

INAUGURAL-DISSERTATION

zur
Erlangung der Doktorwürde
der
Fakultät für Physik
der
Universität Bielefeld

vorgelegt von

Dipl.-Phys. Jürgen Reymann

aus Herbolzheim

Tag der Disputation: 31. Januar 2008

Entwicklung eines SMI-Mikroskops zur Präzisions-Strukturanalyse in vitalen biologischen Systemen

Gutachter: Prof. Dr. Markus Sauer
Prof. Dr. Andreas Hütten

Entwicklung eines SMI-Mikroskops zur Präzisions-Strukturanalyse in vitalen biologischen Systemen

In den letzten Jahren entwickelte Methoden in der lichtoptischen Mikroskopie erlauben die Etablierung von optischen Auflösungen weit unterhalb der konventionellen Beugungsbegrenzung, wodurch komplett neue Bereiche bei Analysen zu strukturellen Charakteristika subchromosomaler Komplexe zugänglich werden. In dieser Dissertation werden SMI-mikroskopische Verfahren zur hochpräzisen Vermessung von biologischen Nanostrukturen weiterentwickelt, um diese Technik auf die Untersuchung lebender Zellen zu adaptieren und die prinzipielle Tauglichkeit für solche in-vivo Prozeduren zu testen.

Die SMI-Mikroskopie erreicht durch eine räumlich modulierte Beleuchtung eine Erhöhung des Informationsgehalts, wodurch Objektstrukturen mit Dimensionen unterhalb der konventionellen Auflösung zugänglich werden. Zur Realisierung von Lebendzellmessungen wurde hierfür ein komplett neuer Mikroskopaufbau verwirklicht und es wurden akkurate Charakterisierungs- und Optimierungsprozeduren entwickelt. Dies implizierte die Einbindung unterschiedlicher Hardware-Komponenten und deren Abstimmung mit der optischen Konfiguration. Weiterhin erfolgte die Ermittlung von Systemeigenschaften unter in-vivo Bedingungen, wodurch vertrauensvolle Größenmessungen bis zu kleinsten Ausdehnungen von 40nm verifiziert und präzise Aussagen über dynamische Objekte getroffen werden konnten. Im Anschluss wurden Lebendzellanalysen hinsichtlich des Einflusses von sich destruktiv äußernden Fixierungsmethoden durchgeführt.

Development of a SMI-Microscope for precision structural analysis in vital biological systems

Methods in light optical microscopy developed during the last years, allow the establishment of optical resolutions far below the conventional diffraction limit. This has made new areas for the analysis of structural characteristics of subchromosomal complexes accessible. In this thesis, SMI-microscopic procedures for the high precision determination of biological nanostructures are enhanced, adapting this technique to the study of live cells and testing its applicability for such in-vivo procedures.

By using spatially modulated illumination, SMI-Microscopy achieves an increase of the information content for object structures with dimensions below the conventional resolution. For the implementation of live cell measurements a completely new microscope setup was built and accurate characterisation and optimisation procedures were developed. This implied the integration of different hardware components and their adjustment within the optical configuration. Furthermore, the system properties under in-vivo conditions were determined, by what confiding size measurements up to least extensions of 40nm verified and precise conclusions about dynamical objects could be given. Subsequent, a live cell analysis concerning the influence of destructive manifesting fixation procedures were accomplished.

“Some things need to be believed to be seen”

Guy Kawasaki

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Motivation	1
1.2	Stand der Technik	3
2	Laseroptische Mikroskopie	5
2.1	Klassische Beugungstheorie	5
2.1.1	Maxwell-Gleichungen	5
2.1.2	Integralformulierung von Kirchhoff	6
2.1.3	Beugung an einer kreisförmigen Apertur	9
2.2	Punktbildfunktion und Auflösungsvermögen	11
2.3	Optische Transferfunktion	13
2.4	Fluoreszenz	15
2.5	Höchstaufösende Mikroskopiesysteme	17
3	Molekulare Zellbiologie	21
3.1	Grundlagen der molekularen Genetik	21
3.1.1	Struktur der DNA	21
3.1.2	Genexpression	22
3.2	Fluoreszenzmarkierung	25
3.2.1	Zellfixierung	27
3.3	Der β -Globin-Cluster	27
3.3.1	Evolutionäre Entwicklung	27
3.3.2	Struktur und Expression	28
3.4	Das tet-Operon	30
4	SMI-Mikroskopie	33
4.1	Theorie	33
4.1.1	Punktbildfunktion	33
4.1.2	Optische Transferfunktion	35
4.2	Datenakquisition	36
4.3	Datenanalyse	37
4.3.1	Axiale Intensitätsverteilung und Objektstruktur	37
4.3.2	Heuristischer Ansatz zur Größenbestimmung	39
4.4	Experimenteller Aufbau	41

5	Dynamische Systeme	43
5.1	Grundlagen der molekularen Biophysik	44
5.2	Markov-Prozesse	44
5.2.1	Grundlegende Formalismen stochastischer Prozesse	45
5.2.2	Brownsche Molekularbewegung	46
5.3	Biopolymere	48
5.3.1	Intramolekulare Wechselwirkungen	48
5.3.2	Intermolekulare Wechselwirkungen	50
5.4	Abschätzungen zur Mobilität	51
6	In-vivo SMI-Mikroskopie	55
6.1	Anmerkungen zur Lebendzellbeobachtung	55
6.2	Restriktionen	56
6.3	Zeitlich veränderliche Punktbildfunktion	58
6.3.1	Einfluss der Objektmobilität	58
6.3.2	Kriterien zur Vertrauenswürdigkeit der AID	61
7	Das Vertico-SMI	65
7.1	Motivation	65
7.2	Realisierung	66
7.2.1	Optische Konfiguration	66
7.2.2	Objektpositionierung	70
7.2.3	In-vivo Instrumentierung	74
8	Charakterisierung des Vertico-SMI	77
8.1	Grundlegende Eigenschaften des Systems	77
8.1.1	Kalibration unter Normalbedingungen	78
8.1.2	Einfluss von Wärme auf das System	82
8.2	Leistungsvermögen	88
8.2.1	Hochgeschwindigkeits-DAQ	88
8.3	Datenakquisition nicht-fixierter Objekte	90
8.3.1	Objektabtastung und Zeitreihen	91
8.3.2	Interpretation	99
9	Strukturanalyse biologischer Präparate	101
9.1	Untersuchungen zum β -Globin-Lokus	102
9.1.1	Präparate und Durchführung	102
9.1.2	Resultate	103
9.2	Lebendzellanalysen	106
9.2.1	Präparate und Durchführung	106
9.2.2	In-vivo Signaturen	109
9.2.3	Einfluss der Fixierung	112
9.2.4	Interpretation und Hypothesen	115
10	Diskussion und Ausblick	117
10.1	Zusammenfassung	117
10.2	Diskussion	119
10.3	Perspektiven	122

A CAD-Modell	127
A.1 Basiskonstruktion	127
A.2 Inkubatorkammer	129
B Ansteuerung	131
B.1 Schrittmotoren	131
B.2 Piezoelektrische Aktuatoren	132
B.2.1 Kalibration des Piezo P-621.ZCD	133
B.3 CCD-Kamera	135
B.4 Datenakquisition	136
C Stückliste	139
Literaturverzeichnis	145
Danksagung	151

Kapitel 1

Einleitung

1.1 Motivation

Im Laufe der letzten Jahrzehnte hat sich ein fundamentaler Wandel von Zielsetzungen im Bereich der Lebenswissenschaften ausgebildet. So waren die zu Beginn des letzten Jahrhunderts formulierten Fragestellungen von eher qualitativer Natur, woraus aus rein grundlegenden Beobachtungen zwar prinzipielle Funktionsweisen in biologischen Systemen erkennbar wurden, diese aber in ihrer Komplexität bei weitem nicht aufgelöst werden konnten. Ein wesentlicher Grund hierfür lag in der fehlenden technischen Kompetenz, wodurch der Zugang zu präziseren Schlussfolgerungen verwehrt blieb. Durch die Entwicklung weitreichender, neuer biologischer und physikalischer Methoden in Kombination mit der zunehmenden Möglichkeit, geeignete Datenverarbeitungsroutinen einzusetzen, wodurch entscheidende Verbesserungen zur Visualisierung von komplexen Vorgängen und damit sehr kleinen Dimensionen erzielt wurden, fand ein entscheidender Übergang statt. In den modernen Lebenswissenschaften liegt die Zielsetzung aus diesem Grund mehr und mehr in einem quantitativen Verständnis der beobachteten Phänomene und hiermit verbunden die Entschlüsselung der Kausalitätsketten biologischer Prozesse.

Ein wesentliches Element ist hierbei gegeben durch die Mikroskopie, deren fundamentalen Zusammenhänge hinsichtlich der optischen Auflösung bereits in den Arbeiten von Ernst Abbe hinreichend genau beschrieben wurden [1, 2]. Danach unterliegt ein Objekt bei der Abbildung durch ein optisches System aufgrund der Welleneigenschaft des Lichts einer Auflösungsbegrenzung, die sich proportional zur Hälfte der Wellenlänge verhält. Als erste Konsequenz wurde versucht, die zur Beobachtung verwendete Wellenlänge zu minimieren, was unter anderem zum Einsatz von Materiewellen und damit zur Etablierung des Elektronenmikroskops mit einer Auflösung von etwa einem Nanometer führte. Nichtsdestotrotz sind lichtoptische Methoden unverzichtbar zur Erforschung spezifischer Charakteristika von zellulären Komplexen, da elektronenmikroskopische Untersuchungen aufgrund der systembedingten Notwendigkeit des Einsatzes sehr dünner Präparate nur auf eingegrenzte Fragestellungen und nicht auf strukturell intakte Systeme angewendet werden können. Insbesondere ist es in diesem Fall nicht möglich, dynamische Prozesse in ihrer Gesamtheit aufzulösen.

Diese Probleme treten in der Fernfeld-Lichtmikroskopie zwar nicht auf, jedoch musste hier nach Möglichkeiten gesucht werden, wie dennoch sehr kleine Objekte vernünftig abgebildet werden können. In diesem Zusammenhang spielt die Fluoreszenzmikroskopie eine

entscheidende Rolle. Der natürlich in der Zelle enthaltene oder in die Zelle eingebrachte Fluoreszenzfarbstoff erlaubt die gezielte Anregung spezifischer Bereiche, wodurch der Kontrast und damit der Informationsgehalt deutlich erhöht werden konnte. Damit war unter optimalen optischen Bedingungen eine Auflösung bis an das von Abbe formulierte Limit in zumindest zwei Dimensionen möglich, da bei solchen herkömmlichen Methoden immer noch Strukturen von außerhalb des Fokusbereichs entlang der optischen Achse mit abgebildet wurden. Dies konnte schließlich umgangen werden durch die Entwicklung des konfokalen Laser-Raster-Mikroskops (engl.: *Confocal Laser Scanning Microscope (CLSM)*), welches eine 3-dimensionale Abbildung mittels fokussierter Beleuchtung und der Unterdrückung von Detektionslicht außerhalb des Fokusbereichs erreicht.

Die parallele Weiterentwicklung von biologischen Verfahren zur Markierung von Strukturen innerhalb der Zelle in Kombination mit den neu entwickelten Mikroskopietechniken führte zu einer erheblichen Verbesserung des Verständnisses zellulärer Vorgänge. Techniken wie die Fluoreszenz In-Situ Hybridisierung (FISH) erlauben schon seit längerem die spezifische Markierung von Nukleinsäuren wie der DNA mit Fluoreszenzfarbstoffen [71]. Damit muss das fluoreszierende Protein nicht mehr von außen in die Zelle eingebracht werden, sondern wird von der Zelle selbst produziert, nachdem künstliche, gentechnische Veränderungen dies veranlasst haben [55].

Dennoch waren trotz all dieser Fortschritte viele experimentelle Szenarien nur bedingt mit dem standardmäßig etablierten CLSM adressierbar, da dieses der konventionellen Beugungsbegrenzung von Abbe mit maximal erreichbaren Auflösungen von etwa 200nm in der Bildebene und 550nm entlang der optischen Achse unterliegt [65]. Die hierfür erforderlichen Dimensionen sind zu klein, wodurch wesentliche Fragestellungen, insbesondere die Struktur betreffend, nicht beantwortet werden konnten. So wurde beispielsweise durch die Entschlüsselung der kompletten Basenpaarsequenz des menschlichen Genoms zu Beginn der Jahrtausendwende zwar eine Art Grundvokabular zur Verfügung gestellt; um allerdings die genaue Syntax und Grammatik zu verstehen, müssen die gegenseitigen Wechselwirkungsmechanismen der einzelnen Gene sowie ihre intrinsischen Charakteristika bekannt sein. Neuere Theorien postulieren hierfür einen signifikanten Einfluss der räumlichen Anordnung und damit der Topologie, in deren Folge lokale Verteilungen von DNA-Sequenzen auch einen funktionellen Aspekt tragen würden [53, 19, 70]. Dies gilt auch für subchromosomale Vorgänge, in deren Verlauf zum Beispiel Prozesse wie die Expression eines Gens initiiert werden. Mit dieser Aktivierung eines Genabschnitts verknüpft sind Veränderungen der Topologie in Form einer Dekondensation des lokalen Abschnitts. Strukturelle Eigenschaften auf makromolekularer Ebene stellen demnach eine Vielzahl von Informationen bezüglich der komplexen Mechanismen im Genom bereit. Zur Visualisierung solch kleiner Strukturen mussten allerdings völlig neue Ansätze in der lichtoptischen Mikroskopie verfolgt werden, die in der Lage sind, die herkömmlichen Abbildungseigenschaften von Abbe zu umgehen und Auflösungen weit unterhalb dieser konventionellen Begrenzung zu ermöglichen.

Ein erheblicher Nachteil dieser im Laufe der letzten zehn Jahre realisierten neueren Mikroskopiemethoden liegt allerdings in der standardmäßigen Auslegung der Systeme auf fixierte biologische Präparate zur Untersuchung. Durch die Fixierung werden die Zellen mittels verschiedenster biochemischer Verfahren in ihrem augenblicklichen Zustand eingefroren. Die Folgen dieser Prozedur sind bis zum jetzigen Zeitpunkt noch nicht wirklich verstanden, wobei erste qualitative Abschätzungen einen nicht unerheblichen Einfluss auf die

Struktur aufzeigen [52, 42]. Weiterhin können dynamische Prozesse nicht verfolgt werden, falls Fragen hinsichtlich der Zellphysiologie von Interesse sind. Eine implizite grundlegende Forderung besteht also in der Weiterentwicklung von bestehenden höchstauflösenden Mikroskopietechniken, um deren Vorteile bezüglich einer quantitativen Visualisierung bis in den makromolekularen Bereich auf vitale biologische Systeme zu adaptieren und damit den destruktiven Einsatz von Fixierungsprotokollen zu vermeiden, wodurch gleichzeitig dynamische Prozesse in Realzeit verfolgt und definiert werden können.

1.2 Stand der Technik

Eine in den letzten Jahren standardisierte Methode zur Umgehung der klassischen Beugungsbegrenzung ist mit dem ersten Prototypen des SMI (engl.: *Spatially Modulated Illumination*) -Mikroskops realisiert, bei dem mittels räumlich modulierter Beleuchtung unter Verwendung zweier gegenüberliegender Objektive mit hoher numerischer Apertur der vom fluoreszierenden Objekt übertragene Frequenzbereich erweitert und damit dessen Informationsgehalt erhöht wird [68, 28, 29, 5]. Bei diesem Verfahren wird allerdings keine tatsächliche Auflösungsverbesserung erzielt, d.h. die optischen Charakteristika des Mikroskops unterliegen immer noch den herkömmlichen Beugungsbeschränkungen. Vielmehr wird hier durch die interferometrische Anordnung eine modifizierte Punktantwort (engl.: *Point Spread Function (PSF)*) des Objekts generiert, wodurch sehr präzise Größenbestimmungen mit einer effektiven Sensitivität von 30nm bis 200nm und damit bis in den makromolekularen Bereich weit unterhalb der konventionellen Auflösungsgrenze erzielt werden. Weiterhin erlaubt die selektive Anregung durch die strukturierte Beleuchtung sehr genaue Objektlokalisationen, wodurch relative Positionen und Distanzen mit hoher Präzision bestimmt werden können. Bereits mehrere erfolgreiche Arbeiten konnten dabei die Anwendbarkeit des SMI-Mikroskops auf biologische Fragestellungen zur Topologie spezifischer Genregionen zeigen [57, 44, 59].

In dieser Arbeit wurde ein komplett neuer Aufbau eines SMI-Mikroskops realisiert, das einer sehr kompakten und stabilen, vertikalen Auslegung folgt, um auf dem SMI-Prinzip begründete, quantitative Lebendzellprozeduren verwirklichen zu können. Dabei ist durch die intrazelluläre Dynamik bzw. der Eigenmobilität sehr kleiner Objekte bei Lebendzelluntersuchungen ein sehr wichtiger Aspekt gegeben, der mittels einer sehr schnellen und hochpräzisen Datenakquisition auch während des Betriebs des Systems mit erhöhten Temperaturen berücksichtigt werden muss. Durch eine Kombination aus Charakterisierungsstudien verschiedenster Komponenten und darauf aufbauender Optimierungsprozesse stellt das vertikale SMI-Mikroskop mittlerweile ein für den routinemäßigen Einsatz verwendetes Instrument zur Untersuchung biologischer Präparate dar. Erste semi-quantitative Analysen von lebenden Zellen konnten ebenfalls während dieser Arbeit realisiert und damit die prinzipielle Tauglichkeit des Mikroskops bezüglich quantitativer in-vivo Studien im subchromosomalen Bereich verifiziert werden.

Die vorliegende Dissertation gliedert sich nun wie folgt: in Kapitel 2 werden die physikalischen Grundlagen bereit gestellt, die zum allgemeinen Verständnis der Beugungsbegrenzung notwendig sind, wie sie unter anderem für das hier vorgestellte SMI-Prinzip gültig sind. Anschließend werden in Kapitel 3 die elementarsten molekularbiologischen Begriffe zur Genexpression, Markierungstechnik und zweier spezifischer DNA-Sequenzen eingeführt, welche zur Nachvollziehbarkeit der Problematik bei Lebendzelluntersuchungen

und für die biologischen Anwendungen notwendig sind. In Kapitel 4 folgen die explizit für das SMI-Mikroskop geltenden physikalischen Grundlagen mit einer ausführlichen Beschreibung der SMI-PSF, der optischen Transferfunktion (OTF) und Details zur Datennahme und -analyse. Von enormer Bedeutung bei der höchstauflösenden Lebendzellmikroskopie sind dynamische Prozesse, auf deren Ursprung und Beschreibung eingehend in Kapitel 5 eingegangen wird. Dabei wird, ausgehend von allgemeinen statistischen Prozessen, der Übergang zur Beschreibung einer Biopolymerkette wie der DNA mittels intrinsisch und extern wirkenden Kräften vollzogen. Erste Abschätzungen hinsichtlich der Größenordnungen von intrazellulärer Mobilität spezifischer Genregionen bilden den Abschluss des Kapitels, bevor im nachfolgenden Kapitel 6 allgemeine Überlegungen zu den Auswirkungen von in-vivo SMI-Prozeduren auf die Form der SMI-PSF folgen. Die Abbildungseigenschaften und damit der zugängliche Informationsgehalt eines mobilen Objekts unterscheiden sich je nach Bewegungsprofil erheblich von denen eines fixierten Objekts. Es werden akquirierte Intensitätsverteilungen von mobilen Objekten und hieraus abgeleitete Kriterien zur Vertrauenswürdigkeit einer in-vivo SMI-PSF vorgestellt. Kapitel 7 beschreibt schließlich die eigentliche Konzeption des vertikalen SMI-Mikroskops, verschiedene Optimierungsprozesse der Hardware-Komponenten, die spezifisch aufeinander abgestimmt werden mussten und die Implementierung einer Inkubatorkammer zur Etablierung einer autarken Atmosphäre bevor im darauf folgenden Kapitel 8 die eigentliche Charakterisierung folgt. Hierzu wurden Nanokugeln bekannter Größe unter verschiedensten Bedingungen vermessen und analysiert, um die Vertrauenswürdigkeit des Mikroskops zu überprüfen. Gleiches wurde durch die Analyse von frei beweglichen Objekten im Hinblick auf die in Kapitel 6 getroffenen Kriterien bezüglich einer in-vivo SMI-PSF realisiert. Kapitel 8 ist in zwei Teile untergliedert: im ersten Teil werden Strukturanalysen zu fixierten biologischen Präparaten vorgestellt, bei denen mögliche topologische Unterschiede zwischen aktiven und inaktiven β -Globin Gensequenzen untersucht wurden. Im zweiten Teil werden erstmalig Lebendzellanalysen von tet-Operator Systemen am vertikalen SMI-Mikroskop aufgezeigt, in deren Verlauf auch eine Realzeit-Beobachtung des Fixierungsprozesses durchgeführt wurde, um etwaige strukturelle Änderungen zu erfassen. Den Abschluss der Arbeit bildet mit Kapitel 9 eine Zusammenfassung inklusive einer Diskussion der erhaltenen Ergebnisse mit einem nachfolgenden Ausblick auf zukünftige Neuerungen und mögliche Weiterentwicklungen.

Kapitel 2

Laseroptische Mikroskopie

Das von Ernst Abbe im Jahre 1873 formulierte Gesetz zur beugungsbegrenzten Auflösung optischer Systeme galt lange Zeit als Manifest innerhalb der Mikroskopie. Die von ihm hergeleitete Relation

$$d \geq \frac{\lambda}{2n \sin \alpha}$$

definiert dabei eine untere Grenze des Auflösungsvermögens d mit lichtoptischen Verfahren, das gegeben ist durch die verwendete Wellenlänge λ , dem zugrunde liegenden Brechungsindex n und dem Öffnungswinkel α der zur Detektion verwendeten Linse [1]. Erst in der jüngsten Vergangenheit ist es gelungen Methoden zu entwickeln, quantitative Analysen von Strukturen mit Dimensionen unterhalb diesen Limits mittels lichtoptischer Verfahren zu verwirklichen.

Dieses Kapitel soll eine kurze Einführung in die theoretischen Grundlagen von Beugungseffekten und der daraus resultierenden Auflösungsbegrenzung im herkömmlichen Sinn geben, sowie eine Darstellung über moderne Methoden der Fluoreszenzmikroskopie zur Umgehung des Abbe-Kriteriums liefern.

2.1 Klassische Beugungstheorie

Mit Hilfe der geometrischen Optik, die als Spezialfall der klassischen Beugungstheorie aufgefasst werden kann, können Beugungsphänomene nicht beschrieben werden. Dies liegt an der wellenförmigen Struktur elektromagnetischer Erscheinungen, deren Charakter durch rein geometrische Betrachtungen nicht berücksichtigt wird. Durch konsequente Weiterentwicklung der Aussagen der Maxwell-Gleichungen kann insbesondere durch die Fraunhofer-Approximation eine hinreichend genaue Beschreibung für Beugungsphänomene gefunden und auf mikroskopische Systeme adaptiert werden.

2.1.1 Maxwell-Gleichungen

Sämtliche klassischen elektromagnetischen Phänomene können mit Hilfe der Maxwell-Relationen beschrieben werden, die ihrerseits aus den herkömmlichen Gesetzen der Elektro- und Magnetostatik, d.h. zeitlich unabhängiger Felder, abgeleitet sind [46]. Zur Beschreibung von elektrostatischen Feldern ergeben sich aus dem Coulomb-Gesetz die Grundgleichungen für die Elektrostatik zu $\nabla \times \mathbf{E} = \mathbf{0}$ und $\nabla \cdot \mathbf{E} = \rho/\epsilon_0$ mit $\epsilon_0 = 1/(4\pi k) = 1/(\mu_0 c^2)$.

In analoger Form können magnetostatische Felder über $\nabla \times \mathbf{B} = \mu_0 \mathbf{j}$ und $\nabla \cdot \mathbf{B} = 0$ angegeben werden. Bei der Betrachtung zeitabhängiger Phänomene ergibt sich eine Verallgemeinerung, die zu einer Kopplung dieser Gleichungen führt. Durch Anwendung der Kontinuitätsgleichung für Ladung und Strom (Ladungserhaltung) $\nabla \cdot \mathbf{j} + \partial\rho/\partial t = 0$ und den Übergang auf zeitabhängige Felder mittels Eichtransformationen erhält man die *Maxwell-Gleichungen* in Materie in differentieller Schreibweise:

$$\nabla \cdot \mathbf{D} = \rho \quad (2.1)$$

$$\nabla \times \mathbf{H} = \mathbf{j} + \frac{\partial \mathbf{D}}{\partial t} \quad (2.2)$$

$$\nabla \times \mathbf{E} = -\frac{\partial \mathbf{B}}{\partial t} \quad (2.3)$$

$$\nabla \cdot \mathbf{B} = 0 \quad (2.4)$$

Diese bilden die Basis zur Beschreibung von klassischen elektromagnetischen Erscheinungen und damit insbesondere optischer Phänomene. Die Vektorpotentiale \mathbf{D} und \mathbf{H} sind dabei definiert als elektrische Verschiebung $\mathbf{D} = \epsilon_0 \mathbf{E}$ bzw. magnetische Feldstärke $\mathbf{H} = \mathbf{B}/\mu_0$. Betrachtet man die Maxwell-Gleichungen in Gebieten, in denen die Ladungsdichten $\rho(\vec{x}, t)$ und Stromdichten $\mathbf{j}(\vec{x}, t)$ verschwinden, so erhält man nach zweifacher Differentiation Wellengleichungen für das elektrische und magnetische Feld:

$$\left(-\Delta + \frac{1}{c'^2} \frac{\partial^2}{\partial t^2} \right) \mathbf{E}(\mathbf{x}, t) = 0 \quad (2.5)$$

$$\left(-\Delta + \frac{1}{c'^2} \frac{\partial^2}{\partial t^2} \right) \mathbf{B}(\mathbf{x}, t) = 0 \quad (2.6)$$

Dabei entspricht $c' = c/n$ der Lichtgeschwindigkeit innerhalb des Mediums mit Brechungsindex n . Diese Gleichungen haben Lösungen, die laufenden und sich mit der Geschwindigkeit c' ausbreitenden ebenen Wellen entsprechen. D.h. es gilt

$$\mathbf{E}(\mathbf{x}, t) = e^{i(\mathbf{k} \cdot \mathbf{x} - \omega t)} \quad (2.7)$$

$$\mathbf{B}(\mathbf{x}, t) = e^{i(\mathbf{k} \cdot \mathbf{x} - \omega t)} \quad (2.8)$$

mit dem Wellenvektor $|\mathbf{k}| = \omega/c$ für $n=1$ im Vakuum.

2.1.2 Integralformulierung von Kirchhoff

Die Wechselwirkung elektromagnetischer Wellen mit einem Beugungshindernis (Apertur/Linse) kann in ihrer ersten Näherung mit Hilfe der geometrischen Optik beschrieben werden. Um jedoch eine konsequentere Formulierung von Beugungserscheinungen zu erhalten ist es notwendig, die Verschmierung von einfallenden Wellen durch das Hindernis zu betrachten. Dabei sind die im Folgenden diskutierten Näherungen in Regionen definiert, in denen der Ablenkwinkel θ der gebeugten elektromagnetischen Welle der Bedingung $\theta \lesssim \lambda/d \ll 1$ genügt, wobei λ der Wellenlänge und d der Dimension des Beugungshindernisses entsprechen.

Weiterhin wird die zugrundeliegende Geometrie der Beugungsregion aufgeteilt in eine Quellregion, welche den einfallenden Wellen entspricht und in eine Wechselwirkungsregion mit Oberfläche S , die das Beugungshindernis darstellt und mit der Quellregion interagiert,

d.h. Reflexions- und Absorptionserscheinungen verursacht und insbesondere einen modifizierten Anteil des Quellfeldes transmittiert.

Dieser transmittierte Anteil ist der für die hier behandelten optischen Abbildungseigenschaften eines Objekts elementare Bestandteil zur Erklärung des Auflösungsvermögens eines Mikroskops. Die Winkelverteilung der Transmission wird als *Beugungsmuster* bezeichnet und stellt den Teil des elektromagnetischen Quellfeldes dar, der in Abhängigkeit vom Quellfeld und der Interaktion mit dem Beugungshindernis bzw. der Feldverteilung auf der Oberfläche S präzisiert wird.

Skalare Betrachtung

Sei im Folgenden $\psi(\mathbf{x}, t)$ ein beliebiges skalares Feld. Dann schreiben sich die Gleichungen (2.5) und (2.6) ohne Anwesenheit von Quellen als

$$\left(\Delta - \frac{1}{c^2} \frac{\partial^2}{\partial t^2}\right) \psi(\mathbf{x}, t) = 0 \quad (2.9)$$

mit folgenden möglichen Lösungen für das Vakuum in Form von ebenen Wellen:

$$\psi(\mathbf{x}, t) = e^{i(\mathbf{k}\cdot\mathbf{x} - \omega t)} \quad (2.10)$$

Unter der Annahme, dass $\psi(\mathbf{x}, t)$ als Fourier-Integral $\psi(\mathbf{x}, t) = 1/(2\pi) \int_{-\infty}^{\infty} \psi(\mathbf{x}, \omega) e^{-i\omega t} d\omega$ mit der entsprechenden inversen Transformation formuliert werden kann und eine harmonische Zeitabhängigkeit $e^{-i\omega t}$ besitzt, erfüllt $\psi = \psi(\mathbf{x})$ die homogene *Helmholtz-Gleichung*

$$(\Delta + k^2)\psi(\mathbf{x}) = 0 \quad (2.11)$$

mit dem Betragsquadrat $k^2 = \omega^2/c^2$ des Wellenvektors. Dieser Ausdruck erlaubt nun den Übergang zur skalaren Beugungstheorie, wie zuerst von Kirchhoff formuliert. Der grundlegende Ansatz liegt dabei in der Annahme, dass Beugungserscheinungen an Aperturen auftreten, deren Dimension groß ist im Vergleich zur Wellenlänge.

Durch Einführung einer Greenschen Funktion $G(\mathbf{x}, \mathbf{x}')$, welche der Helmholtz-Gleichung $(\Delta + k^2)G(\mathbf{x}, \mathbf{x}') = \delta(\mathbf{x} - \mathbf{x}')$ genügt und die auslaufende Wellen

$$G(\mathbf{x}, \mathbf{x}') = \frac{e^{ikR}}{4\pi R} \quad (2.12)$$

mit $\mathbf{R} = |\mathbf{x} - \mathbf{x}'|$ beschreibt, erhält man aus (2.11) das *skalare Kirchhoff-Integral*:

$$\psi(\mathbf{x}) = -\frac{1}{4\pi} \int_S \frac{e^{ikR}}{R} \mathbf{n}' \cdot \left[\nabla' \psi + ik \left(1 + \frac{i}{kR} \right) \frac{\mathbf{R}}{R} \psi \right] da' \quad (2.13)$$

Integriert wird über die gesamte Oberfläche S des Beugungshindernisses, wobei da' die relative Position eines differentiellen Oberflächenelements angibt und \mathbf{n}' ein auf der auslaufenden Kugelwelle definierter Normalenvektor ist, der entgegen der Ausbreitungsrichtung in das Beugungsvolumen zeigt. Den Kirchhoffschen Näherungen liegen dabei zwei Annahmen zugrunde:

1. Sowohl ψ als auch $\partial\psi/\partial n$ verschwinden überall auf S bis auf die Öffnungen
2. Die Werte von ψ und $\partial\psi/\partial n$ in den Öffnungen sind gleich der Werte der einlaufenden Welle bei Abwesenheit eines Beugungshindernisses

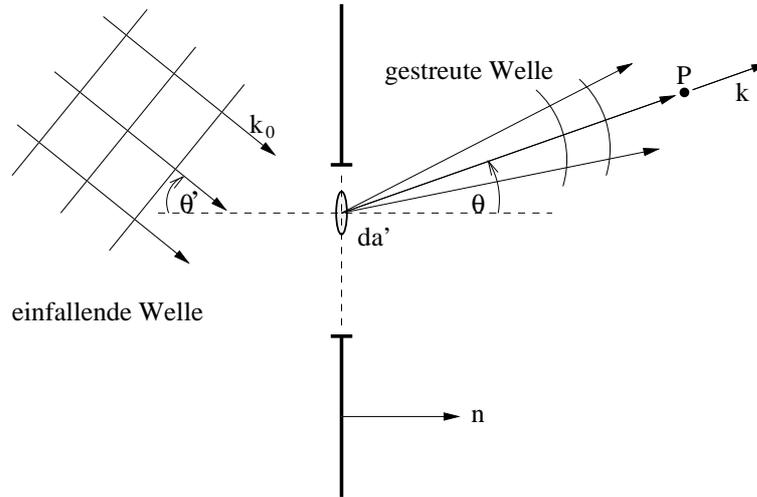


Abbildung 2.1: Illustration der Beugung an einem differentiellen Oberflächenelement da' einer unter dem Winkel θ' einfallenden Welle mit Wellenzahl k_0 . Die gestreute Welle läuft unter dem Winkel θ mit modifizierter Wellenzahl k aus dem Wechselwirkungsgebiet aus.

Mit diesen Annahmen und der zusätzlichen Einschränkung auf *Neumannsche Randbedingungen*¹ kann die Kirchhoffsche Integralformulierung weiterhin in folgender allgemeinen Form dargestellt werden:

$$\psi(P) = \frac{k}{2\pi i} \int_{Apertur} \frac{e^{ikr}}{r} \frac{e^{ikr'}}{r} \mathcal{O}(\theta, \theta') da' \quad (2.14)$$

Dieser Ausdruck stellt den Spezialfall der Betrachtung des Beugungsproblems unter Zuhilfenahme einer Punktquelle P' vor der Apertur und der Observablen P nach Durchlaufen des Hindernisses dar. Abbildung 2.1 zeigt schematisch die Geometrie der hier aufgeführten Situation, wobei θ und θ' dem Winkel der aus- bzw. einlaufenden Wellen relativ zur Normalen von S entsprechen. Unter Berücksichtigung der Kirchhoff-Approximation gilt dabei für den Neigungsfaktor $\mathcal{O}(\theta, \theta') = 1/2(\cos \theta + \cos \theta')$, der für große Abstände von P und P' als konstant angesehen werden kann.

Vektorielle Betrachtung

Da elektromagnetische Wellen einen vektoriellen Charakter besitzen, wird nun der Übergang der skalaren Formulierung auf eine vektorielle Größe wie dem elektrischen oder magnetischen Feld \mathbf{E} und \mathbf{B} erläutert. Der Ausdruck (2.13) beschreibt das gebeugte skalare Feld $\psi(\mathbf{x})$ nach der Wechselwirkung mit der Apertur.

Für die Erweiterung zur vektoriellen Darstellung des Kirchhoff-Integrals unter Miteinbeziehung der Kirchhoff-Approximationen und Neumannscher Randbedingungen kann ein analoger Formalismus zur skalaren Betrachtung entwickelt werden. Durch Einführung einer geeigneten Greenschen Funktion wird das *vektorielle Kirchhoff-Integral* für die elektrische

¹Mit der Neumannschen Randbedingung ist die Normalenableitung $(\mathbf{n} \cdot \nabla)\psi(\mathbf{x})$ bekannt $\forall t$ und $x \in \partial V$ mit V als Volumen des transmittierten Anteils.

Komponente² des Feldes zu:

$$\mathbf{E}(\mathbf{x}) = \frac{1}{2\pi} \nabla \times \int_{\text{Apertur}} (\mathbf{n} \times \mathbf{E}) \frac{e^{ikR}}{R} da' \quad (2.15)$$

Die Integration erfolgt wiederum über die gesamte Apertur, wobei die Größe \mathbf{E} die Tangentialkomponente, d.h. die laterale Projektion des elektrischen Feldes auf die Beugungsebene beschreibt.

2.1.3 Beugung an einer kreisförmigen Apertur

Da die optischen Komponenten, die in der Mikroskopie zum Einsatz kommen, zumeist eine radialsymmetrische Geometrie aufweisen, kann das Beugungsbild in den meisten Fällen durch die Betrachtung einer kreisförmigen Beugungsstruktur wiedergegeben werden. Um die genaue Struktur des elektrischen Feldes nach Durchgang durch eine solche Geometrie zu beschreiben, kann auf die zuvor hergeleiteten Kirchhoffschen Integraldarstellungen (2.13) bzw. (2.15) zurückgegriffen werden. Die Betrachtung einer vorgegebenen Geometrie erfordert nun allerdings eine exaktere Berücksichtigung der zugrundeliegenden Skalen, wodurch die historisch bedingte Fraunhofer- bzw. Fresnel-Beugung klassifiziert wird [46, 13].

Prinzipiell kann man nur von einem realen Beugungsmuster sprechen, solange r , d.h. der Abstand vom Beugungssystem mit Dimension d zur Observablen, hinreichend groß ist, also $r \gg d$. Desweiteren wird durch die verwendete Wellenlänge λ ein weiterer Parameter vorgegeben, der für die Charakterisierung des optischen Systems von grundlegender Bedeutung ist.

Die Bedingung $r \gg d$ impliziert gleichermaßen, dass z.B. in der Darstellung (2.15) langsam variierende Parameter als konstant angenommen werden können, wodurch sich eine grobe Abhängigkeit nur noch im Faktor kR der Exponentialfunktion äußert. Die Entwicklung

$$kR = kr - k\mathbf{n} \cdot \mathbf{x}' + \frac{k}{2r} [r'^2 - (\mathbf{n} \cdot \mathbf{x}')^2] + \dots \quad (2.16)$$

für $r \gg d$ und mit $\mathbf{n} = \mathbf{x}/r$ als Einheitsvektor in Beobachtungsrichtung, liefert dann Terme der Ordnung (kr) , (kd) , $(kd)(d/r)$, ..., wobei innerhalb des Fraunhofer-Regimes Terme ab der dritten Ordnung vernachlässigbar sind, da $kd \ll 1$.

Bei der *Fraunhofer-Beugung* wird dabei davon ausgegangen, dass die ein- und auslaufenden elektromagnetischen Wellen parallel zueinander propagieren (*paraxiale Näherung*). Dies wurde bei der bisherigen Betrachtung stets angenommen, da Punktquelle und Observable als weit entfernt vom Beugungsschirm vorausgesetzt waren. Bei divergenter oder konvergenter Wellenausbreitung spricht man von *Fresnel-Beugung* und höhere Terme der Entwicklung (2.16) können nicht mehr vernachlässigt werden:

1. Fraunhofer-Beugung $\Leftrightarrow kd \ll 1$

2. Fresnel-Beugung $\Leftrightarrow kd \geq 1$

Da hier weiterhin der Fall der Fraunhofer-Beugung betrachtet werden soll, kann man sich auf das Fernfeld, also Gebiete mit $kr \gg 1$ beschränken und die Näherung $R = |\mathbf{x} - \mathbf{x}'|$

²Der Übergang zur Darstellung der magnetischen Komponente erfolgt formal durch die Ersetzung $\mathbf{E} \rightarrow c\mathbf{B}$ und $c\mathbf{B} \rightarrow -\mathbf{E}$.

verwenden, wodurch aus (2.13) für die skalare Feldverteilung folgt:

$$\psi(\mathbf{x}) = -\frac{e^{ikr}}{4\pi r} \int_S e^{i\mathbf{k}\cdot\mathbf{x}'} [\mathbf{n} \cdot \nabla' \psi(\mathbf{x}') + i\mathbf{k} \cdot \mathbf{n} \psi(\mathbf{x}')] da' \quad (2.17)$$

In analoger Weise erhält man aus (2.15) die vektorielle Form für das elektrische Feld:

$$\mathbf{E}(\mathbf{x}) = \frac{ie^{ikr}}{2\pi r} \mathbf{k} \times \int_S \mathbf{n} \times \mathbf{E}(\mathbf{x}') e^{-i\mathbf{k}\cdot\mathbf{x}'} da' \quad (2.18)$$

Durch Einführung von Polarkoordinaten in (2.18) kann das daraus resultierende Winkelintegral durch eine Besselfunktion dargestellt werden und man erhält, für eine unter dem Winkel α relativ zur Normalenrichtung einer kreisförmigen Apertur mit Radius a einlaufende ebene Welle, das elektrische Feld in der sogenannten *Smythe-Kirchhoff-Approximation*

$$\mathbf{E}(\mathbf{x}) = \frac{ie^{ikr}}{r} a^2 E_0 \cos \alpha (\mathbf{k} \times \boldsymbol{\epsilon}_2) \frac{J_1(ka\xi)}{ka\xi} \quad (2.19)$$

mit $\xi = (\sin^2 \theta + \sin^2 \alpha - 2 \sin \theta \sin \alpha \cos \phi)^{1/2}$. Analog ergibt sich durch Quadrierung für die gestreute Leistung pro Einheitswinkel in Abhängigkeit von der Beobachtungsrichtung

$$\frac{dP}{d\Omega} = P_i \cos \alpha \frac{(ka)^2}{4\pi} (\cos^2 \theta + \cos^2 \phi \sin^2 \theta) \left| \frac{2J_1(ka\xi)}{ka\xi} \right|^2 \quad (2.20)$$

mit einem Vorfaktor $P_i \propto E_0^2 \pi a^2 \cos \alpha$, der die gesamte, in Normalenrichtung zur Apertur einfallende Leistung beschreibt. Dabei definieren θ und ϕ die üblichen Winkel innerhalb eines Bezugssystems unter Verwendung von Polarkoordinaten und J_1 die sphärische Besselfunktion 1. Ordnung.

In der bis hier vorgestellten Diskussion tritt eine starke Winkelabhängigkeit der transmittierten Anteile auf. Dies liegt an der bisherigen Berücksichtigung der Polarisations-eigenschaften der Felder, die keine Rolle mehr spielen, falls man lediglich in Normalenrichtung, d.h. mit $\alpha = 0$ und $ks \gg 1$ einlaufende Wellen betrachtet. Damit folgt sowohl für die skalare als auch für die vektorielle Betrachtung folgender allgemeine Ausdruck:

$$\frac{dP}{d\Omega} \cong P_i \frac{(ka)^2}{4\pi} \left| \frac{2J_1(ka \sin \theta)}{ka \sin \theta} \right|^2 \quad (2.21)$$

Diese Relation charakterisiert die Antwort eines optischen Systems tangential zur Geometrie des Beugungshindernisses, d.h. das Beugungsmuster bzw. detektierte Signal nach Durchlaufen einer kreisförmigen Apertur. Diese tangential Ebene wird auch als *laterale* Ebene bezeichnet, wohingegen die *axiale* Richtung als die Normalenrichtung bezüglich der lateralen Ebene definiert ist.

Übergang auf ein „reales“ mikroskopisches System

In der Fluoreszenzmikroskopie wird inkohärentes Licht von einer punktförmigen Observablen in alle Raumrichtungen emittiert, welches dann mit Hilfe eines in der Regel hochnumerischen und auf unendlich korrigierten Objektivs zur weiteren Detektion des Fluoreszenzsignals in ein paralleles Strahlenbündel überführt wird. Es liegt also prinzipiell die umgekehrte Situation zu den bisherigen Betrachtungen vor, bei denen ein paralleles Strahlenbündel in der paraxialen Näherung durch ein Wechselwirkungsgebiet beeinflusst wurde.

Außerdem wird bei der eigentlichen Detektion des Beugungsmusters nicht die elektrische Komponente $\mathbf{E}(\mathbf{x})$ sondern die aufintegrierte Intensität gemessen, die im Wesentlichen (2.21) entspricht. Um nun einen allgemeinen Ausdruck für das Intensitätsfeld unter „realen“ fluoreszenzmikroskopischen Bedingungen, d.h. der Abbildung einer strahlenden Punktquelle durch ein Objektiv zu definieren, muß lediglich die bisher geforderte Propagation der Wellenfronten umgekehrt werden, was aufgrund der Symmetrieeigenschaften optischer Systeme ohne Einschränkung konform mit den bisherigen Überlegungen ist.

Man führt dann zuerst eine neue optische Koordinate $\nu_{lat}(r)$ für das laterale Beugungsmuster ein. Unter der Annahme, dass der Observationspunkt nahe an der optischen Achse z liegt, d.h. $\cos \theta \approx 1$, folgt mit $\sin \theta = r/z \cos \theta \approx r/z$ in kartesischen Koordinaten für das Argument der Besselfunktion in (2.21) die radiale optische Koordinate [33]:

$$\nu_{lat}(r) = ka \sin \theta \approx \frac{2\pi a}{\lambda} \frac{a}{f} \cdot r \approx \frac{2\pi}{\lambda} NA \cdot r \quad (2.22)$$

Dabei ist mit $z = f$ das Feld im Fokuspunkt f und mit

$$NA = n \sin \alpha \approx n \frac{a}{f} \quad (2.23)$$

die numerische Apertur NA der Linse bzw. des Objektivs gegeben, wobei hier α als halber Öffnungswinkel des Objektivs bezeichnet wird. Man sieht außerdem, dass die optische Koordinate $\nu_{lat}(r)$ nun zusätzlich noch eine Abhängigkeit vom Brechungsindex n des beugenden Mediums aufweist.

Letztendlich ergibt sich dann unter Miteinbeziehung der für (2.21) geforderten Annahmen für die laterale Intensitätsverteilung:

$$I(r)|_{z=0} = I_0 \left[\frac{2J_1(\nu_{lat}(r))}{\nu_{lat}(r)} \right]^2 \quad (2.24)$$

Das axiale Beugungsbild erhält man dann formal durch Integration über die laterale Ebene der Apertur. Die Radialkoordinaten verschwinden in diesem Fall, da sich die Betrachtung auf die optische Achse beschränkt und man erhält mit

$$I(r)|_{r=0} = I_0 \left[\frac{\sin(\nu_{ax}(z)/4)}{\nu_{ax}(z)/4} \right]^2 \quad (2.25)$$

die axiale Intensitätsverteilung mit der axialen optischen Koordinate

$$\nu_{ax}(z) = \frac{2\pi NA^2}{\lambda} \frac{1}{n} \cdot z \quad (2.26)$$

Abbildung 2.2 illustriert die Intensitätsverteilungen im Fokusbereich eines Objektivs für die laterale und axiale Situation wie durch (2.24) beziehungsweise (2.25) beschrieben.

2.2 Punktbildfunktion und Auflösungsvermögen

Wie im vorangegangenen Abschnitt erläutert, unterliegt das detektierte Signal einer punktförmigen Observablen einer Verschmierung, die auf Beugungserscheinungen durch das abbildende optische System zurückzuführen sind. Diese sind dabei unabhängig von der Art

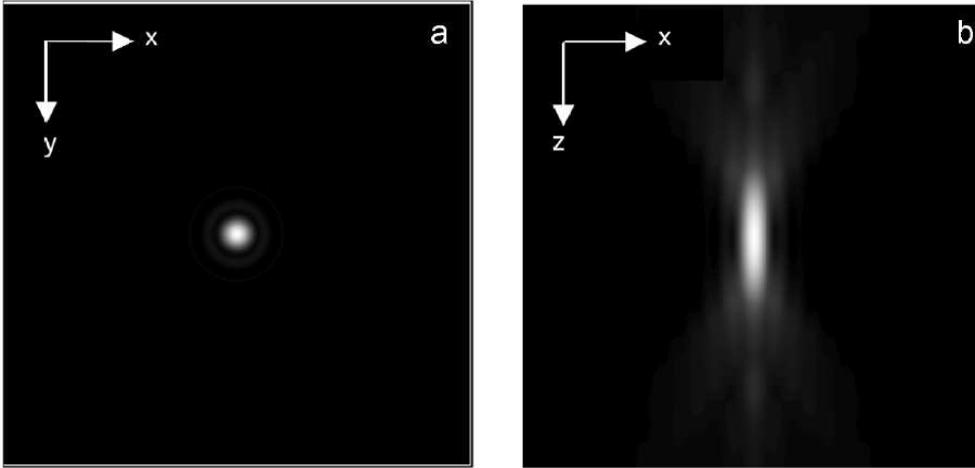


Abbildung 2.2: Laterale (a) und axiale (b) Intensitätsverteilung im Fokusbereich eines Objektivs (Bildquelle [16]).

der Detektion, d.h. der lateralen oder axialen Abtastung. Um das axiale Beugungsmuster einer Punktquelle zu erhalten, wird das Objekt lediglich in axialer Richtung durch den Fokus des Detektionsobjektivs gefahren und die Einzelbilder aus jeder aufgenommenen z -Position aufsummiert.

Der so erhaltene Intensitätsverlauf einer Punktquelle wird auch als *Punktantwort* bezeichnet, wobei die *Punktbildfunktion* (engl.: *Point Spread Function (PSF)*) $h(r)$ bzw. $h(z)$ die Abbildung eines optischen Systems charakterisiert. Die Ausdrücke (2.24) und (2.25) gelten also analog zu folgender Formulierung für die PSF der Abbildung im Fokus des Objektivs mit

$$h(r)|_{z=0} = h_0 \left[\frac{2J_1(\nu_{lat}(r))}{\nu_{lat}(r)} \right]^2 \quad (2.27)$$

für die laterale und

$$h(z)|_{r=0} = h_0 \left[\frac{\sin(\nu_{ax}(z)/4)}{\nu_{ax}(z)/4} \right]^2 \quad (2.28)$$

für die axiale PSF mit den gleichen optischen Koordinaten ν_{lat} und ν_{ax} aus (2.22) bzw. (2.26).

Die so hergeleitete Beugungscharakteristik impliziert also eine Begrenzung der Auflösung (Vgl. Abbildung 2.2), die abhängig ist von der Wellenlänge, mit der das Objekt beleuchtet wird, dem zugrundeliegenden Brechungsindex und der Größe des Raumwinkels, mit welchem die vom Objekt emittierten Wellenfronten vom Beobachter aufgefangen werden (numerische Apertur des Objektivs).

Auflösungsvermögen

Grundsätzlich gibt es verschiedene Möglichkeiten, das Auflösungsvermögen Δd eines Mikroskops zu definieren. Eine sehr gebräuchliche Methode ist durch das *Rayleigh-Kriterium* gegeben mit

$$\Delta d_{lat} = 0,61 \cdot \frac{\lambda}{NA} \quad (2.29)$$

für das laterale und

$$\Delta d_{ax} = 2 \cdot \frac{n\lambda}{NA^2} \quad (2.30)$$

für das axiale Auflösungsvermögen. Die Vorfaktoren entsprechen dabei den jeweiligen 1. Nullstellen der Besselfunktion in (2.27) bzw. von $\sin(z)/z$ in (2.28). Um also zwei benachbarte Punkte noch räumlich getrennt detektieren zu können, darf das Hauptmaximum der einen PSF höchstens das erste Minimum der benachbarten PSF überlappen.

Ein weiteres sehr gebräuchliches Kriterium für das Auflösungsvermögen ist durch die Halbwertsbreite *FWHM* (engl.: *Full Width at Half Maximum*) der PSF gegeben. Dabei ergibt sich die Auflösung durch die Breite der PSF bei halber Höhe des Intensitätsverlaufs im Fokuspunkt zu

$$FWHM_{lat} = 0,52 \cdot \frac{\lambda}{NA} \quad (2.31)$$

für die laterale Auflösung aus (2.27) bzw.

$$FWHM_{ax} = 1,77 \cdot \frac{n\lambda}{NA^2} \quad (2.32)$$

für die axiale Auflösung aus (2.28). Mit anderen Worten können Strukturen, die kleiner als etwa die halbe Wellenlänge des Anregungslichts sind, nicht mehr aufgelöst werden. Für konventionelle Mikroskope ergibt sich daraus ein Auflösungsvermögen von ungefähr 200nm in lateraler und 450nm in axialer Richtung.

Bis vor einigen Jahren bestand also die einzige Möglichkeit zur Verbesserung der Auflösungseigenschaften in der Optimierung der Gleichungen (2.29) - (2.32) durch eine verbesserte numerische Apertur der verwendeten Objektive, dem Angleich der Brechungsindizes im Objektraum und der Verringerung der Wellenlänge des Anregungslichts. Neueste höchstauflösende Mikroskopiemethoden erreichen demgegenüber eine technisch realisierbare Auflösung von bis zu $\lambda/50$ (siehe Abschnitt 2.5).

2.3 Optische Transferfunktion

Im vorangegangenen Abschnitt wurde der Begriff der Punktbildfunktion (PSF) eingeführt, welche die Antwort eines punktförmigen Objekts nach Durchlaufen eines optischen Systems charakterisiert. Eine weitergehende Interpretation dieses Sachverhalts kann nun dadurch erfolgen, dass man sich das Objekt aus beliebig vielen einzelnen Punkten aufgebaut vorstellt. Jeder dieser Punkte wird dann mit der gleichen PSF auf die Bildebene projiziert, wodurch das Gesamtbild entsteht. Überträgt man diese Überlegungen auf ein einfaches optisches System wie in Abbildung 2.3 dargestellt, so resultiert das Gesamtbild $g(r)$ aus der Integration der einzelnen Intensitätsverteilungen der Punkte im Objektraum. Das optisch abbildende System generiert also eine Antwort $g(r)$ mit [48]:

$$g(r) = \int_{-\infty}^{+\infty} f(r') \cdot h(r - r') dr' = f(r) \otimes h(r) \quad (2.33)$$

Dies entspricht einer Faltung des Objekts $f(r)$ mit der Punktbildfunktion $h(r)$ des Systems, wobei vom Detektor lediglich Intensitäten, gegeben durch $I(r, t) \propto |E(r, t)|^2$, gemessen werden. Um also einen Ausdruck für die allgemeine Intensitäts-PSF zu erhalten, muss das

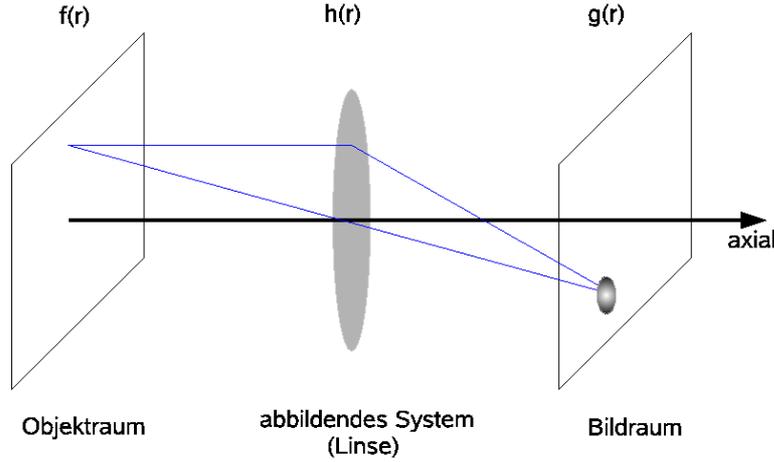


Abbildung 2.3: Entstehung des Gesamtbildes $g(r)$ durch Integration über sämtliche Intensitätsverteilungen der Punkte im Objektraum.

elektrische Feld im Fokus der Linse betrachtet werden, das gegeben ist durch die sogenannte Amplituden-PSF h_A [33]:

$$h_A(r, z) = \exp(-ikz) \int_0^a P(\theta) J_0(kr \sin(\theta)) \exp(-ikz \cos(\theta)) \sin(\theta) d\theta \quad (2.34)$$

Dabei ist a der maximale Aperturwinkel über den integriert wird, $k = 2\pi n/\lambda$ die Wellenzahl, θ der Aperturwinkel, $r = \sqrt{x^2 + y^2}$ die radiale Koordinate, J_0 die Besselfunktion 0. Ordnung und $P(\theta)$ die Pupillenfunktion der Linse. Unter zusätzlicher Annahme, dass die Amplituden-PSF verschiebungsinvariant ist³, kann mit (2.34) die Intensitäts-PSF $h(r)$ definiert werden über:

$$h(r) = |h_A(r)|^2 \quad (2.35)$$

Allerdings muss hier darauf geachtet werden, dass eine Linearität bezüglich der Intensität der Abbildung nur im inkohärenten Fall vorliegt. Diese Bedingung ist bei der Fluoreszenzmikroskopie allerdings stets erfüllt, da das emittierte Fluoreszenzlicht eine inkohärente Abstrahlcharakteristik aufweist (siehe Abschnitt 2.4).

Die Eigenschaft, dass optische Systeme ein Objekt mittels einer relativ komplexen Faltungsoption (Faltung des Objekts $f(r)$ mit der PSF $h(r)$) in die Bildebene transferieren, erschwert die analytische Beschreibung erheblich. Allerdings kann die Berechnung unter Verwendung des Faltungstheorems, d.h. durch den Übergang in den Fourierraum, vereinfacht werden. Eine Faltung im Ortsraum entspricht der Multiplikation komplexer Zahlen im Fourierraum, wodurch sich, mit den zugehörigen Fouriertransformierten $G(\mathbf{k})$, $F(\mathbf{k})$ und $H(\mathbf{k})$ mit Raumfrequenzen $|\mathbf{k}| = 2\pi/\lambda$, folgende Darstellung ergibt:

$$\begin{aligned} g(r) &= f(r) \otimes h(r) \\ &\updownarrow \\ G(\mathbf{k}) &= F(\mathbf{k}) \cdot H(\mathbf{k}) \end{aligned} \quad (2.36)$$

³Diese Forderung ist für herkömmliche Mikroskopobjektive im Allgemeinen erfüllt.

Dieser, als *Optische Transferfunktion (OTF)* bezeichnete Ausdruck, beschreibt die Übertragung der Raumfrequenzen \mathbf{k} eines Objekts bei der optischen Abbildung, wodurch eine alternative Definition des Auflösungsvermögens optischer Systeme durch den Anteil übertragener Raumfrequenzen, also der Größe des Übertragungsbereichs der OTF, angegeben werden kann. Allerdings sind die Bereiche, in denen $H(\mathbf{k}) \neq 0$ ist, im Allgemeinen sehr klein, so dass sich z.B. für die OTF der Abbildung mit einer Linse folgende maximal übertragene Raumfrequenzen in lateraler bzw. axialer Richtung mit dem Aperturwinkel α ergeben [35]:

$$k_{lat} = \frac{4\pi \sin(\alpha)}{\lambda} \quad (2.37)$$

$$k_{ax} = \frac{2\pi(1 - \cos(\alpha))}{\lambda} \quad (2.38)$$

Zur Herleitung dieser Ausdrücke betrachtet man die in Abbildung 2.4(a) dargestellte Fouriertransformierte des elektrischen Feldes $E(k)$, welche nur auf einer infinitesimal kleinen Kugelschale mit Radius $k_0 = 2\pi/\lambda_0$ ungleich Null ist. Bei der Detektion mit einer Linse können folglich nur diejenigen Raumfrequenzen k_{lat} (2.37) und k_{ax} (2.38) abgebildet werden, die innerhalb des doppelten Öffnungswinkels α der Linse liegen (Abbildung 2.4(b)). Damit erhält man schließlich die in Abbildung 2.4(c) aufgeführte Geometrie für die OTF einer Linse, die im 3-dimensionalen Übergang um die k_z -Achse rotiert.

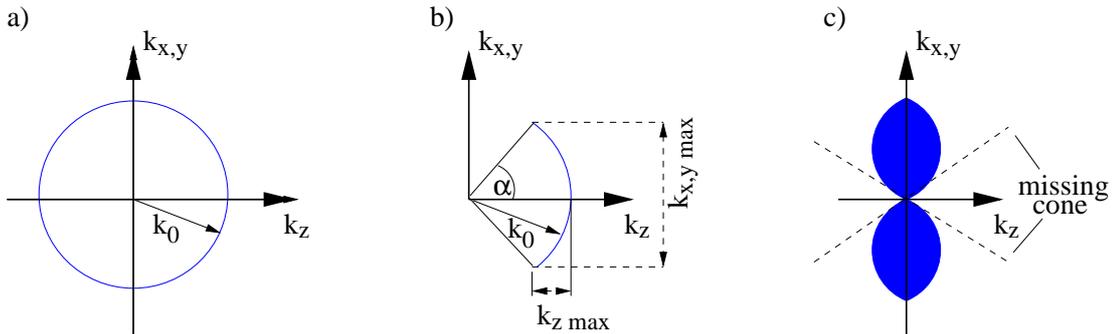


Abbildung 2.4: Zur Herleitung der Optischen Transferfunktion (OTF) für die Abbildung mit einer Linse.

2.4 Fluoreszenz

Zur gezielten Selektion, d.h. Anregung sehr kleiner Untersuchungsobjekte wie sie im Bereich der molekularen Zellbiologie sehr oft erforderlich sind, spielen Fluoreszenzmarkierungen eine entscheidende Rolle. Mit Hilfe konventioneller Durchlichtmikroskopie ist es nicht möglich, subchromosomale Strukturen, deren Dimensionen im Bereich $\leq 1\mu\text{m}$ liegen, aufzulösen. Um aus solch kleinen Objekten dennoch einen vernünftigen Informationsgehalt zu extrahieren, hat sich die Methode der Fluoreszenzmikroskopie etabliert, bei der Farbstoffmoleküle spezifisch an eine Zielregion andockt (siehe Kapitel 3) und mit Hilfe kohärenter Beleuchtung angeregt und zu spontaner Emission gebracht werden. Das so erzeugte Detektionssignal trägt dann direkte Informationen über das betreffende Objekt.

Abbildung 2.5 zeigt das vereinfachte Jablonski-Energiediagramm eines organischen Farbstoffmoleküls mit den erlaubten quantenmechanischen Übergängen [43]. Durchgezogene Pfeile symbolisieren Strahlungsprozesse, während gestrichelte Linien strahlungslose Übergänge aufzeigen. Innerhalb der einzelnen elektronischen Niveaus S_0 (Grundzustand) und S_1 (1. angeregter Zustand) existieren noch unterschiedliche Schwingungsniveaus innerhalb derer Übergänge stattfinden können. Desweiteren ist der 1. Triplettzustand T_1 angegeben, der aufgrund der Auswahlregeln nicht direkt vom Grundzustand aus angenommen werden kann.

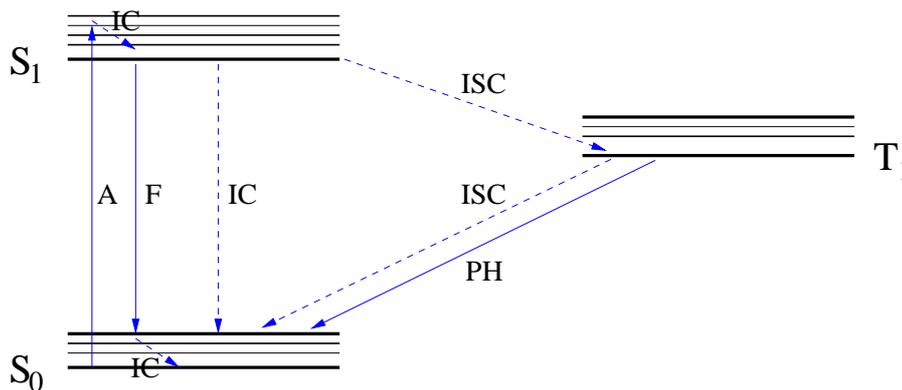


Abbildung 2.5: Jablonski-Energiediagramm eines organischen Farbstoffmoleküls: die durchgezogenen Pfeile kennzeichnen Strahlungsprozesse, während gestrichelte Linien strahlungslose Übergänge indizieren. Eingetragen ist das Grundniveaus S_0 , der 1. angeregte Zustand S_1 sowie der Triplettzustand T_1 mit den zugehörigen Schwingungsniveaus. A bezieht sich auf Absorptionsvorgänge, F auf Fluoreszenz, PH auf Phosphoreszenz, IC auf innere Konversion und ISC auf Inter System Crossing.

Durch Absorption eines Photons mit entsprechender Energie kann nun ein Übergang vom energetisch tiefer liegenden Grundzustand in energetisch höhere Schwingungszustände von S_1 erfolgen. Bei Zimmertemperatur wird das Molekül durch Stöße mit Nachbarmolekülen oder Atomen innerhalb von Picosekunden in den energieärmsten Schwingungsgrundzustand von S_1 relaxieren. Eine Möglichkeit des Übergangs in den Grundzustand des Moleküls besteht nun in der Emission eines Fluoreszenzphotons, das gerade die Energiedifferenz zwischen dem energieärmsten Zustand von S_1 und einem beliebigem Schwingungszustand von S_0 trägt. Dieser Vorgang liegt im Bereich von Nanosekunden, während die erneute Relaxation von einem etwaigen S_0 -Schwingungszustand zum Grundzustand wiederum innerhalb von Picosekunden erfolgt. Dieser Übergang hat nun für die Fluoreszenzmikroskopie eine entscheidende Konsequenz: durch den, wenn auch minimalen, Energieverlust bei der Relaxation innerhalb des S_1 -Zustands, ist die Energie des emittierten Photons etwas geringer als die Energie, die ursprünglich absorbiert wurde. Diesen als *Stokes-Verschiebung* bezeichneten Effekt macht man sich zunutze, indem man geeignete Filterkombinationen verwendet, die in der Lage sind, das Anregungs- vom ca. 20-50nm rotverschobenen Emissionslicht spektral zu trennen. Das so erhaltene Signal kann dann eindeutig der Zielregion zugeordnet werden und enthält idealerweise keine Anteile mehr von störendem Hintergrund wie gestreutes oder transmittiertes Anregungslicht, dessen Intensität ein Vielfaches über dem Fluoreszenzsignal liegt.

Eine weitere Möglichkeit der Rückkehr zum Grundzustand besteht für das Farbstoffmolekül in Form von strahlungslosen Übergängen. In diesem Fall verliert das Molekül durch Stöße Energie, welche dann als Wärme abgegeben wird. Damit kann eine spezifische Quantenausbeute η angegeben werden, wobei $\eta \approx 0,8$ ein Wert für sehr gute Farbstoffe ist, der eine 80%ige Übergangswahrscheinlichkeit in den Grundzustand unter Aussendung eines Fluoreszenzphotons angibt.

2.5 Höchstaufflösende Mikroskopiesysteme

Die in den vorangegangenen Abschnitten diskutierten Beugungsphänomene erklären die Verschmierung von Observablen durch ein optisches System, wodurch eine theoretische Auflösungsgrenze in der lichteoptischen Mikroskopie gegeben ist. Die Auflösung wird dabei bestimmt durch die Halbwertsbreite der Intensitätsverteilung des gemessenen Objekts und beträgt für konventionelle Mikroskope wie z.B. dem konfokalen Laser-Raster-Mikroskop (engl.: *Confocal Laser Scanning Microscope (CLSM)*) ungefähr 200nm in lateraler und 450nm in axialer Richtung.

In jüngster Vergangenheit haben sich neuere Verfahren etabliert, die entweder in der Lage sind, die optische Auflösung unter zusätzlicher Anwendung von *Point Spread Function Engineering* -Methoden tatsächlich zu verbessern, oder sich geeigneter, optischer Techniken bedienen, um dieses Limit zu umgehen. Die wichtigsten dieser Entwicklungen werden in den folgenden Abschnitten kurz vorgestellt.

4Pi-Mikroskopie

Das konfokale 4Pi-Mikroskop [39, 40] stellt das erste kommerziell verfügbare höchstaufflösende Mikroskop dar, mit dessen Hilfe biologische Strukturen bis zu ~ 100 nm Auflösung untersucht werden können. Das Prinzip hierbei ist, dass mittels kohärenter Beleuchtung durch zwei sich gegenüber liegende, hochnumerische Objektive auf gleiche Objektraumkoordinaten fokussiert wird, wodurch sich der effektive Öffnungswinkel deutlich erhöht. Durch Interferenz der einander entgegenlaufenden Wellenfronten kann in axialer Richtung der herkömmliche, beugungsbegrenzte konfokale Objektpunkt im Fokusbereich noch weiter eingegrenzt, d.h. die Halbwertsbreite der axialen Intensitätsverteilung deutlich verringert werden.

STED-Mikroskopie

Bei der herkömmlichen Fluoreszenzmikroskopie wird ein Fluorophor in einen Zustand angeregt, der beim Übergang in den Grundzustand Fluoreszenzlicht emittiert. Da nun aber das anregende Licht der klassischen Beugung unterliegt, kann das Anregungsgebiet der fluoreszierenden Moleküle nicht kleiner als 200nm sein. In der STED- (engl.: *Stimulated Emission Depletion*) Mikroskopie [41] umgeht man das Problem der räumlich ausgedehnten Anregung durch eine zeitlich beschränkte und lokale Überführung des Fluorophors in einen nicht-fluoreszierenden Zustand. Dadurch kann erreicht werden, dass das Emissionslicht aus einem Raumgebiet stammt, welches kleiner als die eigentliche beugungsbegrenzte Ausdehnung des Anregungslichts ist.

Zur Etablierung eines nicht-fluoreszierenden Zustands werden hierzu optisch sättigbare

Fluorophore verwendet, die reversible Eigenschaften besitzen, um die Umkehrbarkeit des Prozesses zu gewährleisten. Durch dieses Konzept der *stimulierten Emission* hängt die theoretisch mögliche Auflösung prinzipiell nur noch vom erreichbaren Sättigungsgrad ab, bzw. ist in realiter durch das Signal zu Rausch Verhältnis gegeben, wodurch sich folgende neue Formulierung der Auflösungsbegrenzung ergibt:

$$d \geq \frac{\lambda}{2n \sin \alpha \cdot \sqrt{1 + I/I_{sat}}}$$

Dabei ist I_{sat} die sogenannte Sättigungsintensität. Sie gibt die Schwelle an, bei der die Fluoreszenz eines Moleküls mit 50%iger Wahrscheinlichkeit unterdrückt wird und ist charakteristisch für den verwendeten Farbstoff. Durch kontinuierliche Erhöhung von I/I_{sat} wird somit die Auflösungsgrenze weiter nach unten verschoben. (Im Grenzfall einer nicht-stimulierten Emission ($I = 0$) folgt der von Abbe formulierte Ausdruck).

Das Prinzip der stimulierten Emission ist dann gegeben durch Abregung eines normalerweise fluoreszierenden Moleküls, d.h. durch einen erzwungenen Übergang in den Grundzustand. Da der Prozess reversibel ist, können abgeregte Moleküle auch gleich wieder von Neuem angeregt und nachfolgend wieder in den Grundzustand versetzt werden. Dabei verringert sich mit zunehmender Intensität der Stimulation die Gesamtfluoreszenz, bis die Abregung komplett, d.h. gesättigt ist und die Fluoreszenz weitestgehend erlischt. Mit Hilfe der STED-Mikroskopie konnten mittlerweile schon Auflösungen von $\sim 16\text{nm}$ erzielt werden.

I⁵M-Mikroskopie

Eine weitere Methode zur Umgehung der klassischen Beugungsbegrenzung ist mit der I⁵M-Mikroskopie [35, 36, 37] gegeben. Mittels einer Beleuchtung mit ebenen Wellenfronten und einer kohärenten Detektion des Fluoreszenzlichts durch zwei Objektive konnten hier schon Auflösungen von etwa 100nm in axialer Richtung erreicht werden.

SMI-Mikroskopie

Das in dieser Arbeit vorgestellte SMI (engl.: *Spatially Modulated Illumination*) -Mikroskop gehört zum Typus der Wellenfeldmikroskope und erreicht mit Hilfe von Methoden des Point Spread Function Engineerings ein Auflösungsäquivalent von bis zu 30nm für Objektgrößen und eine hochpräzise Objektlokalisierung in (augenblicklich) einer Dimension [59, 69, 27, 72, 28]. Bei diesem Verfahren werden analog zum 4Pi-Prinzip zwei einander gegenüberliegende Objektive verwendet.

Der grundlegende Unterschied besteht allerdings in der nicht-konfokalen Beleuchtung und Weitfeld-Detektion. Durch konstruktive Interferenz zweier linear polarisierter und kollimierter Laserstrahlen wird im Objekttraum in axialer Richtung ein stehendes Wellenfeld generiert, wodurch sich Intensitätsmaxima und -minima ausbilden. Durch eine geeignete Objektrasterung kann schließlich eine modifizierte Punktbildfunktion detektiert werden, die sehr konkrete Aussagen über Objektgrößen und -positionen unterhalb der Abbe-Bedingung, d.h. bis zu $\lambda/20$ zulassen. Diese Methode wurde erstmalig im Jahre 1993 vorgestellt [9].

PALM

Ein neu entwickeltes Verfahren zur Umgehung klassischer Beugungslimitierung ist durch PALM (engl.: *Photoactivated Localization Microscopy*) [12] gegeben, welches theoretisch Auflösungen bis in den molekularen Bereich, d.h. bis zu einigen Nanometern verwirklichen kann. Dabei gründet sich diese Methode nicht in der aufwändigen Entwicklung eines neuen mikroskopischen Verfahrens; vielmehr werden spezifische Eigenschaften photoaktivierbarer oder photoschaltbarer Moleküle konsequent ausgenutzt.

Ein geringer Teil photoaktivierbarer Moleküle, die an die Zielregion angelagert sind, werden mit einem kurzen Laserpuls bei einer Wellenlänge von $\lambda_{act}=405\text{nm}$ aktiviert und anschließend bei einer Wellenlänge von $\lambda_{exc}=561\text{nm}$ detektiert, bis sie vollständig ausgebleichen sind. Durch häufiges Wiederholen dieses Prozesses wird die Population von inaktivierten und unausgebleichenen Molekülen letztendlich komplett ausgelöscht.

Auf den ersten Blick wird dadurch also ein gewöhnlicher, beugungsbegrenzter Datenstapel generiert. Indem man aber mit Hilfe der Punktbildfunktion des Mikroskops zuerst die Position jedes einzelnen Moleküls berechnet, kann man eine Lokalisationsgenauigkeit der einzelnen Fluorophore erreichen, die ausschließlich abhängig ist vom Fehler $\sigma_{x,y}$ der angepassten Fitfunktion bei der Lokalisation. Aufsummiert über sämtliche Positionen der einzelnen Moleküle resultiert hieraus eine höchst aufgelöste Darstellung, in der die optische Auflösung prinzipiell nur noch von der Unsicherheit der Lokalisationsgenauigkeit und nicht mehr durch die Beugungsbegrenzung des optischen Systems gegeben ist.

Kapitel 3

Molekulare Zellbiologie

In diesem Kapitel werden die grundlegendsten Begriffe eingeführt, die zum Verständnis der molekularbiologischen Bereiche dieser Arbeit notwendig sind. In einem ersten Teil werden zunächst allgemeine Definitionen zur Struktur der DNA und Genexpression vorgestellt. Den zweiten Teil des Kapitels bildet dann eine genauere Betrachtung zweier spezifischer DNA-Sequenzen, des sogenannten β -Globin-Lokus und des tet-Operons, welche einen wesentlichen Teil der biologisch orientierten Analysen ausmachen.

3.1 Grundlagen der molekularen Genetik

Zur Speicherung, Replikation und Übersetzung der Erbinformation eines Organismus spielen *Nukleinsäuren*, insbesondere in Form der Desoxyribonukleinsäure (engl.: *Desoxyribonucleic Acid (DNA)*) und Ribonukleinsäure (engl.: *Ribonucleic Acid (RNA)*) eine zentrale Rolle [3, 67, 56]. Durch spezifische Anordnungen von Nukleotiden in der DNA wird eine eindeutige, informationstragende Struktur gebildet, welche zur Übersetzung in ein Protein verwendet werden kann. Der reine Informationsgehalt wird also getragen von der DNA, während die RNA an der Übersetzung (Transkription) und Proteinsynthese (Translation) in Form der messenger- und transfer-RNA beteiligt ist. DNA und RNA sind dabei aufgebaut aus vier verschiedenen *Nukleotiden*, die ihrerseits wiederum aus einer Base, einem Zucker und einem Phosphatrest bestehen.

3.1.1 Struktur der DNA

Die DNA ist ein Polynukleotid und trägt die genetische Information in Form von Nukleotiden, die als vier Basen *Adenin*, *Guanin*, *Cytosin* und *Thymin* plus zugehörigem Zucker und Phosphatrest vorliegen. Die Nukleobase Thymin ist in der RNA ersetzt durch *Uracil*. RNA-Nukleotide unterscheiden sich weiterhin durch den Zucker, der hier in Form der Ribose vorliegt (entsprechend Desoxyribose für die DNA).

In der doppelsträngigen¹ DNA ist dabei die Anzahl an Adenin und Thymin, wie auch an Guanin und Cytosin in etwa gleich. Hierfür verantwortlich ist der Sachverhalt, dass jede Base in einem DNA-Strang mit einer komplementären Base im anderen Strang durch Wasserstoffbrücken verknüpft ist. Genauer gesagt besteht ein Basenpaar aus einer Purin

¹In einigen Viren kann die DNA allerdings auch als Einzelstrang vorliegen.

(Adenin oder Guanin) und einer Pyrimidin (Thymin oder Cytosin) -Base, woraus die Zusammensetzung Adenin \leftrightarrow Thymin und Guanin \leftrightarrow Cytosin folgt.

Die topologische Anordnung der DNA ist zum Einen also gegeben durch den Doppelstrang, definiert durch die Komplementarität der Purine und Pyrimidine. Zum Anderen wird sie durch eine Doppelhelix definiert, wie zuerst von *Watson* und *Crick* im Jahre 1953 publiziert [77]. Dabei gibt es drei unterschiedliche Anordnungen der Doppelhelix in Form der B-DNA, welche die vorherrschende Konformation in der Zelle ausmacht und der A- bzw. Z-DNA, auf die hier nicht näher eingegangen wird. Allen Konformationen gemein ist das Desoxyribose-Phosphat Rückgrat und die im Innern der Doppelhelix lokalisierten komplementären Basenpaare. Durch diese räumliche Anordnung ist die Oberfläche des DNA-Moleküls aufgrund der peripher angeordneten Zucker- und Phosphatreste polar und negativ geladen, was auch wesentliche Auswirkungen auf intrazelluläre Wechselwirkungen hat (siehe Kapitel 5). Zur Ausbildung eines höheren Organisationsgrades werden basische Proteine, die sogenannten *Histone* an die DNA angelagert, woraus eine perlenschnurförmige Struktur der DNA resultiert. Die einzelnen Komplexe aus DNA und Histonen bezeichnet man als *Nukleosom*, die ihrerseits wiederum in einem als *30nm Chromatinfaser*² bezeichneten Verbund aneinandergelagert sind. Das Chromatin bildet dann seinerseits schleifenförmige DNA-Domänen aus, die sich schließlich zum größtmöglichen Kompaktierungsgrad als *Metaphasen-Chromosom* organisieren können (siehe Abbildung 3.1).

Kodierung

Die informationstragenden Einheiten (einige Prozent) der DNA werden als *Gene* bezeichnet, wobei die menschliche DNA ca. 25000 Gene trägt. Bei Bedarf werden bestimmte Genabschnitte in RNA umgeschrieben, wobei die so generierte RNA als Matrize zur Synthese von Proteinen dient. Zur Synthese eines bestimmten Proteins bilden dann drei funktionelle Basen ein sogenanntes Triplet (Codon), das jeweils für eine der 20 natürlich vorkommenden, proteinogenen Aminosäuren kodiert.

3.1.2 Genexpression

Der gesamte Vorgang der Synthese eines Proteins wird als *Expression* bezeichnet. Hierzu muss zunächst einmal der abzulesende Genabschnitt in „freier“ Form, d.h. als dekondensierter DNA-Strang vorliegen. Die Sequenzinformation des betreffenden Gens wird dann in eine komplementäre prä-messenger-RNA (prä-mRNA) -Sequenz transkribiert und die so generierte Matrize im weiteren Verlauf mehrfach modifiziert, bis sie als mRNA den Zellkern verlässt. Erst im Zytoplasma der Zelle kann dann die eigentliche Synthese des Proteins erfolgen.

Transkription

Im Einzelnen zeigen sich sehr viele Mechanismen für den Prozess der Transkription verantwortlich. Immer beteiligt sind sogenannte Transkriptionsfaktoren, die als Regulatorproteine fungieren und an bestimmte DNA-Sequenzen andocken. Auf diese Weise kann die

²Aus Gründen der Vollständigkeit soll hier angemerkt werden, dass ein exakter wissenschaftlicher Nachweis bezüglich der Ausbildung einer 30nm Chromatinfaser bis zum jetzigen Zeitpunkt noch aussteht.

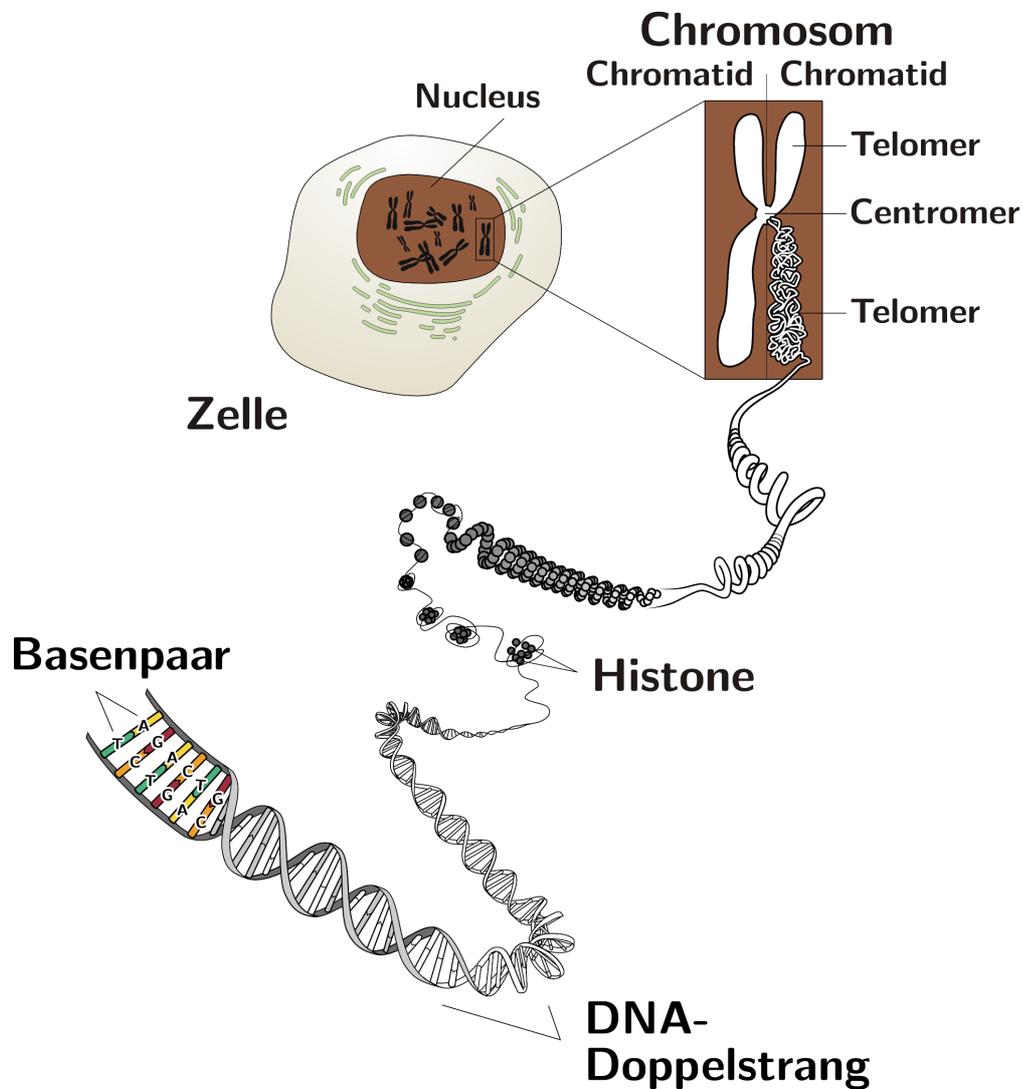


Abbildung 3.1: Zur Organisation der DNA: die reine DNA-Doppelstrang-Konformation ist aufgrund der peripher angeordneten Zucker- und Phosphatreste polar und negativ geladen, woraus in Folge intramolekularer Wechselwirkungen eine sehr instabile Struktur resultieren würde. Zur Erhöhung des Organisationsgrades werden im Innern der DNA basische Proteine (Histone) eingelagert, welche die komplementären Basenpaare umschließen und eine perlenschnurförmige Anordnung der DNA ausbilden. DNA-Histon-Komplexe (Nucleosomen) werden (vermutlich) in einem als 30nm Chromatinfaser bezeichneten Verbund aneinandergelagert und formieren im weiteren Verlauf ihrerseits schleifenförmige DNA-Domänen. Der höchste Organisationsgrad ist schließlich mit dem größtmöglichen Kompaktierungsgrad als Metaphasen-Chromosom erreicht (Bildquelle [30]).

Transkription von Genen aktiviert oder aber auch gehemmt werden. Im Falle der Hemmung spricht man dann von einem *Repressor*, während sich für den Fall der Genaktivierung *Induktoren* verantwortlich zeigen. Diese Regulatorproteine docken dabei an spezifische DNA-Sequenzen: zur Expression binden Transkriptionsfaktoren an eine als *Promoter* bezeichnete Kontrollsequenz und ermöglichen RNA-Polymerase II die Transkription der folgenden Gensequenz. Ein Repressor-bindender Kontrollabschnitt ist demgegenüber als *Operator* definiert. RNA-Polymerase II³ ist ein Enzym, das den DNA Doppelstrang lokal in Einzelstränge aufspaltet und die RNA Nucleotide komplementär zu den einzelnen Basenfolgen anlagert. Der betreffende Genabschnitt wird dann so lange ab der Initiationssequenz (Promoter) abgelesen, bis eine als Terminationssequenz bezeichnete Basenfolge erreicht ist, wodurch der Transkriptionsvorgang abgeschlossen wird. Im weiteren Verlauf wird die so generierte prä-mRNA-Sequenz modifiziert und verlässt als mRNA den Zellkern (siehe Abbildung 3.2).

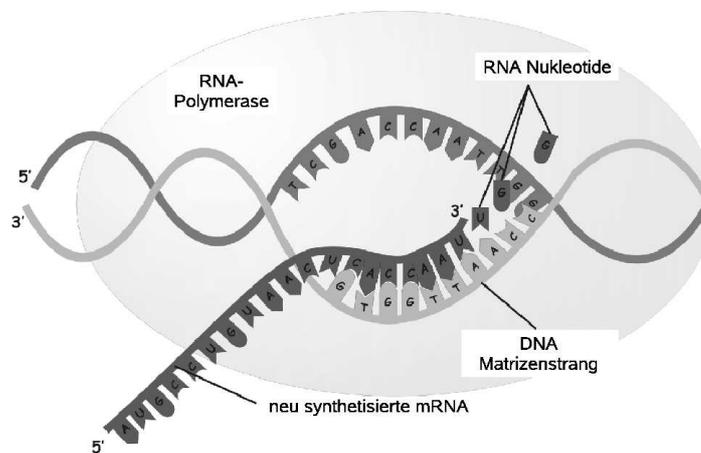


Abbildung 3.2: Illustration der Transkription: aus dem kodierten Anteil des Matrizenstrangs der DNA wird prä-mRNA generiert, die im weiteren Verlauf in mRNA umgewandelt wird und in modifizierter Form den Zellkern verlässt (Bildquelle [11]).

Translation

Bei der Translation wird die genetische Kodierung der mRNA innerhalb des Zytoplasmas mit Hilfe eines *Ribosoms* in Proteine übersetzt. Die in der Zelle vorhandenen 20 proteinogenen Aminosäuren werden dafür mit Hilfe der transfer-RNA (tRNA) zum Ribosom transportiert, wobei je eine tRNA die Kodierung für eine angelagerte Aminosäure enthält. Die tRNA fungiert also als Adapter, welcher entsprechend der Kodierung auf der mRNA Matrize eine spezifische Aminosäure bereithält und in der Summe eine Polypeptidkette synthetisiert. Das Ribosom steuert diesen Prozess insofern, dass es an die mRNA andockt und dadurch den Prozess der Translation initialisiert (siehe Abbildung 3.3).

³Entsprechend gibt es eine DNA-Polymerase, die bei der Duplikation, d.h. der Zellreplikation eine entscheidende Rolle spielt.

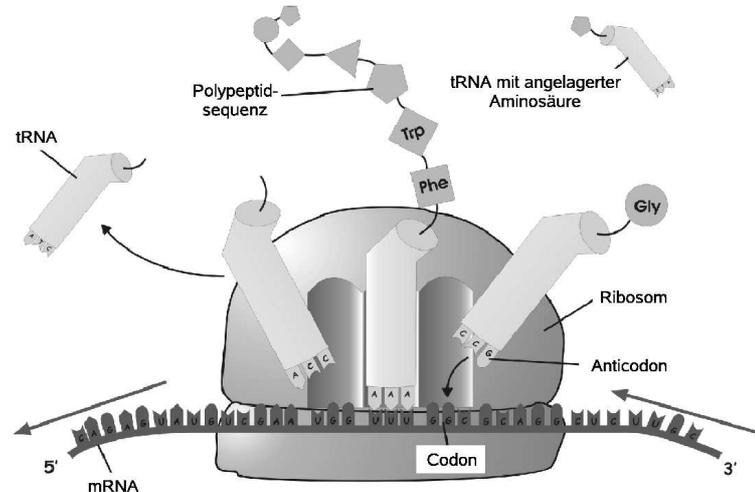


Abbildung 3.3: Illustration der Translation: mit spezifischen Aminosäuren gepaarte tRNA Sequenzen dekodieren die auf der mRNA enthaltene Information, wodurch ein Polypeptid synthetisiert und der Expressionsvorgang abgeschlossen wird (Bildquelle [11]).

3.2 Fluoreszenzmarkierung

Die wesentliche Grundlage, um subchromosomale Strukturen mittels lichtoptischer Verfahren auflösen zu können, liegt in der Markierung von spezifischen DNA Zielsequenzen mit Hilfe fluoreszierender Proteine. Um dies zu realisieren werden zunächst durch Erhitzen und *Formamid* die Wasserstoffbindungen der Basenpaare aufgebrochen und damit die Doppelstrang-Konformation aufgelöst. Ein Vorgang, der auch als *Denaturierung* bezeichnet wird. Dieser Prozess ist unter optimalen Bedingungen reversibel und kann ausgenutzt werden, indem man die DNA unter Ausbildung eines zusätzlichen Sondenstrangs zur doppelhelikalen Konformation renaturieren lässt. Diese Eigenschaft erlaubt es nun, bestimmte *Hybridisierungs*-Protokolle zu entwickeln, mit denen zu untersuchende Genregionen spezifisch mit Fluoreszenzmolekülen für die optische Detektion markiert werden können. Dieses Verfahren zur Markierung von Sequenzen innerhalb des Zellkerns wird als *Fluoreszenz In-Situ Hybridisierung (FISH)* bezeichnet (siehe Abbildung 3.4), wobei sich zwei unterschiedliche Methoden etabliert haben:

- **Direkte Markierung:** der zu untersuchende Genabschnitt wird *direkt* mit einer komplementären und fluoreszenzmarkierten DNA-Sequenz (Sonde) versehen, wobei die Länge dieser Sonden von einigen Basen (Oligonukleotide) bis zu Megabasen reichen kann. Falls die Sonde zusätzlich als Doppelstrang vorliegt, ergibt sich daraus der Vorteil, beide Komplementärstränge gleichzeitig markieren und detektieren zu können.
- **Indirekte Markierung:** in die DNA-Sequenz eingebaute, sogenannte Haptene wie Biotin oder Digoxigenin werden spezifisch mit Antikörpern gekoppelt, an die wiederum Fluoreszenzfarbstoffe zur Detektion angelagert sind. Da die Fluoreszenzfarbstoffe bei diesem Verfahren nicht direkt in der Zielregion eingelagert sondern mittels eines

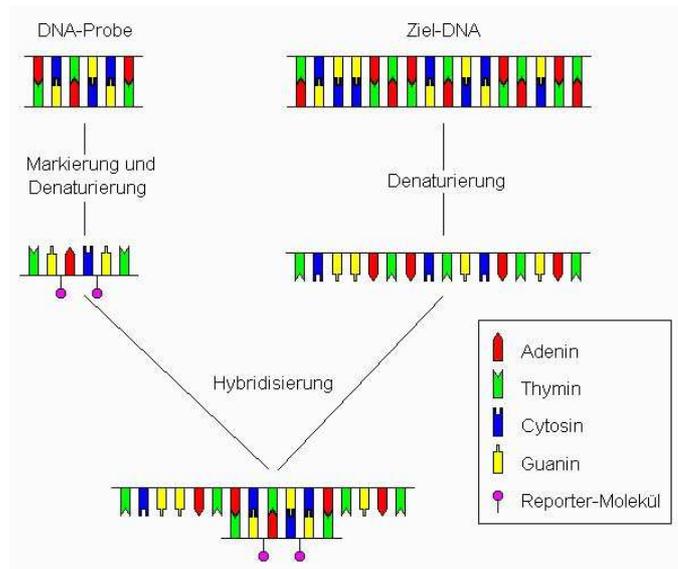


Abbildung 3.4: Prinzip der Fluoreszenz In-Situ Hybridisierung (FISH): die denaturierte Ziel-DNA renaturiert unter Miteinlagerung der fluoreszenzmarkierten Sondensequenz (Bildquelle [6]).

„Adapters“ verbunden sind, kann deren Anzahl prinzipiell beliebig variiert und damit das Fluoreszenzsignal beträchtlich erhöht werden.

Von enormer Bedeutung in diesem Zusammenhang ist, dass die jeweilige Markierungstechnik sehr genau an die Untersuchungsmethode, d.h. den verwendeten Mikroskoptyp angepasst sein muss. So können z.B. bei der indirekten Markierung zusätzlich zur eigentlichen Zielregion auch eine sehr große Anzahl von Nebenbindungsstellen an Proteinen oder RNA, sogenannte unspezifische Bindungen, auftreten. Diese Signale sind mit konventionellen Mikroskopen wie dem CLSM nicht oder nur bedingt detektierbar, wohingegen bei sensitiveren Verfahren wie der SMI-Mikroskopie eine sehr viel geringere Photonenzahl registriert werden kann. Als Folge kann hier die Identifikation der eigentlich interessierenden Zielregion erheblich erschwert bzw. im ungünstigsten Fall unmöglich werden, da sich die Anzahl der vom Zielsignal ausgesandten Photonen nicht mehr signifikant vom Hintergrundsignal unterscheidet. Ein weiteres Problem bei der Detektion können die Zielsequenzen selbst darstellen: um während der Renaturierungsphase die Wahrscheinlichkeit einer positiven Adaption der Sonde in den DNA-Strang zu erhöhen, gibt man die Markierungssequenzen in sogenanntem molarem Überschuss bei. Die verbleibenden, nicht gebundenen Anteile, werden anschließend mit Hilfe einer Puffer-Lösung entfernt (stringentes „Waschen“ bei hoher Temperatur). Im Idealfall sollten also lediglich an die Zielregion eingebundene Sondenabschnitte vorhanden sein. In realiter können aber sehr viele fluoreszierende Sondenabschnitte durch einen nicht optimalen Waschvorgang im Zellkern verbleiben, wodurch das Hintergrundsignal wiederum drastisch erhöht wird.

In-vivo Markierung

Die Protokolle für Fluoreszenzmarkierungen von fixierten Zellen wie oben beschrieben können nicht ohne Weiteres auf die Markierung von lebenden Zellen übertragen werden. So sind zum Beispiel nicht alle Farbstoffe auch für in-vivo Präparationen geeignet [55]. Desweiteren

können elementare Prozeduren wie stringentes Waschen bei hohen Temperaturen aufgrund der folgenden Denaturierung nicht mehr angewendet werden, wodurch die Zielsequenzen nicht mehr eindeutig zugeordnet werden können. Die Unterscheidung zwischen ungebundenem und spezifischem Sondersignal wird also erheblich erschwert mit dem Nebeneffekt einer weiteren Erhöhung des Hintergrundsignals. Dies stellt, zusätzlich zur ohnehin schon stark ausgeprägten Eigenfluoreszenz einer lebenden Zelle, einen weiteren Faktor dar, der zur Verminderung einer vernünftigen Signalextraktion führen kann.

3.2.1 Zellfixierung

Bei *nicht* in-vivo Untersuchungen⁴ werden die Zellen vor der eigentlichen Fluoreszenzmarkierung fixiert. Dieser Vorgang ist vergleichbar mit dem Einfrieren des augenblicklichen Zustands der Zelle, woraus eine Art Momentaufnahme resultiert, die bei vernünftiger Lagerung über einen längeren Zeitraum konserviert bleibt. Dabei existieren im Wesentlichen zwei unterschiedliche Techniken der Fixierung: die sogenannte Methanol-Eisessig- und die Paraformaldehydfixierung, die jeweils unterschiedliche Einflüsse auf die Zelle haben [52, 42, 10] (siehe auch Dissertation von Y. Weiland (zum jetzigen Zeitpunkt noch nicht fertiggestellt)). Das entscheidende Problem bei sämtlichen Fixierungsmethoden ist nun, dass die grundlegende Architektur intrazellulärer Konstituenten wesentlich beeinflusst wird. Bis zum jetzigen Zeitpunkt existieren im Wesentlichen nur rein qualitative Abschätzungen über die Auswirkungen der Zellfixierung auf die Struktur subchromosomaler Regionen.

Sehr genau bekannt ist lediglich, dass durch die Verwendung unterschiedlicher Salzkonzentrationen bei der Fixierung sowohl die Form, als auch das Volumen der Zelle durch Hydrierung bzw. Dehydrierung entscheidend verändert wird. Einen weiteren Einfluss auf die Struktur haben die hohen Temperaturen, welche während der Denaturierungsprozedur angewandt werden. Diese Schwierigkeiten erklären das enorme Interesse an der Entwicklung lichtoptischer Mikroskope, die in der Lage sind, hochauflösende Lebendzelluntersuchungen zu ermöglichen.

3.3 Der β -Globin-Cluster

Ein großer Teil der biologischen Analysen in dieser Arbeit bezieht sich auf den β -Globin-Cluster, welcher sich verantwortlich zeigt für die Synthese des Proteins Hämoglobin. Dieses Protein ist in Erythrozyten, den roten Blutkörperchen eingelagert und sorgt, durch seine Eigenschaft einer hohen Affinität zur Bindung von Sauerstoff bzw. Kohlendioxid, für den Transport dieser Gase im Organismus.

3.3.1 Evolutionäre Entwicklung

Für gewöhnlich liegen eukaryotische Gene, die RNA/Proteine kodieren, als Einzelkopien im Genom vor. Einige Gene sind jedoch in mehrfachen Kopien vorhanden oder zeigen zumindest große Sequenzähnlichkeiten untereinander. Solche Gene werden dann als Multigenfamilie klassifiziert, die sehr wahrscheinlich eine gemeinsame „Ur“-Sequenz haben.

Der β -Globin-Cluster ist ein klassisches Beispiel für eine Multigenfamilie, bei welcher der evolutionäre Verlauf, d.h. die Entwicklung aus einem ursprünglichen Vorläufer-Gen, sehr

⁴Dies entspricht bei subchromosomalen Strukturanalysen momentan noch der Regel.

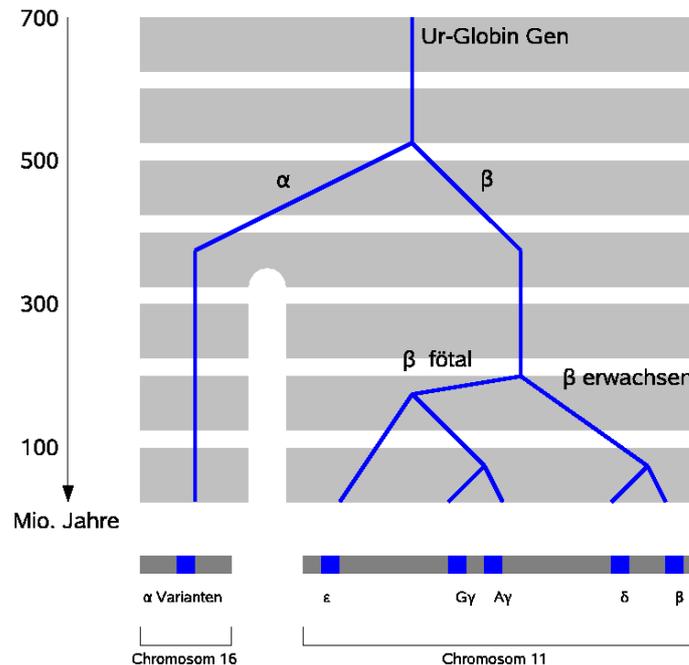


Abbildung 3.5: Evolutionäre Entwicklung des Globin-Gens: ausgehend von einem Ur-Gen haben sich infolge von Duplikation und Divergenz die beiden α - und β -Cluster entwickelt, die ihrerseits wiederum verschiedene Gensequenzen ausgebildet haben.

genau bekannt ist. Aus dem ursprünglichen Globin-Gen haben sich infolge von Duplikation und Divergenz die α - und β -Globin-Gene entwickelt, die ihrerseits ihre eigenen, spezifischen Gensequenzen ausbildeten, woraus die sogenannten α - und β -Cluster resultierten. Der Hintergrund hierfür ist, dass die einzelnen Gene innerhalb dieser Cluster die Hämoglobin-Synthese in verschiedenen Stadien des Organismus dominieren. So trägt z.B. der auf Chromosom 11 lokalisierte β -Globin-Cluster ein Gen für die embryonale ϵ -Kette und zwei Gene für die fötalen $G\gamma$ - und $A\gamma$ -Ketten, die in den jeweiligen Entwicklungsstadien des Organismus aktiviert, d.h. exprimiert werden. Dies ist eine Folge der sehr guten Anpassung an die im jeweiligen Stadium vorherrschenden Gegebenheiten. So haben beim Menschen embryonales und fötales Hämoglobin eine höhere Affinität zum Sauerstoff als das Hämoglobin des Erwachsenen. Dies zeigt eine Spezialisierung, die eine Folge des Energiehaushalts des sich entwickelnden Embryos/Fötus im Mutterleib ist, wodurch ein effizienterer Sauerstofftransfer vom mütterlichen auf den fötalen Organismus gewährleistet wird. Das exprimierte Hämoglobin selbst ist dann, je nach Entwicklungsgrad des Organismus, eine Folge aus unterschiedlichen Kombinationen des α - und β -Clusters bzw. deren Gene. Abbildung 3.5 zeigt schematisch die Entwicklung des Globin-Gens zum α - bzw. β -Cluster.

3.3.2 Struktur und Expression

Wie zuvor erläutert, haben sich evolutionär bedingt unterschiedliche Abschnitte innerhalb der Genfamilien ausgebildet. Beim β -Globin-Cluster sind dies die Gensequenzen ϵ (embryonal), $G\gamma$ und $A\gamma$ (fötal), die sich nach der Expression lediglich durch eine Aminosäure unterscheiden und δ (kindlich), wobei die fötalen und kindlichen Sequenzen vereinfacht

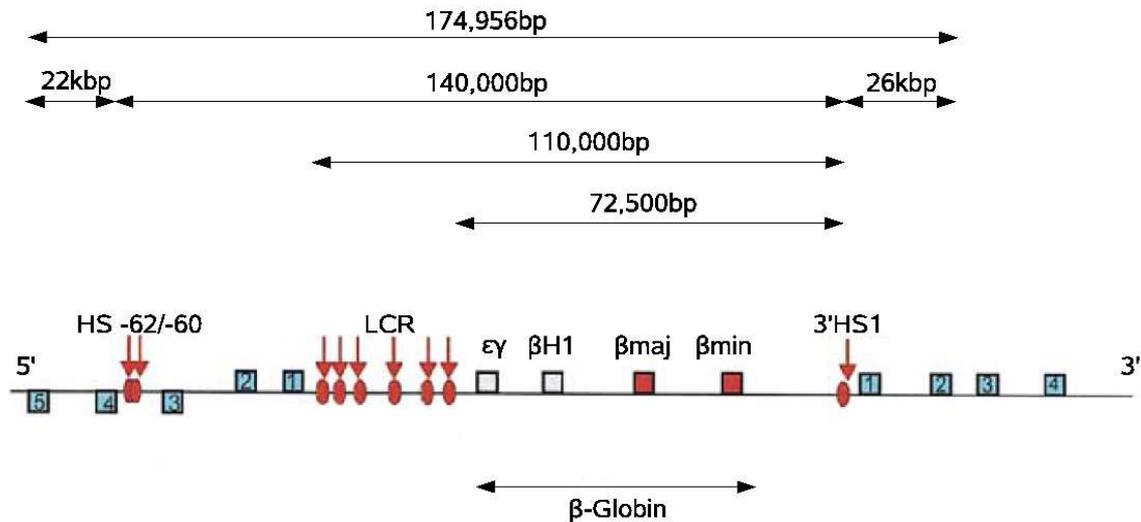


Abbildung 3.6: Schematische Darstellung des fötalen β -Globin-Lokus und zugehörige Längenskalen in Basenpaaren (bp): der komplette Locus umfasst etwa 175kbp und beinhaltet zwei hypersensitive Seiten am 5' und 3' Ende und eine Lokus-Kontroll-Region (LCR) (durch rote Pfeile gekennzeichnet). Die kodierten Sequenzen ϵ , γ (embryonal) und β (fötal) sind jeweils unterbrochen von Zwischensequenzen (Introns), die keinerlei kodierungsspezifische Information tragen und in der mRNA nicht mehr enthalten sind (Bildquelle [22]).

auch als γ - bzw. β -Globin-Lokus bezeichnet werden (Vgl. Abbildung 3.5). Desweiteren existiert noch ein sogenanntes Pseudogen Ψ , das keine kodierte Information trägt und nicht exprimiert wird. Die genaue Struktur des fötalen β -Globin-Clusters kann somit schematisch wie in Abbildung 3.6 dargestellt werden, wobei sich die gesamte Länge über ungefähr 175000 Basenpaare (bp) erstreckt, was (im linearen und dekondensierten, d.h. biologisch nicht realisierten Fall) in etwa $59,9\mu\text{m}$ entspricht ($1\text{bp} \cong 0,34\text{nm}$). Einen weiteren zentralen Bestandteil der Nukleotidsequenz bilden hier die Lokus-Kontroll-Region (engl.: *Locus Control Region (LCR)*), die bei der Aktivierung des Gens eine wesentliche Rolle spielt sowie die hypersensitiven Seiten am 5'- und 3'-Ende des Clusters. Diese liegen im Fall der Transkription zwar immer noch als Nukleosomen vor, beinhalten aber nicht mehr das Histon H1, wodurch der Zugang zu diesen Promoter-/Enhancer-Bereichen für RNA-Polymerase II erleichtert wird. Demgegenüber verbleiben die kodierten Bereiche vollständig in ihrer nukleosomalen Anordnung, was aber kein Hindernis für den Transkriptionsvorgang darstellt, da durch gewisse Mechanismen die Kontakte zwischen DNA und Histonkomplexen kurzzeitig aufgelöst werden können. Außerdem beinhaltet der Cluster wie jede andere Sequenz sogenannte *Introns*, d.h. Zwischensequenzen, welche die eigentlichen Kodierungssequenzen unterbrechen und keinerlei kodierungsspezifische Funktion erfüllen. Das Intron wird bei der Transkription zunächst mit abgelesen, wodurch ein primäres Transkriptionsprodukt, bestehend aus Introns und *Exons* (kodierte Nukleotidsequenzen) generiert wird. Erst im weiteren Verlauf der Modifikation der RNA werden die Zwischensequenzen entfernt bis sie schließlich in der mRNA nicht mehr enthalten sind (engl.: *Splicing*).

Topologie des aktiven und inaktiven β -Globin-Lokus

Die für die biologischen Untersuchungen vorgegebenen Fragestellungen beziehen sich auf SMI-Mikroskopische Messungen möglicher Unterschiede der Topologie zwischen aktiven und inaktiven fötalen Maus β -Globin-Sequenzen, deren Morphologie sich nur unwesentlich von der des Menschen unterscheidet. Nach [22, 64, 75] sollte sich die räumliche Struktur eines aktiven β -Globin-Lokus signifikant von der eines inaktiven Lokus unterscheiden (Vgl. Abbildung 3.6). Im inaktiven Fall sollte demnach eine annähernd lineare⁵ Konformation vorliegen, während sich im aktiven Fall die beiden hypersensitiven Seiten am 5'- bzw 3'-Ende der dekondensierten Sequenz in Richtung der LCR bewegen, um den jeweiligen kodierten Nukleotidsequenzen das Andocken and die Kontroll-Region zu ermöglichen (siehe Abbildung 3.7). Diese Anordnung bezeichnet man auch als aktiven Chromatin-Knoten (engl.: *Active Chromatin Hub (ACH)*). Es bilden sich also Schleifen (engl.: *Loops*) mit den kodierenden Sequenzen im Zentrum und den Introns in eher peripheren Bereichen. Die genaue Durchführung dieser Analysen und deren Ergebnisse werden in Kapitel 9 vorgestellt.

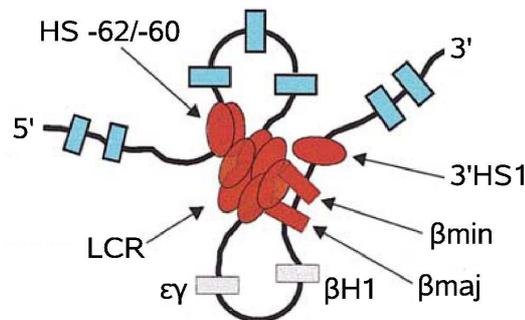


Abbildung 3.7: Schematische Darstellung des aktiven β -Globin-Lokus: sowohl die hypersensitiven 5'- und 3'-Enden als auch die zu exprimierenden β -Sequenzen bewegen sich zur LCR und bilden dort einen aktiven Chromatin-Knoten (engl.: *Active Chromatin Hub (ACH)*). Introns und nicht zur Expression vorgesehene Exons bilden Schleifen außerhalb des ACH (Bildquelle [22]).

3.4 Das tet-Operon

Erste qualitative und quantitative Versuche zur Lebendzelluntersuchung wurden an fluoreszenzmarkierten tet-Systemen von Bakterienzellen durchgeführt (siehe Kapitel 9). Diese Gensequenz kodiert ein Protein zur Resistenz gegen das Antibiotikum *Tetracyclin*. Die Tetracyclinresistenz wird dabei von zwei Genen kodiert, dem eigentlichen Resistenzgen tet-A und dem Regulatorgen tet-R.

Regulationsmechanismen: Das tet-System ist ein typisches Beispiel einer positiven Genregulation. Bei Abwesenheit von Tetracyclin wird der tet-Repressor (tet-R) exprimiert, welcher mit sehr hoher Spezifität an die tet-Operatorsequenzen in der LCR binden. Dadurch wird sowohl die Transkription von tet-R als auch die des Tetracyclin-Resistenzgens tet-A unterdrückt und damit die Expression des Gens gezielt reguliert (siehe Abbildung 3.8). Gelangt nun Tetracyclin durch passive Diffusion über die Zytoplasmamembran in die Zelle, so

⁵Die tatsächliche Struktur wird sicherlich eher zufällig und insbesondere in kondensierter Form vorliegen.

wirkt dieses in seiner antibiotisch wirksamen Form als hochspezifischer Induktor für tet-R. Tetracyclin bindet also an den tet-Repressor und induziert damit eine Konformationsänderung, die zum Verlust der Operatorbindefähigkeit von tet-R führt. Als Konsequenz kann RNA-Polymerase II an den Promoter binden und das Ablesen der Sequenz zur Expression von tet-A initiieren (siehe Abbildung 3.9). Das nachfolgend synthetisierte Resistenzprotein exportiert schließlich den Tetracyclin-Komplex aus der Zelle, bevor entscheidende Störungen des Metabolismus, hervorgerufen durch das Antibiotikum, auftreten können.

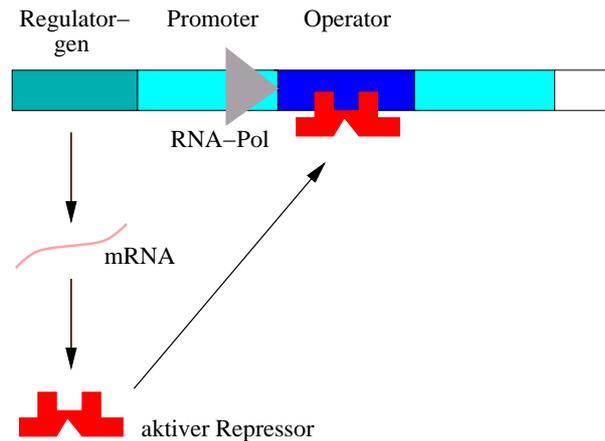


Abbildung 3.8: Das tet-Operon in Abwesenheit von Tetracyclin: der tet-Repressor ist aktiv und bindet an den Operator, wodurch ein Ablesen der nachfolgenden Sequenz unterdrückt wird.

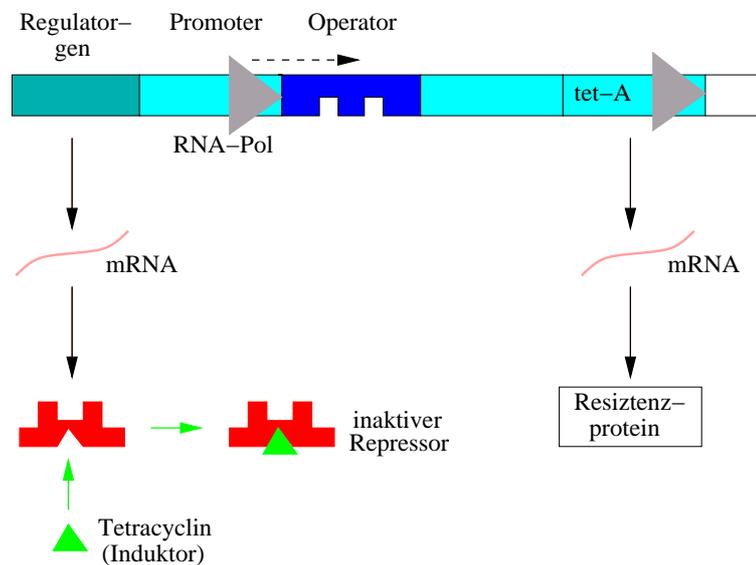


Abbildung 3.9: Das tet-Operon in Anwesenheit von Tetracyclin: Tetracyclin bindet hochspezifisch an tet-R, wodurch dessen Konformation geändert und die Bindung an den Operator verhindert wird. Als Konsequenz kann RNA-Polymerase II die nachfolgenden Sequenzen ablesen und das Resistenzgen tet-A exprimiert werden.

Kapitel 4

SMI-Mikroskopie

Sehr viele Fragestellungen innerhalb der molekularen Zellbiologie beziehen sich auf die Struktur subchromosomaler Komplexe, woraus sich etwaige Korrelationen zur Funktionalität spezifischer Gensequenzen herleiten lassen können [19]. Da dieser Größenbereich mit konventionellen Mikroskopen in der Regel nicht aufgelöst werden kann, bedarf es höchstauflösender lichtoptischer Methoden, die in der Lage sind, Strukturen mit Dimensionen unterhalb des Abbe-Kriteriums aufzulösen.

Ein hierzu seit einigen Jahren etabliertes Verfahren ist mit dem SMI- (engl.: *Spatially Modulated Illumination*) Mikroskop gegeben, welches streng betrachtet keine Auflösungsverbesserung im eigentlichen Sinn liefert. Vielmehr werden hier durch die Generierung einer modifizierten Punktantwort der Observablen zusätzliche Objektinformationen bereitgestellt, die, sinnvoll verarbeitet, zur Strukturanalyse sehr kleiner Objekte verwendet werden können. Mit Hilfe fluoreszenzbasierter (Weitfeld-) Detektion und einer geeigneten Nachbearbeitung der Rohdaten können sowohl axiale Ausdehnungen optisch isolierter Objekte in einem Bereich von etwa 30-200nm, entsprechend $1/20$ der Anregungswellenlänge, als auch Objektpositionen sehr genau bestimmt werden.

Dieses Kapitel ist dabei nur als grundlegende Einführung in die Theorie der SMI Mikroskopie und darauf aufbauender Analysetechniken gedacht. Für eine ausführlichere Darstellung dieser Thematik möchte ich auf [4, 73, 7, 58] verweisen.

4.1 Theorie

Das grundlegende Prinzip des SMI-Mikroskops besteht in der Abtastung von fluoreszierenden Objekten unter Verwendung einer räumlich modulierten Beleuchtung im Objektraum zweier sich gegenüberliegender hochnumerischer Immersionsobjektive als Teil einer interferometrischen Konfiguration. Das Fluoreszenzsignal selbst wird schließlich konventionell mittels einer Weitfeldanordnung durch das Detektionsobjektiv aufgefangen und anschließend mit Hilfe einer Tubuslinse auf einen CCD- (engl.: *Charge-Coupled Device*) Chip fokussiert, um eine digitalisierte Darstellung des Objekts zu erhalten.

4.1.1 Punktbildfunktion

Mit Hilfe der interferometrischen Anordnung werden zwei linear polarisierte, kohärente und kollimierte Laserstrahlen gleicher Intensität und Polarisation im Objektraum konstruktiv überlagert, wodurch ein stehendes Wellenfeld ausgebildet wird. Dessen Intensitätsprofil ist

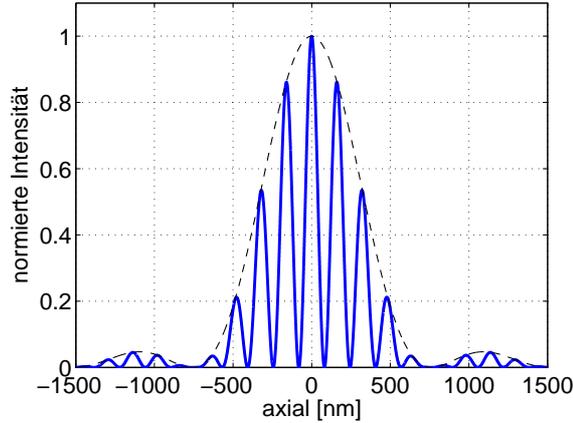


Abbildung 4.1: Simulierte Punktbildfunktion des SMI-Mikroskops (blau) berechnet nach Gleichung (4.4) mit einer Wellenlänge von $\lambda_{ill}=488\text{nm}$, einer numerischen Apertur von $NA=1.4$ und einem Brechungsindex von $n=1,5$. In schwarz (gestrichelt) ist die gewöhnliche axiale PSF eines Epifluoreszenzmikroskops dargestellt, die gerade die Einhüllende der SMI-PSF darstellt.

abhängig von der Vakuumwellenlänge des Anregungslichts λ_{ill} , dem Brechungsindex n im Objektraum und dem Winkel θ bzw. der Phasendifferenz $\Delta\phi$ der gegenläufigen, interferierenden Strahlen. Entlang der optischen Achse bilden sich also äquidistante Intensitätsmaxima und -minima aus, die der Bedingung [68]

$$I(z) = I_0 \cos^2 \left[k_z z + \frac{\Delta\phi}{2} \right] \quad (4.1)$$

mit $k_z = 2\pi n \cos(\theta)/\lambda_{ill}$ genügen und eine selektive Fluoreszenzanregung einzelner Objektbereiche ermöglichen. Der Abstand d der Wellenfronten lässt sich dann herleiten zu:

$$d = \frac{\lambda_{ill}}{2n \cos(\theta)} \quad (4.2)$$

Der wesentliche Unterschied zu einem konventionellen Weitfeldmikroskop besteht hier also in der strukturierten Beleuchtung in axialer Richtung, wodurch die resultierende Punktbildfunktion (PSF) zusätzlich modifiziert wird. Für die PSF der Beleuchtung folgt somit:

$$h_{ill[SMI]}(z) = h_0 \cos^2 \left[k_z z + \frac{\Delta\phi}{2} \right] \quad (4.3)$$

Dabei ist zu beachten, dass sämtliche Modifikationen bezüglich der Beleuchtungs- als auch der Detektions-PSF nur entlang der optischen Achse gültig sind. In lateraler Richtung entsprechen die Punktantworten denen eines gewöhnlichen Epifluoreszenzmikroskops, d.h. es gilt $h_{ill[SMI]}(r) = \textit{konstant}$ und $h_{det[SMI]}(r)$ entsprechend (2.27). Die Gesamt-PSF berechnet sich schließlich aus dem Produkt der Detektions- (2.28) und Beleuchtungs-PSF (4.3) zu

$$\begin{aligned} h_{axial[SMI]}(z) &= h_{det[SMI]}(z) \cdot h_{ill[SMI]}(z) \\ &= h_0 \cdot \text{sinc}^2 \left[\frac{\nu_{ax}(z)}{4} \right] \cdot \cos^2 \left[k_z z + \frac{\Delta\phi}{2} \right] \end{aligned} \quad (4.4)$$

mit der axialen optischen Koordinate $\nu_{ax}(z)$ aus (2.26) und der Vereinfachung $\text{sinc}(x) = \sin(x)/x$. Abbildung 4.1 zeigt die simulierte PSF des SMI-Mikroskops in axialer Richtung, berechnet für eine Anregungswellenlänge von $\lambda_{ill}=488\text{nm}$, eine numerische Apertur von $\text{NA}=1.4$ und einen Brechungsindex von $n=1.5$. Durch das Wellenfeld ist deren Profil stark strukturiert, wobei die Einhüllende gerade die Punktantwort eines konventionellen Epifluoreszenzmikroskops darstellt.

4.1.2 Optische Transferfunktion

Ausgehend von den Punktantworten in (4.4) kann eine verallgemeinerte Darstellung für drei Raumdimensionen angegeben werden mit:

$$h_{[SMI]}(\mathbf{r}) = h_{det[SMI]}(\mathbf{r}) \cdot h_{ill[SMI]}(\mathbf{r}) \quad (4.5)$$

Dabei ist in diesem Fall $h_{ill[SMI]}(\mathbf{r}) \equiv h_{ill[SMI]}(z)$, womit sich die Optische Transferfunktion (OTF) des SMI-Mikroskops nach den Ausführungen aus Kapitel 2 zu

$$H_{[SMI]}(\mathbf{k}) = H_{det[SMI]}(\mathbf{k}) \otimes H_{ill[SMI]}(\mathbf{k}) \quad (4.6)$$

ergibt. Mit diesen Betrachtungen der genauen Struktur der SMI-OTF (siehe Abbildung 4.2) wird klar, dass bei der Nachbearbeitung der Bilddaten einige Einschränkungen auftreten.

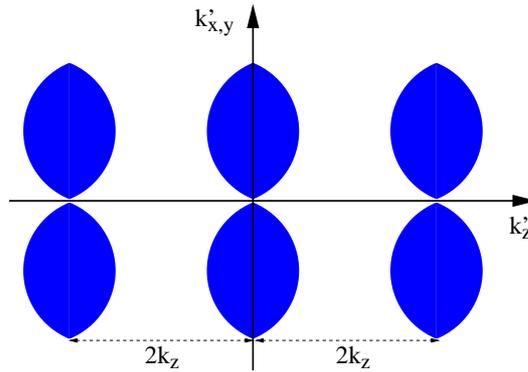


Abbildung 4.2: Schematische Darstellung der OTF des SMI-Mikroskops. Innerhalb der Bereiche, in denen die OTF Null ist, werden keine Raumfrequenzen und damit Objektinformationen übertragen, weshalb zusätzliche a priori Annahmen über die Form des Objekts in die Auswertung mit einfließen müssen.

Durch das sinusoidale Beleuchtungsmuster ergibt sich als Fouriertransformierte eine Struktur, die sich zusammensetzt aus den drei Delta-Verteilungen $\delta(k' = 0)$ und $\frac{1}{2}\delta(k' = \pm 2k_z)$, wobei Erstere einen um einen Faktor zwei höheren Wert besitzt. Daraus resultiert eine Modifikation der OTF gegenüber der Abbildung mit einer Linse (Vgl. Abbildung 2.4(c)) in Form einer Erweiterung des detektierbaren Frequenzraums nach $k' = \pm 2k_z$, woraus zusätzliche Informationen über die Observable extrahiert werden können. Die zuvor erwähnte Einschränkung bezieht sich nun auf die auffallenden Lücken im Frequenzspektrum, d.h. diejenigen Bereiche, in denen die OTF Null ist: an diesen Stellen werden keine Raumfrequenzen übertragen und somit auch keine Informationen über das Objekt. Als Folge müssen bei der Datenanalyse gewisse Annahmen über das Objekt in die Auswertelgorithmen mit einfließen, die sich z.B. in Abschätzungen über die Objektform äußern. Daraus ergibt sich

auch die Forderung, bei der SMI-Mikroskopie idealerweise nur optisch isolierte Objekte zu untersuchen. Optisch isoliert bzw. aufgelöst bedeutet in diesem Zusammenhang, dass der relative Abstand zweier Objekte größer ist als die Halbwertsbreite der zugehörigen, detektierten PSF, um ein Überlappen der Intensitätsverteilungen und daraus resultierende Mehrdeutigkeiten zu vermeiden.

4.2 Datenakquisition

Durch die kollimierte Strahlführung im Objektraum folgt die Detektion des SMI-Mikroskops einer herkömmlichen Weitfeld-Konfiguration, d.h. die gesamte laterale Fokusebene wird instantan abgebildet. Zur Datenakquisition (engl.: *Data Acquisition (DAQ)*) muss das zu analysierende Objekt also lediglich in einer Dimension (axial) abgetastet werden, woraus gleichermaßen eine wesentliche Erhöhung der Aufnahmegeschwindigkeit für einen kompletten Datensatz resultiert, da in diesem Fall ein zusätzliches, zeilenweises Abtasten der lateralen Ebene wie im konfokalen Fall entfällt. Dies ist insbesondere für Lebendzelluntersuchungen von enormer Bedeutung, da hier das Interesse in einer Optimierung der Datennahmegeschwindigkeit besteht, um aus der Objektmobilität (siehe Kapitel 5) resultierende, störende Einflüsse auf das Detektionssignal, möglichst zu minimieren.

Allerdings kann die Schrittweite, mit welcher das Objekt durch die Fokusebene gefahren wird, nicht beliebig gewählt werden: allgemein wird bei der Detektion ein analoges Signal digitalisiert, wodurch ein Übergang von einem kontinuierlichen in einen diskreten Raum erfolgt. Dieser Prozess ist per Definitionem nicht reversibel, da im Kontinuumsfall eine unendliche Menge (\mathbb{Q}) an Datenpunkten vorliegt, die in einen endlichen Zahlenraum (\mathbb{R}) abgebildet wird. Um nun bei der axialen Abtastung eines Objekts dennoch keinem allzu großen Informationsverlust zu unterliegen, muss die Schrittweite so gewählt sein, dass sie den Prinzipien des *Nyquist-Theorems* genügt: danach muss ein kontinuierliches Signal mit mindestens der doppelten Frequenz abgetastet werden, um aus der digitalisierten Antwort das (kontinuierliche) Ursprungssignal ohne Informationsverlust rekonstruieren zu können. Die generierte digitale Antwort muss also genügend Informationen tragen, um aus einer diskreten Anzahl von Datenpunkten eine hinreichend genaue, analoge Signalstruktur zu interpolieren. Ansonsten könnten sogenannte *Aliasing-Effekte* entstehen, wodurch bestimmte Frequenzanteile falsch interpretiert/rekonstruiert und unerwünschte Artefakte generiert würden.

In der Praxis wird dies realisiert, indem das Objekt für gewöhnlich in 40nm Schritten abgetastet bzw. durch den Fokuspunkt des Detektionsobjektivs und damit durch das stehende Wellenfeld bewegt wird, was bei einem Wellenfrontabstand von ungefähr 180nm eine adäquate Wahl darstellt. Die so erhaltene *Axiale Intensitätsverteilung* (engl.: *Axial Intensity Distribution (AID)*) des Objekts wird dann mittels eines CCD-Chips (Pixelinformation) digitalisiert und liefert die Grundlage für alle weiteren Analysen.

Abbildung 4.3 zeigt einen 3-dimensionalen Rohdatensatz des SMI-Mikroskops von aufgenommenen Kalibrationsobjekten mit 100nm Durchmesser. Die Schrittweite bei der axialen Abtastung betrug 40nm bei insgesamt 100 unterschiedlichen z-Positionen. In 4.3(a) ist der komplette Datenstapel dargestellt, während der vergrößerte Ausschnitt in 4.3(b) die einzelnen axialen Ebenen mit den Intensitätsmaxima und -minima, entsprechend der Beleuchtungsstruktur des Wellenfelds, sehr schön wiedergibt.

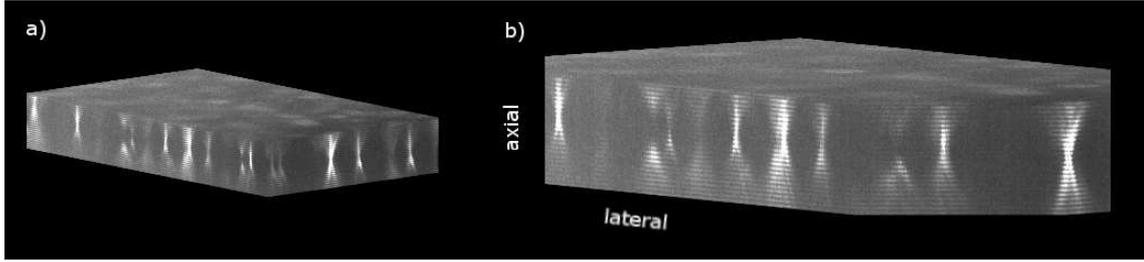


Abbildung 4.3: 3-dimensionaler Rohdatensatz des SMI-Mikroskops von 100nm Kalibrationsobjekten, aufgenommen mit einer Abtastrate von 40nm bei insgesamt 100 unterschiedlichen z-Positionen. Der komplette Datenstapel ist in (a) gezeigt, während im vergrößerten Ausschnitt (b) die einzelnen axialen Ebenen mit den Intensitätsmaxima und -minima, entsprechend der Beleuchtungsstruktur des Wellenfelds, zu erkennen sind.

4.3 Datenanalyse

Durch die im Vorangegangenen erläuterte modifizierte Punktbildfunktion können wie schon erwähnt sehr spezifische Aussagen über Objektgrößen unterhalb der herkömmlichen Auflösungsgrenze getroffen werden. Hierzu wird nachfolgend aufgeführt, wie sich aus der Modulation des Detektionssignals sehr detaillierte Informationen hinsichtlich der Objektstruktur ableiten lassen.

4.3.1 Axiale Intensitätsverteilung und Objektstruktur

Die in Abschnitt 4.1 hergeleitete (axiale) Punktbildfunktion (4.4) gilt in dieser Darstellung für ein Objekt mit infinitesimaler Ausdehnung. Übertragen auf ein fluoreszierendes Objekt mit endlichen axialen Dimensionen S von $\mathbb{I}_{S[SMI]} = \{30\text{nm} < S < 200\text{nm}\}$ ergibt sich eine Abhängigkeit der Objektgröße von der *Modulationstiefe* im axialen Intensitätsprofil. Dabei bezeichnet $\mathbb{I}_{S[SMI]}$ im Folgenden das Größenintervall, für welches das SMI-Mikroskop sensitiv ist, d.h. Dimensionsabschätzungen möglich sind. Die Einschränkung dieses Intervalls bezüglich des oberen Limits ist eine Folge der Lücken in der SMI-OTF. Durch die in diesen Bereichen fehlenden Raumfrequenzanteile können Mehrdeutigkeiten bei der Interpretation auftreten und es kann nicht mehr objektiv beurteilt werden, ob z.B. lediglich Substrukturen eines größeren Komplexes abgebildet wurden. Der untere Grenzwert resultiert aus dem statistischen Rauschen des Hintergrundsignals, welches für den Fall sehr kleiner Objekte eine ähnliche Photonenstatistik relativ zur Modulationstiefe aufweist und dadurch eine vertrauenswürdige Größenabschätzung nicht mehr zulässt.

Betrachtet man nun ein fluoreszierendes Objekt mit einer spezifischen Farbstoffverteilung $f(z)$ in axialer Richtung, so ergibt sich für die gemessene Intensitätsverteilung:

$$I_{det[SMI]}(z) = h_{axial[SMI]}(z) \otimes f(z) \quad (4.7)$$

Für den Fall, dass ein Objekt mit Dimensionen innerhalb von $\mathbb{I}_{S[SMI]}$ abgetastet wird, resultiert hieraus eine axiale Intensitätsverteilung (AID), wie in Abbildung 4.4 für das simulierte Profil eines 100nm Objekts dargestellt. Für die Berechnung wurde eine Anregungswellenlänge von $\lambda_{ill}=488\text{nm}$ unter Verwendung von Ölobjektiven angenommen. Unter der Annahme einer bekannten Fluorophorverteilung ist die Information über die Objektgröße

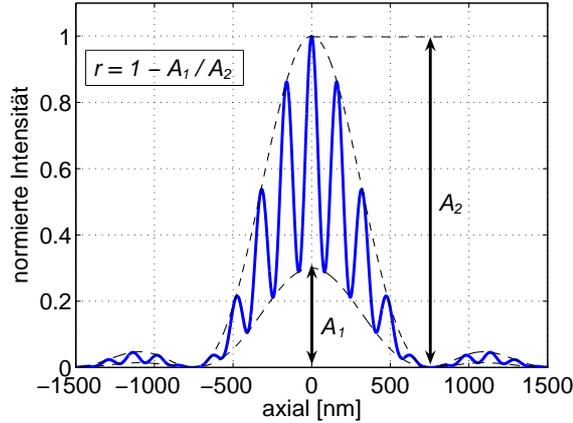


Abbildung 4.4: Simulierte AID eines Objekts mit einer axialen Ausdehnung von 100nm. Die Modulationstiefe r ist proportional zum Verhältnis der Amplituden A_1 und A_2 der inneren und äußeren Einhüllenden des Intensitätsprofils und beträgt für das hier berechnete 100nm Objekt $r=0,70$.

dann direkt mit der nachfolgend definierten Modulationstiefe

$$r := \frac{I_{max} - I_{min}}{I_{max}} = 1 - \frac{A_1}{A_2} \quad (4.8)$$

korreliert, wobei A_1 und A_2 die Amplituden der inneren und äußeren Einhüllenden der AID bezeichnen. Für das hier berechnete 100nm Objekt ergibt sich dann ein Wert von $r=0,70$, der sich bei kleineren (größeren) Objekten aufgrund der veränderten Modulationstiefe entsprechend vergrößert (verringert).

Durch die fehlenden Raumfrequenzanteile in der OTF müssen allerdings noch a priori Annahmen über die Form des Objekts, d.h. die Farbstoffverteilung $f(z)$ in die Kalkulation mit einbezogen werden. Durch eine explizite Berechnung von (4.7) mittels Computersimulationen unter Berücksichtigung verschiedenster Fluoreszenzverteilungen können sogenannte R - S -Kurven definiert werden, die eine direkte Interpretation des gemessenen Intensitätsprofils erlauben: für eine gegebene Form $f(z)$ und Anregungswellenlänge λ_{ill} wird das Verhältnis der Amplituden $R = A_1/A_2$ direkt mit der Objektgröße S in Relation gesetzt (siehe Abbildung 4.5). Daraus wird gleichzeitig ersichtlich, dass ein erheblicher Nachteil dieses Verfahrens in der Zuordnung der Objektgrößen besteht, falls nicht genügend Informationen über die Farbstoffverteilung vorhanden sind.

Objektlokalisierung

Aus der Modulation im axialen Intensitätsprofil können neben der zuvor erläuterten hochpräzisen Größenbestimmung auch sehr genaue Informationen über Objektpositionen und damit auch relativer Distanzen zweier optisch isolierter Objekte¹ extrahiert werden. Dies impliziert eine sehr gute Lokalisationsgenauigkeit in axialer Richtung, die hier gegeben ist durch die einzelnen Wellenfronten: im Gegensatz zum konventionellen axialen Intensitätsprofil, bei dem für solche Berechnungen lediglich die volle Halbwertsbreite des sinc^2 -Profils

¹Unter zusätzlicher Verwendung unterschiedlicher Fluoreszenzfarbstoffe kann diese Einschränkung allerdings aufgehoben werden (Spektrale Präzisionsdistanzmikroskopie (SPDM) [5, 18, 23, 24]).

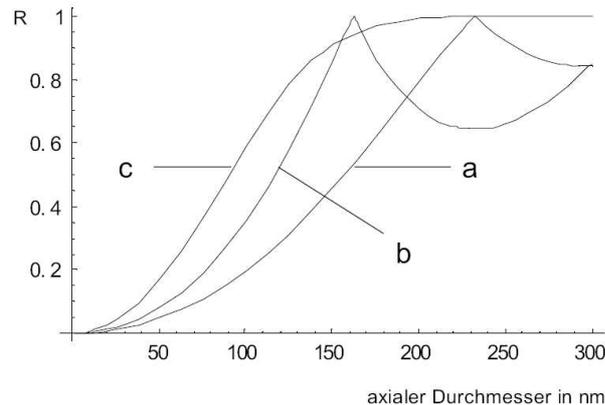


Abbildung 4.5: Das Verhältnis der Amplituden $R = A_1/A_2$ ist direkt mit der Objektgröße S korreliert: die einzelnen Kurven entsprechen Fluoreszenzverteilungen von einer a) homogenen Vollkugel, b) Kugelschale und c) gaußförmigen Verteilung für den Fall einer Anregungswellenlänge von $\lambda_{ill}=488\text{nm}$ (Bildquelle [76]).

zur Verfügung steht, kann dieser Bereich durch die Interferenzstruktur erheblich detaillierter aufgelöst werden. Dabei ist allerdings zu beachten, dass z.B. die Objektposition nicht notwendigerweise mit einem Intensitätsmaximum des Wellenfeldes übereinstimmen muss.

4.3.2 Heuristischer Ansatz zur Größenbestimmung

Die zuvor erläuterten Prinzipien zur Größenbestimmung beruhen auf idealisierten Darstellungen bezüglich der Form der AID, des Intensitätsprofils des stehenden Wellenfelds und der Einbettung des Objekts in seine lokale Umgebung. Diese Annahmen gelten in ihrem grundlegenden Ansatz zwar weiterhin, können in realiter jedoch nicht ohne Weiteres auf einen gemessenen Datensatz übertragen werden. So wird z.B. selbst bei noch so guter Justage der interferometrischen Einheit niemals eine reine \cos^2 -Form des Intensitätsprofils zu realisieren sein. Dies liegt daran, dass die beiden eingekoppelten Laserstrahlen zur Objektbeleuchtung nicht exakt die gleiche Intensität aufweisen. Desweiteren werden diese nicht komplett gegenläufig interferieren, sondern unter einem bestimmten Winkel aufeinandertreffen. Weitere Effekte wie Abberationen, lokale Brechungsindexunterschiede, hervorgerufen durch Glas-Medium-Übergänge und insbesondere durch Variationen in der lokalen Objektumgebung usw. verstärken diese Problematik.

Um dennoch eine vertrauenswürdige Rekonstruktion der Objektstruktur zu erhalten, müssen also weitere Parameter in die Berechnung mit einfließen. Bei nicht identischen Intensitäten der einlaufenden Laserstrahlen wird an den jeweiligen Knotenpunkten keine vollständige Auslöschung des elektromagnetischen Feldes erreicht, woraus ein konstanter, nicht modulierender Anteil im Wellenfeld bestehen bleibt. Bei der Berechnung wird dies berücksichtigt, indem zum theoretischen \cos^2 -Profil noch ein Zusatzterm $umod$ angefügt wird, der Informationen über die Qualität des Wellenfelds bzw. des nicht modulierenden Anteils trägt und diese Information als Korrektur in die Größenbestimmung mit einfließen lässt. Weiterhin muss natürlich die Anregungswellenlänge λ_{ill} und der Brechungsindex bekannt sein und als Parameter zur Verfügung stehen. Dies gilt insbesondere dann, wenn

mit unterschiedlichen Anregungswellenlängen und Objektiven² gearbeitet wird, die unterschiedliche Brechungscharakteristika aufweisen. Die Bestimmung dieser Korrekturterme läuft in der Praxis so, dass vor der eigentlichen (biologischen) Messung eine Reihe von Kalibrationsmessungen mit Objekten bekannter Fluoreszenzverteilung und Größe, sogenannten Nanokugeln (engl.: *Beads*) durchgeführt werden, die kommerziell erhältlich sind. Aus diesen können dann die zuvor erläuterten Parameter sehr genau bestimmt und als Korrekturterme für die biologischen Auswertungen zugrunde gelegt werden.

Vollautomatisierte Auswertung

Ein sehr umfangreicher Algorithmus zur automatischen Objektidentifikation und Größenbestimmung wurde für eine vollautomatisierte Auswertung in eine *MATLAB*³-Umgebung integriert [7, 8]. Aus den in den Arbeitsspeicher des Rechners eingelesenen Rohdaten werden die axialen Intensitätsverteilungen zunächst extrahiert und nachfolgend weiterverarbeitet, indem für jede axiale Position eine laterale Mittelung über einen Bereich von üblicherweise 3×3 Pixel (entsprechend etwa $300 \times 300 \text{ nm}^2$) erfolgt. Daraus resultiert ein konstanter Hintergrund, der vom Ursprungssignal abgezogen wird und so das Signal zu Rausch Verhältnis (engl.: *Signal to Noise Ratio (SNR)*) entscheidend verbessert. Aus dieser Grundlage kann dann eine Fitfunktion an die AID angepasst werden, die selbst bei stark verrauschten Signalen ein vernünftiges Konvergenzverhalten zeigt und folgende Darstellung besitzt:

$$I(z) = A [(1 - r) + r \cdot \cos^2(k(z - z_0))] \cdot I_{smooth}(z) + b \quad (4.9)$$

Dabei beschreibt A die Amplitude, k die Wellenzahl, z die Position des Objektträgers und z_0 die Verschiebung des Wellenfelds relativ zum Ursprung, da der Beginn des Datenstapels in der Regel nicht der Fokusposition des Objekts entspricht. Die Modulationstiefe fließt über die Relation $(1 - r) = A_1/A_2$ ein und mit I_{smooth} wird der Verlauf der geglätteten AID gekennzeichnet.

In Abbildung 4.6 ist die aufgenommene Intensitätsverteilung eines 100nm Beads mit der angepassten Fitfunktion (blau) und geglätteten AID I_{smooth} (rot) zusammen mit dem Interpolationsprofil der diskreten Messwerte (durch schwarze Punkte gekennzeichnet) dargestellt. Auf der Abszisse sind die jeweiligen z -Positionen aufgetragen, welche der hier verwendeten Schrittweite von 40nm entsprechen. Die aus der Fitfunktion ermittelte Modulationstiefe von $r=0,69$ stimmt dabei sehr genau mit dem simulierten Wert von $r_{(sim)}=0,70$ aus vorherigem Abschnitt überein. Demgegenüber fällt hier, im Vergleich zur simulierten Verteilung in Abbildung 4.4, eine ausgeprägte Asymmetrie des Profils bezüglich der Einhüllenden auf (erkennbar am Verlauf der geglätteten AID). Diese resultiert aus einem nicht exakt angepassten Brechungsindex in der lokalen Umgebung der Probe.

Aus dem so ermittelten Datensatz können dann verschiedenste Diagramme zur Visualisierung der detektierten Objekte, der Anzahl der nicht gefitteten Objekte, der hieraus resultierenden Größenverteilung usw. mit den zugehörigen Mittelwerten und Standardabweichungen erstellt werden. Weiterhin können aufgrund des modularen Aufbaus der Programmroutinen zusätzliche Skripte für spezifische Analysen relativ leicht mit eingebunden oder aber die schon vorhandenen Elemente entsprechend modifiziert werden.

²In dieser Arbeit wurden sowohl Öl- als auch Wasserimmersionsobjektive verwendet, die grundlegende Unterschiede hinsichtlich ihrer optischen Spezifikationen aufweisen.

³The MathWorks, Inc., <http://www.mathworks.com>

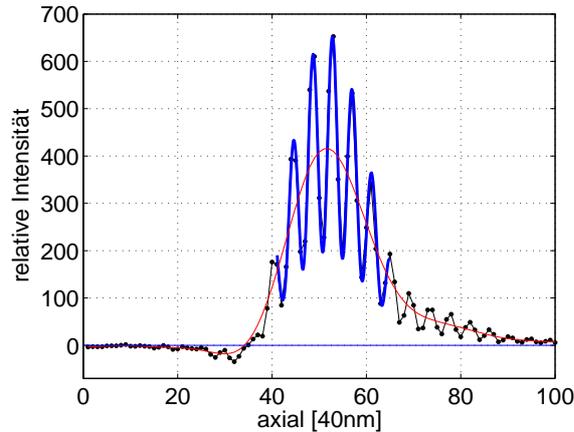


Abbildung 4.6: Axiale Intensitätsverteilung eines 100nm Beads, gegeben durch das Interpolationsprofil der diskreten Messwerte (durch schwarze Punkte gekennzeichnet) bei einer Anregungswellenlänge von $\lambda_{ill}=488\text{nm}$ und einer Schrittweite von 40nm. Die vom Algorithmus automatisch angepasste Fitfunktion ist in blau dargestellt und liefert eine Modulationstiefe von $r=0,69$. Im Vergleich zur simulierten AID ist hier eine ausgeprägte Asymmetrie bezüglich der Einhüllenden zu erkennen.

4.4 Experimenteller Aufbau

Die experimentelle Realisierung des SMI-Mikroskops wird hier lediglich prinzipiell veranschaulicht, da eine ausführliche Beschreibung der SMI-Konfiguration in Kapitel 7 erfolgt. Das hier vorgestellte SMI-Mikroskop folgt einer horizontalen Anordnung direkt auf dem optischen Tisch, woraus eine vertikale Positionierung des Objektträgers folgt. Dieser Aufbau wurde über einen Zeitraum von mehreren Jahren entwickelt und wird im Folgenden als *horizontales SMI-Mikroskop* bezeichnet, während das in dieser Arbeit komplett neu entwickelte und in einer vertikalen Ausrichtung realisierte SMI-Mikroskop der Nomenklatur *Vertico-SMI-Mikroskop* (*Vertico-SMI*) folgt.

Abbildung 4.7 zeigt den Aufbau des horizontalen SMI-Mikroskops in der Draufsicht und zusätzlich den Strahlengang des eingekoppelten Lasers (grün). Der kollimierte Laserstrahl wird über einen 50:50 Strahlteiler in zwei Laserstrahlen gleicher Intensität aufgespalten, wodurch das Interferometer definiert wird. Das stehende Wellenfeld bildet sich dann im Objektraum zwischen den beiden hochnumerischen Ölimerssionsobjektiven (PL APO, $100\times$, $\text{NA}=0.70\text{-}1.40$, Leica Microsystems GmbH) aus. Der Detektionsstrahlengang führt über das rechte Detektionsobjektiv zur nicht mehr dargestellten hochsensitiven CCD-Kamera (gleiches Modell wie am Vertico-SMI), während oberhalb der Objektive die Schrittmotoren und der piezoelektrische Aktuator zur Objektpositionierung bzw. nanometergenaue Objektabtastung zu erkennen sind. Diese werden mittels einer eigens entwickelten, in der objektorientierten Programmiersprache *Python*⁴ verfassten, Software angesteuert, die gleichzeitig eine automatische Datenakquisition und -speicherung über die in den Algorithmus implementierte Ansteuerung der CCD-Kamera ermöglicht (Einzelheiten bezüglich der Architektur des Algorithmus siehe auch in Anhang B und [7]). Die zur Verfügung stehenden Anregungswellenlängen werden durch einen Ar^+ -Laser bei $\lambda_{ill}=488\text{nm}$ und zweier

⁴<http://www.python.org>

Kr⁺-Laser bei $\lambda_{ill}=568\text{nm}$ bzw. $\lambda_{ill}=647\text{nm}$ bereitgestellt, wodurch der größte Teil des zur Verfügung stehenden Spektrums biologischer Fluoreszenzfarbstoffe abgedeckt werden kann. Für eine genauere Beschreibung der Einzelheiten des aktuellen horizontalen SMI-Mikroskop Aufbaus möchte ich auf [73, 7] verweisen.

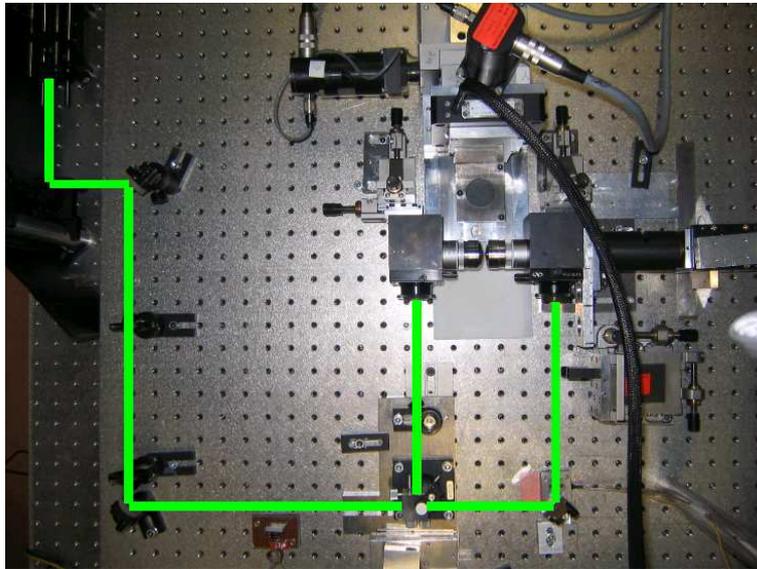


Abbildung 4.7: Foto des horizontalen SMI-Mikroskops (Draufsicht): der Strahlengang ist in grün dargestellt und zeigt schematisch die Einkopplung des Lasers und die interferometrische Einheit nach der Aufspaltung durch einen 50:50 Strahlteiler.

Kapitel 5

Dynamische Systeme

Strukturuntersuchungen an der lebenden Zelle stehen in unmittelbarem Zusammenhang mit der Eigendynamik von (Makro-) Molekülen, die sich auf vielfältigste Weise äußern kann und sich insbesondere auf unterschiedlichen Zeitskalen niederschlägt. Bislang durchgeführte Lebendzelluntersuchungen beziehen sich in der Regel auf Beobachtungen über einen Zeitraum von einigen Mikrosekunden bis zu einigen Minuten/Stunden¹ zur Ermittlung des Kurzzeitverhaltens und daraus resultierender Parameter wie der Diffusion. Hieraus können dann Informationen über etwaige, in biochemischen Wechselwirkungen/Prozessen begründete Korrelationen von zwei oder mehreren Konstituenten extrahiert werden. Primär besteht also ein Interesse an der („*makroskopischen*“) Dynamik selbst, die bis zu einem gewissen Grad, der abhängig ist von der zur Verfügung stehenden räumlichen und zeitlichen Auflösung, auch tatsächlich quantifizierbar ist. Subchromosomale Objekte folgen allgemein aber sehr komplexen Bewegungsmustern, die insbesondere auch extrem schnelle Fluktuationen um ihren Gleichgewichtspunkt („*mikroskopische*“ Dynamik) beinhalten, welche nicht aufgelöst werden können und lediglich als statistisches Rauschen in das Detektionssignal mit einfließen. Weiterhin werden zur Untersuchung im Allgemeinen nur Mikroskope verwendet, welche der in Kapitel 2 beschriebenen herkömmlichen Auflösungsbegrenzung unterliegen, wodurch der Zugang zu Strukturuntersuchungen von subchromosomal Komplexen a priori ausgeschlossen ist.

Viele Probleme in der molekularen Zellbiologie beziehen sich allerdings gerade auf solche Fragestellungen, bei denen sich gleichzeitig die Objektmobilität als in höchstem Maße störende Begleiterscheinung äußert. Mit der Konzeption und Anwendung eines in-vivo SMI-Mikroskops (Vertico-SMI) zur hochpräzisen Strukturanalyse soll nun die Ermittlung struktureller Eigenschaften in intakten mikroskopischen Systemen realisiert werden, wengleich sich hier einige Schwierigkeiten ergeben, die in diesem Kapitel noch näher erläutert werden. Es sollte aber prinzipiell möglich sein, zum Einen sehr präzise Unterschiede in Bewegungsmustern zu erkennen, und zum Anderen zumindest qualitative „Größenangaben“ über Abschätzungen hinsichtlich der Modulationstiefe von hinreichend kleinen Objekten bereit zu stellen.

Zur Veranschaulichung der Mechanismen, die sich für die Bewegung von nuklearen Konstituenten verantwortlich zeigen, soll dieses Kapitel die stochastischen Grundlagen bereitstellen, die zum Verständnis der makromolekularen Mobilität erforderlich sind und auch

¹Längere Beobachtungszeiten, die über einen Zeitraum von einigen Tagen andauern können, sind auf andere Fragestellungen wie Zellreplikation usw. bezogen.

qualitative Abschätzungen bezüglich der Größenordnungen der zugrunde liegenden Kinetik geben. Gleichzeitig möchte ich aber darauf hinweisen, dass dieses Kapitel einen eher intuitiven Zugang zu dieser Thematik, als eine quantitative Behandlung kompletter Bewegungsvorgänge liefert, da diese bis zum jetzigen Zeitpunkt immer noch größtenteils unverstanden sind.

5.1 Grundlagen der molekularen Biophysik

Die molekulare Biophysik beschäftigt sich unter anderem mit der mathematischen Beschreibung molekularbiologischer Prozesse. Die Problematik bei der Quantifizierung solcher komplexer Strukturen zeigt sich dabei, wenn man sich zum Einen vor Augen führt, dass sich (mit Ausnahme von Einzelmolekül-Prozessen) in der Regel eine sehr große Anzahl von, teils gebundenen, teils frei beweglichen Konstituenten (Proteinen, usw.) für den Gesamtprozess verantwortlich zeigen. Es ist klar, dass hierfür auf statistische Modelle zurückgegriffen werden muss, die in der Lage sind, das System als Ensemble zu beschreiben. Zum Anderen besteht eine große Herausforderung in der Erfassung der Mobilität der Konstituenten, die ich in zwei Kategorien unterteilen und als *regulatorische Prozesse* und *Zufallsprozesse* klassifizieren möchte:

- **Regulatorische Prozesse** unterliegen infolge temporär ausgebildeter Kräfte ohne das unmittelbare² Zutun äußerer Einflüsse einer Eigendynamik. Ein Beispiel hierfür ist die Aktivierung einer Gensequenz mit dem Ziel, den Vorgang der Transkription zu initiieren, wodurch verschiedenste biochemische Prozesse in Gang gesetzt werden. Diese Bewegung ist insofern nicht zufällig, als dass sie durch die Reaktionskinetik, d.h. biochemische Potentiale angetrieben ist und im Wesentlichen nur lokal begrenzt wirkt.
- Reine **Zufallsprozesse** können zum Einen durch die Brownsche Molekularbewegung und Diffusion beschrieben werden, die auf das Gesamtsystem und dort überall gleich verteilt wirken. Lokale Unterschiede ergeben sich lediglich durch Dichteveränderungen, d.h. der Ausbildung von Gradienten oder dem Auftreten eines regulatorischen Prozesses. Zum Anderen resultieren Fluktuationen um mögliche Gleichgewichtszustände auch aus intra- bzw. intermolekularen Kräften.

Sehr oft variieren diese Zusammenhänge auch im Laufe der Zeit, d.h. es werden attraktive/repulsive Potentiale gebildet oder die Anzahl an Reaktionspartnern bei biologischen Vorgängen ändert sich, wodurch die Komplexität und damit die Möglichkeiten der Modellierung erheblich erschwert werden.

5.2 Markov-Prozesse

In diesem ersten Teil der Beschreibung dynamischer Systeme werden grundsätzliche Konzepte der Stochastik aufgeführt, die prinzipiell für jedes beliebige System gelten. Intrinsische Wechselwirkungen eines am zufälligen Bewegungsprozess beteiligten Teilchens werden hier nicht berücksichtigt (hierzu siehe Abschnitt 5.4).

²Diese spielen sicher dennoch eine Rolle, sind aber nicht aktiv an der Reaktionskinetik beteiligt.

5.2.1 Grundlegende Formalismen stochastischer Prozesse

Ein stochastischer Prozess ist durch eine Zufallsvariable $Z(t)$ definiert, wodurch sich im Falle von diskreten Ereignissen mit $\{Z(t_i), i = 1, \dots\}$ eine Sequenz von Zufallsvariablen ergibt. Im Allgemeinen sind diese Zufallsvariablen oder Zufallsdichten zeitlich miteinander korreliert, d.h. sämtliche Wahrscheinlichkeitsdichten charakterisieren die zuvor definierte Zufallssequenz. Seien im Folgenden z_1, z_2, \dots mögliche Zustände, dann wird ein allgemeiner stochastischer Prozess im kontinuierlichen Fall beschrieben durch [45]:

- die Wahrscheinlichkeitsdichte $\rho_1(z, t)$, dass der Zustand z zum Zeitpunkt t vorhanden ist
- die bedingte³ Wahrscheinlichkeit $\rho_2(z_2, t_2 | z_1, t_1)$, dass zum Zeitpunkt t_2 der Zustand z_2 gefunden werden kann, falls zur Zeit t_1 der Zustand z_1 vorhanden ist
- die bedingten Wahrscheinlichkeiten $\rho_n(z_n, t_n | z_{n-1}, t_{n-1}, z_{n-2}, t_{n-2}, \dots, z_1, t_1)$, dass zu dem Zeitpunkt t_n der Zustand z_n gefunden werden kann, falls zu den Zeiten t_{n-1}, \dots, t_1 die entsprechenden Zustände z_{n-1}, \dots, z_1 vorhanden sind

Eine besondere Klasse von klassischen stochastischen Systemen stellen nun die sogenannten *Markov-Prozesse* dar. Ein Markov-Prozess definiert dabei einen Zustand zum Zeitpunkt $t + \tau$, der nur vom Zustand zum Zeitpunkt t abhängt, also nicht von vorherigen Ereignissen $t_{\mathbb{N}-}$. Dabei ist die Größe τ eine infinitesimale Zeitspanne, wodurch das Kurzzeitverhalten einer Wahrscheinlichkeit definiert werden kann. Übertragen auf obige Formulierung eines stochastischen Prozesses muss also die Forderung

$$\rho_n(z_n, t_n | z_{n-1}, t_{n-1}, \dots, z_1, t_1) = \rho_2(z_n, t_n | z_{n-1}, t_{n-1}) \quad (5.1)$$

für alle bedingten Wahrscheinlichkeiten erfüllt sein.

Liegt eine Zeitunabhängigkeit $\rho(z, t) = \rho(z)$ vor und ist $\rho(z)$ zusätzlich die Dichte einer Normalverteilung, so wird der stochastische Prozess auch als *weißes Rauschen* bezeichnet. Für jeden Ereigniszeitpunkt t ist dann $Z(t)$ eine normal verteilte Zufallsvariable und jede Observable eines beliebigen Zeitpunktes ist unabhängig von den Restlichen und somit unkorreliert.

Um nun eine allgemeine Übergangswahrscheinlichkeit eines stochastischen Prozesses von einem Zustand $z' \rightarrow z$ anzugeben, kann man folgenden Ansatz verwenden:

$$\frac{\partial}{\partial t} \rho(z, t) = \int dz' w(z, z', t) \rho(z', t) - \int dz' w(z', z, t) \rho(z, t) \quad (5.2)$$

Die (unkorrelierten) Frequenzen, mit denen die einzelnen Zustände angenommen werden, sind dabei als w bezeichnet, wobei im diskreten Fall mit der Bezeichnung n für einen beliebigen Zustand bzw. $\rho_n(t)$ und $w_{nn'}(t)$ anstatt $\rho_1(z, t)$ und $w(z, z', t)$ folgt:

$$\dot{\rho}_n(t) = \sum_{n'} (w_{nn'}(t) \rho_{n'}(t) - w_{n'n}(t) \rho_n(t)) \quad (5.3)$$

Hier wird der Wechsel der Wahrscheinlichkeit bezüglich des Ausbildens eines Zustands n zur Zeit t repräsentiert durch einen Term, der den Gewinn (Übergang von $n' \rightarrow n$) und

³Eine bedingte oder konditionale Wahrscheinlichkeit ist die Wahrscheinlichkeit des Eintretens eines Ereignisses A unter der Bedingung, dass ein Ereignis B bereits vorher eingetreten ist.

einen Term, der den Verlust (Übergang von $n \rightarrow n'$) charakterisiert. Die physikalische Dimension dieser Übergangsfrequenz ist dabei wie gewöhnlich s^{-1} .

Betrachtet man nun Übergangswahrscheinlichkeiten eines deterministischen Prozesses, d.h. ist $\dot{\mathbf{z}} = \mathbf{f}(\mathbf{z})$, so kann folgende *Master-Gleichung* abgeleitet werden:

$$\begin{aligned} \frac{\partial \rho_1(\mathbf{z}, t)}{\partial t} &= \int d^n z' \left[-\mathbf{f}(\mathbf{z}') \cdot \frac{\partial}{\partial \mathbf{z}} \delta(\mathbf{z} - \mathbf{z}') \right] \rho_1(\mathbf{z}, t) \\ &= -\frac{\partial}{\partial \mathbf{z}} \cdot (\mathbf{f}(\mathbf{z}) \rho_1(\mathbf{z}, t)) \end{aligned} \quad (5.4)$$

Unter zusätzlicher Berücksichtigung infinitesimaler zeitlicher Übergänge τ von einem Zustand zum anderen, d.h. der bedingten Wahrscheinlichkeit $\rho(z, t + \tau | z', t)$, kann die Master-Gleichung mittels Mittelwerten $A_i(\mathbf{z}, t)$ und Varianzen $D_{ij}(\mathbf{z}, t)$ ausgedrückt werden. Daraus folgt schließlich die *Fokker-Planck-Gleichung*, welche die Grundlage für alle weiteren Betrachtungen bildet:

$$\frac{\partial}{\partial t} \rho(\mathbf{z}, t) = \left[-\sum_{i=1}^n \frac{\partial}{\partial z_i} A_i(\mathbf{z}, t) + \frac{1}{2} \sum_{i,j=1}^n \frac{\partial^2}{\partial z_i \partial z_j} D_{ij}(\mathbf{z}, t) \right] \rho(\mathbf{z}, t) \quad (5.5)$$

Dieser Ausdruck ist eine partielle Differentialgleichung für die zeitabhängige Dichtefunktion eines Markov-Prozesses. In diesem speziellen Fall entspricht sie einer *Diffusionsgleichung*, die dadurch charakterisiert ist, dass keine Unstetigkeiten in Form von „Sprüngen“ zwischen den einzelnen Zuständen vorkommen, d.h. die zuvor eingeführten Mittelwerte $A_i(\mathbf{z}, t)$ und Varianzen $D_{ij}(\mathbf{z}, t)$ können nun als die physikalischen Größen für *Reibung* (Driftterm) und *Diffusion* mit den entsprechenden Dimensionen identifiziert werden.

5.2.2 Brownsche Molekularbewegung

Bei der *Brownschen Molekularbewegung* bezieht man sich in der Regel auf mikroskopische Teilchen in einer Flüssigkeit, welche zufälligen und sich schnell wiederholenden Stoßprozessen (Größenordnung 10^{14} pro Sekunde) mit den Flüssigkeitsmolekülen unterliegen, wodurch eine komplett zufällige Bewegung entsteht. Aufgrund der Unkorreliertheit der übertragenen Impulse bei dieser Bewegung ist es nicht möglich, die exakte Dynamik der in diesem Prozess beteiligten Teilchen im Detail vorherzusagen. Allerdings können die grundlegenden Parameter der Brownschen Bewegung sowohl stochastisch beschrieben als auch experimentell bestimmt werden, wobei quantitativ Formalismen der zuvor erläuterten Markov-Prozesse herangezogen werden können. Daraus ergeben sich dann Ansätze zur Beschreibung der Diffusion und Brownschen Bewegung in den Darstellungen über die *Langevin-Gleichung* und *Autokorrelationsfunktion*.

Für die Trajektorien eines Diffusionsprozesses ergibt sich eine Unabhängigkeit der Diffusionsmatrix von \mathbf{z} , so dass $D_{ij}(\mathbf{z}, t) = D_{ij}(t)$. Sei außerdem $n(\mathbf{z}, t) = \rho(\mathbf{z}, t)$ die Anzahl oder Konzentration von Molekülen, dann kann die resultierende Diffusionsgleichung ohne Berücksichtigung des Driftterms, d.h. mit $A_i(\mathbf{z}, t) \equiv 0$, geschrieben werden als [47, 21]:

$$\frac{\partial}{\partial t} n(\mathbf{z}, t) = \sum_{i,j=1}^n D_{ij}^{trans}(t) \frac{\partial^2}{\partial z_i \partial z_j} n(\mathbf{z}, t) \quad (5.6)$$

Der translatorische Anteil der Diffusion D_{ij}^{trans} ist dabei definiert durch

$$D_{ij}^{trans} = \frac{\langle \Delta z^2 \rangle}{2\tau} \quad (5.7)$$

mit der Varianz $\langle \Delta z^2 \rangle$, welche die Verteilung von Verrückungen angibt. In gleicher Weise kann mit

$$D_{\theta\phi}^{rot} = \frac{\langle \Delta \alpha^2 \rangle}{2\tau} \quad (5.8)$$

für die Rotation ein analoger Diffusionsparameter angegeben werden, wobei $\Delta\alpha(t)$ die mittlere quadratische Rotation eines Moleküls bezüglich der molekularen Achse beschreibt. Eine explizite Berücksichtigung der Umgebung, in welchem sich die betrachteten Teilchen bewegen, führt mit Hilfe des Driftterms schließlich zur Langevin-Gleichung

$$m \frac{d^2 z}{dt^2} = -f\eta_0 \frac{dz}{dt} + F(t) \quad (5.9)$$

zur Beschreibung der Dynamik eines Teilchens mit Masse m . Der erste Term auf der rechten Seite bestimmt die Reibungskräfte innerhalb eines Mediums mit Viskosität η_0 und einem spezifischem Reibungskoeffizienten f . Der Term $F(t)$ beschreibt weißes Rauschen und kann hier gleichgesetzt werden mit einer zeitabhängigen mittleren Zufallskraft, die unabhängig ist von der Geschwindigkeit $v = dx/dt$, wobei die Variationen von $F(t)$ sehr viel schneller sind als die von v . Betrachtet über einen längeren Zeitraum in Relation zu zwei Teilchenkollisionen und unter der Voraussetzung, dass ein thermodynamisches Gleichgewicht vorhanden ist, wird $\langle F(t) \rangle \equiv 0$. Für eine konstante Temperatur T ist diese Bedingung mit Sicherheit erfüllt und es folgt aus (5.9) für die mittlere quadratische Distanz, die ein Teilchen während der Zeit t zurücklegt:

$$\langle z^2 \rangle = 2t \frac{k_B T}{f\eta_0} \quad (5.10)$$

Die beiden Ausdrücke für die Translations- (5.7) und Rotations- (5.8) Diffusion eines Teilchens werden dann zu

$$D_{ij}^{trans} = \frac{k_B T}{f\eta_0} \quad (5.11)$$

$$D_{\theta\phi}^{rot} = \frac{k_B T}{6\eta_0 V} \quad (5.12)$$

mit der Boltzmann-Konstanten k_B . Die hier formulierten Größen können nun direkt experimentell bestimmt werden, wobei aus Gründen der Vollständigkeit in folgendem Abschnitt noch kurz auf eine zweite Möglichkeit zur direkten Beobachtung der Brownschen Molekularbewegung eingegangen wird. Desweiteren soll noch darauf hingewiesen werden, dass diese Art der Bewegung den geringeren Anteil an der Gesamtdiffusion ausmacht. Tatsächlich sind die wesentlichen Beiträge bei der Mobilität von Makromolekülen elektrischen oder chemischen Ursprungs (siehe Abschnitt 5.4).

Autokorrelationsfunktion

Wie im vorangegangenen Abschnitt erwähnt kann eine Zufallsgröße $Z(t)$ allgemein zwei verschiedene Werte $Z(t)$ und $Z(t + \tau)$ bei zwei unterschiedlichen Zeitpunkten t und $t + \tau$

annehmen. Es ergibt sich also eine Korrelation zwischen aufeinanderfolgenden Ereignissen, die abhängig ist vom Zeitintervall τ . Diese Abhängigkeit kann mit Hilfe der Autokorrelationsfunktion $G(\tau)$ angegeben werden, welche das zeitliche Mittel des Produkts zweier Zufallsvariablen zu zwei verschiedenen Zeitpunkten angibt:

$$G(\tau) = \langle Z(t)Z(t + \tau) \rangle = \lim_{T \rightarrow \infty} \frac{1}{T} \int_0^T Z(t)Z(t + \tau) dt \quad (5.13)$$

Die Zeitabhängigkeit ist in den meisten Fällen exponentiell und von der Form $e^{-\tau/\tau_c}$, wobei τ_c als charakteristische Korrelationszeit bezeichnet wird. Dieser Ansatz wird vornehmlich dann zur Analyse von Brownscher Bewegung verwendet, wenn korrelationspektroskopische Messungen durchgeführt werden, da die Observablen in diesem Fall direkt mit der Autokorrelationsfunktion verknüpft sind.

5.3 Biopolymere

Die bisherige Beschreibung der Dynamik eines Teilchens bezog sich ausschließlich auf die Betrachtung der Bewegung innerhalb eines beliebigen Mediums mit Viskosität η , d.h. im Wesentlichen Teilchenkollisionen auf molekularer Ebene. Ein komplexeres Bild ergibt sich, wenn man die Dynamik von *Makromolekülen* innerhalb der Zelle / des Zellkerns zu verstehen versucht. Hier kommen, zusätzlich zur Brownschen Molekularbewegung, sowohl die intrinsischen Eigenschaften eines Moleküls als auch durch elektrische oder chemische Potentiale induzierte Wechselwirkungen mit Molekülen aus dem Medium zum Tragen.

Als makromolekularen Komplex bezeichnet man dabei den Verbund einer großen Anzahl von Molekülen, die aus vielen (bis zu mehreren Hunderttausend) Bausteinen, d.h. Atomen oder Atomgruppen aufgebaut sind. Viele Makromoleküle wie z.B. die DNA können dabei gleichzeitig als (*Bio-*) *Polymer* beschrieben werden [62], da sie über lange verzweigte Molekülketten verfügen.

5.3.1 Intramolekulare Wechselwirkungen

Die tragenden intramolekularen Kräfte innerhalb eines Makromoleküls können in verschiedene Untergruppen aufgeteilt werden und sind bis zum jetzigen Zeitpunkt auch einigermaßen vernünftig verstanden und mathematisch beschreibbar. Die Struktur des Komplexes ist dabei enorm abhängig von der gegenseitigen Wechselwirkung verschiedenster Kräfte, wodurch die Vereinfachung auf relativ unbiologische aber intuitive Modelle als probates Mittel erscheint.

Die gesamte potentielle Energie U_{ges} eines Proteins in einer beliebigen Konfiguration kann beschrieben werden als Summe der wirkenden Einzelkräfte, wobei nachfolgend aufgeführter Ausdruck (5.14) die Energie als Funktion der Koordinaten der Atome repräsentiert. Die erste Summe beschreibt die Spannungsenergie aller kovalenten Bindungen im Protein, wobei a_α die konstanten Bindungskräfte für die Bindung vom Typ α repräsentiert. Die x_i stehen für die jeweilige Position im Molekül und x_{i0} bezeichnet die Länge der Bindung, für welche die Bindungsenergie ein Minimum aufweist. Der zweite Term summiert über das komplette Molekül und damit über die Bindungsenergie aller Bindungen mit analogen Bezeichnungen zur ersten Summe. Der dritte Term berücksichtigt Rotationspotentiale der Öffnungswinkel mit wiederum analoger Nomenklatur zum Vorangegangenen. In Abbildung 5.1 sind hierzu

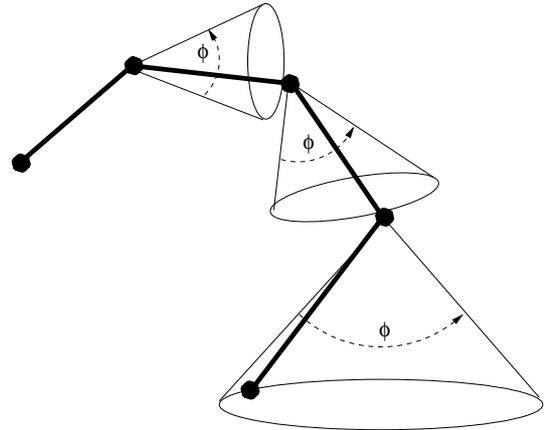


Abbildung 5.1: Mögliche Rotationskegel einer Polymerkette mit unterschiedlichen Öffnungswinkeln ϕ . Die jeweiligen Freiheitsgrade der einzelnen Kettenglieder sind dabei stark abhängig von elektrostatischen Wechselwirkungen mit direkt benachbarten Segmenten.

mögliche Rotationskegel einer Polymerkette mit unterschiedlichen Öffnungswinkeln ϕ illustriert. Die vierte Summe beschreibt die elektrostatischen Wechselwirkungen zwischen den Ladungen mit einer dielektrischen Konstante, die von der Position im Protein abhängt, während der letzte Term das *Lennard-Jones-Potential* für ungebundene Wechselwirkungen definiert.

$$\begin{aligned}
 U_{ges} &= \sum_{\text{Bindungen}} a_{\alpha}(x_i - x_{i0})^2 \\
 &+ \sum_{\text{Bindungswinkel}} b_{\beta}(\theta_i - \theta_{i0})^2 \\
 &+ \sum_{\text{Öffnungswinkel}} c_{\gamma}(1 - \cos(n_i(\phi_i - \phi_{i0})))^2 \\
 &+ \sum_{\text{Ladungen}} \frac{q_i q_j}{\epsilon(r) r_{ij}} \\
 &+ \sum_{\text{neutrale Atome}} 4d_{\delta} \left[\left(\frac{r_{ij0}}{r_{ij}} \right)^{12} - \left(\frac{r_{ij0}}{r_{ij}} \right)^6 \right] \quad (5.14)
 \end{aligned}$$

In Nukleinsäuren wie der DNA tragen hauptsächlich drei Kräfte zur Stabilität des Komplexes bei. Dies sind:

1. Wechselwirkungen zwischen den Basen
2. elektrostatische Wechselwirkungen zwischen geladenen Phosphaten des Polymerrückgrats
3. Wasserstoffbindungen in Watson-Crick Basenpaaren

Die Wechselwirkung zwischen den Basen ist dabei sehr stark ausgeprägt und bildet die Grundlage für das Ausbilden der doppelhelikalen Struktur der DNA. Zusätzlich zu den hier aufgezeigten intramolekularen Kräften existieren noch eine Reihe weiterer Abhängigkeiten wie *intermolekulare* Wechselwirkungen, thermodynamische Effekte und chemische Potentiale, die im Folgenden erläutert werden.

5.3.2 Intermolekulare Wechselwirkungen

Der wesentliche Ursprung intermolekularer Wechselwirkungen liegt in elektrischen und chemischen Potentialen begründet, die den größten Beitrag zur Mobilität von Biopolymeren liefern und die Komplexität der resultierenden Transportgleichung entscheidend erhöhen. Elektrische Kräfte resultieren aus Molekülen, die ein spezifisches elektrisches Potential Ψ tragen, wodurch die Umgebung eines Makromoleküls mittels einer Potentialverteilung, gegeben durch die Verteilung geladener Gruppen, repräsentiert werden kann. Die räumliche Variation des Potentials wird mittels eines vektoriellen Gradienten ($\text{grad}\Psi$) beschrieben, der Informationen über die lokalen Feldverteilungen enthält. Ein Molekül der Ladung q erfährt innerhalb eines solchen Gradientenfeldes die Kraft:

$$F_{el} = -q(\text{grad}\Psi) = q\mathbf{E} \quad (5.15)$$

Dadurch folgt gleichzeitig eine Erweiterung der Beschreibung elektrostatischer Wechselwirkung von Makromolekülen als *Polyelektrolyte*. Eine analoge Darstellung kann für chemische Kräfte angegeben werden, welche aus Variationen in Molekülkonzentrationen resultieren. Mit der Einführung des chemischen Potentials μ_i , definiert als partielle Ableitung der freien Energie G und mit i als spezifischer Molekülsorte gilt dann:

$$F_{chem} = -(\text{grad}\mu_i) \quad (5.16)$$

Wie im elektrischen Fall sind die Komponenten des Gradientenfeldes gerade die partiellen Ableitungen des zugehörigen Potentials.

Allgemeine Transportprozesse

Wie in Abschnitt 5.2 gezeigt, unterliegt der (molekulare) Transport von Materie einer externen Kraft \mathbf{F} und kann mit Hilfe der Langevin-Gleichung (5.9) in seiner allgemeinsten Form ausgedrückt werden durch:

$$m \frac{d^2\mathbf{z}}{dt^2} + f\eta_0 \frac{d\mathbf{z}}{dt} = \mathbf{F} + \mathbf{V}(t) \quad (5.17)$$

Der Term $\mathbf{V}(t)$ berücksichtigt zusätzlich noch mögliche Eigenschwingungen des Moleküls um einen Gleichgewichtszustand, auf den hier nicht näher eingegangen wird. Unter Berücksichtigung aller bisherigen Ergebnisse kann hieraus für den eindimensionalen Fall folgende Relation hergeleitet werden:

$$\frac{\partial}{\partial t} c(z, t) = \frac{\partial}{\partial z} \left[D_{ij}^{trans} \frac{\partial}{\partial z} c(z, t) - \frac{F}{f\eta_0} c(z, t) \right] \quad (5.18)$$

Dabei ist $c(z, t)$ eine beliebige Lösung der Differentialgleichung, welche das Verhalten des Gesamtsystems beschreibt. Der erste Term in der eckigen Klammer charakterisiert den Diffusionsfluss, d.h. gewöhnliche Brownsche Bewegung mit $\langle \mathbf{F} \rangle \equiv 0$. Der zweite Term steht für einen Konvektionsfluss: falls $\mathbf{F} \neq 0$, so wirkt auf das Molekül eine Beschleunigung, die solange anhält, bis die Reibungsgleich der beschleunigenden Kraft ist und die resultierende Kraft auf das Molekül Null ist. Ist dieses Kräftegleichgewicht erreicht, wirkt nur noch der Anteil der Brownschen Bewegung in Form des Diffusionsflusses auf das Molekül. In realiter wird ein solches System stets den Zustand minimalster potentieller Energie

anstreben, d.h. eine möglichst gleichmäßige Molekülverteilung, um den Einfluss externer Potentiale so gering wie möglich zu halten.

Für Biopolymere erweitert man diese Überlegungen mit Hilfe der zuvor definierten elektrischen und chemischen Potentiale, d.h. mit einem elektrochemischen Potential $\mu_{ec} = \mu_{el} + \mu_{chem}$, wodurch (5.18) in folgender Weise modifiziert wird:

$$\frac{\partial}{\partial t} c(z, t) = \frac{\partial}{\partial z} \left[\tilde{D}_{ij}^{trans}(c(z, t)) \frac{\partial}{\partial z} c(z, t) - uE \cdot c(z, t) \right] \quad (5.19)$$

Der wesentliche Unterschied dieses Ausdrucks zu (5.18) liegt im Diffusionsfluss \tilde{D}_{ij}^{trans} , welcher nun zusätzlich noch Informationen bezüglich des elektrochemischen Potentials und der Reibung trägt. Insbesondere ist die differentielle Abhängigkeit nun nicht mehr linear, sondern vielmehr logarithmisch gegeben durch

$$\tilde{D}_{ij}^{trans} = D_{ij}^{trans} \left(1 + \frac{\partial \ln \gamma}{\partial \ln c(z, t)} \right) \quad (5.20)$$

mit $\gamma \propto \eta_0 \mu_{ec}$. Der Diffusionsfluss ist in diesem Fall also eine Funktion der Konzentration $c(z, t)$. Desweiteren sind die bislang als unkorreliert betrachteten stochastischen Variablen soweit abgeändert, dass zufällige „Sprünge“ in den einen oder anderen Zustand aufgrund der elektrochemischen Potentiale nicht mehr den gleichen Wahrscheinlichkeiten unterliegen. Und obwohl (5.19) nicht mehr analytisch lösbar ist, erklärt dieser Ausdruck zumindest qualitativ sehr gut die an der Dynamik eines Biopolymers beteiligten Wechselwirkungen und deren Zusammenhänge.

5.4 Abschätzungen zur Mobilität

Die Größenordnungen der im vorangegangenen Abschnitt erläuterten Kinetik variieren im Allgemeinen sehr stark mit den betrachteten Konstituenten. So sind z.B. bestimmte Proteine in der Lage, den kompletten Nukleus innerhalb weniger Sekunden zu durchqueren, woraus grob abgeschätzt Bewegungen im Bereich von $\mu\text{m/s}$ folgen. Die Mobilität unterschiedlicher Genregionen unterliegt ebenfalls starken Schwankungen und wird z.B. wesentlich beeinflusst von lokalen Dichteveränderungen, d.h. im Nukleus eher peripher angeordnete Genabschnitte werden im Vergleich zu zentral lokalisierten Sequenzen sicherlich anderen Bewegungsmustern folgen. Zusätzlich ist vorstellbar, dass Chromatinstrukturen an mehr oder weniger stationären nuklearen Substrukturen angelagert sind.

In [17] konnten erstmals eindeutige Bewegungen solcher Regionen nachgewiesen werden, die einen Hinweis auf Chromatinmobilität liefern, deren Bewegungsmuster gleichzeitig darauf schliessen lässt, dass Chromatin in lokalen Unterstrukturen organisiert ist [20, 61]: die komplette Substruktur bewegt sich als Verbund aus einzelnen Genregionen, wobei die relativen Distanzen der Zielregionen in etwa konstant bleiben. Die mittleren Geschwindigkeiten konnten dann aus den relativen Verrückungen $\langle \Delta d \rangle$ abgeschätzt werden zu $\langle \Delta d \rangle / s \leq 500\text{nm/s}$, abhängig von der Position im Nukleus.

Ein weiteres Beispiel zur Mobilität eines subchromosomalen Fokus in einer lebenden Neuroblastenzelle ist in Abbildung 5.2 gegeben [14]. In der 2-dimensionalen (2D) Projektion ist eine vollkommen zufällige Bewegung zweier Foki zu erkennen, deren Trajektorien in der Abbildung in rot und relative Distanzen in cyan dargestellt sind. Die mittlere relative Verrückung $\langle \Delta d \rangle / s$ der beiden Zielsequenzen beträgt hier etwa 30nm/s . Weiterhin kann

hier aufgrund des Bewegungsmusters wiederum der Rückschluss auf etwaig vorhandene, größere chromosomale Einheiten gezogen werden, die mehrere Substrukturen beinhalten. Insgesamt sind die Transportprozesse einer beliebigen DNA-Region also sehr komplex und können als Überlagerung sämtlicher „Einzel“-Bewegungen gesehen werden, d.h. die Gesamtmobilität einer DNA-Sequenz unterliegt der Mobilität einer Globalstruktur, gleichzeitig derjenigen einer Substruktur und desweiteren etwaig vorhandenen noch kleineren Verbänden innerhalb dieser Substruktur usw., die alle ihrer spezifischen Bewegungscharakteristika folgen.

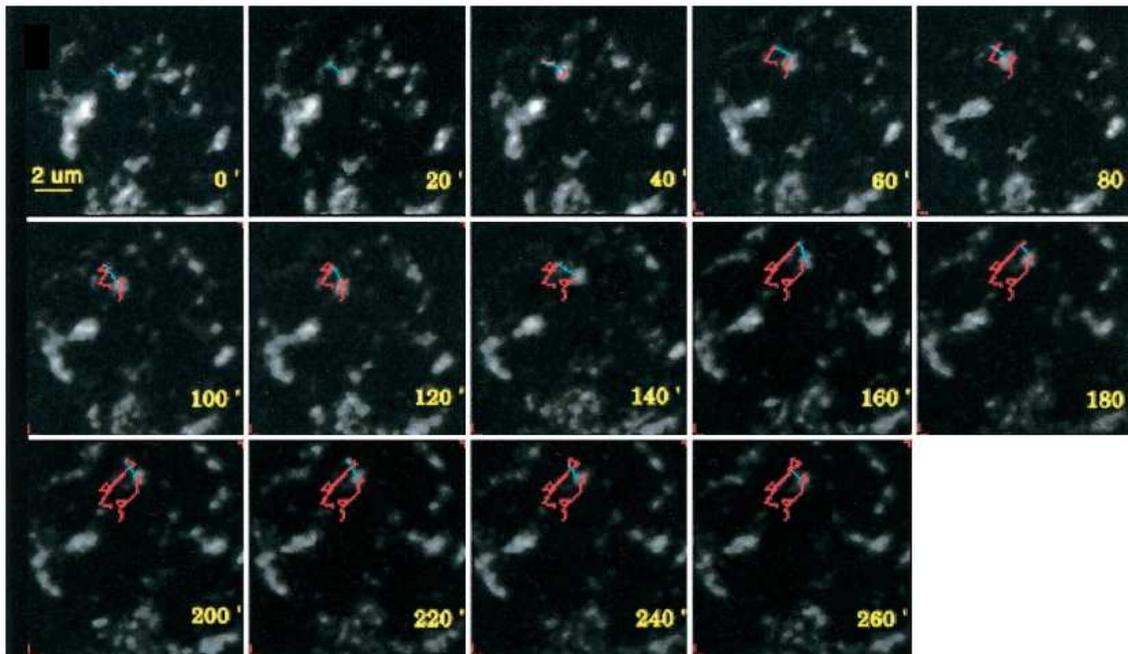


Abbildung 5.2: 2D-Projektion der Bildsequenz einer vierstündigen Aufnahme von lebenden Neuroblastenzellen mit einem konfokalen Laser-Scanning-Mikroskop: Für zwei Foki sind die zugehörigen Trajektorien (rot) und relative Distanzen (cyan) eingezeichnet (Bildquelle [14]).

Auswirkungen hinsichtlich hochpräziser Strukturanalysen: Das Wesentliche bei dieser bislang betrachteten „makroskopischen“ Mobilität ist nun aber, dass diese lokale Bewegung einzelner Sequenzen einerseits zwar entscheidende Folgen für quantitative Untersuchungen der subchromosomalen Architektur hat: das Interesse besteht in diesem Fall zumindest nicht primär an der Mobilität oder der Ermittlung von Diffusionsparametern, sondern an einer nicht durch Zellfixierungen beeinträchtigten Bestimmung der Topologie oder deren Änderung durch Realzeit-Messungen des Einflusses von regulatorischen Prozessen. Makromolekulare Bewegungen treten hier also als in höchstem Maße störender Nebeneffekt auf, deren Konsequenzen bezüglich der Signalextraktion mit dem SMI-Mikroskop in Kapitel 6 näher erläutert werden. Andererseits ist diese „makroskopische“ Diffusion in einem Bereich angesiedelt, der prinzipiell sehr genau erfassbar/messbar ist und folglich bei der Signalanalyse als solche identifiziert werden kann.

Ein weitaus größeres Problem besteht in der Erfassung und vernünftigen Interpretation „mikroskopischer“ Mobilität. In der allgemeinen Transportgleichung (5.17) wurde der vibratorische Anteil $\mathbf{V}(t)$, d.h. mögliche Eigenschwingungen des Moleküls um einen Gleichge-

wichtszustand, nicht berücksichtigt (siehe Abbildung 5.3 für eine simulierte 30nm Chromatinfaser [63]). Diese, in jeder Molekülkonfiguration auftretenden, sehr geringen und gleichzeitig schnellen Fluktuationen können im zeitlichen Mittel das Detektionssignal komplett verschmieren und eine vertrauenswürdige Interpretation des Signals aufgrund der bis heute fehlenden genaueren Kenntnisse über das Bewegungsmuster nahezu unmöglich machen. Ein intuitiver Zugang zu diesen Parametern ist insofern ebenfalls nicht realisierbar, da mit Ausnahme von fluoreszenz-korrelations-spektroskopischen (engl.: *Fluorescence Correlation Spectroscopy (FCS)*) Methoden⁴ eine zeitliche Auflösung solcher „Mikro“-Fluktuationen bis jetzt nicht möglich ist.

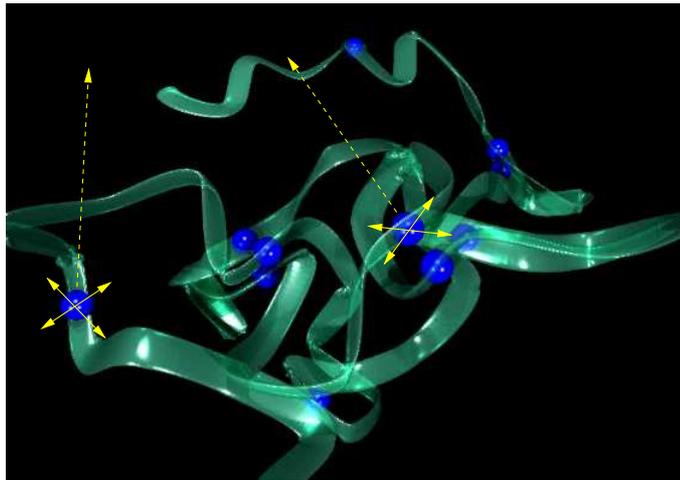


Abbildung 5.3: Zur „makroskopischen“ und „mikroskopischen“ Mobilität einer 30nm Chromatinfaser: die Abbildung zeigt eine simulierte lineare Kette bestehend aus 60 Segmenten mit jeweils 30kbp Länge (Bildquelle [63]). Die blauen Sphären illustrieren die Positionen spezifischer Genloki, die in dieser Simulation als attraktive Potentiale wirken und sehr schnelle Fluktuationen um ihren Gleichgewichtszustand ausführen (durchgezogene Pfeile). Diese Bewegung ist aufgrund der Beschränktheit der zeitlichen Auflösung nicht messbar und damit im zeitlichen Mittel gerade Null. Die „makroskopische“ Bewegung der kompletten Faser bzw. Relativbewegung der Loki (gestrichelte Pfeile) kann prinzipiell gemessen werden.

Diese komplexen Bewegungscharakteristika von subnuklearen Objekten resultieren in enormen Problemen bei der Umsetzung von höchstauflösenden Lebendzell-Techniken. Das folgende Kapitel gibt hierfür einen kurzen Überblick über zu erwartende Effekte hinsichtlich der Vermessung von mobilen Objekten mit dem SMI-Mikroskop und daraus abzuleitender Konsequenzen für die Strukturanalyse.

⁴Die FCS ist in der Lage, korrelative Fluoreszenzsignale einzelner Moleküle im Bereich von μs aufzulösen und mit Hilfe einer Autokorrelationsfunktion (Vgl. Gleichung (5.13)) in Verbindung zu setzen. Damit wäre es zumindest theoretisch vorstellbar, genauere Informationen über Fluktuationen auf molekularer Ebene zu erhalten.

Kapitel 6

In-vivo SMI-Mikroskopie

Bei biologischen Fragestellungen, die sich auf rein strukturelle Eigenschaften und nicht auf dynamische Prozesse beziehen, wird die Eigenmobilität des zu untersuchenden Objekts stets als störende Begleiterscheinung auftreten. Das vermehrt auftretende Interesse nach höchstauflösenden mikroskopischen Methoden verschärft diese Problematik nun um ein Vielfaches, da sich der zu erwartende, mittlere relative Fehler $\langle \Delta F_{[Dim/Lok]} \rangle$ bei z.B. Größen- oder Lokalisationsangaben mit

$$\langle \Delta F_{[Dim/Lok]} \rangle \propto \frac{1}{S} \quad (6.1)$$

umgekehrt proportional zur Dimension S des Objekts verhalten wird. Bei Lebendzelluntersuchungen von „großen“ Objekten, d.h. mit einer Ausdehnung oberhalb der konventionellen Beugungsbegrenzung, werden sich die in dem untersuchten (DNA-) Verbund wirkenden Einzelmobilitäten bis hinunter zur „mikroskopischen“ Mobilität nur unmerklich im Detektionssignal äußern, da die hierzu notwendige zeitliche und räumliche Auflösung nicht vorhanden ist. Je kleiner der zu untersuchende (DNA-) Verbund allerdings gewählt wird (im Extremstfall: Einzelmoleküle), desto besser muss die vom Mikroskop gegebene Auflösung sein. Damit werden aber gleichzeitig, proportional zur „Verkleinerung“ des Objekts, immer feinere Bewegungsmuster mitaufgelöst und detektiert, woraus eine Verschmierung des Intensitätssignals mit einer hieraus resultierenden Verringerung der Aussagekraft bzw. Interpretationsmöglichkeit folgt. Im ungünstigsten Fall kann das Signal weder quantitativ noch qualitativ zu jedweder Information über das betreffende Objekt verwendet werden. In diesem Kapitel werden hierzu zuerst die bei der Lebendzelluntersuchung herrschenden Begebenheiten aufgezeigt und die aus diesen resultierenden Beschränkungen bezüglich einer verlässlichen Durchführbarkeit der höchstauflösenden in-vivo Mikroskopie skizziert. Im Anschluss daran werden spezifisch für das (Vertico-) SMI-Mikroskop zu erwartende Charakteristika hinsichtlich unter in-vivo Bedingungen extrahierten Intensitätsverteilungen und gleichfalls mögliche Kriterien vorgestellt, nach denen dennoch eine vertrauensvolle Datenanalyse und eine hierauf aufbauende Interpretation erfolgen kann.

6.1 Anmerkungen zur Lebendzellbeobachtung

Im Gegensatz zu fixierten Präparaten spielt bei höchstauflösenden Lebendzelluntersuchungen die jeweilige Charakteristik des zu untersuchenden Objekts eine wesentliche Rolle. Wie

bereits im vorangegangenen Kapitel erläutert, variieren die Bewegungsmuster unterschiedlicher intranuklearer Komponenten über einen Bereich von einigen Nano- bis zu Mikrometern pro Sekunde enorm. Daraus folgt, dass z.B. vor einer möglichen Vermessung eines subnuklearen Komplexes dessen ungefähre Mobilitätseigenschaften bekannt sein sollten, um eine darauf ausgerichtete Messprozedur zu entwickeln bzw. die zugrundeliegende Fragestellung eventuell sogar spezifisch daran anzupassen/abzuändern, um sinnvolle und vertrauenswürdige Resultate zu erhalten.

Bei den derzeit erreichbaren zeitlichen Auflösungen (siehe Kapitel 8 für das Vertico-SMI) würde es z.B. wenig Sinn machen, strukturelle Fragestellungen zu bestimmten frei beweglichen Proteinen zu bearbeiten, die sich innerhalb weniger Sekunden durch den kompletten Nukleus mit etwa $10\text{-}15\mu\text{m}$ Durchmesser bewegen können. Nichtsdestotrotz könnten hier Informationen bezüglich der Ermittlung des grundlegenden Bewegungsmusters sehr hilfreich sein, die z.B. beim (Vertico-) SMI-Mikroskop dadurch erhalten werden könnten, dass man das Objekt nicht wie üblich durch das Stehwellenfeld verfährt, sondern umgekehrt, bei stationär gehaltener Piezo-Position, die Signatur des Objekts bei dessen Durchlaufen der strukturierten Beleuchtung misst. Mittels solch einer „passiven“ Abtastprozedur könnten sehr detailliert Diffusionsparameter und daraus etwaige Dichteveriationen ermittelt werden, aus denen wiederum Rückschlüsse auf die lokale Struktur gezogen werden könnten. Dieses Beispiel zeigt also:

Die biologische Fragestellung muss mit dem zur Verfügung stehenden Potential des in-vivo Mikroskops maximal korrelieren, wodurch der Einsatzbereich des Mikroskops nicht allgemein definiert werden kann, sondern immer in Relation zum bearbeiteten Problem angegeben werden muss.

6.2 Restriktionen

Aus den im Vorangegangenen und in Kapitel 5 dargelegten Sachverhalten ergibt sich, dass die zentrale Rolle bei der höchstauflösenden Lebendzellmikroskopie einer sehr hohen Geschwindigkeit bei der Datennahme (Datenakquisitionsrate (*DAQ-Rate*)) zukommt, um den aus der Objektmobilität resultierenden Fehler auf das Detektionssignal so weit wie möglich zu minimieren. Die maximal mögliche DAQ-Rate hängt nun von vielen einzelnen Faktoren ab, wobei die wesentlichen Beschränkungen durch die in Abbildung 6.1 dargestellten Bereiche gegeben sind, die eine wechselseitige Abhängigkeit aufweisen und die Biologie und die verwendete Hardware repräsentieren:

1. **Sonde:** Eine entscheidende Größe für eine schnelle Datennahme ist mit dem Signal zu Rausch Verhältnis (SNR) bzw. der Signalstärke, d.h. der Anzahl vom Objekt emittierter Photonen pro Zeitintervall gegeben. Dies ist insbesondere bei der Untersuchung von lebenden Zellen umso wichtiger, da hier der Nukleus eine sehr hohe Eigenfluoreszenz aufweist.
2. **Kamera:** Zur Detektion des Intensitätssignals wird bei den meisten mikroskopischen Systemen eine CCD-Kamera eingesetzt, die zwei wesentlichen und sich in ihrer grundlegenden Definition scheinbar widersprechenden Anforderungen genügen muss. Einerseits muss die Kamera hochempfindlich, also mit einer genügend hohen Quanteneffizienz ausgestattet sein, um die gerade von sehr kleinen Objekten teilweise mini-

malsten Photonenraten noch detektieren zu können. Andererseits ist für eine schnelle Datennahme aber die Anzahl der maximal aufzunehmenden Bilder pro Sekunde (engl.: *frames per second (fps)*) ein entscheidendes Kriterium. Die mit abnehmender Objektgröße sinkende Photonenzahl muss also gleichzeitig mit einer hohen Bildaufnahme Frequenz kombiniert werden.

3. **Piezo:** Zur 3-dimensionalen Abtastung des Objekts müssen vom piezoelektrischen Aktuator durchschnittlich 20-40 verschiedene Positionen angefahren werden. Maßgebend zum Erreichen hoher Geschwindigkeiten ist hier, dass selbst ohne allzu große Verzögerungen zwischen den einzelnen Schritten ein hinreichend genauer, linearer und stabiler Betrieb gewährleistet ist. Hierzu muss der Piezo ein absolut exaktes und schnelles Einschwingverhalten an der jeweils neu angefahrenen Position aufweisen, das im Wesentlichen gegeben ist durch die erreichbare Positionsaufösung.

Mit einer konsequenten Weiterführung dieser Überlegungen kann in erster Näherung, mit der maximal möglichen Bildaufnahme Frequenz $\text{fps}_{[Kamera]}$ und Quanteneffizienz (QE) der Kamera sowie mit der Laserintensität $I_{[Laser]}$, der Abtastrate des Piezos $v_{[Abtast]}$ und dem Fluoreszenzsignal des Objekts $I_{[Sonde]}$, folgende Relation

$$\text{DAQ-Rate} \propto \text{fps}_{[Kamera]} - \frac{1}{\text{QE} \cdot I_{[Laser]} \cdot v_{[Abtast]} \cdot I_{[Sonde]}} \quad (6.2)$$

als der (derzeit) begrenzende Faktor zur Etablierung hoher DAQ-Raten definiert werden. Mikroskopiesysteme, deren Detektion konfokal erfolgt, haben hier naturgemäß Nachteile gegenüber Weitfeldtechniken wie dem SMI-Mikroskop, bei dem die komplette 2D-Fokusebene instantan abgebildet wird, da im konfokalen Fall an jeder z-Position das Bild zuerst noch zeilen- und spaltenweise aufgebaut werden muss.

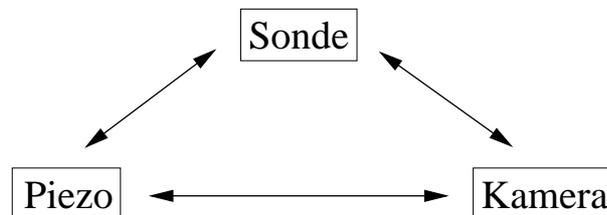


Abbildung 6.1: Zur wechselseitigen Abhängigkeit der drei wesentlichen Beschränkungen bezüglich einer maximalen DAQ-Rate.

Die Größenordnungen für die in (6.2) angegebenen, restriktiven Parameter sind sehr unterschiedlich und hängen insbesondere für die verwendete CCD-Kamera, sehr stark von der schon vielfach erwähnten biologischen Fragestellung und dem darauf ausgelegten Mikroskop ab. Allgemein kann man bezüglich der Fluoreszenzeigenschaften herkömmlicher biologischer Sonden einen durchschnittlichen Wert von einigen 1000 Photonen pro Sekunde angeben. Allerdings sind gerade durch die Entwicklung sogenannter *Quantum Dots (QDots)* in jüngster Zeit sehr erfolgsversprechende Ansätze zur Erhöhung von $I_{[Sonde]}$ gelungen. Diese synthetischen Nanokugeln mit Kerndurchmessern von 5-15 Nanometern verfügen über hervorragende Fluoreszenzeigenschaften, sind zur Verwendung in einer DNA-Sonde unter in-vivo Bedingungen allerdings noch nicht bzw. nur sehr bedingt einsetzbar [60]. Die zum Einsatz kommenden CCD-Kameras weisen sehr unterschiedliche technische Spezifikationen

auf, wodurch stets ein möglichst guter Kompromiss zwischen Modellen mit bis zu 500fps mit geringer QE und hochsensitiven Varianten mit bis zu 65%iger Quantenausbeute aber maximal erreichbaren 20fps anzustreben ist. Diese Hardwarebegrenzung in (6.2) wird durch den zukünftigen Einsatz neuester Generationen von CCD-Kameras, die hohe Quanteneffizienz und niedriges Elektronenrauschen mit sehr hohen Bildraten kombinieren, aber weiter entschärft werden. Bei den piezoelektrischen Aktuatoren ist die Problematik durch die geforderte Positionsauflösung und im gleichzeitig erreichbaren, linearen Betrieb gegeben, woraus für neueste Modelle Durchschnittswerte von bis zu 50 angefahrenen Positionen pro Sekunde resultieren.

6.3 Zeitlich veränderliche Punktbildfunktion

Die im Vorangegangenen erläuterten Grundlagen zur Lebendzellbeobachtung gelten prinzipiell für jede beliebige, höchstauflösende Mikroskopietechnik. Im Folgenden wird spezifisch auf zu erwartende Charakteristika bezüglich des Detektionssignals des (Vertico-) SMI-Mikroskops unter dem Einfluss von sich bewegenden Objekten und hieraus folgender Interpretationsmöglichkeiten eingegangen.

6.3.1 Einfluss der Objektmobilität

Durch die Mobilität kann sich das Detektionssignal abhängig von der Geschwindigkeit, mit welcher sich das betrachtete Objekt bewegt, deutlich von dem Signal, das von einem ruhenden Objekt akquiriert wird, unterscheiden. Erfolgt die Bestimmung der Objektgröße über herkömmliche Techniken, d.h. mittels der FWHM der Intensitätsverteilung, wird sich ein Einfluss durch die Mobilität in einem gestreckten oder gestauchten Profil, bzw. allgemein über Asymmetrien äußern, woraus nur noch sehr vage Informationen über das Objekt erhalten werden können. Insbesondere können hier, auch unter Verwendung von korrigierenden, nachbearbeitenden Maßnahmen wie dem *Tracking*¹ nur sehr unzureichende Aussagen über den Einfluss der Objektmobilität auf die Intensitätsverteilung getroffen werden.

Unter Verwendung einer strukturierten Beleuchtung wie beim SMI-Mikroskop wirken sich schon kleinste Veränderungen bei der Abtastung des Objekts, die durch die Eigendynamik hervorgerufen sind, deutlich auf die Form der Axialen Intensitätsverteilung (AID) aus. Dies liegt systembedingt am größeren Informationsgehalt, der mittels des Stehwellenfelds in zumindest einer Dimension erhalten wird, wodurch schon aus den Rohdaten relativ einfach Schlussfolgerungen bezüglich der betragsmäßigen Ausprägung der Objektgeschwindigkeit gezogen werden können. Allerdings können in diesem Fall, d.h. der Bestimmung der Objektgröße über die Modulationstiefe, keine Tracking-Methoden mehr angewandt werden, um Asymmetrien bezüglich des (axialen) Intensitätsprofils auszugleichen. Um dies näher zu erläutern, sind in den folgenden Abbildungen 6.2 - 6.4 zwei unterschiedliche Beispiele aufgeführt.

Abbildung 6.2 zeigt das y-z Profil eines frei in Glycerol gebetteten und sich schnell bewegenden 100nm Beads². Die Bewegung bzw. Geschwindigkeit des Objekts in lateraler

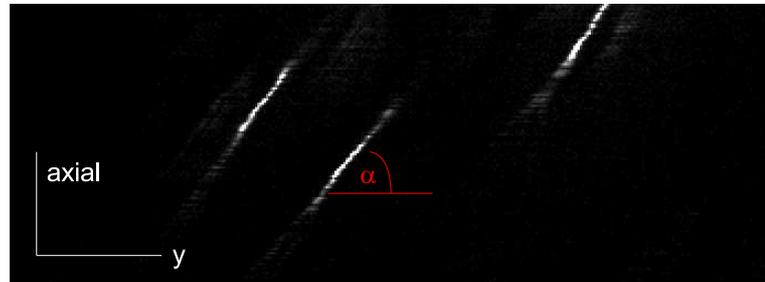
¹Darunter versteht man eine optimierte Überlagerung der einzelnen Bilder des Rohdatensatzes in Abhängigkeit von ihrer maximalen Intensität, um die Objektbewegung nachträglich „herauszurechnen“.

²Sämtliche in diesem Kapitel vorgestellten Daten sind ein Resultat von Messungen, die mit dem Vertico-SMI durchgeführt wurden. Da in diesem Kapitel nur exemplarische Erläuterungen hinsichtlich der Kon-

Richtung spiegelt sich hier wider über die Steigung des Intensitätsmusters. Sofern die Datenakquisitions-Rate, d.h. die Geschwindigkeit, mit welcher das Objekt abgetastet wurde, bekannt ist, können die Bewegungsparameter des Objekts bestimmt werden, da diese direkt mit dem Winkel α korreliert sind. Dies ist selbst dann noch möglich, wenn einige Be-

Abbildung 6.2:

Intensitätssignatur eines frei beweglichen 100nm Beads in der y-z-Ebene. Das Geschwindigkeitsprofil ist direkt mit der Steigung, d.h. dem Winkel α , korreliert.



reiche des Objekts aufgrund dessen Eigendynamik nicht exakt abgebildet werden konnten, da in diesem Fall die wahrscheinliche Trajektorie durch Extrapolation, d.h. im Wesentlichen mittels *Tracking*-basierter Methoden, bestimmt werden kann.

Ist man allerdings an der Bestimmung der Objektgröße über die Modulationstiefe interessiert, können fehlende Informationen, die aus der selektiven Beleuchtungsstruktur des Stehwellenfeldes resultieren, nicht mehr oder nur sehr unzureichend rekonstruiert werden, wobei zwei unterschiedliche Szenarien definiert werden können (Vgl. Abbildung 6.3):

1. Für bestimmte (allerdings sehr unwahrscheinliche) Bewegungsmuster, bei denen sich das Objekt mit einem, relativ zur Abtastrichtung ($+z$) bzw. $-z$ -geschwindigkeit und über den kompletten DAQ-Zeitraum anhaltenden „kompensatorischem“ Geschwindigkeitsprofil $v_{\pm z, Objekt}$ bewegt, würden axiale Intensitätsverteilungen akquiriert, die ein Modulationsverhalten analog zu denen von stationären Objekten aufzeigen. Mit „kompensatorischem“ Geschwindigkeitsprofil sind hier Objektbewegungen gemeint, die trotz der Überlagerung mit der Abtastung einen stetigen Verlauf des Modulationsprofils generieren, bei dem die inneren und äußeren Einhüllenden keine Diskontinuitäten beinhalten und dem Verlauf einer sinc^2 -Funktion folgen. Nichtsdestotrotz gäbe die Modulationstiefe in diesem Fall keinerlei vertrauenswürdige Information über die Objektgröße, da das Modulationsprofil, trotz seiner Symmetrie, wesentlich von der Eigendynamik beeinflusst wäre.
2. In realiter wird die Eigendynamik eines Objekts einem statistischen Prozess folgen, in dessen Verlauf sich Diskontinuitäten im Modulationsprofil ergeben. Je nach Ausprägung solcher Asymmetrien, d.h. dem Geschwindigkeitsprofil des Objekts, sind Aussagen über die Objektgröße selbst hinsichtlich qualitativer Abschätzungen nicht mehr möglich.

Um die Folgen der Objektmobilität auf die Form der AID des SMI-Mikroskops abschätzen zu können, ist in Abbildung 6.3(b) das axiale Intensitätsprofil eines sich frei bewegenden und mit 40nm Schritten abgetasteten 100nm Beads dargestellt, wodurch das unter Punkt 2 aufgezeigte Szenario verdeutlicht wird. Trotz der zu erkennenden Modulation, die zumindest angibt, dass das Objekt sehr klein ist, folgen sowohl die innere als auch die

sequenzen auf die Form der AID gegeben werden, wird diesbezüglich nicht näher auf Details bei der Datennahme eingegangen (hierzu siehe Kapitel 7 und 8).

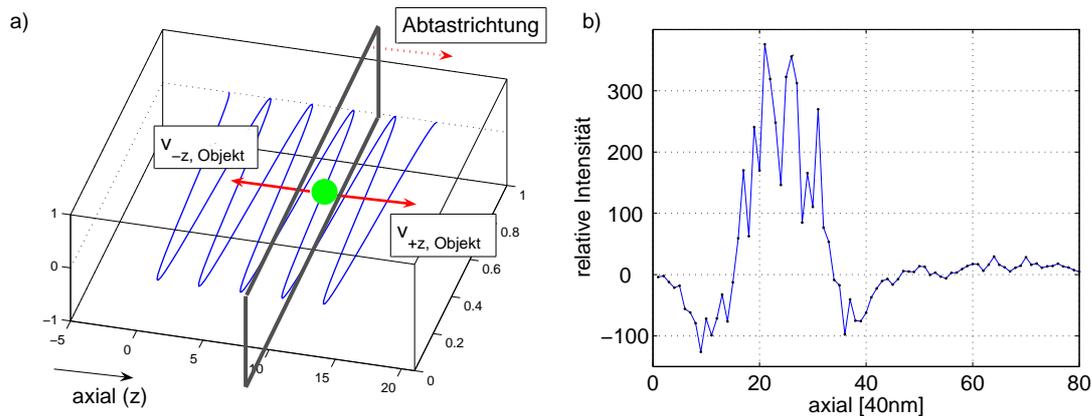


Abbildung 6.3: Schematische Darstellung zur Visualisierung der in den Punkten 1 und 2 aufgeführten Bedingungen zum Einfluss der Objektmobilität auf die AID des SMI-Mikroskops (a) und das axiale Intensitätsprofil eines sich schnell und frei bewegenden 100nm Beads (b). Aufgrund der ausgeprägten Modulation ist erkennbar, dass das Objekt klein ist, jedoch lassen Diskontinuitäten bezüglich des Modulationsprofils keine *quantitative* Größenabschätzung zu.

äußere Einhüllende aufgrund der Eigenbewegung des Beads, welche die Abtastprozedur überlagert, keinem kontinuierlichem Verlauf mehr. Eine quantitative, herkömmliche Größenbestimmung über die Modulationstiefe würde in diesem Fall in einer Fehlinterpretation der Objektstruktur aufgrund unzureichender bzw. fehlender Informationen aus der selektiven Beleuchtung resultieren, bzw. weitergehend formuliert: die genaue Form der AID ist eine Folge von zufälligen Bewegungen des Objekts in $\pm z$ -Richtung des Stehwellenfelds, wodurch, je nach Bewegungsrichtung des Beads, dieser entweder eine zu starke oder zu geringe Fluoreszenzcharakteristik aufweist. In Abbildung 6.4(a) sind, zusammen mit dem zugrunde liegenden Stehwellenfeld, für das zuvor dargestellte Intensitätsprofil vier z -Positionen (1-4) markiert, die eine deutliche Verschiebung bezüglich der „tatsächlichen“ Intensität in Relation zum Wellenfeld aufweisen, wobei die Pfeile die Bewegungsrichtung angeben, die zur jeweiligen Konstellation geführt haben. Die wahrscheinlich „wahren“ Positionen (1*-4*) im Stehwellenfeld der gekennzeichneten z -Ebenen, d.h. unter der Annahme, dass das Objekt stationäre Eigenschaften bzw. eine nur sehr schwache Eigendynamik aufweist, sind in Abbildung 6.4(b) dargestellt.

Eine analoge Argumentation wie zuvor wäre hier also: der Informationsgehalt aus dem Stehwellenfeld weist durch die fehlerhafte³ Anregung an den Positionen 1-4 entscheidende Lücken auf. Auch unter Verwendung von *Tracking*-Methoden ist das reale Muster nicht reproduzierbar, da hier das Problem nicht nur in einer relativen Verschiebung von einzelnen Bildebenen liegt, was nachträglich korrigierbar wäre. Im Falle der strukturierten Beleuchtung *fehlen* entscheidende Informationen über komplette Bereiche des Anregungsfelds. Die Form der AID wäre also lediglich für den Fall nachträglich korrigierbar, falls das Bewegungsprofil des Objekts exakt bekannt wäre, was im Allgemeinen aber nicht der Fall ist.

³In diesem Zusammenhang bedeutet fehlerhaft, dass entscheidende Informationen über das Bewegungsprofil nicht zugänglich sind. Selbstverständlich liefert das akquirierte Signal exakt das korrekte Intensitätsprofil für diese Objektgröße unter Berücksichtigung seiner z -Verrückungen während der DAQ.

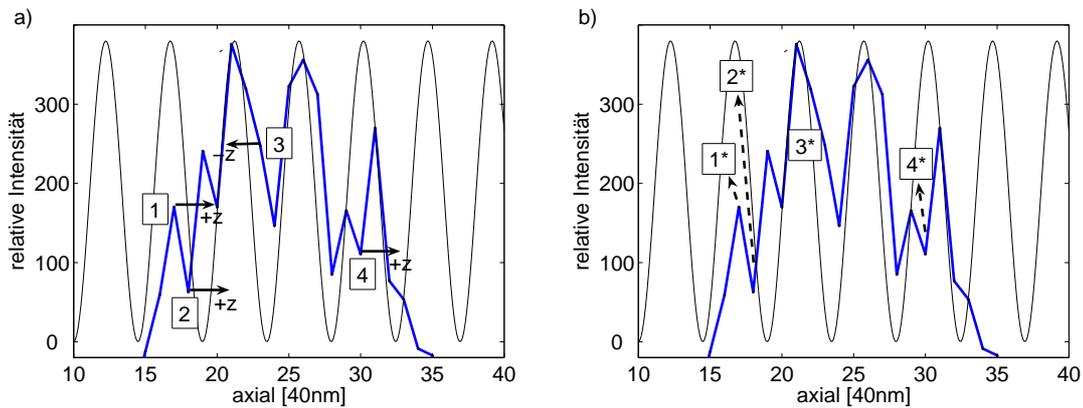


Abbildung 6.4: Schematische Darstellung der Auswirkung von zufälligen $\pm z$ -Bewegungen eines 100nm Beads und der hieraus resultierenden Asymmetrie des Modulationsprofils. In (a) ist für vier ausgesuchte z -Positionen (1-4) die jeweilige Bewegungsrichtung eingezeichnet, die zum akquirierten Intensitätssignal geführt haben. Die wahrscheinlich „wahren“ Positionen (1*-4*) im Stehwellenfeld, die unter der Annahme eines stationären Objekts abgebildet worden wären, sind in (b) aufgeführt.

Diese Darlegungen zeigen also, dass einerseits eine Rekonstruktion bzw. Extrapolation in Bezug auf die Modulationscharakteristik des detektierten Signals nur unzureichend durchführbar bzw. bei sich sehr schnell bewegenden Objekten unmöglich ist. Auf der anderen Seite liefern diese Überlegungen aber wertvolle Hinweise auf mögliche Kriterien, mit denen die Vertrauenswürdigkeit einer in-vivo SMI-AID überprüft werden kann, wodurch zumindest qualitative Abschätzungen von Objektgrößen über die Modulationstiefe ermöglicht werden.

6.3.2 Kriterien zur Vertrauenswürdigkeit der AID

Um in-vivo SMI-Mikroskopie trotz der zuvor erläuterten Schwierigkeiten bezüglich des Einflusses der Objektmobilität auf die Form der AID auf eine vernünftige Basis stellen zu können, müssen Kriterien abgeleitet werden, aufgrund derer akquirierte Modulationsprofile auf ihre Glaubwürdigkeit hin abgeschätzt werden können. Damit sollte es dann ermöglicht werden, objektive Merkmale zur Verfügung zu stellen, die eine Entscheidung hinsichtlich der Verwertbarkeit eines Intensitätsprofils und daraus abzuleitender Schlussfolgerungen zulassen. Wie im vorangegangenen Abschnitt aufgezeigt, wird sich, sofern das zu untersuchende Objekt hinreichend klein ist, selbst bei sehr starken Eigenbewegungen eine Modulation im Detektionssignal ausbilden. Nichtsdestotrotz ist die Aussagekraft des Modulationsprofils erheblich davon abhängig, inwieweit das Geschwindigkeitsprofil des Objekts das Intensitätsprofil beeinflusst hat bzw. ob keine zu großen Lücken hinsichtlich des Informationsgehalts entstanden sind. Um dies näher zu präzisieren, wird im Folgenden der Begriff der *Modulations-Symmetrie* eingeführt, der ein neues Maß für die Güte der Modulation definiert und implizit mit der Bewegungscharakteristik und der Wahrscheinlichkeit von z -Verrückungen des untersuchten Objekts korreliert ist.

Ausgehend von der in Abbildung 6.4 gezeigten Situation können vier wesentliche Kriterien spezifiziert werden, aufgrund derer eine realistische Einschätzung zur Qualität der Modulation gegeben werden kann:

Kriterien zur Vertrauenswürdigkeit der AID:

1. Stetiger Verlauf, d.h. kontinuierliche Charakteristik der inneren und äußeren Einhüllenden.
2. Nicht-variable Breite der Wellenzüge (korrespondierend mit dem Profil der Wellenfronten des Stehwellenfelds).
3. Verhältnismäßige FWHM des Gesamtprofils.
4. Symmetrische Ausprägung von $I_{smooth}(z)$.

Hier ist anzumerken, dass das Kriterium 4 nur ein sehr schwaches Kriterium darstellt, da sich Asymmetrien selbst bei fixierten Objekten aufgrund von Brechungsindexvariationen relativ schnell ausbilden können. Allerdings zeigen solche Profile in der Regel einen charakteristischen Abfall beim Übergang zwischen zwei optisch unterschiedlich dichten Medien, der gut zu identifizieren ist. Asymmetrien, die aus Objektmobilitäten resultieren, zeigen demgegenüber eine unverhältnismäßige Stauchung/Streckung des *Gesamtprofils*.

Die beiden wesentlichen Kriterien 1 und 2 werden im Folgenden als **Modulations-Symmetrie** definiert, die als Qualitätsmaß bezüglich der Vertrauenswürdigkeit der axialen Intensitätsverteilung in Abhängigkeit von der Objektmobilität angesehen werden kann: je symmetrischer das Modulationsprofil, desto eindeutiger die Möglichkeit zur objektiven Beurteilung der Objektstruktur.

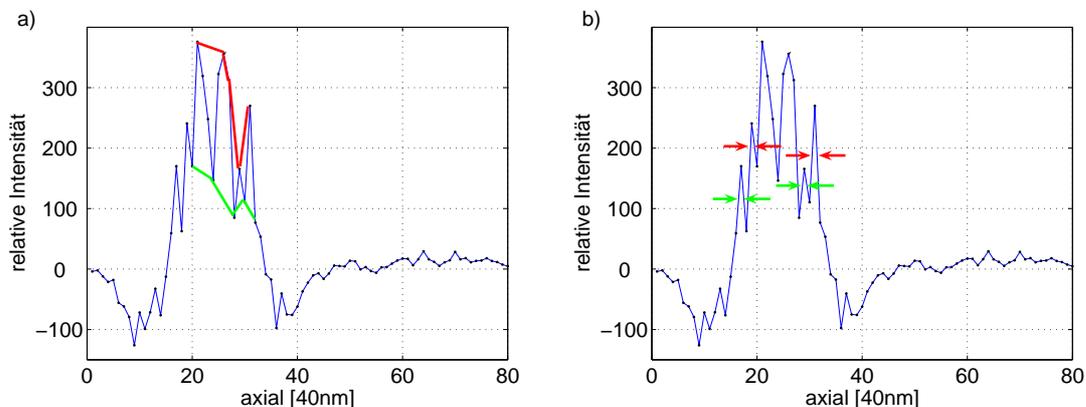


Abbildung 6.5: Zur Illustration der unter Punkt 1 und 2 aufgestellten Kriterien zur Vertrauenswürdigkeit der AID in Bezug auf einen stetigen Verlauf der Einhüllenden (a) und einer mit dem Stehwellenfeld korrespondierenden Breite der Wellenzüge (b).

Zur Illustration der unter Punkt 1 und 2 aufgeführten Kriterien ist in Abbildung 6.5 wiederum die Intensitätsverteilung des im bisherigen Verlauf verwendeten, frei beweglichen Beads dargestellt. Sowohl die innere als auch die äußere Einhüllende der AID zeigen einen nicht-stetigen, diskontinuierlichen Verlauf, der nicht mehr durch eine sinc^2 -Funktion angenähert werden kann (Abbildung 6.5(a)). Eine direkte Folge davon sind die in den einzelnen Wellenzügen ausgebildeten unterschiedlichen Breiten, welche mit der FWHM der Wellenfronten des Stehwellenfeldes korrespondieren müssten (Abbildung 6.5(b)). Das 3. Kriterium

stellt ein qualitativ sehr hilfreiches Maß dar, mit dem erste Abschätzungen über die Eigendynamik getroffen werden können: zeigt das Gesamtprofil eine zu hohe (geringe) FWHM, ist dies ein starkes Indiz für schnelle Objektbewegungen entlang (entgegen) der Abtastrichtung. Dies hängt unter anderem sehr stark von der verwendeten DAQ-Rate ab (siehe Kapitel 8).

Mit den bis jetzt aufgeführten Erläuterungen und Definitionen lassen sich weitergehende Überlegungen formulieren, die allgemein als Grundlage zur in-vivo SMI-Mikroskopie verwendet werden können:

Hypothesen:

1. Für den Fall, dass das untersuchte Objekt Dimensionen innerhalb von $\mathbb{I}_{S[SMI]} = \{30\text{nm} < S < 200\text{nm}\}$ und zusätzlich keine zu starke Eigendynamik aufweist, ist eine Modulation detektierbar.
2. Unter der Annahme des Vorliegens einer adäquaten Modulations-Symmetrie sollte eine zumindest qualitativ vertrauenswürdige Größenabschätzung hinsichtlich der Argumentation über die Modulationstiefe möglich sein.

3. Eine für die unter Punkt 2 vorgestellte weitergehende Argumentation bezieht den Einfluss der Objektmobilität direkt mit ein:

Um eine Signalstruktur mit einer Modulations-Symmetrie analog zum Profil eines stationären Objekts trotz eines angenommenen, erheblichen Einflusses in Folge einer stark ausgeprägten Eigendynamik zu erhalten^a, müsste das Objekt ein in Relation zur Abtastrichtung und zum Stehwellenfeld annähernd kolineares, mit „kompensatorisch“ wirkender Relativgeschwindigkeit verlaufendes Bewegungsmuster über den kompletten DAQ-Zeitraum aufweisen. Andernfalls sollten spezifische Unstetigkeiten der Einhüllenden zu detektieren sein. Solch eine lineares Muster widerspräche aber den allgemein gültigen Modellen eines rein statistischen Bewegungsprofils, welchem ein *Random-Walk* zugrunde liegt.

^aResultierend würden sich trotz einer ausgeprägten Modulations-Symmetrie erhebliche Fehlinterpretationen bei der Größenabschätzung ergeben.

Auf Grundlage dieser Annahmen wird ersichtlich, dass unter der Voraussetzung einer sehr schnellen Datennahme zur Verringerung des Einflusses der Objektmobilität auf die Form des akquirierten Intensitätssignals, in-vivo SMI-Prozeduren prinzipiell realisierbar sind. Eine Einschränkung ist aber in jedem Fall dadurch gegeben, dass Größenabschätzungen nur rein qualitativ über die Betrachtung der Modulationstiefe, gleichbedeutend mit der Vermeidung von absoluten Größenangaben, getroffen werden sollten, sofern das exakte Bewegungsmuster nicht bekannt ist (dies entspricht für gewöhnlich der Regel). Weiterhin unterliegen die hier vorgestellten Daten und damit die Schlussfolgerungen einem Bewegungsmuster, die lediglich Ausdruck von diffusorischen Anteilen und damit der in vorigem Kapitel eingeführten „makroskopischen“ Dynamik sind. Vibratorische Bestandteile, d.h. Auswirkungen der „mikroskopischen“ Dynamik, wurden hier nicht berücksichtigt und müssen direkt am vitalen biologischen System untersucht werden, da diese Bewegungsformen sehr komplex sind und mit großer Wahrscheinlichkeit auch innerhalb der Zelle / des Zellkerns sehr stark voneinander differieren. In den folgenden Kapiteln wird aufgezeigt, wie

durch die Entwicklung des neu konzipierten Vertico-SMI-Mikroskops erste Untersuchungen zum grundlegenden Verhalten eines in-vivo SMI-Mikroskops und der Vermessung von sowohl physikalischen als auch vitalen biologischen, frei beweglichen Objekten durchgeführt und damit erste in-vivo SMI-AID's extrahiert werden.

Kapitel 7

Das Vertico-SMI

Mit den in den vorherigen Kapiteln eingeführten theoretischen Grundlagen, wird im Folgenden der Übergang zur experimentellen Realisierung des in einer vertikalen Anordnung komplett neu entwickelten SMI-Mikroskops beschrieben. Hierfür wird zunächst eine kurze Einführung hinsichtlich der wissenschaftlichen Motivation zur Konzeption dieses, als *Vertico-SMI-Mikroskop (Vertico-SMI)* bezeichneten Instruments gegeben und nachfolgend sowohl die optische als auch die Hardware- Konfiguration vorgestellt.

7.1 Motivation

Das horizontale SMI-Mikroskop wurde über einen Zeitraum von mehreren Jahren als erster Prototyp zur hochpräzisen Vermessung subchromosomaler Strukturen mittels räumlich modulierter Beleuchtung stetig weiterentwickelt. Im zeitlichen Verlauf wurden sowohl verschiedenste optische Konfigurationen getestet, um optimale Beleuchtungs- und Detektionseigenschaften zu ermitteln, als auch die Ansteuerung der Hardwarekomponenten eigenständig programmiert und weiter verfeinert. Gleichzeitig wurden, mit Hilfe von *virtueller Mikroskopie*, d.h. mittels Computersimulationen, Verfahren zur Verarbeitung der SMI-Rohdatensätze eingeführt, die ein Optimum an Informationsgewinn aus den biologischen Messungen liefern. Der (vorläufige) Höhepunkt dieser Entwicklung mündete schließlich in den in Kapitel 4 beschriebenen, vollautomatisierten Auswertalgorithmus, womit sich das horizontale SMI-Mikroskop als vollwertiges und stabiles System zur hochpräzisen Vermessung von Objekten unterhalb des Abbe-Limits etabliert hat.

Dennoch können trotz dieser Fortschritte einige wesentliche Aspekte biologischer Fragestellungen nicht bearbeitet werden. Der wesentliche Grund liegt hier im horizontalen Design des SMI-Mikroskops, wodurch der Objektträger vertikal im Objektraum positioniert werden muss, was für fixierte biologische Präparate zu keinerlei Restriktionen führt. Für (Langzeit-) Lebendzelluntersuchungen ist diese Konfiguration allerdings völlig ungeeignet oder zumindest nur sehr bedingt einsetzbar, da insbesondere der Einsatz von Objektiven, die speziellen optischen Anforderungen wie Wasserimmersion genügen müssen, gewährleistet sein muss.

Aufgrund der in Kapitel 3 vorgestellten Schwierigkeiten bezüglich der Zellfixierung und des damit verbundenen künstlichen Eingriffs auf die Architektur, bzw. um biologische Prozesse in ihrer Gesamtheit dynamisch auflösen zu können, ist die konsequente Weiterentwicklung höchstauflösender, lichteptischer Verfahren zur Lebendzelluntersuchung aber eines der vor-

dringlichsten Ziele der gegenwärtigen Mikroskopentwicklung (siehe z.B. [34]) . Aus diesem Grund wurde das Vertico-SMI konzipiert, das mittels einer vertikalen Ausrichtung eine horizontale Positionierung des Objektträgers ermöglicht und damit die oben beschriebenen gravitativen Einflüsse auf das Präparat umgehen kann und gleichzeitig die Einbindung spezieller Vorrichtungen zur Lebendzelluntersuchung erlaubt. Dies ist z.B. durch die zwingend erforderliche Verwendung einer Inkubator-kammer gegeben, wodurch die Ausbildung einer autarken Atmosphäre, d.h. einer beliebig konstanten Temperatur ermöglicht wird, um die Zellen über einen möglichst langen Zeitraum am Leben zu erhalten. Weiterhin können relativ einfach spezielle Observationskammern konstruiert werden, die, an einen externen Perfusor gekoppelt, eine kontinuierliche Zugabe von lebensnotwendigen Zellnährstoffen bzw. den Abtransport von Zellabfallprodukten gewährleisten.

7.2 Realisierung

Der grundlegende Aufbau des Vertico-SMI wurde zuerst als CAD (engl.: *Computer Aided Design*) -Modell (siehe Anhang A) im Rahmen einer technischen Diplomarbeit mit Hilfe der kommerziellen Software *SolidWorks*¹ erstellt [74]. Dadurch konnten, in enger Zusammenarbeit, wesentliche Aspekte des Designs hinsichtlich einer optimalen Objektpositionierung und der optischen Konfiguration schon a priori, d.h. vor der eigentlichen Fertigung der Aluminium-Grundkonstruktion², berücksichtigt werden. Durch die Verwendung der computergestützten Modellierung konnte somit die komplette interferometrische Einheit bzw. die Strahlführung des Lasers bis zur Detektionseinheit (CCD-Kamera) exakt an die einzelnen Bauteile bzw. diese an die optischen Komponenten angepasst werden. Dies stellt einen nicht zu unterschätzenden Vorteil dar, da, aufgrund des kompakten Designs des Vertico-SMI, bei einer fehlerhaften oder nur unzureichend genauen Konstruktion, nachträgliche Änderungen, die aus einer nicht präzisen Anpassung des Interferometers oder der Bauteile an dieses resultieren würden, nur mit sehr großem Aufwand zu beheben gewesen wären. Weiterhin erlaubte das CAD-Modell eine relativ einfache Integration zusätzlicher Elemente wie der Inkubator-kammer und spontane Änderungen.

7.2.1 Optische Konfiguration

Der experimentelle Aufbau ist auf einem optischen Tisch realisiert, der mit Druckluft stabilisiert wird, um vom Gebäude übertragene Vibrationen auf das Interferometer und damit fehlerhafte Signale zu vermeiden. Gleiches gilt für die Laser, die komplett vom optischen Tisch entkoppelt sind, da deren Wasserkühlung ebenfalls störende Einflüsse hervorrufen würden. Der Effekt der Vibration darf dabei nicht unterschätzt werden, da das Stehwellenfeld des SMI-Mikroskops sehr empfindlich gegenüber Erschütterungen ist und unter solchen Erscheinungen stark fluktuiert.

Lasereinkopplung

Abbildung 7.1 zeigt das mit SolidWorks erstellte CAD-Modell und gleichzeitig die optische Konfiguration des Vertico-SMI durch zusätzlich eingefügte Komponenten mit den

¹SolidWorks Corporation, <http://www.solidworks.com>

²Die ursprünglich geplante Verwendung von *SuperInvar*, um thermischen Effekten aufgrund von Materialeigenschaften vorzubeugen, erwies sich wie später gezeigt wird, als nicht notwendig.

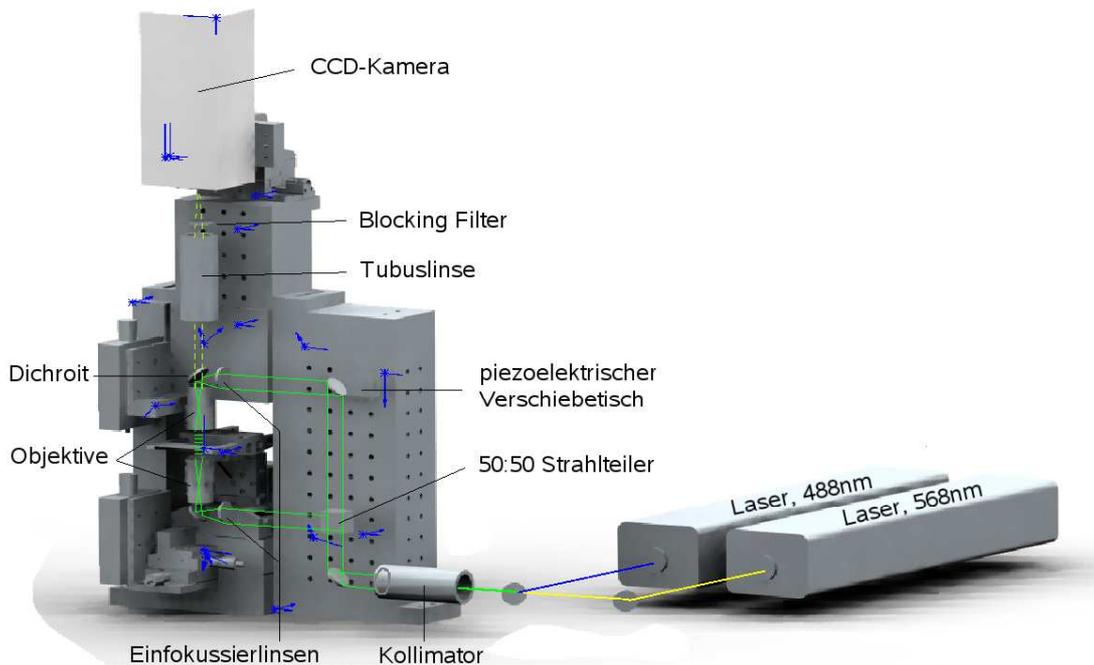


Abbildung 7.1: Mit Hilfe von *SolidWorks* erstelltes CAD-Modell des Vertico-SMI und zusätzlich eingefügte Komponenten zur Darstellung der optischen Konfiguration.

beiden Laserquellen in einer 3-dimensionalen (3D) Darstellung. Zur Beleuchtung steht ein Argon-Ionen-Laser (Modell: 2060-65, Spectra Physics (Newport)³) und ein Krypton-Laser (Modell: Lexel 95-K, Lexel Laser⁴) mit Anregungswellenlängen von $\lambda_{ill}=488\text{nm}$ und $\lambda_{ill}=568\text{nm}$ und maximalen Leistungen von $\sim 500\text{mW}$ bzw. $\sim 100\text{mW}$ zur Verfügung. Beide Laser werden auf der TEM_{00} -Mode betrieben, um ein gaußförmiges Strahlprofil zu erhalten (die 568nm-Linie wird dabei über ein Glasfaserkabel von einem benachbarten Aufbau auf den optischen Tisch geführt). Die beiden Laserlinien werden dann mittels eines dichroitischen Strahlteilers (F33-492, AHF Analystechnik⁵), der in diesem Fall als *Beam Combiner* fungiert zu einem Strahl überlagert, wobei die einzelnen Linien zusätzlich noch mit Hilfe eines *Cleanup Filters* (F54-568, AHF Analystechnik) mit einer spektralen Genauigkeit (FWHM) von $\pm 5\text{nm}$ vom Laserplasma getrennt werden. Zur homogenen Beleuchtung im Objektraum werden die zusammengeführten Strahlen mittels eines Kollimators, bestehend aus zwei achromatischen, konvexen Linsen (Best.-Nr.: G322201000 und G322324000, Linos Photonics⁶) mit Brennweiten von $f=20\text{mm}$ und $f=100\text{mm}$ im Abstand von 120mm , auf einen konstanten Strahldurchmesser von etwa 10mm $1/e^2$ -Durchmesser aufgeweitet. Zwei Irisblenden, die im Abstand von etwa 150mm angeordnet sind, erlauben zum Einen eine zusätzliche Modifikation des Strahldurchmessers, was gerade für Justagearbeiten von Vorteil ist und dienen zum Anderen als Referenz, falls Änderungen an der Lasereinkopp-

³Darmstadt, <http://www.newport.com>

⁴Fremont, USA, <http://www.lexellaser.com>

⁵Tübingen, <http://www.ahf.de>

⁶Göttingen, <http://www.linos.de>

lung vorgenommen werden müssen. Im Anschluss daran wird der Strahl auf den ersten, metallbeschichteten Spiegel mit 25mm Durchmesser (Best.-Nr.: 10Z40ER.2, Newport), der auf einem kinematischen Spiegelhalter (KMS/M, Thorlabs⁷) fixiert ist, geführt und von dort in die vertikale Ausrichtung des Vertico-SMI eingekoppelt.

Interferometrische Einheit

Mit Hilfe eines nicht-polarisierenden 50:50 Strahlteilers (NT32-505, Edmund Optics⁸) wird der vom ersten Spiegel in das Vertico-SMI geführte Strahl in zwei Laserstrahlen gleicher Intensität und Polarisation aufgespalten. Im Falle des oberen Interferometerarms wird dies über einen im 45° Winkel relativ zum einlaufenden Strahl positionierten Spiegel realisiert, der zusätzlich auf einem piezoelektrischen Aktuator (P-753.1CD, Physik Instrumente⁹) befestigt ist, wodurch das Wellenfeld im Objektraum nanometergenau in axialer Richtung verschoben werden kann (die genauen Spezifikationen der im Aufbau verwendeten piezoelektrischen Verschiebetische sind in Anhang B aufgeführt). Die beiden kollimierten, aufgeweiteten Laserstrahlen werden dann in die Einfokussierlinsen gelenkt, die mittels zweier 3-Achsen Linsenpositionierer (M-LP-05A-XYZ, Newport) zur lateralen und axialen Justage, direkt am eigens gefertigten oberen bzw. unteren Objektivhalter fixiert sind. Dadurch erfolgt eine Fokussierung in die hintere Fokusebene des jeweiligen Objektivs mit nachfolgend aufgeführten, möglichen Konfigurationen am Vertico-SMI:

- Konfiguration I (Wasserimmersion)
 - Achromatische Einfokussierlinsen mit einer Brennweite von $f=60\text{mm}$ und einem Durchmesser von 18mm (Best.-Nr.: G322266, Linos Photonics)
 - Wasserimmersionsobjektive (HCX PL APO, 63×, NA= 1.2, Leica¹⁰)
- Konfiguration II (Ölimmersion)
 - Achromatische Einfokussierlinsen mit einer Brennweite von $f=80\text{mm}$ und einem Durchmesser von 18mm (Best.-Nr.: PAC368, Newport)
 - Ölimmersionsobjektive (HCX PL APO, 63×, NA=0.7-1.4, Leica)

Der untere Objektivhalter lenkt dabei den von der Einfokussierlinse kommenden Strahl über einen im Objektivhalter positionierten Spiegel in das Objektiv, während der Objektivhalter des oberen Interferometerarms mit einem *dichroitischen Strahlteiler* (F52-489, AHF Analysentechnik) bestückt ist, der die beiden Anregungswellenlängen von $\lambda_{iII}=488\text{nm}$ und $\lambda_{iII}=568\text{nm}$ zu mehr als 95% reflektiert und die jeweiligen Stokes-Verschobenen Anteile (Emissionslicht) in den Detektionsstrahlengang transmittiert.

Das System Einfokussierlinse ↔ Objektiv bildet dabei einen Kollimator, wodurch der Laserstrahl nach Durchlaufen dieser beiden Komponenten im Objektraum, d.h. zwischen den beiden Objektiven, wieder einer kollimierten Strahlführung folgt und durch Interferenz mit dem kollimierten Strahl des gegenüberliegenden Systems das Stehwellenfeld ausbildet.

⁷München, <http://www.thorlabs.com>

⁸Karlsruhe, <http://www.edmundoptics.com>

⁹Karlsruhe, <http://www.pi.ws>

¹⁰Bensheim, <http://www.leica-microsystems.com>

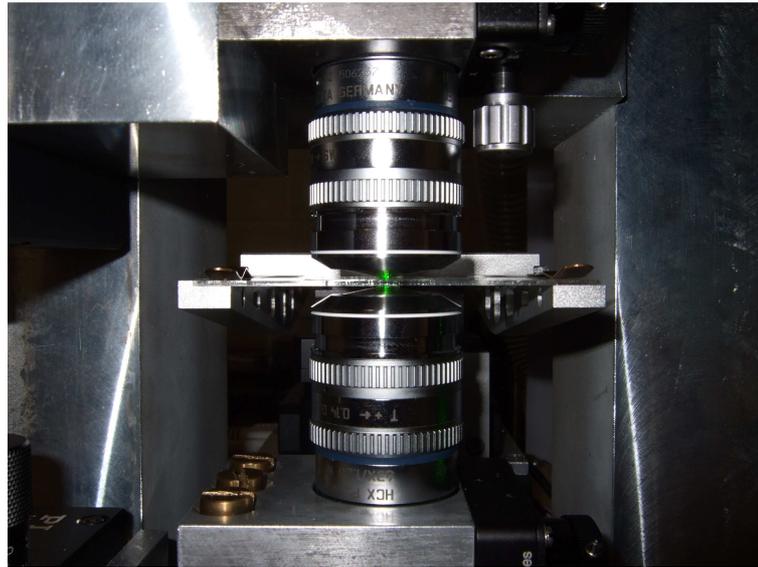


Abbildung 7.2: Foto des Objektraums des Vertico-SMI mit den beiden gegenüberliegenden (Wasserimmersions-) Objektiven und dem dazwischen positionierten Objektträger. Im Hintergrund ist die Objektpositioniereinheit und, in hellem grün zwischen den beiden Objektiven, der durch den Objektträger laufende Laserstrahl mit $\lambda_{ill}=568\text{nm}$ zu erkennen.

Während der Vermessung von Objekten wird zwischen dem Objektträger, der in das Stehwellenfeld zwischen den beiden Objektiven gefahren wird, und den Objektiven Immersionsmedium aufgetropft, um einen Angleich des Brechungsindex zu erreichen. Als Immersionsmedium wird Wasser mit einem Brechungsindex von $n=1,33$ (Wasserimmersionsobjektive) bzw. Öl mit einem Brechungsindex von $n=1,52$ (Ölimmersionsobjektive) verwendet. In Abbildung 7.2 ist der Objektraum mit den beiden gegenüberliegenden Objektiven (hier: Wasserimmersionsobjektive) und einem im Stehwellenfeld positionierten Objektträger dargestellt. Weiterhin ist der Objektträgerhalter sowie ein Teil der Objektpositioniereinheit (siehe Abschnitt 7.2.2) im Hintergrund zu erkennen. Zwischen den beiden Objektiven sieht man in hellem grün den Laserstrahl mit $\lambda_{ill}=568\text{nm}$, der durch den Objektträger läuft. Da das obere Objektiv zur Detektion verwendet wird, gilt der obere Objektivhalter als Referenzpunkt des kompletten Interferometers und kann mittels eines 1-Achsen Linearverstellers (M-126.M0, Physik Instrumente) lediglich in axialer Richtung verschoben werden. Der untere Objektivhalter kann demgegenüber mit Hilfe des gleichen Linearverstellers sowohl in axialer Richtung als auch, mittels zweier zusätzlicher Präzisions-Lineartische (M-106.10, Physik Instrumente), in lateraler Richtung bewegt werden.

Detektionsstrahlengang

Die Detektion des (Vertico-) SMI-Mikroskops folgt einer konventionellen Epifluoreszenz-Weitfeldanordnung: das vom Detektionsobjektiv aufgesammelte Fluoreszenzlicht der Probe wird vom dichroitischen Strahlteiler transmittiert und auf eine Tubuslinse (Best.-Nr.: 11020 515 073 010, $1.0\times$, Brennweite $f=200\text{mm}$, Leica) mit einem Durchmesser von $\sim 35\text{mm}$ gelenkt, welches das Emissionslicht auf den CCD-Chip der 12bit Schwarz-Weiß-Kamera mit 1376×1040 Pixel und einer maximalen Quanteneffizienz von 62% (SensiCam QE, PCO

Imaging¹¹) fokussiert (die genauen Spezifikationen der Kamera sind in Anhang B aufgeführt). Dabei sind das Objektiv und die Tubuslinse spezifisch aufeinander abgestimmt, um sphärische und chromatische Abberationen zu vermeiden, während weiterhin das Tubuslinsensystem auf die verwendete Kamera (genauer: auf die Pixelgröße von $6,45\mu\text{m}^2$ des CCD-Chips) optimiert ist. Da zumindest ein geringer Teil des Anregungslichts vom dichroitischen Strahlteiler transmittiert wird, ist kurz vor dem CCD-Chip ein zusätzlicher *Blocking Filter* (F73-491, AHF Analysetechnik) angebracht, um das Hintergrundsignal auf ein Minimum zu reduzieren.

Für eine optimale Justage und Befestigung der Tubuslinse und des Sperrfilters, sowie um störendes Umgebungslicht auf das Detektionssignal zu vermeiden, ist der komplette Detektionsstrahlengang in einem Röhrensystem angeordnet, das über einen sogenannten *C-Mount* fest mit der Kameraöffnung verbunden ist (siehe Anhang C). Dieses erlaubt zudem eine völlig flexible Positionierung der Tubuslinse relativ zum CCD-Chip der Kamera in axialer Richtung, was insbesondere für das Auffinden des genauen Fokuspunkts sehr hilfreich ist. Weiterhin ist die CCD-Kamera auf einem 3-Achsen Linearverschiebetisch (M-460P-XYZ, Newport) befestigt, um eine optimale Positionierung relativ zur optischen Achse des Interferometers zu gewährleisten (für Details hinsichtlich der optischen Justage des SM-Mikroskops möchte ich auf [4, 73] verweisen).

7.2.2 Objektpositionierung

Wie im vorangegangenen Kapitel 6 ausführlichst erläutert, bilden möglichst hohe Geschwindigkeiten bei der Datennahme eine zentrale Rolle im Hinblick auf die Verwirklichung von in-vivo Messungen, um den Einfluss der Objektmobilität auf das Detektionssignal auf ein Minimum zu reduzieren. Gleichzeitig muss aber gewährleistet sein, dass trotz hoher Datenakquisitionsraten ein Maximum an Stabilität erreicht wird, d.h. maximale Linearität und Positioniergenauigkeit über den kompletten Verfahrbereich. Läge hier z.B. eine Nichtlinearität während der Abtastung vor, würde die vom Auswertalgorithmus angepasste Fitfunktion fehlerhafte Parameter zurückgeben, woraus unzureichend genaue Größenangaben resultieren würden. Abbildung 7.3 zeigt das CAD-Modell der kompletten Objektpositioniereinheit, bestehend aus drei sehr genau verfahrbaren Schrittmotoren für die 3D-Objektpositionierung (M-505.4DG (x-Achse), M-112.1DG (y-Achse) und M-110.1DG (z-Achse), Physik Instrumente) und einem hochpräzisen piezoelektrischen Verschiebetisch für die axiale Objektabtastung (P-621.ZCD, Physik Instrumente). Die Ansteuerung der Schrittmotoren erfolgt computergesteuert über die kommerzielle Software des Herstellers bzw. für die Nanopositioniereinheit über gewöhnliche ASCII-Befehlssequenzen, die mittels eines Moduls in die eigens entwickelte SMI-Python-Steuersoftwareumgebung [7] implementiert sind, da der Piezo direkt mit der (in Python geschriebenen) Datennahmesequenz verknüpft sein muss (eine detaillierte Beschreibung der Ansteuerung findet sich in Anhang B). Die komplette Positioniereinheit ist dabei auf einem massiven Aluminiumblock fixiert, der fest in die Vertico-SMI Basiskonstruktion integriert ist. Desweiteren wurde bei der Konstruktion darauf geachtet, dass bei der Verbindung der einzelnen Verfahrsysteme keine Verkippung des Objektträgers im Objektraum resultiert, also eine absolut horizontale Positionierung möglich ist.

¹¹Kelheim, <http://www.pco.de>

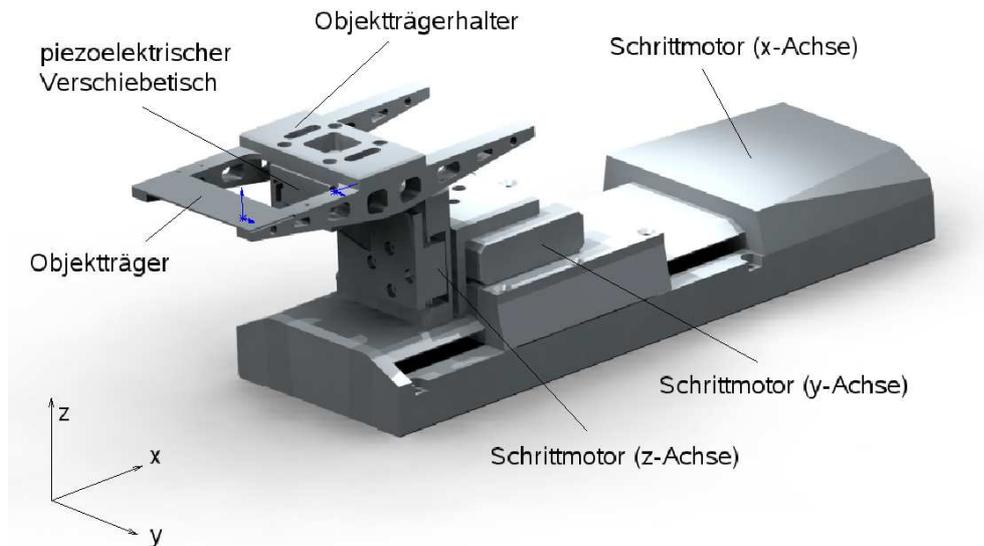


Abbildung 7.3: CAD-Modell der Objektpositionierung: zur 3D-Positionierung stehen drei Schrittmotoren für die jeweiligen Achsen zur Verfügung. Die hochpräzise Nanopositioniereinheit für die axiale Objektabtastung trägt den Objektträgerhalter, dessen Symmetrie von enormer Bedeutung ist, um zusätzliche wirkende Gradienten auf den Piezo während des Abtastvorgangs zu vermeiden.

Schrittmotoren

Das Design des Vertico-SMI ist spezifisch an die Verfahrenswege der Schrittmotoren angepasst um zu gewährleisten, dass prinzipiell jede beliebige Position auf dem Objektträger angefahren werden kann. Weiterhin verfügen die Schrittmotoren über eine vibrationsfreie, absolute Positionstreue: dies ist wichtig, da die Schrittmotoren während des Abtastvorgangs ihre Position auch unter in-vivo Bedingungen, d.h. wenn das Vertico-SMI mit erhöhten Temperaturen von bis zu 37°C betrieben wird, konstant halten müssen.

Die x-Achseneinheit verfügt mit 100mm über den größten Verfahrbereich und erlaubt das Ein- und Ausfahren des Objektträgers in bzw. aus dem Objektraum zwischen den beiden Objektiven. Die minimale Schrittweite des M-505.4DG beträgt 50nm mit einer Auflösung von 17nm. Die y-Achseneinheit (M-112.1DG) erlaubt das Verfahren über einen Bereich von 25mm mit einer minimalen Schrittweite von ebenfalls 50nm und einer Auflösung von bis zu 7nm. Beide Modelle werden über eine 2-Achsen PCI-Karte angesteuert, während der Schrittmotor zur axialen Objektpositionierung, d.h. in der Hauptsache zum Anfahren der Fokusebene, über einen externen Controller betrieben wird. Der M-110.1DG verfügt über einen maximalen Verfahrbereich von 5mm mit einer minimalen Schrittweite von wiederum 50nm und einer Auflösung von 7nm.

Nanopositioniereinheit

Der piezoelektrische Aktuator P-621.ZCD zur axialen Objektabtastung (Verfahren des Objektträgers durch das Stehwellenfeld in z-Richtung) stellt, in Kombination mit der CCD-Kamera, einen zentralen Bestandteil bezüglich einer sehr schnellen Datennahme unter in-vivo Bedingungen dar. Hierfür muss der Piezo auch unter hohen Temperaturen absolut präzise und stabil, d.h. linear verfahren werden können. Ein weiteres kritisches Element

stellt hier der Objektträgerhalter dar, der direkt auf dem Aktuator angebracht ist. Wie in Abbildung 7.3 zu erkennen, ist das Design des Objektträgerhalters so konzipiert, dass dieser zum Einen absolut symmetrisch aufgebaut ist, was das Einwirken zusätzlicher Gradienten auf den Piezo verringert, deren Folge eine ungenaue Positionierung wäre. Zum anderen ist die Konstruktion, zu erkennen an den vielen Hohlräumen des Aluminium-Trägers, mit ungefähr 130g auf ein möglichst geringes Gewicht zur Vermeidung einer Überlastung des Piezos ausgelegt.

Der P-621.ZCD wird über einen externen Controller angesteuert und verfügt über einen maximalen, reibungsfreien Verfahrbereich von $100\mu\text{m}$ im sogenannten *closed-loop* Modus mit einer Linearität von 0,02% und einer (theoretischen) Auflösung von $<1\text{nm}$. Die sehr hohe Genauigkeit wird dabei mittels eines kapazitiven Sensors erreicht, welcher die augenblickliche Distanz zwischen dem Gehäuse (Fixpunkt) und dem sich bewegenden Teil des Piezos misst. Weiterhin reagiert der P-621.ZCD sehr schnell auf Eingabeänderungen und verfügt über ein präzises Einschwingverhalten an der neuen Position.

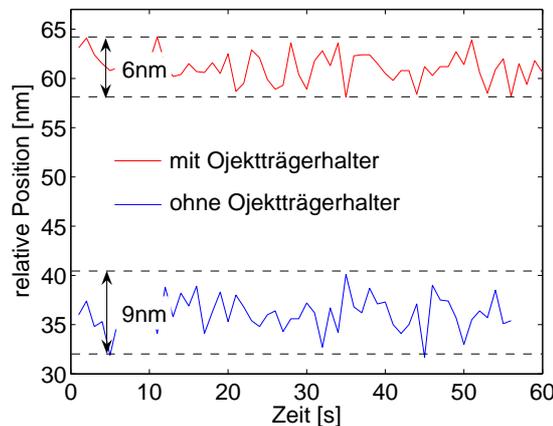


Abbildung 7.4: Stationäre Ortsauflösung des Piezos P-621.ZCD nach der Kalibration auf den Objektträgerhalter: in rot ist der zeitliche Verlauf der relativen Verrückungen unter Belastung, d.h. mit Objektträgerhalter, aufgetragen. Die Auflösung ist in diesem Fall mit $\pm 3\text{nm}$ etwa 30% besser als ohne Gewicht (blaue Kurve).

Für einen optimalen Betrieb des Piezos muss der Controller spezifisch auf das zu tragende Gewicht und dessen Geometrie (Objektträgerhalter) kalibriert sein. Hierfür wurde vom Hersteller eine (Vorab-) Kalibration bereitgestellt, die sich im Verlauf einiger Testmessungen, bei denen mit Hilfe eines Michelson-Interferometers die Stabilität anhand der Interferenzcharakteristik bestimmt wurde, jedoch als völlig unzureichend für den geforderten Einsatz hinsichtlich einer sehr schnellen und stabilen Datenakquisition im *closed-loop* Modus herausstellte. Insbesondere zeigte der Piezo nach der Initialisierung durch den Controller einen Gradienten und zusätzlich noch starke Fluktuationen im Bereich einiger 100nm, woraus eine extreme Nichtlinearität während des Abtastvorgangs resultierte, die bei der Datenanalyse nicht mehr zu berücksichtigen gewesen wäre und völlig falsche Ergebnisse liefern würde. Durch eine Neukalibration des Controllers und einer darauf abgestimmten Modifikation der Ansteuerungssoftware, d.h. der Implementierung von zusätzlichen Korrekturtermen für den Gradienten, den Offset und zur Kompensation der Fluktuationen, die bei jeder Initialisierung des Controllers neu berechnet und an die Piezosteuerung zurück-

gegeben werden, konnte ein extrem stabiler und linearer Betrieb des Piezos mit einem sehr kurzen Einschwingverhalten im Bereich von einigen μs an jeder neu angefahrenen Position erreicht werden. Ein weiterer Vorteil dieser Prozedur liegt in einer nun vorhandenen, relativ einfachen „Realzeit“-Kalibration bei jedem Systemstart, wodurch z.B. mögliche, neue Initialisierungs-Prozeduren bzw. verfeinerte Anpassungen bei verschiedenen Betriebstemperaturen des Vertico-SMI vorgenommen werden können, falls der Piezo temperaturbedingt Schwankungen aufweisen sollte.

In Abbildung 7.4 ist die Ortsauflösung des P-621.ZCD an einer stationären Position nach der Kalibration auf den Objektträgerhalter und der entsprechende Verlauf ohne Belastung dargestellt. Die Ordinate gibt die relative Verrückung in Nanometern an, während auf der Abszisse der zeitliche Verlauf in Sekunden dargestellt ist. Man erkennt hier, dass die Auflösung des Piezos mit $\pm 3\text{nm}$ unter Belastung, d.h. mit Objektträgerhalter, um etwa 30% besser ist als ohne Gewicht.

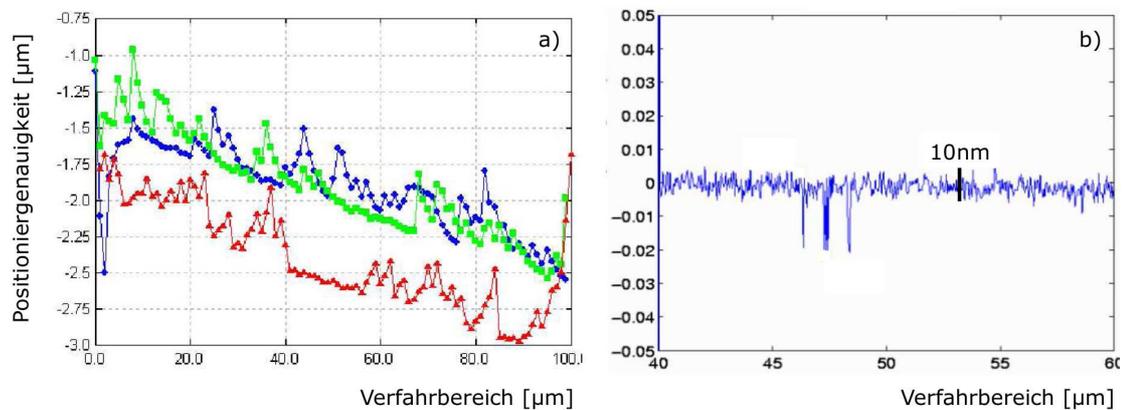


Abbildung 7.5: Die relative Positioniergenauigkeit vor (a) und nach (b) der Kalibration: die Ordinate gibt den relativen Fehler, d.h. die Abweichung des an den Controller übermittelten Soll-Werts vom Ist-Wert der tatsächlich angefahrenen Position an, wobei die drei Kurven im linken Schaubild das Ergebnis aus drei verschiedenen Messvorgängen darstellen. Der spezifische Gradient und die starken Fluktuationen von bis zu 500nm konnten durch die Kalibration beseitigt und eine Positionsauflösung von $\pm 5\text{nm}$ (NB: Skalierung Ordinate) während der Objektabtastung erzielt werden. Die drei Peaks im rechten Schaubild resultieren aus der Initialisierungsprozedur des Piezos durch den Controller und treten nur einmalig beim Systemstart auf.

Viel wichtiger als die stationäre Ortsauflösung ist aber die Genauigkeit während der Abtastung. Hierfür sind in Abbildung 7.5 zwei Kurven gezeigt, die über einen Verfahrbereich von $100\mu\text{m}$ bzw. $60\mu\text{m}$ die relative Positionsauflösung vor (Abbildung 7.5(a)) und nach (Abbildung 7.5(b)) der Kalibration darstellen. Genauer gibt die Ordinate den relativen Fehler bei der Objektabtastung an: der an den Controller ausgegebene Wert (Soll-Position) wurde von der tatsächlich angefahrenen Position (Ist-Wert) subtrahiert und aufgetragen. Die Kurve vor der Kalibration zeigt hier einen ausgeprägten Offset, einen spezifischen Gradienten und starke Fluktuationen über einen Bereich von bis 500nm. Durch die Kalibration (NB: Skalierung Ordinate) konnten sowohl die Gradientenbildung beseitigt als auch die Fluktuationen um eine Größenordnung verringert und eine Auflösung/Positioniergenauigkeit von $\pm 5\text{nm}$ während des Verfahrens erzielt werden (weitergehende Details sind in Anhang B aufgeführt). Aufgrund der so verbesserten Stabilität und Auflösungseigenschaften des Piezos wird gleichzeitig eine sehr schnelle Objektabtastung ermöglicht.

7.2.3 In-vivo Instrumentierung

Zur Untersuchung lebender Zellen müssen diese in eine vernünftige Umgebung integriert sein, welche in der Lage ist, die Apoptose möglichst lange hinauszuzögern. Hierfür wurden eine Inkubator-kammer zur Temperaturregulation und spezielle Observationskammern entwickelt, welche die Zellen mit den notwendigen Nährstoffen versorgen.

Inkubator-kammer

Die Inkubator-kammer wurde zuerst als CAD-Modell konzipiert und auf Basis dieser Vorlagen von einem kommerziellen Hersteller aus Plexiglas hergestellt und mit Anschlüssen für ein Temperaturkontrollsystem versehen (Life Imaging Services¹²). Bei der Konstruktion wurde dabei darauf geachtet, dass das System das Vertico-SMI einerseits komplett umschließt und andererseits modular aufgebaut ist: die Kammer besteht aus einem Vorder- und einem Hinterteil, die unabhängig voneinander entfernt werden können, wodurch z.B. ein sehr leichter Zugang zu den optischen Bauteilen bei Justagearbeiten ermöglicht wird. Desweiteren ist die CCD-Kamera nicht innerhalb der Kammer platziert, um die nötige Wärmeabfuhr des CCD-Chips bzw. dessen Kühlung zu gewährleisten. Sowohl Vorder- als auch Hinterteil der Kammer bilden dabei ein separates Kreislaufsystem. An den jeweiligen Oberseiten erfolgt die Wärmezufuhr, während an den Unterseiten die abgekühlte Luft zurück in das Kontrollsystem geleitet wird. Aufgrund des (kalten) optischen Tisches am Kammerboden, der als natürliche Wärmesenke fungiert, wird durch diese Prozedur die Konvektion auf ein Minimum reduziert. Dennoch wird sich durch die Wärmezufuhr ein Temperaturgradient ausbilden, der das empfindliche Stehwellenfeld in der Fokusebene entscheidend beeinflussen kann. Desweiteren können durch die erhöhte Temperatur die optischen Komponenten, auch aufgrund thermischer Ausdehnung, von ihren Normspezifikationen abweichen. Der Entschluss, das komplette Vertico-SMI in die Inkubator-kammer miteinzubeziehen und folglich den gesamten Aufbau zu erhitzen¹³ resultierte letztlich aus der Überlegung, sämtliche Komponenten den gleichen Bedingungen auszusetzen, da andernfalls zu starke Temperaturgradienten zwischen einzelnen optischen Elementen und z.B. der Aluminiumkonstruktion zu erwarten gewesen wären, welche die optischen Eigenschaften wesentlich stärker beeinflusst hätten.

Abbildung 7.6 zeigt ein Foto des Vertico-SMI mit geschlossener Inkubator-kammer: die beiden oberen Schläuche versorgen die Kammer mit der erwärmten Luft (rote Pfeile), welche, bevor sie in das Innere der Kammer gelangt, mittels Mikrofiltern von Staub befreit wird. Der Luftauslass (blaue Pfeile) befindet sich jeweils an der Unterseite und vervollständigt das Kreislaufsystem. Die Temperaturkontrolleinheit (in der Abbildung nicht dargestellt) erlaubt die Etablierung konstanter Temperaturen bis zu ca. 50°C mit einer Genauigkeit von $\sim 0,1^\circ\text{C}$ am Temperatursensor, der für gewöhnlich direkt neben dem Objektraum positioniert wird. Die vom Sensor gemessene Temperatur (Ist-Wert) wird dabei mit dem am Kontrollsystem eingegebenen Soll-Wert verglichen, welches so lange nachregelt, bis beide Werte übereinstimmen. Zur Ausbildung einer konstanten Temperatur von beispielsweise 37°C muss hierfür etwa zwei Stunden geheizt werden (dies gilt nicht unter Berücksichtigung der Temperaturadaption der Aluminiumkonstruktion, der Objektpositioniersysteme

¹²Reinach, CH, <http://www.lis.ch>

¹³Prinzipiell wäre es auch vorstellbar, nur gewisse Bereiche des Interferometers wie z.B. den Objektraum mit den beiden Objektiven zu erwärmen.

und der optischen Komponenten). Desweiteren besteht die Möglichkeit, das Temperaturkontrollsystem über eine serielle Schnittstelle anzusprechen, wodurch die Implementierung dieser Einheit in die Steuersoftware ermöglicht wird. Dies würde z.B. über einen längeren Zeitraum stattfindende, automatisierte Datennahmesequenzen bei unterschiedlichen Temperaturen erlauben.



Abbildung 7.6: Foto des Vertico-SMI mit geschlossener Inkubatorkammer. Die erwärmte Luft wird über die beiden oberen Schläuche (rote Pfeile) in die Inkubatorkammer gepumpt. Der Luftauslass und Rücktransport zur Temperaturkontrolleinheit erfolgt über die beiden unteren Schläuche (blaue Pfeile), wodurch das Kreislaufsystem vervollständigt wird. Durch diese Anordnung wird die Konvektion auf ein Minimum reduziert. Die CCD-Kamera ist außerhalb der Kammer angebracht, um eine ausreichende Kühlung des CCD-Chips zu gewährleisten.

Observationskammer

Um Zellen möglichst lange am Leben zu erhalten, müssen sie zum Einen den notwendigen Temperaturen ausgesetzt und zum Anderen mit Nährstoffen versorgt werden. Hierfür wurden zwei Observationskammern entwickelt, deren Dimensionen mit Ausnahme der Höhe von 1,5mm denen eines konventionellen Objektträgers mit $26 \times 76 \times 1$ mm (Breite \times Länge \times Höhe) entsprechen, um eine problemlose Positionierung mit dem Objektträgerhalter im Stehwellenfeld des Vertico-SMI zu ermöglichen (siehe Abbildung 7.7).

Die erste, aus Aluminium konstruierte Variante, ist ausschließlich für Kurzzeitmessungen bis zu maximal vier Stunden (bei entsprechendem Temperaturangleich) konzipiert. Die Kammer verfügt über ein Volumen von $\sim 200 \mu\text{l}$ und kann mittels gewöhnlicher Deckgläser von oben und unten versiegelt werden. In der Regel lässt man die zu untersuchenden Zellen direkt am Deckglas anwachsen und versorgt sie während der Messprozedur mit einem sogenannten Puffermedium wie *Hepes*, welches die Zellen einerseits mit Nährstoffen versorgt und andererseits dafür sorgt, dass die Apoptose so lange wie möglich hinausgezögert wird. Durch den Stoffwechsel der Zellen werden, insbesondere unter Abwesenheit von CO_2 , freie Radikale gebildet, die, wenn sie nicht vernünftig abtransportiert werden, sehr schnell zum

Zelltod führen. Das Puffermedium, welches in das Observationsvolumen der Kammer gefüllt wird, ist nun in der Lage, die Wirkung solcher Radikale über einen längeren Zeitraum zu kompensieren und die Zellen am Leben zu erhalten.

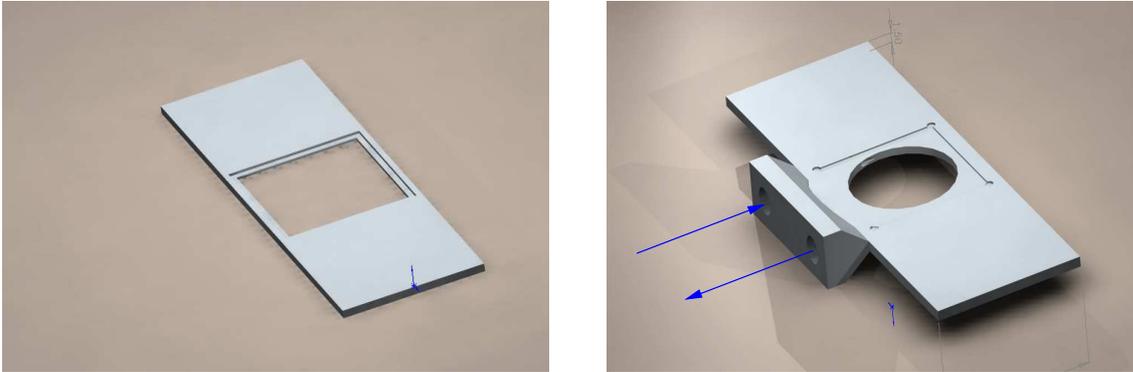


Abbildung 7.7: CAD-Modelle der beiden am Vertico-SMI eingesetzten Observationskammern zur Lebendzelluntersuchung. Das erste Modell verfügt über ein Volumen von $\sim 200\mu\text{l}$ für die Aufnahme von Puffermedium, was für Kurzzeitmessungen bis zu etwa vier Stunden ausreichend ist. Das zweite Modell [54] ermöglicht via zweier Konnektoren für den Anschluss an *Flow-Control* Systeme (Perfusoren) eine kontinuierliche Zugabe von Nährstoffen und den Abtransport von zellulären Abfallprodukten, wodurch Langzeitmessungen ermöglicht werden. Die Kammern können auf der Ober- und Unterseite mit konventionellen Deckgläsern versiegelt werden, wobei die Dimensionen beider Modelle mit Ausnahme der Höhe von 1,5mm denen eines gewöhnlichen Objektträgers entsprechen.

Die zweite Variante der Observationskammern [54] verfügt über zwei Konnektoren für den Anschluss an *Flow-Control* Systeme (Perfusoren), wodurch Langzeitmessungen ermöglicht werden, da in diesem Fall kontinuierlich Nährstoffe in beliebiger Konzentration in das Observationsvolumen gepumpt und gleichzeitig Abfallprodukte der Zellen abtransportiert werden können. Durch dieses System können weiterhin Realzeit-Messungen zellulärer Prozesse realisiert werden, bei denen z.B. während des Messvorgangs im Vertico-SMI unterschiedliche Chemikalien/Medien in die Kammer gepumpt werden, deren Einfluss auf die Zellphysiologie instantan beobachtet werden kann. Die Versiegelung der Kammer erfolgt wie für die erste Variante mit konventionellen Deckgläsern an der Ober- bzw. Unterseite, wobei dieses Modell aus zwei unterschiedlichen Materialien gefertigt ist: zum Einen aus Aluminium und zum Anderen aus einem speziellen Kunststoff, der sehr gute Materialeigenschaften bezüglich der Resistenz gegen Säuren und hoher Temperaturen bis zu etwa 150°C aufweist. Dies ist wichtig, um nach einer biologischen Messreihe die verwendete Kammer vernünftig reinigen und desinfizieren zu können. Desweiteren weist die Kammer eine kreisförmige Geometrie auf, welche einen optimalen Durchfluss des eingepumpten Mediums gewährleistet.

Kapitel 8

Charakterisierung des Vertico-SMI

Nach der Beendigung der Aufbauphase der Vertico-SMI-Basiskonstruktion und sämtlicher Kalibrationsprozeduren, d.h. der vollständigen Eingliederung der Hardwarekomponenten wie CCD-Kamera, Schrittmotoren und piezoelektrischer Aktuatoren inklusive deren Softwareansteuerung, wurden die optischen Elemente zum Aufbau der Lasereinkopplung, des Interferometers und der Detektionseinheit an das Gerät angepasst und der Strahlengang sehr präzise justiert.

In diesem Kapitel werden nun die grundlegendsten Charakterisierungsstudien vorgestellt, womit gezeigt wurde, dass das Vertico-SMI als vollwertiges und absolut vertrauenswürdig arbeitendes Mikroskop betrachtet werden kann. Dies gilt insbesondere auch für die eigentliche Bestimmung des Vertico-SMI im Hinblick auf Lebendzelluntersuchungen, bei denen auch während des Einsatzes der Inkubatorkammer die Gewährleistung zur Evaluierung tatsächlicher Objektgrößen gegeben sein muss. Hierzu wurde das System unter dem Einfluss von verschiedenen Temperaturen getestet und charakterisiert. Den Abschluss des Kapitels bildet dann eine Betrachtung der (momentanen) Leistungsfähigkeit des Vertico-SMI hinsichtlich hoher Datenakquisitionsraten und der Akquirierung von Intensitätsprofilen von nicht-fixierten Kalibrationsobjekten.

8.1 Grundlegende Eigenschaften des Systems

Um vertrauenswürdige Aussagen hinsichtlich der Genauigkeit zur Evaluierung von Objektgrößen zu erhalten, wurden physikalische Referenzobjekte mit dem Vertico-SMI vermessen und die so erhaltenen Ergebnisse in Relation zur tatsächlichen Größe gesetzt (Herstellerangabe). Als Kalibrationsobjekte dienten kommerzielle, fluoreszierende Nanokugeln (Beads) mit Durchmessern von 44-200nm. Genauer handelt es sich bei Beads um Polystyrol-Kügelchen, in die Fluoreszenzfarbstoffe eingebracht sind, welche sehr stabile Fluoreszenzeigenschaften aufweisen und für verschiedenste Anregungswellenlängen erhältlich sind. Die Genauigkeit bei den Größenangaben zu Beads liegt dabei laut Hersteller (Duke Scientific¹) bei etwa 5-15% und mussten bei den Charakterisierungsstudien als Faktum angesehen werden.

Die Beads sind in wässriger Suspension gehalten und wurden zur Präparation für mikroskopische Untersuchungen zuerst mit Ethanol in gewünschter Konzentration verdünnt und anschließend etwa 15 Minuten in ein Ultraschallbad gegeben, um etwaig vorhandene

¹Palo Alto, USA, <http://www.dukescientific.com>

Bead-Cluster aufzulösen, welche das Messergebnis beeinträchtigen würden². Nach dieser Behandlung wurden maximal $3\mu\text{l}$ dieser Lösung auf ein Standarddeckglas mit Dicken von $150\text{-}170\mu\text{m}$ aufgetropft und sehr sorgfältig mit einem zweiten Deckglas verstrichen, um eine möglichst homogene Verteilung zu erreichen. Nach kurzzeitiger Eintrocknungszeit wurden die so präparierten Deckgläser unter Verwendung eines Einbettungsmediums (Glycerol, $n \approx 1,47$) auf einem Standardobjektträger mit Hilfe von gewöhnlichem Nagellack fixiert. Die Verwendung von Glycerol stellt dabei auch unter Verwendung von Wasserimmersionsobjektiven trotz des offensichtlichen Brechungsindexsprungs kein Problem dar, solange die zu untersuchenden Objekte *direkt* am Deckglas angelagert sind.

Zur Verwendung im Vertico-SMI wird der Objektträger am Objektträgerhalter befestigt, mittels der Schrittmotoren zwischen die Objektive in das Stehwellenfeld gefahren und direkt in der Fokusebene des Detektionsobjektivs positioniert. Zwischen Objektträger und Objektiv muss weiterhin noch Immersionsmedium gegeben werden, um einen Angleich der Brechungsindizes zu erreichen, wobei im Falle der Untersuchung mit Wasserimmersionsobjektiven destilliertes Wasser bzw. für Ölimmersionsobjektive Öl verwendet wurde.

Zur eigentlichen Messprozedur wird der Objektträger / das Objekt mit Hilfe des Piezos zur axialen Abtastung wie in Kapitel 4 beschrieben sehr genau durch die Fokusebene des Detektionsobjektivs gefahren, wobei an jeder z-Position mittels der CCD-Kamera die 2-dimensionale Intensitätssignatur der optischen Abbildung gespeichert wird. Typische Abtastraten während der Charakterisierungsphase waren $40\text{-}60\text{nm}$ unter Verwendung von Integrations-, d.h. Belichtungszeiten von $100\text{-}500\text{ms}$. Mit Datenstapeln von $30\text{-}200$ unterschiedlich angefahrenen z-Positionen ergaben sich so durchschnittliche Aufnahmezeiten zwischen 5 und 15 Sekunden pro Objekt (Hochgeschwindigkeitsmessungen zur Ermittlung maximalster DAQ-Raten wurden unter anderen Fragestellungen und damit Voraussetzungen durchgeführt und erzielten, wie in Abschnitt 8.2 gezeigt wird, erheblich geringere Gesamtaufnahmezeiten bis zu $<2\text{s}$).

8.1.1 Kalibration unter Normalbedingungen

Zur Ermittlung erster Systemeigenschaften des Vertico-SMI wurden Charakterisierungen unter Normalbedingungen, d.h. unter Raumtemperatur durchgeführt. Um den kompletten, sensitiven Bereich des Vertico-SMI abzudecken, wurden Beads mit Größen von 44nm , 71nm , 88nm , 100nm , 140nm und 200nm bei einer Anregungswellenlänge von $\lambda_{ill}=488\text{nm}$ sowohl mit Öl- als auch mit Wasserimmersionsobjektiven untersucht. Die gleiche Prozedur erfolgte unter Verwendung von Beads mit Größen von 63nm , 100nm und 200nm für die Anregungswellenlänge $\lambda_{ill}=568\text{nm}$. Bei der Verwendung der Wasserobjektive muss dabei darauf geachtet werden, dass vor der Messung die Deckglaskorrektur spezifisch auf die Dicke des verwendeten Deckglases eingestellt ist. Hierzu wurden die Deckgläser vor der Präparation mit einer Mikrometerschraube vermessen und die Objektive mittels des so erhaltenen Werts von durchschnittlich $\sim 155\mu\text{m}$ durch Verstellung des Rändelrings spezifisch angepasst.

Abbildung 8.1 zeigt die mit den Öl- (grau) bzw. Wasserobjektiven (rot) unter Verwendung der 488nm Anregungswellenlänge evaluierten Objektgrößen als Histogramm im direkten Vergleich. Wie bereits erwähnt, besitzen die nominellen Objektgrößen eine vom Hersteller angegebene Unsicherheit, die mit größer werdender Ausdehnung ansteigt. Unter Berücksichtigung dieser Fehlergrenzen, konnten insgesamt sehr vertrauenswürdige Größenbestim-

²Nichtsdestotrotz sind in den meisten Fällen immer noch einige Cluster vorhanden.

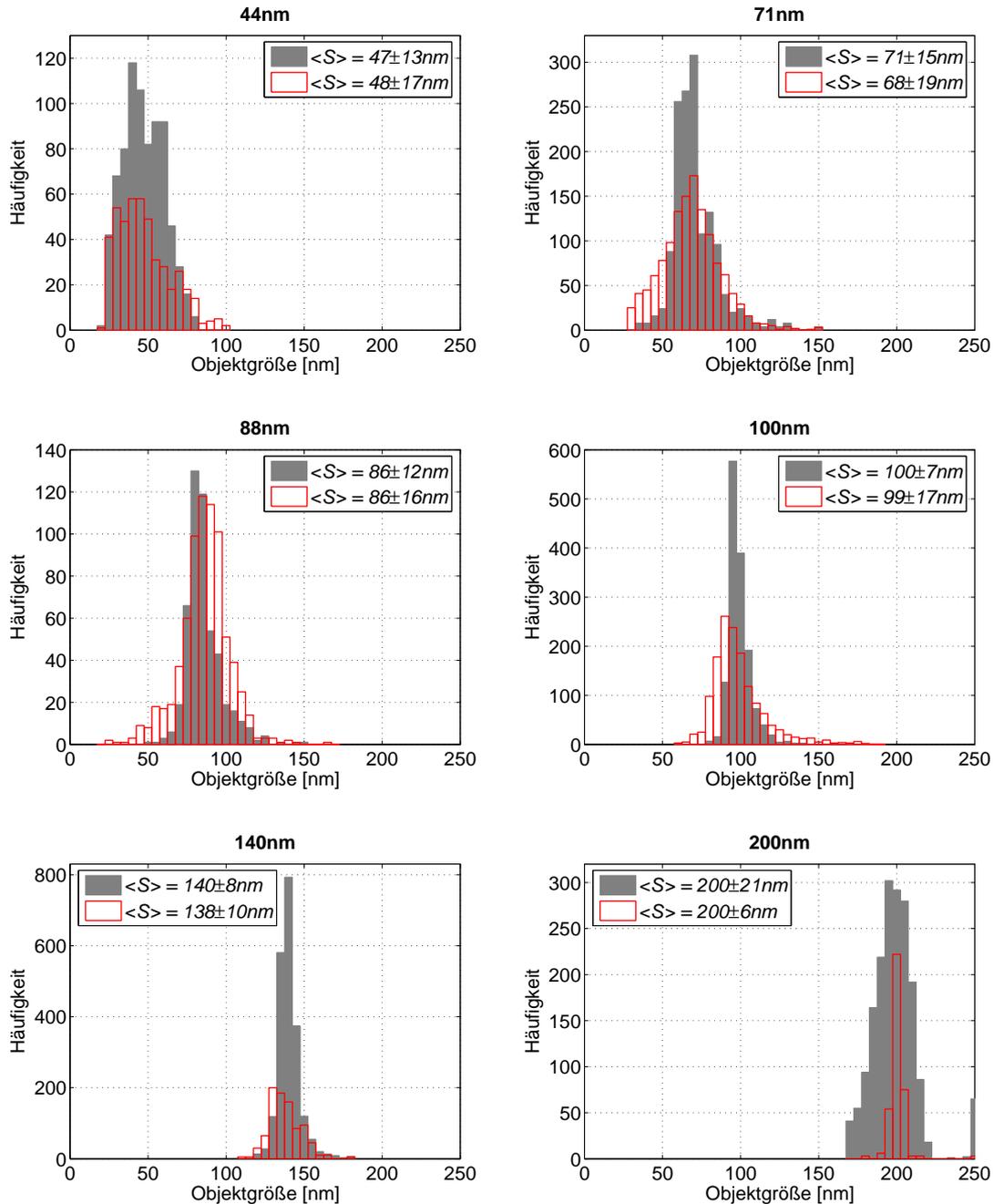


Abbildung 8.1: Histogramme der evaluierten Objektgrößen für vermessene Beads mit nominalen Durchmessern von 44-200nm bei einer Anregungswellenlänge von $\lambda_{ill}=488\text{nm}$. Zum direkten Vergleich sind die Ergebnisse unter Verwendung von Öl- (grau) bzw. Wasserobjektiven (rot) mit den Mittelwerten $\langle S \rangle$ und deren Standardabweichungen σ angegeben.

mungen durchgeführt werden. Allerdings zeigen die Verteilungen in 8.1 einerseits zwar eine gute Übereinstimmung, andererseits aber eine offensichtliche Differenz hinsichtlich der Breite der Kurve bzw. der Standardabweichungen wie in Abbildung 8.2 in einer korrelativen Darstellung unter Miteinbeziehung der Standardabweichungen aufgeführt ist. Die beiden eingezeichneten Parallelen zur Diagonalen beschreiben dabei zur besseren Visualisierung der Größenordnung der Standardabweichungen ein $\pm 10\text{nm}$ Fehlerintervall. Die beiden oberen (unteren) Diagramme zeigen die jeweiligen Größenverteilungen für eine Anregungswellenlänge von $\lambda_{iil}=488\text{nm}$ ($\lambda_{iil}=568\text{nm}$).

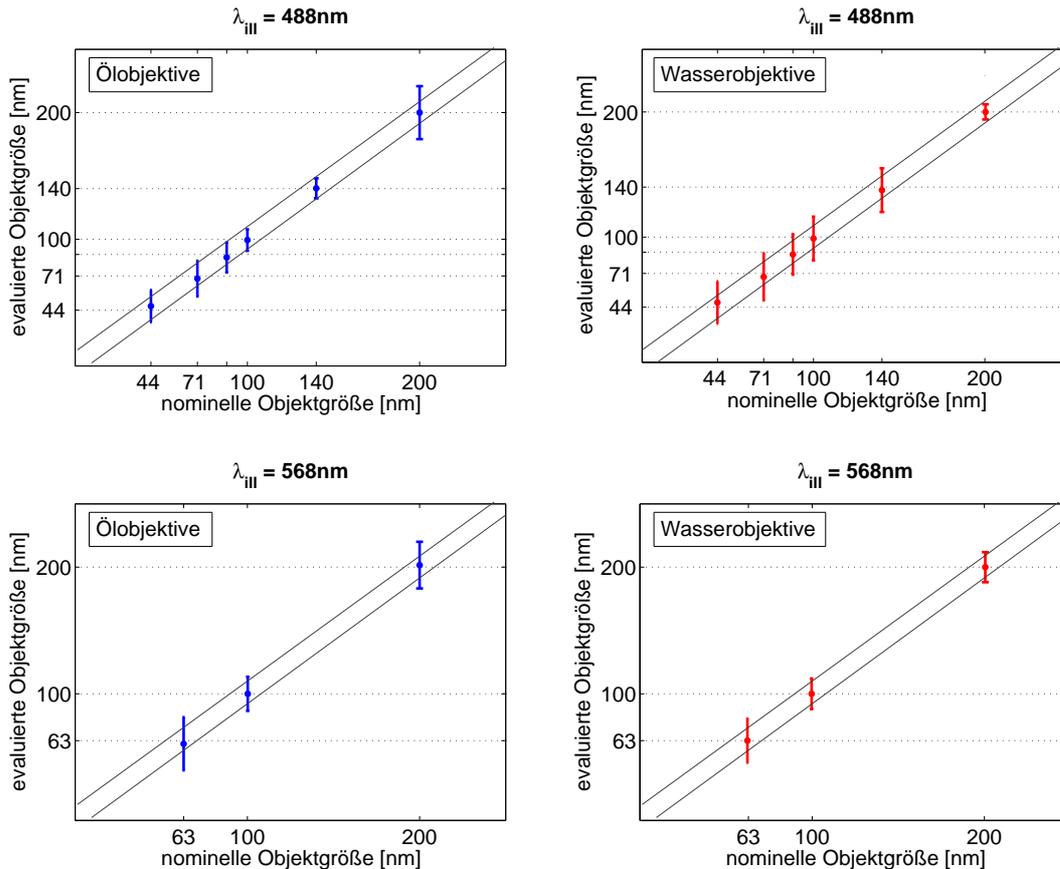


Abbildung 8.2: Korrelative Darstellung der nominellen und evaluierten Objektgrößen unter Miteinbeziehung der Standardabweichungen. Die beiden oberen (unteren) Darstellungen zeigen die Verteilungen unter Verwendung einer Anregungswellenlänge von $\lambda_{iil}=488\text{nm}$ ($\lambda_{iil}=568\text{nm}$). Zur besseren Visualisierung ist ein $\pm 10\text{nm}$ Fehlerintervall parallel zur Diagonalen eingezeichnet.

Die verbreiterte Verteilung bei Wasserobjektiven kann mit deren erheblich schlechteren Sensitivität erklärt werden, was sowohl konstruktionsbedingt auf die Optik als auch auf die erforderliche Verwendung von Wasser als Immersionsmedium zurückzuführen ist. Dieses besitzt eine natürlich gegebene, leichte Eigenfluoreszenz und streut das Anregungs- bzw. Detektionslicht zusätzlich wesentlich stärker im Objektraum als Öl. Ein Sachverhalt, der sich z.B. sehr drastisch in der verwendeten Integrationszeit niederschlägt: bei der Vermessung mit Ölobjectiven konnte die Integrationszeit konstant auf 100ms für sämtliche Beadgrößen gehalten werden, wobei dieser Wert für gut fluoreszierende Objekte prinzipiell auf bis zu 16ms verringert werden kann. Demgegenüber musste die Integrationszeit unter

Verwendung von Wasserobjektiven selbst bei gut fluoreszierenden Objekten, d.h. Beadgrößen $\geq 100\text{nm}$, auf bis zu 500ms erhöht werden, um ein vernünftiges Amplitudenverhältnis zwischen dem Maximum der inneren/äußeren Einhüllenden der Intensitätsverteilung und dem Hintergrund zu generieren. Dieser Sachverhalt erklärt dann auch die etwas schlechteren Standardabweichungen bei der Größenbestimmung unter Verwendung von Wasserobjektiven, da sich hier aufgrund der geringeren Photonenstatistik mit einem hieraus resultierenden stärkeren Einfluss des Hintergrunds das SNR insgesamt, bzw. damit korreliert die Genauigkeit der Parameterbestimmung bei der Größenabschätzung abnimmt. Als Folge ergibt sich hier eine breitere Streuung von evaluierten Größen. In Tabelle 8.1 sind hierfür

Ölobjektive

λ_{ill} [nm]	Nominelle Größe [nm]	Evaluierte Größe [nm] $\langle S \rangle \pm \sigma$	Anzahl Objekte
488	44 ± 7	47 ± 13	778
	71 ± 7	71 ± 15	1452
	88 ± 9	86 ± 12	505
	100 ± 10	100 ± 7	1466
	140 ± 14	140 ± 8	2138
	200 ± 20	200 ± 21	1811
568	63 ± 7	61 ± 21	1671
	100 ± 10	100 ± 13	1562
	200 ± 20	202 ± 18	856

Wasserobjektive

λ_{ill} [nm]	Nominelle Größe [nm]	Evaluierte Größe [nm] $\langle S \rangle \pm \sigma$	Anzahl Objekte
488	44 ± 7	48 ± 17	458
	71 ± 7	68 ± 19	1300
	88 ± 9	86 ± 16	750
	100 ± 10	99 ± 17	1443
	140 ± 14	138 ± 10	900
	200 ± 20	200 ± 6	123
568	63 ± 7	62 ± 17	1198
	100 ± 10	100 ± 12	1240
	200 ± 20	201 ± 12	594

Tabelle 8.1: Gemessene Größen unter Verwendung von Öl- (oben) bzw. Wasserobjektiven (unten) bei Anregungswellenlängen von $\lambda_{ill}=488\text{nm}$ und $\lambda_{ill}=568\text{nm}$. Bei den nominellen Beadgrößen sind zusätzlich noch deren (vom Hersteller angegebenen) Ungenauigkeiten aufgeführt. Bei den evaluierten Größen sind jeweils der Mittelwert $\langle S \rangle$, die Standardabweichung σ und die Anzahl der vermessenen Objekte angegeben.

explizit die evaluierten mittleren Objektgrößen $\langle S \rangle$ mit den Standardabweichungen σ und die Anzahl der vermessenen Objekte für die jeweils verwendete Wellenlänge aufgeführt. Die Breite der Verteilungen respektive die Standardabweichung und damit die Vertrauenswürdigkeit bei der Größenbestimmung ist stark davon abhängig, wie nahe sich die untersuchten

Objektgrößen in den Randbereichen des SMI-sensitiven Bereichs von $\mathbb{I}_{S[SMI]} = \{30\text{nm} < S < 200\text{nm}\}$ befinden (siehe Kapitel 4). D.h., dass der relative Fehler umso größer wird, je kleiner (größer) die Dimension S des betrachteten Objekts ist, wie die vermessenen 44nm und 200nm Beads zeigen. Demgegenüber steigt, mit zunehmender Annäherung der Objektgrößen in den mittleren Bereich des Intervalls $\mathbb{I}_{S[SMI]}$, die Vertrauenswürdigkeit der Größenbestimmung: die Evaluation der 100nm Beads mit Ölobjektiven ergab hier eine mittlere Größe $\langle S \rangle = 100\text{nm}$ mit einer Standardabweichung von $\sigma = \pm 7\text{nm}$ für $\lambda_{ill} = 488\text{nm}$. Im Vergleich zu Kalibrationsmessungen, die am etablierten horizontalen SMI-Mikroskop in den letzten Jahren schon vielfach durchgeführt wurden (siehe z.B. [4, 73]), können die hier aufgeführten Ergebnisse als sehr gutes Resultat angesehen werden, womit gezeigt wurde, dass die grundsätzliche Konstruktion geeignet ist, vertrauenswürdige Daten zu akquirieren. Da das Vertico-SMI allerdings speziell für Lebendzelluntersuchungen und damit für den Einsatz unter erhöhten Temperaturen bis zu 37°C konzipiert ist, muss eine Gewährleistung gegeben werden können, welche diese Vertrauenswürdigkeit auf unterschiedliche Temperaturbereiche erweitert. Hierfür wird in folgendem Abschnitt der Übergang zur Charakterisierung des Vertico-SMI unter dem Einfluss von Wärme auf das Gesamtsystem vorgestellt.

8.1.2 Einfluss von Wärme auf das System

Prinzipiell könnte man intuitiv erwarten, dass sich Größenbestimmungen unter erhöhten Temperaturen negativ auf die Vertrauenswürdigkeit, d.h. unter anderem auf die Breite der Verteilungen auswirken. Dies liegt an vielen nicht vorherzusehenden Parametern wie dem Verhalten der optischen Komponenten, falls aufgrund thermischer Ausdehnung Abweichungen von deren Normalspezifikationen die Folge wären, und insbesondere an der Auswirkung auf das Stehwellenfeld. Hier wäre zu vermuten, dass aufgrund auftretender Temperaturgradienten oder dem Ausbilden von kleineren „Turbulenzen“ im Objektraum, das Wellenfeld zu Instabilitäten neigt, die sich in Fluktuationen äußern und damit die Signalextraktion erheblich beeinflussen könnten. Die optischen Bauteile des Interferometers und des Detektionsstrahlengangs, d.h. Spiegel, Strahlteiler, Filter und Linsen sollten laut Herstellerangaben temperaturstabile Eigenschaften, d.h. ihrer Spezifikation entsprechende Charakteristika aufweisen. Dies gilt gleichermaßen für die Objektpositioniereinheiten (Schrittmotoren und piezoelektrische Aktuatoren).

Die beiden kritischsten Elemente dürften allerdings durch das Objektiv \leftrightarrow Tubuslinsensystem und die CCD-Kamera gegeben sein. Nach Rücksprache mit den Herstellern sollten diese Komponenten ebenfalls keinerlei temperaturbedingte Abweichungen aufweisen. Dennoch könnten sich durch den Einfluss der Wärme z.B. Brechungsindexvariationen im Objektraum, hervorgerufen durch das Immersionsmedium und innerhalb des Präparats, durchaus als störend auf das Ergebnis auswirken. Weiterhin muss eine vernünftige und stabile Kühlung des CCD-Chips bzw. der Kameraelektronik gewährleistet sein, um zusätzliches Elektronenrauschen zu vermeiden. Durch die Verwendung eines komplett geschlossenen Detektionsstrahlengangs in Form eines Röhrensystems, das ideal ist um Umgebungslicht auszublenden, gleichzeitig aber den negativen Effekt einer Art „Kamin“ erfüllt, erhitzt sich gerade dieser Teil der Konstruktion auf bis zu 42°C bei einer Solltemperatur von 37°C im Objektraum, wodurch diese Abwärme direkt auf die Frontabdeckung des CCD-Chips geleitet wird. Dennoch konnte, trotz einer Temperaturerhöhung der Elektronik von standardmäßigen 32°C auf 40°C , eine konstante Kühlung des CCD-Chips auf $-10/-11^\circ\text{C}$ beobachtet werden.

Ebenfalls zu berücksichtigen sind Materialeigenschaften der Aluminiumkonstruktion: durch eine nicht homogene Erwärmung könnten minimalste Ausdehnungseffekte die sehr sensible Interferometercharakteristik beeinflussen. Aus diesem Grund war ursprünglich die Verwendung von *SuperInvar* für die Basiskonstruktion vorgesehen, das einen Wärmeausdehnungskoeffizienten von annähernd Null besitzt. Wie sich im Laufe der Messungen herausstellte, spielt dieser Effekt unter der Voraussetzung, dass ein Gleichgewicht zwischen Umgebungs- und Materialtemperatur vorliegt, keine Rolle mehr.

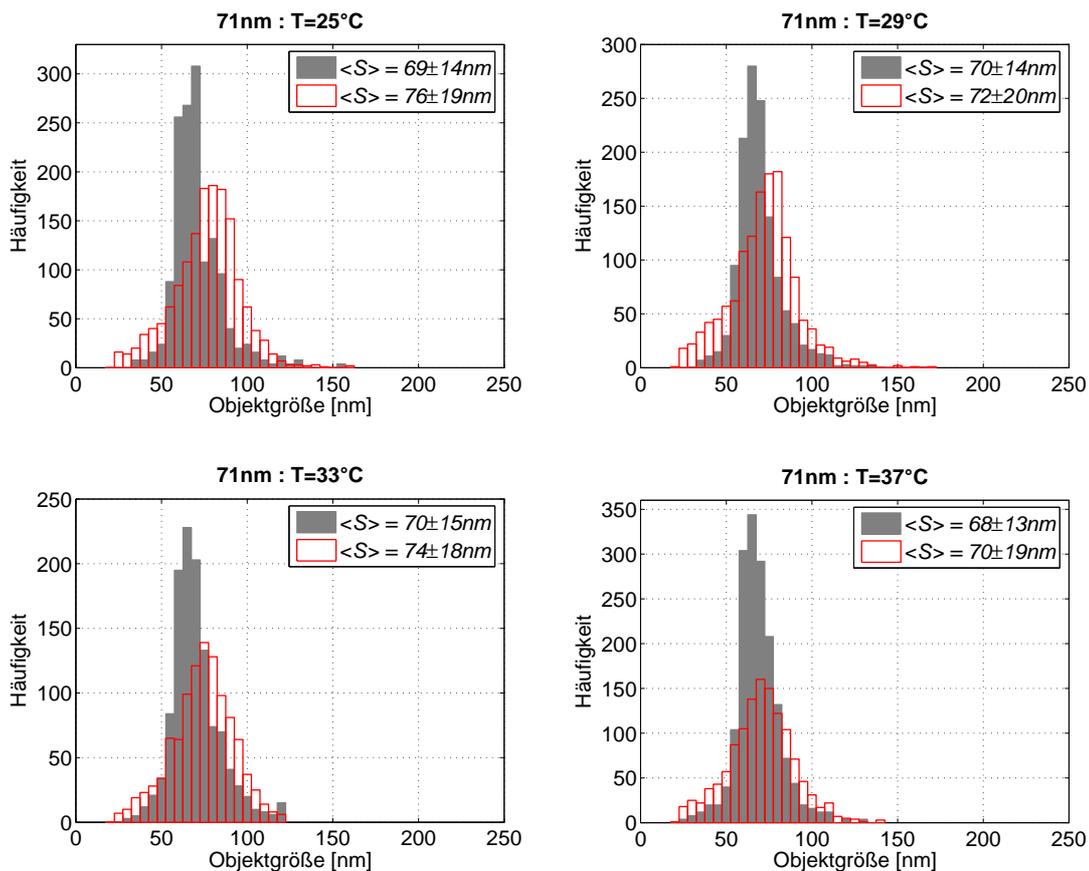


Abbildung 8.3: Histogramme von gemessenen 71nm Beads für eine Anregungswellenlänge von $\lambda_{ill}=488\text{nm}$ unter Verwendung von Öl- (grau) und Wasserobjektiven (rot) bei Temperaturen von 25/29/33/37°C. Die jeweiligen Mittelwerte $\langle S \rangle$ sind mit den zugehörigen Standardabweichungen angegeben.

Demgegenüber ist der Einfluss der Vibrationen durch das Heizgerät, welche über die Zu- und Abluftschläuche auf die Inkubator-kammer und hierdurch auf das Mikroskop übertragen werden, nicht vernachlässigbar und äußert sich in teils starken Fluktuationen des empfindlichen Stehwellenfelds. Der resultierende Fehler bei der Vermessung von 100nm Beads unter solchen Bedingungen lag bei $\sim 30\text{-}40\%$, weshalb die Temperatureinheit bei sämtlichen Untersuchungen für die Dauer der Messung (einige Sekunden) ausgeschaltet wurde.

Kalibration unter Wärmeeinfluss

Zur Charakterisierung des Vertico-SMI unter Wärmeeinfluss wurden Größenmessungen von Beads bei vier unterschiedlichen Temperaturen von 25/29/33/37°C durchgeführt, wobei dem System nach jeder neuen Temperaturerhöhung um 4°C mindestens zwei Stunden Zeit gegeben wurde, um ein thermisches Gleichgewicht zwischen Material und Umgebung auszubilden. Die letzte Temperaturstufe von 37°C wurde somit, unter Berücksichtigung der benötigten Zeit zur Durchführung der einzelnen Messprozeduren, durch schrittweise Erhöhung nach etwa 12 Stunden erreicht. Als Kalibrationsobjekte dienten 71nm, 100nm

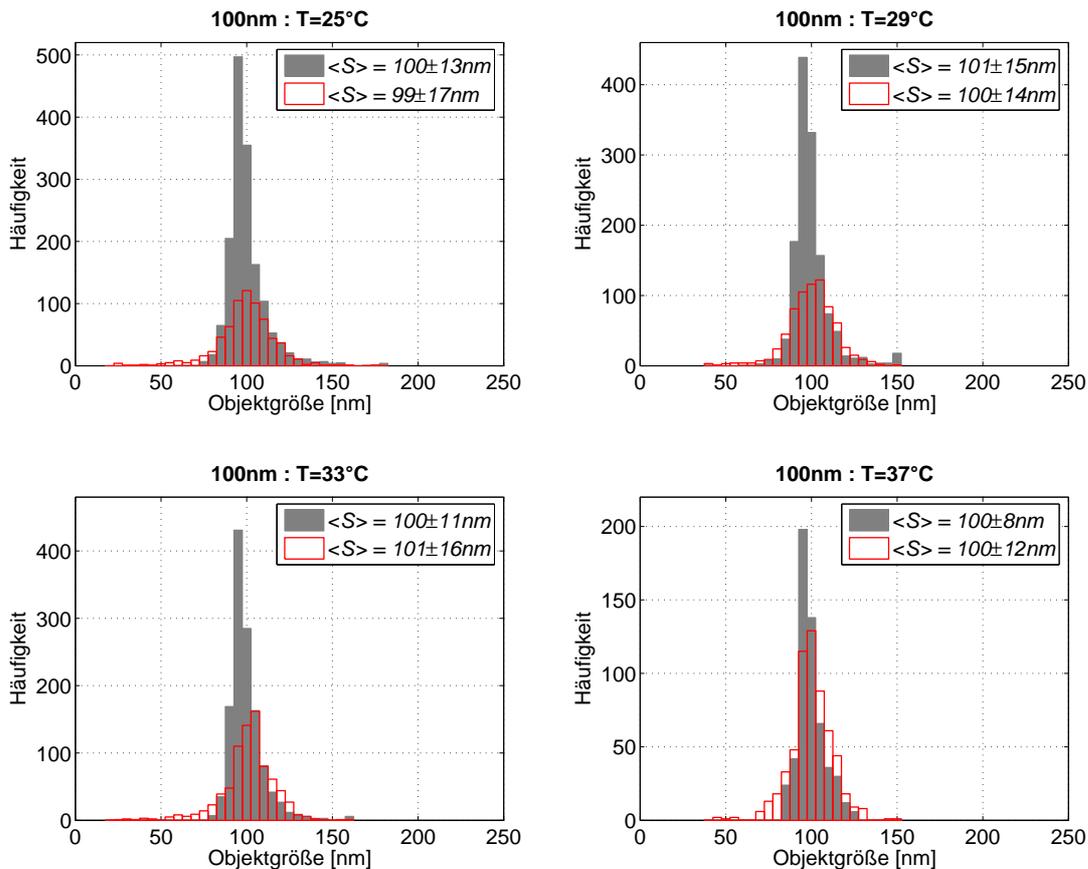


Abbildung 8.4: Histogramme von gemessenen 100nm Beads für eine Anregungswellenlänge von $\lambda_{ill}=488\text{nm}$ unter Verwendung von Öl- (grau) und Wasserobjektiven (rot) bei Temperaturen von 25/29/33/37°C. Die jeweiligen Mittelwerte $\langle S \rangle$ sind mit den zugehörigen Standardabweichungen angegeben.

und 140nm -Objekte bei einer Anregungswellenlänge von $\lambda_{ill}=488\text{nm}$ unter Verwendung von Öl- und Wasserimmersionsobjektiven. Diese Beads bilden aufgrund ihrer Dimension eine repräsentative Auswahl, da, wie im vorherigen Abschnitt gezeigt, zu kleine oder große Objekte eine zu große Unsicherheit bei der Größenbestimmung zeigen, weshalb im Fall der temperaturabhängigen Vermessung nicht mehr vertrauenswürdig zwischen dem „natürlichen“, statistischen Fehler und einem möglichen thermischen Einfluss auf die Signalextraktion unterschieden werden könnte.

Die Abbildungen 8.3 - 8.5 zeigen die Ergebnisse der Messungen für Temperaturen von 25/29/33/37°C unter Verwendung der 488nm Anregungswellenlänge in Form von Histogrammen mit den zugehörigen Mittelwerten $\langle S \rangle$ und Standardabweichungen σ , wobei in grau (rot) wie bisher die erhaltenen Resultate unter Verwendung von Ölobjektiven (Wasserobjektiven) gekennzeichnet sind.

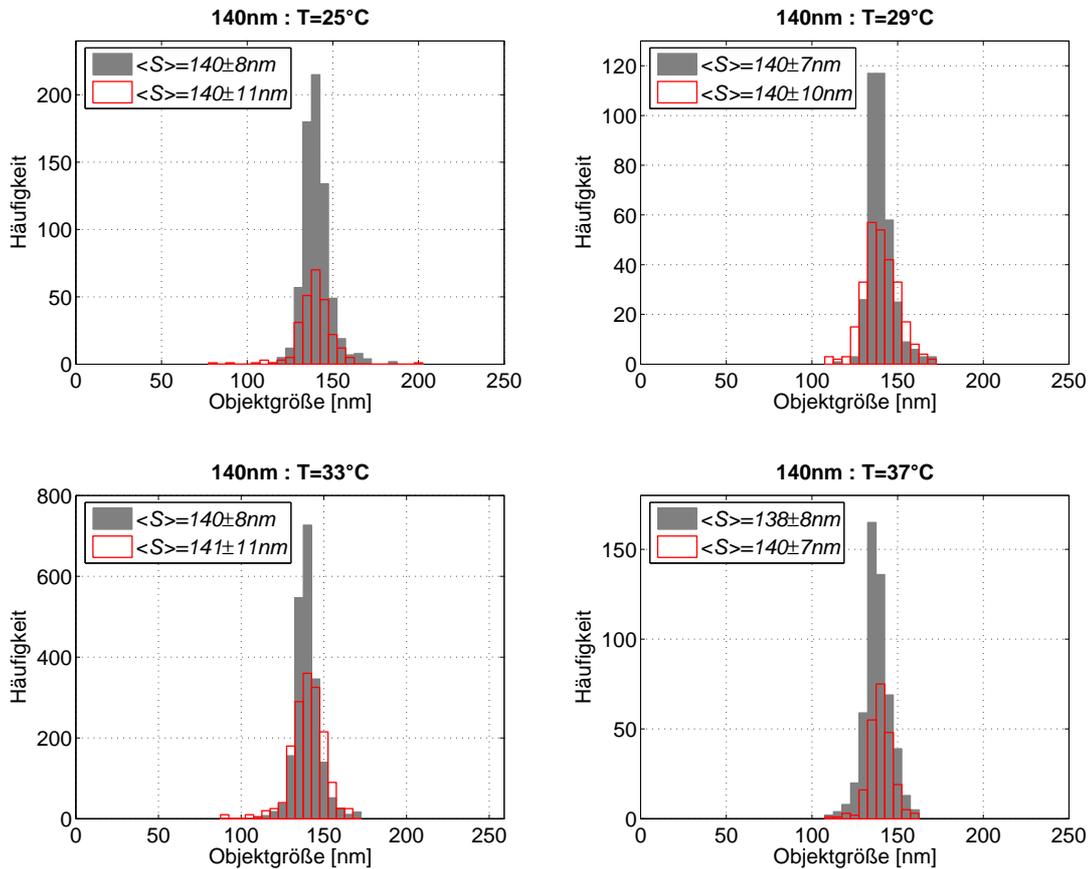


Abbildung 8.5: Histogramme von gemessenen 140nm Beads für eine Anregungswellenlänge von $\lambda_{ill}=488\text{nm}$ unter Verwendung von Öl- (grau) und Wasserobjektiven (rot) bei Temperaturen von 25/29/33/37°C. Die jeweiligen Mittelwerte $\langle S \rangle$ sind mit den zugehörigen Standardabweichungen angegeben.

Aus den Verteilungen der 71nm, 100nm und 140nm Beads lässt sich kein signifikanter Unterschied zu den Kalibrationen unter Normalbedingungen ableiten. Zur genaueren Verifizierung sind hierzu die Ergebnisse im direkten Vergleich mit den evaluierten Größen bei Raumtemperatur (RT) aufgetragen (siehe Abbildung 8.6), wobei zur besseren Visualisierung wiederum ein $\pm 10\text{nm}$ Fehlerintervall eingezeichnet ist, aus dem ersichtlich wird, dass keine thermisch bedingten Unregelmäßigkeiten bei der Größenbestimmung der Objekte zu erkennen sind. Tatsächlich ist z.B., mit $\langle S \rangle = 100 \pm 12\text{nm}$, der erhaltene Wert für die 100nm Beads unter Verwendung von Wasserobjektiven bei 37°C, besser im Vergleich zur evaluierten mittleren Größe bei Raumtemperatur ($\langle S \rangle = 99 \pm 17\text{nm}$). Dies legt den Schluss nahe, dass die beobachteten Schwankungen rein statistischer Natur sind und somit keine temperaturbedingten Einflüsse auf die Evaluierung von Objektgrößen auftreten. Dies konnte auch durch genauere Betrachtungen der Stabilität des Stehwellenfeldes verifiziert

werden, das selbst bei sehr hohen Temperaturen ein absolut stationäres Verhalten zeigte. In Tabelle 8.2 ist hierzu eine detaillierte Auflistung der erhaltenen Messwerte in Abhängigkeit von der Temperatur mit dem direkten Vergleich der unter Raumtemperatur evaluierten Objektgrößen gegeben.

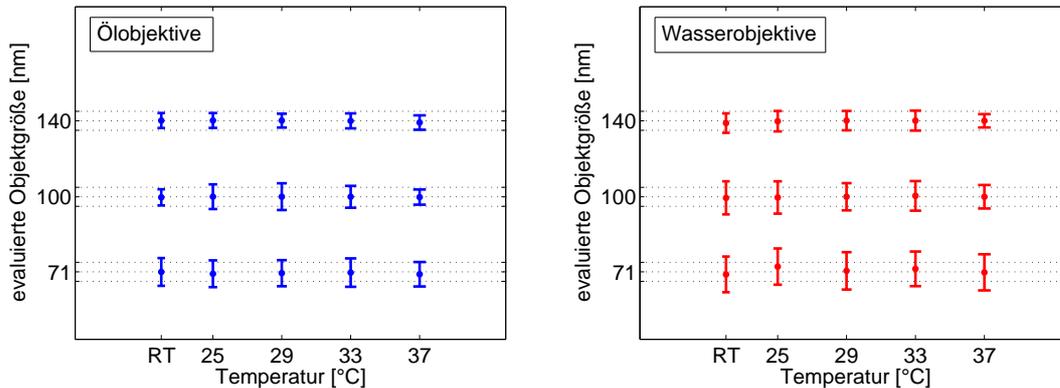


Abbildung 8.6: Evaluierte Objektgrößen mit den zugehörigen Standardabweichungen im Vergleich zur Messung bei Raumtemperatur (RT). Zur besseren Visualisierung sind ± 10 nm Fehlerintervalle eingezeichnet

In Bezug auf die Hardware-Instrumentierung konnten ebenfalls keine signifikanten Abweichungen festgestellt werden: so zeigte der für die Objektabtastung verantwortliche Piezo über den kompletten Versuchszeitraum identische Linearität beim Verfahren im Vergleich zu Normalbedingungen und keinerlei Veränderungen beim Einschwingverhalten. Ein gleichfalls sehr wichtiges Kriterium betrifft eine absolute Positionstreu: insbesondere für zukünftig geplante Langzeitmessungen dürfen die Schrittmotoren diesbezüglich keine Drift aufweisen, was bei den durchgeführten Messungen auch nicht beobachtet werden konnte. Allerdings muss bei der Durchführung von Messprozeduren bei *nicht* konstanten Temperaturen³ auf die thermische Ausdehnung sämtlicher Komponenten des Mikroskops geachtet werden, da in diesem Fall die exakte Fokusposition nicht mehr gehalten werden kann. Der hier beobachtete Effekt liegt bei einigen μm pro 4°C .

Insgesamt wird aus den Ergebnissen aber ersichtlich, dass, unter der Voraussetzung einer vernünftigen Versuchsanordnung, d.h. insbesondere der Etablierung eines adäquaten thermischen Gleichgewichts zwischen der Umgebung, dem Mikroskopaufbau, den optischen Komponenten und den Objektpositioniereinheiten, eine zusätzliche durch thermische Effekte bedingte Unsicherheit nicht gegeben ist. Diese Feststellung ist insofern bedeutsam, da kein weiterer Parameter bei der Datenakquisition und -analyse berücksichtigt werden muss. Die Anzahl der zusätzlichen Freiheitsgrade bei in-vivo SMI-Untersuchungen resultiert also lediglich aus Objektmobilität bedingten Unsicherheiten. Um diesen Einfluss auf die Signalextraktion genauer definieren zu können, werden in Abschnitt 8.3 nicht-fixierte Kalibrationsobjekte untersucht.

³So wäre es z.B. vorstellbar, dass bestimmte Messprozeduren eine automatisierte, schrittweise Erhöhung der Temperatur erfordern.

Ölobjektive

Temperatur [°C]	Nominelle Größe [nm]	Evaluierte Größe [nm] $\langle S \rangle \pm \sigma$	Anzahl Objekte
RT	71 ± 7	71 ± 15	1452
	100 ± 10	100 ± 7	1466
	140 ± 14	140 ± 8	2138
25	71 ± 7	69 ± 14	1948
	100 ± 10	100 ± 13	1579
	140 ± 14	140 ± 8	693
29	71 ± 7	70 ± 14	1295
	100 ± 10	101 ± 15	1355
	140 ± 14	140 ± 7	368
33	71 ± 7	70 ± 15	1190
	100 ± 10	100 ± 11	1281
	140 ± 14	140 ± 8	2090
37	71 ± 7	68 ± 13	418
	100 ± 10	100 ± 8	492
	140 ± 14	138 ± 8	520

Wasserobjektive

Temperatur [°C]	Nominelle Größe [nm]	Evaluierte Größe [nm] $\langle S \rangle \pm \sigma$	Anzahl Objekte
RT	71 ± 7	68 ± 19	1300
	100 ± 10	99 ± 17	1443
	140 ± 14	138 ± 10	900
25	71 ± 7	76 ± 19	1516
	100 ± 10	99 ± 17	709
	140 ± 14	140 ± 11	255
29	71 ± 7	72 ± 20	1394
	100 ± 10	100 ± 14	732
	140 ± 14	140 ± 10	273
33	71 ± 7	74 ± 18	1070
	100 ± 10	101 ± 16	805
	140 ± 14	141 ± 11	324
37	71 ± 7	70 ± 19	1277
	100 ± 10	100 ± 12	597
	140 ± 14	140 ± 7	228

Tabelle 8.2: Die evaluierten Objektgrößen von 71nm, 100nm und 140nm Beads bei Temperaturen von 25/29/33/37°C unter Verwendung von Öl- und Wasserobjektiven. Zum Vergleich sind die jeweiligen Ergebnisse aus den Messungen bei Raumtemperatur (RT) aufgeführt. Angegeben sind die Mittelwerte $\langle S \rangle$ mit den Standardabweichungen σ und die Anzahl der vermessenen Objekte.

8.2 Leistungsvermögen

Im vorangegangenen Kapitel wurde das System Objektabtastung \leftrightarrow CCD-Kamera als ein zentraler Teil hinsichtlich einer schnellen Datenakquisition bezeichnet. Tatsächlich könnte die Abtastung des Objekts mittels des Piezos trotz einer zusätzlich in die Steuersoftware eingefügten zeitlichen Verzögerung im μs -Bereich zwischen einzelnen, anzufahrenden Positionen zur Vermeidung von Nichtlinearitäten, theoretisch auf bis zu 50 Bilder pro Sekunde (fps) gesteigert werden. Dieser Wert kann aufgrund der technischen Spezifikationen der CCD-Kamera mit experimentell realisierbaren maximalen 20fps ⁴ in realiter nicht erreicht werden, weshalb diese auf den ersten Blick als der begrenzende Faktor für hohe Datenakquisitionsraten erscheint. Wie sich im Verlauf der Kalibrationsmessungen allerdings gezeigt hat, spielt das erreichbare SNR bei immer kleiner werdenden Integrationszeiten letztendlich die entscheidendste Rolle, wodurch hohe Anforderungen an die verwendete Sonde gestellt werden müssen. Kalibrationsobjekte wie Beads besitzen sehr stabile Fluoreszenzeigenschaften und liefern eine sehr gute Photonenstatistik. Demgegenüber wird bei realen, biologischen Messungen nicht nur das Fluoreszenzsignal der Sonde, sondern vielmehr das Hintergrundsignal, gegeben durch intrazelluläre Eigenfluoreszenz, Nebenbindungstellen usw. einen hohen Einfluss auf die DAQ-Rate haben. Von sehr großer Bedeutung werden hier zukünftig die größtenteils immer noch in der Entwicklungsphase befindlichen *Quantum Dots* zur Markierung subnuklearer Komplexe sein, die sehr hohe Quantenausbeute mit der geforderten Stabilität verbinden. Desweiteren verfügen diese Marker über unterschiedlichste spektrale Spezifikationen, wodurch z.B. unter Anregung mit einer spezifischen Wellenlänge verschiedene Emissionslinien detektiert werden können.

8.2.1 Hochgeschwindigkeits-DAQ

Um die Geschwindigkeit bei der Abtastung eines Objekts zu maximieren, wird jeweils nur eine Zelle gezielt vermessen, d.h. das Gesichtsfeld der Kamera auf genau diesen Bereich von üblicherweise $\sim 15 \times 15 \mu\text{m}^2$ verkleinert. Die Definition einer solchen *Region of Interest (ROI)* ermöglicht eine schnellere Aufnahme durch den CCD-Chip, da dieser zeilen- und spaltenweise aufgebaut ist und die Information der einzelnen Pixel Zeile für Zeile in den Speicher übertragen wird, wodurch sich eine Proportionalität zwischen der Aufnahmezeit und der Anzahl der verwendeten Zeilen, also der Größe der ROI ergibt. Für Standarduntersuchungen liegen die maximalen Datenakquisitionsraten am Vertico-SMI unter vernünftigen Bedingungen bezüglich des Fluoreszenzsignals bei etwa 5-10 Sekunden für einen kompletten 3D-Datenstapel bei einer Anregungsintensität von 50-200mW und einer axialen Schrittweite von 40nm. Durch eine Erhöhung der Laserleistung $I_{[Laser]}$ und einer Vergrößerung der Schrittweite auf 60nm/80nm, sollte dieser Wert prinzipiell auf unter zwei Sekunden verringert werden können. Im Vergleich zu anderen höchstauflösenden Mikroskopiesystemen wie dem 4Pi-Mikroskop ist dieser Wert auch unter dem Einsatz neuester, sogenannter *Multilinsen-Arrays* zur simultanen Abtastung verschiedener Objektbereiche in der lateralen Ebene um bis zu drei Größenordnungen besser. Diese hohen Geschwindigkeiten bei der Datennahme erlauben weiterhin die Evaluierung sehr guter Statistiken, wodurch der relative Fehler bei der Analyse biologischer Objekte verkleinert werden kann.

⁴CCD-Kameras mit Bildraten von bis zu 500fps sind zwar kommerziell erhältlich, erfüllen aber nicht die vom SMI-Mikroskop gestellten Anforderungen nach einer genügend hohen Quanteneffizienz und geringem Elektronenrauschen.

Um nun das tatsächliche Leistungsvermögen des Vertico-SMI hinsichtlich der maximal möglichen DAQ-Rate zu testen, wurden grün fluoreszierende 100nm Beads in einer Konzentration präpariert, die einerseits eine vertrauenswürdige Größendiskriminierung zulassen, d.h. nicht zu dicht aneinandergelagert sind, andererseits aber dennoch eine genügend hohe Statistik liefern, um allgemein gültige Aussagen treffen zu können. Aus der Kontrollsoft-

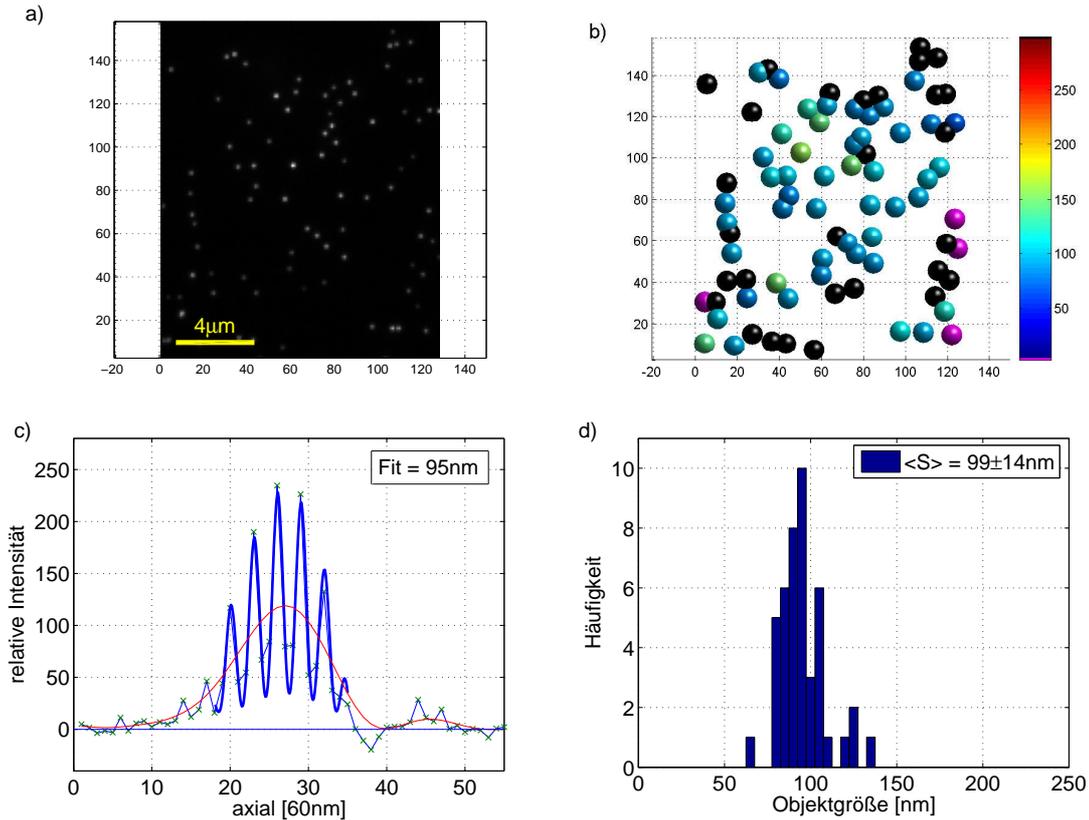


Abbildung 8.7: Hochgeschwindigkeits-DAQ am Vertico-SMI, bei welcher die Objekte in 1,8s abgetastet wurden: die Abbildungen (a) und (b) zeigen die Rohdaten bzw. die automatisch detektierten Objekte. Ein Beispiel einer AID ist in (c) gegeben, wodurch ersichtlich wird, dass selbst unter solch hohen DAQ-Raten ein absolut symmetrisches Intensitätsprofil extrahiert werden kann. Insgesamt wurden 40 Objekte mit einer resultierenden mittleren Objektgröße von $\langle S \rangle = 99 \pm 14 \text{ nm}$ erfolgreich gefittet (d), was die Vertrauenswürdigkeit der Vermessung verifiziert.

ware zur Ansteuerung des piezoelektrischen Aktuators wurden weiterhin sämtliche Verzögerungen auf ihre jeweiligen minimalsten Werte eingestellt, die gleichzeitig aber noch eine vertrauenswürdige Abtastcharakteristik gewährleisten. Hieraus resultierte eine Begrenzung der Abtastrate $v_{[Abtast]}$ des Piezos, die nur noch von der Geschwindigkeit der CCD-Kamera abhängig ist, d.h. der maximal möglichen Bildfrequenz $\text{fps}_{[Kamera]}$ bzw. damit korreliert dem Fluoreszenzsignal der Probe $I_{[Sonde]}$. In erster Näherung kann auf Grundlage der Relation (6.2) also folgende modifizierte maximale Datenakquisitionsrates

$$\text{DAQ-Rate}_{[Vertico]} \propto \text{fps}_{[Kamera]} - \frac{1}{\text{QE} \cdot I_{[Laser]} \cdot I_{[Sonde]}} \quad (8.1)$$

am Vertico-SMI angegeben werden. Im Vergleich zu (6.2) ist diese (augenblickliche) Rate nicht mehr abhängig von der Abtastrate des Piezos, da dieser Parameter wie schon erläutert unterhalb seiner theoretischen Limitierung liegt.

Für die Vermessung mit Ölimmersionsobjektiven wurde die Laserintensität der 488nm Anregungswellenlänge auf 250mW erhöht und die ROI des CCD-Chips auf eine zellkerntypische Größe von $\sim 18 \times 15 \mu\text{m}^2$ eingestellt. Das Fluoreszenzsignal der Beads war hinreichend gut, um die Integrationszeit der Kamera auf den (fast)⁵ kleinstmöglichen Wert von 16ms einzustellen, während die Objekte zur Abtastung mit 60nm Schritten durch den Fokus des Detektionsobjektivs bewegt wurden. Abbildung 8.7 zeigt das Ergebnis einer solchen Hochgeschwindigkeits-DAQ mit der Darstellung des Rohdatensatzes (a), den automatisch detektierten Objekten in einer farbkodierten Darstellung (b), einem Beispiel einer AID (c) und dem Histogramm der Größenverteilungen der evaluierten Objektgrößen (d). Mit den oben aufgeführten Einstellungen konnte die Akquirierung der 3D Objektsignaturen auf 1,8s entsprechend etwa 15fps reduziert werden. In Abbildung 8.7(b) sind diejenigen Objekte, die ein ungenügend hohes SNR aufweisen in schwarz dargestellt, während das Beispiel der AID in Abbildung 8.7(c) zeigt, dass selbst unter solch hohen DAQ-Raten ein absolut symmetrisches Profil ohne eine zusätzliche Ausbildung von Diskontinuitäten extrahiert wurde, wie durch ein unzureichend genaues Einschwingverhalten des Piezos zumindest vorstellbar gewesen wäre. Die evaluierten mittleren Objektgrößen $\langle S \rangle = 99 \pm 14 \text{nm}$ für 40 erfolgreich gefittete Beads zeigen weiterhin eine auch unter diesen Bedingungen vertrauensvolle Datenakquisition und damit Größenbestimmung.

8.3 Datenakquisition nicht-fixierter Objekte

Nachdem in den vorherigen Kapiteln 5 und 6 ausführlich auf die Eigendynamik, daraus resultierender Auswirkungen auf das Intensitätsprofil und der hieraus folgenden Notwendigkeit einer sehr schnellen Datenakquisition (DAQ-Rate) eingegangen wurde, werden im Folgenden erste Untersuchungen zur DAQ nicht-fixierter Objekte vorgestellt, um das Verhalten des Vertico-SMI unter solchen Bedingungen zu charakterisieren. Allerdings muss hier angemerkt werden, dass die hier aufgezeigten Ergebnisse keine repräsentative Studie zum allgemeinen Verhalten unter in-vivo Bedingungen im biologischen Sinn darstellen. Die zur Untersuchung verwendeten Kalibrationsobjekte zeigen einerseits eine sehr starke Eigendynamik, d.h. betragsmäßig hohe Diffusionsparameter $D \geq 200 \text{nm}^2/\text{s}$, die nicht direkt mit einem DNA-Verbund zu vergleichen sind. Andererseits verhalten sich die Bewegungsmuster der Beads durch die rein „makroskopische“ Dynamik bzw. Diffusion sehr einfach in ihrem Geschwindigkeitsprofil. Ein differenziertes Bewegungsprofil von makromolekularen Verbänden mit seinen komplexen Überlagerungen aus vibratorischen und diffusorischen Anteilen kann damit nicht wiedergegeben werden, weshalb diesbezüglich keine Aussage getroffen werden kann. Die Auswirkungen solcher Mobilitäten auf die AID müssen direkt am vitalen biologischen System gemessen werden (siehe Kapitel 9). Allerdings können mittels dieser Studien zumindest prinzipielle Aussagen über den Einfluss der Objektmobilität gegeben werden.

⁵Die kleinstmögliche Integrationszeit der Kamera liegt bei 1ms (nähere Angaben zu den technischen Spezifikationen der CCD-Kamera finden sich in Anhang B).

8.3.1 Objektabtastung und Zeitreihen

Zur Durchführung der hier vorgestellten Kalibrierungsstudien wurden grün fluoreszierende Beads mit einem Durchmesser von nominal 100nm verwendet, die mittels der schon beschriebenen Verfahren verdünnt, jedoch nicht auf einem Objektträger bzw. Deckglas aufgebracht wurden, um eine Antrocknung und damit Fixierung zu vermeiden. Um ein einigermaßen realistisches Szenario hinsichtlich der Viskosität des Mediums, in welchem die Beads frei beweglich eingebracht wurden, und damit des Geschwindigkeitsprofils zu erhalten, wurde keine wässrige Lösung als Trägermedium verwendet. Da das intrazelluläre bzw. intranukleare Medium in erster Näherung einer wässrigen Lösung entspricht und eine Viskosität von etwa $\eta_{Nukleus} \approx 2,4 \text{ mPa}\cdot\text{s}$ ⁶ [66] besitzt, erscheint diese Wahl auf den ersten Blick als nicht geeignet für den Vergleich mit intranuklearer Diffusion. Allerdings dürfte intuitiv klar sein bzw. haben vielfältige Studien bereits gezeigt [xx], dass sich die Diffusionsparameter von DNA-Verbänden nicht durch komplett freie Bewegungen innerhalb einer wässrigen Lösung beschreiben lassen. Vielmehr wirken dort zusätzliche Zwangskräfte *durch* den Verbund, die einer zu starken Mobilität entgegenwirken, weshalb das tatsächliche Geschwindigkeitsprofil eines makromolekularen Komplexes (als Teil eines größeren Biopolymers) weit unterhalb dem eines in wässriger Lösung gehaltenen, *freien* Teilchens definiert ist. Aus diesem Grund wurde als Trägermedium Glycerol gewählt, welches aufgrund seiner hohen Viskosität von $\eta_{Glycerol} = 1480 \text{ mPa}\cdot\text{s}$ zumindest teilweise die eingeschränkte Bewegungsfreiheit, wie sie für DNA-Verbände zum Tragen kommt, wiedergeben kann. Zur Präparation für die Observierung im Vertico-SMI kamen dabei zwei unterschiedliche Methoden zum Einsatz:

- Einbringen von $\sim 5 \mu\text{l}$ einer Ethanol-Bead Lösung in einen Tropfen des Trägermediums, Aufbringen des Mediums auf einen Standardobjektträger und herkömmliche Fixierung mit Deckglas und Nagellack wie in Abschnitt 8.1 beschrieben.
- Einspritzen von $\sim 200 \mu\text{l}$ einer Ethanol-Bead-Trägermedium Lösung in eine mit Deckgläsern verschlossene Observationskammer.

Bis auf die Tatsache, dass unter Verwendung der Observationskammer mehr Observationsvolumen zur Verfügung stand, ergaben sich hinsichtlich der akquirierten Daten keine signifikanten Unterschiede bei den Ergebnissen, weshalb im Folgenden die verwendete Untersuchungsmethode nicht mehr explizit aufgeführt wird.

Allgemein konnten Intensitätsprofile mit einer vernünftigen Modulations-Symmetrie (Vgl. Kapitel 6) extrahiert werden, sofern das Signal zu Rausch Verhältnis der betrachteten Objekte gut genug war, um Integrationszeiten der CCD-Kamera von $\leq 30 \text{ ms}$ und damit DAQ-Raten unterhalb 3s zu ermöglichen. In diesem Fall war der Einfluss der $\pm z$ -Verrückungen auf das Detektionssignal im zeitlichen Mittel sehr gering. Gleiches gilt für laterale Bewegungsmuster, die, falls zu stark ausgeprägt, zu Fehlinterpretationen führten.

Objekte mit $D \leq 100 \text{ nm}^2/\text{s}$: Um Bewegungsprofile zu erhalten, die sehr geringe diffusorische Anteile tragen, wurde die Konzentration an Ethanol bei der Präparation sehr gering gehalten. Aus den resultierenden Geschwindigkeitsprofilen ließen sich dann qualitativ Diffusionsparameter zu $D \leq 100 \text{ nm}^2/\text{s}$ für sämtliche Objekte im Beobachtungsvolumen abschätzen. Abbildung 8.8(a) zeigt ein typisches Beispiel der AID eines nicht-fixierten 100nm Be-

⁶Die hier angegebenen Werte gelten für Raumtemperatur.

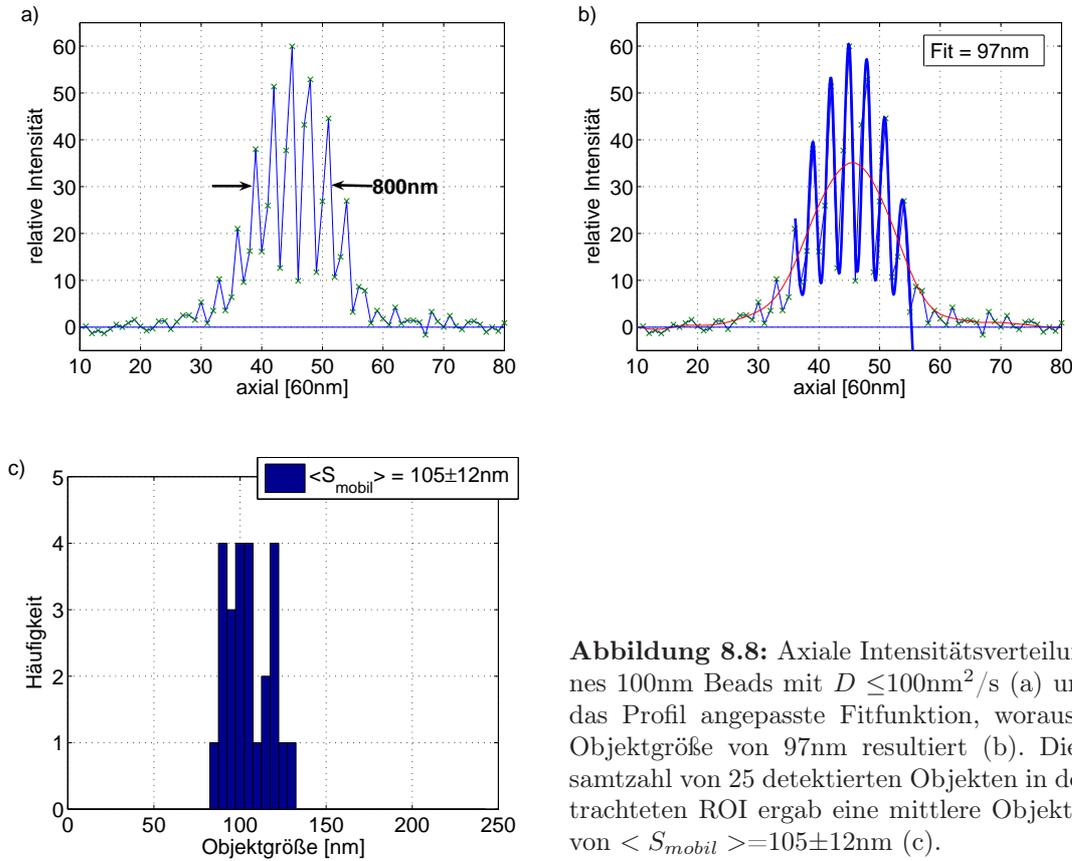


Abbildung 8.8: Axiale Intensitätsverteilung eines 100nm Beads mit $D \leq 100 \text{ nm}^2/\text{s}$ (a) und an das Profil angepasste Fitfunktion, woraus eine Objektgröße von 97nm resultiert (b). Die Gesamtzahl von 25 detektierten Objekten in der betrachteten ROI ergab eine mittlere Objektgröße von $\langle S_{mobil} \rangle = 105 \pm 12 \text{ nm}$ (c).

ads, aufgenommen bei einer Anregungswellenlänge von $\lambda_{ill} = 488 \text{ nm}$ unter Verwendung von Ölimmersionsobjektiven. Mit einer Integrationszeit von 30ms und einer axialen Abtastrate von 60nm wurde das komplette Objekt in etwa 2,5s abgetastet. Obwohl kleinere Unstetigkeiten zu erkennen sind, zeigt dieses Beispiel eine ausgeprägte Modulations-Symmetrie. Ein weiterer Hinweis auf eine vernünftige Abtastprozedur wird ersichtlich aus der Halbwertsbreite, die mit $\text{FWHM} \approx 800 \text{ nm}$ zwar etwas zu groß ist, in etwa aber dem zu erwartenden Wert entspricht. Die automatisch angepasste Fitfunktion evaluiert für diese AID eine Objektgröße von 97nm (siehe Abbildung 8.8(b)), wobei für die Gesamtzahl von 25 detektierten Objekten in der betrachteten ROI eine mittlere Objektgröße von $\langle S_{mobil} \rangle = 105 \pm 12 \text{ nm}$ resultiert (siehe Abbildung 8.8(c)). Der Mittelwert liegt hier also nur marginal über dem nominellen Wert.

Objekte mit $D \geq 200 \text{ nm}^2/\text{s}$: Durch eine Erhöhung der Ethanol-Konzentration bei der Präparation erhöhte sich die Mobilität der frei beweglichen Beads erheblich. Die unter diesen Bedingungen akquirierten Profile zeigen, unter Verwendung der gleichen DAQ-Einstellungen wie zuvor, viel stärkere Schwankungen des Intensitätssignals, die in einer zwar immer noch deutlich erkennbaren Modulations-Symmetrie resultieren, aber eine im Mittel geringere Modulationstiefe aufweisen. Abbildung 8.9(a) zeigt das Beispiel der AID eines Beads mit einer FWHM von 720nm: die Breiten der Wellenfronten korrespondieren in diesem Fall aufgrund schneller Objektbewegungen in axialer Richtung zumeist nicht mehr vernünftig mit denen des Stehwellenfeldes. Außerdem ist ein Sprung im Modulations-Profil zu erkennen, woraus eine asymmetrisch geglättete AID $I_{smooth}(z)$ resultiert (siehe Abbil-

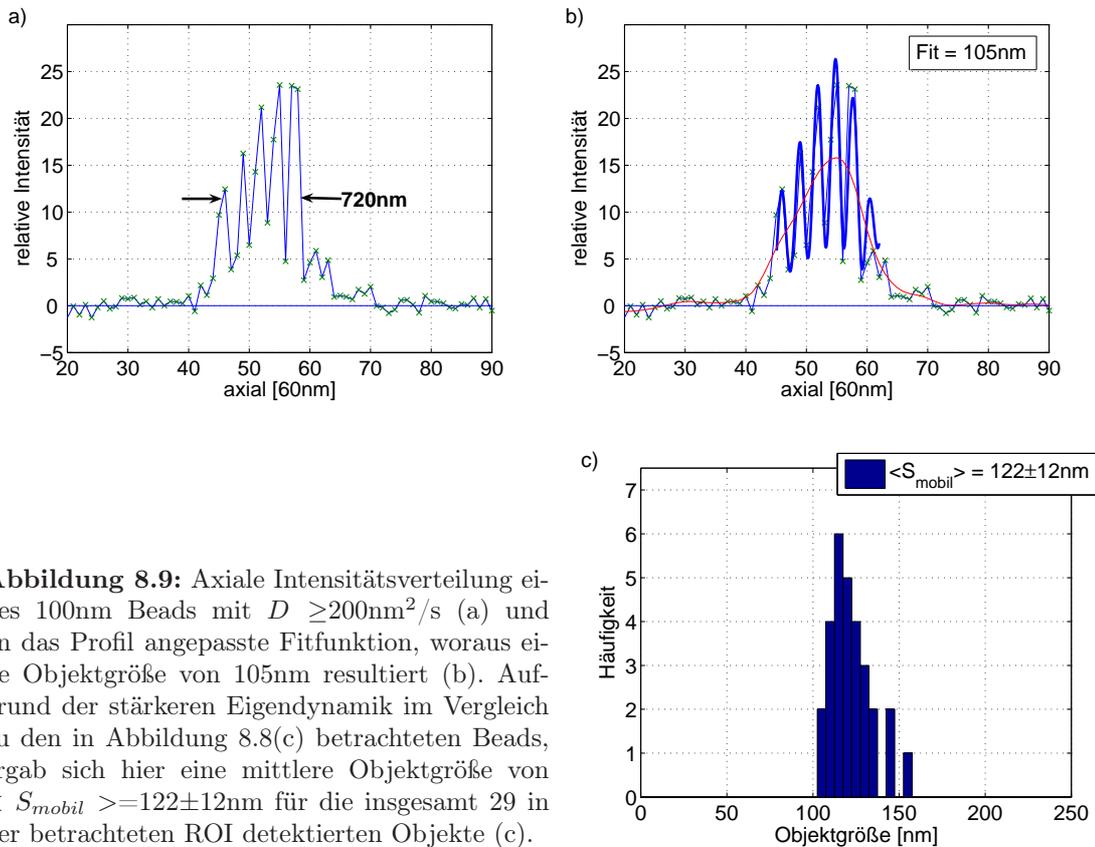


Abbildung 8.9: Axiale Intensitätsverteilung eines 100nm Beads mit $D \geq 200 \text{ nm}^2/\text{s}$ (a) und an das Profil angepasste Fitfunktion, woraus eine Objektgröße von 105nm resultiert (b). Aufgrund der stärkeren Eigendynamik im Vergleich zu den in Abbildung 8.8(c) betrachteten Beads, ergab sich hier eine mittlere Objektgröße von $\langle S_{\text{mobil}} \rangle = 122 \pm 12 \text{ nm}$ für die insgesamt 29 in der betrachteten ROI detektierten Objekte (c).

Abbildung 8.9(b)). Die automatisch angepasste Fit-Funktion liefert hier zwar einen im Vergleich zur nominellen Objektgröße sehr guten Wert von 105nm; nichtsdestotrotz korrespondiert die Modulationstiefe für die Mehrzahl der 29 detektierten Objekte aber nicht mit der nominellen Objektgröße, sondern zeigt einen niedrigeren Kontrast, der sich in einem zu großen mittleren Wert von $\langle S_{\text{mobil}} \rangle = 122 \pm 12 \text{ nm}$ niederschlägt (siehe Abbildung 8.9(c)). Aufgrund der größeren Beweglichkeit der Objekte resultiert eine Verschmierung während der Abbildung mit der Folge, dass die Objekte im Mittel zu groß erscheinen.

Auswirkungen unterschiedlicher DAQ-Raten

Das gleiche Präparat, welches die zuvor aufgeführten Resultate lieferte, wurde weiterhin verwendet, um einen direkten Vergleich zwischen akquirierten Intensitätsverteilungen unter Verwendung unterschiedlicher DAQ-Raten zu erhalten. Für die gleiche ROI wurden Datenstapel aufgenommen, bei welchen in einem Fall, mit der zuvor verwendeten Integrationszeit von 30ms und einer Schrittweite von 60nm, wiederum eine durchschnittliche DAQ-Zeit von $\sim 2,5 \text{ s}$ pro Objekt resultierte. Im anderen Fall führte eine Integrationszeit von 100ms und eine Schrittweite von 40nm zu einer durchschnittlichen DAQ-Zeit von $\sim 5 \text{ s}$ pro Objekt. Die hieraus extrahierten, axialen Intensitätsverteilungen zeigen sehr differenzierte Ausprägungen hinsichtlich der Modulation-Symmetrie und in der FWHM. In Tabelle 8.3 sind hierfür repräsentativ vier Beispielprofile, jeweils ohne und mit durchgeführtem Fit, aufgeführt, die sehr deutlich zeigen, wie aus einer unzureichend hohen DAQ-Rate erhebliche Unterschiede bezüglich des Informationsgehalts resultieren. Während die Objektsignaturen

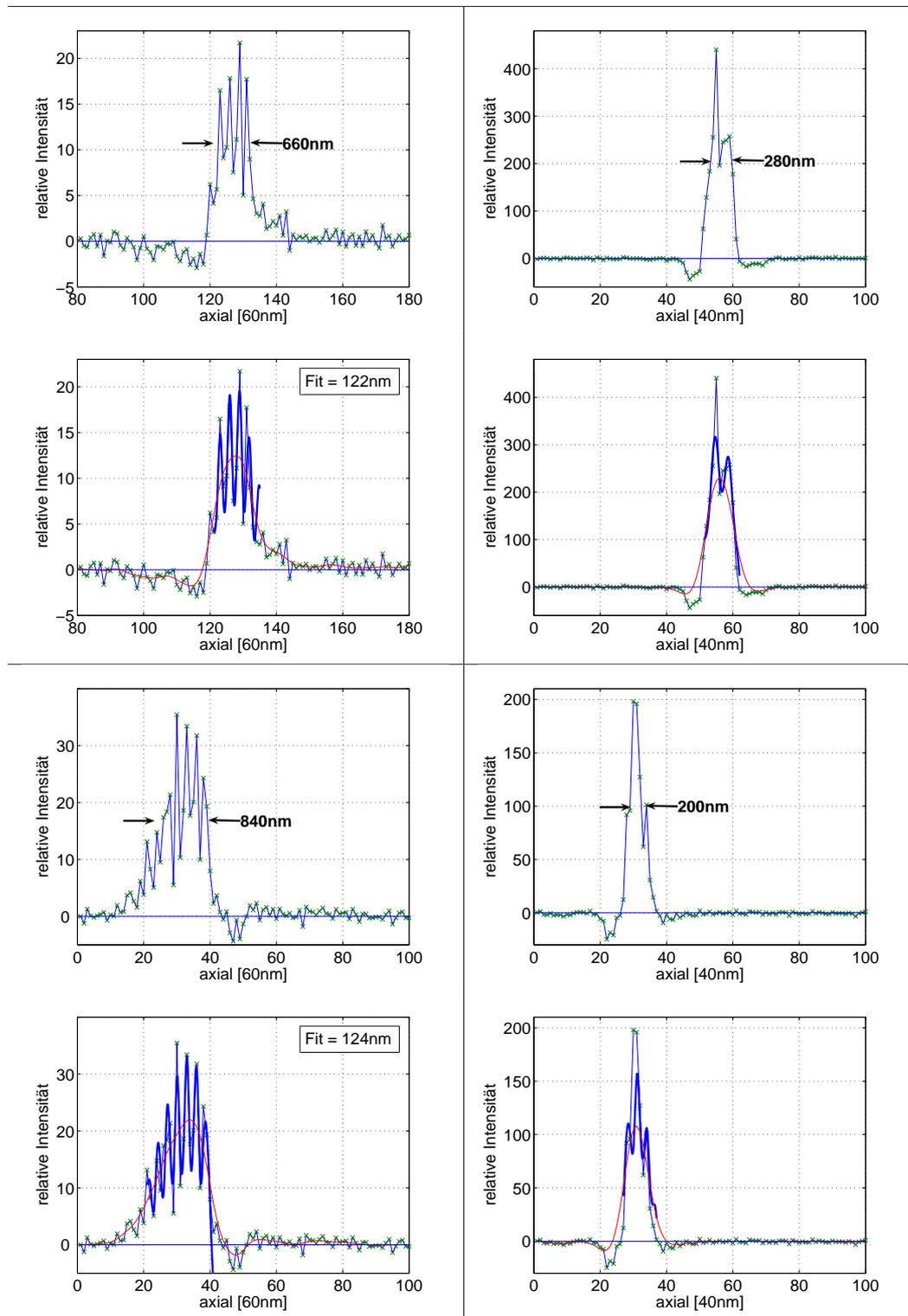
DAQ-Zeit pro Objekt: $\sim 2,5s$ DAQ-Zeit pro Objekt: $\sim 5s$ 

Tabelle 8.3: Zur Auswirkung unterschiedlicher DAQ-Raten auf die axiale Intensitätsverteilung (nähere Erläuterungen siehe Text).

bei einer sehr schnellen Abtastung eine ausgeprägte Modulations-Symmetrie mit gefitteten Größen von 122nm bzw. 124nm, korrespondierend zu oben aufgeführtem Wert von $\langle S_{mobil} \rangle = 122 \pm 12 \text{nm}$, und eine verhältnismäßige FWHM mit $\sim 660 \text{nm}$ bzw. $\sim 840 \text{nm}$ aufweisen, sind die Profile unter Anwendung einer sehr langsamen Abtastprozedur stark deformiert. Eine Modulations-Struktur ist nur schwer zu erkennen und die mit $\sim 280 \text{nm}$ bzw. $\sim 200 \text{nm}$ sehr schmalen Breiten bei halber Höhe des Maximums deuten auf eine erhebliche Bewegung der Objekte entgegen der Abtastrichtung hin, deren Auswirkung aufgrund der geringen DAQ-Zeit detektiert wurde.

Objekt mit stark ausgeprägten Fluktuationen in drei Dimensionen

Um die Auswirkungen eines sich sehr schnell bewegenden Objekts explizit darzustellen, ist in Abbildung 8.11 (nächste Seite) in einer invertierten Darstellung zur besseren Visualisierung, die Bildsequenz für das laterale Bewegungsprofil eines 100nm Beads beim Durchfahren des Fokus mit einer axialen Abtastrate von 40nm gezeigt. Mit einer Integrationszeit von 16ms resultierte daraus, unter Berücksichtigung der Breite des Gesamtprofils, eine effektive DAQ-Zeit von etwa 1s, woraus sich $\sim 60 \text{ms}$ zwischen den einzelnen Bildfolgen ergeben. Im Vergleich zu der in Abschnitt 8.2 vorgestellten Hochgeschwindigkeits-DAQ, bei der für fixierte Objekte eine maximale DAQ-Rate von 1,8s erzielt werden konnte, ist dieser Wert offensichtlich viel zu gut. Der Grund hierfür liegt in einer sehr schnellen Be-

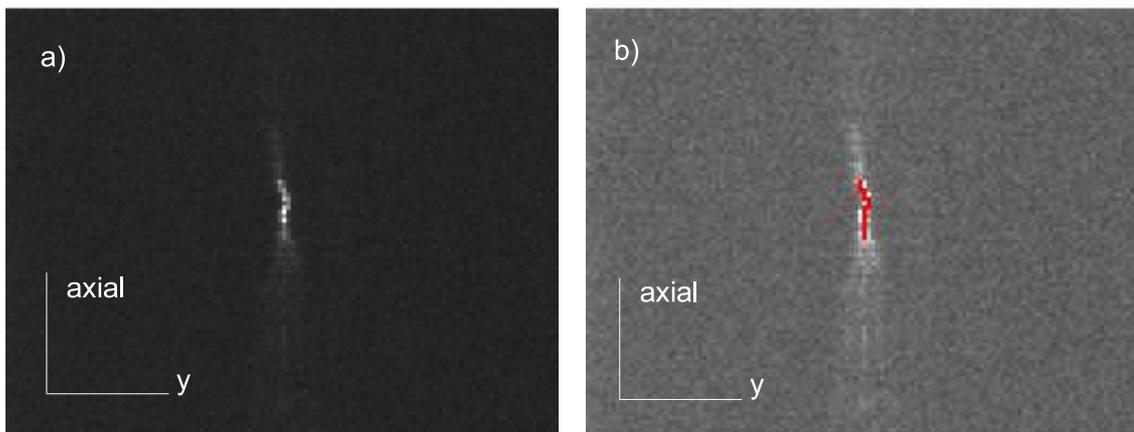


Abbildung 8.10: Darstellung der y-z-Projektion des 100nm Beads (Rohdaten, (a)) und nachbearbeitet mit dem Verlauf der maximalen Intensitäten (rot, (b)). Man erkennt eine erhebliche Stauchung des Gesamtprofils entlang der optischen Achse und sehr schnelle Fluktuationen in y-Richtung.

wegung des Beads entgegen der Abtastrichtung, woraus eine sehr schmale, effektive Breite des Profils mit $\text{FWHM} \approx 300 \text{nm}$ resultiert. Dies ist ebenfalls in der starken Stauchung des Gesamtprofils der y-z-Projektionen in Abbildung 8.10 zu erkennen. Der in Abbildung 8.10(b) in rot dargestellte Verlauf der maximalen Intensitäten zeigt eine erhebliche Stauchung entlang der optischen Achse und sehr schnelle Fluktuationen in y-Richtung. Eine Modulations-Symmetrie ist hier nur sehr schwer zu identifizieren, was sich auch in der

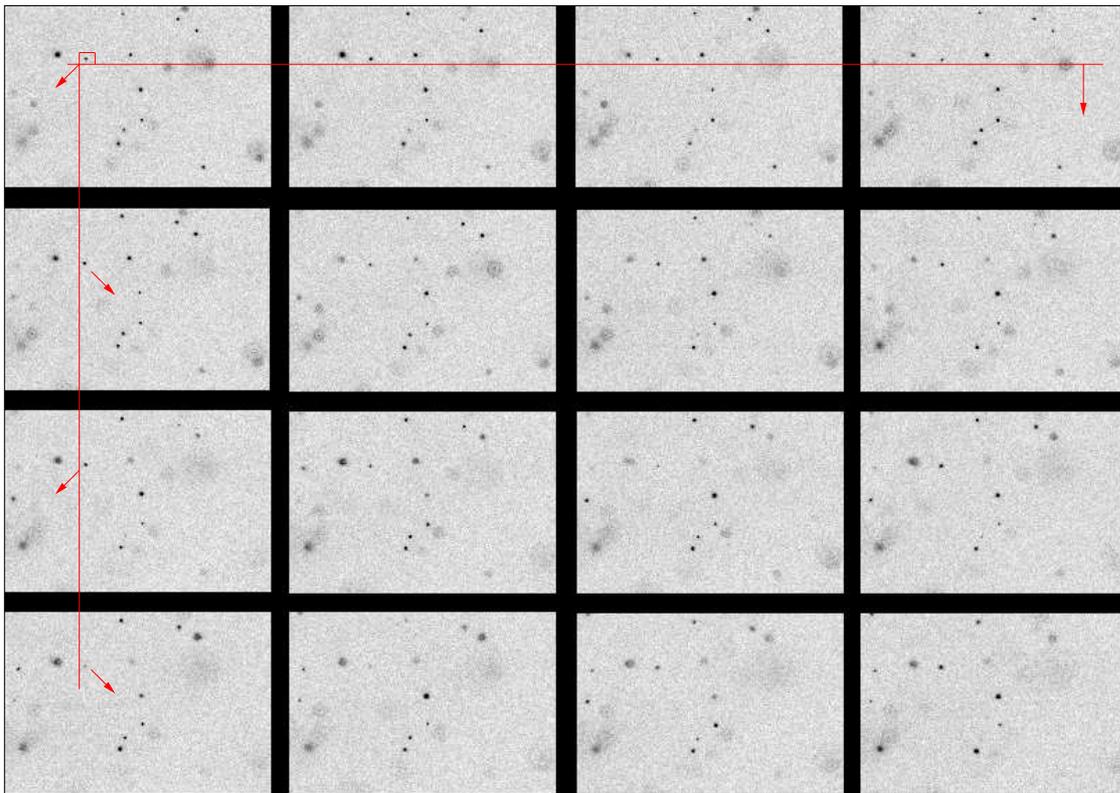


Abbildung 8.11: Laterales Bewegungsprofil eines sich sehr schnell bewegenden 100nm Beads beim Durchfahren des Fokus mit einer axialen Abtastrate von 40nm (invertierte Darstellung zur besseren Visualisierung). Unter Berücksichtigung der verwendeten Integrationszeit von 16ms ergeben sich daraus ~ 60 ms zwischen den einzelnen Bildfolgen.

axialen Intensitätsverteilung, dargestellt in Abbildung 8.12(a), niederschlägt. Aufgrund der sehr schnellen Bewegung des Beads, ergeben sich starke Intensitätsschwankungen innerhalb weniger angefahrener z-Positionen. Die automatisch angepasste Fitfunktion (Abbildung 8.12(b)) erkennt zwar den prinzipiellen Verlauf der Modulation, welche durch das Wellenfeld gegeben ist, kann aber, aufgrund der zu großen Sprünge zwischen den einzelnen Intensitätswerten, lediglich eine Anpassungsfunktion ausgeben, die einem mittleren Verlauf des kompletten Intensitätsmusters entspricht. Zu hohe bzw. geringe Intensitäten

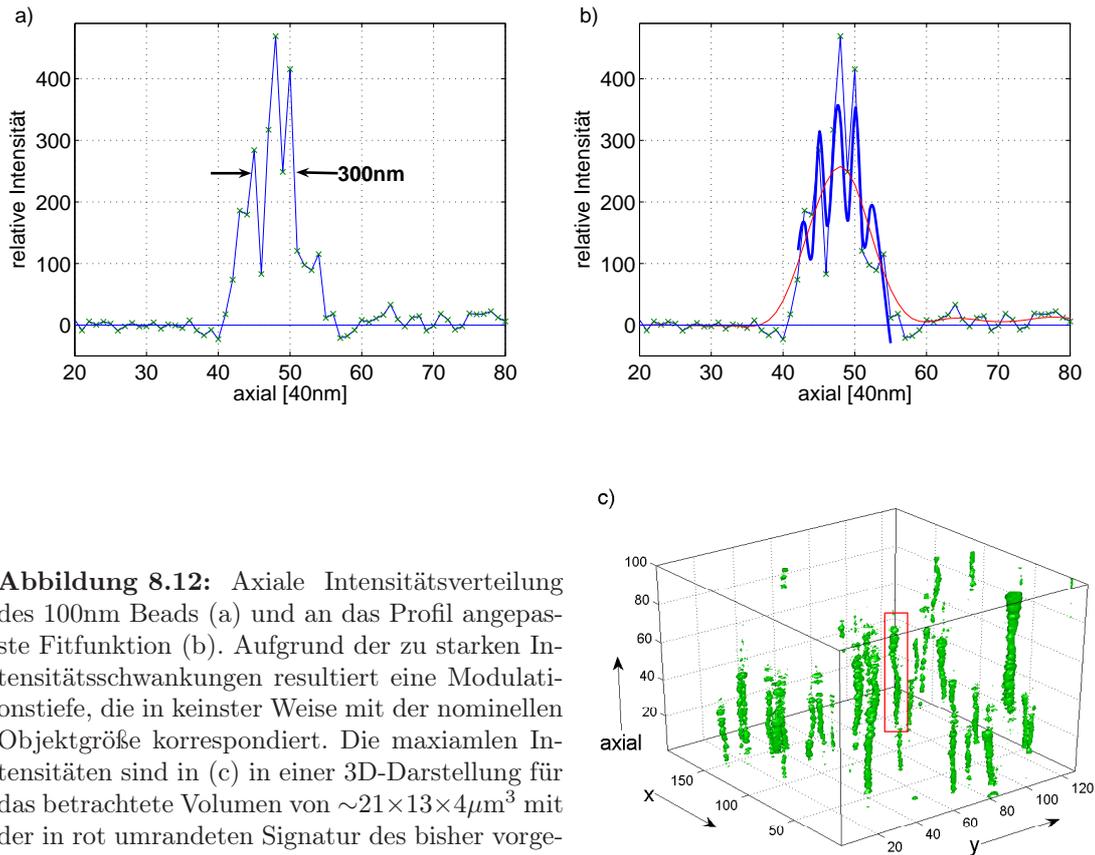


Abbildung 8.12: Axiale Intensitätsverteilung des 100nm Beads (a) und an das Profil angepasste Fitfunktion (b). Aufgrund der zu starken Intensitätsschwankungen resultiert eine Modulationstiefe, die in keinsten Weise mit der nominellen Objektgröße korrespondiert. Die maximalen Intensitäten sind in (c) in einer 3D-Darstellung für das betrachtete Volumen von $\sim 21 \times 13 \times 4 \mu\text{m}^3$ mit der in rot umrandeten Signatur des bisher vorgestellten Beads angegeben.

werden dadurch nicht berücksichtigt und es resultiert eine zu geringe Modulationstiefe, die in keinsten Weise mit der nominellen Objektgröße korrespondiert, weshalb für solche Rohdatensätze die Angabe einer auch nur qualitativen Größenabschätzung reine Spekulation wäre. Die einzige mögliche, auf solch einem Intensitätsprofil basierende, vertrauenswürdige Aussage wäre, dass das Objekt aufgrund der offensichtlichen Modulation Dimensionen innerhalb von $\mathbb{I}_{S[SMI]}$ aufweist. Abbildung 8.12(c) zeigt die maximalen Intensitäten des kompletten Rohdatensatzes in einer 3D-Darstellung für das hier betrachtete Volumen von $\sim 21 \times 13 \times 4 \mu\text{m}^3$ (Länge \times Breite \times Höhe), wobei der in den bisherigen Betrachtungen vorgestellte Bead rot umrandet ist.

Zeitreihen: Prinzipiell wäre es allerdings vorstellbar, dass die erheblichen Einflüsse der Eigendynamik auf die Form der AID wie eben gezeigt, mittels adäquater Informationen über das Bewegungsprofil nachträglich zu korrigieren sind. Um dies näher aufzuführen, wurden Zeitreihen über das gleiche Observationsvolumen aufgenommen, indem die Objek-

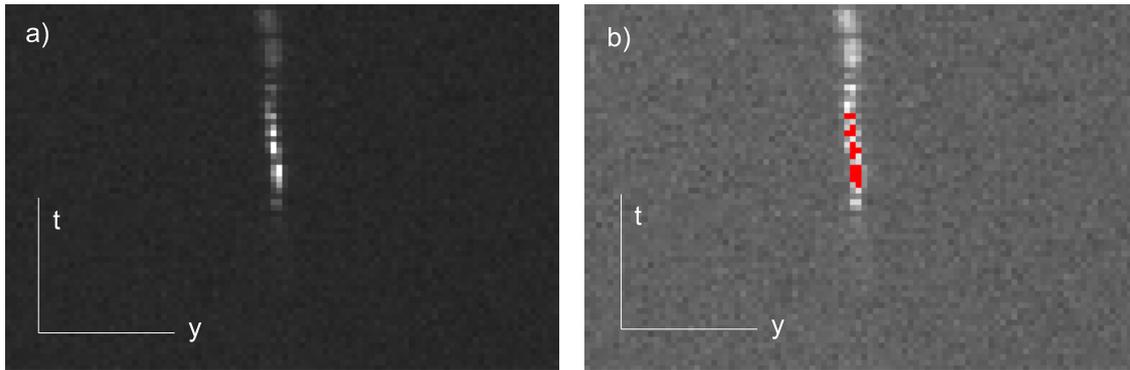


Abbildung 8.13: Zeitreihe (y-t-Projektion) des 100nm Beads (Rohdaten, (a)) und nachbearbeitet mit dem Verlauf der maximalen Intensitäten (rot, (b)). Im Gegensatz zu einem fixierten Objekt, das einen konstanten Verlauf der Trajektorie generieren würde, sind hier Fluktuationen in y-Richtung und eine Bewegung durch das Stehwellenfeld zu erkennen.

te nicht abgetastet, sondern stationär in der Fokusebene des Detektionsobjektivs gehalten wurden. Um diese Prozedur vertrauenswürdig durchzuführen, musste die Zeitskala, d.h. die Integrationszeit pro Bild, exakt an die DAQ-Rate während der zuvor beschriebenen Objektabtastprozedur angepasst werden. Andernfalls ergäben sich Datensätze, deren Bildfolgen zeitlich nicht miteinander korrelieren würden und damit nicht vergleichbar wären. Abbildung 8.13(b) zeigt hierfür die y-t-Projektion des zuvor beschriebenen 100nm Beads mit dem in rot dargestellten Verlauf der maximalen Intensitäten. Im Gegensatz zu fixierten Objekten, bei denen hier eine konstant verlaufende Trajektorie abgebildet würde, sind hier wieder sehr starke Fluktuationen zu erkennen, die sich darin äußern, dass das Objekt einerseits aus der Fokusebene wandert und andererseits sowohl laterale (bzw. hier in y-Richtung) als auch axiale Bewegungen durch das Stehwellenfeld ausführt, die sich in der deutlich zu erkennenden Modulation widerspiegeln. Die axiale Intensitätsverteilung des Objekts ist in Abbildung 8.14(a) dargestellt, aufgrund derer eine deutliche Bewegung durch das Wellenfeld festzustellen ist, während Abbildung 8.14(b) wieder eine 3D-Darstellung der maximalen Intensitäten aller Objekte des observierten Volumens aufzeigt.

Aus dem hier vorgestellten Profil ist nun folgendes abzuleiten: da das Intensitätsmuster nicht mit dem des Stehwellenfelds korrespondiert, erfolgt die Bewegung des Objekts (wie aufgrund des Modells eines *Random-Walk* zu erwarten) rein zufällig in sämtlichen drei Dimensionen. Das wiederum bedeutet, dass aufgrund der Kenntnis eines Bewegungsprofils innerhalb eines Zeitintervalls $[t, t']$, längst keine Aussagen über das Bewegungsprofil innerhalb eines vorherigen oder nachfolgenden Zeitintervalls $[t \pm \tau, t' \pm \tau]$ getroffen werden können. Mögliche, korrigierende Verfahren hinsichtlich einer AID, die während der Objektabtastung extrahiert wurden, sind also nur bedingt möglich. Die Ableitung einer größenordnungsmäßig realitätsnahen Wiedergabe der „makroskopischen“ Dynamik eines Objekts und die Adaption dieser Information auf die AID sollte innerhalb gewisser Grenzen möglich sein. Jedoch werden sehr schnelle, sich stets ändernde kleine Bewegungsmuster, die dennoch einen erheblichen Einfluss auf die AID haben, nicht reproduzierbar sein. Eine tatsächliche Wiedergabe solch einer Information wäre nur mit einer simultanen Objektabtastung und Zeitreihenanalyse realisierbar, was a priori nicht möglich ist.

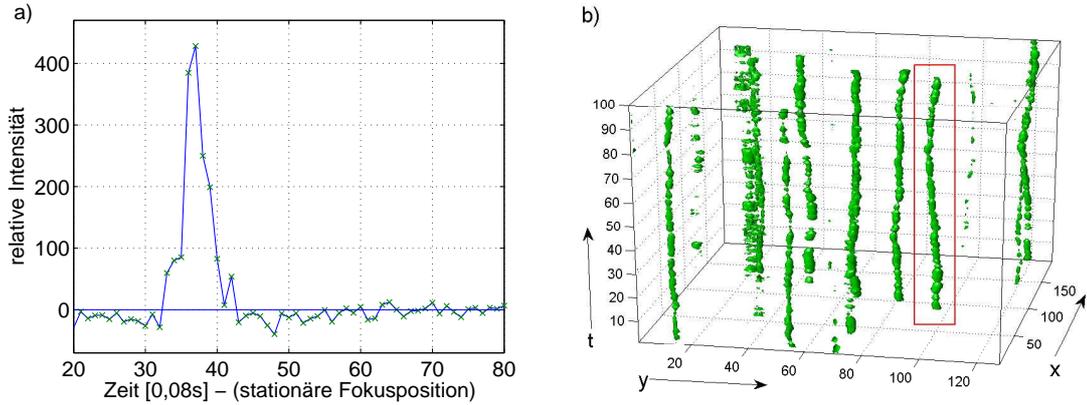


Abbildung 8.14: Axiales Intensitätsprofil des 100nm Beads (a), wodurch eine ausgeprägte Bewegung durch das Stehwellenfeld ersichtlich wird. Eine Bildnummer entspricht einer Zeit von 0,08s, woraus eine Gesamtzeit des hier aufgeführten Bereichs von 4,8s resultiert. Die Intensitätsverteilungen aller Objekte des Rohdatensatzes sind in (b) dargestellt.

8.3.2 Interpretation

Die bisherigen Erläuterungen zeigen, dass zur Realisierung von Strukturuntersuchungen an mobilen Objekten, zwei wesentliche Kriterien erfüllt sein müssen. So darf die „mikroskopische“ und „makroskopische“ Eigendynamik eines Objekts wie im vorherigen Abschnitt gezeigt einerseits nicht zu stark ausgeprägt sein, während andererseits eine wesentliche Anforderung in einer möglichst schnellen Objektabtastung gegeben sein muss.

Obwohl die zuvor vorgestellten Ergebnisse der Beadmessungen aufgrund des sehr einfachen Bewegungsmusters und der im Vergleich zu einem DNA-Verbund zu starken Diffusion keine repräsentative Studie in Bezug auf das Verhalten von mobilen biologischen Objekten darstellen, können hieraus erste Schlussfolgerungen gezogen werden. Danach konnten die in Kapitel 6 formulierten Kriterien zur Vertrauenswürdigkeit der AID als wertvolles, qualitatives Maß zur Beurteilung der Güte einer axialen Intensitätssignatur eines mobilen Objekts, bestätigt werden. Insbesondere zeigen die oben aufgeführten Resultate die zu erwartenden Verteilungen, wonach sowohl die Modulations-Symmetrie als auch die Form des Gesamtprofils im Hinblick auf die FWHM und Symmetrie der geglätteten AID immens von der Geschwindigkeit bei der Objektabtastung und der Bewegungs-Charakteristik des Objekts abhängig ist. Eine Folge hiervon schlägt sich auf die evaluierten Objektgrößen nieder, die im Mittel oberhalb des nominellen Werts liegen, was zu erwarten ist, da aufgrund der Objektbewegung eine Verschmierung des Objekts und hieraus ein effektiv größeres Objektvolumen abgebildet wird (siehe Abbildung 8.15). Entscheidend hierfür ist der Weg, welcher das Objekt innerhalb des Observationsvolumens während der Datenakquisition zurücklegt, womit in erster Näherung die evaluierte Objektgröße S_{mobil} eines mobilen Teilchens unter Berücksichtigung der Verschmierung und damit des relativen Fehlers angegeben werden kann mit:

$$S_{mobil} \approx S_{nominell} + a \cdot \int_0^{T_{DAQ}} \vec{v}_{Objekt} dt \quad (8.2)$$

Dabei beschreibt \vec{v}_{Objekt} das vollständige Geschwindigkeitsprofil des betrachteten Teilchens und a einen beliebigen Parameter. Für eine infinitesimal kleine DAQ-Zeit oder alternativ unter Kenntnis der vollständigen Information über das Bewegungsprofil, womit eine mathe-

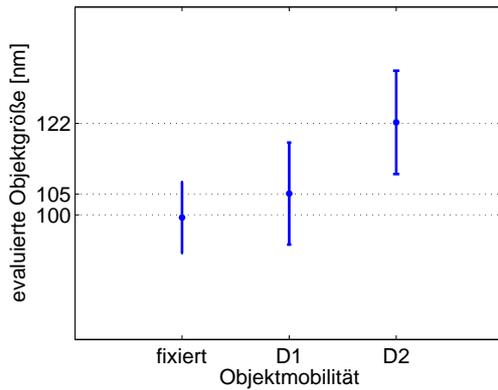


Abbildung 8.15: Die evaluierten Objektgrößen von 100nm Beads in Abhängigkeit von der Eigendynamik der Objekte. Während für fixierte Präparate mit $\langle S \rangle = 100 \pm 7 \text{ nm}$ der nominelle Wert sehr gut reproduziert werden kann, erhöhen sich die diskriminierten, mittleren Objektgrößen von $\langle S \rangle = 105 \pm 12 \text{ nm}$ bzw. $\langle S \rangle = 122 \pm 12 \text{ nm}$ proportional mit dem Geschwindigkeitsprofil der Objekte, d.h. mit der Zunahme des Diffusionsparameters $D \leq 100 \text{ nm}^2/\text{s}$ (D1) bzw. $D \geq 200 \text{ nm}^2/\text{s}$ (D2).

matische Nachbearbeitung der Rohdaten und folglich eine Korrektur bzw. Rekonstruktion möglich wäre, würde die tatsächliche Objektstruktur resultieren. Letzteres ist aufgrund der fehlenden zeitlichen und räumlichen Auflösung nicht möglich, weshalb die Maximierung der DAQ-Rate als (augenblicklich) einzigstes probates Mittel angesehen werden kann, um sinnvolle Informationen bezüglich der Objektstruktur von mobilen, intrazellulären Konstituenten zu extrahieren.

Kapitel 9

Strukturanalyse biologischer Präparate

Fixierte Präparate: Ein wesentlicher Teil der biologischen Fragestellungen in dieser Arbeit bezog sich auf strukturelle Untersuchungen zum β -Globin-Lokus (siehe Kapitel 3) unter Verwendung von fixierten Präparaten im Rahmen eines Kollaborationsprojekts mit Dr. Mariëtte Kemner-van de Corput aus der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Frank Grosveld, Fachbereich 'Zellbiologie und Genetik' der Medizinischen Fakultät der Erasmus Universität Rotterdam. Da diese Arbeiten einerseits zu einem sehr frühen Zeitpunkt, d.h. noch während der Aufbauphase des Vertico-SMI, begannen und andererseits mit Anregungswellenlängen durchzuführen waren, welche für das Vertico-SMI nicht vorgesehen sind, wurde hierfür das horizontale SMI-Mikroskop verwendet.

Vitale Zellen: Nach der Fertigstellung des Vertico-SMI bzw. nach der Beendigung der Charakterisierungsphase, wurden erste Untersuchungen an lebenden Zellen vorgenommen. Hierfür wurden in Kollaboration mit Dr. Thibaud Jégou aus der Arbeitsgruppe von PD Dr. Karsten Rippe, Fachbereich 'Molekulare Biophysik' des Kirchhoff Instituts für Physik der Universität Heidelberg, tet-Systeme (siehe Kapitel 3) unter verschiedensten Bedingungen analysiert. Diese Systeme bildeten eine sehr gute erste Grundlage zur Ermittlung von Systemeigenschaften des Vertico-SMI-Aufbaus unter in-vivo Bedingungen und lieferten gleichermaßen interessante Erkenntnisse hinsichtlich der zugrundeliegenden Biologie. Die in diesem Zusammenhang vorgestellten (semi-) quantitativen Analysen ermöglichen gleichfalls erste Rückschlüsse auf Interpretationsmöglichkeiten, basierend auf SMI-methodischen Lebendzelltechniken. Damit sollten zukünftige, weiter optimierte Messprozeduren nicht nur im Hinblick auf das Mikroskopsystem, sondern auch auf das zu untersuchende biologische Präparat bzw. die biologische Fragestellung ermöglicht werden, die, wie schon in Kapitel 6 erläutert, stets maximal miteinander korrelieren sollten.

9.1 Untersuchungen zum β -Globin-Lokus

Eine der zentralen Fragestellungen in der molekularen Zellbiologie besteht in der direkten Nachweisbarkeit von Unterschieden bezüglich der Aktivität bzw. Inaktivität von Gensequenzen. Dies ist bis zum jetzigen Zeitpunkt nur über indirekte, d.h. rein molekularbiologische/biochemische Methoden möglich, weshalb eine direkte Observation von größtem Interesse ist. Da sehr viele Modelle zur Genarchitektur eine Änderung der lokalen Konformation bei der Aktivierung einer Gensequenz in Betracht ziehen, besteht ein möglicher Ansatz zur direkten Visualisierung darin, mögliche strukturelle Änderungen hinsichtlich der Architektur, also spezifische Größenunterschiede zwischen aktiven und inaktiven Sequenzen zu ermitteln.

Die bisherigen Modellvorstellungen zur Topologie des aktiven und inaktiven, fötalen Maus β -Globin-Clusters sagen nun erhebliche strukturelle Änderungen bei der Aktivierung des entsprechenden Genabschnitts voraus [22, 64, 75]. Wie schon in Kapitel 3 beschrieben, erwartet man bei inaktiven Sequenzen das Vorliegen einer nicht dekondensierten Kette, deren Konformation, bezogen auf räumliche Dimensionen, eher kompakt und von statistischer Natur geprägt sein sollte. Demgegenüber sollte für aktive Sequenzen, durch Dekondensierung und zusätzlicher Ausbildung von Schleifen in der entsprechenden Genregion, eine ausgeprägt definierte, d.h. sehr spezifische Größenverteilung zu erwarten sein.

9.1.1 Präparate und Durchführung

Um eindeutig zwischen aktiven und inaktiven fötalen Sequenzen unterscheiden zu können, wurden Gehirn- und Leberzellen von Maus-Embryonen verwendet, da die β -Globin Sequenzen im Genom der Gehirnzellen nicht exprimiert und somit mit Sicherheit nur inaktive Konformationen observiert werden. Leberzellen weisen demgegenüber eine sehr hohe Wahrscheinlichkeit zur Expression der betreffenden Sequenz auf, wobei in diesem Fall zur Sicherheit noch zusätzlich eine Markierung der mRNA erfolgte.

Zur Observation wurden die hinsichtlich ihrer Fluoreszenzeigenschaften sehr stabilen Farbstoffe *Alexa Fluor 488 (A488)* (Absorptionsmaximum: 495nm) bzw. *Alexa Fluor 647 (A647)* (Absorptionsmaximum: 653nm) verwendet, die mittels einer indirekten FISH-Prozedur den entsprechenden Genabschnitt markierten. Zur zusätzlichen Überprüfung des Vorliegens einer aktiven Sequenz in den Leberzellen wurden hier die korrespondierenden mRNA-Abschnitte mit einer unterschiedlichen spektralen Signatur versehen, d.h., dass im Falle einer Markierung der Zielregion mit A647 die zugehörige mRNA mit dem Farbstoff *FITC* (Absorptionsmaximum: 495nm) gefärbt wurde (zu Details hinsichtlich der verwendeten biologischen Protokolle zur Herstellung der Präparate möchte ich auf [51] verweisen).

Bei ersten, vorbereitenden Messungen wurde der komplette β -Globin-Cluster vom 5'- bis zum 3'-Ende markiert. Diese Sondengröße stellte sich im Verlauf der Analysen als zu groß dimensioniert für eine akkurate Vermessung mit dem SMI-Mikroskop heraus. In mehreren Schritten wurde die Sondengröße deshalb auf den kleinstmöglichen Bereich von 52kbp zur kompletten Abdeckung des β -Globin-Abschnitts verringert. Abbildung 9.1 zeigt die schematischen Darstellungen des inaktiven und aktiven β -Globin-Lokus mit den zugehörigen, markierten Bereichen in grün.

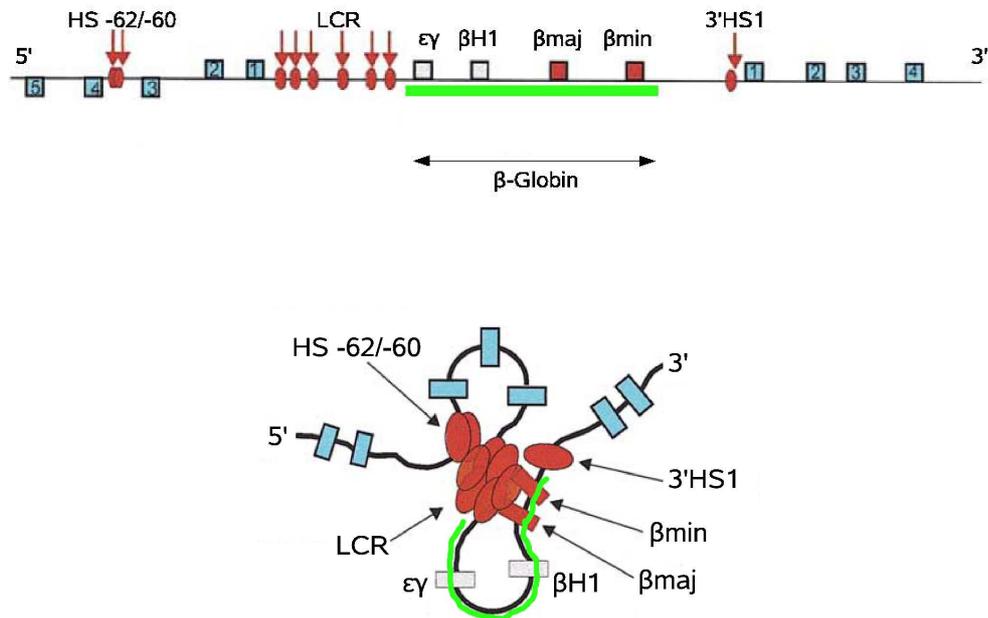


Abbildung 9.1: Die markierten Regionen im Falle des inaktiven (oben) und aktiven (unten) β -Globin-Lokus. Die Sondensequenz umfasst 52kbp.

9.1.2 Resultate

In Folge der indirekten Markierung wurde die eindeutige Identifikation der Zielregion aufgrund des teilweise sehr stark ausgeprägten Hintergrundsignals (unspezifische Bindungen, siehe Kapitel 3) erheblich erschwert. Dies führte zum Einen zu einer stärker begrenzten Statistik und zum Anderen zu teilweise nicht mehr analysierbaren Loci, da das Signalniveau in vielen Fällen nur unmerklich oberhalb des Hintergrundrauschens lag und die Fitprozedur infolgedessen nicht mehr vertrauensvoll durchgeführt werden konnte. Diese Problematik äußerte sich insbesondere bei den (inaktiven) Gehirnzellen, bei denen eine simultane Messung des im aktiven Fall kolokalisierenden mRNA-Signals nicht möglich ist. Aus einer Gesamtheit von 325 aufgenommenen Zellen konnten hier lediglich 42 Zellen (entsprechend $\sim 14\%$), welche 97 Fluoreszenzsignale zeigten, ausgewertet werden, wenngleich diese dennoch einen sehr niedrigen Kontrast zeigten. Die Gesamtzahl an aufgenommenen Leberzellen betrug 206, wobei hier 61 Zellen (entsprechend $\sim 24\%$) mit 114 Fluoreszenzsignalen erfolgreich ausgewertet werden konnten.

Im aktiven Fall wurden die einzelnen Zellen mit den Anregungswellenlängen $\lambda_{ill}=488\text{nm}$ und $\lambda_{ill}=647\text{nm}$ vermessen, während im inaktiven Fall lediglich eine der beiden Laserlinien verwendet wurden (abhängig von der jeweils gewählten Farbmarkierung der Ziel-DNA). Die Abtastraten bei der Aufnahme des Rohdatensatzes betrug für alle Messungen 40nm.

Abbildung 9.2 zeigt den 2D-Rohdatensatz einer aktiven Leberzelle im Fokus des Detektionsobjektivs und die zugehörigen axialen Intensitätsverteilungen der markierten β -Globin-Sequenz, aufgenommen mit einer Anregungswellenlänge von $\lambda_{ill}=488\text{nm}$, d.h. einer Ziel-DNA-Markierung mit A488. Die Berechnung der Modulationstiefe erfolgte wie in Kapitel

4 dargestellt unter der Annahme einer kugelförmigen Fluorophorverteilung, woraus für die hier gezeigten Loki axiale Größen von 153nm (1) und 142nm (2) resultieren. Für den inaktiven Fall (Gehirnzelle) mit einer Anregungswellenlänge von $\lambda_{ill}=647\text{nm}$ ist eine analoge Darstellung in Abbildung 9.3 mit ermittelten Objektgrößen von 83nm (1) und 149nm (2) gegeben. Bei der Vermessung mit dem SMI-Mikroskop wurde darauf geachtet, dass mindestens zwei Signale vernünftig zu detektieren waren, wobei die Anzahl der zu erkennenden Loki in Abhängigkeit vom Zellzyklus durchaus auch drei oder vier betragen konnte.

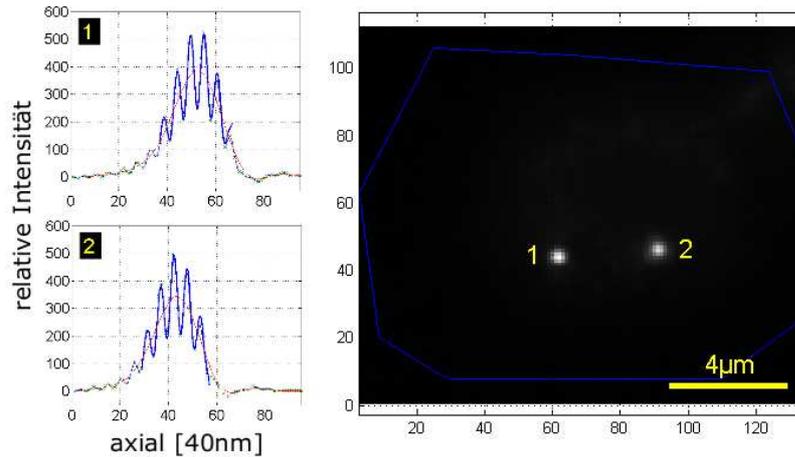


Abbildung 9.2: 2D-Rohdatensatz einer typischen aktiven Leberzelle im Fokus des Detektionsobjektivs, aufgenommen mit einer Anregungswellenlänge von $\lambda_{ill}=488\text{nm}$. Die Intensitätsverteilungen der beiden Loki entsprechen einer axialen Ausdehnung von 153nm (1) und 142nm (2).

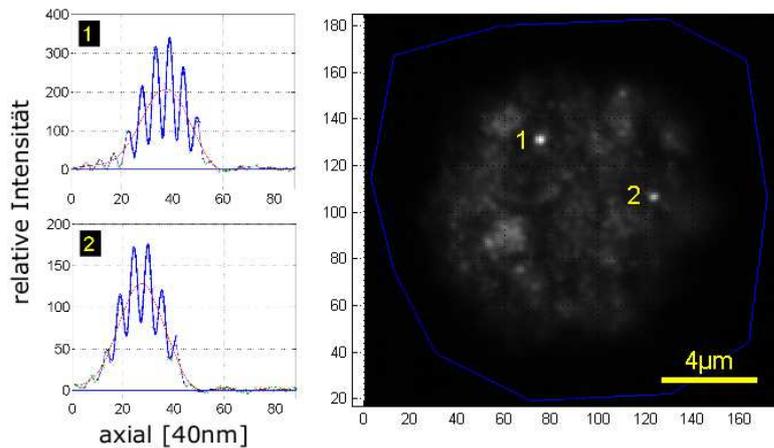


Abbildung 9.3: 2D-Rohdatensatz einer inaktiven Gehirnzelle. Man erkennt das für diese Präparate typische, stark ausgeprägte Hintergrundsignal im Fokus des Detektionsobjektivs, aufgenommen mit einer Anregungswellenlänge von $\lambda_{ill}=647\text{nm}$. Die Intensitätsverteilungen der beiden Lokis zeigen Modulationstiefen, die einer axialen Ausdehnung von 83nm (1) und 149nm (2) entsprechen.

Insgesamt konnte für die aktiven Zellen ein sehr vertrauenswürdiges Resultat mit einer mittleren Objektgröße und Standardabweichung von $\langle S_{[aktiv]} \rangle = 136 \pm 25 \text{nm}$ für 114 erfolgreich ausgewertete Fluoreszenzsignale evaluiert werden (siehe Histogramm in Abbil-

dung 9.4(a), ausgefüllte Balken). Vertrauenswürdig bedeutet in diesem Zusammenhang, dass das Signal zu Rausch Verhältnis (SNR) in den meisten Fällen gut genug für eine erfolgreiche Durchführung der Fitprozedur war.

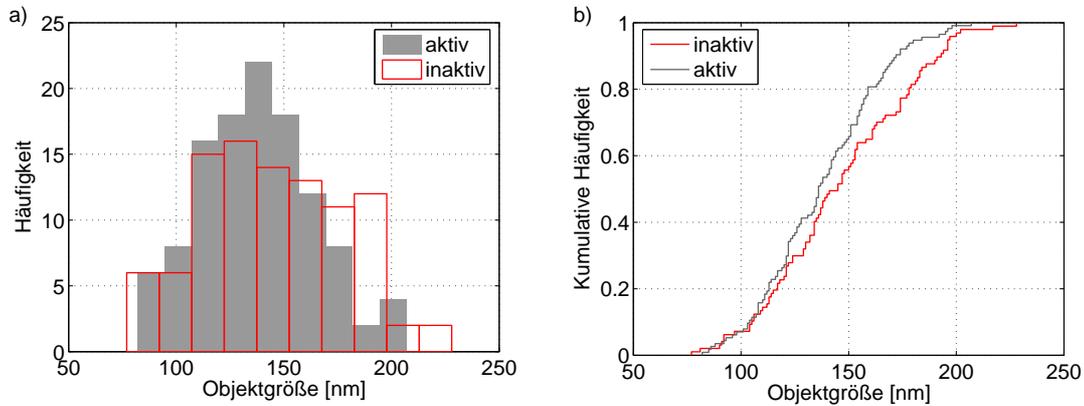


Abbildung 9.4: Histogramme (a) und kumulative Häufigkeiten (b) der Größenverteilungen des aktiven/inaktiven β -Globin-Lokus: die mittlere Objektgröße und Standardabweichung der aktiven Leberzellen konnte zu $\langle S_{[aktiv]} \rangle = 136 \pm 25 \text{ nm}$ evaluiert werden (ausgefüllte Balken). Für die inaktiven Gehirnzellen wurde eine mittlere Objektgröße und Standardabweichung von $\langle S_{[inaktiv]} \rangle = 145 \pm 33 \text{ nm}$ erhalten (rot umrandete Balken).

Bei den Präparaten mit den inaktiven Gehirnzellen war der Anteil unspezifischer Bindungen sehr stark ausgeprägt: das Hintergrundsignal (Vgl. Rohdatensatz in Abbildung 9.3) hatte aufgrund des hieraus resultierenden geringeren SNR einen erheblichen Einfluss auf die Signalextraktion bzw. Ziel-DNA-Lokalisation, wodurch eine vertrauensvolle Auswertung erheblich erschwert wurde. Die für die inaktiven Loki ermittelte mittlere Objektgröße und Standardabweichung beträgt $\langle S_{[inaktiv]} \rangle = 145 \text{ nm} \pm 33 \text{ nm}$ für 97 erfolgreich ausgewertete Fluoreszenzsignale (siehe Histogramm in Abbildung 9.4(a), rot umrandete Balken). In Abbildung 9.4(b) sind darüberhinaus die Objektgrößen in einer kumulativen Häufigkeitsverteilung aufgetragen.

Zur weitergehenden Bewertung dieser beiden Verteilungen wurde ein t-Test durchgeführt, mit dem ein möglicher signifikanter Unterschied der Mittelwerte unter der Annahme zweier normalverteilter Grundgesamtheiten bestimmt werden kann. Die Ausführung eines zweiseitigen t-Tests auf die ermittelten Datensätze ergab ein 95% Konfidenzintervall für die Differenz des Mittelwerts der aktiven und inaktiven Größenverteilungen von $I = [0 \text{ nm}, 17 \text{ nm}]$, womit kein statistisch signifikanter Unterschied nachzuweisen war.

9.2 Lebendzellanalysen

Für Untersuchungen an der lebenden Zelle müssen grundlegend unterschiedliche biologische Voraussetzungen beachtet und die Bedingungen bei der Observation mit dem Mikroskop daran angepasst werden. Diese Vorgaben müssen dann gleichfalls in die Datenanalyse einbezogen werden, um die Interpretation der erhaltenen Ergebnisse auf eine möglichst gut fundierte Basis stellen zu können. Wie in Kapitel 3 näher beschrieben, zeigt sich der erste Unterschied zur Untersuchung von fixierten Präparaten schon in der Einschränkung der Markierungstechniken. Desweiteren muss die Zelle über einen möglichst langen Zeitraum am Leben erhalten werden, was mit sogenannten Puffer-Kulturmedien verwirklicht wird: das zusätzlich in das Kulturmedium eingebrachte Puffermedium (hier: *Hepes*) versorgt die Zellen einerseits mit den notwendigen Nährstoffen und leistet andererseits einen kompensatorischen Beitrag bezüglich der Ausbildung freier Radikale, deren ungehemmte Wirkungsweise andernfalls zu einer beschleunigten Apoptose führen würde.

Hinsichtlich der Untersuchungsmethode treten im Lebendzellbereich ebenfalls zusätzliche Faktoren auf, die eine vertrauenswürdige Observation, Analyse und Interpretation erheblich erschweren. So besitzen lebende Zellen z.B. eine natürliche Eigenfluoreszenz, die im fixierten Fall durch stringentes Waschen unterdrückt werden kann. Bei der Untersuchung von sehr kleinen Objekten unter Berücksichtigung der in Kapitel 5 geschilderten Problematik bezüglich der Eigendynamik subchromosomaler Objekte in Kombination mit einer geforderten, sehr schnellen Datennahme, wird dieser Sachverhalt einen wesentlichen Einfluss auf das erreichbare Ergebnis haben.

Weitere Herausforderungen liegen auch im optischen Bereich angesiedelt: fixierte Zellen sind für gewöhnlich von Einbettungsmedium umgeben, dessen Brechungsindex spezifisch an die Detektions-Optik angepasst werden kann. Untersucht man lebende Zellen, die frei beweglich innerhalb eines wässrigen Mediums „gelagert“ sind, ist eine adäquate Anpassung des Brechungsindex nicht mehr möglich, weshalb für gewöhnlich versucht wird, diese Fehlanpassung durch die Verwendung von Wasserimmersionsobjektiven auf ein Minimum zu reduzieren.

9.2.1 Präparate und Durchführung

Zur erstmaligen Realisierung von in-vivo Messungen am Vertico-SMI wurden tet-Operator-Systeme verwendet, da diese Gensequenz hinsichtlich ihrer Mobilitätseigenschaften von Dr. Thibaud Jégou bereits in multiplen CLSM-Studien untersucht wurde und dadurch wesentliche Eigenschaften schon a priori bekannt waren. Die in diesen Arbeiten erhaltenen Resultate ließen darauf schließen, dass solche Präparate prinzipiell für erste in-vivo SMI-mikroskopische Studien geeignet sein sollten [50]. Weiterhin zeigten erste vorbereitende Versuche, dass die Markierungstechnik bzw. der verwendete Farbstoff ein genügend hohes SNR bereitstellte, um sehr hohe DAQ-Raten etablieren zu können.

Die Detektion erfolgte dabei über die Expression von tet-Repressor-GFP (*Green Fluorescent Protein*) (Absorptionsmaximum: 488nm) des tet-Operon-Systems, das in mehreren, zufälligen Wiederholungen stabil in die Telomer-Region von Interphasechromatin menschlicher U2OS (*Human Osteosarcoma*)-Zellen integriert wurde. Ein Problem bei der Verwendung dieses Präparats war allerdings, dass der tet-Operator wie schon erwähnt mit einer zufälligen Anzahl von Wiederholungen in das Genom integriert wurde: dadurch konnten einerseits keine genauen Angaben über die exakte Größe des markierten Abschnitts ge-

macht werden, während andererseits die durchschnittliche Größe der Wiederholungen im Mittel im oberen Grenzbereich des SMI-sensitiven Bereichs $\mathbb{I}_{S[SMI]}$ lag.

Transfektion der adhärenen Zellen: die lebenden Zellen wurden für die durchgeführten Experimente an konventionellen $22 \times 22 \text{mm}^2$ Deckgläsern anwachsen lassen (*Adhäsion*), wodurch eine mögliche freie Bewegung der Zellen innerhalb des Umgebungsmediums unterdrückt wurde. Ein weiterer Vorteil dieser Prozedur besteht in der nun eher unproblematischen Verwendungsmöglichkeit von Ölimmersionsobjektiven, da sich der Brechungsindexsprung durch den direkten Kontakt der Zellen zum Glas nicht mehr so drastisch auswirkt. Die Verwendung von Ölimmersionsobjektiven zur Detektion ist prinzipiell stets zu präferieren, da diese konstruktionsbedingt bessere Eigenschaften hinsichtlich des erreichbaren SNR aufweisen.

Unter Transfektion versteht man nun das Einbringen von Fremd-DNA, d.h. in diesem Fall des tet-Operator-Genabschnitts, in eukaryotische Zellkulturen (hier: U2OS-Zellen), wofür die Zellen einen Tag vor der Transfektion geteilt und ausgesät wurden (zu Details hinsichtlich der verwendeten biologischen Protokolle zur Herstellung der Präparate möchte ich auf [49, 15] verweisen).

Messprozedur I

Zur erstmaligen Versuchsdurchführung wurde die in Kapitel 7 vorgestellte, geschlossene in-vivo Observationskammer verwendet. Mit einem Volumen von etwa $200 \mu\text{l}$ kann genügend Puffermedium zugegeben werden, um eine mehrstündige Messung ohne vorzeitige Apoptose zu verwirklichen (bei entsprechend angepasster Temperatur). Die Kammer wurde zuerst mit einem Deckglas von der einen Seite abgedeckt und auf der gegenüberliegenden Seite mit dem Probendeckglas versiegelt, wobei zur Abdichtung *Fixogum* als Klebemittel verwendet wurde, um das Probendeckglas nach der Messung wieder zerstörungsfrei von der Kammer lösen zu können. Anschließend wurde durch ein seitlich an der Observationskammer befindliches Loch Hepes-Kulturmedium in das Volumen gespritzt.

Für die Observation am Vertico-SMI wurde dieses im voraus einige Stunden mit einer Temperatur von $T=37^\circ\text{C}$ betrieben, um der Gesamtkonstruktion, den optischen Bauteilen und den Positioniereinheiten eine vernünftige Adaption der Umgebungstemperatur erlauben zu lassen. Die in-vivo Messung selbst verlief über einen Zeitraum von etwa drei Stunden bei oben angegebener Temperatur, wobei während der Datennahme selbst die Luftzirkulation für die Dauer der Messung (einige Sekunden) unterbrochen wurde, um hieraus hervorgerufene Vibrationen, die einen erheblichen Einfluss auf das Stehwellenfeld gehabt hätten, zu vermeiden.

Direkt im Anschluss an die Lebendzellmessung wurde das Probendeckglas von der Observationskammer gelöst und die Zellen mittels eines Standardprotokolls unter Verwendung von Paraformaldehyd (PFA) fixiert und auf einem gewöhnlichen Objektträger unter Verwendung von Glycerol als Einbettungsmedium befestigt. Vom so erhaltenen, konventionell fixierten Präparat wurde unter Normalbedingungen, d.h. bei Raumtemperatur, wiederum eine Messprozedur am Vertico-SMI gestartet, um einen direkten Vergleich mit den unter in-vivo Bedingungen evaluierten Ergebnissen zu ermöglichen.

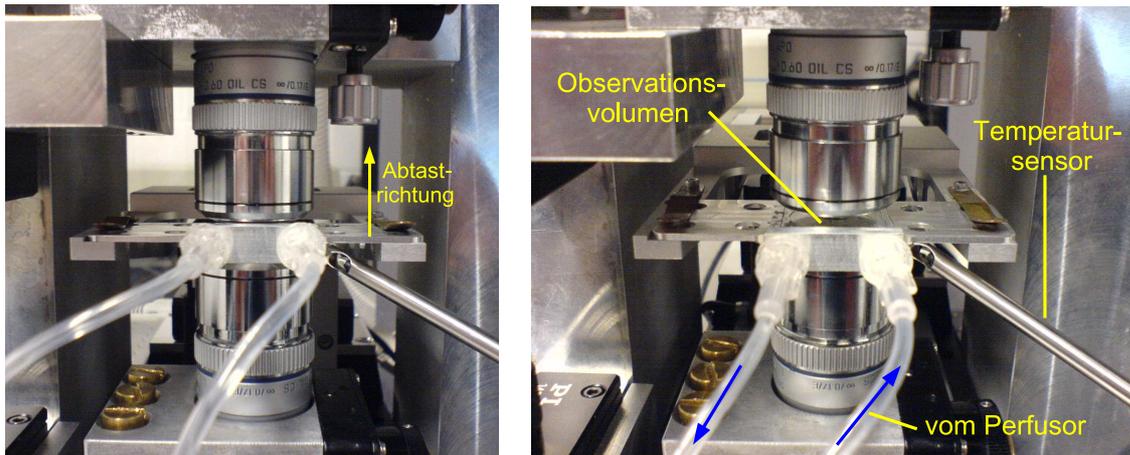


Abbildung 9.5: Fotos der im Stehwellenfeld zwischen den beiden Objektiven platzierten Observationskammer, mit der eine Realzeit-Beobachtung des Fixierungsprozesses der Zellen durchgeführt wurde. Das entsprechende Medium (Puffer, Fixierung, PBS) wird über den rechten Schlauch mittels eines Perfusors in das Observationsvolumen gepumpt, während der Abfluss über den linken Schlauch erfolgt (blaue Pfeile). Auf den Bildern ist ebenfalls der Temperatursensor zu erkennen, der direkt neben dem Observationsvolumen angebracht ist, um eine genaue Temperaturregulation in der Umgebung der Zellen zu gewährleisten.

Messprozedur II

Um eine Realzeit-Beobachtung des Fixierungsprozesses zu verwirklichen, muss das Fixierungsmedium während der Observation mit dem Vertico-SMI in das Observationsvolumen der in-vivo Kammer eingebracht werden. Hierfür wurde die in Kapitel 7 beschriebene Observationskammer verwendet, die über zwei Konnektoren an einen Perfusor angeschlossen werden kann: zuerst wurde ein Deckglas auf einer Seite der Kammer mittels Nagellack fixiert und $300\mu\text{l}$ Hepes-Kulturmedium auf der gegenüber liegenden Seite im Innern der Kammer aufgebracht. Im Anschluss daran wurde das Probendeckglas mit den adhärennten und transfizierten Zellen wiederum mit Nagellack auf der Kammer fixiert. Nach einer etwa 30 minütigen Wartezeit¹, um eine vollständige Trocknung des Nagellacks zu gewährleisten, wurde die Observationskammer in das schon seit etwa drei Stunden beheizte Vertico-SMI eingebracht und im Objektträgerhalter platziert (siehe Abbildung 9.5). Bei der etwa 4-stündigen in-vivo Prozedur wurde wie bereits zuvor beschrieben, die Luftzirkulation für die Dauer der jeweiligen Objekt-Vermessung zur Vermeidung von Vibrationen unterbrochen.

Im Anschluss daran erfolgte eine Realzeit-Fixierung, indem eine zuvor vorbereitete und mit Fixierungsmedium (PFA) befüllte, 50ml fassende handelsübliche Perfusorspritze im Perfusor eingespannt und der zuvor mit PFA gespülte Schlauch mit der Observationskammer verbunden wurde. Um einerseits einen genügend schnellen Austausch des Mediums, d.h. 'Hepes-Kulturmedium \rightarrow PFA', und andererseits die Deckgläser keinem zu hohen Druck auszusetzen, wurde die Durchflussrate am Perfusor während dieses Vorgangs auf konstant 30ml/h eingestellt. Der Austausch des kompletten Mediums innerhalb der Kammer konnte dadurch innerhalb von etwa 30s abgeschlossen werden. Danach wurde der Perfusor ab-

¹Die Observationskammer / die Zellen wurden während dieser Zeit in einer 37°C -Umgebung gehalten.

gestellt, die Zellen für etwa 15 Minuten dem Fixierungsmedium ausgesetzt und während dieser Zeit kontinuierlich observiert.

Nach Beendigung des Fixierungsprozesses wurde die Kammer mit einer ebenfalls zuvor vorbereiteten und mit PBS (engl.: *Phosphate Buffered Saline*) befüllten Perfusorspritze bei gleicher Durchflussrate erneut gespült, wodurch das Fixierungsmedium durch PBS ersetzt wurde. Nach erneuter Entkopplung vom Perfusor konnten somit Aufnahmen der jetzt fixierten Präparate durchgeführt werden, wobei hierfür wieder unter Normalbedingungen, d.h. bei Raumtemperatur, gemessen wurde.

9.2.2 In-vivo Signaturen

Sowohl die Konstitution der Zellen als auch die Qualität der Fluoreszenzsignale waren über den kompletten Zeitraum der Lebendzelluntersuchung als optimal zu bezeichnen. So konnten, aufgrund eines sehr geringen Hintergrundsignals in Kombination mit einer sehr guten Photonenstatistik der GFP-markierten Probe, wodurch die Integrationszeiten auf bis zu 30ms reduziert werden konnten, DAQ-Zeiten im Bereich von 2-4 Sekunden für die Objektabtastung erzielt werden. Die Mobilität der ungefähr 70 analysierten Loki war dabei nur sehr schwach ausgeprägt, so dass der Einfluss der jeweiligen Objektbewegung auf das Modulationsprofil als sehr gering angesehen werden konnte. Desweiteren konnten im Mittel pro Zelle zwei signifikant vom Hintergrundsignal unterscheidbare Signale detektiert werden, was ebenfalls konform mit den Ergebnissen aus den CLSM-Beobachtungen ist.

In Abbildung 9.6 ist exemplarisch die Bildsequenz einer lebenden Zelle beim Durchfahren des Fokus mit einer axialen Abtastrate von 40nm aufgeführt, anhand derer man die (geringe) Mobilität des tet-Operator-Lokus erkennen kann. Die einzelnen Bildfolgen sind etwa 125ms zeitlich voneinander getrennt, woraus sich eine gesamte Aufnahmedauer von ~ 2 s für den hier dargestellten Bereich der Sequenz ergibt. Speziell für den Fall der vertikal eingezeichneten Hilfslinie kann man sehr schön die marginale Drift des Lokus, dargestellt durch die Pfeile, erkennen.

Insgesamt wurden 50 Zellen unter in-vivo Bedingungen aufgenommen und ausgewertet. Dabei konnte zum Einen gezeigt werden, dass sich, sofern das Objekt hinreichend klein ist (und wie schon gezeigt eine nur marginale Driftcharakteristik aufweist), eine gut zu identifizierende Modulation im Intensitätssignal ausbildet. Dies war für etwa 5-10% der untersuchten Fluoreszenzsignaturen der Fall, während bei den typischen Profilen zwar immer noch leichte Modulationen erkennbar waren, diese aber in einem Bereich angesiedelt waren, die „Größen“ oberhalb 200nm entsprechen würden.

In Abbildung 9.7 ist ein Beispiel einer AID mit ausgeprägter Modulation mit zugehörigem 2D-Rohdatensatz im Fokus des Detektionsobjektivs gezeigt. Das Profil, erkennbar am Verlauf der geglätteten AID, als auch die Modulation folgt insgesamt einer sehr symmetrischen Anordnung ohne erkennbare Unstetigkeiten, was im Vergleich zu den in Kapitel 8 aufgezeigten, zeitlich veränderlichen Intensitätsverteilungen für schnell bewegliche Objekte, auf eine sehr vertrauensvolle Signalstruktur schließen lässt. Gleiches gilt im Wesentlichen für die

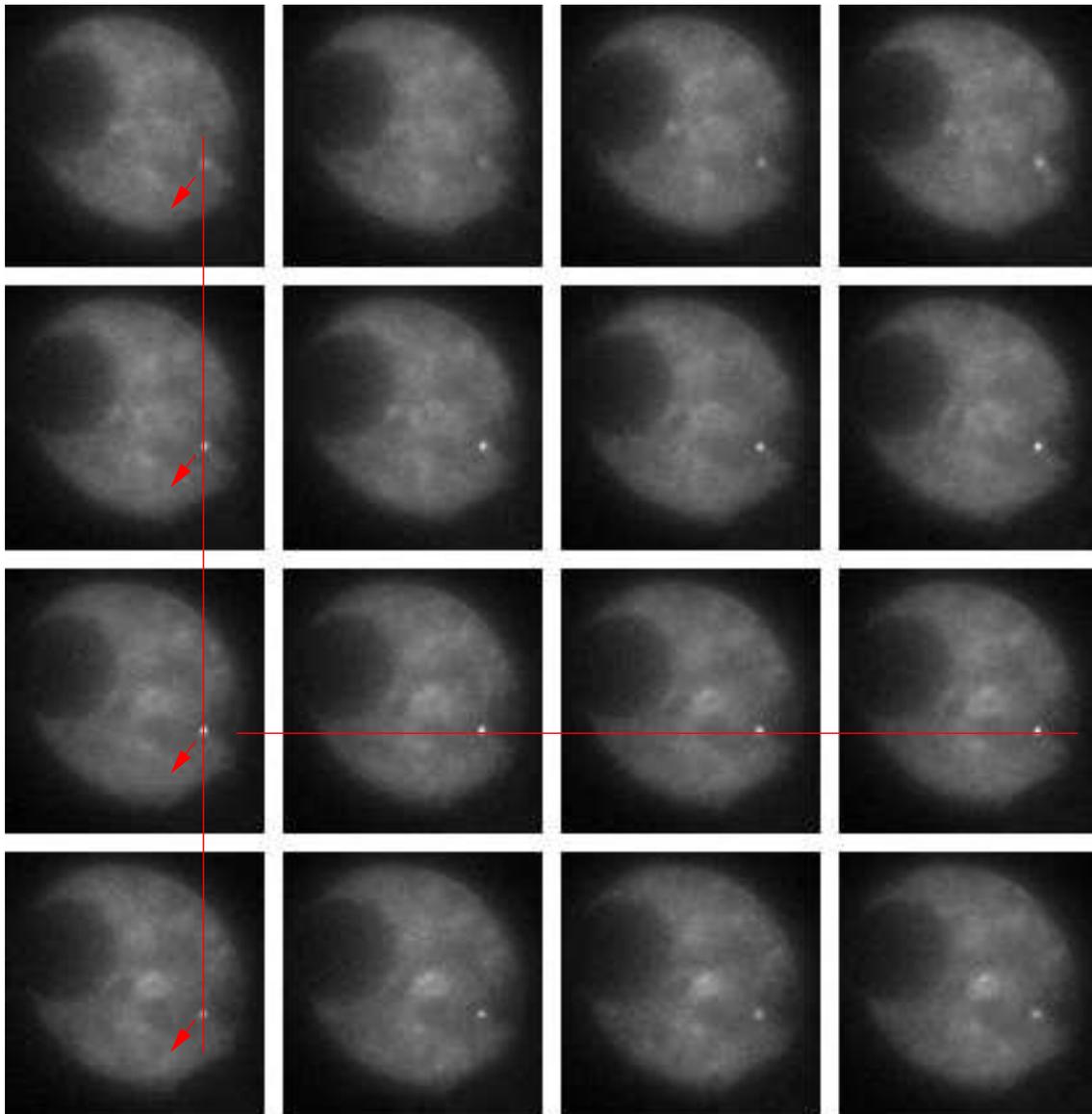


Abbildung 9.6: Bildsequenz einer lebenden U2OS-Zelle mit einem in die Telomer-Region des Interphasechromatin integrierten tet-Operon-Lokus beim Durchfahren des Fokus mit einer axialen Abtastrate von 40nm. Zwischen den einzelnen Bildfolgen liegen $\sim 125\text{ms}$, woraus eine gesamte Aufnahmedauer der hier dargestellten Sequenz von $\sim 2\text{s}$ folgt. Anhand der vertikal eingezeichneten Hilfslinie ist sehr schön eine nur marginal ausgeprägte Drift zu erkennen.

Mehrzahl der Profile mit geringerer Modulation, wenngleich sich hier das Bewegungsmuster der Loki, aufgrund der geringeren Amplituden², stärker auf die Modulations-Symmetrie der Kurve auswirkt (siehe Abbildung 9.8).

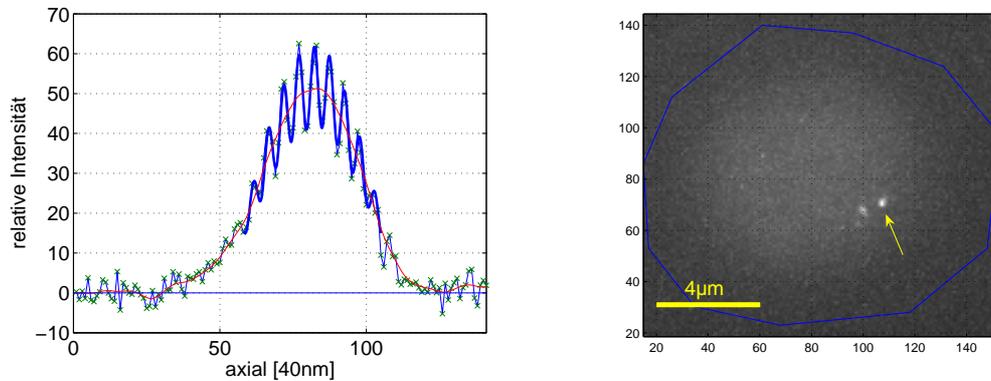


Abbildung 9.7: In-vivo Signatur eines tet-Operon-Lokus im Fokus mit zugehörigem 2D-Rohdatensatz: der sehr symmetrische Verlauf des Profils, erkennbar an der geglätteten AID und am stetigen Verlauf der Modulation, lässt insgesamt auf eine vertrauenswürdige Signalstruktur schließen.

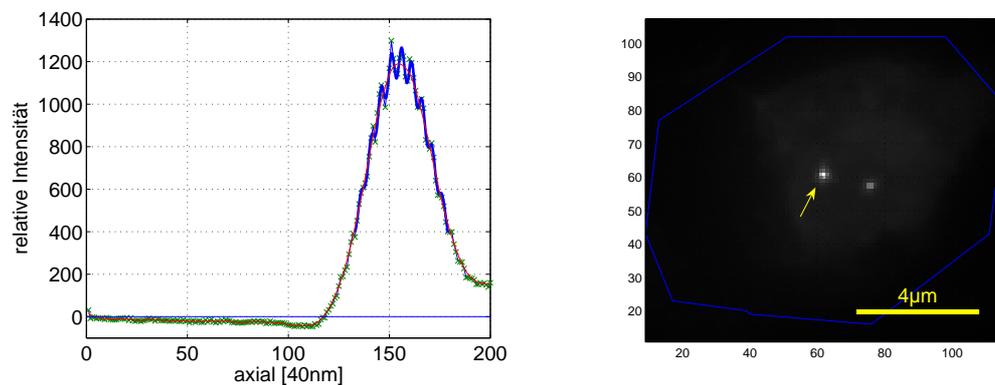


Abbildung 9.8: In-vivo Signatur eines typischen Profils: die geringe Modulation lässt auf „Größen“ oberhalb 200nm schließen.

Anmerkungen zur „Objektgröße“: für Objekte, die eine vernünftige Modulationstiefe aufwiesen, konnte auch in den meisten Fällen eine erfolgreiche Fitprozedur mit einer hieraus resultierenden Größenangabe durchgeführt werden. So lieferte der Auswertalgorithmus im Falle der AID in Abbildung 9.7 z.B. eine „Größe“ von 182nm. Es wurde hier aber dennoch bewusst auf quantitative Angaben verzichtet, da die aus der Mobilität resultierenden Unsicherheiten zu groß sind, um wirklich klare Aussagen treffen zu können. Nichtsdestotrotz können aus solchen Ergebnissen aber sehr viele Rückschlüsse hinsichtlich einer allgemeinen Struktur oder zumindest eines tendenziellen Verhaltens gezogen werden.

²Dies gilt lediglich unter der Annahme, dass das Objekt tatsächlich eine Ausdehnung im vorgestellten Bereich (>200nm) hat. Man könnte natürlich auch umgekehrt argumentieren: aufgrund des Einflusses einer sehr schnellen Objektbewegung auf die Signalform/Modulation, wird solch ein geringes Amplitudenverhalten generiert.

9.2.3 Einfluss der Fixierung

Wie bereits in Kapitel 3 erläutert, sind die Auswirkungen von destruktiv wirkenden Fixierungsprotokollen bis zum jetzigen Zeitpunkt noch weitestgehend unbekannt. Aus diesem Grund wurden die zur in-vivo Untersuchung verwendeten Zellen direkt im Anschluss fixiert und erneut einer Analyse unterzogen. Weiterhin besteht durch die Verwendung einer Observationskammer mit Anschlüssen zu Perfusor-Systemen die Möglichkeit, aktiv in zelluläre Prozesse einzugreifen und in Realzeit zu beobachten. Da für diese Messungen der Fokus auf mögliche Auswirkungen des Fixierungsprozesses lag, wurde in diesem Fall Fixierungsmedium in das Observationsvolumen gepumpt.

Realzeit-Beobachtung des Fixierungsprozesses

Zur Beobachtung des Fixierungsprozesses wurde eine Zelle während der in-vivo Prozedur gezielt ausgewählt, die zwei Loki mit ausgeprägter Modulation aufzeigte, um mögliche strukturelle Änderungen hinreichend genau feststellen zu können. Nach dem kompletten Austausch des Kulturmediums mit PFA innerhalb der Observationskammer (Dauer ~30s), wurde pro Minute jeweils eine Objektabtastung sowie eine Zeitreihe akquiriert, um Informationen sowohl über das Modulationsverhalten als auch über die Objektmobilität zu erhalten. Nach etwa zehn Minuten war der Fixierungsprozess abgeschlossen und das PFA wurde durch PBS ersetzt.

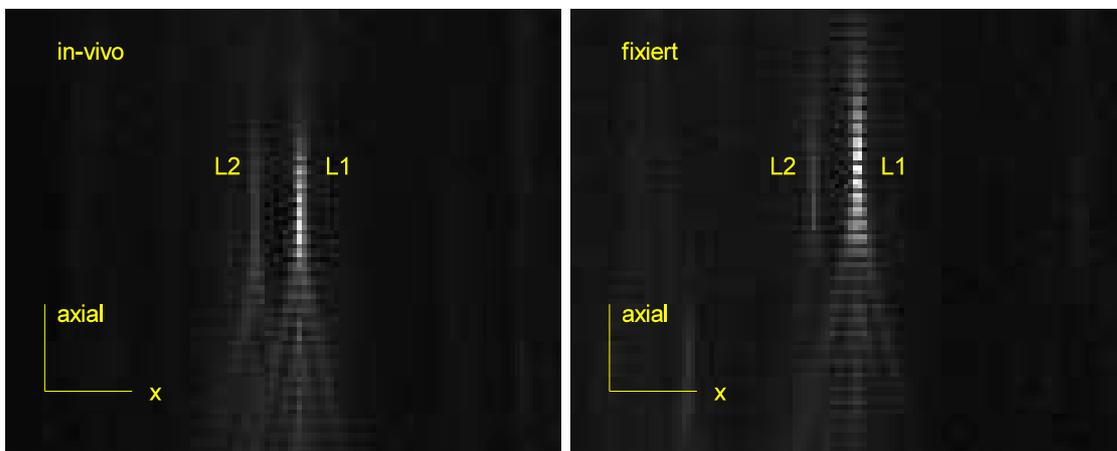


Abbildung 9.9: Die x - z Projektionen der Intensitätsprofile beider Loki (L1 und L2) der Rohdatensätze unter in-vivo Bedingungen (links) und nach Beendigung des Fixierungsprozesses (rechts). In beiden Darstellungen zeigt L2 nur eine sehr geringe Intensität, da sich das Objekt in diesen Projektionen in einem Intensitätsminimum des Anregungsfeldes befindet.

In Abbildung 9.9 sind die x - z Profile der beiden Loki (L1 und L2) der Rohdatensätze der betrachteten Zelle unter in-vivo Bedingungen und nach Beendigung des Fixierungsprozesses dargestellt. In beiden Fällen lässt sich eine sehr ausgeprägte Modulation identifizieren.

Aufgrund der guten Modulations-Symmetrie der beiden Loki unter in-vivo Bedingungen (siehe Abbildungen 9.10(a) für L1 und 9.10(c) für L2) lässt sich folgern, dass die Objekt-mobilität während der DAQ nur sehr gering und damit deren Einfluss auf die Modulations-tiefe nur unwesentlich ist. Als Folge können die extrahierten Intensitätsverteilungen und die daraus ermittelten Modulationstiefen mit $r=0,56$ für L1 bzw. $r=0,41$ für L2 als sehr vertrauenswürdig eingestuft werden.

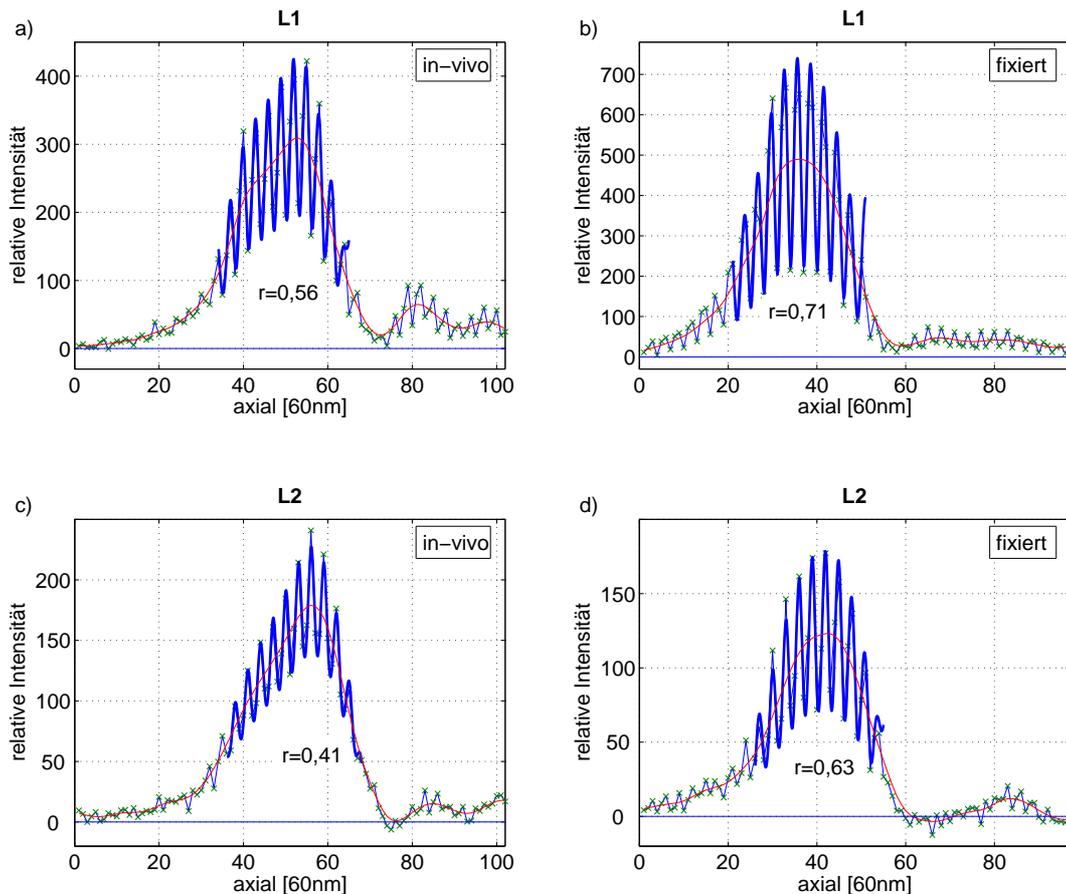


Abbildung 9.10: Die Intensitätsverteilungen der beiden Loki unter in-vivo Bedingungen ((a) und (c)) sowie in fixiertem Zustand ((b) und (d)). Der stetige Verlauf des in-vivo Profils lässt auf eine insgesamt sehr vertrauenswürdige Abschätzung der Modulationstiefe schließen.

Zur genaueren Betrachtung sind hierfür in Abbildung 9.11 die Modulationstiefen für jede Messprozedur und für beide Loki während des Fixierungsprozesses in Relation zur Zeit aufgetragen (Abbildungen 9.11(a) für L1 und 9.11(b) für L2). Der Zeitpunkt, an dem das Fixierungsmedium in das Observationsvolumen gepumpt wurde, ist mit einem roten Kreis gekennzeichnet und es wird ersichtlich, dass für L1 bis auf kleinere Schwankungen die Modulationstiefe während des Fixierungszeitraums kontinuierlich ansteigt. Bei L2 scheint offensichtlich eine sofortige Wirkung einzutreten, da hier ein Sprung auf einen Wert von $r=0,71$ zu erkennen ist und dieses Plateau tendenziell beibehalten wird.

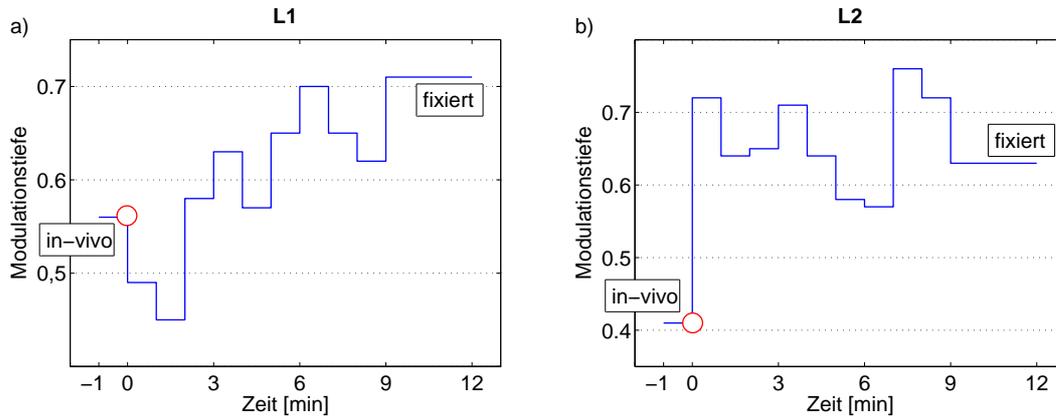


Abbildung 9.11: In Relation zur Zeit evaluierte Modulationstiefen der Intensitätsverteilungen von L1 (a) und L2 (b), die während des Fixierungsprozesses akquiriert wurden. Der rote Kreis markiert den Zeitpunkt, an dem das Fixierungsmedium in das Observationsvolumen gepumpt wurde und man erkennt einen signifikanten Anstieg während des Fixierungszeitraums.

Im direkten Vergleich mit den Modulationstiefen im fixierten Zustand ergibt sich allerdings eine signifikante Differenz: hier liefern die akquirierten Intensitätsprofile Modulationstiefen, die mit $r=0,71$ für L1 bzw. $r=0,63$ wesentlich kleineren Objekten entsprechen (siehe Abbildungen 9.10(b) für L1 und 9.10(d) für L2).

Fixierte Zellen

Von den direkt im Anschluss an die in-vivo Messprozedur fixierten Zellen konnten 49 Fluoreszenzsignale analysiert und deren Größe evaluiert werden. Dabei zeigte sich in Übereinstimmung mit den Ergebnissen, die während der Realzeit-Beobachtung des Fixierungs-

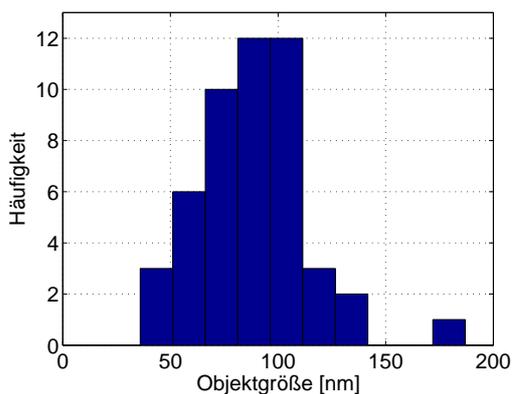


Abbildung 9.12: Die evaluierten Objektgrößen von 49 fixierten Loki. Die mittlere Objektgröße mit zugehöriger Standardabweichung beträgt $\langle S_{[fixiert]} \rangle = 89 \pm 26 \text{ nm}$.

prozesses evaluiert wurden, ein wesentlicher Unterschied zu den unter in-vivo Bedingungen aufgenommenen Profilen. Die hier akquirierten Intensitätsprofile zeigten eine ausgeprägte Modulation, woraus r -Werte resultierten, die deutlich über den in-vivo Signaturen lagen. Die Gesamtverteilung aller analysierten Loki lieferte eine mittlere Objektgröße mit zugehöriger Standardabweichung von $\langle S_{[fixiert]} \rangle = 89 \pm 26 \text{ nm}$ (siehe Abbildung 9.12).

9.2.4 Interpretation und Hypothesen

Aus den so erhaltenen Daten lassen sich nun zwei wesentliche Folgerungen ableiten, die als Grundlage für zukünftige und weitergehende Messverfahren angesehen werden können.

1. Deutung der biologischen Resultate und Relevanz: Die in den vorangegangenen Abschnitten aufgeführten Ergebnisse aus den Lebendzelluntersuchungen erlauben mit der nachfolgend aufgeführten Mobilitätscharakteristik eine weitergehende Interpretation.

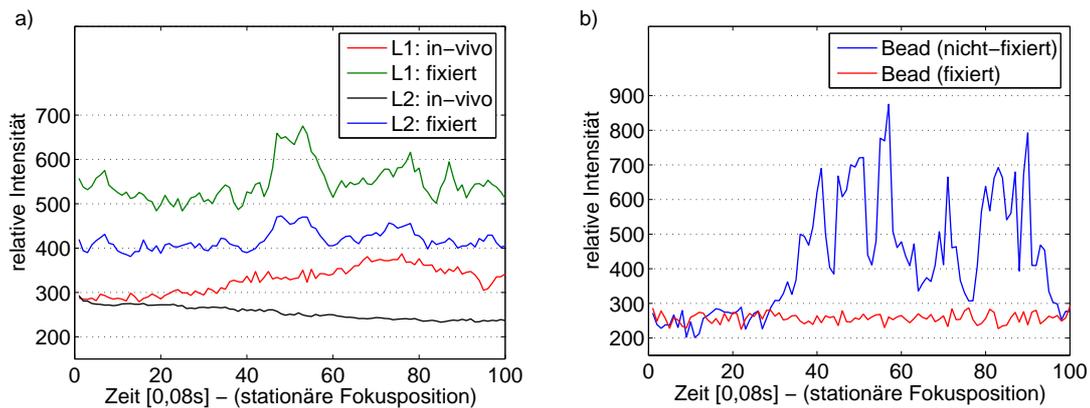


Abbildung 9.13: Bewegungsprofile der mit den axialen Intensitätsprofilen aus Abbildung 9.10 korrespondierenden Loki unter in-vivo Bedingungen und in fixiertem Zustand (a). In (b) sind zum Vergleich die Zeitreihen eines frei beweglichen und eines fixierten Beads dargestellt (NB: identische Skalierung der Intensitätswerte in (a) und (b)).

Hierzu sind in Abbildung 9.13(a) die mit den axialen Intensitätsverteilungen aus Abbildung 9.10 korrespondierenden, vom Hintergrundsignal korrigierten Bewegungsprofile der beiden Loki L1 und L2, jeweils unter in-vivo Bedingungen und in fixiertem Zustand, dargestellt. Die Integrationszeit pro Bild wurde dabei so gewählt, dass die DAQ-Rate derjenigen aus der Objektabtastung entspricht, um die Ergebnisse miteinander in Relation setzen zu können. Zum Vergleich sind in Abbildung 9.13(b) außerdem die Bewegungsprofile eines frei beweglichen und eines fixierten Beads aufgezeigt. Die beiden in-vivo Kurven (rot für L1 und schwarz für L2) zeigen hier zwar eine marginale Drift über den kompletten Beobachtungszeitraum von acht Sekunden, unterliegen aber keinen schnellen Fluktuationen wie z.B. durch das Profil des nicht fixierten Beads gegeben (NB: identische Skalierung der Intensitätswerte). Damit können die in den vorangegangenen Abschnitten getroffenen Annahmen, wonach aufgrund der Modulations-Symmetrie auf eine sehr geringe Objektmobilität geschlossen wurde, bestätigt werden. Der plötzliche Intensitätsanstieg der Signale bei den fixierten Loki (grün für L1 und blau für L2) zum Zeitpunkt $t \approx 3,2$ s (entsprechend Bildnummer 40) ist nicht vollkommen geklärt. Da das Phänomen aber bei beiden Loki zum gleichen Zeitpunkt eintritt, ist davon auszugehen, dass es sich hier um zufällige Schwankungen des Anregungslichts wie z.B. Modensprünge des Lasers handelt.

Damit kann gefolgert werden, dass die (geringe) Objektmobilität den im vorangegangenen Abschnitt ermittelten erheblichen Unterschied in der Modulationstiefe zwischen in-vivo und fixierten Präparaten nicht generieren kann und offensichtlich eine strukturelle Beeinflussung aufgrund des zugegebenen Fixiermediums (Lösung oder Reagenz) statt-

gefunden hat. Unter Berücksichtigung der evaluierten r -Werte würde sich qualitativ ein Größenunterschied $\text{in-vivo} \leftrightarrow$ fixiert von mindestens 30nm ergeben, was einer Zunahme der Kompaktierung der lokalen Sequenz um ungefähr 20% entspräche. Folglich ist ein erheblicher Einfluss der Fixierungsprozedur auf zumindest die lokale Struktur gegeben. Da allerdings davon auszugehen ist, dass dieser Effekt an jedem Ort innerhalb der Zelle die gleiche Wirkung hat, wird sich solch eine strukturelle Änderung höchstwahrscheinlich auf die globale Genomstruktur auswirken.

Die genauen Größenordnungen sind (auch unter Berücksichtigung der vorliegenden Statistik) bis zum jetzigen Augenblick zwar als eher qualitativ anzusehen, dennoch sind diese Ergebnisse konform mit den wenigen bisherigen Studien [52, 42]³ und sollten in weitergehenden Experimenten untersucht und überprüft werden.

2. Prinzipielle Tauglichkeit bezüglich in-vivo SMI-Prozeduren: Unter der Voraussetzung, dass das untersuchte Objekt nur eine marginale Driftcharakteristik aufweist und gleichzeitig ein SNR vorliegt, welches die Etablierung maximalster DAQ-Raten ermöglicht, können prinzipiell Intensitätsprofile akquiriert werden, die als sehr vertrauenswürdig eingestuft werden können. Wenngleich mit solchen Profilen noch immer keine absoluten, quantitativen Größenangaben gemacht werden können, erlaubt dieses mikroskopische Verfahren zumindest die Bereitstellung von Erkenntnissen bezüglich tendenzieller struktureller Eigenschaften subnuklearer Komplexe unter Lebendzellaspekten.

³Diese beziehen sich allerdings vornehmlich auf die Auswirkungen hinsichtlich der kompletten Zellstruktur und nicht wie hier vorgestellt auf subchromosomale Komplexe.

Kapitel 10

Diskussion und Ausblick

10.1 Zusammenfassung

Im Rahmen dieser Arbeit konnte erfolgreich ein komplett neues SMI-Mikroskop in einer vertikalen Anordnung, das sogenannte Vertico-SMI-Mikroskop (Vertico-SMI) realisiert werden. Der grundlegende Gedanke hinter dieser Konzeption war zum Einen gegeben durch eine geforderte Adaption der bereits durch den ersten SMI-Prototypen standardisierten Techniken auf vitale biologische Systeme zur Umsetzung von Lebendzellmessungen. Zum Anderen wurde dieser Aufbau so verwirklicht, dass er als letzte experimentelle Entwicklungsstufe im Hinblick auf eine kommerzielle Verwertbarkeit angesehen werden kann. Mit Beendigung dieser Arbeit stellt das Vertico-SMI bereits ein routinemäßig zum Einsatz kommendes Gerät für biologische Anwendungen zur Untersuchung struktureller Eigenschaften weit unterhalb der konventionellen Beugungsbegrenzung dar, wenngleich noch einige Fragestellungen hinsichtlich in-vivo Prozeduren zu beantworten sind (siehe folgende Abschnitte). Diese Problematik ist allerdings nicht systembedingt, sondern gilt prinzipiell für jedes beliebige höchstauflösende Verfahren, da diese Neuentwicklungen völlig neue Einblicke in die Architektur biologischer Nanosysteme erlauben, wodurch auch komplett neue, grundlegende Beschreibungen erforderlich werden.

Während der Aufbauphase des Vertico-SMI wurden sämtliche Komponenten des Systems, d.h. die Objektpositioniereinheiten, piezoelektrische Aktuatoren und optische Konfiguration des Interferometers und des Detektionsstrahlengangs, unter Berücksichtigung der kompakten Geometrie der Basiskonstruktion optimal aufeinander abgestimmt. Dies beinhaltete unter anderem eine vernünftige Positionierung der Präparate im Objektraum zwischen den beiden Objektiven und die Implementierung einer hochpräzisen (Realzeit-) Kalibrationsprozedur des piezoelektrischen Aktuators, der für die Objektabtastung eingesetzt wird. Eine wesentliche Anforderung zur Umsetzung von Lebendzellmessungen ist implizit mit sehr hohen Datenakquisitionsraten verknüpft, um den destruktiven Einfluss intrazellulärer Objektmobilität auf das Detektionssignal auf ein Minimum zu reduzieren. Sehr hohe Abtastraten von bis zu unter zwei Sekunden für einen kompletten 3-dimensionalen Datenstapel mussten dennoch die geforderten Kriterien von hoher Stabilität und Linearität erfüllen. Weiterhin mussten die Hardware-Komponenten über geeignete Programmroutinen angesprochen werden, wobei für die Ansteuerung der für die Datennahme wesentlichen Einheiten, d.h. CCD-Kamera und piezoelektrische Aktuatoren, im Wesentlichen auf eine schon vorhandene Software-Architektur zurückgegriffen werden konnte, die bereits am er-

sten Prototypen erfolgreich eingesetzt wird [7]. Hierzu mussten für den Fall von nicht korrespondierenden Hardware-Komponenten lediglich einige neue Programm-Module implementiert werden. Für die Umsetzung von Lebendzell-Messungen wurde außerdem eine geeignete Inkubatorkammer konzipiert, mit der eine stabile Temperatur bis zu etwa 50°C etabliert werden kann. Ergänzt wird diese in-vivo Instrumentierung durch den Einsatz zweier unterschiedlicher Observationskammern [54], mit welchen die Zellen während der Messung mit Nährstoffen versorgt werden können.

Die optische Konfiguration des Vertico-SMI erlaubt den problemlosen Einsatz zweier unterschiedlicher Objektiv-Typen. Um eine größtmögliche Anpassung der Brechungsindizes zwischen Detektionsoptik und intrazellulärem Medium im Falle von in-vivo Prozeduren zu gewährleisten, kann das System mit zwei Wasserimmersionsobjektiven hoher numerischer Apertur bestückt werden. Desweiteren stehen zwei Ölimmersionsojektive mit den gleichen optischen Eigenschaften zur Verfügung. Das Interferometer selbst ist derart angeordnet, dass eine minimale Anzahl optischer Komponenten wie Spiegel, Filter, usw. zur Ausbildung des Stehwellenfelds notwendig ist, um zusätzliche optische Effekte, die das Stehwellenfeld und damit das Detektionssignal beeinflussen würden, möglichst zu minimieren. Die Detektionsoptik wurde in ein Röhrensystem eingefügt, das zum Einen das Umgebungslicht fast vollständig ausblendet und zum Anderen eine problemlose Eingliederung zusätzlicher optischer Elemente wie Filter erlaubt. Zur Beleuchtung der Proben stehen zwei Laserlinien mit Anregungswellenlängen von 488nm und 568nm zur Verfügung, die bei Bedarf simultan verwendet werden können.

Die Grundcharakteristik des Vertico-SMI wurde durch Kalibrationsmessungen mit fluoreszierenden Nanokugeln (engl.: *Beads*) unterschiedlicher Größe sowohl bei Raumtemperatur als auch bei erhöhten Temperaturen von bis zu 37°C bestimmt. Zur Analyse der erhaltenen Messdaten konnte hierfür auf einen schon bestehenden Auswertalgorithmus zurückgegriffen werden, der zur Auswertung von SMI-Daten am ersten Prototypen entwickelt wurde [7]. Weiterhin wurden sehr genaue Kalibrationsprozeduren zur Leistungsfähigkeit des Vertico-SMI im Hinblick auf sehr hohe Datenakquisitionsraten, hieraus resultierender Unsicherheiten und zum Einfluss von dynamischen Effekten auf das Detektionssignal durchgeführt. Dies lieferte erste Kriterien zur Vertrauenswürdigkeit einer in-vivo SMI-Punktbildfunktion (engl.: *Point Spread Function (PSF)*) in Abhängigkeit von der verwendeten Abtaststrategie.

Mittels des ersten SMI-Prototypen¹ wurden darüberhinaus strukturelle Untersuchungen an fixierten biologischen Präparaten durchgeführt. Ziel der Messungen war, etwaige Unterschiede in der Konformation zwischen aktiven und inaktiven β -Globin Sequenzen zu extrahieren, womit ein Nachweis hinsichtlich der jeweiligen topologischen Ausprägung gegeben wäre. Nach Beendigung der Aufbau- und Charakterisierungsphase des Vertico-SMI wurden erstmalig semi-quantitative Lebendzelluntersuchungen mit tet-Operator Systemen realisiert, um einerseits wichtige physikalische Eigenschaften des Vertico-SMI, d.h. unter anderem eine prinzipielle Tauglichkeit für in-vivo Prozeduren zu testen und andererseits erste Hinweise auf strukturelle Charakteristika des biologischen Präparats aufzulösen. Im Rahmen dieser Versuchsreihen wurde gleichfalls eine Realzeit-Beobachtung des Fixierungsprozesses der Zellen zur Ermittlung etwaiger, strukturverändernder Prozesse in Folge des Einflusses von Fixierungsmedium, durchgeführt.

¹Dieses Projekt begann zu einem Zeitpunkt, als das Vertico-SMI noch in der Aufbauphase befindlich war.

10.2 Diskussion

Systemeigenschaften

Im Vergleich zum ersten, horizontal auf einem optischen Tisch angeordneten Prototypen des SMI-Mikroskops, erlaubt das Vertico-SMI durch seine vertikale Auslegung eine horizontale Positionierung der biologischen Präparate zwischen den beiden Objektiven. Dies ist unerlässlich zur Realisierung von Lebendzelluntersuchungen, um den Einsatz von Objektiven, die speziellen optischen Anforderungen genügen, zu gewährleisten. Außerdem erfüllt das Vertico-SMI die Anforderungen eines sehr stabilen und kompakten Aufbaus, wodurch z.B. die Implementierung der Inkubator-kammer und zusätzlicher in-vivo Komponenten wie Observationskammern vernünftig umgesetzt werden kann. Allerdings wurde das Vertico-SMI im Vergleich zum ersten Prototypen für weitergehende Anwendungszwecke konzipiert, wodurch völlig neue Systemeigenschaften in Betracht gezogen bzw. identifiziert und definiert werden mussten. Dies beinhaltet im Wesentlichen zwei Aspekte: zum Einen musste eine möglichst schnelle Datenakquisition bei gleichzeitig absolut linearem Verfahrensweg berücksichtigt werden, während sich die Grundcharakteristik des Mikroskops bei erhöhten Temperaturen nicht oder nur marginal ändern sollte. Eine Erhöhung der Umgebungstemperatur auf 37°C ist bei (Langzeit-) Lebendzelluntersuchungen (>30min) unverzichtbar, um eine vorzeitige Apoptose der Zellen zu vermeiden. Zum Anderen impliziert die Aufnahme von dynamischen Objekten die gleichzeitige Abbildung von Bewegungsmustern, deren Parameter lokal variieren und nur in den seltensten Fällen bekannt sind. Erschwerend kommt hier hinzu, dass aufgrund der technischen Begrenzung eine zeitliche Auflösung von sehr schnellen Objektfluktuationen nicht möglich ist. Im Laufe der Arbeit konnte hier die CCD-Kamera, d.h. die maximal mögliche Bildrate bei gleichzeitig hoher Quanteneffizienz in Kombination mit dem erreichbaren Signal zu Rausch Verhältnis (engl.: *Signal to Noise Ration (SNR)*), d.h. im Wesentlichen die Photonenstatistik der Sonde, als entscheidender restriktiver Faktor bestätigt werden. Als Folge muss aus den erhaltenen Intensitätsverteilungen der Einfluss des jeweiligen Bewegungsmusters identifiziert und wenn möglich berücksichtigt werden.

Die grundlegende Charakteristik des Vertico-SMI wurde zuerst unter Normalbedingungen, d.h. bei Raumtemperatur untersucht, indem fluoreszierende Beads mit Durchmessern zwischen 44nm und 200nm für beide Anregungswellenlängen mit Wasser- und Ölimmersionsobjektiven vermessen wurden. Die hier erzielten Ergebnisse sind im Vergleich mit Daten vom ersten Prototypen als sehr gut einzustufen. So konnten unter Verwendung von Ölobjektiven Objektgrößen mit zugehörigen Standardabweichungen für Beads evaluiert werden, die innerhalb der von den Herstellern angegebenen Unsicherheiten (5-15%) lagen. Die Vermessung mit Wasserobjektiven zeigte hier eine etwas schlechtere Größendiskriminierung, woraus sich Standardabweichungen ergaben, die im Mittel etwa 5% über denen der mit den Ölobjektiven akquirierten Daten lagen. Der Grund hierfür lag zum Einen im optischen Design der Wasserobjektive, woraus ein etwas schlechteres SNR resultiert und zum Anderen in der Verwendung von Wasser als Immersionsmedium. Dieses generiert im Vergleich zur Ölimmersion wesentlich stärker ausgeprägte Beugungseffekte, wodurch sowohl die Qualität des Beleuchtungsfelds als auch die des Emissionslichts beeinträchtigt wird. Aufgrund des hieraus resultierenden geringeren Kontrasts und zusätzlicher Unstetigkeiten im Modulationsprofil des Intensitätssignals erhöhen sich die möglichen Freiheitsgrade während der Fitprozedur, woraus sich größere Schwankungen bei der Größenbestimmung ergeben.

Zur Überprüfung der Temperaturstabilität des Vertico-SMI wurden wiederum Beads, in diesem Fall mit Durchmessern von 71-140nm verwendet, um repräsentative Aussagen zu erhalten. Repräsentativ bedeutet hier, dass zu kleine und/oder große Objekte in den Randbereichen des SMI-sensitiven Bereichs mit etwa 30-200nm liegen. Für solche Objekte wäre eventuell nicht eindeutig ableitbar, ob Abweichungen aufgrund thermischer Effekte auftreten oder rein statistischer Natur sind. Bei unterschiedlichen Temperaturstufen von 25/29/33/37°C wurden sowohl Objektgrößen evaluiert als auch die Stabilität der Aluminium-Basiskonstruktion, der Hardware-Komponenten und des Stehwellenfelds bzw. Interferometers untersucht. In Bezug auf die Hardware-Instrumentierung konnten hier, sofern dem Mikroskop vor der Erhöhung auf die nächste Temperaturstufe genügend Zeit zur Adaption gegeben wurde ($\geq 2h$), keine signifikanten Abweichungen festgestellt werden. Allerdings zeigten sich Differenzen während der Temperaturerhöhung, solange das System noch nicht im thermischen Gleichgewicht mit der Umgebung war. Aufgrund der thermischen Ausdehnung sämtlicher Komponenten des Mikroskops kann in diesem Fall die exakte Fokusposition nicht mehr gehalten werden. Der hier beobachtete Effekt lag bei einigen μm pro 4°C. Die evaluierten Beadgrößen zeigten bei sämtlichen Temperaturen die gleichen Standardabweichungen verglichen mit den bei Raumtemperatur diskriminierten Werten. Unter der Voraussetzung einer vernünftigen Versuchsanordnung, d.h. insbesondere der Etablierung eines adäquaten thermischen Gleichgewichts zwischen der Umgebung, der Vertico-SMI Basiskonstruktion, den optischen Komponenten und den Objektpositionier-einheiten, ist eine zusätzliche, durch thermische Effekte bedingte Unsicherheit also nicht gegeben.

Die so erhaltene Grundcharakteristik des Vertico-SMI zeigt, dass auf SMI-Techniken basierende Methoden relativ unempfindlich gegenüber äußeren Einflüssen wie einer erhöhten Temperatur sind. Der Grund hierfür liegt hauptsächlich in der sehr einfachen optischen Konfiguration des Aufbaus, wodurch störende Effekte keinen zu starken Einfluss auf die Beleuchtungsstruktur haben. Ein weiterer Grund ist durch das SMI-Prinzip selbst gegeben: bei erhöhter Temperatur ändern sich die physikalischen Eigenschaften der einzelnen Komponenten. So ändert sich z.B. die Viskosität des Immersionsmediums und damit dessen Brechungsindex, wodurch die optische Abbildung beeinträchtigt und die effektive numerische Apertur der Objektivs sinkt. Resultierend kann die theoretisch erreichbare Auflösung, im Sinne der üblich verwendeten Definition über die Halbwertsbreite des Intensitätssignals, nicht mehr erreicht werden. Da dieses Kriterium beim herkömmlichen SMI-Verfahren aber nicht zur Erhöhung des Informationsgehalts verwendet wird, ist dieser Effekt für Größenbestimmungen subchromosomaler Strukturen im Gegensatz zu anderen Mikroskopietechniken unerheblich. Zu beobachten ist hier lediglich eine marginale Veränderung der Abstände der Wellenfronten des Stehwellenfelds in Abhängigkeit von der Temperatur. Dieser Effekt liegt durch Betrachtungen der Modulationstiefe bei weniger als 10%, also unterhalb der vom System gegebenen Unsicherheit. Ein weiterer Vorteil der SMI-Methode ist durch die herkömmliche Weitfeld-Detektion gegeben, wodurch die komplette Bildebene instantan abgebildet wird und nicht erst zeilen- und spaltenweise abgerastert werden muss. Dies bringt gerade für Hochgeschwindigkeitsmessungen zur Akquirierung von 3-dimensionalen in-vivo Datenstapeln enorme Vorteile gegenüber konfokalen Techniken wie dem 4Pi-Mikroskop. Ein weiterer erheblicher Vorteil der (in-vivo) SMI-Mikroskopie äußert sich in der Verwendung von konventionellen biologischen Präparaten. Techniken wie die 4Pi- oder I⁵M-Mikroskopie stellen demgegenüber wesentlich strengere Anforderungen.

Mit erreichten Datenakquisitions-Zeiten von unter zwei Sekunden für einen 3-dimensionalen Datenstapel sind erste prinzipielle Anforderungen für Lebendzelluntersuchungen erfüllt. Nichtsdestotrotz muss der Einfluss diffusorischer Effekte von Objekten bekannter Form und Größe auf das Intensitätssignal charakterisiert werden, um grundlegende Referenzen bezüglich der prinzipiellen Ausprägung solcher Phänomene zur Verfügung zu haben. Hierfür wurden frei bewegliche 100nm Beads, die unterschiedliche Diffusionsparameter aufwiesen, mit unterschiedlichen Abtastraten analysiert, um einen direkten Vergleich zwischen Objektmobilität und Datenakquisitions-Zeit zu erhalten. Die wesentlichen Ergebnisse hieraus mündeten schließlich in der Formulierung von neuen, qualitativen Kriterien zur Vertrauenswürdigkeit einer in-vivo SMI Intensitätssignatur. Um eine zumindest qualitativ objektive Beurteilung der Objektstruktur zuzulassen, dürfen keine zu stark ausgeprägten Unstetigkeiten im Modulationsprofil enthalten sein. Dies impliziert gleichermaßen, dass das betrachtete Objekt einerseits keiner zu starken Eigendynamik unterliegt, während andererseits eine notwendige Anforderung durch eine möglichst schnelle Objektabtastung gegeben ist. Eher schwache Kriterien in diesem Zusammenhang sind gegeben durch die Halbwertsbreite und etwaige Asymmetrien des Profils. Wie aus rein theoretischen Überlegungen zu erwarten, vergrößert sich der evaluierte Durchmesser eines frei beweglichen Objekts aufgrund der Verschmierung proportional mit dessen Mobilität. Insgesamt konnte aber gezeigt werden, dass folgende, grundsätzliche Betrachtungen zur in-vivo SMI-Mikroskopie ihre Gültigkeit haben:

- Sofern das untersuchte Objekt Dimensionen innerhalb des SMI-sensitiven Bereichs und zusätzlich keine zu starke Eigendynamik aufweist, ist eine Modulation detektierbar.

Mit dem eingeführten Begriff der Modulations-Symmetrie, welche ein Maß für die Vertrauenswürdigkeit eines in-vivo SMI-Profiles definiert, lässt sich dies folgendermaßen erweitern:

- Unter dem Vorliegen einer adäquaten Modulations-Symmetrie ist eine zumindest qualitativ vertrauenswürdige Größenabschätzung hinsichtlich der Argumentation über die Modulationstiefe möglich.

Mit diesen Ansätzen können diffusorische Anteile des Bewegungsmusters prinzipiell identifiziert und je nach Ausprägung berücksichtigt werden. Allerdings wurden hier keine schnellen Fluktuationen, wie sie z.B. in Biopolymeren wie der DNA vorkommen, betrachtet. Deren Einflüsse können nicht aufgelöst werden, weshalb diese auch in absehbarer Zeit nicht identifiziert und in die Kalkulationen zur Größenbestimmung einbezogen werden können.

Prinzipielle Eignung für in-vivo Applikationen

Zur Etablierung einer ersten in-vivo Versuchsreihe am Vertico-SMI wurden GFP (engl.: *Green Fluorescent Protein (GFP)*) markierte tet-Operator Sequenzen verwendet, die erste Aussagen bezüglich Lebendzellprozeduren ermöglichten. Das Mikroskop wurde dabei unter standardmäßigen in-vivo Bedingungen, d.h. bei einer Temperatur von 37°C betrieben und die Zellen mittels der Observationskammern ständig mit Nährstoffen versorgt. Die aufgenommenen Profile zeigten hier, sofern ihre Ausdehnung nicht weit oberhalb des SMI-sensitiven Bereichs lag, eine in der Regel vernünftige Modulationsstruktur. Dies ließ darauf schließen, dass die hier untersuchten Objekte keiner zu starken Eigendynamik unterliegen; ein Sachverhalt, der schließlich durch die Akquirierung von Bewegungsprofilen, woraus eine

nur marginale Driftcharakteristik abzuleiten war, bestätigt werden konnte. In Kombination mit sehr hohen Datenakquisitionsraten konnten somit sehr vertrauenswürdige Abschätzungen zur Modulationstiefe der analysierten Loki unter in-vivo Bedingungen getroffen werden. Weiterhin wurde eine Realzeit-Beobachtung des Fixierungsprozesses durchgeführt, indem während des laufenden Experiments Fixierungsmedium in das Observationsvolumen gepumpt und der Vorgang der Fixierung kontinuierlich an einer gezielt ausgesuchten Zelle beobachtet wurde. Hier zeigte sich eine signifikante Erhöhung der Modulationstiefe und damit eine lokale Änderung/Zunahme der Kompaktierung der betrachteten Sequenz um etwa 20%, was auch durch die Analyse der im Anschluss an die in-vivo Prozedur fixierten Zellen beobachtet werden konnte. Die Intensitätsverteilungen der einzelnen Loki zeigten im Vergleich zu den in-vivo Signaturen eine ausgeprägte Modulation.

Mit Hilfe dieser Ergebnisse konnten zwei wesentliche Aspekte bearbeitet werden. Zum Einen konnte gezeigt werden, dass das Vertico-SMI unter dem Vorliegen von geeigneten Untersuchungsobjekten, d.h. hinsichtlich ihrer Driftcharakteristik und dem erreichbaren Signal zu Rausch Verhältnis, wodurch maximalste Datenakquisitionsraten etabliert werden können, in der Lage ist, vertrauenswürdige Intensitätsprofile in vitalen Systemen aufzunehmen. Zum Anderen lieferten die biologischen Ergebnisse deutliche Hinweise auf einen signifikanten Einfluss des Fixierungsmediums auf zumindest die in dieser Arbeit untersuchte lokale Struktur. Allerdings ist davon auszugehen, dass sich dieser Effekt an jedem Ort innerhalb der Zelle auswirkt, weshalb eine Veränderung der globalen Genomstruktur aufgrund des destruktiven Einsatzes von Fixierungsprotokollen zumindest in Betracht gezogen werden muss. Da bis zum jetzigen Zeitpunkt ein Großteil der Experimente bezüglich Fragestellungen zu subchromosomalen Strukturen mit Hilfe von fixierten biologischen Präparaten durchgeführt wurde (und in sehr großem Umfang immer noch wird), sollten die hier gewonnenen Resultate mit Hilfe neuer Ansätze weitergehend untersucht werden, damit die Auswirkungen der Fixierung auf die (intrinsische) Zellkernarchitektur vernünftig eingeschätzt werden können.

10.3 Perspektiven

An dieser Stelle werden keine Maßnahmen erläutert, die sich auf allgemeine Erweiterungen der „konventionellen“ SMI-Technik beziehen wie z.B. der Implementierung einer zusätzlichen, lateral strukturierten Beleuchtung im Objektraum (augenblicklich in der Entwicklungsphase). Vielmehr werden hier spezifisch für das Vertico-SMI bzw. allgemein für die in-vivo SMI-Mikroskopie mögliche, neue Konzepte vorgestellt, die im Rahmen zukünftiger Projekte verwirklicht werden könnten.

Vertico-SMI Basiskonstruktion: Das zentrale Element für eine optimale Datenerfassung bei Lebendzelluntersuchungen ist gegeben durch das Zusammenspiel zwischen der Geschwindigkeit bei der Objektabtastung (piezoelektrischer Aktuator), der CCD-Kamera (Quanteneffizienz kombiniert mit hohen Bildraten) und der Qualität der eingesetzten Sonde im Hinblick auf die Anzahl emittierter Photonen. Unterliegt eine dieser Komponenten einer ungenügenden Effizienz, so wird die komplette Prozedur unterbrochen, weshalb in allen hier aufgeführten drei Bereichen erhebliche Verbesserungen erzielt werden müssen.

Die Qualität der Sonde spielt hierbei eine zentrale Rolle, da insbesondere bei in-vivo Messungen ein in der Regel sehr hoher Hintergrund aufgrund von Eigenfluoreszenz des Zy-

toplasmas vorhanden ist. Diese Problematik könnte durch den zukünftigen Einsatz von Quantum Dots in lebenden Zellen drastisch entschärft werden. Gleiches gilt für die CCD-Kameras, da mittlerweile verfügbare Modelle die Anforderungen von sehr hohen Bildraten in Kombination mit einer guten Quanteneffizienz erfüllen. Eine hohe Geschwindigkeit bei der Objektabtastung ist demgegenüber auch abhängig von einer sehr hohen Stabilität und damit verknüpft dem Einsatz speziell ausgelegter Positioniereinheiten, an die wiederum die Geometrie des Mikroskops angepasst werden muss.

Obwohl das Vertico-SMI in seiner augenblicklichen Geometrie und Konfiguration als erster SMI-Prototyp zur Lebendzelluntersuchung absolut geeignet ist, haben sich im Laufe dieser Arbeit einige wichtige Aspekte ergeben, die für ein etwaiges Nachfolgemodell berücksichtigt werden sollten. Die Stabilitätseigenschaften der augenblicklichen Anordnung der Objektpositioniereinheit bzw. damit korreliert des piezoelektrischen Aktuators zur axialen Objektabtastung könnten in diesem Zusammenhang durch den Einsatz neuester Generationen von Nanopositioniereinheiten erheblich gesteigert werden. Hieraus resultierend ergäben sich, ein vernünftiges SNR vorausgesetzt, erhebliche Verbesserungen bezüglich maximaler Abtastraten. Ein sinnvoller Ansatz wäre hier die Implementierung einer 3-Achsen Nanopositioniereinheit mit hoher Auflösung und großem effektiven Verfahrbereich in Form eines Torus² bei gleichzeitigem Verzicht auf jegliche Schrittmotoren. Durch solch eine toroidale Geometrie würde eine maximale Stabilität des Objektträgers bzw. der Observationskammer im Objektraum erreicht. Außerdem könnten durch die flexible 3-Achsen Steuerung etwaige Verkippungen im Stehwellenfeld problemlos und hochpräzise ausgeglichen werden. Der Einsatz eines solchen Systems würde allerdings eine komplette Neukonzeption des Mikroskops bedeuten, bei dem die Geometrie der Basiskonstruktion durch die Positioniereinheit vorgegeben wird. Zur Positionierung des Präparats im Piezo/Objektraum könnte ein Objektiv mittels präziser Schrittmotoren vollautomatisch aus der interferometrischen Anordnung fahren und nach dem Einbringen der Probe in seine Ursprungsanordnung zurückkehren. Diesbezüglich wäre auch eine Erhöhung der Stabilität des optischen Strahlengangs mittels einer dreieck-förmigen Anordnung des Interferometers vorstellbar, was mit dem augenblicklichen Aufbau nicht realisierbar ist. Dies würde gleichzeitig die Anzahl an optischen Elementen verringern und damit wiederum zu einer Verringerung von störenden, optischen Effekten führen. Außerdem sollte das Design des Mikroskops so vollzogen werden, dass problemlos eine zweite CCD-Kamera zur simultanen, multispektralen Detektion angeschlossen werden kann, was die Aufnahmezeit bei komplexeren biologischen Fragestellungen wiederum um mindestens einen Faktor zwei reduzieren würde.

Eine weitere Option bestünde in der Implementierung von automatisierten Datennahmesequenzen in die Steuersoftware der Hardware-Komponenten, wodurch zum Einen Langzeit-Experimente über die Dauer von einigen Tagen und zum Anderen komplexe Aufnahme-prozeduren realisiert werden könnten. Ein gleichzeitiges, Rechner-gestütztes Ansprechen von externen Einheiten wie des Perfusors oder der Temperatureinheit würde die experimentellen Möglichkeiten weiter erhöhen.

Datenanalyse: Die augenblicklich vordringlichste nächste Entwicklung sollte in eine ausgiebige, weitergehende Untersuchung und Beurteilung der Auswirkungen von Bewegungsmustern auf das Intensitätssignal münden. Um Strukturaussagen mit Hilfe des Modulationsprofils auf eine quantitativ fundierte Basis stellen zu können, müssen theoretische

²Modelle mit solchen Geometrien sind bereits erhältlich.

Verfahren erarbeitet werden, die in der Lage sind, spezifische Bewegungsmuster in Abhängigkeit von „äußeren“ Parametern wie Abtastrate, Brechungsindexvariationen, usw. objektiv zu identifizieren. Auf Grundlage eines wahrscheinlichen Bewegungsprofils des Objekts könnte hieraus eine Extrapolation der wahren Modulationssignatur bzw. damit korreliert der Objektgröße erzielt werden.

Biologische Anwendungen: Abgesehen von standardmäßigen in-vivo Untersuchungen biologischer Präparate zur Vermeidung des Einsatzes von destruktiven Fixierungsprotokollen, ist eine Vielzahl von möglichen Fragestellungen in diesem Sektor denkbar. So könnten in Realzeit dynamische Prozesse aufgelöst und damit wichtige Charakteristika zur Zellphysiologie beantwortet werden: durch eine energieabhängige Analyse von subchromosomalen Strukturen könnten sowohl physikalische Eigenschaften des Vertico-SMI als auch mögliche topologische Änderungen nuklearer Komplexe untersucht werden. Hierzu müsste nach einer standardmäßigen Beobachtung der Probe ATP hemmendes Medium in das Observationsvolumen gegeben werden, wodurch sich die dynamischen Eigenschaften und damit die lokalen Konformationen ändern sollten. Aufgrund der Reversibilität dieses Prozesses, könnte nach einer solchen Untersuchung das ATP hemmende Medium wieder entfernt und eine Rückbildung dieser Auswirkungen beobachtet werden. Von sehr großer Bedeutung wäre auch eine Fortführung der in dieser Arbeit begonnenen Analysen zur Auswirkung des Fixierungsprozesses, d.h. Realzeit-Beobachtungen dieses Vorgangs. Neben den reinen Größenbestimmungen wären auch genaue Distanzmessungen von höchstem Interesse, da sich eine globale Strukturveränderung aufgrund der Fixierung mit großer Wahrscheinlichkeit auch auf relative Distanzen auswirken wird. Weiterhin könnten dynamische Parameter von sich schnell bewegenden Objekten in zumindest einer Dimension sehr genau aufgelöst werden, indem dieses nicht abgetastet sondern stationär in der Fokusebene gehalten wird. Aufgrund der Eigenmobilität wird sich das Objekt durch das Stehwellenfeld bewegen und damit eine sehr exakte Abbildung seines Bewegungsprofils hinterlassen, wodurch z.B. Diffusionsparameter sehr genau bestimmt werden könnten.

Kombination mit neuesten Techniken: Das erst kürzlich neu entwickelte Verfahren PALM (engl.: *Photoactivated Localization Microscopy*) [12] erlaubt eine Auflösung bis in den molekularen Bereich, indem die Eigenschaften von photoaktivierbaren oder schaltbaren Fluorophoren konsequent ausgenutzt werden. Statt der gewöhnlichen optischen Auflösungsbegrenzung unterliegt man hier lediglich der Lokalisationsgenauigkeit einzelner Moleküle, die stochastisch aktiviert und dadurch mit großer Wahrscheinlichkeit optisch isoliert detektiert werden können. Als Folge dieses iterativen Prozesses muss allerdings eine sehr große Zahl von einzelnen Bildebenen miteinander kombiniert werden, um das Gesamtbild nachträglich zu extrapolieren. Für realistische Lebendzelluntersuchungen ist aus diesem Grund eine erhebliche Anforderung durch eine sehr schnelle Datennahme gegeben. Dies stellt besondere Bedingungen an die eingesetzten Fluorophore, die zum Einen eine vernünftige Photonenstatistik liefern müssen, um eine präzise Lokalisation zu gewährleisten und zum Anderen keine zu großen Lebensdauern aufweisen sollten, um die einzelnen Aufnahmesequenzen zu beschleunigen. Diese Probleme werden aber mit Sicherheit in absehbarer Zeit gelöst werden, wodurch weitere Anwendungsfelder für PALM zugänglich werden. So wäre z.B. eine Kombination dieses Verfahrens mit dem (Vertico-) SMI-Mikroskop denkbar, um mit Hilfe der strukturierten Beleuchtung die Lokalisationsgenauigkeit noch weiter zu erhöhen. In Kombination mit 3-dimensionalen PALM-Techniken, die im Augenblick

durch Zweiphotonenanregung realisiert werden, und der zusätzlichen Implementierung einer lateral strukturierten Beleuchtung am (Vertico-) SMI-Mikroskop, könnten effektive 3-dimensionale Auflösungen bis in den Bereich von wenigen Nanometern realisiert und durch die Verwendung eines weiter entwickelten Vertico-SMI auf Lebendzellprozeduren erweitert werden.

Anhang A

CAD-Modell

In diesem ersten Anhang werden die grundlegendsten Konstruktionen des Vertico-SMI vorgestellt. Wie schon in Kapitel 7 ausführlichst erläutert, bestand eine wesentliche Anforderung in einer exakten, maßstabsgetreuen Vorabentwicklung des Vertico-SMI, um sowohl die optischen Komponenten zur genauen Strahlführung und Definition des Interferometers, den Objektraum usw. als auch die Hardware wie Schrittmotoren, piezoelektrische Aktuatoren und CCD-Kamera spezifisch an das Design des Vertico-SMI anpassen zu können. Dies wurde mit Hilfe eines in der kommerziellen Software *SolidWorks* erstellten CAD-Modells in enger Zusammenarbeit mit Dipl. Ing. Werner Stadter von der Hochschule für Angewandte Wissenschaften (HAW) in Hamburg realisiert.

Im Verlauf der Konstruktion haben sich dabei oftmals zwingende Änderungen ergeben, in deren Folge sich z.B. zusätzliche konstruktive Maßnahmen am Interferometeraufbau ergaben. Weiterhin war in der ursprünglichen Planung kein spezieller, kompakter Aluminiumblock für die Detektionseinheit, d.h. zur 3-Achsen-Positionierung der CCD-Kamera vorgesehen, der erst nachträglich unter Berücksichtigung der optischen Achse des Interferometers auf der Basiskonstruktion modelliert wurde. Ein weiteres Beispiel ist durch die Objektpositioniereinheit gegeben: ein ursprünglich vorgesehener Piezo zur axialen Objektabtastung war, wie sich im Verlauf mehrerer Kalibrationsmessungen an eigens dafür aufgebauten Interferometern zeigte, nicht für eine hochpräzise Abtastprozedur wie für das Vertico-SMI gefordert, geeignet. Die Auswahl eines neuen Piezos¹, der eine völlig andere Geometrie im Vergleich zum Vorgängermodell aufwies, erforderte gleichfalls eine komplette Neukonstruktion der Objektpositioniereinheit und damit korreliert eine neuerliche Überarbeitung des Objektraums der interferometrischen Einheit. Wäre die Notwendigkeit, solche Änderungen einzufügen erst *nach* der Fertigstellung der Grundkonstruktion festgestellt worden, hätte dies zu erheblichen Problemen bezüglich einer erfolgreichen Konzeption des Vertico-SMI geführt.

A.1 Basiskonstruktion

Um die Basiskonstruktion erfolgreich zu realisieren, mussten die zum Einsatz kommenden optischen Komponenten wie Spiegel, kinematische Spiegelhalter, 3-Achsen Positionierer für den Strahlteiler, die Konfiguration des Detektionsstrahlengangs, d.h. das Röhrensystem schon vor der eigentlichen Fertigung aus Aluminium bekannt sein. Weiterhin war

¹Das Modell P-621.ZCD, das schließlich auch zum Einsatz kam.

z.B. durch die Lage der optischen Achse schon von vornherein festgelegt, an welcher Position die Einkopplung des Lasers vom optischen Tisch in das Vertico-SMI zu erfolgen hat, um ein möglichst gut definiertes Interferometer und damit Stehwellenfeld ausbilden zu können. Der Referenzpunkt für sämtliche Bauteile wurde dabei durch das Detektionsobjektiv festgelegt, das, im Gegensatz zu allen anderen Einheiten, lediglich über einen einzigen Freiheitsgrad verfügt, d.h. nur in axialer Richtung verstellt werden kann.

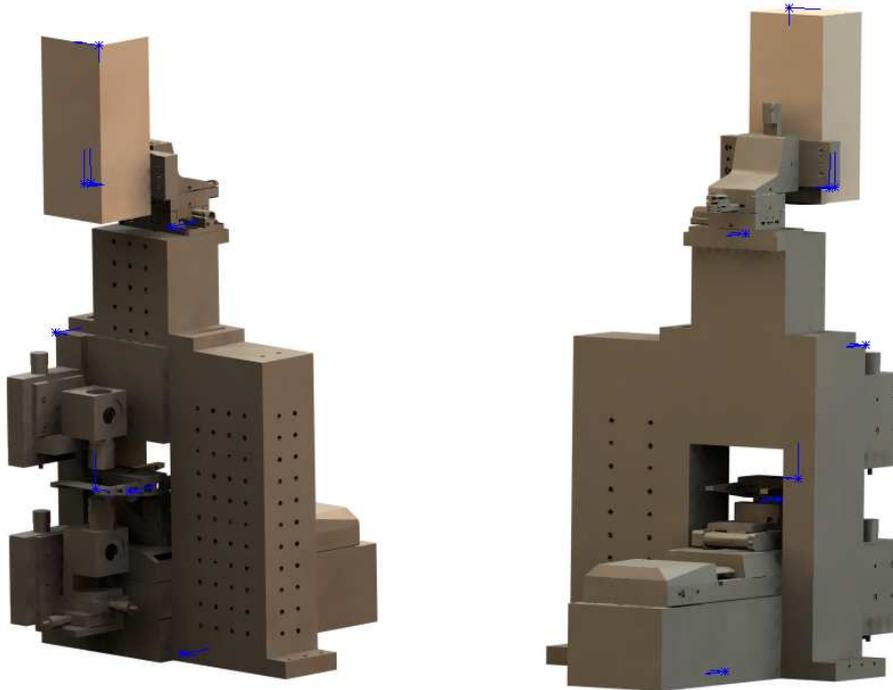


Abbildung A.1: Die endgültige Version des Vertico-SMI in der Vorder- und Rückansicht. Der Referenzpunkt des kompletten Aufbaus wurde mit dem Detektionsobjektiv festgelegt, an welches sämtliche weitere Komponenten der Konstruktion angepasst wurden, um eine optimale Strahlführung unter gleichzeitiger Ausnutzung der maximal möglichen Verfahrbereiche der Objektpositioniereinheit zu gewährleisten.

Abbildung A.1 zeigt die Vorder- und Rückansicht des Vertico-SMI in seiner endgültigen Version als CAD-Modell, wie sie schließlich von der mechanischen Werkstatt des Instituts hergestellt wurde. Diese Version erlaubte schließlich eine optimale Strahlführung des Lasers zur Ausbildung des Stehwellenfelds im Objektraum, wobei gleichzeitig die Ausnutzung der maximal möglichen Verfahrbereiche der Objektpositioniereinheit gewährleistet werden konnte.

Wie im Verlauf dieser Arbeit schon mehrfach erwähnt, stellt die Objektpositioniereinheit bzw. insbesondere die axiale Objektabtastung eine wesentliche Kernkomponente des kompletten Aufbaus dar. Aus diesem Grund wurden schon vor der Fertigstellung der Basiskonstruktion verschiedenste Charakterisierungsstudien unter Verwendung unterschiedlichster Interferometeraufbauten durchgeführt, um die Stabilität dieser Einheit untersuchen zu können. Wie schon zu Beginn des Kapitels erwähnt, wurde die Verwendung des ursprünglich

geplanten Piezo verworfen, nachdem diesbezüglich zu ungenaue Positioniereigenschaften festgestellt wurden. Gleiches gilt für die Konstruktion des Objektträgerhalters: Mehrere der verwirklichten und getesteten Modelle führten zu Instabilitäten während des Betriebs mit dem Piezo, wodurch ersichtlich wurde, dass zum Einen das Gewicht, das durch den Objektträgerhalter auf den Piezo lastet, möglichst klein zu halten ist² und zum Anderen dessen Geometrie so konzipiert sein sollte, dass keine zu starken Gradienten auf den Piezo wirken, welche wiederum zu Instabilitäten bzw. nichtlinearem Einschwingverhalten führen würden.



Abbildung A.2: Der letztendlich zum Einsatz gekommene Objektträgerhalter zusammen mit dem piezoelektrischen Aktuator unterhalb des Trägers: die Konstruktion ist einerseits vollkommen symmetrisch konzipiert, um zusätzliche Gradienten auf den Piezo zu vermeiden und weist andererseits sehr viele Hohlräume auf, wodurch das auf dem Piezo lastende Gewicht auf ein Minimum reduziert werden konnte.

In Abbildung A.2 ist die endgültige Version des zum Einsatz gekommenen Objektträgerhalters auf dem piezoelektrischen Aktuator als CAD-Modell dargestellt. Wie aus der Konstruktion ersichtlich, ist dieser absolut symmetrisch aufgebaut, während gleichzeitig, trotz der notwendigen Verwendung eines knapp 10cm langen Auslegers um ein vernünftiges Ein- und Ausfahren des Objektträgers zu gewährleisten, das Gewicht durch die vielen zusätzlich eingefügten Hohlräume auf ungefähr 130g reduziert werden konnte.

A.2 Inkubatorkammer

Zur Etablierung einer autarken Umgebung für Lebendzelluntersuchungen wurde zuerst eine Vorabversion einer Inkubatorkammer konzipiert, auf deren Grundlage eine endgültige Version von einem kommerziellen Anbieter (Life Imaging Services) solcher Systeme entwickelt wurde. Diese beinhaltet dann die genaue Lage und Anzahl der Anschlüsse zur Luftzufuhr und -abfuhr, wobei von unserer Seite sehr viel Wert auf eine modulare Ausrichtung der Konstruktion gelegt wurde, um eine vernünftige Justage der optischen Elemente durchführen zu können. Grob betrachtet besteht die Kammer aus zwei separaten Einheiten, einem

²Dennoch muss, wie in Kapitel 7 erläutert, der Piezo spezifisch auf das zu tragende Gewicht kalibriert werden.

Vorder- und einem Hinterteil, die über ein getrennt geregeltes Kreislaufsystem verfügen. Bei diesem Design musste wie schon für die Basiskonstruktion sehr genau darauf geachtet werden, dass eine exakte Anpassung an die vorgegebene Geometrie des Vertico-SMI bzw. der Strahlführung, d.h. insbesondere bezüglich der Lasereinkopplung und dem Detektionsstrahlengang gegeben ist.

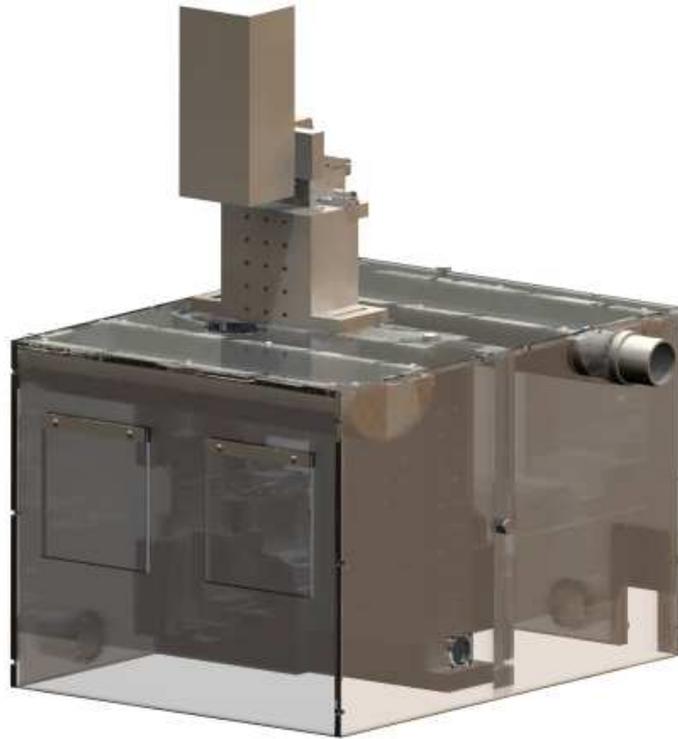


Abbildung A.3: Endgültige Version der Inkubatorkammer dargestellt mit der Basiskonstruktion des Vertico-SMI. Die Kammer besteht aus zwei separaten Modulen, die über ein getrenntes Kreislaufsystem zur Luftzufuhr und -abfuhr verfügen. Die Aussparungen zur Lasereinkopplung bzw. für den Detektionsstrahlengang sind wiederum exakt an die Geometrie bzw. die Strahlführung des Vertico-SMI angepasst.

Abbildung A.3 zeigt die endgültige Version der Inkubatorkammer zusammen mit der Vertico-SMI Basiskonstruktion. Das Einlegen der Probe auf den Objektträgerhalter erfolgt über die beiden an der Vorderseite befindlichen Öffnungen. An der unteren rechten Seite der Kammer ist eine Aussparung zur Lasereinkopplung zu erkennen, dessen Mittelpunkt exakt auf der gleichen Ebene bezüglich der optischen Achse positioniert ist. Gleiches gilt für den Detektionsstrahlengang an der Oberseite des Gehäuses, welches das komplette Röhrensystem aufnehmen muss und gleichzeitig nicht zu groß dimensioniert sein darf, um keine größeren Wärmeverluste zu generieren.

Anhang B

Ansteuerung

In diesem zweiten Teil des Anhangs werden die Hardwarekomponenten zur Objektpositionierung und die piezoelektrischen Aktuatoren mit ihren grundlegenden Spezifikationen aufgeführt (zu Details hinsichtlich der CCD-Kamera siehe nächster Abschnitt). Weiterhin wird hier noch einmal genauer auf die Kalibration des P621.ZCD zur Objektabtastung sowie auf die genaue Prozedur zur Datenakquisition (DAQ) eingegangen.

B.1 Schrittmotoren

Die zur Objektpositionierung ausgewählten Schrittmotoren (Physik Instrumente (PI)) verfügen über eine sehr gute Positioniergenauigkeit mit einer Auflösung von bis zu 7nm, die auch bei Temperaturen von bis zu 50°C gewährleistet ist. Durch eine spezielle, reibungsfreie Lagerung der mechanischen Elemente ist weiterhin eine absolute Positionstreuung gegeben. Dies ist wichtig, da die Schrittmotoren während der eigentlichen DAQ auch unter erhöhten Temperaturen ihre jeweiligen Positionen stabil halten müssen.

	M-505.4DG	M-112.1DG	M-110.1DG	Einheit
Verfahrbereich	100	25	5	mm
Auflösung	0,017	0,007	0,007	μm
Wiederholbarkeit	0,1	0,1	0,1	μm
Genauigkeit/25mm	1	-	-	μm
Maximale Geschwindigkeit	3	1,5	1	mm/s
Maximale Belastbarkeit	100	2	3	kg
Maximale Zug-/Druckkräfte	50 / 50	10 / 10	10 / 10	N
Maximale laterale Kraft	200	10	10	N
Ansteuerung via (Controller)	C-843 PCI-Karte	C-843 PCI-Karte	C-862 extern [RS-232]	

Tabelle B.1: Herstellerangaben bezüglich der technischen Spezifikationen der Schrittmotoren.

In Tabelle B.1 sind die wichtigsten Spezifikationen der Schrittmotoren zur x- (M-505.4DG), y- (M-112.1DG) und z- (M-110.1DG) Achsenpositionierung aufgelistet. Die Ansteuerung erfolgt dabei für die beiden x- und y-Einheiten über eine interne PCI-Karte, während die Regelung der z-Positioniereinheit zum Auffinden der Fokusposition über einen externen Controller via einer RS-232 Schnittstelle erfolgt.

Die Ansteuerung im realen Betrieb erfolgt über die vom Hersteller mitgelieferte Software, die multiple Parametereinstellungen wie z.B. Geschwindigkeit, Verzögerung/Beschleunigung usw. sowie eine spezifische Kalibration von beispielsweise neu festzulegenden bzw. einzuschränkenden Verfahrenswegen erlaubt, wodurch etwaige Kollisionen mit der empfindlichen Optik vermieden werden können.

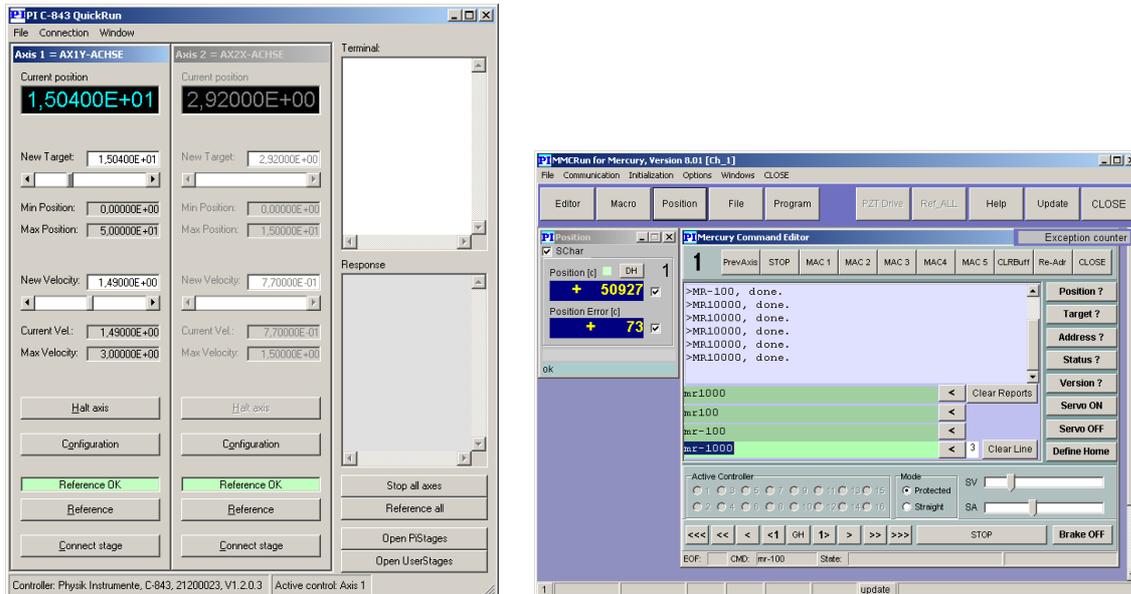


Abbildung B.1: Grafische Oberflächen zur Ansteuerung der Schrittmotoren zur x- (M-505.4DG) und y- (M-112.1DG) (links) und zur z-Positionierung (M-110.1DG) (rechts) mit der 2-Achsenkontrolle via PCI-Karte und der Ansteuerung des externen Controllers über eine RS-232 Schnittstelle.

Abbildung B.1 zeigt hierzu die grafische Oberfläche der beiden Softwaremodule mit der 2-Achsenkontrolle für die x- und y-Positionierung via PCI-Karte (links) und der Ansteuerung des externen Controllers für die z-Einheit (rechts).

B.2 Piezoelektrische Aktuatoren

Im Vertico-SMI werden (wie auch für das horizontale SMI-Mikroskop) zwei piezoelektrische Aktuatoren verwendet. Der Piezo P-753.1CD ist Teil des Interferometers und erlaubt das Verschieben der Wellenfronten des Stehwellenfelds im Objektraum, wodurch z.B. Phasenabtastungen ermöglicht werden, während zur axialen Objektabtastung der P-621.ZCD verwendet wird. Beide Piezos werden im *closed-loop* Modus betrieben, um eine größtmögliche Auflösung, Stabilität und Linearität zu gewährleisten und können Umgebungstemperaturen von bis zu 80°C (P-753.1CD) bzw. 120°C (P-621.ZCD) ausgesetzt werden. Die genauen Spezifikationen der Piezos sind in Tabelle B.2 aufgeführt.

Die Ansteuerung erfolgt dabei extern über zwei Controller via RS-232 Schnittstellen, die mit gewöhnlichen ASCII-Befehlen angesprochen werden. Hierzu wurden zusätzliche Module in die Basissoftware der SMI-Ansteuerung und -Datenakquisition (geschrieben in *Python*) eingefügt, die einfach zu implementierende, zusätzliche Modifikationen erlauben. Abbildung B.2 zeigt hierzu die grafische Oberfläche zur Ansteuerung der beiden Piezos, bei

	P-621.ZCD	P-753.1CD	Einheit
Aktive Achse	z	x	
Verfahrbereich (Open-loop)	140	12	μm
Verfahrbereich (Closed-loop)	100	12	μm
Sensor	kapazitiv	kapazitiv	
Auflösung (Open-loop)	0,2	0,05	nm
Auflösung (Closed-loop)	0,3	0,05	nm
Closed-loop Linearität	0,02	0,03	%
Maximale Belastbarkeit	1	2	kg
Laterale Belastungsgrenze	10	30	N
Resonanzfrequenz (unbelastet)	790	5600	Hz $\pm 20\%$
Resonanzfrequenz (30g Belastung)	500	-	Hz $\pm 20\%$
Resonanzfrequenz (200g Belastung)	-	2500	Hz $\pm 20\%$
Betriebstemperatur	-40..120	-20..80	$^{\circ}\text{C}$
Ansteuerung via (Controller)	E-665 extern [RS-232]	E-665 extern [RS-232]	

Tabelle B.2: Herstellerangaben bezüglich der technischen Spezifikationen der piezoelektrischen Aktuatoren.

denen über gewöhnliche Schieber die jeweiligen Positionen nanometergenau über einen kompletten Verfahrbereich von $12\mu\text{m}$ (P-753.1CD, unterer Schieber („Phase“)) bzw. $100\mu\text{m}$ (P-621.ZCD, oberer Schieber („Object“)) angefahren werden können. Die manuelle Positionsveränderung erfolgt dabei in 10nm-Schritten, während für die automatische DAQ zur Objektabtastung fest eingestellte Schrittweiten über einen zuvor definierten Verfahrbereich verwendet werden.

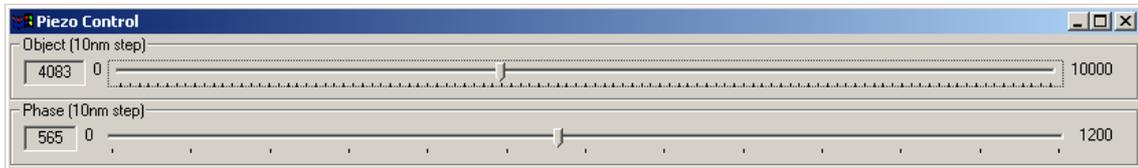


Abbildung B.2: Grafische Oberflächen zur Ansteuerung der Piezos (Objektabtastung („Object“): P-621.ZCD, oberer Schieber / Phasenabtastung („Phase“): P-753.1CD, unterer Schieber). Die manuelle Positionierung erfolgt in 10nm-Schritten über den kompletten Verfahrbereich von $100\mu\text{m}$ (P-621.ZCD) bzw. $12\mu\text{m}$ (P-753.1CD) über externe Controller.

B.2.1 Kalibration des Piezo P-621.ZCD

Wie schon teilweise in Kapitel 7 näher aufgeführt, wurde der Piezo zur axialen Objektabtastung bzw. der zur Ansteuerung verwendete Controller vielfachen Kalibrationsprozeduren unterworfen, die sich zum Einen auf eine spezifische Eichung des zu tragenden Gewichts (Objektträgerhalter) und zum Anderen auf die Feinjustage des Positioniervorgangs durch manuelle Einstellungen des sogenannten *Notch-Filters* in der Controller-Hardware bezogen. Zur genauen Kalibration auf den Objektträgerhalter wurde ein externes Rechtecksignal auf den Controller gegeben und mit Hilfe interner Verstärker so lange nachgeregelt,

bis ein minimales Amplitudenverhalten / minimale Schwingungen bezüglich der ansteigenden Flanke des Rechtecksignals am Oszilloskop festzustellen war. Auf diese Weise konnte das Einschwingverhalten, das Wesentlich ist für eine lineare, stabile und insbesondere sehr schnelle Abtastprozedur, auf wenige μs reduziert werden.

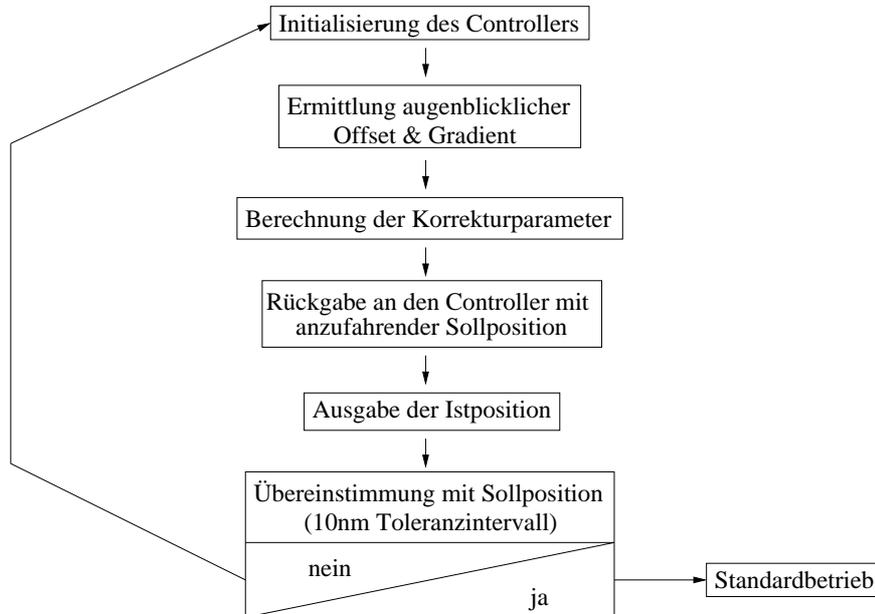


Abbildung B.3: Schematische Darstellung der Initialisierungsprozedur des P-621.ZCD zur axialen Objektastung als Flussdiagramm.

Dennoch waren durch eine nicht hinreichend genaue Kalibration des Herstellers bei jeder Initialisierung des Controllers sehr starke Fluktuationen, eine Gradientenbildung und ein Offset erkennbar (siehe Kapitel 7, Abbildung 7.5(a)). Diese Instabilitäten/Nichtlinearitäten konnten in einer ersten Prozedur beseitigt werden, indem, wie schon in Kapitel 7 beschrieben, die augenblicklichen Werte der abweichenden Parameter bestimmt und hieraus Korrekturfaktoren ermittelt und als konstante Terme in die Kontrollsoftware implementiert wurden. Allerdings stellte sich heraus, dass die Abweichungen bei jeder neuerlichen Initialisierung des Controllers geringfügig voneinander abwichen. Dies erforderte schließlich eine Kalibrationsprozedur, mit deren Hilfe bei jeder Initialisierung die entsprechenden Abweichungen in „Realzeit“ ermittelt und die in die Steuersoftware übergebenen Korrekturen als variable Parameter übernommen werden.

Abbildung B.3 zeigt hierfür ein Flussdiagramm, das schematisch die grundlegenden Prozesse darstellt, die bei der Initialisierung des P-621.ZCD durchlaufen werden: nach der Berechnung der Korrekturparameter wird daraus eine modifizierte Sollposition bezüglich einer anzufahrenden Position an den Controller geschickt. Diese Sollposition wird dann mit dem Istwert der angefahrenen Position verglichen. Für den Fall, dass die Abweichung dieser beiden Werte innerhalb eines Toleranzintervalls von $\pm 10\text{nm}$ liegt wird die komplette Steuersoftware gestartet und der Übergang zum Standardbetrieb ermöglicht. Sollte die Abweichung jedoch zu groß sein, muss eine erneute Initialisierung des Piezos durchgeführt

werden. Je nach der Definition des Toleranzintervalls¹ können bis zu fünf Neuinstallationen erforderlich sein, bevor die gewünschte Genauigkeit bzw. Übereinstimmung zwischen Soll- und Istwert erreicht ist. Die Vertrauenswürdigkeit dieser Prozedur konnte schließlich durch vielfach durchgeführte Versuche an eigens aufgebauten Interferometern zum Test der Stabilität und Linearität verifiziert werden.

B.3 CCD-Kamera

Die Kriterien für die Auswahl der CCD-Kamera des (Vertico-) SMI-Mikroskops bezogen sich auf eine hochempfindliche Detektion des Fluoreszenzlichts, da bei der Untersuchung subchromosomaler Strukturen in der Regel sehr kleine Objekte mit einer entsprechend niedrigen Photonenemission observiert werden. Maximale Quanteneffizienz und geringes Elektronen-/Ausleserauschen waren aus diesem Grund unverzichtbare Eigenschaften (zu Details hinsichtlich der technischen Spezifikationen siehe nachfolgende Tabelle). Mit einer

	Einheit	Bezugspunkt	
Auflösung (hor×ver)	μm^2		1376×1040
Pixelgröße (hor×ver)	μm^2		6,45×6,45
Spitzen-Quanteneffizienz	%	@500nm	62
Dynamischer Bereich (A/D-Konverter)	bit		12
Ausleserauschen	e^- (rms)	@gain high @gain low	4..5 5..6
Bildwiederholrate	fps	ohne Binning Binning 2×2	10,0 19,8
Spektraler Bereich	nm		290..1100
Integrationszeit	s		500ns..3600ns
Binning horizontal	Pixel		1,2,4,8
Binning vertikal	Pixel		1,2,4,8,16
Dunkelstrom	$e^-/\text{Pixel}\cdot\text{s}$	@-12°C	0,1
ROI	Pixel		bis zu 32×32
Betriebstemperatur	°C		+5..+40
Datenschnittstelle			lokaler PCI Bus 132MByte/s
CCD-Betriebstemperatur	°C		-12
Kühlmethode			luftgekühltes 2-Stufen Peltierelement

Tabelle B.3: Technische Spezifikationen der PCO SensiCam QE

maximalen Quanteneffizienz (QE) von bis zu 62% gehört die PCO SensiCam QE zu den sensitivsten CCD-Kameras, die augenblicklich kommerziell erhältlich sind. In Abbildung B.4 ist die spektrale Empfindlichkeit des CCD-Chips in Relation zum Detektionsbereich

¹Je kleiner dieses gewählt ist, desto wahrscheinlicher sind mögliche Abweichungen mit der Folge einer umso längeren Initialisierungsprozedur.

von 200-1100nm gezeigt. Die PCO SensiCam QE wird über eine PCI-Karte angesteuert/ausgelesen, die über einen (Hoch- geschwindigkeits-) faseroptischen Link mit der Kamera verbunden ist. Der CCD-Sensor wird mittels eines Peltierelements auf -12°C heruntergekühlt, um das Elektronen- bzw. Ausleserauschen auf bis zu vier Elektronen (rms) zu begrenzen. Wesentliche Parameter wie augenblickliche Elektronik- und CCD-Chip-Temperatur

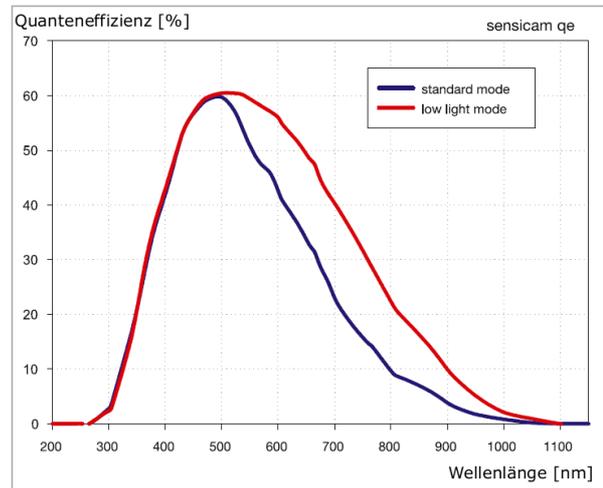


Abbildung B.4: Spektrale Empfindlichkeit der PCO SensiCam QE (Bildquelle: [xx]).

werden im Hauptfenster der grafischen Oberfläche zur Darstellung des Gesichtsfeld des CCD-Chips (siehe Abschnitt B.4) angezeigt. Zur Einstellung der gewünschten Integrationszeit über einen Bereich von 1-10000ms, wird analog zu den piezoelektrischen Aktuatoren wiederum ein Schieber verwendet, der in Abbildung B.5 dargestellt ist.

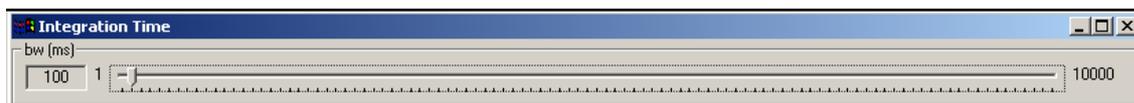


Abbildung B.5: Grafische Oberfläche zur Einstellung der Integrationszeit über einen Bereich von 1-10000ms.

B.4 Datenakquisition

Die komplette Ansteuerung bzw. Datenakquisition des Vertico-SMI erfolgt schließlich über die in Abbildung B.6 als Bildschirmfoto dargestellten grafischen Oberflächen. Die hier gezeigten Module wurden bis auf das Hauptfenster zur Darstellung des Gesichtsfelds des CCD-Chips bereits vorgestellt, welches in diesem Fall eine Schicht von 100nm Beads im Fokus des Detektionsobjektivs zeigt. Mit Hilfe dieser Oberfläche können beispielsweise verschiedene Vergrößerungs- oder Verkleinerungsoptionen angewendet, eine *Region of Interest (ROI)* definiert oder der Vorgang zur automatisierten Datenakquisition (DAQ) gestartet werden. Weiterhin besteht die Möglichkeit zur Akquirierung von Zeitsequenzen, d.h. der Datennahme bei stationär gehaltener Objektpositionier- und Abtasteinheit. Über einen Reiter im Kontrollmenü des Hauptfensters ist *Konsolen-basiert* die direkte Ausgabe des

Python-Initialisierungsmoduls einsehbar, über das gleichfalls Befehlssequenzen eingegeben werden können. Dies ist z.B. zur quantitativen Überprüfung augenblicklicher Ist-Positionen der piezoelektrischen Aktuatoren von Vorteil.

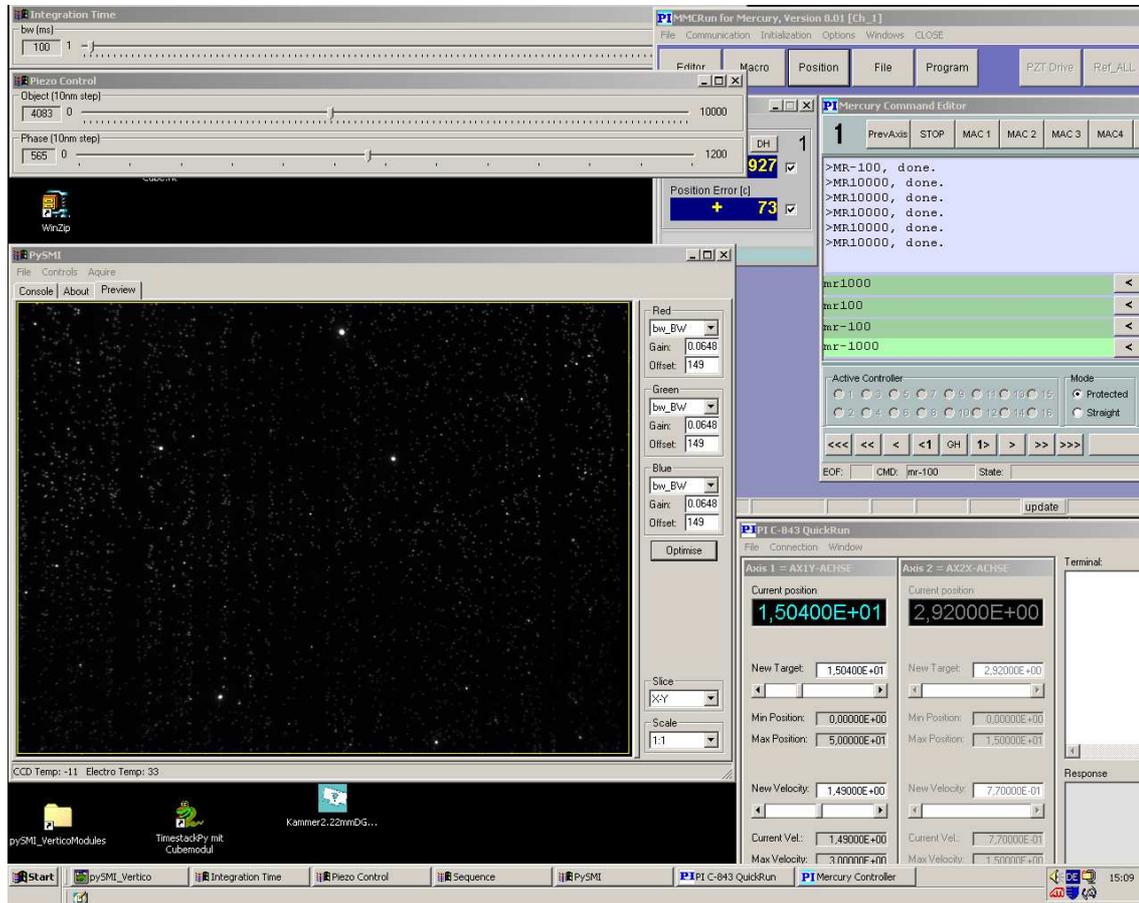


Abbildung B.6: Bildschirmfoto sämtlicher grafischer Oberflächen, die zur Ansteuerung des Vertico-SMI verwendet werden. Zusätzlich zu den bisher aufgeführten Modulen ist das Hauptfenster zur Darstellung des Gesichtsfelds des CCD-Chips zu erkennen, das in diesem Fall eine Schicht von 100nm Beads im Fokus des Detektionsobjektivs zeigt.

Anhang C

Stückliste

In den folgenden Tabellen C.1-C.4 sind sämtliche für das Vertico-SMI verwendeten Bauteile exklusive der schon in Kapitel 7 ausführlich vorgestellten optischen Elemente wie Linsen, Filter, Strahlteiler usw. aufgeführt. Zur besseren Visualisierung bezüglich der

Hersteller	Bestell-Nr.	Typ	Abbildung
Positionierung - Objektive			
Physik Instrumente www.pi.ws	M-106.10	Präzisions-Lineartisch, 5mm, Differential Mikro- meterantrieb	
	M-126.M0	Linearversteller, 25mm, manueller Antrieb	
Positionierung - Phase			
Physik Instrumente www.pi.ws	P-753.1CD	LISA Piezo Nanopositio- niersystem, 12 μ m, kapazi- tiver Sensor, Digital	
	E-665.CR	LVPZT Verstärker und Servocontroller, kapaziti- ve Sensoren, RS-232 (An- steuerung des P-753)	

Tabelle C.1: Stückliste - Positionierung Objektive/Phase.

Verbindung der einzelnen Elemente des in den Tabellen C.3 und C.4 aufgelisteten Röhrensystems, ist in Abbildung C.1 eine Schemazeichnung dargestellt, wobei die Komponenten

Hersteller	Bestell-Nr.	Typ	Abbildung
Positionierung - Objektträger			
Physik Instrumente www.pi.ws	M-505.4DG	Linearversteller, 100mm, DC-Getriebemotor	
	M-112.1DG	Präzisions-Lineartisch, 25mm	
	C-843.21	2-Kanal DC- Motorcontroller, PCI- Karte (Ansteuerung des M-505 und M-112)	
	M-110.1DG	Präzisions-Lineartisch, 5mm	
	C-862.00	Mercury DC- Motorcontroller, RS-232 (Ansteuerung des M-110)	
	P-621.ZCD	PIHera Compact, Verti- cal Piezo Nano Elevation Stage, 100µm, kapazitiver Sensor, Digital	
	E-665.CR	LVPZT Verstärker und Servocontroller, kapaziti- ve Sensoren, RS-232 (An- steuerung des P-621)	
Positionierung - Kamera			
Newport www.newport.com	M-460P-XYZ	Linear Stage	

Tabelle C.2: Stückliste - Positionierung Objektträger/Kamera.

Hersteller	Bestell-Nr.	Typ	Abbildung
Optik - Interferometer			
Newport www.newport.com	M-LP-05A-XYZ	Multi-Axes Lens Positioner (Halter für Einfokussierlinsen)	
Optik - Detektion (Röhrensystem)			
Thorlabs www.thorlabs.com	SM1A9	Camera „C“-Mount Adapter (Anbindung des Röhrensystems an die Kameraöffnung)	
	SM1L10	1“ Stackable Lens Tube, 1“ Deep	
	SM1RR SM2RR	/ Retaining Ring	
	SM1V10	1“ Adjustable Focus	
	SM1A2	SM2 Adapter	
	SM2L20	2“ Stackable Lens Tube, 2“ Deep	
	SM2V10	2“ Adjustable Focus	

Tabelle C.3: Stückliste - Positionierung Interferometer-/Detektionsoptik (Röhrensystem für den Detektionsstrahlengang).

	SM2L30	2" Stackable Lens Tube, 3" Deep	
	SM2T2	2" Lens Tube Coupler	
	SMR2C/M	Slip Ring (Fixierung des kompletten Röhrensystems an der Vertico-SMI Basiskonstruktion)	

Tabelle C.4: (Fortsetzung von Tabelle C.3) Stückliste - Positionierung Interferometer-/Detektionsoptik (Röhrensystem für den Detektionsstrahlengang).

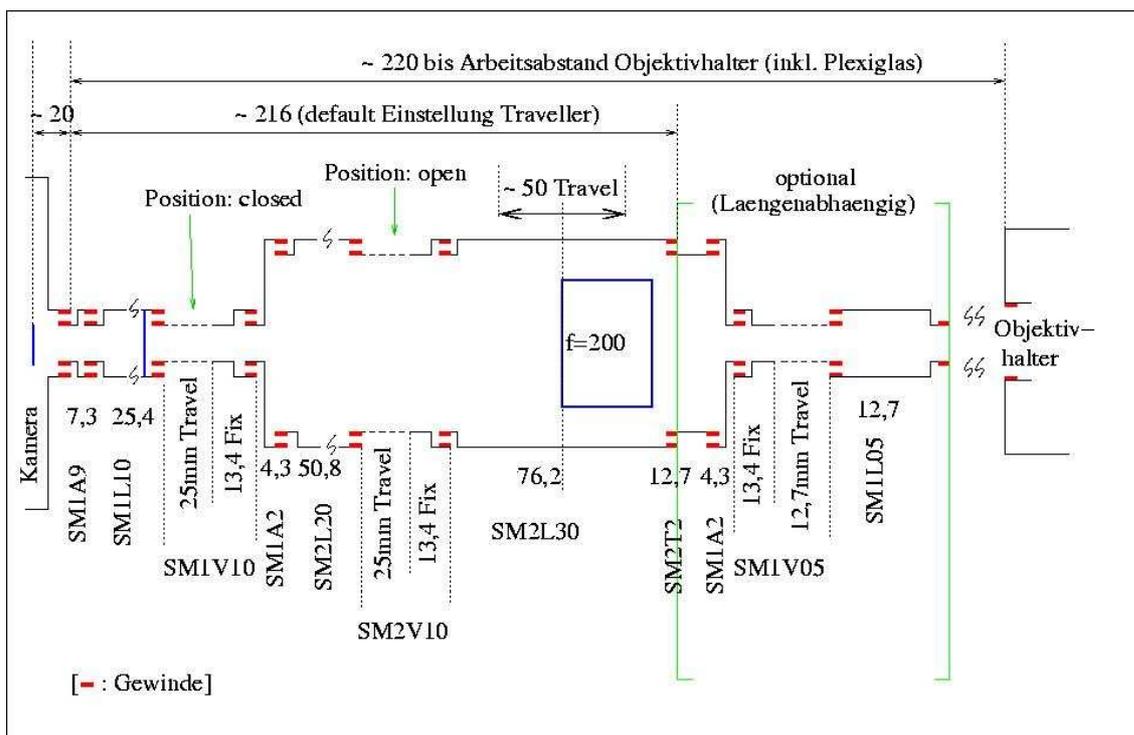


Abbildung C.1: Schematische Darstellung zur Verbindung der Elemente des in den Tabellen C.3 und C.4 aufgelisteten Röhrensystems. Die Komponenten in dem als „optional“ bezeichneten Bereich wurden nicht realisiert. Die Tubuslinse ist über einen speziell gefertigten Adapter mit dem Innengewinde der *SM2L30*-Röhre axial zentriert verbunden, während der Sperrfilter direkt vor dem CCD-Chip platziert und mittels zweier *Retaining-Ringe* (*SM1RR*) in der *SM1L10* Röhre fixiert ist. (Die in der Grafik aufgeführten Größen sind in mm angegeben.)

in dem als „optional“ bezeichneten Bereich nicht realisiert wurden. Die Tubuslinse ist über einen speziell gefertigten Adapter mit dem Innengewinde der *SM2L30*-Röhre axial zentriert verbunden. Mit Hilfe der beiden flexibel justierbaren „Fokuseinheiten“ *SM1V10* und *SM2V10* kann der exakte Abstand der Tubuslinse zum CCD-Chip, d.h. die korrekte Fokussierung sehr einfach vollzogen werden. Zusätzliche optische Elemente wie der Sperrfilter, welcher in der *SM1L10* Röhre direkt vor dem CCD-Chip platziert ist, können problemlos in den passenden Durchmesser des Röhrensystems ($1\frac{1}{2}$ “) eingesetzt und mittels sogenannter *Retaining*-Ringe fixiert werden.

Literaturverzeichnis

- [1] E. ABBE. Beiträge zur Theorie des Mikroskops und der mikroskopischen Wahrnehmung. *Arch. f. mikr. Anat.*, 8:413–468, 1873.
- [2] E. ABBE. Die Leistungsfähigkeit der Mikroskope und ihre Grenzen. *Naturforsch.*, 8(39), 1873.
- [3] B. ALBERTS et al. *Essential Cell Biology: An Introduction to the Molecular Biology of the Cell*. Garland, 1998.
- [4] B. ALBRECHT. *Hochpräzisions-fluoreszenzmessungen mit räumlich modulierter Anregung*. Dissertation, Universität Heidelberg, 2002.
- [5] 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.
- [6] K. ALDINGER, 1993. <http://www.kip.uni-heidelberg.de/AGCremer/mollabel.html>.
- [7] D. BADDELEY. *Precision measurements with SMI and 4Pi Microscopy*. Dissertation, Universität Heidelberg, 2007.
- [8] D. BADDELEY, C. BATRAM, Y. WEILAND, C. CREMER, and U. BIRK. Nanostructure analysis using spatially modulated illumination microscopy. *Nature Protocols*, (2):2640–2646, 2007.
- [9] B. BAILEY, D.L. FARKAS, D.L. TAYLOR, and F. LANNI. Enhancement of axial resolution in fluorescence microscopy by standing-wave excitation. *Nature*, 366(6450):44–48, 1993.
- [10] C. BATRAM. *Hochpräzisionsgrößenmessung und Bestimmung der Topologie subchromosomaler Domänen nach molekularer Markierung unter Berücksichtigung des Einflusses der Zellfixierung*. Dissertation, Universität Heidelberg, 2007.
- [11] G. BAUERSACHS. <http://www.guidobauersachs.de/genetik/bio-ecke.html>.
- [12] E. BETZIG, G.H. PATTERSON, R. SOUGRAT, O.W. LINDWASSER, S. OLENYCH, J.S. BONIFACINO, M.W. DAVIDSON, J. LIPPINCOTT-SCHWARTZ, and H.F. HESS. Imaging Intracellular Fluorescent Proteins at Nanometer Resolution. *Science*, 313(5793):1642, 2006.
- [13] M. BORN and E. WOLF. *Principles of optics*. Pergamon Press New York, 1980.

- [14] H. BORNFLLETH, P. EDELMANN, D. ZINK, T. CREMER, and C. CREMER. Quantitative Motion Analysis of Subchromosomal Foci in Living Cells Using Four-Dimensional Microscopy. *Biophysical Journal*, 77(5):2871–2886, 1999.
- [15] Qiagen Broschüre. *Effectene Transfection Reagent Handbook*. 2001.
- [16] Zeiss Broschüre. *Die konfokale Laser Scanning Mikroskopie - Grundlagen*. 2003.
- [17] J.R. CHUBB, S. BOYLE, P. PERRY, and W.A. BICKMORE. Chromatin Motion Is Constrained by Association with Nuclear Compartments in Human Cells. *Current Biology*, 12(6):439–445, 2002.
- [18] C. CREMER, P. EDELMANN, H. BORNFLLETH, G. KRETH, H. MUENCH, H. LUZ, and M. HAUSMANN. Principles of spectral precision distance confocal microscopy of molecular nuclear structure. *Handbook of Computer Vision and Applications*, 1999.
- [19] T. CREMER and C. CREMER. Chromosome territories, nuclear architecture and gene regulation in mammalian cells. *Nat. Rev. Genet*, 2(4):292–301, 2001.
- [20] T. CREMER and C. CREMER. Chromosome territories, nuclear architecture and gene regulation in mammalian cells. *Nat. Rev. Genet*, 2(4):292–301, 2001.
- [21] M. DAUNE. *Molecular Biophysics: Structures in Motion*. Oxford University Press Oxford, 1999.
- [22] W. DE LAAT and F. GROSVELD. Spatial organization of gene expression: the active chromatin hub. *Chromosome Research*, 11(5):447–459, 2003.
- [23] P. EDELMANN. *Confocal spectral precision distance microscopy for the investigation of the functional 3D structure of the human genome*. Dissertation, Universität Heidelberg, 1999.
- [24] P. EDELMANN and C. CREMER. Improvement of confocal Spectral Precision Distance Microscopy (SPDM). *Proc SPIE*, 3921:313–320, 2000.
- [25] A. EGNER, S. JAKOBS, and S.W. HELL. Fast 100-nm resolution three-dimensional microscope reveals structural plasticity of mitochondria in live yeast. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 99(6):3370, 2002.
- [26] A. EGNER, S. VERRIER, A. GOROSHKOV, H.D. SOLING, and S.W. HELL. 4Pi-microscopy of the Golgi apparatus in live mammalian cells. *J. Struct. Biol*, 147:70–76, 2004.
- [27] A.V. FAILLA, B. ALBRECHT, U. SPÖRI, A. SCHWEITZER, M. BACH, A. KROLL, G. HILDENBRAND, and C. CREMER. Nanostructure Analysis Using Spatially Modulated Illumination Microscopy. *ComplexUs*, 1:77–88, 2003.
- [28] A.V. FAILLA, A. CAVALLO, and C. CREMER. Subwavelength size determination by spatially modulated illumination virtual microscopy. *Appl. Opt*, 41:6651–6659, 2002.
- [29] A.V. FAILLA, U. SPOERI, B. ALBRECHT, A. KROLL, and C. CREMER. Nanosizing of fluorescent objects by spatially modulated illumination microscopy. *Appl. Opt*, 41:7275–7283, 2002.

- [30] Wikipedia. Die freie Enzyklopädie, 2005. <http://de.wikipedia.org/wiki/Bild:Chromosom.svg>.
- [31] J.T. FROHN, H.F. KNAPP, and A. STEMMER. True optical resolution beyond the Rayleigh limit achieved by standing wave illumination, 2000.
- [32] J.T. FROHN, H.F. KNAPP, and A. STEMMER. Three-dimensional resolution enhancement in fluorescence microscopy by harmonic excitation. *Opt. Lett.*, 26:828–830, 2001.
- [33] M. GU. *Principles of Three-Dimensional Imaging in Confocal Microscopes*. World Scientific, 1996.
- [34] H. GUGEL, J. BEWERSDORF, S. JAKOBS, J. ENGELHARDT, R. STORZ, and S.W. HELL. Cooperative 4Pi Excitation and Detection Yields Sevenfold Sharper Optical Sections in Live-Cell Microscopy. *Biophysical Journal*, 87(6):4146–4152, 2004.
- [35] M.G.L. GUSTAFSSON, D.A. AGARD, and J.W. SEDAT. Sevenfold improvement of axial resolution in 3D widefield microscopy using two objective lenses. *Proc. SPIE*, 2412:147–156, 1995.
- [36] M.G.L. GUSTAFSSON, D.A. AGARD, and J.W. SEDAT. 3D widefield microscopy with two objective lenses: experimental verification of improved axial resolution. *Proc. SPIE*, 2655:62–66, 1996.
- [37] M.G.L. GUSTAFSSON, D.A. AGARD, and J.W. SEDAT. I5M: 3D widefield light microscopy with better than 100nm axial resolution. *Journal of Microscopy*, 195(Pt 1):10–16, 1999.
- [38] R. HEINTZMANN and C. CREMER. Laterally modulated excitation microscopy: improvement of resolution by using a diffraction grating. *Proc. SPIE*, 3568:185–195, 1998.
- [39] S. HELL and E.H.K. STELZER. Fundamental improvement of resolution with a 4Pi-confocal fluorescence microscope using two-photon excitation. *Opt. Commun.*, 93:277–282, 1992.
- [40] S. HELL and E.H.K. STELZER. Properties of a 4Pi confocal fluorescence microscope. *J. Opt. Soc. Am. A*, 9(12):2159–2166, 1992.
- [41] S.W. HELL. Strategy for far-field optical imaging and writing without diffraction limit. *Physics Letters A*, 326(1-2):140–145, 2004.
- [42] M.J. HENDZEL and D.P. BAZETT-JONES. Fixation-dependent organization of core histones following DNA fluorescent in situ hybridization. *Chromosoma*, 106(2):114–123, 1997.
- [43] M. HESSE, H. MEIER, and B. ZEEH. *Spektroskopische Methoden in der organischen Chemie*, 5. Auflage, Georg Thieme Verlag Stuttgart, 123(9), 1995.

- [44] G. HILDENBRAND, A. RAPP, U. SPÖRI, C. WAGNER, C. CREMER, and M. HAUSMANN. Nano-Sizing of Specific Gene Domains in Intact Human Cell Nuclei by Spatially Modulated Illumination Light Microscopy. *Biophysical Journal*, 88(6):4312–4318, 2005.
- [45] J. HONERKAMP. *Statistical Physics: An Advanced Approach with Applications*. Springer, 2002.
- [46] J.D. JACKSON. *Klassische Elektrodynamik*. Walter de Gruyter, 2002.
- [47] M.B. JACKSON. *Molecular and Cellular Biophysics*. Cambridge University Press, 2006.
- [48] B. JÄHNE. *Digitale Bildverarbeitung*. Springer, 2005.
- [49] T. JÉGOU. persönliche Mitteilung.
- [50] T. JÉGOU. *Dynamics of telomers in a telomerase negative human osteosarcoma cell line*. Dissertation, Universität Heidelberg, 2007.
- [51] M. KEMNER-VAN DE CORPUT. persönliche Mitteilung.
- [52] S. KOZUBEK, E. LUKASOVA, J. AMRICHOVA, M. KOZUBEK, A. LSKOVA, and J. SLOTOVA. Influence of Cell Fixation on Chromatin Topography. *Analytical Biochemistry*, 282(1):29–38, 2000.
- [53] A.I. LAMOND and OTHERS. Structure and Function in the Nucleus. *Science*, 280(5363):547–553, 1998.
- [54] P. LEMMER. *Optimierung eines SMI-Mikroskops für hochpräzise Größen- und Lokalisationsbestimmungen an in vivo Systemen*. Diplomarbeit, Universität Heidelberg, 2007.
- [55] J. LIPPINCOTT-SCHWARTZ and G.H. PATTERSON. Development and Use of Fluorescent Protein Markers in Living Cells. *Science*, 300(5616):87, 2003.
- [56] M.T. MADIGAN, J.M. MARTINKO, J. PARKER, T.D. BROCK, and W. GOEBEL. *Mikrobiologie*. Spektrum Akad. Verl., 2002.
- [57] S. MARTIN, A.V. FAILLA, U. SPÖRI, C. CREMER, and A. POMBO. Measuring the Size of Biological Nanostructures with Spatially Modulated Illumination Microscopy. *Molecular Biology of the Cell*, 15(5):2449, 2004.
- [58] H. MATHÉE. *Hochpräzisionsmikroskopie mit räumlich strukturierter Beleuchtung und Zweiphotonenanregung*. Dissertation, Universität Heidelberg, 2006.
- [59] H. MATHÉE, D. BADDELEY, C. WOTZLAW, J. FANDREY, C. CREMER, and U. BIRK. Nanostructure of specific chromatin regions and nuclear complexes. *Histochemistry and Cell Biology*, 125(1):75–82, 2006.
- [60] X. MICHALET, F.F. PINAUD, L.A. BENTOLILA, J.M. TSAY, S. DOOSE, J.J. LI, G. SUNDARESAN, A.M. WU, S.S. GAMBHIR, and S. WEISS. Quantum Dots for Live Cells, in Vivo Imaging, and Diagnostics. *Science*, 307(5709):538–544, 2005.

- [61] T. MISTELI. Concepts in nuclear architecture. *BioEssays*, 27(5):477–487, 2005.
- [62] C. MÜNDEL and J. LANGOWSKI. Chromosome structure predicted by a polymer model. *Physical Review E*, 57(5):5888–5896, 1998.
- [63] J. ODENHEIMER, G. KRETH, and D.W. HEERMANN. Dynamic Simulation of Active/Inactive Chromatin Domains. *Journal of Biological Physics*, 31(3):351–363, 2005.
- [64] R.J. PALSTRA, B. TOLHUIS, E. SPLINTER, R. NIJMEIJER, F. GROSVELD, and W. DE LAAT. The β -globin nuclear compartment in development and erythroid differentiation. *Nature Genetics*, 35(2):190–194, 2003.
- [65] J.E. PAWLEY. *Handbook of Biological Confocal Microscopy*. Kluwer Academic Publishers, 1995.
- [66] K. RIPPE. persönliche Mitteilung.
- [67] K.H. RÖHM and J. KOOLMANN. Taschenatlas der Biochemie, 1998.
- [68] B. SCHNEIDER. *Spatially modulated illumination microscopy*. Dissertation, Universität Heidelberg, 1999.
- [69] B. SCHNEIDER, B. ALBRECHT, P. JAECKLE, D. NEOFOTISTOS, S. SÖDING, T. JAEGER, and C. CREMER. Nanolocalization measurements in spatially modulated illumination microscopy using two coherent illumination beams. *Proc. SPIE*, 3921:321–330, 2000.
- [70] D.L. SPECTOR. The dynamics of chromosome organization and gene regulation. *Annual Review of Biochemistry*, 72:573–608, 2003.
- [71] M.R. SPEICHER, S.G. BALLARD, and D.C. WARD. Karyotyping human chromosomes by combinatorial multi-fluor FISH. *Nature Genetics*, 12(4):368–375, 1996.
- [72] U. SPÖRI, A.V. FAILLA, and C. CREMER. Superresolution size determination in fluorescence microscopy: A comparison between spatially modulated illumination and confocal laser scanning microscopy. *Journal of Applied Physics*, 95:8436, 2004.
- [73] U. SPÖRI. *Messungen mit dem SMI-Mikroskop*. Dissertation, Universität Heidelberg, 2004.
- [74] W. STADTER. *Entwicklung und Konstruktion eines Mikroskopaufbaus zur Messung von Oberflächenrauigkeiten an Biomaterial*. Diplomarbeit, Hochschule für Angewandte Wissenschaften Hamburg, 2004.
- [75] B. TOLHUIS, R.J. PALSTRA, E. SPLINTER, F. GROSVELD, and W. DE LAAT. Looping and interaction between hypersensitive sites in the active-globin locus. *Mol. Cell*, 10:1453–1465, 2002.
- [76] C. WAGNER. *Neue Methoden zur Größen- und Formbestimmung von fluoreszierenden Nanostrukturen unter Verwendung der SMI-Mikroskopie*. Dissertation, Universität Heidelberg, 2004.

- [77] J.D. WATSON and F.H.C. CRICK. Genetical implications of the structure of deoxyribonucleic acid. *Nature*, 171(4361):964–967, 1953.

Danksagung

Ohne die Unterstützung von zahlreichen Personen wäre eine erfolgreiche Umsetzung dieser Arbeit nicht möglich gewesen, weshalb ich mich an dieser Stelle herzlich bedanken möchte. Dies gilt insbesondere für:

Prof. Dr. Dr. Christoph Cremer, der mir die Möglichkeit gab, ein neues, hochinteressantes wissenschaftliches Forschungsgebiet kennen zu lernen und für die stete Betreuung und Unterstützung während jeder Phase dieser Dissertation und

Prof. Dr. Markus Sauer für die freundliche und unkomplizierte Aufnahme in seinen Fachbereich ‘Angewandte Laserphysik & Laserspektroskopie’ der Fakultät für Physik der Universität Bielefeld.

Ein ganz besonderer Dank geht an Dr. Udo Birk, der zu jeder Zeit als kompetenter Ansprechpartner, Ideengeber und konstruktiver Kritiker zur Seite stand, wodurch er gleichfalls einen enormen Anteil an meiner persönlichen Entwicklung während der Zeit in dieser Arbeitsgruppe trägt.

Allen physikalisch orientierten Mitarbeitern des Fachbereichs, die mich im Laufe der Jahre begleitet haben, möchte ich ein herzliches Dankeschön aussprechen: Elvira Steinwand, Dr. Stefan Stein, Bianca Reinhardt, Paul Lemmer, Manuel Gunkel, Dr. Hans Mathée, Dr. Gregor Kreth, Dr. Nick Kepper, Heinz Eipel, Dr. Christian Carl, David Baddeley, Margund Bach und Roman Amberger (umgekehrte alphabetische Reihenfolge) und hier insbesondere dem „SMI-Team“, das durch kritisches Hinterfragen, steter Bereitschaft zur Hilfe, fruchtbaren Diskussionen und vielen Problemlösungen immer unterstützend zur Seite stand.

Ebenfalls ein herzliches Dankeschön geht an alle biologisch orientierten Mitarbeiter des Fachbereichs, namentlich: Yanina Weiland, Dr. Jutta Schwartz-Finsterle, Wei Jiang, Patrick Müller und Dr. Claudia Batram (umgekehrte alphabetische Reihenfolge) für die Kenntnissvermittlung vieler biologischer Sachverhalte und das ausdauernde Bereitstellen biologischer Präparate.

Gleicher Dank geht an externe Kollaborationspartner wie Dr. Thibaud Jégou und Dr. Mariëtte Kemner-van de Corput für die Bereitstellung von biologischen Präparaten.

Vielen Dank auch an alle Mitarbeiter der Mechanischen Werkstatt des Instituts für eine sehr konstruktive Zusammenarbeit, die unter anderem zu vielen eleganten Lösungen bei mechanischen Bauteilen geführt hat.

Unabhängig von der wissenschaftlichen Unterstützung und der guten Zusammenarbeit möchte ich mich bei meinen Büro- und Laborkollegen für die stets sehr angenehme Atmosphäre und darüberhinaus bei all denjenigen Personen bedanken, mit denen ich sehr

viele schöne private Gespräche geführt und Exkursionen außerhalb der Wissenschaft unternommen habe, wodurch mir diese Zeit in Heidelberg stets in sehr guter Erinnerung bleiben wird.

Ein weiterer, ganz besonderer Dank geht schließlich an Prof. Dr. Michael Hausmann für die vielen hilfreichen Gespräche in Freiburg im Vorfeld der Dissertation und die Unterstützung während dieser Phase, die letztlich zur Realisierung dieser Arbeit geführt haben, sowie an Manu, die dieser Arbeit mit sehr viel Geduld und Rücksichtnahme gegenüberstand und mich des öfteren davon überzeugen konnte, dass auch noch ein Leben außerhalb der Wissenschaft existiert.

Abschließend möchte ich mich ganz herzlich bei meinen Eltern bedanken, deren andauernde Unterstützung meinen beruflichen Werdegang überhaupt erst ermöglicht hat.

