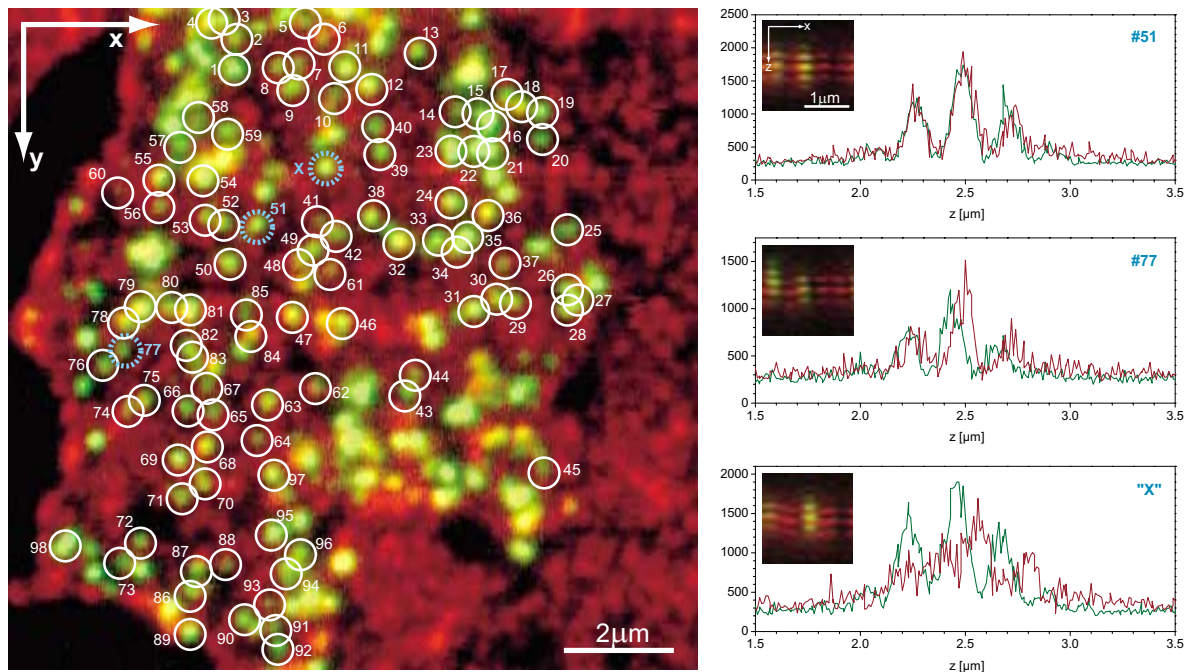
## 6.2 Messprotokoll

### 6.2.1 Präparation

Drei verschiedene Proben mit GFP-gefüllten Granula und Cy3-gefärbtem Syntaxin werden hergestellt:

- Membranen von Zellen, die Kalzium ausgesetzt werden,
- Membranen von Tetanus-Toxin koexprimierenden Zellen und
- Membranen, die keiner dieser Behandlungen ausgesetzt wurden, als Kontrolle.

Die PC12-Zellen werden mit NPY-GFP transfiziert, auf Deckgläser gesetzt und kultiviert. Im Falle der Tetanus-Toxin-Exprimierung wird die Transfektion gemeinsam mit dem NPY-GFP vorgenommen. Nach zwei Tagen werden die Deckgläser zur Versteifung der Phospholipide der Membran in ein Eisbad gelegt und dann einem Ultraschallpuls ausgesetzt, um die Zellen zu zerreißen. Zu einem Anteil von wenigen Prozent bleibt dabei der am Deckglas haftende Teil der Zellmembran kleben [44]. Diese aus ihrer natürlichen biochemischen Umgebung gerissenen, hochreaktiven Zellreste, die sogenannten "Patches", werden sofort je nach Versuchsbedingung einer Lösung mit oder ohne Kalzium ausgesetzt. Im Anschluss werden die Proben mit einer 4-prozentigen PFA-Lösung zwei Stunden bei 4°C fixiert. Danach wird eine Anfärbung der Syntaxin-Moleküle mit dem Farbstoff Cy3 (Amersham, Braunschweig) über Antikörper vorgenommen. Das PFA wird dazu wieder ausgewaschen. Anschließend werden die Zellen in einem PBS-Puffer aufbewahrt. Die Proben werden anonymisiert, um eine Blindmessung und -auswertung durchführen zu können.



**Abbildung 6.2:** Beispiel einer "Patch"-Aufnahme und exemplarische Profile über einzelne Granula. Die laterale Übersicht wurde aus der axialen Projektion eines aufgenommenen Datensatzes gewonnen. Die Farbtabelle ist zur besseren Darstellung gesättigt. Die auswertbaren Vesikel sind weiß umrandet. Als Beispiel sind die Profile über Vesikel #51 und #77 gezeigt sowie über eines der Vesikel (mit "X" gekennzeichnet), die anhand des 4Pi-Profiles als nicht auswertbar klassifiziert werden konnten. Aus den Profilen ist der unterschiedliche Abstand der Vesikel zur Membran zu erkennen. Aus dem Fit ergibt sich ein Abstand  $\Delta z$  von  $12 \pm 2$  nm für Vesikel #51 und  $45 \pm 2$  nm für #77. Zu den Profilen sind die entsprechenden xz-Schnitte durch den Datensatz gezeigt. Diese wurden entlang der y-Achse über ca. 300 nm gemittelt, um für die Darstellung das SNR zu verbessern.

Unter einem gewöhnlichen Lichtmikroskop werden die Deckgläser untersucht, um Proben herauszufinden, die eine möglichst hohe Dichte an "Patches" aufweisen. Diese in PBS gepufferten Proben werden dann mit einem zweiten Deckglas versehen und mit Nagellack versiegelt. Eines der Deckgläser ist teilweise verspiegelt, um eine leichtere Justage des 4Pi-konfokalen Mikroskops vornehmen zu können.

## 6.2.2 Aufnahmeverfahren

Die versiegelten Proben werden in das 4Pi-konfokale Mikroskop eingelegt, das Mikroskop nachjustiert und geeignete Stellen ausgesucht.

Es werden Bildstapel von xz-Schnitten in einem Abstand von 65,1 nm entlang der y-Achse aufgenommen. Die xz-Schnitte bestehen aus 512 mal 512 Bildpunkten mit einer Pixelgröße von lateral 24,4 nm und axial 8,35 nm und werden viermal gemittelt. Die Zahl von xz-Schnitten wird an das jeweilige aufzunehmende "Patch" angepasst und liegt typischerweise zwischen 80 und 240 Schnitten. Die Aufnahmezeit beträgt zwischen 8 und 25 Minuten. Da eine leichte, relative Drift der Objektivfokusse zueinander beobachtet werden kann, die auf Raumtemperaturschwankungen zurückgeführt wird, wird die Position des unteren Objektivs alle 5 bis 10 Minuten mit Hilfe des Piezos korrigiert.

Die Probe wird mit der 488 nm-Linie eines Argon-Lasers zur Fluoreszenz angeregt. Die Detektionslochblende wird auf einen Durchmesser eingestellt, der 0,80 Airy-Scheibendurchmessern bei einer Wellenlänge von 568 nm entspricht. Parallel werden drei Kanäle aufgenommen: Auf dem ersten Kanal wird zur Dokumentation der Justage das durch beide Objektive transmittierte Laserlicht aufgenommen. Dieses Signal reagiert sehr empfindlich auf die relative Verschiebung der Fokusse der beiden Objektive zueinander. Über einen Reflektionskurzpass mit einer Kante bei 580 nm und einem Bandpass 530/30 wird das GFP-Signal mit einem zweiten Photomultiplier aufgenommen. Das Cy3-Signal wird hinter dem Reflektionskurzpass oberhalb von 580 nm und hinter einem Langpass 590 mit einer Avalanche-Photodiode (s. Kap. 3.4) detektiert. Die höhere Quanteneffizienz dieses Detektors ermöglicht die Aufnahme des Cy3-Signals, obwohl die Anregungswellenlänge von 488 nm weit außerhalb des idealen Anregungsbereichs liegt, und ein erheblicher Anteil des Fluoreszenzlichts aufgrund der Detektion oberhalb von 590 nm ausgefiltert wird. Durch diese Konstellation kann das Übersprechen zwischen den Fluoreszenzkanälen verringert werden und gute Bedingungen für eine 4Pi-Typ C-Aufnahme auf mehreren Kanälen gewährleistet werden.

### 6.3 Auswertung

Ein im GFP-Kanal vorhandener geringer Anteil des transmittierten Laserlichts wird mit Hilfe des aufgenommenen Laserlichtkanals aus den GFP-Daten herausgerechnet. Da das an den Detektoren ankommende Laserlicht durch die geringe Drift der Objektive leicht schwankt, ist dieser Prozess zur besseren Darstellung bei der axialen Projektion der aufgenommenen Daten hilfreich. Ansonsten addiert sich der eigentlich sehr schwache Anteil im Gegensatz zu dem axial auf wenige Pixel konzentriertem Fluoreszenzsignal auf und erzeugt störende Streifen im axial projizierten Übersichtsbild. Für die eigentliche Analyse der Daten ist die Korrektur allerdings nicht notwendig.

Anschließend werden mit Hilfe der axialen Projektion der aufgenommenen dreidimensionalen Datensätze die Granula vorausgewählt. In 10% bis 20% der Fälle muss erfahrungsgemäß auf eine Auswertung einzelner Granula verzichtet werden, da entweder anhand des 4Pi-Signals erkennbar mehrere Granula zu eng beieinander liegen oder das Syntaxin in der Nähe des Vesikels nicht in einer eindeutig identifizierbaren Schicht vorliegt. Diese Beurteilung wird durch die erhöhte Auflösung des 4Pi-konfokalen Gerätes ermöglicht und wäre in einem konfokalen Mikroskop nur in Einzelfällen machbar.

Die für eine Auswertung nutzbaren Granula werden einzeln dokumentiert und axiale Profile sowohl für den GFP- als auch für den Cy3-Kanal berechnet. Für die Profile wird über einen 122 nm mal 130 nm großen lateralen Bereich um das Intensitätsmaximum des aufgenommenen Granulums herum gemittelt. Dabei wird die Verschiebung zwischen den beiden Kanälen aufgrund der APD-Elektronik gemäß Kap. 3.4 korrigiert.

An die ermittelten Profile wird mit Hilfe eines Maximum-Likelihood-Verfahrens (Levenberg-Marquardt-Methode, Microcal Origin 6.1) jeweils eine theoretische, konstruktive PSF mit der passenden Detektionswellenlänge gefittet. Als Fit-Parameter werden neben einem Untergrund die Amplitude und die axiale Position zugelassen.

Die Differenz  $\Delta z$  zwischen den aus dem Fit ermittelten axialen Positionen des GFP- und des Cy3-Schwerpunkts wird bestimmt. Um den eigentlichen Abstand  $d$  zwischen der Vesi-

kelmembran und der Plasmamembran zu berechnen, wird der mittlere Radius der Granula abgezogen und der Abstand des Cy3 von der Plasmamembran addiert. Zusätzlich muss noch eine Korrektur für eine teilweise nicht perfekt eingestellte Dispersion bzw. einen schlechten Weglängenabgleich vorgenommen werden (s. Kap. 6.4.1.3).

## 6.4 Meßgenauigkeit

Das Fit-Verfahren ermittelt bei dem typischerweise auftretenden SNR Standardabweichungen von ca. 2 nm für die axiale Position. Ein Test anhand der mehrfachen Aufnahme fluoreszierender Kügelchen (beads) und dem anschließenden Fit konnte diese Werte bestätigen. Sie liegen damit weit unter den Unsicherheiten aufgrund der biologischen Struktur und den systematischen physikalischen Fehlern.

### 6.4.1 Systematische Fehler physikalischen Ursprungs

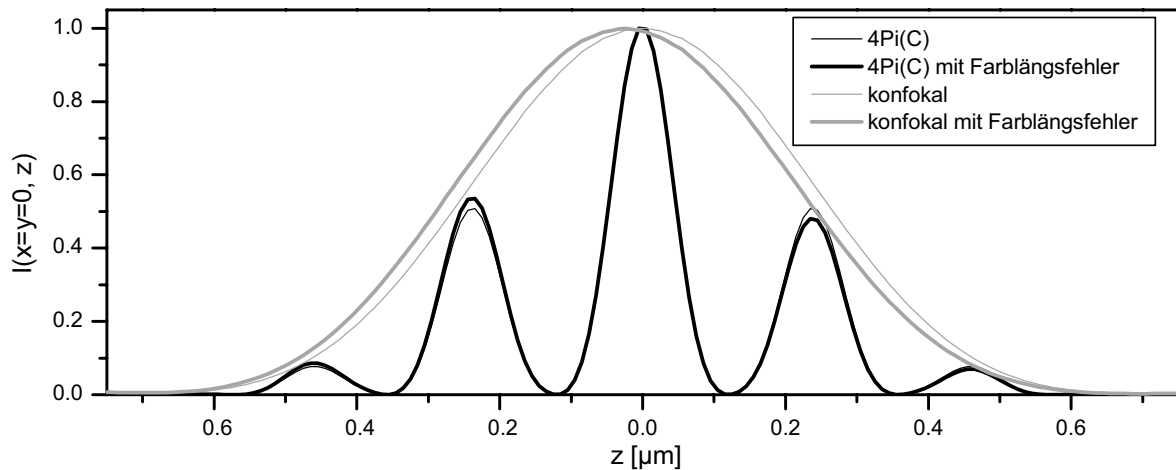
#### 6.4.1.1 Übersprechen zwischen den Fluoreszenzkanälen (Crosstalk)

Aufgrund der für das Cy3 ungünstigen Anregungswellenlänge von 488 nm ist die Cy3-Fluoreszenz relativ schwach verglichen mit der des GFPs. Durch die hohe Quanteneffizienz der Avalanche-Photodiode wird trotzdem ein ausreichendes Signal detektiert. Allerdings konkurriert die Cy3-Fluoreszenz mit dem extrem geringen Anteil des GFP-Emissionsspektrums oberhalb von 590 nm. Experimentelle Abschätzungen ergeben ein Übersprechen der GFP-Fluoreszenz auf den Cy3-Kanal, das ungefähr 20% des GFP-Signals entspricht. Diese einfach vorzunehmende Korrektur führt je nach Helligkeit des betroffenen Vesikels zu einer Erhöhung von 5% bis 15% des ohne Korrektur ermittelten Abstandswertes.

#### 6.4.1.2 Farblängsfehler

Der bei Kollisionsmessungen mit konfokalen Laserrastermikroskopen sehr problematische Farblängsfehler spielt im 4Pi-konfokalen Fall nur eine untergeordnete Rolle (s. Abb. 6.3). Die Gründe hierfür sind folgende:

- Durch die Detektion über 2 einander entgegengesetzten Objektiven kommt es bei Objektiven mit dem gleichen Farblängsfehler zu einer chromatischen Verbreiterung der effektiven Detektions-PSF anstelle einer Schwerpunktsverschiebung. Sind die Objektive nicht bzgl. ihrer chromatischen Aberrationen gepaart, so sind die Unterschiede in den meisten Fällen geringer als die absoluten Farblängsfehlerwerte der einzelnen Objektive.
- Die Lokalisierung im 4Pi-konfokalen Mikroskop geschieht nicht durch eine Schwerpunktsfindung der einhüllenden konfokalen PSF sondern der einzelnen Maxima der 4Pi-konfokalen PSF. Die Lage der Maxima ist aber maßgeblich durch die Phasendifferenz der Teilstrahlen definiert. Bei einer Verschiebung eines der Fokusse der Objektive verändert sich die Lage der Interferenzmaxima nur sehr wenig (s. Abb. 6.3).



**Abbildung 6.3:** Auswirkungen des Farblängsfehlers eines Objektivs auf die PSF in der konfokalen und der 4Pi-konfokalen Mikroskopie. Verglichen wird ein Farblängsfehler von 100 nm in der Detektion mit dem farblängsfehlerlosen Fall. Im 4Pi-konfokalen Mikroskop wird der asymmetrische Fall, bei dem nur ein Objektiv diesen Fehler aufweist, betrachtet. Der Fit an die Kurven analog dem oben geschilderten Verfahren führt auf einen Lokalisierungsfehler von 22,8 nm im konfokalen Fall und auf den 62-mal kleineren Wert von 0,37 nm im 4Pi-konfokalen Mikroskop.

Für die Berechnung wurde von Wasser-Immersionsobjektiven mit einem halben Öffnungswinkel von 1,1 rad ausgegangen, einer Beleuchtungswellenlänge von 488 nm und der Detektion bei 590 nm mit einem Durchmesser der Detektionslochblende entsprechend dem einer Airy-Scheibe.

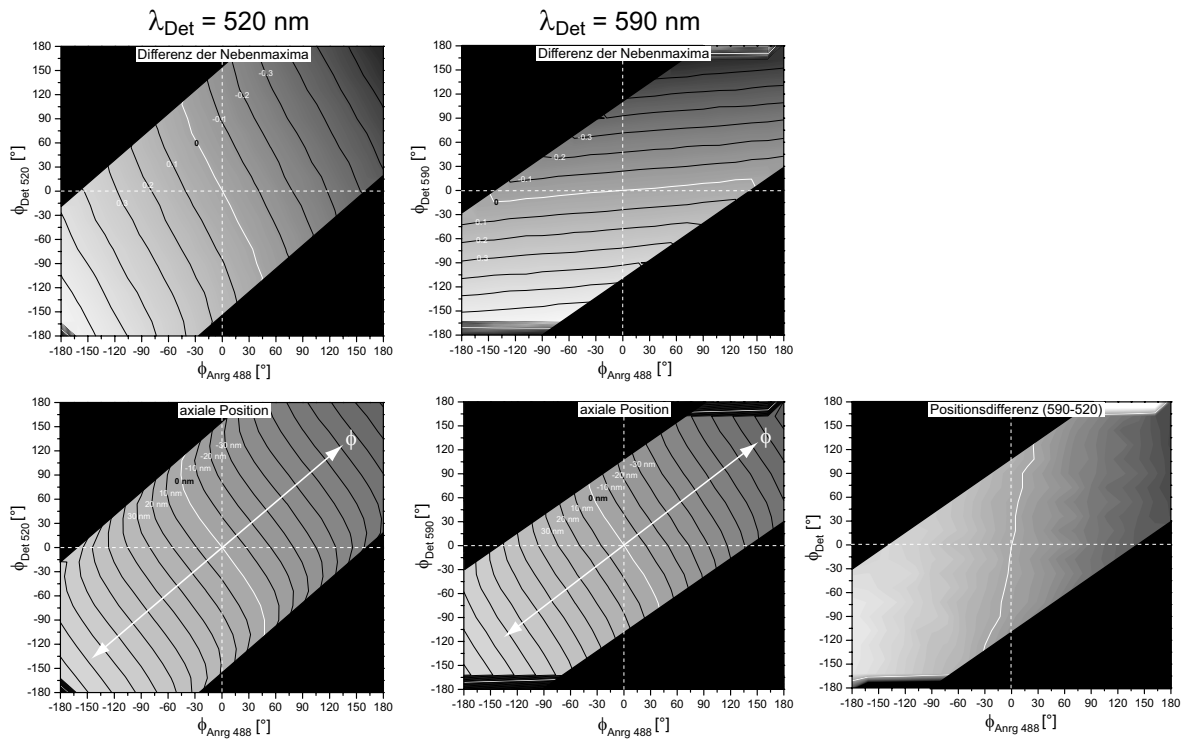
### 6.4.1.3 Phasendifferenz und Dispersion

Die Phasen- und Dispersionseinstellung nimmt in der 4Pi-konfokalen Mikroskopie des Typs C als maßgebliche Größe bei der Lokalisationsmessung die Rolle des Farblängsfehlers in der konfokalen Mikroskopie ein. Grund ist, dass die Lage der Interferenzmaxima stark von diesen Parametern abhängt. Wird bei der Lokalisationsauswertung die vorliegende Phasendifferenz und Dispersionskorrektur nicht berücksichtigt, ergeben sich starke Abweichungen, die im Extremfall bis zu 100 nm von der eigentlichen Position des aufgenommenen Objekts betragen können (s. Abb. 6.4).

Zu betrachten ist allerdings die Differenz der auftretenden Abweichungen zwischen zwei Detektionskanälen, da Abstände und keine absoluten Positionen bestimmt werden sollen. Wie anhand der Darstellung der Differenz der axialen Positionen festgestellt werden kann, hat die Detektionswellenlänge nur einen geringfügigen Einfluss auf die Abhängigkeit der Positionsbestimmung von der Phase. Wenn die Phasen in den beiden Kanälen identisch sind, werden im dargestellten Bereich selbst am Rand nur Differenzen von unter 7 nm erreicht.

Die Einstellung der Phase erfolgt in der Praxis über den Weglängenabgleich. Man bewegt sich dabei innerhalb der in Abb. 6.4 dargestellten Diagramme entlang des weißen Pfeils. Je nach Stokes-Shift ist der Pfeil mehr oder weniger stark geneigt.<sup>4</sup> Verändert man den Weglängenabgleich um mehr als  $180^\circ$  für die Anregungswellenlänge und verlässt somit den dargestellten Bereich, so tritt man aufgrund der Periodizität auf der anderen Seite wieder in das Diagramm ein, allerdings entsprechend der Pfeilneigung im Diagramm um einige Grad vertikal versetzt (modulo  $360^\circ$ ) und somit nicht mehr auf einer Geraden durch das Zentrum. Der dadurch ent-

<sup>4</sup>Für einen Stokes-Shift von Null ist der Pfeil parallel zur Diagonalen ausgerichtet.



**Abbildung 6.4:** Verhalten von Konstruktivität und Lage effektiver  $4Pi$ -konfokaler PSFs vom Typ C bei Veränderung der Phase und/oder der Dispersion. Für die Detektionswellenlängen 520 nm und 590 nm wurde die Differenz zwischen den Höhen der Nebenmaxima (normiert auf die Hauptmaximumshöhe, Linien sind bei Vielfachen von 0,1 eingezeichnet) und die sich bei einem Fit mit einer konstruktiven PSF ergebende axiale Position gegen die Phasen von Anregung ( $\phi_{Anrg\ 488}$ ) und Detektion ( $\phi_{Det\ 520}$  bzw.  $\phi_{Det\ 590}$ ) aufgetragen (Linien alle 10 nm).  $\pm 180^\circ$  entspricht dabei der destruktiven PSF. Die Abbildung rechts unten stellt die Differenz zwischen den beiden Abbildungen links davon dar. Die maximalen Werte liegen unter 7 nm.

Die Verstellung des Weglängenabgleichs, die zur Feineinstellung der Phasendifferenz  $\phi$  zwischen den beiden Interferometerarmen genutzt wird, führt zu einer Verschiebung der Detektions- und Anregungsphasen entlang des weißen Pfeils. Eine Veränderung des Dispersionsabgleichs führt neben einer Veränderung des Weglängenabgleichs zu einer Verschiebung senkrecht zu dieser Richtung.

In den geschwärzten Bereichen gibt ein Vergleich mit einer konstruktiven PSF aufgrund der starken Abweichung keinen Sinn. Auf eine Evaluation dieser Bereiche wurde deshalb verzichtet.

stehende Zustand ähnelt dem einer Fehljustage des Dispersionsabgleichs, bei dem die Phasen nicht in einem festen Verhältnis zueinander stehen. Durch einen nicht optimierten Weglängenabgleich oder die Fehljustage des Dispersionsabgleichs können sich die Phasen der beiden Detektionskanäle daher relativ stark voneinander unterscheiden, obwohl die Anregungswellenlänge die selbe ist. Dies kann zu einer Differenz in der Positionsbestimmung führen, die im Extremfall bis zu 50 nm betragen kann. Eine Korrektur muss daher auf alle Fälle vorgenommen werden.

Aus den aufgenommenen Daten kann die Differenz der Höhen der Nebenmaxima normiert auf die Höhe des Hauptmaximums entnommen werden. Diese Größe ist ein Maß dafür, wie konstruktiv die PSF ist. Eine genaue Bestimmung von Anregungs- und Detektionsphase ist daraus allerdings nicht möglich. Man kann die möglichen Kombinationen zwischen den beiden Phasen nur auf eine Linie, wie in den Diagrammen in Abb. 6.4 gezeigt, beschränken. Nur aus der zusätzlichen Kenntnis der Dispersion, die den Unterschied zwischen den Phasen bestimmt,

könnten die Phasen ermittelt werden.

Eine deutlich einfachere Methode, die weniger mögliche Unsicherheiten beinhaltet, ist, eine mehrfarbige Referenz, deren räumlicher Abstand zwischen den Kanälen bekannt ist, mit der Probe aufzunehmen. Standardmäßig bieten sich dazu fluoreszierende, mehrfarbige Kügelchen (Beads) mit einem Durchmesser um die 100 nm an. Aus der Kenntnis der Kolo-kalisation der zwei Farbstoffe lässt sich der für die eigentliche Probe zu verwendende Korrekturwert ermitteln.

#### 6.4.1.4 Sonstige Einflüsse

Um den Einfluss anderer Fehlerquellen wie mechanische Schwingungen und elektronisches Rauschen abschätzen zu können, wurden Testaufnahmen von zweifarbigen Beads gemacht und die Kolo-kalisation überprüft. Die Intensität wurde so angepasst, dass ungefähr das gleiche SNR der biologischen Aufnahmen erreicht wurde.

Die Breite der Verteilung, die sich aus der Auswertung mehrerer Beads ergab, lag im Rahmen der zu 2 nm errechneten Standardabweichung der z-Position des Fits.

### 6.4.2 Biologische Parameter

In den hier beschriebenen Messungen werden die Schwerpunkte der Farbstoffverteilungen von GFP und Cy3 gemessen. Um aus den gemessenen Daten den Abstand zwischen der intrazellulären Seite der Plasmamembran und der Außenseite der Granula ableiten zu können, muss nach Korrektur aller physikalischer systematischer Fehler die Struktur des biologischen Systems und die relative Position der Farbstoffmoleküle berücksichtigt werden.

#### 6.4.2.1 Durchmesser der Granula

Die Durchmesser der Granula der neuroendokrinen Zelllinie PC12 wurden von [45] aus elektronenmikroskopischen Aufnahmen abgeleitet. Für die Durchmesser des “dense cores” ergab sich eine annähernd gaussförmige Verteilung mit  $120,0 \pm 11,7$  nm. Die Vesikelmembran liegt normalerweise an dem dichten Kern an. Unter Berücksichtigung der Membrandicke von 5 nm ergibt sich somit ein Radius von  $65,0 \pm 5,9$  nm, der von  $\Delta z$  abgezogen werden muss.

#### 6.4.2.2 Abstand der Cy3-Farbstoffmoleküle von der Plasmamembran

Die an die Plasmamembran gebundenen Syntaxinmoleküle sind über zwei Antikörper mit Cy3 gefärbt. Aus der Strukturanalyse von Syntaxin [46, 47] ist bekannt, dass Syntaxin aus zwei Untereinheiten, der ca. 7 nm langen Habc- und der H3-Gruppe mit ca. 12 nm Länge besteht. Mit der H3-Gruppe ist Syntaxin an die Plasmamembran gebunden und steht von dieser ab. Der ca. 7 nm lange erste Antikörper ist am Ende der Habc-Einheit des Syntaxins gebunden. Ein zweiter, an den das Cy3 gebunden ist, schliesst sich an. Unter der Annahme, dass der Komplex senkrecht von der Membran absteht, befindet sich der Farbstoff in einer Entfernung von  $a_{Cy3} = 33$  nm vor der Membran. Die Anordnung der Antikörper ist allerdings nicht genau bekannt und so sollte bei  $a_{Cy3}$  mit einem systematischen Fehler von bis zu 10 nm gerechnet werden.

### 6.4.2.3 Unebenheit der Plasmamembran und nicht senkrechte Bindung

Unter der Annahme, dass der Bindungszustand B (s. Abb. 6.1) maximal über die zweifache Länge der Syntaxinuntereinheit  $Habc$  reichen kann, beträgt seine Distanz  $d_B$  maximal ca. 14 nm. Bei einem Durchmesser des Vesikels von 120 nm ist das Vesikel daher maximal um 43 nm lateral versetzt (im Fall der Berührung mit der Plasmamembran), wenn die Bindung nicht senkrecht erfolgt. Der axiale Abstand variiert entsprechend zwischen 0 und 14 nm.

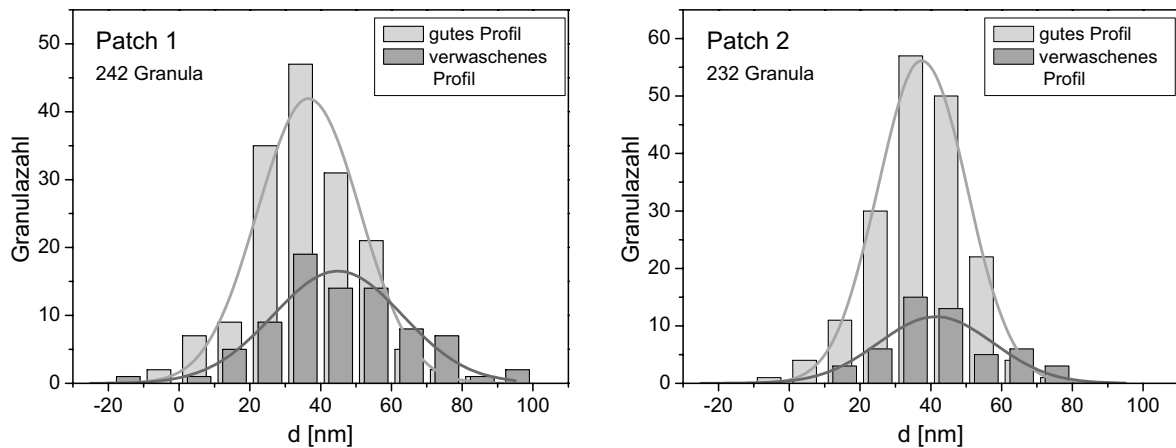
Die Syntaxincluster in der Plasmamembran, an die die Granula binden, bestehen aus  $\sim 10^3$  Molekülen. Daher ist die Wahrscheinlichkeit, dass nur ein SNARE-Paar bindet, extrem gering. Die Granula sind dadurch normalerweise gut fixiert und der maximale Abstand von 14 nm wird dadurch selten auftreten. Eine hierdurch bedingte Variation unterhalb der Streuung der Granularadien ist zu erwarten.

xz-Schnitte erster 4Pi-Aufnahmen der Proben (s. Abb. 6.2) zeigen, dass die Membran erwartungsgemäß nicht völlig flach ist. Variationen in der Höhe von bis zu 200 nm über mehrere 100 Nanometer Breite können beobachtet werden. Die Winkel zwischen der Membran und der Horizontalen betragen nicht mehr als  $15^\circ$ , wie aus den Daten entnommen werden kann. Bindet ein Vesikel an einer solchen schrägen Stelle senkrecht zur Membranoberfläche, wird fälschlicherweise der Abstand zur unter dem Vesikel liegenden Membran und nicht zur Bindungsstelle gemessen. Ist das Zentrum des Vesikels  $\Delta z = 65 \text{ nm} + 14 \text{ nm} - 33 \text{ nm} = 46 \text{ nm}$  von der Cy3-Färbung der Bindungsstelle entfernt, wird fälschlicherweise der Abstand zu einer lateral  $46 \text{ nm} \cdot \sin(15^\circ) = 12 \text{ nm}$  versetzten Stelle der Plasmamembran vermessen. Die Messung liefert allerdings mit  $46 \text{ nm} / \cos(15^\circ) = 47,6 \text{ nm}$  einen um nur 3,5% größeren Wert als den eigentlichen Abstand  $\Delta z$ . Berücksichtigt man, dass diese Konstellation selten vorkommt, kann dieser Effekt vernachlässigt werden.

Eine weitere Fehlerquelle stellen kleine, in der Größenordnung der lateralen Auflösung liegende Vertiefungen in der Plasmamembran dar. Liegt ein Vesikel in einer solchen Einbuchtung, wird aufgrund der auflösungsbedingten lateralen Mittelung die Syntaxinposition näher am Vesikel ermittelt, als es der Realität entspricht. Geht man wie eben von einem maximalen Winkel der Membran von  $15^\circ$  gegen die Waagerechte aus und rechnet mit einer cosinusartigen Vertiefung mit einem Durchmesser von 200 nm, so ergibt sich daraus eine Tiefe der Einbuchtung von 34 nm. Die gemittelte Position des Syntaxins liegt daher zwischen 0 und 34 nm je nach Verteilung des Syntaxins. Sie wird typischerweise bei ungefähr der Hälfte liegen und erzeugt somit einen Fehler in der Messung von ca. 20 nm. Ein Fehler in entgegengesetzter Richtung ergibt sich, wenn ein Vesikel auf einer Erhebung der Plasmamembran sitzt. Bei größeren Strukturen sind die Senkungen bzw. Erhebungen der Membran zwar stärker, doch entfällt der verwaschende Effekt der begrenzenden Auflösung und die Fehler in der Messung werden deutlich geringer.

Anhand elektronenmikroskopischer Aufnahmen [44] kann man sehen, dass die Vertiefungen mit kritischer Größe einen nicht zu vernachlässigenden Anteil der Membranoberfläche einnehmen. Von einer Standardabweichung in der Abstandsbestimmung von bis zu 10 nm muss daher ausgegangen werden.





**Abbildung 6.5:** Histogramme der Vesikelabstände  $d$  zweier Patches. Bei den einzelnen Patches wird zwischen Stellen mit guter 4Pi-Modulation, die ausgeprägte Minima in beiden Detektionskanälen aufweisen, und Stellen mit in mindestens einem der beiden Kanäle leicht verwaschenem Profil unterschieden. Stellen, mit kaum erkennbarer 4Pi-Modulation wie z.B. “X” in Abb. 6.2 wurden nicht in die Auswertung einbezogen. Die eingezeichneten Kurven stellen Gauß-Fits der Form  $A(d) = A_0 e^{-(d-d_0)^2/2b^2}$  dar. Es ergaben sich folgende Fit-Parameter:

Patch 1 – gutes Profil:  $d_0=36,7\pm 1,2$  nm,  $b=14,4\pm 1,0$  nm

Patch 1 –verwaschenes Profil:  $d_0=44,9\pm 2,2$  nm,  $b=18,3\pm 1,6$  nm

Patch 2 – gutes Profil:  $d_0=37,7\pm 1,0$  nm,  $b=12,5\pm 0,7$  nm

Patch 2 –verwaschenes Profil:  $d_0=41,4\pm 2,7$  nm,  $b=16,1\pm 2,6$  nm

Die  $d_0$ -Werte können nur innerhalb eines Patches miteinander verglichen werden. Die mittleren Abstände  $d_0$ , die eine saubere Modulation vorweisen, sind im Mittel etwas kleiner als die Abstände an Stellen mit verwaschenem Profil.

## 6.5 Ergebnisse

Die Auswertung der bisher aufgenommenen Daten zeigt, dass der Anteil der unspezifisch, nicht an Syntaxincluster gebundenen Vesikel mit unter 10% zu vernachlässigen ist. Bei weiterführenden Experimenten soll daher ein Membranfarbstoff benutzt werden, der eine Korrektur aufgrund des Abstand der Antikörperfärbung von der eigentlichen Membran überflüssig macht.

Die bisherigen Messungen erlauben noch keine Korrektur des aus der Dispersion und Phaseneinstellung stammenden systematischen Fehlers (s. Kap. 6.4.1.3). Die gewonnenen Daten sind daher nur bis auf einen unbekannt systematischen Versatz zu betrachten. Durch die parallele Aufnahme zweifarbiger Beads, können die physikalischen systematischen Fehler allerdings korrigiert werden.

Obwohl ein Vergleich zwischen verschiedenen Aufnahmen durch die fehlenden Korrekturwerte zur Zeit nicht möglich ist, können jedoch separate Aufnahmen genauer analysiert werden. Im Rahmen dessen wurden zwei Patches mit hoher Granulazahl ausgewertet. Ein Patch mit 242 auswertbaren Granula stammt aus der dritten, unbehandelten Gruppe (“Patch 1”). Das zweite Patch (“Patch 2”) stammte von einer Tetanus-Toxin koexprimierten Zelle. Auf ihm befanden sich 232 auswertbare Vesikel.

**Abhängigkeit der  $\Delta z$ -Verteilung vom Signalprofil** Für die einzelnen Patches wurden die ausgewerteten  $\Delta z$  nach der Güte des Profils beurteilt. Grundlage war ein vor der

Bestimmung der  $\Delta z$  dokumentierter visueller Eindruck, der vor allem die Tiefe der Minima im 4Pi-Profil berücksichtigte. Ein leicht verwaschenes 4Pi-Profil deutet auf eine Struktur hin, die von einem Punktobjekt bzw. einer lateralen Ebene abweicht. Für Granula bedeutet dies typischerweise, dass es sich um ein Cluster von mehreren Vesikeln innerhalb von ca. 200 nm handelt. Bei dem Syntaxin deutet dies auf eine Ausbeulung oder eine Doppellage der Membran hin.<sup>5</sup> Nicht berücksichtigt wurden bei dieser Analyse Stellen mit sehr schlechter 4Pi-Modulation in einem der beiden Kanäle. Diese wurden wie oben erwähnt vorher als nicht verwertbar aussortiert (s. z.B. Granulum "X" in Abb. 6.2).

Zu beobachten ist bei beiden Patches, dass die Verteilung der  $\Delta z$  im Fall mit ausgeprägter 4Pi-Modulation verglichen mit der Verteilung der Stellen mit weniger ausgeprägter Modulation im Mittel zu kürzeren Abständen verschoben ist und eine geringere  $1/\sqrt{e}$ -Breite aufweist (s. Abb. 6.5).

**Abhängigkeit der  $\Delta z$ -Verteilung von der Signalamplitude** Vergleicht man die  $\Delta z$ -Verteilungen relativ heller mit denen relativ dunkler Granula, so kann man die These, dass helle Granula ein größeres Volumen und damit einen größeren Radius besitzen und somit im Mittel einen größeren Abstand  $\Delta z$  aufweisen, nicht bestätigen. Die Verteilungen zeigen eher eine Tendenz in die andere Richtung, die statistisch allerdings noch nicht relevant ist.

**Abhängigkeit der  $\Delta z$ -Verteilung von der lateralen Position der Granula** Betrachtet man die Granula, die eindeutig direkt über dem Zentrum eines Syntaxinclusters liegen, getrennt vom Rest, so kann man keine relevanten Unterschiede in der  $\Delta z$ -Verteilung erkennen. Dies bestätigt die Vermutung, dass die SNARE-Bindung in praktisch allen Fällen senkrecht erfolgt.

---

<sup>5</sup>Insbesondere am Patchrand konnte oft eine sehr schlechte 4Pi-Modulation beobachtet werden. Dies deckt sich mit der Vorstellung, dass die abgerissenen Membranränder sich oft aufstellen oder zusammenklappen.

## Kapitel 7

# Zusammenfassung und Ausblick

Die in den vorangegangenen Kapiteln dargestellten Ergebnisse geben einen Einblick in die aktuellen Fortschritte der 4Pi-konfokalen Mikroskopie, einer Technik zur effizienten Erhöhung der axialen Auflösung in der Lichtmikroskopie. Nach Jahren der Beschränkung auf die 2-Photonen-Anregung wird hier die erfolgreiche Erweiterung auf die aus vielen Gründen (höhere Lichtausbeute, bessere Auflösung, einfachere Handhabung, flexiblere Wahl und Kombination von Wellenlängen) bevorzugte 1-Photonen-Anregung beschrieben.

Betrachtet man die theoretische OTF eines 4Pi-konfokalen Mikroskops des Typs A mit 1-Photonen-Anregung so fällt das ausgeprägte Minimum in der OTF bei der kritischen axialen Raumfrequenz  $k_c$  auf.<sup>1</sup> Diese schwache Übertragung bestimmter Raumfrequenzen, die sich u.a. in hohen Nebenmaxima von über 55% in der PSF widerspiegelt, erschwert die erfolgreiche Anwendung der 1-Photonen-Anregung in der 4Pi-konfokalen Mikroskopie erheblich. Konzepte mussten daher gefunden werden, die die für eine erfolgreiche Bildrekonstruktion essentiellen Raumfrequenzen in die OTF integrieren.

Als vielversprechende Grundlage für verschiedene Ansätze stellte sich der Typ C-Modus des 4Pi-konfokalen Mikroskops anstelle der üblichen und deutlich einfacher zu realisierenden Typ A-Variante heraus: Die Typ C-Realisierung schließt die Lücke in der OTF besser und bietet durch die Kombination der komplexeren OTFs in Anregung und Detektion mehr Angriffspunkte bei der Modellierung der effektiven OTF.

Eine Analyse der verschiedenen Einflüsse auf die 4Pi-OTF zeigt, dass die Verringerung der Detektionslochblendengröße und die Vergrößerung der Differenz zwischen Anregungs- und Detektionswellenlänge die OTF bei  $k_c$  deutlich verbessern.<sup>2</sup> Insbesondere die Kombination beider Effekte ermöglicht eine OTF, mit der biologische Strukturen in der Praxis artefaktfrei aufgelöst werden können, ohne zu Nachteilen wie extremen Lichtverlusten zu führen.

Grundsätzlichere Ansätze beinhalten die Erhöhung des Objektiv-Öffnungswinkels, mit dem die OTF deutlich an Qualität gewinnt.<sup>3</sup> Bei den in Verbindung mit dieser Arbeit entwickelten neuartigen Glycerin-Immersionsobjektiven [27] ist dieser Wert bereits unter Berücksichtigung einer möglichst geringen Bildfeldwölbung und minimaler chromatischer Aberrationen optimiert. Ein Ansatz, bei dem der Öffnungswinkel auf Kosten z.B. der nutzbaren Bildfeldgröße

---

<sup>1</sup>s. z.B. Abb. 4.1

<sup>2</sup>s. Abb. 4.3 und 4.4

<sup>3</sup>s. Abb. 4.2

oder einer Einschränkung auf einen schmaleren Wellenlängenbereich weiter vergrößert werden könnte, ist allerdings zu erwägen, wenn die 4Pi-OTF weiter verbessert werden soll.

Eine Möglichkeit, die Anregungs- bzw. die Detektions-OTF punktuell zu verändern, bietet sich in der Nutzung von Pupillenfiltern, die direkten Einfluss auf die elektromagnetische Feldverteilung im Frequenzraum üben. Durch die Anwendung dieser Filter können zwar keine neuen Raumfrequenzen generiert werden, aber die Gewichtung vorhandener Frequenzen verändert werden. Betrachtet man die entstehenden PSFs im Ortsraum, so zeigt sich, dass bei der Unterdrückung eines Nebenmaximums stattdessen an anderer Stelle Bereiche höherer Intensität entstehen. Durch die Kombination von Anregungs- und Detektions-PSF können diese Maxima allerdings stark unterdrückt werden. Wichtig ist jedoch die Analyse der entstehenden PSF, die eine Berücksichtigung des Lichts abseits der optischen Achse beinhaltet. Durch die  $z$ -Antwort, die das Signal lateral integriert, ist eine praxisrelevante Größe gegeben, die das gesamte Aufnahmevolumen berücksichtigt. Es zeigt sich, dass die 2-Photonen-Anregung hier ihren Vorteil der quadratischen Abhängigkeit der Anregungseffizienz von der lokalen Beleuchtungsintensität ausspielen kann: Die vielen Bereiche niedriger Intensität, die sich in der 1-Photonen-Anregung oft zu einem relativ hohen Signal in der  $z$ -Antwort aufaddieren, werden bei der 2-Photonen-Anregung praktisch bedeutungslos. Es können relativ einfach 2-Photonen-4Pi-PSFs erzeugt werden, deren  $z$ -Antwort bis auf Reste von ca. 13% praktisch nebenmaximafrei sind. In der 1-Photonen-Anregung bietet sich trotz des weniger drastischen Effekts die Nutzung moderat wirkender Filter mit nur geringer Signaldämpfung im Zentrum der PSF an. Durch ihren Einsatz kann z.B. der nötige Wellenlängenunterschied zwischen Anregung und Detektion etwas gesenkt werden und erlaubt somit die Benutzung von Farbstoffen mit einem weniger ausgeprägten Stokes-Shift.

Weitere Möglichkeiten zur Glättung der OTF, wie z.B. die in Kap. 4.6 geschilderte OTF-Kombinationsmethode, zeigen, dass das Potenzial der 4Pi-konfokalen Mikroskopie mit 1-Photonen-Anregung noch keineswegs ausgeschöpft ist.

Ein prinzipiell über die geschilderten Methoden hinausgehendes Verfahren wäre die Verwendung zweier Anregungs-PSFs möglichst verschiedener Wellenlängen, die nur in Kombination zur Anregung führen. Dadurch könnten schon in der Anregungs-OTF die nicht unterstützten Frequenzlücken geschlossen werden. Eine anschließende Faltung mit der Detektions-OTF würde die effektive OTF weiter glätten. Als mögliches System kann man sich die Anregung vom elektronischen Grundzustand  $S_0$  erst in einen angeregten Vibrationszustand des selben elektronischen Zustands und von dort in einen Vibrationszustand des angeregten elektronischen Zustands  $S_1$  vorstellen.

Ein für die routinemäßige Anwendbarkeit der 4Pi-konfokalen Technik entscheidender Schritt wurde durch die Implementierung einer 4Pi-Anordnung vom Typ C in ein ausgereiftes konfokales Mikroskop erreicht. Dadurch ist die 4Pi-Mikroskopie nun mit Strahlrasterung über ein Bildfeld von ca.  $50\ \mu\text{m}$  mal  $50\ \mu\text{m}$  möglich und kann alle Vorteile der erhältlichen Konfokaltechnik nutzen (mehrere simultane Detektionskanäle und Anregungswellenlängen, stufenloser Zoom, verschiedene Aufnahmegeschwindigkeiten und -orientierungen, einstellbare Detektionslochblendengröße, usw.). Die Schwierigkeiten, die mit einem über ein Bildfeld von ca.  $50\ \mu\text{m}$  funktionierenden, multispektralen, 4Pi-konfokalen Mikroskop des Typs C verbunden sind, konnten in dieser Arbeit gelöst werden:

Ein über das Bildfeld invarianter Farbquerfehler konnte durch die Ausrichtung der Achsen der Objektive zur Tubuslinsenachse vermieden werden. Außerdem mussten die Objektive präzise

zueinander ausgerichtet werden, so dass die beiden Bildfeldebene parallel orientiert sind. Die Invarianz der Phasendifferenz in der PSF über das komplette Bildfeld konnte durch eine besondere Beachtung der optischen Symmetrie der Arme des 4Pi-Interferenzstrahlengangs speziell bei der Objektivausleuchtung erzielt werden. Durch den Einbau eines gegeneinander verschiebbaren Glaskeil-Paares konnte der Glasdickenunterschied zwischen den beiden Interferometerarmen und damit der effektive Dispersionsunterschied minimiert werden. Dadurch wird die Abhängigkeit der Phasendifferenz von der Wellenlänge bis auf geringe Restfehler beseitigt und die 4Pi-Interferenz über einen größeren Spektralbereich erst ermöglicht. Die erfolgreiche Realisierung kann z.B. anhand Abb. 5.1 nachvollzogen werden.

Die mit dem neuen Gerät verbundenen Möglichkeiten erlauben nun, komplexere, biologische Forschungsprojekte mit Hilfe der 4Pi-konfokalen Mikroskopie in Angriff zu nehmen. Eine erste Anwendung zeigt die Aufnahmen von *Escherichia coli* Bakterien in Abb. 5.3, die insbesondere das gegenüber dem konfokalen Standard ca. 6-fach überlegene, praktisch artefaktfreie Auflösungsvermögen des 4Pi-konfokalen Typ C Mikroskops mit 1-Photonen-Anregung demonstrieren. Die axiale Auflösung liegt mit unter 100 nm vor der Bildrestaurierung ca. 30% unter der bisheriger Typ A-Aufbauten.

Der Einsatz der 4Pi-Typ C Technik mit einer ca. 75% breiteren optischen Transferfunktion verglichen mit den bisher verwendeten Typ A-Methoden lenkt in Verbindung mit den nun vorhandenen bis zu vier Detektionskanälen die Aufmerksamkeit neben der reinen Strukturauflösung auch auf das vielversprechende Gebiet der Lokalisierung von Strukturen. Eine diesbezügliche Anwendung wird im Rahmen dieser Arbeit in Form der Abstandsmessung sekretorischer Granula von der Plasmamembran neuroendokriner Zellen vorgestellt. Für das typische SNR beträgt die physikalische Lokalisierungsgenauigkeit bei bekannter PSF ungefähr 2 nm.

Die deutlich gesteigerte Zuverlässigkeit des Systems ermöglicht nun die Kombination der 4Pi-konfokalen Technik mit schon bekannten Mikroskopiemethoden wie FRET (*Förster resonant energy transfer*) [30, 31] oder FCS (*fluorescence correlation spectroscopy*) [48] und damit weitere interessante Entwicklungen. Vielversprechende Möglichkeiten bietet auch die Implementierung von STED (*stimulated emission depletion*) [13, 14] in Kombination mit der 4Pi-Technik, wie sie kürzlich berichtet wurde [49], in das vorhandene Gerät.

Die Lokalisierungsmessungen an sekretorischen Granula und die Bakterien-Aufnahmen stehen stellvertretend für die erfolgreiche Erweiterung des 4Pi-Konzepts auf die 1-Photonen-Mikroskopie: Die erfolgreiche Abstandsmessung mit einer Genauigkeit im Bereich von 2 nm ist in der Praxis mit der 1-Photonen-4Pi-Mikroskopie möglich. Dank der Kenntnis der aufgenommenen Strukturen in typischen Lokalisationsmessungen kann auf eine artefaktfreie Rekonstruktion verzichtet werden. Daher haben Lücken im von der OTF abgedeckten Raumfrequenzspektrum keine negativen Auswirkungen. Durch Abstriche im Detektionsspektrum beispielsweise können diese Lücken allerdings durchaus geschlossen werden. Dadurch können mittels 1-Photonen-Anregung artefaktfrei Strukturen im sub-100 nm-Bereich aufgelöst werden, wie die aufgenommenen *E. coli*-Daten<sup>4</sup> zeigen. Durch die zusätzliche Implementierung des 4Pi-konfokalen Aufbaus in ein ausgereiftes Konfokalmikroskop bieten sich durch die bis zu 7-fach gesteigerte Auflösung und Lokalisierungsgenauigkeit zahlreiche neue biologische Applikationen an.

---

<sup>4</sup>s. Abb. 5.3

# Literaturverzeichnis

- [1] M. Minsky. Microscopy apparatus. *US Patent 3013467*, 1961.
- [2] J. Pawley. *Handbook of Biological Confocal Microscopy*. Plenum Press, New York, 1995.
- [3] S. Hell and E. H. K. Stelzer. Properties of a 4Pi-confocal fluorescence microscope. *J. Opt. Soc. Am. A*, 9:2159–2166, 1992.
- [4] A. Egner, S. Jakobs, and S.W. Hell. Fast 100-nm resolution 3D-microscope reveals structural plasticity of mitochondria in live yeast. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 99:3370–3375, 2002.
- [5] G. H. Patterson and D. W. Piston. Photobleaching in two-photon excitation microscopy. *Biophys. J.*, 78:2159–2162, 2000.
- [6] E. Wolf. Electromagnetic diffraction in optical systems I. An integral representation of the image field. *Proc. R. Soc. A*, 253:349–357, 1959.
- [7] B. Richards and E. Wolf. Electromagnetic diffraction in optical systems II. Structure of the image field in an aplanatic system. *Proc. R. Soc. Lond. A*, 253:358–379, 1959.
- [8] M. Gu and C. J. R. Sheppard. Three-dimensional transfer functions in 4Pi confocal microscopes. *J. Opt. Soc. Am. A*, 11(5):1619–1627, 1994.
- [9] M. Schrader, M. Kozubek, S. W. Hell, and T. Wilson. Optical transfer functions of 4Pi confocal microscopes: theory and experiment. *Opt. Lett.*, 22(7):436–438, 1997.
- [10] M.G.L. Gustafsson, D.A. Agard, and J.W. Sedat. I 5m: 3d widefield light microscopy with better than 100 nm axial resolution. *J. Microsc.*, 195:10–16, 1999.
- [11] F. Lanni, B. Bailey, D. L. Farkas, and D. L. Taylor. Excitation field synthesis as a means for obtaining enhanced axial resolution in fluorescence microscopy. *Bioimaging*, 1:187–192, 1994.
- [12] 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(1):36–48, 2001.
- [13] S.W. Hell and J. Wichmann. Breaking the diffraction resolution limit by stimulated emission: stimulated emission depletion microscopy. *Opt. Lett.*, 19(11):780–782, 1994.

- 
- [14] T. A. Klar, S. Jakobs, M. Dyba, A. Egner, and S. W. Hell. Fluorescence microscopy with diffraction resolution limit broken by stimulated emission. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 97:8206–8210, 2000.
- [15] S.W. Hell, C.M. Blanca, and J. Bewersdorf. Phase determination in interference-based superresolving microscopes through critical frequency analysis. *Opt. Lett.*, 27(11):888–890, 2002.
- [16] J. Gelles, B.J. Schnapp, and M.P. Sheetz. Tracking kinesin-driven movements with nanometre-scale precision. *Nature*, 331:450–453, 1988.
- [17] H. Bornfleth, K. Satzler, R. Eils, and C. Cremer. High-precision distance measurements and volume-conserving segmentation of objects near and below the resolution limit in three-dimensional confocal fluorescence microscopy. *J. Microsc.*, 189:118–136, 1998.
- [18] T.D. Lacoste, X. Michalet, F. Pinaud, D.S. Chemla, A.P. Alivisatos, and S. Weiss. Ultrahigh-resolution multicolor colocalization of single fluorescent probes. *PNAS*, 97(17):9461–9466, 2000.
- [19] R.E. Thompson, D.R. Larson, and W.W. Webb. Precise nanometer localization analysis for individual fluorescent probes. *Biophys. J.*, 82:2775–2783, 2002.
- [20] M. Schmidt, M. Nagorni, and S.W. Hell. Subresolution axial distance measurements in far-field fluorescence microscopy with precision of 1 nanometer. *Rev. Sci. Instrum.*, 71:2742–2745., 2000.
- [21] M.K. Cheezum, W.F. Walker, and W.H. Guilford. Quantitative comparison of algorithms for tracking single fluorescent particles. *Biophys. J.*, 81:2378–2388, 2001.
- [22] B. Albrecht, A.V. Failla, A. Schweitzer, and C. Cremer. Spatially modulated illumination microscopy allows axial distance resolution in the nanometer range. *Appl. Opt.*, 41(1):80–87, 2002.
- [23] W. H. Press, B. P. Flannery, S. A. Teukolsky, and W. T. Vetterling. *Numerical Recipes in C*. Cambridge University Press, 2nd edition, 1993.
- [24] N. Bobroff. Position measurement with a resolution and noise-limited instrument. *Rev.Sci.Instr.*, 57(6):1152–1157, 1986.
- [25] Alexander Egner. *Multifokale hochauflösende 3D-Fluoreszenzmikroskopie*. Dissertation, Ruprecht-Karls-Universität, 2002.
- [26] M. Bass, editor. *Handbook of Optics*, volume I. McGraw-Hill, 2nd. ed. edition, 1995.
- [27] N. Martini, J. Bewersdorf, and S.W. Hell. A new high-aperture glycerol immersion objective lens and its application to 3d-fluorescence microscopy. *J. Microsc.*, 206(2):146–151, 2002.
- [28] T. Wilson and A.R. Carlini. Size of the detector in confocal imaging systems. *Opt. Lett.*, 12(4):227, 1987.

- 
- [29] 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.*, 191:135–140, 1998.
- [30] Th. Förster. Zwischenmolekulare Energiewanderung und Fluoreszenz. *Annalen der Physik*, 2:55–75, 1948.
- [31] P. R. Selvin. The renaissance of fluorescence resonance energy transfer. *Nature Struct. Biol.*, 7(9):730–734, 2000.
- [32] G. Toraldo di Francia. Supergain antennas and optical resolving power. *Nuovo Cimento Suppl.*, 9:426–435, 1952.
- [33] Z.S. Hegedus and V. Sarafis. Superresolving filters in confocally scanned imaging systems. *J. Opt. Soc. Am. A*, 3(11):1892–1896, 1986.
- [34] T.R.M. Sales and G.M. Morris. Axial superresolution with phase-only pupil filters. *Opt. Commun.*, 156:227–230, 1998.
- [35] C.J.R. Sheppard, G. Calvert, and M. Wheatland. Focal distribution for superresolving toraldo filters. *J. Opt. Soc. Am. A*, 15(4):849–856, 1998.
- [36] M. Martinez-Corral, P. Andres, C. J. Zapata-Rodriguez, and M. Kowalczyk. Three-dimensional superresolution by annular binary filters. *Opt. Commun.*, 165:267–278, 1999.
- [37] M. Martinez-Corral, A. Pons, and M.T. Caballero. Axial apodization in 4Pi-confocal microscopy by annular binary filters. *J. Opt. Soc. Am. A*, 19(8):1532–1536, 2002.
- [38] C.M. Blanca, J. Bewersdorf, and S.W. Hell. Single sharp spot in fluorescence microscopy of two opposing lenses. *Appl. Phys. Lett.*, 79(15):2321–2323, 2001.
- [39] C.M. Blanca, J. Bewersdorf, and S.W. Hell. Determination of the unknown phase difference in 4Pi-confocal microscopy through the image intensity. *Opt. Commun.*, 206:281–285, 2002.
- [40] W. H. Richardson. Bayesian-based iterative method of image restoration. *J. Opt. Soc. Am.*, 62:55–59, 1972.
- [41] L. B. Lucy. An iterative technique for the rectification of observed distributions. *Astron. J.*, 79:745–754, 1974.
- [42] M. Nagorni and S.W. Hell. Coherent use of opposing lenses for axial resolution increase in fluorescence microscopy. II. Power and limitation of nonlinear image restoration. *J. Opt. Soc. Am. A*, 18(1):49–54, 2001.
- [43] R. Jahn and P.I. Hanson. SNAREs line up in new environment. *Nature*, 393:14–15, 1998.
- [44] T. Lang, D. Bruns, D. Wenzel, D. Riedel, P. Holroyd, C. Thiele, and R. Jahn. SNAREs are concentrated in cholesterol-dependent clusters that define docking and fusion sites for exocytosis. *EMBO J.*, 20(9):2202–2213, 2001.



- 
- [45] S.A. Tooze, T. Flatmark, J. Tooze, and W.R. Huttner. Characterization of the immature secretory granule, an intermediate in granule biogenesis. *J. Cell Biol.*, 115(6):1491–1503, 1991.
- [46] R.B. Sutton, D. Fasshauer, R. Jahn, and A.T. Brunger. Crystal structure of the SNARE complex involved in synaptic exocytosis at 2.4Å resolution. *Nature*, 395:347–353, 1998.
- [47] K.M.S. Misura, R.H. Scheller, and W.I. Weis. Three-dimensional structure of the neuronal-Sec1-syntaxin 1a complex. *Nature*, 404:355–362, 2000.
- [48] E.L. Elson and R. Rigler, editors. *Fluorescence correlation spectroscopy. Theory and applications*. Springer, Berlin, 2001.
- [49] M. Dyba and S.W. Hell. Focal spots of size  $1/23$  open up far-field fluorescence microscopy at 33 nm axial resolution. *Phys. Rev. Lett.*, 88:163901, 2002.

# Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Priv.-Doz. Dr. Stefan Hell, der mir dieses Thema vorgeschlagen hat. Sein stetiges Interesse und seine kompetenten Anregungen bedeuteten über die gesamte Zeit hin eine große Unterstützung. Die hervorragenden Arbeitsbedingungen am Max-Planck-Institut für biophysikalische Chemie bildeten eine ideale Forschungsumgebung.

Prof. Dr. Josef Bille möchte ich herzlich für seine schnelle Zustimmung, als Zweitgutachter zur Verfügung zu stehen, und sein langjähriges Interesse an der Konfokalmikroskopie danken.

Die vorliegende Arbeit wurde dank der Förderung durch das Bundesministerium für Bildung und Forschung im Rahmen einer Kooperation zwischen der Firma Leica Microsystems Heidelberg GmbH in Mannheim und der Gruppe für Hochauflösende Optische Mikroskopie am Max-Planck-Institut für biophysikalische Chemie in Göttingen durchgeführt.

Ich möchte mich bei folgenden Personen bei Leica Microsystems, die sehr zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben, bedanken:

- Dr. Johann Engelhardt hat in der Anfangsphase der Arbeit in seiner Funktion als Entwicklungsleiter in Mannheim durch seine unschätzbare praktische Erfahrung im Bau von Konfokalmikroskopen wertvolle Impulse zur erfolgreichen Verwirklichung des strahlrasierenden 4Pi-Aufbaus gegeben.
- Dr. Rafael Storz hat als Projektleiter und später auch als Entwicklungsleiter durch seine stetige Unterstützung die bürokratische Last von mir ferngehalten und dadurch ermöglicht, dass ich mich ganz auf die Forschung konzentrieren konnte.
- Hilmar Gugel hat durch viele wichtige Diskussionen aber auch dadurch, dass er während der zäheren Momenten der Arbeit mit mir das Schicksal teilte, sehr geholfen.
- Die vielen Mannheimer Kollegen insbesondere aus der Optik-, der Elektronik- und der Softwareentwicklung, aus der Konstruktion und der Werkstatt sowie aus der Applikation haben durch viele kleinere und größere oft auch unbürokratische Hilfen ihren Anteil am Erfolg des Projekts. Speziell hervorheben möchte ich Dr. Heinrich Ulrich, den Leiter der Optik-Entwicklung, als stets hilfsbereiten Optik-Experten, sowie Reiner Rygiel, der als jetziger Projektleiter der 4Pi-Entwicklung stets auch tatkräftig das Forschungsvorhaben unterstützt hat.
- Die Herren Peter Euteneuer, Ralf Krüger sowie Dr. Wesner bei Leica Microsystems in Wetzlar, haben durch ihr mit mir geteiltes Fachwissen auf dem Gebiet der Optik von Objektiven hoher numerischer Apertur viel zu meinem Verständnis der Materie beigetragen.

In Göttingen möchte ich mich bei allen Kollegen der Arbeitsgruppe für Hochauflösende Optische Mikroskopie für die freundliche und hilfsbereite Atmosphäre bedanken. Im speziellen danke ich:

- Dr. Alexander Egner, mit dem ich in einigen Diskussionen mein Verständnis der 4Pi-konfokalen Mikroskopie festigte, der mit seinen Computerkenntnissen mir einige Male ersparte, mir dieses Wissen selbst mühsam anzueignen, und der – immer hilfsbereit – sich sogar zum Lesen des Manuskripts bereit erklärte.

- Andreas Schönle, der mir durch sein Allround-Programm *Inspector* die Datenauswertung, -bearbeitung und -darstellung massiv erleichtert hat und der dies mit jeder weiteren Version noch steigert. Durch sein theoretisches Fachwissen war er immer auch eine sehr gute Anlaufstelle für theoretischere Diskussionen.
- Dr. Carlo Blanca, mit dem ich die Pupillenfilter-Experimente durchführte und der die langen Messnächte durch seine immer freundliche Art kurzweiliger machte.
- Dr. Stefan Jakobs und Nadia Martini lieferten bereitwillig die *E. coli* Proben und konnten als Biologen immer wieder kompetent auf naive, biologische Fragen eines Physikers reagieren.
- Rainer Pick mit seinen außerordentlichen Kenntnissen der optomechanischen Möglichkeiten sowie Harald Meyer als Elektroniker der Gruppe lieferten viele wertvolle Beiträge zur täglichen experimentellen Arbeit.
- Dr. Karsten Bahlmann und Dr. Matthias Nagorni, nun ehemalige Gruppenmitglieder, die mich in den ersten Monaten der Doktorarbeit in die Geheimnisse der 4Pi-Mikroskopie einführten.
- Marcus Dyba und Lars Kastrup als immer hilfsbereite Kollegen, und sei es nur, um einen optischen Tisch von einem Raum in den anderen zu tragen.

In der Zusammenarbeit mit der Abteilung Neurobiologie unter Prof. Dr. Reinhard Jahn am Max-Planck-Institut möchte ich mich speziell bei Dr. Thorsten Lang bedanken, der mir unermüdlich neue Proben mit neuroendokrinen Zellen präparierte, mich durch sein stetiges Interesse anspornte und mir die biologische Fragestellung näher brachte.

Den Mitarbeitern der mechanischen und der optischen Werkstatt des Max-Planck-Instituts, stellvertretend Herrn Dieter-Jürgen Czudnochowski und Herrn Saueremann, danke ich für ihren flexiblen Umgang mit den Anforderungen eines Experimentalphysikers und den daraus resultierenden qualitativ hochwertigen Werkstücken.

Zuletzt gilt mein Dank meiner Frau Cornelia, meinen Eltern und meinen Freunden für ihre Unterstützung aber auch ihre Nachsicht, dass die Arbeit manchmal vor dem Privatleben Vorrang hatte.