

# INAUGURAL-DISSERTATION

zur  
Erlangung der Doktorwürde  
der  
Fakultät für Physik  
der  
Universität Bielefeld

vorgelegt von  
**Dipl.-Phys. Roman Amberger**  
aus Hockenheim

Tag der Disputation: 12.06.2008



# Hochauflösende multispektrale Fluoreszenzmikroskopie mit lateralen stehenden Wellen

---

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



## Hochauflösende multispektrale Fluoreszenzmikroskopie mit lateralen stehenden Wellen

Zur Erforschung biologischer Strukturen in Zellen liefert die Fluoreszenzmikroskopie besonders mit ihren innovativen Neuerungen einen wichtigen Beitrag. Im Rahmen dieser Dissertation wurden mehrere Mikroskope zur Verbesserung der lateralen Auflösung in 1D und 2D entwickelt. Es konnte gezeigt werden, dass mit der im Rahmen dieser Dissertation neu entstandenen Methode zur Erzeugung einer bezüglich Periodenlänge und Richtung frei einstellbaren lateralen Struktur in der Objektebene eine Verbesserung der optischen Auflösung um den Faktor zwei gegenüber der klassischen optischen Auflösungsgrenze erreichbar ist. Außerdem konnte gezeigt werden, daß eine Anregung über totale interne Reflexion in dieser Konstruktion möglich ist. Ausführliche physikalische Messungen und Simulationen zur Charakterisierung des Aufbaus sowie erste erfolgreiche biologische Messungen an Aktinfasern wurden durchgeführt. Das neue Mikroskop mit strukturierter Beleuchtung ist zur Klärung biologischer Fragestellungen besonders gut geeignet, da horizontal liegende Objektträger von ihrer Unterseite beobachtbar sind. Für multispektrale Untersuchungen stehen vier Anregungswellenlängen zur Verfügung.

## Multispectral High-Resolution Fluorescence Microscopy Using Laterally Standing Waves

Fluorescence microscopy, especially when considering recent new innovations, has become very important to resolve structures within biological cells. Several microscopes to improve lateral resolution in 1D and 2D have been developed by this thesis. It could be shown that an improvement of the optical resolution by a factor of two can be achieved by the new technique developed here by generating a lateral structure within the plane of the object with a freely selectable fringe distance as well as angular directions. It has been shown that excitation by total internal reflection is also possible using this construction. To characterize the instrument extensive physical measurements on beads as well as simulations were carried out. Furthermore, first successful measurements on biological objects were made. The new microscope offering structured illumination is especially suitable for biological applications since horizontally orientated slides can be observed from below. For multispectral measurements four different excitation wavelengths are available.



# Inhaltsverzeichnis

<b>1 Die Entwicklung der Mikroskopie</b>	<b>1</b>
1.1 Die Position der Mikroskopie in der Forschung . . . . .	1
1.1.1 Der Blick in das Verborgene . . . . .	1
1.1.2 Historische Entwicklung der Mikroskopie . . . . .	2
1.1.3 Stand der Technik . . . . .	3
1.2 Grenzen der Einsetzbarkeit von Mikroskopen . . . . .	5
<b>2 Allgemeine Grundlagen zur höchstauflösenden Mikroskopie</b>	<b>7</b>
2.1 Die Maxwell-Gleichungen . . . . .	7
2.2 Geometrische- und Gaußsche Optik . . . . .	8
2.3 Brechungsindex und Brechungsgesetz . . . . .	11
2.4 Die Totalreflexion . . . . .	12
2.5 Fluoreszenz . . . . .	16
2.6 Auflösung und Detektierbarkeit in der Lichtmikroskopie . . . . .	18
2.7 Lokalisationsmikroskopie . . . . .	22
2.8 Das Objektiv . . . . .	24
2.9 Detektoren für die Lichtmikroskopie . . . . .	27
2.10 Strukturierte Beleuchtung . . . . .	30
2.10.1 Optische Schnittbildung . . . . .	33
<b>3 Betrachtung zu den Aufbauten und deren Justage</b>	<b>35</b>
3.1 2D SW-TIRF mit Prismen-Einkopplung . . . . .	36
3.2 2D SW-TIRF mit Objektiv-Einkopplung . . . . .	38
3.2.1 Der Dove-Prisma Aufbau . . . . .	39
3.2.2 Der Interferometer-Aufbau . . . . .	41
3.3 Justage des objektivbasierten SW-TIRF Aufbau . . . . .	45
<b>4 Mikrofluoreszenz-Koordinator</b>	<b>49</b>
<b>5 Software-Entwicklung</b>	<b>59</b>
5.1 Hardware . . . . .	59
5.2 Strahlgeometrie zur Prisma-Einkopplung . . . . .	60
5.3 Simulation des Dove-Prisma-Strahlengangs . . . . .	61
5.4 Simulation des Interferometer-Strahlengangs . . . . .	62
5.5 Größenbestimmung durch Modulationskontrast . . . . .	63

5.6	Simulation und Rekonstruktion der strukturierten Beleuchtung . . . . .	64
<b>6</b>	<b>Messungen und Ergebnisse</b>	<b>67</b>
6.1	Positionsgenauigkeit der Piezoaktuatoren . . . . .	68
6.2	Bestimmung des Abbildungsmaßstabs von Objektiv und Tubuslinse . . .	71
6.3	Abbildungsmaßstab von Webcam zu PCO Kamera . . . . .	72
6.4	Der UV-Mikrostrahl . . . . .	74
6.5	Analyse der Wellenfront im Objektraum . . . . .	75
6.6	Chromatische Fehler . . . . .	78
6.7	Fluoreszenzanregung mit Totalreflexion . . . . .	79
6.8	Optische Schnitte an biologischen Präparaten . . . . .	81
6.9	Auflösungsverbesserung in einer Richtung . . . . .	83
6.10	Auflösungsverbesserung in der lateralen Ebene . . . . .	85
<b>7</b>	<b>Diskussion und Ausblick</b>	<b>87</b>
<b>8</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>93</b>
<b>A</b>	<b>Teileliste</b>	<b>99</b>
<b>B</b>	<b>Protokoll zum Mikrofluoreszenz-Deckglas</b>	<b>101</b>
<b>C</b>	<b>Protokoll zur Aktinfärbung</b>	<b>103</b>
<b>D</b>	<b>Verwendete Abkürzungen und physikalische Größen</b>	<b>105</b>
<b>E</b>	<b>Danksagung</b>	<b>113</b>



# 1 Die Entwicklung der Mikroskopie

## 1.1 Die Position der Mikroskopie in der Forschung

In der heutigen Zeit ist nicht nur die Erforschung und Beschreibung naturwissenschaftlicher Effekte wichtig, sondern auch die Erforschung jener Ursachen dieser Effekte, welche jedoch meist verglichen mit deren Wirkungen sehr viel kleiner sind. Hier bietet sich die Mikroskopie mit all ihren Variationen als nützliches und unumgängliches Werkzeug an. Speziell in den Bereichen Biologie, Medizin sowie in der Materialforschung findet sie Anwendung. Zum Einen dient sie der direkten Beobachtung, wie dem Einfluß von Pharmaka auf Zellen bzw. Zellgewebe, zum Anderen liefert die Mikroskopie wichtige Daten für die Erstellung neuer theoretischer Modelle sowie zur Optimierung dieser Modelle. Schwerpunkte dieser Modelle sind unter anderem die Abschätzungen von Doppelstrangbrüchen an der DNA aufgrund von hochenergetischer Strahlung [Kre07] sowie die Struktur und Organisation der Zellkernarchitektur [Kre98] [Cre01].

### 1.1.1 Der Blick in das Verborgene

Seit dem 17. Jahrhundert wurden viele grundlegende Erkenntnisse im Bereich der Biologie, Medizin und Physik erzielt. Hierbei ist großteils ein deutlicher Zusammenhang mit den Fortschritten in der Mikroskopie erkennbar. Mittels Mikroskopen wurden u.a. die kapillare Verbindung zwischen Venen und Aterien in Lungenbläschen 1661 von Marcello Malphigi [Sch05] sowie der Blutkreislauf 1665 von William Harvey detailliert beschrieben. Zellen, Blutkörperchen, Bakterien und Kristalle wurden im Jahr 1667 von Robert Hooke nachgewiesen. Diese neuen Erkenntnisse dienten sowohl der Grundlagenforschung; sie bildeten aber auch den Ausgangspunkt für die Entwicklung spezifischer Medikamente. Eindrucksvoll wurde 1947 ein Mikroskop von J. Bardeen, W. Shockley und W. Brattain zur Abbildung des ersten Transistors eingesetzt [Kra06]. Hierbei wurde der multidisziplinäre Nutzen der Mikroskopie gezeigt.

Die direkte Übersetzung des Wortes *Mikroskop* bedeutet „Kleinsehgerät“, da dieses das entsprechende Verwendungsziel treffend beschreibt. Das Prinzip der klassischen Lichtmikroskope besteht darin, den dem Auge zugänglichen Winkel von 40 Winkelsekunden auf einen größeren Wert zu erhöhen, damit räumlich nahe beieinander liegende Objekte noch als solche voneinander getrennt vom Auge erkannt werden können.

Heute existiert eine erstaunliche Vielfalt an Mikroskopiesystemen. Diese sind jeweils für entsprechende Fragestellungen optimiert worden, weshalb es nicht möglich ist, von einem

universellen Mikroskop zu sprechen. Vielmehr obliegt es dem Anwender, ein adequates Mikroskopieverfahren zu dem entsprechenden Problem auszuwählen.

### 1.1.2 Historische Entwicklung der Mikroskopie

Die ersten historischen Erwähnungen zu Mikroskopen wurden Anfang 1600 publiziert. Die erste beschreibt die zweilinsige Version eines Lichtmikroskops von dem Holländer Zacharias Jansen aus dem Jahre 1595. Als einer der Pioniere der Mikroskopie ist *Robert Hooke* mit seiner dreilinsigen Version des Mikroskops von 1667 zu nennen. Bis etwa 1800 konnten mit den Mikroskopen Strukturen bis herunter zu  $5\mu\text{m}$  aufgelöst werden, was unter anderem auf die damaligen Linseneigenschaften zurückzuführen ist. Erst die Entwicklung achromatischer Linsen erlaubte eine wesentliche Verbesserung der Auflösung. 1830 ist ein weiterer Meilenstein in der Mikroskopiegeschichte, da es *Joseph Jackson Lister* durch eine geschickte Kombination von mehreren in Reihe geschalteten Linsen mit geringer Brechkraft gelungen ist, die sphärische Aberration zu minimieren. 1877 schließlich ist das Jahr von Ernst Abbe und der Beschreibung der optischen Auflösung. Gegen Anfang 1900 konnten mit all diesen Methoden laterale Strukturen mit sichtbarem Licht bis etwa 300nm aufgelöst werden. Das erste Fluoreszenzmikroskop wurde 1953 von *Karl Reichert* entwickelt, nachdem sich gezielte Färbemethoden an lebenden Zellen etabliert hatten.

Ab dem 20. Jahrhundert jedoch sollte sich das Weltbild aufgrund neuer Möglichkeiten grundlegend ändern.

Neben den großen Fortschritten der Lichtmikroskopie entwickelten sich parallel zu diesen auch nicht-optische Methoden, welche ein höheres Auflösungsvermögen als die gewöhnlichen licht-optischen Mikroskope haben. *Louis de Broglie* postulierte 1924 die Welleneigenschaft von Teilchen, die nur 9 Jahre später von *Ernst August Friedrich Ruska* zu der Erfindung des ersten Elektronenmikroskops führte. Zeitnah entwickelten *Gerd Binnig* und *Heinrich Rohrer* das erste Raster-Tunnel-Mikroskop. Somit blieb die Mikroskopie nicht auf den rein klassischen Bereich des sichtbaren Lichtes beschränkt, vielmehr wurden die Grenzen der verwendeten Wellenlängen erweitert. Heute wird sowohl Ultraschall, als longitudinale Welle, sowie infrarotes, sichtbares und ultraviolettes Licht bis hin zur Röntgenstrahlung, welche die transversalen Wellen vertreten, verwendet. Letztere werden verstärkt in der Materialforschung eingesetzt. Die Gründe für diese verschiedenen Methoden sind ebenso vielseitig wie die Art der Anwendungen. Aus den Formulierungen von Abbe folgte als unmittelbare Konsequenz der Drang nach immer kürzeren Wellenlängen, damit eine möglichst hohe Auflösung erreicht werden konnte. Unabhängig von der verwendeten Wellenlänge ist jedoch immer ein gewisser Kontrast zwischen den Objekten bzw. Objekt und Umgebung notwendig, damit dieses erkennbar ist. Hieraus entwickelte sich eine Untergruppe in der Mikroskopie, deren Leistungsfähigkeit darauf beruht, den Kontrast von Objekten zu steigern. Hierbei wurde sowohl die Farbe als Kontrastmerkmal eingesetzt, als auch die Phase selbst, die es erlaubte, opake Objekte, wie sie häufig in der Mineralogie und Zoologie auftreten, zu untersuchen.

### 1.1.3 Stand der Technik

Aufgrund der gegenwärtigen Vielfalt an neuen, hochauflösenden Mikroskopieverfahren kann nur ein kleiner Teil exemplarisch herausgegriffen und erörtert werden. Einige dieser in naher Zukunft vielversprechendsten Methoden sowie Methoden, die physikalisch besonders herausragende Techniken verwenden, werden in diesem Abschnitt aufgezählt, ohne jedoch all zu tief auf deren detaillierte Realisierung einzugehen.

Bei der Frage nach immer kürzeren Wellenlängen ist die Entwicklung von EUV<sup>1</sup> Quellen im Bereich der Technik eine sehr herausragende aktuelle Entwicklung, welche Wellenlängen im 10nm-Bereich liefern kann. Noch kürzere Wellenlängen sind mit harter Röntgenstrahlung aus Synchrotrons bzw. hochenergetischen Elektronenstrahlen zu erreichen, deren Einsatzgebiet jedoch meist auf einen sehr engen Bereich in der Materialforschung beschränkt ist, da diese entweder im Vakuum verwendet werden oder aber so hohe Energien aufweisen, daß sie Schäden an lebenden biologischen Objekten verursachen. Hinzu kommt, daß biologische Objekte üblicherweise in wässriger Umgebung vorliegen.

Die lichtoptischen Mikroskope stellen speziell zur Erforschung von Strukturen und Zusammenhängen innerhalb des Zellkerns in der Biologie und der Medizin nach wie vor die häufigsten Vertreter im Bereich der Mikroskope dar. Diese werden mit 3D-Methoden sowohl an lebenden Zellen als auch an fixierten Zellen fast ausschließlich mit hochauflösenden lichtoptischen Mikroskopen durchgeführt, da die zu untersuchenden Strukturen entweder mit fluoreszenten Sonden versehen sind (FISH-Methode) [Cel92] [Haa94] oder aber aufgrund von genetischen Manipulationen die Zellen bereits fluoreszente Proteine (xFP)[Shi62] exprimieren. Eine weitere Möglichkeit besteht in der indirekten Markierung mittels Antikörpern. Zur Detektion wird als Referenzgerät üblicherweise das *konfokale Laser-Raster-Mikroskop (CLSM)* verwendet, welches aufgrund der Anregungs- und Detektionstechnik eine maximale laterale Auflösung von 200-250nm, sowie axial etwa 500-600nm erreicht [Mue02]. Hierbei wird die Probe punktweise mit einem beugungsbegrenzten fokussierten Laserstrahl abgetastet. Der Detektor befindet sich in einer konfokalen Anordnung zum Objekt. Mittels einer Lochblende vor dem Detektor, dem *Pinhole*, kann sowohl die Auflösung verbessert sowie Licht von außerhalb der Fokusebene unterdrückt werden.

Eine zweite Möglichkeit der Auflösungsverbesserung besteht darin, ein Volumen anzuregen, welches sehr viel kleiner ist als die Beugungsbegrenzung der Detektion, um mit diesem die Probe abzurastern. Hierdurch wird bei der Anregung eine optische Isolation von benachbarten Objekten erreicht, deren Abstand größer ist, als das Anregungsvolumen. Bei der Detektion sind diese Nachbarobjekte nicht sichtbar, da sie nicht angeregt wurden. Diesen Weg wählt die *STED-Mikroskopie* (stimulated emission depletion), die ein nicht-lineares Verhalten von Farbstoffmolekülen nutzt [Kla00]. Hierbei wird die Probe zunächst beugungsbegrenzt zur Fluoreszenz angeregt; unmittelbar danach mit einem zweiten Laser, welcher ein spezielles Modenprofil aufweist, abgeregt, so daß das restliche

---

<sup>1</sup>EUV: extrem ultra violet

angeregte Fluoreszenzvolumen kleiner als die Beugungsbegrenzung ist, und es trotzdem zu seiner Umgebung aufgrund der STED-Abregung optisch isoliert ist. Hierzu müssen jedoch sowohl an die Technik als auch an die Farbstoffe sehr hohe Anforderungen gestellt werden. Gegenwärtig ist dies die einzige Methode, die aus theoretischer Sicht keiner Begrenzung für eine kleinste Auflösung unterliegt.

Eine weitaus einfachere Methode der hochauflösenden Lichtmikroskopie stellt die hochpräzise Lokalisationsmikroskopie dar. Diese stellt primär die *SPDM*-Methode (spectral precision distance microscopy) [Bra96] dar sowie deren moderne Varianten *PALM* (photo activated localization microscopy) [Bet06] und *STORM* (stochastic optical reconstruction microscopy) [Hua08]. Photoschaltbare Farbstoffe bilden für PALM die Grundlage für die benötigte optische Isolation der fluoreszenten Moleküle untereinander, da diese statistisch zur Fluoreszenz angeregt werden und somit immer mehr Moleküle sich im Grundzustand als im angeregten Zustand befinden. Im Fall von STORM ist es ein strahlungsloser Energietransfer zwischen zwei benachbarten Farbstoffmolekülen. Das Prinzip der Auflösungsverbesserung besteht in beiden Fällen in der hochpräzisen sequenziellen Lokalisation der einzelnen Farbstoffmoleküle, indem mehrere hundert zeitlich nacheinander aufgenommene Bilder einzeln ausgewertet und die jeweiligen Intensitätsschwerpunkte als Basis für ein einzelnes, hochaufgelöstes Lokalisationsbild dienen.

Alternativ kann auch eine Auflösungsverbesserung mit strukturierter Beleuchtung erreicht werden. Eine Realisierung ist die konfokale *4Pi-Mikroskopie* [Hel92]. Hierbei werden zwei kohärente Laserstrahlen fokussiert und in der Objektebene zur Interferenz gebracht. Je nach Ausbaustufe dieser Technik ist zwischen kohärenter Anregung mit inkohärenter Detektion (4Pi-Typ A), inkohärente Anregung mit kohärenter Detektion (4Pi-Typ B), sowie der kohärenten Anregung und der kohärenten Detektion (4Pi-Typ C) zu unterscheiden. Die 4Pi-Methode erreicht derzeit eine laterale optische Auflösung von etwa 100-120nm. Weitere Vertreter in der Gruppe der strukturierten Beleuchtung sind *HELM* (harmonic excitation light microscopy) [Fro00], *I5M* (incoherent interference illumination image interference microscopy) sowie *SMI* (spatially modulated illumination) [Bor98]. Alle diese Methoden verwenden eine strukturierte Beleuchtung, mit der weitere Informationen über das Objekt erhalten werden können. Bei HELM interferieren vier kohärente Laserstrahlen im Objektraum, wobei diese jeweils paarweise zueinander orthogonal ausgerichtet sind. Dadurch wird ein Interferenzmuster in der gesamten lateralen Ebene erzeugt. Bei SMI tritt in axialer Richtung eine stehende Welle aus zwei kohärenten und kollimierten Laserstrahlen zwischen zwei sich gegenüberliegenden Objektiven im Objektraum auf. Diese Methode steigert prinzipiell nicht die optische Auflösung, gestattet aber innerhalb gewisser Grenzen eine Aussage über die Objektgröße sowie den Abstand zweier Objekte zueinander zu liefern. Hierbei wird die zu untersuchende Probe entlang der in axialer Richtung stehenden Welle durch den Objektivfokus bewegt, wobei es zu einer Überlagerung aus der  $\sin^2$ -Funktion der stehenden Welle und der Einhüllenden der Punktbildfunktion kommt.

## 1.2 Grenzen der Einsetzbarkeit von Mikroskopen

Die Frage nach den Grenzen der Mikroskopie ist zum Einen durch die verwendete Wellenlänge begrenzt, da diese sowohl erzeugt werden muß, als auch Elemente der Strahlformung und Strahlführung benötigt werden, zum Anderen darf diese die Probe im Fall von Lebendzellmessungen auch nicht schädigen. Des weiteren müssen auch entsprechende Detektoren und spezifische Marker für diese Wellenlängen existieren. Verbesserungen können jedoch wie bereits gezeigt, durch die Methode selbst, etwa der Verwendung von strukturierter Beleuchtung, der stimulierten Abregung sowie der Verbesserung der zugänglichen Probenposition, wie z.B. bei der Tomographie-Technik, erreicht werden.

Aus dieser kurzen Betrachtung ist erkennbar, dass eine eindeutige Begrenzung des praktischen Einsatzes der Mikroskopie in absehbarer Zeit nicht zu erwarten ist, da neue Erkenntnisse in der Wissenschaft auch als Stimulation zur Entwicklung neuer Methoden dienen werden. Es zeigt sich jedoch, daß die Verwendung einer strukturierten Beleuchtung, ganz gleich ob kollimiert wie bei SMI oder fokussiert wie bei  $4\pi$ , die optische Auflösung signifikant steigern können bzw. eine Strukturinformation liefern können, welche äquivalent zu einer höheren Auflösung ist. Aus diesen Überlegungen folgt im Rahmen dieser Arbeit die Entwicklung eines Fluoreszenzmikroskopes mit einer neuartigen Methode zur Erzeugung der strukturierter Beleuchtung, welches sowohl die laterale Auflösung verbessert als auch in axialer Richtung detailreichere Abbildungen ermöglicht. Das Ziel dieser Entwicklung war eine frei einstellbare Periodenlänge des Beleuchtungsmusters sowie eine frei einstellbare Orientierung dieses Musters in der lateralen Ebene.

Die vielen unterschiedlichen speziellen Mikroskopie-Techniken verlangen nach einer praktikablen Methode, die damit untersuchten Objekte rasch unter den verschiedenen Mikroskopen auszutauschen. Hierbei ist es schwierig, die einzelnen Objekte auf dem Träger wiederzufinden. Daher wurde im Rahmen dieser Arbeit eine entsprechende Methode zur Lösung dieses Problems weiterentwickelt und patentiert. Diese Methode wird in Kapitel 4 dargestellt.



## 2 Allgemeine Grundlagen zur höchstauflösenden Mikroskopie

Im letzten Jahrhundert wurde die Lichtmikroskopie bis nahe an die klassische Auflösungsgrenze vorangebracht. Zum einen gelang dieser Fortschritt durch Weiterentwicklung des physikalischen Verständnisses der Prozesse der Mikroskopie, zum anderen aber auch durch Fortschritte in der Industrie, indem immer präzisere optische, mechanische und auch leistungsfähigere elektrische Komponenten gefertigt werden konnten. Die Kombination dieser Elemente zusammen mit der Verfügbarkeit von leistungsfähigeren Computern führte in letzter Zeit zu spektakulären Ergebnissen. Jedes höchstauflösende Mikroskop ist auf die Datenverarbeitung und Datenaufbereitung mittels Computer angewiesen. Dieses Kapitel skizziert die Grundlagen zur Mikroskopie, speziell wird auf Probleme der Auflösung eingegangen, da diese einen Schwerpunkt der vorliegenden Arbeit darstellt. Zum besseren Verständnis der Notwendigkeit, neue Methoden in der Mikroskopie einzusetzen, werden in diesem Kapitel einzelne Elemente der Mikroskopie sowie der Bildentstehung beschrieben, deren Effekte und Einschränkungen die Hintergründe zu dieser Arbeit hervorheben sollen.

### 2.1 Die Maxwell-Gleichungen

Um die mit einem Lichtmikroskop detektierten Signale physikalisch richtig interpretieren zu können, ist es notwendig, die Lichtwege in dem Mikroskop mathematisch beschreiben zu können. Da es sich bei Licht um elektromagnetische Wellen handelt, erfolgt die Beschreibung mit den Maxwellgleichungen. Die Existenz von Linsen und sonstigen Elementen der Strahlführung wird insofern berücksichtigt, als dass die Maxwellgleichungen für Materie aufgestellt werden und die Randbedingungen an den Luft-Glas-Übergängen berücksichtigt werden [Jac62].

Das elektrische Feld  $\vec{E}$ , die dielektrische Verschiebung  $\vec{D}$ , das Magnetfeld  $\vec{H}$  sowie die magnetische Induktion  $\vec{B}$  sind mit der freien Ladung  $\rho$  und der Stromdichte  $\vec{j}$  wie folgt verknüpft:

$$\begin{aligned} \operatorname{div} \vec{D} &= 4\pi \rho_{ext} & \operatorname{div} \vec{B} &= 0 \\ \operatorname{rot} \vec{E} + \frac{1}{c} \frac{\partial \vec{D}}{\partial t} &= 0 & \operatorname{rot} \vec{H} - \frac{1}{c} \frac{\partial \vec{D}}{\partial t} &= \frac{4\pi}{c} \vec{j}_{ext} \end{aligned} \quad (2.1)$$



Für isotrope, lineare Medien gilt weiterhin:

$$\vec{D} = \epsilon_0 \cdot \epsilon_r \cdot \vec{E} \qquad \vec{H} = \frac{1}{\mu_0 \mu_r} \cdot \vec{B} \qquad (2.2)$$

wobei  $\epsilon_0$  und  $\epsilon_r$  die Dielektrizitätskonstante im Vakuum und im Medium, sowie  $\mu_0$  und  $\mu_r$  die Permeabilität des Vakuums und des Mediums beschreiben.

An der Form der Maxwellgleichungen kann man erkennen, daß es sich bei diesen um ein lineares System von gekoppelten, partiellen Differentialgleichungen erster Ordnung handelt. Zur Beschreibung der Optik können diese vier Gleichungen vereinfacht werden, da es sich hierbei um nichtleitende ( $\vec{j} = 0$ ) sowie ungeladene ( $\rho = 0$ ) Materie, typischerweise Luft und Glas, handelt. Durch das Bilden der zweiten Ableitung lassen sich die Wellengleichungen für  $\vec{E}$  und  $\vec{B}$  herleiten, welche die Eigenschaften der elektromagnetischen Welle beschreiben.

$$\left( \Delta \vec{E} - \frac{\partial^2 \vec{E}}{c^2 \partial t^2} \right) \phi(r, t) = 0 \qquad (2.3)$$

$$\left( \Delta \vec{B} - \frac{\partial^2 \vec{B}}{c^2 \partial t^2} \right) \phi(r, t) = 0 \qquad (2.4)$$

Hierin ist  $c = c_0/n$  die Lichtgeschwindigkeit in Materie,  $c_0$  die Lichtgeschwindigkeit im Vakuum und  $n$  der Brechungsindex des Medium. Ein Lösungssystem dieser Wellengleichungen bilden die ebenen Wellen. In der Optik sind ebenfalls Kugelwellen als Lösungssysteme und die Gaußstrahlen sehr wichtig. Aus diesen werden die Fresnel Formeln abgeleitet, welche das Verhalten von elektromagnetischen Feldern an Grenzflächen beschreiben.

## 2.2 Geometrische- und Gaußsche Optik

Damit die Prinzipien und Methoden der hochauflösenden Mikroskopie, wie sie im Rahmen dieser Arbeit verwendet wurden, besser verstanden werden können, ist es sinnvoll, zunächst die Grundlagen der Mikroskopie im Allgemeinen, welche mittels der geometrischen - und der Gaußschen Optik beschrieben werden, in einer kurzen Form wiederzugeben.

Zur Beschreibung eines komplexen optischen Systems, etwa einem Mikroskop, bedarf es der Möglichkeit, den Weg des Lichtes zu beschreiben. Eine grobe, meist jedoch vollkommen ausreichende Näherung stellt die geometrische Optik dar [BaW99], in welcher aufgrund der geringen Wellenlänge die Wellennatur des Licht vernachlässigt wird. Somit kann die Ausbreitung des Lichtbündels als ein Strahl mit den üblichen Methoden der Geometrie beschrieben werden. Die Strahlen sind die orthogonale Trajektorie zur geometrischen Wellenfront. Eine weitere Einschränkung ist die Intensitätsverteilung eines



solchen Lichtbündels, die als konstant über die gesamte Querschnittsfläche angenommen wird. Bei Beschränkung der Strahlgeometrie auf kleine Winkel relativ zur Achse (*paraxiale Näherung*) kann der Strahlengang, etwa durch eine Linse gemäß Abb.2.1 mit einem Strahl parallel zur optischen Achse (*Parallelstrahl*), einem Strahl durch den Brennpunkt der Linse (*Brennpunktstrahl*) sowie einem Strahl durch den Mittelpunkt der Linse (*Mittelpunktstrahl*) beschrieben werden. Bei dicken Linsen ist zu beachten, daß

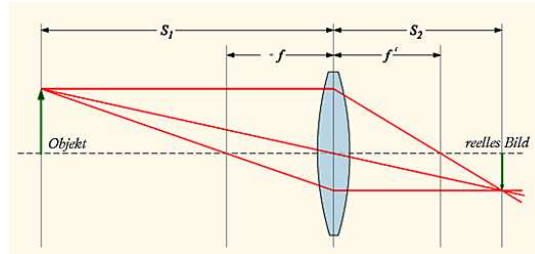


Abb. 2.1: Strahlengang durch eine dünne Linse mit den Brennpunkten  $f$  und  $f'$ .

der Übergang Parallelstrahl - Brennpunktstrahl an der Hauptebene der Linse erfolgen muß, welche nicht zwangsläufig in der geometrischen Mitte der Linse liegen muß. Eine konsequente Weiterentwicklung dieser Theorie stellt die Gaußsche Optik dar. Ausgehend von einer radialsymmetrischen elektrischen Feldverteilung, welche ein exponentielles Verhalten aufweist, läßt sich die Intensitätsverteilung in Abhängigkeit des Abstandes (Strahlradius  $r$ , minimaler Strahlradius  $\omega_0$ ) beschreiben. Aus diesen Gleichungen ist

$$E = E_0 \cdot \exp\left(-\frac{r^2}{\omega_0^2}\right)$$

$$I = \text{const.} \cdot E \cdot E^*$$

$$I = I_0 \cdot \exp\left(-\frac{2r^2}{\omega_0^2}\right)$$

$$P(\infty) = I(0) \cdot \left(\frac{\pi\omega_0^2}{2}\right)$$

$$P(r) = P(\infty) \cdot \left(1 - \exp\left(-\frac{2r^2}{\omega_0^2}\right)\right)$$

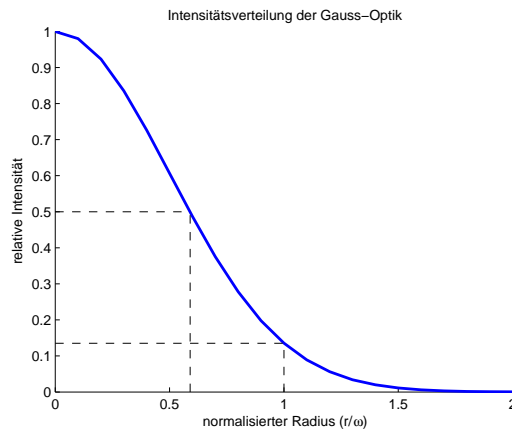


Abb. 2.2: Laterale Intensitätsverteilung bei der Gauß-Optik

erkennbar, daß nahezu 95% der optischen Leistung innerhalb des Radius  $r = 2\omega_0$  zu finden sind, es jedoch in radialer Richtung zu einem exponentiellen Abfall der Leistung kommt. Dies ist besonders für die Fluoreszenzmikroskopie wichtig, bei welcher mittels

eines Laserstrahls (fokussiert oder kollimiert) die Probe beleuchtet wird. Inhomogene Ausleuchtungen führen unter anderem zu einer Verschlechterung des Fokus. Soll zusätzlich noch strukturiert beleuchtet werden, spiegelt sich dies in einem verschlechterten Interferenzkontrast wieder.

Neben der Intensitätsverteilung beschreibt die Gaußsche Optik auch die Strahlform. Diese ist besonders dann wichtig, wenn für einen kollimierten Laserstrahl die Größe im Fokus einer Linse berechnet werden soll. Bei Kollimatoren und Raumfrequenzfiltern ist es notwendig, diese beiden Faktoren in der Planung zu berücksichtigen. Der Divergenzwinkel

$$\omega^2(x) = \omega_0^2 \cdot \left( 1 + \left( \frac{\lambda x}{\pi \omega_0^2} \right)^2 \right)$$

$$R(x) = x \cdot \left( 1 + \left( \frac{\pi \omega_0^2}{\lambda x} \right)^2 \right)$$

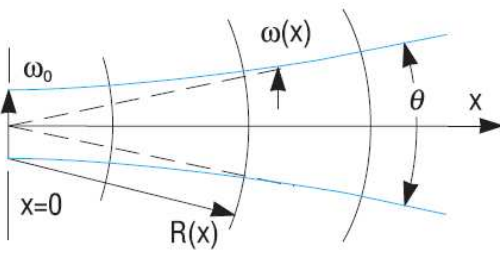
$$\theta = \frac{4\lambda}{2\pi\omega_0}$$


Abb. 2.3: Wellenfrontverlauf in der Gauß-Optik. Aufgrund des Divergenzwinkel  $\theta$  verbreitert sich der minimale Strahradius  $\omega_0$  im Abstand  $x$  auf den Radius  $\omega(x)$ .

kel  $\theta$  kann unter Berücksichtigung kleiner Winkel und der Annahme einer Punktquelle auch über die Brennweite  $f$  einer Linse und einem gaußförmigen Strahldurchmesser  $D$  bestimmt werden.

$$\theta = \frac{4\lambda}{2\pi\omega_0} \quad (2.5)$$

$$\theta \approx \frac{D}{f} \quad (2.6)$$

Durch Substitution folgt der bekannte Ausdruck für den Strahldurchmesser im Fokus.

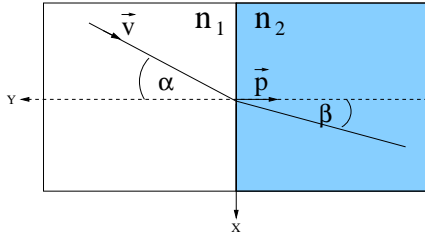
$$2\omega_0 = \frac{4\lambda}{\pi} \frac{f}{D} \quad (2.7)$$

Außer der lateralen Ausdehnung im Fokus ist auch die axiale Ausdehnung wichtig. Diese wird üblicherweise nicht bei einem Intensitätsabfall von  $1/e^2$  im Vergleich zur Fokusintensität bestimmt. Als Grenzwert dient die  $\sqrt{2}$  fache Ausdehnung gegenüber dem Fokusbereich. Somit kann die axiale Ausdehnung des Fokus (DOF) wie folgt beschrieben werden.

$$DOF = \frac{8\lambda}{\pi} \left( \frac{f}{D} \right)^2 \quad (2.8)$$

## 2.3 Brechungsindex und Brechungsgesetz

Das Snelliusschen Brechungsgesetzes beschreibt die Winkelbeziehungen für einen Lichtstrahl, der von einem optisch transparenten Medium mit dem Brechungsindex  $n_1$  unter dem Winkel  $\alpha$  in ein anderes optisch transparentes Medium mit dem Brechungsindex  $n_2$  und Winkel  $\beta$  propagiert.



$$\frac{\sin(\alpha)}{\sin(\beta)} = \frac{n_2}{n_1} \quad (2.9)$$

$$n = \sqrt{\epsilon\mu} \quad (2.10)$$

Abb. 2.4: Brechungsgesetz von Snell

Das Verhältnis der Vakuum-Lichtgeschwindigkeit zur Phasengeschwindigkeit im Medium bestimmt den Brechungsindex. Eine exaktere Formulierung folgt aus der Dielektrizitätsfunktion  $\epsilon$  und der Permeabilitätsfunktion  $\mu$ . Im allgemeinen Fall sind  $\epsilon$  und  $\mu$  tensorielle Größen. Hier werden jedoch nur optisch isotrope Medien betrachtet, so daß es sich bei  $\epsilon$  und  $\mu$  um komplexe Zahlen, bzw. komplexwertige Funktionen in Abhängigkeit des Brechungsindex handelt. Die Größe  $\mu$  beschreibt, in welchem Maße die Materie auf ein äußeres Magnetfeld reagiert. Für die meisten Dielektrika kann näherungsweise  $\mu = 1$  angenommen werden. Dies bedeutet, daß auch der Brechungsindex selbst eine komplexwertige Größe ist, die sowohl einen realen als auch einen imaginären Anteil haben kann, welcher i.A. wellenlängenabhängig ist. Dies wird als *Dispersion* bezeichnet und muß bei multispektralen Experimenten beachtet werden.

Da im Rahmen dieser Arbeit eine räumlich strukturierte Beleuchtung zur Erhöhung der optischen Auflösung verwendet wurde, ist es notwendig, das Brechungsgesetz in vektorieller Form zu formulieren. Dabei soll sowohl der Normalenvektor  $\vec{p}$  der Ebene als auch der Richtungsvektor  $\vec{v}$  der einfallenden Wellenfront normiert sein.

$$\begin{aligned} \cos \alpha &= \vec{v} \cdot \vec{p} \\ \cos \beta &= \sqrt{1 - \left(\frac{n_1}{n_2}\right)^2 \cdot (1 - (\cos \alpha)^2)} \\ \vec{v}_{refl} &= \vec{v} - (2 \cos \alpha) \vec{p} \\ \vec{v}_{refr} &= \left(\frac{n_1}{n_2}\right)^2 \vec{v} + \left(\cos \beta - \frac{n_1}{n_2} \cos \alpha\right) \vec{p} \\ \text{bzw. falls } \vec{v} \cdot \vec{p} < 0 \text{ ist} \\ \vec{v}_{refr} &= \left(\frac{n_1}{n_2}\right)^2 \vec{v} - \left(\cos \beta + \frac{n_1}{n_2} \cos \alpha\right) \vec{p} \end{aligned}$$

## 2.4 Die Totalreflexion

Anhand des Snelliusschen Brechungsgesetzes kann man erkennen, daß es für den Übergangsfall von einem optisch dichteren Medium zu einem optisch dünneren Medium einen kritischen Einfallswinkel gibt, bei dem der gebrochene Strahl parallel zur Grenzfläche verläuft. In diesem Fall ist  $\beta$  genau 90 Grad und somit  $\sin \beta = 1$ . Den dafür nötigen kritischen Eintrittswinkel  $\alpha_{crit}$  kann man leicht aus Gl.2.9 bestimmen.

$$\sin \alpha_{crit} = \frac{n_2}{n_1} \quad (2.11)$$

Sobald ein Eintrittswinkel größer als  $\alpha_{crit}$  auftritt, wird der Strahl an der Grenzfläche vollständig in das erste Medium zurückgebrochen. Diesen Effekt bezeichnet man als *Totalreflexion*. Bei der Totalreflexion ist ein weiterer interessanter Effekt zu beobachten, der unmittelbar aus dem Brechungsgesetz folgt: Ist der kritische Eintrittswinkel  $\alpha_{crit}$  überschritten, kann Gl.2.3 nur noch erfüllt werden, falls der Winkel  $\beta$  imaginär ist, da

$$\frac{n_1}{n_2} \cdot \sin \alpha > 1 \quad (2.12)$$

ist. Deshalb wird der Winkel  $\beta$  wie folgt neu definiert [Som89].

$$\beta := \frac{\pi}{2} \pm i\beta' \quad (2.13)$$

Der erste Term mit  $\frac{\pi}{2}$  entspricht der obigen Situation, da ab dieser die Totalreflexion eintritt. Der zweite Term mit  $\beta'$  stellt einen imaginären Anteil des Winkels  $\beta$  dar, welcher notwendigerweise existieren muß um Gl.2.3 weiterhin erfüllen zu können.

Durch dieses neudefinierte  $\beta$  ändern sich die Sinus- und Kosinusterme. Die Sinus- und Kosinusfunktionen können allgemein durch folgende Ausdrücke dargestellt werden [Fre00]:

$$\sin \theta = \frac{e^{i\theta} - e^{-i\theta}}{2 \cdot i} \quad \cos \theta = \frac{e^{i\theta} + e^{-i\theta}}{2} \quad (2.14)$$

Die Hyperbel-Sinus-Kosinus-Darstellung ist analog zur obigen Definition, jedoch jeweils ohne den Faktor  $i$ . Wenn nun das neu definierte  $\beta$  aus Gl.2.13 eingesetzt wird, ergibt sich folgende Transformation:

$$\begin{aligned} \sin \beta &= \frac{e^{i\beta} - e^{-i\beta}}{2i} = \frac{e^{i(\frac{\pi}{2} \pm i\beta')} - e^{-i(\frac{\pi}{2} \pm i\beta')}}{2i} \\ \sin \beta &= \frac{e^{i\frac{\pi}{2}} \cdot e^{\mp\beta'} - e^{-i\frac{\pi}{2}} \cdot e^{\pm\beta'}}{2i} = \frac{ie^{\mp\beta'} - (-i)e^{\pm\beta'}}{2i} \\ \sin \beta &= \frac{e^{\mp\beta'} + e^{\pm\beta'}}{2} = \cosh(\beta') \end{aligned} \quad (2.15)$$

Analoges gilt für  $\cos \beta$ , wobei die Transformationsgleichung gegeben ist durch:

$$\begin{aligned}\cos \beta &= \frac{e^{i\beta} + e^{-i\beta}}{2} = \frac{e^{i(\frac{\pi}{2} \pm i\beta')} + e^{-i(\frac{\pi}{2} \pm i\beta')}}{2} \\ \cos \beta &= \frac{e^{i\frac{\pi}{2}} \cdot e^{\mp\beta'} + e^{-i\frac{\pi}{2}} \cdot e^{\pm\beta'}}{2} = \frac{ie^{\mp\beta'} - ie^{\pm\beta'}}{2} \\ \cos \beta &= \frac{i(e^{\mp\beta'} - e^{\pm\beta'})}{2} = \mp i \cdot \sinh(\beta')\end{aligned}\quad (2.16)$$

Anhand dieser Transformationsgleichungen (Gl.2.15 und Gl.2.16) wird nun der elektrische Feldvektor  $\vec{E}(\vec{r}, t)$  in Medium 2 berechnet.

$$\vec{E}(\vec{r}, t) = E_0 \cdot e^{i(\vec{k}_2 \vec{r} - \omega t)} \quad (2.17)$$

Hierzu muß jedoch zuerst das Skalarprodukt aus dem Ortsvektor mit dem Wellenvektor gebildet werden. Für den Wellenvektor  $\vec{k}_2$  gilt:

$$\vec{k}_2 = k_2 \cdot (\sin \beta \vec{e}_x - \cos \beta \vec{e}_y) \quad (2.18)$$

Der Ortsvektor wird in der üblichen kartesischen Form dargestellt.

$$\vec{r} = x \cdot \vec{e}_x + y \cdot \vec{e}_y \quad (2.19)$$

Daraus folgt das Skalarprodukt mit

$$e^{\vec{k}_2 \vec{r}} = e^{k_2 \cdot (x \cdot \sin \beta - y \cdot \cos \beta)} \quad (2.20)$$

Durch die Anwendung der obigen Transformationen (Gl.2.15 und Gl.2.16) wird dieses Skalarprodukt zu

$$e^{\vec{k}_2 \vec{r}} = e^{k_2(x \cdot \cosh \beta' \pm i y \cdot \sinh \beta')} \quad (2.21)$$

Da der elektrische Feldvektor  $\vec{E}(\vec{r}, t)$  für  $y \rightarrow -\infty$  nicht divergieren darf, liefert nur das untere Vorzeichen eine physikalisch sinnvolle Lösung. Somit wird Gl.2.17 zu

$$\vec{E}(\vec{r}, t) = E_0 \cdot e^{-i\omega t} \cdot e^{ik_2 x \cosh \beta'} \cdot e^{k_2 y \sinh \beta'} \quad (2.22)$$

Um die reellen E-Felder zu bestimmen, muß nun noch der Realteil der Gl.2.22 gebildet werden. Da es sich bei Gl.2.22 um ein Produkt handelt, können auch die Realteile separat gebildet werden.

$$\operatorname{Re}(e^{-i\omega t}) = \cos(-\omega t) = \cos(\omega t) \quad (2.23)$$

Für den zweiten Term werden Gl.2.3 und Gl.2.15 verwendet, so daß für den Hyperbelkosinus gilt

$$\cosh(\beta') = \frac{n_1}{n_2} \cdot \sin \alpha \quad (2.24)$$

$$Re(e^{ik_2x \cosh(\beta')}) = Re(e^{ik_2x \frac{n_1}{n_2} \sin \alpha}) = \cos(k_2x \frac{n_1}{n_2} \sin \alpha) = \cos(n_1 \frac{\omega}{c} \cdot x \sin \alpha) \quad (2.25)$$

Der Betrag des Wellenvektors  $k_2$  wurde hierbei über die Kreisfrequenz  $\omega$  formuliert, was durch

$$k_2 = n_2 \cdot \frac{\omega}{c} \quad (2.26)$$

möglich ist. Für den letzten Ausdruck mit dem Hyperbelsinus erhält man folgenden Realteil

$$Re(e^{k_2y \cdot \sinh(\beta')}) = e^{k_2y \cdot \sinh(\beta')} = e^{k_2y \sqrt{\cosh^2(\beta') - 1}} \quad (2.27)$$

Hierbei wurde ausgenutzt, daß für die in Gl.2.13 genannte Definition von  $\beta$  folgender Zusammenhang existiert:

$$\cosh^2 - \sinh^2 = 1 \quad (2.28)$$

Mit Gl.2.26 wird Gl.2.27 nun zu

$$Re(e^{k_2y \cdot \sinh(\beta')}) = e^{n_2 \frac{\omega}{c} y \sqrt{\cosh^2(\beta') - 1}} \quad (2.29)$$

$\cosh(\beta')$  kann durch Gl.2.24 ausgedrückt werden. Da bei diesen Betrachtungen die Totalreflexion nur in dem negativen Halbraum von  $y$  auftreten kann, ändert sich auch der Exponent der e-Funktion. Dies führt zu

$$e^{n_2 \frac{\omega}{c} y \sqrt{\cosh^2(\beta') - 1}} = e^{-n_2 \frac{\omega}{c} |y| \sqrt{\frac{n_1^2}{n_2^2} \sin^2(\alpha) - 1}} \quad (2.30)$$

Den Quotienten der Brechungsindizes kann man durch Gl.2.11 für den kritischen Winkel ersetzen. Dies führt zu der folgenden Gleichung:

$$e^{-n_2 \frac{\omega}{c} |y| \sqrt{\frac{n_1^2}{n_2^2} \sin^2(\alpha) - 1}} = e^{-n_2 \frac{\omega}{c} |y| \sqrt{\frac{\sin^2(\alpha)}{\sin^2(\alpha_{crit})} - 1}} \quad (2.31)$$

Somit sind alle Realteile der einzelnen Produkte berechnet. Für das reelle E-Feld ergibt sich daraus

$$Re(\vec{E}(\vec{r}, t)) = E_0 \cos(\omega t) \cos(n_1 x \frac{\omega}{c} \sin \alpha) e^{-n_2 \frac{\omega}{c} |y| \sqrt{\frac{\sin^2(\alpha)}{\sin^2(\alpha_{crit})} - 1}} \quad (2.32)$$

Da es sich bei Totalreflexion um evaneszente Wellen handelt, gilt das besondere Interesse der  $y$ -Komponente des reellen E-Feldes. Der zeitabhängige Term  $\cos(\omega t)$  wird nun ebenfalls vernachlässigt, da letztlich nur Intensitäten gemessen werden. Zusätzlich wird der Parameter  $d$  eingeführt, welcher die Dimension einer Länge hat und für die Eindringtiefe ( $1/e$ -Abfall) des reellen E-Feldes steht. Ein Koeffizientenvergleich liefert für  $d$

$$d := \frac{c}{2 \cdot n_2 \cdot \omega \sqrt{\frac{\sin^2(\alpha)}{\sin^2(\alpha_{crit})} - 1}} \quad (2.33)$$

Daraus folgt letztendlich

$$\vec{E}(y) = E_0 e^{-n_2 \frac{\omega}{c} |y| \sqrt{\frac{\sin^2(\alpha)}{\sin^2(\alpha_{crit})} - 1}} = E_0 \cdot e^{-\frac{|y|}{2d}} \quad (2.34)$$

Die Intensität des Feldes in y-Richtung ist proportional zu  $|\vec{E}(y)|^2$ . Der exponentielle Abfall der Intensität ist typisch für evaneszente Wellen.

$$I(y) = I_0 \cdot e^{-\frac{|y|}{d}} \quad (2.35)$$

Die Abbildung 2.5 zeigt diesen exponentiellen Abfall der Eindringtiefe in Abhängigkeit des Eintrittswinkels beim Übergang von Medium 1 mit  $n_1 = 1,52$  zum Medium 2 mit  $n_2 = 1,33$  für Licht der Wellenlänge 404nm und 633nm. Auf der Abszisse ist der Winkel im ersten Medium eingetragen, die Ordinate gibt die  $1/e$ -Eindringtiefe der Welle in das zweite Medium an. Es ist deutlich zu erkennen, daß eine Singularität der Eindringtiefe am kritischen Winkel, der für die entsprechenden Brechungsindizes bei  $61^\circ$  liegt, auftritt. Diese kann dadurch erklärt werden, daß bis zu diesem Winkel ein Teil des Strahls von Medium 1 in das zweite Medium gebrochen wird und in diesem seine Ausbreitung fortsetzt. Somit muß die Eindringtiefe unterhalb des kritischen Winkels unendlich sein.

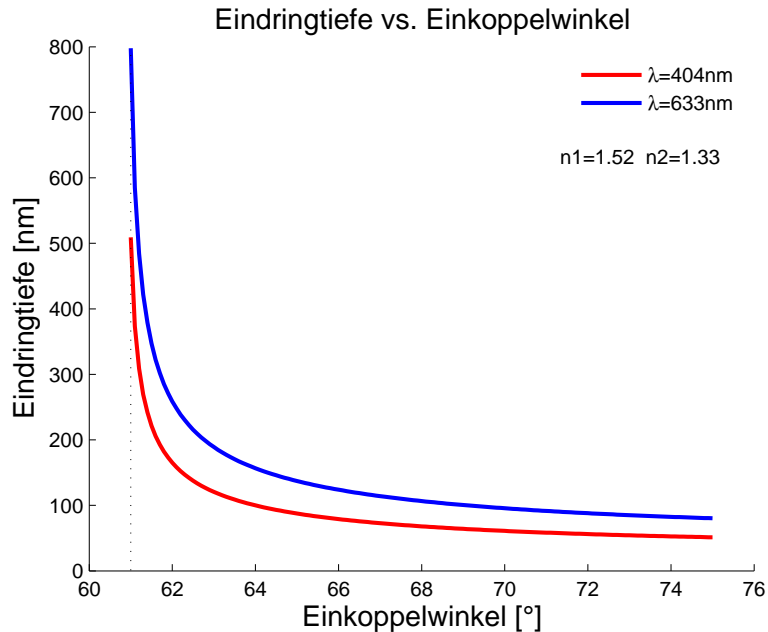


Abb. 2.5: Eindringtiefe der evaneszenten in Abhängigkeit des Einkoppelwinkel für die Wellenlängen 404nm und 633nm. Die gestrichelte Linie markiert den kritischen Winkel.

## 2.5 Fluoreszenz

Der Einsatz von fluoreszenten Farbstoffen ist in der modernen Lichtmikroskopie, speziell der hochauflösenden Mikroskopie, eine Standardmethode zur Erhöhung des Kontrastes. Die Fluoreszenzmikroskopie bietet den großen Vorteil, daß Objekte, welche sehr viel kleiner als die optische Auflösung (etwa 200nm) sind, aufgrund ihres Fluoreszenzsignals detektiert werden können. Im Extremfall wird nur ein einziges Farbstoffmolekül als Marker eingesetzt und somit auch nur dessen Fluoreszenzlicht detektiert. Aufgrund der typischen Größe eines Moleküls von wenigen nm [Hak93] kann ein Volumen im  $nm^3$ -Bereich markiert und somit detektiert werden. Bei der Detektion treten gewisse Beugungseffekte mit in Erscheinung, weshalb die Objekte beugungsbegrenzt erscheinen. Die energetische Beschreibung der Fluoreszenz erfolgt üblicherweise mit einem *Jablonski-Diagramm*.

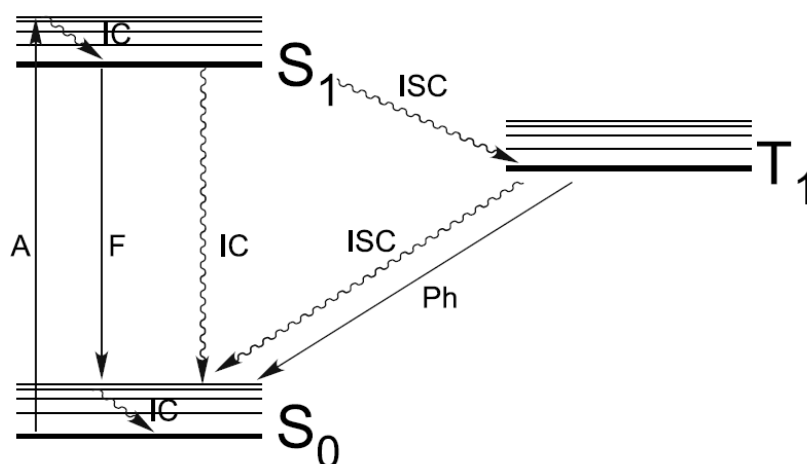


Abb. 2.6: Jablonski-Energieschema eines Farbstoffmoleküls. Strahlungs-Übergänge sind mit geraden Linien, strahlungslose Übergänge mit oszillierenden Linien dargestellt. Die Absorption eines Photons ist mit A, die Emission eines Fluoreszenz-Photons ist mit F gekennzeichnet. Ph, ISC und IC beschreiben Phosphoreszenz, Inter-System-Crossing und innere Konversion.

In diesem Diagramm bezeichnet  $S_0$  den Grundzustand,  $S_1$  den ersten elektronisch angeregten Zustand sowie  $T_1$  den Triplett-Zustand. Jeder dieser elektronischen Zustände ist durch Schwingungsniveaus zusätzlich noch aufgespalten. Die Anregung aus dem Grundzustand  $S_0$  in den nächst höheren energetischen Zustand  $S_1$  erfolgt durch Absorption eines Photons, dessen Energie  $E = h \cdot \nu$  gerade dem Abstand der beiden Niveaus entspricht. Prinzipiell ist auch eine Anregung in ein noch höheres Niveau möglich, wobei diese meist strahlungslos innerhalb weniger fs in den  $S_1$  Zustand übergehen. Aufgrund der Auswahlregeln ist eine direkte Anregung aus dem Grundzustand in den Triplettzustand nicht möglich.



Da die Zeitdauer von Absorption und Emission eines Photons klein gegenüber einer Umorientierung des Abstands der relativ schweren Atomkerne ist, kann nach dem Franck-Condon-Prinzip der Abstand der Atomkerne als konstant betrachtet werden, weshalb die Anregung von  $S_0$  nach  $S_1$  in einen höheren Schwingungsenergiezustand von  $S_1$  erfolgt, da sich der Schwingungsgrundzustand  $S_1$  bei einem anderen Kernabstand befindet. Zusätzlich kommt es bei Zimmertemperatur zur Energieabgabe des Moleküls mit anderen Molekülen und Atomen aufgrund von Stößen, wobei das Molekül hierdurch innerhalb weniger Pikosekunden in den Schwingungsenergiegrundzustand von  $S_1$  relaxiert. Von hier aus geht das Molekül in einen höheren Schwingungszustand von  $S_0$  unter Aussendung von Fluoreszenzlicht mit einer Fluoreszenzlebensdauer von einigen Nanosekunden über. Die Energie des höheren Schwingungsenergielevels wird wiederum durch Stöße innerhalb weniger Pikosekunde abgebaut, sodass das Molekül schließlich in den niedrigsten Schwingungsenergiezustand von  $S_0$  übergeht.

Dieser Energieverlust durch Stöße in den  $S_1$ - und  $S_0$ -Schwingungsenergielevels ist für die Mikroskopie sehr wichtig, da hierdurch die Maxima der Absorptions- und Emissionsspektren des Farbstoffes gegeneinander verschoben werden und somit mit geeigneten Filtern spektral getrennt werden können. Diese Verschiebung der Maxima beträgt einige 10nm und wird als *Stokes-Shift* bezeichnet.

Die Energie des angeregten Zustands  $S_1$  kann auch strahlungslos durch Stöße als Wärme abgegeben werden, sodass nur ein geringer Bruchteil  $\eta$  der angeregten Moleküle ein Fluoreszenzphoton emittiert. Der als Quantenausbeute bezeichnete Wert von  $\eta$  liegt bei guten Farbstoffen bei  $\eta = 0.8$ , meist jedoch darunter.

Die Anregungswahrscheinlichkeit  $p_{ex}$  eines Moleküls zur Absorption eines Photons bei Intensitäten die kleiner als die Sättigungsintensität sind, ist proportional zur Intensität des Anregungslichts  $I$ .

$$p_{ex} = \sigma \frac{I}{h\nu} \quad (2.36)$$

Hierbei bezeichnet  $h$  das Plancksche Wirkungsquantum und  $\nu$  die Frequenz des Photons. Der molekulare Wirkungsquerschnitt der Absorption  $\sigma$  kann mittels des Lambert-Beer'schen Gesetzes experimentell bestimmt werden und weist typisch einen Wert von  $2 - 8 \cdot 10^{-16} \text{cm}^{-2}$  auf. Neben der hier beschriebenen Ein-Photonen-Anregung ist es auch möglich, zwei oder mehrere simultane Photonen zur Fluoreszenzanregung zu nutzen wobei obige Formulierung der Anregungswahrscheinlichkeit eine quadratische Abhängigkeit zur Intensität und Photonenenergie aufweist und die Definition des molekularen Wirkungsquerschnitts eine andere ist.

## 2.6 Auflösung und Detektierbarkeit in der Lichtmikroskopie

Der allgemeine Begriff der Auflösung beschreibt die Fähigkeit des Detektionssystems, zwei oder mehr räumlich voneinander getrennte Objekte der gleichen spektralen Signatur zu unterscheiden, bis diese eine minimale Distanz zueinander aufweisen, ab welcher die Trennung nicht mehr möglich ist. Hierbei wird vorausgesetzt, daß die Objekte einen merklichen Kontrast zu ihrer Umgebung aufweisen. Das Erreichen dieser minimalen Distanz kann als Auflösungsgrenze bezeichnet werden. Bei den mikroskopischen Objekten muß zwischen inkohärent strahlenden Selbstleuchtern, kohärent strahlenden Selbstleuchtern sowie kohärent und inkohärent beleuchteten Objekten unterschieden werden. Die Intensität im detektierten Bild besteht im Fall der kohärenten Selbstleuchter bzw. Beleuchtung nicht nur aus der Summe der Amplitudenquadrate sondern zusätzlich noch aus dem Mischterm, welcher die jeweiligen Phasen berücksichtigt [Hop50].

Eine exakte Formulierung der Auflösungsgrenze ist in der Praxis in dieser allgemeinen Form nicht anwendbar, da es aufgrund des stetigen Kontrastverhaltens einen kontinuierlichen Übergang von strikt trennbaren bis hin zu nicht-unterscheidbaren Objekten gibt. Zur Auflösungscharakterisierung wird üblicherweise eines der Kriterien von Abbe, Rayleigh oder Sparrow verwendet. Analytisch wird die Auflösung der Detektion durch die

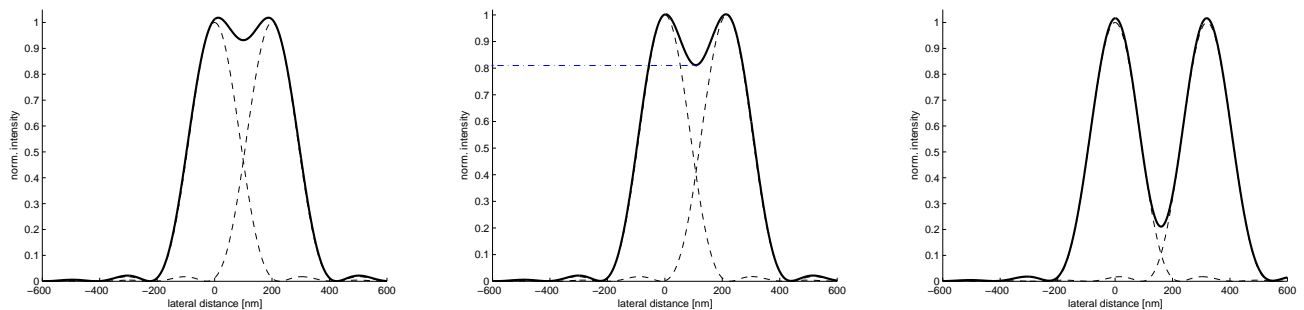


Abb. 2.7: Intensitätsverteilung für zwei punktförmige Objekte, die dicht beieinander sind. links: Rayleigh-Kriterium nicht erfüllt, mitte: Rayleigh-Kriterium erreicht, rechts: Rayleigh-Kriterium erfüllt

*Punktbildfunktion*<sup>1</sup> charakterisiert. Diese beschreibt, wie ein punktförmiges Objekt durch das gesamte Detektionssystem abgebildet wird. Bei dieser muß zwischen axialer PSF und lateraler PSF unterschieden werden, wobei sich axial bzw. lateral auf die optische Achse des Detektionssystems bezieht.

Betrachtet man den geometrischen Strahlengang durch ein Objektiv bzw. vereinfacht dieses durch eine einzige Linse, so existiert ein maximaler Winkel, unter welchem Licht von dem zu untersuchenden Objekt durch die Linse gelangen kann. Dies schränkt den

<sup>1</sup>engl. PSF: point spread function

gesamten Informationsgehalt der Detektion ein, da durch den eindeutigen Grenzwinkel auch eine eindeutige Grenzfrequenz im Fourier-Raum festgelegt wird. In lateraler Rich-

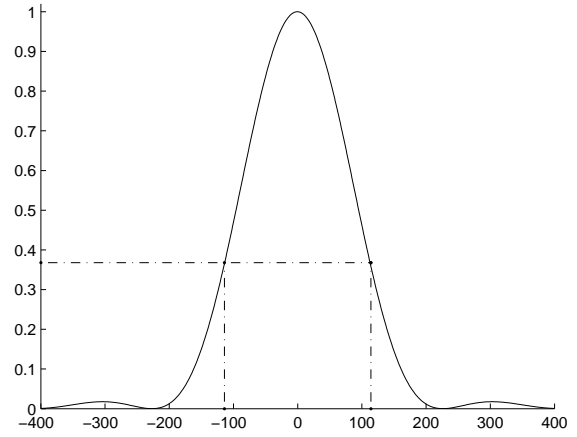
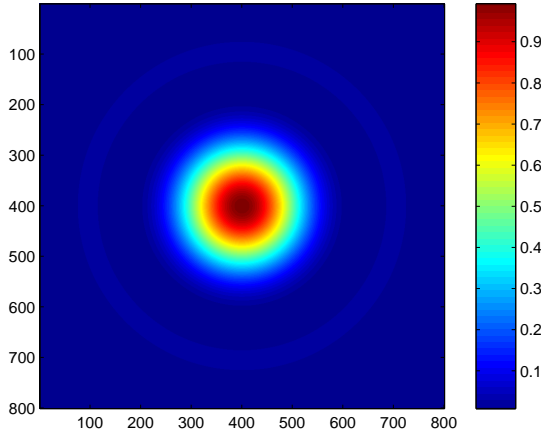


Abb. 2.8: simulierte laterale PSF, Weitfelddetektion, Fläche: 800x800nm, NA=1.4,  $\lambda = 520nm$ ,  $n=1.48$

Abb. 2.9: Intensitätsverteilung entlang der x-Achse durch das Maximum

tung wird die Punktbildfunktion durch eine Besselfunktion erster Ordnung beschrieben, in welche der Abstand  $r$ , das Maximum am Punkt  $r_0$ , die numerische Apertur NA und die Wellenlänge  $\lambda$  eingeht. Der Ausdruck für die axiale Punktbildfunktion ist eine sinc-Funktion.

$$\rho = \frac{2 \cdot \pi \cdot NA \cdot (r - r_0)}{\lambda} \quad (2.37)$$

$$I_{lat} = \left( \frac{2 \cdot J_1(\rho)}{\rho} \right)^2 \quad (2.38)$$

$$\varrho = \frac{2 \cdot \pi \cdot NA^2 \cdot (z - z_0)}{\lambda \cdot n_{medium}} \quad (2.39)$$

$$I_{ax} = \left( \frac{\sin(\frac{\varrho}{4})}{\frac{\varrho}{4}} \right)^2 \quad (2.40)$$

Eine wichtige Eigenschaft der PSF ist, dass Objekte, deren Durchmesser kleiner als die Auflösungsgrenze ist, deren Abbildung wird als beugungsbegrenzt bezeichnet, bei der Detektion eine Halbwertsbreite aufweisen, die ungefähr der Beugungsbegrenzung entspricht. Dies bedeutet aber auch, daß beugungsbegrenzt Objekte sehr wohl detektierbar sind. Die Beugungsbegrenzung entspricht nach dem Rayleigh-Kriterium dem Abstand der ersten Nullstelle der obigen Besselfunktion zueinander, da es sich um ein radial-symmetrisches Problem handelt. Die eingeschlossene Fläche der obigen Besselfunktion

innerhalb dieser Grenze wird als *Airy-Scheibe* bezeichnet. Der Durchmesser  $d$  der Scheibe wird dabei wie folgt bestimmt:

$$d = 1.22 \cdot \frac{\lambda}{NA}$$

Hieraus kann für ein Objektiv bei gegebener Beobachtungswellenlänge sofort der minimale Objektstand in der lateralen Ebene bestimmt werden. Weiterhin ist erkennbar, daß die Auflösung ausschließlich durch das verwendete Objektiv und die Beobachtungswellenlänge, nicht aber durch den Abbildungsmaßstab begrenzt wird. Beim Übergang

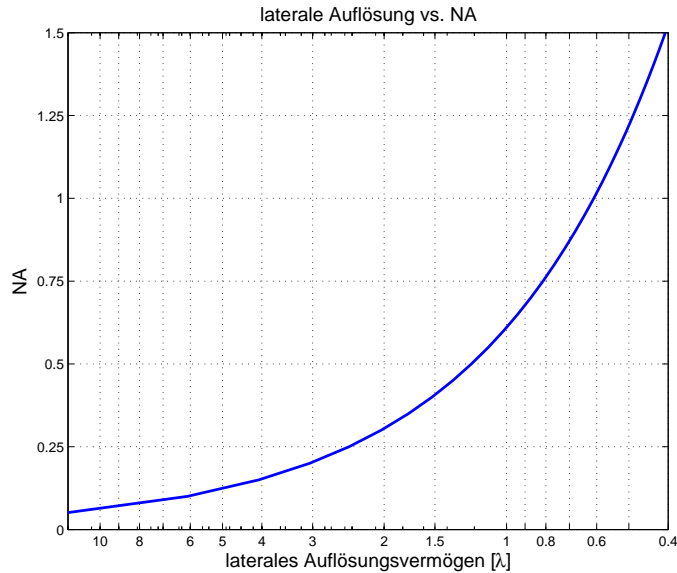


Abb. 2.10: Zusammenhang zwischen lateraler Auflösung und NA

vom Ortsraum zum Frequenzraum durch eine Fouriertransformation wird sichtbar, dass auch die Raumfrequenzen ab einem gewissen Grenzwert abgeschnitten werden. Die Fouriertransformierte der PSF wird als *optische Transferfunktion*<sup>2</sup> bezeichnet und ist in Abbildung 2.11 in einer 3D-Simulation für eine Weitfeldanregung und Detektion, wie sie bei klassischen Fluoreszenzmikroskopen üblich ist, zu sehen. Der Schnitt durch diesen Torus ist in Abbildung 2.12 gezeigt, da hieran eindrucksvoll das *missing-cone* Problem zu erkennen ist, weshalb die axiale Auflösung für diesen Typ von Mikroskop schlechter ist, als die laterale Auflösung.

Da die hohen Frequenzanteile nicht detektiert werden, erscheint das Objekt verwaschen. Sehr bekannt ist dieser Effekt seit der Approximation einer Kante als nicht-stetige Funktion durch eine stetige Sinus-Funktion von J.B. Fourier. Hierin wird deutlich, dass die

<sup>2</sup>engl. OTF: optical transfer function

hohen Frequenzanteile zur Darstellung kleiner Änderungen bzw. Strukturen notwendig sind. Analoges gilt somit auch für die Mikroskopie. Eine Möglichkeit zur Detektion hoher Frequenzen verlangt den Einsatz einer hochbrechenden Frontlinse in Kombination mit einem hochbrechenden Immersionsmedium. Das Objektiv wirkt wie ein Tiefpaßfilter, weshalb es zu einer oberen Grenzfrequenz für die Detektion kommt. Diese Grenze kann aparativ nicht erweitert werden, da sie ausschließlich durch die Apertur und die Wellenlänge gegeben ist.

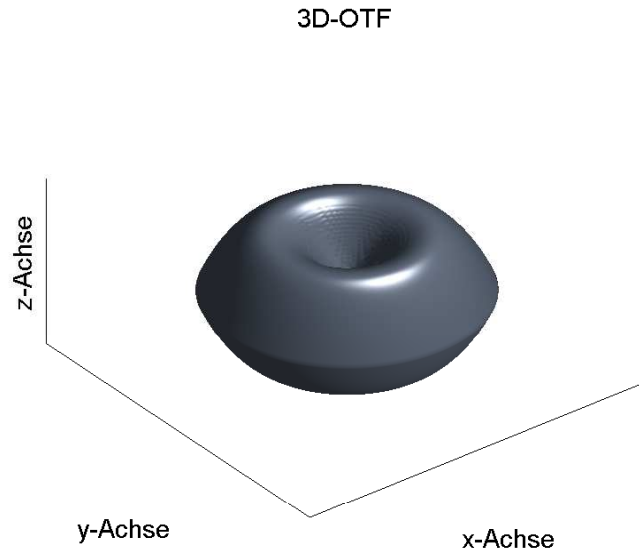


Abb. 2.11: Simulation einer 3D Weitfeld-OTF

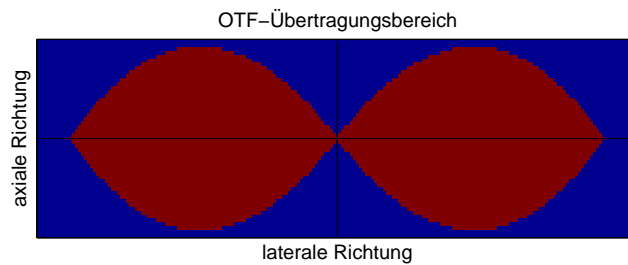


Abb. 2.12: Schnitt durch den simulierten OTF-Donut

Eine indirekte Erweiterung des Frequenzraumes bietet jedoch die strukturierte Beleuchtung, auf welche später im Detail eingegangen wird, da diese ein Hauptbestandteil der Arbeit ist. Hierbei nutzt man Mischfrequenzen in der Detektion aus, um bei bekannter

Trägerfrequenz neben der Grundfrequenz auch die Summenfrequenz nach mathematischer Aufbereitung dem Beobachtungsspektrum zugänglich zu machen.

## 2.7 Lokalisationsmikroskopie

Aufgrund der Beugungsbegrenzung ist es nicht möglich, Objekte, deren Größe unterhalb dieser liegt, beliebig genau abzubilden. Die Fluoreszenzmikroskopie ermöglicht es, einzelne Fluorophore anzuregen und deren Emissionslicht zu detektieren. Da ein einzelnes Fluorophor nur wenige nm groß ist, kann dieses als punktförmig angesehen und dessen Fluoreszenzschwerpunkt innerhalb des beugungsbegrenzten Bildes bestimmt werden. Diese Methode wird als Lokalisationsmikroskopie bezeichnet. Hierbei muß unterschieden werden, ob sich die fluoreszierenden Objekte spektral unterscheiden oder nicht. Der erste Fall ist als SPDM<sup>3</sup> bekannt und wurde bereits 1996 von [Bor98][Crem96] beschrieben. Hierbei wird die spezifische spektrale Signatur zweier Objekte zur Bestimmung deren einzelner Intensitätsschwerpunkte verwendet, wobei die beiden fluoreszenten Objekte einen absoluten Abstand zueinander aufweisen, der geringer ist als eine Airy-Disc. 2006 wurden die ersten Lokalisations-Bilder mit PALM (photo activated localization microscopy) [Bet06] vorgestellt. Die Lokalisationsgenauigkeit in 2D betrug etwa 40nm. PALM basiert auf der Detektion einzelner photoschaltbarer Fluorophore innerhalb eines mehrstufigen Prozesses und stellt somit eine extreme Variante der spektralen Trennung der SPDM-Methode dar. Anfangs sind alle Fluorophore in einem nichtfluoreszenten Zustand. Wird die Probe mit typ. UV-Licht von geringer Intensität kurzzeitig beleuchtet, werden einzelne nichtfluoreszente Fluorophore aktiviert. Die Wahrscheinlichkeit, daß zwei benachbarte Fluorophore während dieser Aktivierungsphase in den fluoreszenten Zustand wechseln, ist bei geringen Intensitäten ebenfalls gering. Nach der Aktivierung werden diese Fluorophore in gewohnter Weise zur Fluoreszenz angeregt, ihr Intensitätsschwerpunkt bestimmt und danach so lange dem Anregungslicht ausgesetzt, bis sie ausgebleicht sind. Danach beginnt der gesamte Prozess wieder mit der Aktivierungsphase, bis schließlich zu jedem Fluorophor dessen Schwerpunkt einzeln bestimmt wurde. Eine weitere Variante zu PALM ist STORM, bei der die Fluorophore aufgrund eines strahlungslosen Energietransfers von einem Zustand in einen anderen Zustand wechseln.

Die Genauigkeit einer derartigen Lokalisation wurde von [Thom02] ausführlich untersucht. Die Lokalisationsgenauigkeit aus diesen theoretischen Betrachtungen ist in der folgenden Abbildung für 2D wiedergegeben. Bei diesen Photonenzahlen ist zu beachten, daß es sich um die tatsächlich detektierten Photonen handelt. Eine grobe Abschätzung über die Anzahl der detektierbaren Photonen ist deshalb notwendig. Ein Objektiv mit NA 1.4 kann etwa 30% des gesamten Raumwinkels abdecken. Die Transmission durch ein Objektiv kann mit 85% angenommen werden. Die Transmission durch die Tubulinse ist aufgrund der geringeren Linsenanzahl mit 90% zu beachten. Schließlich wird noch ein Filter benötigt, um das Anregungslicht vom Detektionslicht zu trennen, dessen

---

<sup>3</sup>spectral precision distance microscopy

Transmission mit 95% als typischer Wert für Interferenzfilter angenommen wird. Die Quanteneffizienz einer backilluminated EM-CCD Kamera wird mit 90% angenommen, die Digitalisierungsrate sei 2 Photonen pro digitalem Count. Somit werden nur etwa  $0,3 \cdot 0,85 \cdot 0,9 \cdot 0,95 \cdot 0,9 \cdot 0,5 = 10\%$  aller emittierten Photonen von der Kamera detektiert. Die gesamte Photonenausbeute gängiger Fluoreszenzfarbstoff-Moleküle beträgt etwa  $10^6$  Photonen pro Molekül [Toom01], wobei dieser Wert sowohl von der entsprechenden Mikroumgebung des Fluorophors als auch vom Fluorophor selbst abhängig ist.

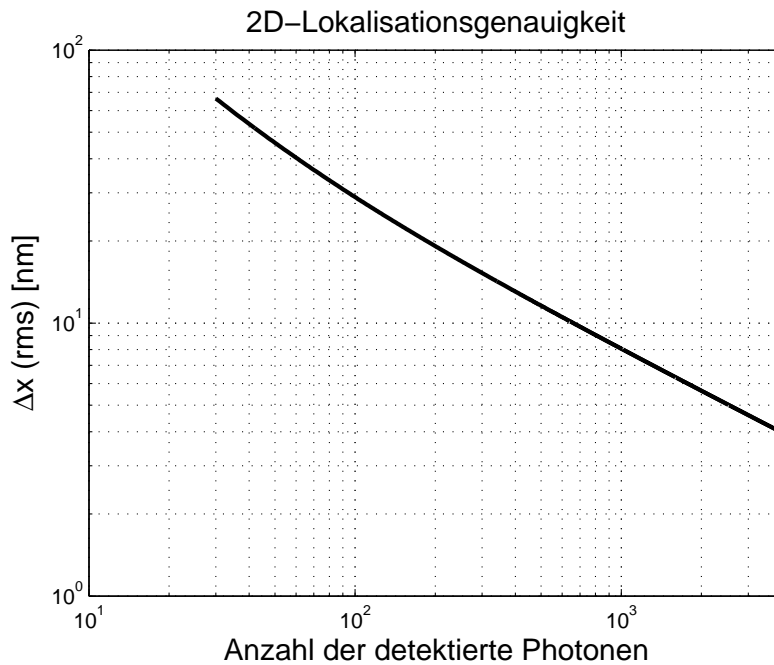


Abb. 2.13: Zusammenhang von Lokalisationsgenauigkeit und detektierten Photonen, für eine PSF-Halbwertsbreite von 250nm, 65nm Pixelgröße und 30% Rauschen [Thom02].

Die Lokalisationsmikroskopie allein erhöht jedoch nicht die optische Auflösung, da die OTF nach wie vor nicht mehr Raumfrequenzen enthält. Erst durch numerische Prozesse entsteht eine „Punktkarte“ des Objektes, welche höhere Raumfrequenzen enthält und somit eine höhere Ortsauflösung pro Fluorophor bietet.

## 2.8 Das Objektiv

Die Qualität der mikroskopischen Abbildung wird im Falle eines idealen Präparates entscheidend durch das verwendete Objektiv geprägt. Bei der Verwendung einer einzelnen Linse als Abbildungsgerät treten eine Vielzahl von Abbildungsfehlern (*Aberrationen*) auf, die nur durch den kombinierten Einsatz mehrerer Linsen korrigiert werden können. Bei der paraxialen Näherung wurden kleine Winkel relativ zur optischen Achse angenommen, d.h.  $\sin(\theta) \simeq \theta$ . Entwickelt man diesen Ausdruck jedoch um den Nullpunkt, ergibt sich aus den ersten Koeffizienten der Taylorreihe:

$$\sin(\theta) = \theta - \frac{\theta^3}{3!} + \frac{\theta^5}{5!} - \frac{\theta^7}{7!} + \dots$$

Abberationen können als Abweichung der paraxialen Näherung beschrieben werden[Mue02]. In diesem Fall werden diese als *Seidel-Aberrationen* bezeichnet. Die *sphärische Aberration*, beschrieben durch die dritte Ordnung der obigen Entwicklung, beschreibt den Versatz des Brennpunktes entlang der optischen Achse in Abhängigkeit zur Entfernung der Strahlenbündel vom Zentrum der Linse zum Rand. Aufgrund der Krümmung einer sphärischen Linse werden an Randnähe die Strahlen stärker gebrochen als an den restlichen Bereichen, weshalb es zu einer axialen Verschiebung (Verkürzung) des Brennpunktes kommt.

Die fünfte Ordnung beschreibt die Stärke des *Koma*, einer Verschmierung eines außerhalb der optischen Achse liegenden Objektes. Diese ist vergleichbar mit dem Schweif eines Kometen. Die Korrektur des Kommas ist somit von der gleichen Wichtigkeit wie die der sphärischen Aberration, da nicht nur Objekte auf der optischen Achse sondern auch von dieser entfernte Objekte noch unverzerrt abgebildet werden sollen. Abbe und Helmholtz formulierten 1873 die *Sinusbedingung*, aus welcher unmittelbar die Korrektur von Koma auf Null ersichtlich ist. Betrachtet man einen Strahlengang mit den Brechungsindizes  $n, n'$  sowie den Strahlhöhen  $h, h'$  und den Strahlwinkeln  $\theta, \theta'$  in der Objekt- und Bildebene, so folgt daraus die Sinusbedingung.

$$\begin{aligned} n \cdot h \cdot \sin \theta &= n' \cdot h' \cdot \sin \theta' \\ \frac{\sin \theta}{\sin \theta'} &= \text{const.} \end{aligned}$$

Ein Linsensystem, das frei von sphärischen Aberrationen und frei von Koma ist, wird als *aplanes Linsensystem* bezeichnet.

Der *Astigmatismus* wird durch das dritte Glied in der obigen Entwicklung beschrieben. Ein zur optischen Achse seitlich versetztes Objekt wird in der Bildebene als zwei Objektpunkte abgebildet. Je weiter das Objekt sich am Bildrand befindet, desto stärker ist dieser Effekt. Der Abstand zwischen beiden Fokusebenen in der Bildebene wird als astigmatische Differenz bezeichnet. Bei der Korrektur gleicht man das Linsensystem derart ab, daß beide Fokusebenen den gleichen Krümmungsradius haben.



Die neunte Ordnung beschreibt die *Bildfeldwölbung*. Diese entspricht im unkorrigierten Fall in etwa der Brennweite des Objektivs. Durch negativ geformte Linsen kann diese Wölbung korrigiert werden, gleichwohl wirkt diese Korrektur aber auch auf alle anderen Aberrationen negativ.

Die *Bildverzerrung* wird durch die letzte der fünf elementaren Aberrationen beschrieben. Der Ursprung hierzu ist die Abhängigkeit der lateralen Vergrößerung vom seitlichen Abstand zur optischen Achse.

Bei Verwendung von nicht-monochromatischem Licht entsteht aufgrund der Dispersion auch noch eine *chromatische Aberration*.

Die Allgemeine Formulierung der Aberrationen erfolgt mittels der *Zernike Polynome*. Diese berücksichtigen auch große Winkel zur optischen Achse, wie sie etwa in der hochauflösenden Mikroskopie vorkommen, da von sphärischen Wellenfronten ausgegangen wird. Die fünf Seidel-Aberrationen lassen sich mittels der Zernike-Polynome in rechtwinklige Koordinaten wie folgt formulieren[BaW99]:

$$W(\rho, \theta, h') = a_0^{40} \rho^4 + a_1^{31} h' \rho^3 \cos \theta + a_2^{22} h'^2 \rho^2 \cos^2 \theta + a_2^{20} h'^2 \rho^2 + a_3^{11} h'^3 \rho \cos \theta$$

Die Koeffizienten  $a_0^{40}$ ,  $a_1^{31}$ ,  $a_2^{22}$ ,  $a_2^{20}$  und  $a_3^{11}$  beschreiben die sphärische Aberration, Koma, Astigmatismus, Gesichtsfeldwölbung und Verzerrung.

Die numerische Apertur NA gibt, wie im vorherigen Abschnitt beschrieben, einen Zusammenhang zwischen maximal auflösbarer Objektstruktur und Öffnungswinkel des Objektivs. Der Öffnungswinkel schränkt auch die Anzahl der detektierbaren Photonen ein, unter der Annahme, daß die Emission im gesamten Raumwinkel von  $4\pi$  erfolgt, das Objektiv jedoch nur etwa dreißig Prozent davon abdeckt, wie die folgende Rechnung zeigt.

$$A = \int_{\theta=0}^{\alpha} \int_{\phi=0}^{2\pi} \underbrace{R^2}_{=:1} \cdot \sin(\theta) \, d\theta \, d\phi$$

$$A = 2\pi(1 - \cos(\alpha))$$

Vergleicht man diesen Wert mit der Kugeloberfläche von  $4\pi$ , ergibt sich für  $NA=1.4$  etwa 33 Prozent der Oberfläche. Hierbei beträgt der Öffnungswinkel  $\alpha$  etwa  $64^\circ$ .

Objektive werden je nach Korrektur der Aberration in verschiedene Typen gruppiert [Lei73]. Die einfachste Gruppe wird durch die *Achromate* gebildet, bei denen eine Korrektur für zwei Farben, üblicherweise rot und blau, durchgeführt wurde. *Apochromate* weisen eine Korrektur für drei Farben auf, die bis beinahe der maximalen Apertur einen geradlinigen Verlauf aufweisen. Die Gruppe der *Plan-Apochromate* (Pl-Apo) wird aus Apochromaten gebildet, die zusätzlich noch auf eine minimale Bildfeldwölbung korrigiert sind. Bei nicht ganz so hohen Anforderungen an die Korrektur der Bildfeldwölbung werden auch Achromate mit planarem Gesichtsfeld angeboten. Diese werden als *Plan-Achromate*

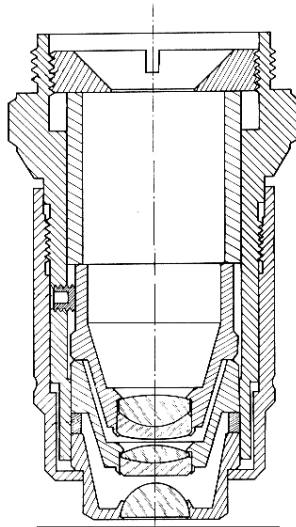


Abb. 2.14: Schematischer Aufbau eines Achromaten. Deutlich erkennbar sind die Linsenduplets zur Dispersionskorrektur. [Kin65]

bezeichnet. Neben diesen üblichen Modellen gibt es noch *Mikro-Spiegelobjektive* und *Phasenkontrast-Objektive*, die jedoch meist nur mit speziellen Kondensor-Systemen eingesetzt werden können. Weiterhin ist bei Objektiven zwischen Luft und Immersions-Objektiven zu unterscheiden. Als Immersionsmedium wird typisch Wasser, Glycerin oder Öl verwendet, je nach Spezifikation des Objektives. Aufgrund der Definition der numerischen Apertur ist erkennbar, daß hochnumerische Objektive immer mit einem hochbrechenden Immersionsmedium zur Vermeidung einer Totalreflexion eingesetzt werden müssen. Die Abbildung 2.14 aus [Kin65] zeigt den schematischen Aufbau eines Achromaten.

## 2.9 Detektoren für die Lichtmikroskopie

Der Detektor eines Mikroskops unterliegt aufgrund seines Funktionsprinzips und seines Aufbaus physikalischen Grenzen bezüglich Auslesegeschwindigkeit, spektraler Empfindlichkeit, Dynamik, Rauschen, Quanteneffizienz sowie der Ortsauflösung. Hierbei muss der Anwender zu einem konkreten Problem stets den geeigneten Detektor wählen.

Ortsauflösende Detektoren sind das Auge, CMOS<sup>4</sup>-Sensoren, CCD<sup>5</sup>-Sensoren, ICCD<sup>6</sup>-Sensoren und EMCCD<sup>7</sup>-Sensoren. Bei einem CMOS-Chip werden einzelne Silizium-Photodetektoren (pixel) matrixförmig angeordnet. Trifft ein Photon mit geeigneter Energie auf die Siliziumschicht, werden Photoelektronen ausgelöst, die als Ladung detektiert werden können. Jede Spalte dieser Matrix besitzt ihr eigenes Verstärkerelement, so daß jeweils eine Zeile parallel ausgelesen werden kann. Dies führt zu hohen Auslesegeschwindigkeiten. Mit entsprechenden Adressdekodern werden die einzelnen Zeilen ausgewählt und an die Ausgangsregister übergeben. Nachteilig an dieser Technik ist, dass für jede Spalte ein Verstärker benötigt wird, diese sich produktionsbedingt nicht exakt aufeinander kalibrieren lassen und es somit zu orts- und intensitätsabhängigen Nichtlinearitäten kommt.

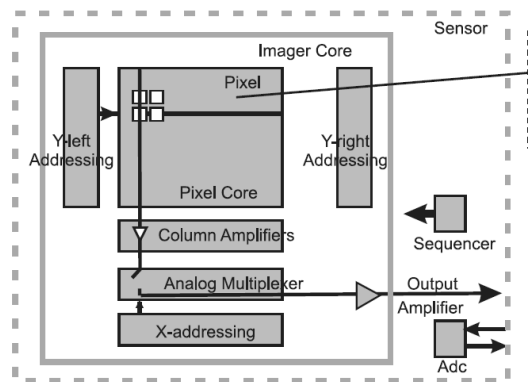


Abb. 2.15: Schematischer Aufbau eines CMOS-Sensors und Anstreuerelektronik. [And08]

<sup>4</sup>engl.: complementary metal oxide semiconductor

<sup>5</sup>engl.: charge coupled device

<sup>6</sup>engl.: image intensified charge coupled device

<sup>7</sup>engl.: electron multiplied charge coupled device

Der Aufbau von CCD-Sensoren ist ebenfalls eine matrizenförmige Anordnung von Silizium-Photodetektoren. Im Gegensatz zu der CMOS-Version existiert nur ein einziges Verstärkerelement, so daß die Ladungen der einzelnen Pixel seriell durch dieses Verstärkerelement transportiert werden müssen. Hierdurch wird ein sehr lineares Verhalten erreicht; die Auslesegeschwindigkeiten sind jedoch durch diese zusätzliche serielle Struktur geringer. EMCCD-Sensoren sind grundsätzlich identisch zu den CCD-Sensoren; das Ausgangsregister ist hier jedoch nicht direkt an den Verstärker angeschlossen, sondern wird einem zweiten Register zugeführt, so daß mehr Ladung in diesem Multiplikationsregister angesammelt werden kann, welche schließlich dem Verstärker zugeführt wird. Der große Vorteil dieses zusätzlichen Multiplikationsregisters erlaubt es, sehr kurze Integrationszeiten zu verwenden und somit das lineare Verhalten der CCD-Sensoren mit dem schnellen Ausleseverhalten der CMOS-Sensoren zu kombinieren. Die bildverstärkenden ICCD-

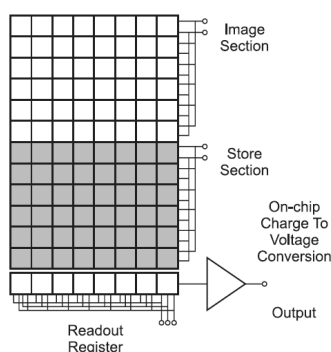


Abb. 2.16: Schematischer Aufbau eines CCD-Sensors und Ansteuerelektronik [And08].

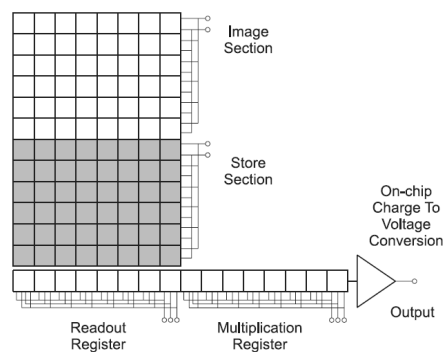


Abb. 2.17: Schematischer Aufbau eines EMCCD-Sensors und Ansteuerelektronik [And08].

Sensoren bestehen aus einem CCD-Sensor mit vorgeschaltetem Bildverstärker. Dieser besteht aus einer Photokathode, an welcher Photoelektronen entstehen. In der folgenden Multichannelplate werden diese in vielen parallelen Mikrokanälen durch den Sekundär-Elektronen-Effekt um den Faktor  $10^2$  bis  $10^4$  verstärkt, durch eine hohe Spannung beschleunigt und treffen dann auf einen Leuchtschirm, an dem sie wieder Fluoreszenzlicht erzeugen. Das Bild auf dem Leuchtschirm wird entweder über eine Linse auf einen CCD-Sensor abgebildet oder über ein geordnetes Lichtleiterbündel auf den Sensor übertragen. Die ICCD-Sensoren gestatten Integrationszeiten im Sub-Nanosekundenbereich, indem die Multichannelplate mit einem kurzen Hochspannungsimpuls beaufschlagt wird.

Die Ortsauflösung ist jedoch nicht nur durch die Anzahl der Pixel gegeben, vielmehr ist deren Fläche die entscheidende Größe bei der Ortsauflösung. Typischerweise werden quadratische Flächen für die Siliziumsensoren mit einer Kantenlänge von  $6\mu m$  bis  $30\mu m$  verwendet. Der Abstand zwischen den einzelnen Pixeln beträgt meist nur weni-

ge 50..200nm. Diese Pixelgröße bestimmt die maximal mögliche Ortsauflösung, wobei das Nyquist-Theorem noch zu berücksichtigen ist! Ein Sensor mit  $8\mu\text{m}$  Pixelgröße, der an einem 100fach Objektiv verwendet wird, erreicht im Objektraum des Objektivs eine Ortsauflösung von 80nm; unter Einhaltung des Nyquist-Theorems sollten damit jedoch maximal 160nm aufgelöst werden. Aus den vorherigen Betrachtungen zur optischen Auflösung entspricht dies einem Objektiv mit einer numerischen Apertur von NA 1.9, was die volle Leistungsfähigkeit eines NA 1.4 Objektivs nicht einschränkt. Wird nun eine Pixelgröße von  $24\mu\text{m}$  verwendet, entspricht dies einer NA=0.6 und reduziert somit die maximal mögliche Auflösung eines Hochleistungsobjektivs (NA 1.4) merklich.

Zeitauflösende Detektoren sind PMTs<sup>8</sup> sowie APDs<sup>9</sup>. Diese bestehen nur aus einem einzigen Detektorelement, welches die Photoelektronen lawinenartig innerhalb sehr kurzer Zeiten (typ. ns-Bereich) verstärkt. Eine Ortsauflösung ist insofern nicht möglich, da meist nur eine beugungsbegrenzte Scheibe auf diese Detektoren abgebildet wird.

Als Weitfeld-Detektion wird die gleichzeitige Erfassung eines gesamten 2D-Bildes bezeichnet, welches aus typ.  $1000\times 1000$  Bildpunkten, je nach Größe der Sensormatrix, besteht. Systeme, bei denen sich der Detektor in der konjugierten Bildebene befindet, werden als konfokale Systeme bezeichnet. Diese können nur einen einzelnen - in der Regel beugungsbegrenzten - Punkt detektieren. Damit ein vollständiges 2D-Bild entsteht, muß entweder die Probe (*stagescanning*) unter dem Strahl lateral bewegt werden oder aber der Strahl wird über die Probe gerastert (*beamscanning*). Durch diesen Abrastvorgang ist die Punktdetektion, üblicherweise mit PMTs oder APDs realisiert, bei großen abzurasternden Flächen nur unwesentlich schneller als bei Verwendung von Weitfeld-CCD-Detektoren. Zur Betrachtung von dynamischen Prozessen kann häufig eine kleine Fläche, eine ROI<sup>10</sup>, betrachtet werden. Hier sind nun PMTs und APDs bei der Detektion von zeitkritischen, d.h. von schnell veränderlichen Signalen gegenüber dem langsamen CCD-Chip klar im Vorteil; EMCCD-Sensoren erreichen jedoch heute bereits Bildraten zwischen 500 und 3000 fps<sup>11</sup>.

Neben diesen beiden Faktoren ist auch der *dynamische Bereich* der Detektoren von sehr großer Wichtigkeit. Bei CCD-Detektoren ist die typische Dynamik der gesamten Elektronik bei 12 bis 16 Bit<sup>12</sup>; hingegen weist die Elektronik der APDs nur etwa 3 bis 4 Bit Dynamik auf. Die PMT-Detektoren arbeiten typischerweise in einem dynamischen Bereich zwischen 8 und 12 Bit. Neben der Dynamik ist die *Quanteneffizienz* eine sehr wichtige Größe, die zusammen mit der gesamten Elektronik beschreibt, wie effektiv der entsprechende Detektor ist, d.h. wieviele Photonen detektiert werden müssen, um diese als ein Ereignis detektieren zu können, was speziell bei lichtschwachen Signalen sehr problematisch wird. Hierzu wurden *back-illuminated CCD* Chips entwickelt, bei denen die Siliziumschicht über den Gate-Elektroden der einzelnen Pixel sehr dünn ausgeführt ist.

---

<sup>8</sup>engl.: photomultiplier tube

<sup>9</sup>engl.: avalanche photo diode

<sup>10</sup>engl.: region of interest

<sup>11</sup>engl.: frames per second

<sup>12</sup>bit: binärer Zustand mit Basis 2

Auf dieser Seite wird der Chip beleuchtet, so daß es zu keiner Reflexion oder Absorption der Photonen an den metallischen Gates der Pixel kommt und somit fast alle Photonen zu Photoelektronen konvertiert werden können. Die Quanteneffizienz sehr guter CCD-Sensoren beträgt etwa 60%, die der back-illuminated CCD-Sensoren etwa 90%.

## 2.10 Strukturierte Beleuchtung

Das Auflösungsvermögen eines Lichtmikroskops ist grundlegend durch das gesamte Detektionssystem, speziell jedoch durch die Numerische Apertur des Objektiv begrenzt. Das von einem homogen (linear) beleuchteten Objekt emittierte Licht kann nur teilweise detektiert werden. Im Ortsraum bedeutet dies, daß nur der Anteil des Lichtes detektiert werden kann, dessen Abstrahlwinkel innerhalb des Öffnungswinkel des verwendeten Objektivs liegt. Im Frequenzraum folgt aus dieser Winkeleinschränkung die Existenz einer maximalen Frequenz, welche durch ein Objektiv übertragen werden kann. Mit dem Fouriertheorem kann daraus eine minimale Objektstruktur verknüpft werden.

Ein Objektiv wirkt demnach als ein Tiefpaßfilter und schneidet hohe Raumfrequenzen ab, welche für eine höhere Auflösung notwendig sind.

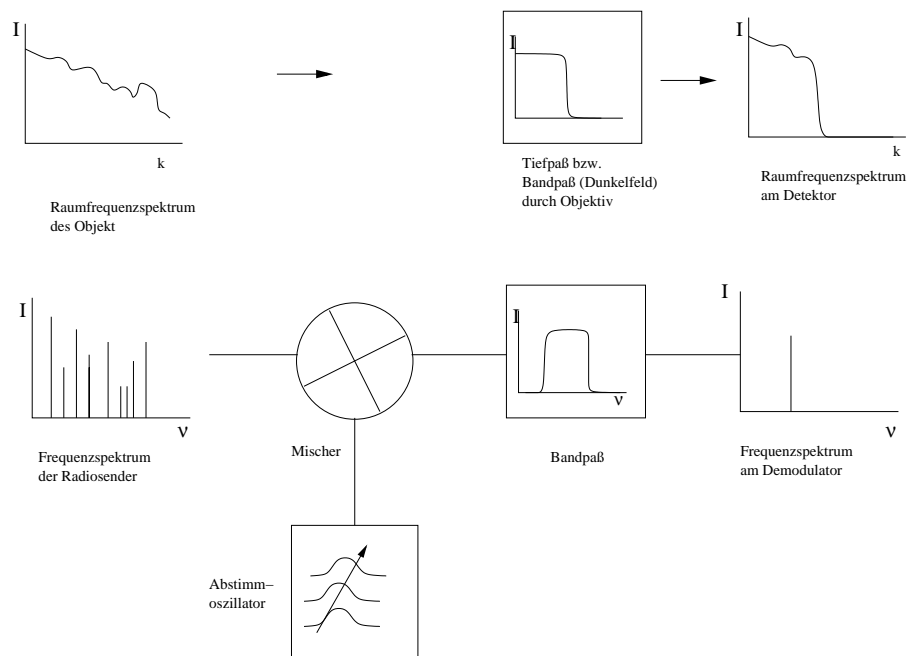


Abb. 2.18: konventionelle Mikroskop-Detektion vs. Radio-Empfang. Durch Mischung wird dem bandbreitenbegrenzten Detektor der entsprechende Frequenzbereich zugänglich gemacht.

Die Abbildung 2.18 skizziert diesen Effekt, indem der Zusammenhang zwischen der Filterwirkung der Objektiv mit dem eines Radioempfängers verglichen wird, da auch dieser nur einen stets konstanten Teil des gesamten Hochfrequenzspektrum zur Detektion verwenden kann. Aus diesem einfachen Schaubild läßt sich bereits die Methode zur Auflösungsverbesserung erkennen. Die verschiedenen Sender werden am Radio durch einen Mischer vor dem bandbreitenbegrenztem Detektor ausgewählt, so daß diesem z.B. die Differenzfrequenz aus der Mischerfrequenz und dem Hochfrequenzsignal der Detektion zugeführt wird. Die Summe aus mehreren bei verschiedenen Mischerfrequenzen detektierter Signalen ergibt bei entsprechende spektraler Verschiebung ein Gesamtsignal, welches aus einem spektral breiteren Bereich stammt.

Zur Erhöhung der optischen Auflösung wird eine hierzu analoge Methode verwendet. Anstatt das Objekt homogen zu beleuchten wird dieses mit einem bekannten Muster beleuchtet, dessen Intensitätsverteilung üblicherweise einer  $\cos$ -Funktion entspricht. Hierzu werden zwei Laserstrahlen kohärent überlagert. Ist die Periode dieses Muster sehr fein, die Raumfrequenz also entsprechend hoch, kommt es zu einem Moire-Effekt zwischen dem periodischen Anregungsmuster und den Objektstrukturen [Gust00] [Froh01]. Eine wichtige Eigenschaft des Moire-Effekt ist, daß das aus diesem stammende Muster eine niedrigere Raumfrequenz aufweist als die der maximalen Objektstruktur, es sich also wie bei dem Radio um eine Mischung der Frequenzen handelt.

Alle durch das Objektiv übertragbaren, und somit auch detektierbaren Raumfrequenzen, liegen im Frequenzraum innerhalb einer Kreisscheibe. Das durch das Objektiv in die Objektebene übertragene strukturierte Beleuchtungsmuster muß demnach ebenfalls innerhalb dieser Kreisscheibe liegen. Für ein  $\cos$ -Signal entspricht dies gerade drei Fourierkomponenten innerhalb dieser Scheibe, wobei eine die Nullfrequenz den Mittelwert darstellt und die beiden anderen Raumfrequenzen jeweils um  $+$  und  $-$  der Frequenz des Periodenmuster verschoben sind. Die Richtung des Beleuchtungsmuster ist dabei mit der Achse der drei Punkte identisch. Ausgehend von jedem dieser Punkte existiert ein OTF-Bereich mit jeweils gleichem Durchmesser. Daher kommt es zu einer zusätzlichen Verschiebung von Raumfrequenzkomponenten welche außerhalb des der Nullfrequenz zugänglichen OTF-Bereich liegen, in diesen Bereich hinein.

Anhand der Abbildung 2.19 ist deutlich erkennbar, daß eine merkliche Verbesserung der optischen Auflösung nur stattfindet, wenn die Periodenlänge des Beleuchtungsmuster sehr klein wird. Damit wird eine deutliche Verschiebung der einzelnen OTF-Bereiche verursacht womit mehr Raumfrequenzkomponenten erfasst werden können.

Die Intensitätsverteilung in der Objektebene ist im Fall einer kosinusförmigen Modulation entlang der  $x$ -Achse:

$$I_{OP}(r) = O(r) \cdot (1 + \cos(k \cdot x + \phi)) \quad (2.41)$$

Hierbei beschreibt  $O(r)$  das Objekt,  $\phi$  die Phasenlage des Beleuchtungsmuster relativ zum Objekt sowie  $k$  den Wellenvektor der strukturierten Beleuchtung. Dieser ist sowohl vom Brechungsindex  $n$  in der Objektebene, als auch vom Winkel  $\theta$  zwischen den beiden

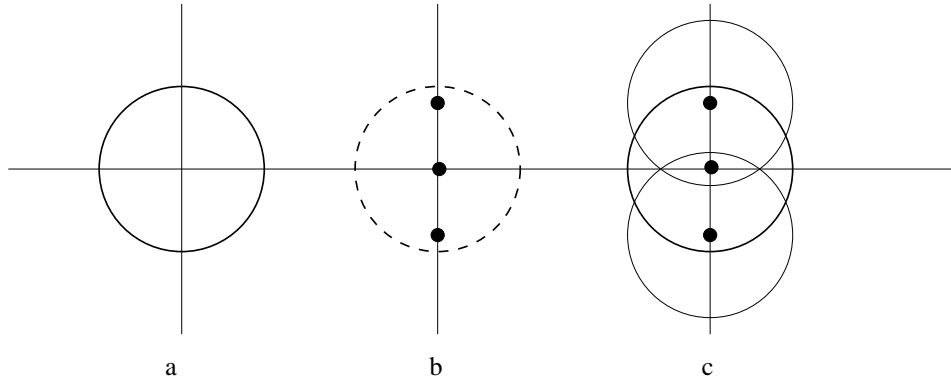


Abb. 2.19: Prinzip der Auflösungsverbesserung durch strukturierte Beleuchtung. In Bild (a) ist der detektierbare Frequenzbereich bei homogener Beleuchtung zu sehen. In (b) sind die 3 Frequenzkomponenten eines Kosinus-Beleuchtungsmuster dargestellt. (c) zeigt den erweiterten OTF-Bereich durch die strukturierte Beleuchtung.

Strahlen sowie von deren Wellenlänge abhängig und kann wie folgt beschrieben werden:

$$k = \frac{2 \cdot \pi}{\lambda/2 \cdot n \cdot \cos(\theta)} \quad (2.42)$$

Das detektierte Bild entspricht in gewohnter Weise einer Faltung aus der Intensitätsverteilung in der Objektebene mit der Detektions-PSF  $P(r)$ , welche der eines gewöhnlichen Mikroskopes entspricht, da sich an der Detektion nichts geändert hat.

$$I_{Det}(r) = O(r)(1 + \cos(k \cdot x + \phi)) \otimes P(r) \quad (2.43)$$

$$\begin{aligned} &= O(r) \otimes P(r) + \left(\frac{1}{2} \cdot e^{i(k \cdot x + \phi)} \cdot O(r)\right) \otimes P(r) \\ &\quad + \left(\frac{1}{2} \cdot e^{-i(k \cdot x + \phi)} \cdot O(r)\right) \otimes P(r) \end{aligned} \quad (2.44)$$

Aus dieser Gleichung ist zu erkennen, daß ein solches Bild die Summe aus drei Bildern darstellt, wobei jedes einzelne aus einem anderen Raumfrequenzbereich entstammt. In dieser Form ist jedoch diese Gleichung nicht eindeutig lösbar. Zur eindeutigen Lösbarkeit werden anstatt nur einem Bild drei Bilder bei unterschiedlicher, jedoch bekannter Phasenlage zueinander aufgenommen. Aus diesem Gleichungssystem der drei Einzelmessungen kann das hochaufgelöste Bild, welches die gewichtete Summe der Einzelbilder darstellt, rekonstruiert werden.

Damit es zu einer Verbesserung nicht nur entlang einer Richtung sondern innerhalb der lateralen Ebene kommt, sind neben dieser Messreihe zwei weitere Messreihen notwendig. Die Orientierung der einzelnen Messreihen zueinander sollte jeweils  $60^\circ$  betragen. Hierdurch kommt es zu einer nahezu homogenen Verbreiterung der gesamten OTF.



### 2.10.1 Optische Schnittbildung

Neben der Erhöhung der optischen Auflösung wird die strukturierte Beleuchtung zur Erzeugung von optischen Schnitten verwendet [Jank04]. Diese erhöhen nicht die Auflösung, steigern jedoch den Kontrast von Objekten innerhalb des Fokus zu Objekten außerhalb des Fokus.

Optische Schnittbildung bedeutet die Einführung einer bekannten zusätzlichen Information in die mikroskopische Abbildung, mit derer unterschieden werden kann, ob Intensitätsänderungen im detektierten Bild pro Pixel aus einem bestimmten Fokusbereich stammen oder nicht.

Hierzu wird ein schmaler Bereich um die Brennebene des Objektiv dadurch ausgezeichnet, daß ein dorthin abgebildetes grobes Beleuchtungsmuster zur Anregung der Objekte verwendet wird. Bei der Detektion bewirken die Objekte zusammen mit dem Beleuchtungsmuster eine Amplitudenänderung. Der Außerfokusbereich weist keine Amplitudenänderung der Objekte mit dem Beleuchtungsmuster auf, da dieses nur in den Infokusbereich scharf abgebildet wird und außerhalb defokussiert ist. Der Mittelwert der modulierten Intensität entspricht der Nullfrequenz in der Fourier-Optik. Dieser Wert ist unabhängig von der Defokussierung. Alle anderen Frequenzanteile werden durch Defokussierung abgeschwächt.

Bei der Detektion werden sowohl Signale aus dem Infokusbereich als auch aus dem Außerfokusbereich detektiert. Diese müssen mathematisch aufbereitet werden, so daß eine Trennung aus den einzelnen Fokusbereichen erfolgen kann. Diese Trennung wird als optische Schnittbildung bezeichnet. Einige dieser Methoden sind [Pawl06]:

- Verwendung des Maximum pro Punkt innerhalb des Datenstapel.
- Differenz aus Maximum - Minimum des Datenstapel
- Differenz aus Maximum - Minimum bei lokaler Gewichtung der Pixeldichte für den Datenstapel.

Je leistungsfähiger die Algorithmen sind, desto effektiver ist auch die Schnittbildung.



### 3 Betrachtung zu den Aufbauten und deren Justage

Ausgehend von den theoretischen Möglichkeiten zur Erzeugung von Totalreflexion mit strukturierter Beleuchtung wurden in dieser Arbeit zwei verschiedene SW-TIRF Mikroskope, Software zur Simulation und Auswertung von SW-TIRF Daten sowie ein Verfahren, dass die einfache und schnelle Relokalisation von ein und dem selben Objekt mit verschiedenen Mikroskopen erlaubt, entwickelt.

Ein vertikaler Aufbau mit Prismen-Einkopplung, welcher aufgrund der vertikalen Strahlführung eine leichte Adaption für in-vivo Messungen liefern sollte, sowie ein horizontaler Aufbau mit Objektiv-Einkopplung. Beide Aufbauten wurden ausgiebig auf deren mechanische Stabilität getestet. Damit die Resultate der einzelnen Mikroskope untereinander verglichen werden konnten, wurde ein System entwickelt, dass die schnelle Relokalisation von Objekten auf einem Präparat mit verschiedenen Mikroskopen zulässt.

Für alle drei Aufbauten wurde weitestgehend die gleiche Hardware verwendet. Die Detektion erfolgte stets mit einem Leica-Hochleistungsobjektiv vom Typ *PL APO 100x NA1.40-0.70 OIL CS* und einer auf diese Objektivserie angepassten Tubuslinse mit dem Abbildungsmaßstab eins. Als Detektor wurde jeweils eine peltiergekühlte CCD-Kamera von PCO, Typ *SensiCam QE* verwendet. Diese hat eine hohe Quanteneffizienz von 60%, bei einer sehr geringen Pixelgröße von  $6,45\mu\text{m} \times 6,45\mu\text{m}$ . Weiterhin zeichnet sie sich durch einen geringen Dunkelstrom von  $<0.1\text{e}^-/\text{pixel}\cdot\text{sec}$  sowie ein niedriges Ausleserauschen von  $4.5\text{e}^-$  aus. Dies erlaubt die Detektion selbst extrem lichtschwacher Signale. Somit erfüllt sie ideal die an diesen Aufbau gestellte Forderung nach hoher Empfindlichkeit bei gleichzeitig hoher örtlicher Auflösung.

Zum exakten Auffinden der Fokusebene wurde das Objektiv an einem Piezo-Fokussierer von PI, Typ *P725.1CD* montiert. Dieser bietet zusammen mit dem ebenfalls von PI stammenden Controller *E665CR* einen maximalen Verfahrbereich von  $100\mu\text{m}$ . Die Positionsauflösung dieses Piezosystem ist besser als 1nm. Da der gesamte Aufbau vom PC aus gesteuert werden sollte, ist eine hohe Bitrate des Analog-Digital-Wandlers am Controller erforderlich gewesen. Das verwendete Modell bietet 20Bit Auflösung und erfüllt damit leicht die geforderte Positionsauflösung von 1nm. Die Resonanzfrequenz liegt bei etwa 160Hz für eine Last von 200g, wie sie typisch für ein Objektiv ist. Damit sind selbst schnelle Wechsel der Fokusposition kein Problem.

Die Phasenmodulation erfolgt ebenfalls mit einem Piezo der Herstellerfirma PI vom Typ *P770.10* und ebenfalls einem *E665* Controller. Die maximale Ausdehnung des Piezos beträgt  $7\mu\text{m}$  wobei die Positionsauflösung hier etwas über 1nm liegt. Die Resonanzfrequenz

muß bei Phasenmessungen höher sein, da bei diesen Messungen sehr schnell die Positionen variiert werden. Das ausgewählte Modell weist eine Resonanzfrequenz von 718Hz bei 100g Last auf.

## 3.1 2D SW-TIRF mit Prismen-Einkopplung

Bei der Prismeneinkopplung entsteht die Totalreflexion an der Oberseite eines Objektträgers, welcher sich im optischen Kontakt mit einem Einkoppelprisma befindet. Die Geometrie des Prismas gestattet eine bessere Einkopplung (und Auskopplung) der Laserstrahlung in den Objektträger, da die Winkel, gemessen zum Lot, an den Prismenschenkeln kleiner sind als direkt am Objektträger. Hinzu kommt, daß mit dieser Art der Einkopplung höhere TIRF-Winkel erreicht werden können als mit der Objektiv-Einkopplung. Der optische Kontakt zwischen Objektträger und Prisma wurde mit Immersionsöl<sup>1</sup> hergestellt, um mögliche Unebenheiten an den Oberflächen optisch anzupassen.

Damit aus diesem TIRF-Aufbau ein SW-TIRF entsteht, wurde der totalreflektierte, ausgekoppelte Laserstrahl mit einem piezoverstellbaren Spiegel entlang seiner Ursprungsrichtung reflektiert. Diese Methode erzeugt ein stehendes Wellenfeld, welches mit dem kritischen Winkel Totalreflexion erfährt. Der gesamte interferometrische Aufbau wurde auf einem Drehtisch aufgesetzt, welcher es gestatten sollte, in der ganzen Ebene Interferenz zu erzeugen, indem das Interferometer gedreht wird. Eine strukturierte Beleuchtung aus verschiedenen Richtungen in der Ebene verbessert die optische Auflösung bis etwa Faktor zwei. Messungen zur Stabilität zeigten jedoch, daß der Drehtisch nicht die benötigte mechanische Stabilität aufweist, zum einen bedingt durch dessen Spiel an den Zahnflanken im Getriebe, zum anderen aber auch durch starke Rückstellkräfte, welche durch Kapillarwirkung innerhalb des Ölfilms zwischen Prisma, Öl und Objektträger, sowie durch Adhäsion entstanden. Diese hatten zwar den Vorteil, dass sie den Objektträger am Prisma fixierten, jedoch auch alle Querkräfte direkt auf die Zahnräder des Getriebes übertragen hatten. Verschiebungen und Verkippungen des Interferometers aufgrund der Getriebe-Bewegung waren die Folge.

Eine mögliche Lösung stellt die Rotation der Probe [Chu07] über dem Prisma dar. Dies kann diese mechanischen Probleme auch nicht minimieren, zusätzlich müßte noch Kreuzkorrelation bei der Objektrekonstruktion durchgeführt werden. Hierbei kann jedoch nicht berücksichtigt werden, dass Aufgrund des stehenden Wellenfeldes bei der Drehung Bereiche des Objektes in ein Minimum fallen können, was zu Fehlern bei der Kreuzkorrelation führen kann. Die Abbildung 3.1 zeigt ein Photo des drehbaren Aufbaus sowie des Objektträgerhalters im Detail. Ein wesentlicher Nachteil der Prismenmethode stellt die im Vergleich zur Objektivmethode relativ große Fläche des totalreflektierten Laserspots dar. Die gesamte Strahlfläche wird durch eine Ellipse beschrieben, deren Fläche sich nach Gl. 3.3 berechnet. Hierbei steht  $d_1$  für den Strahldurchmesser in Luft,  $\delta$  für den

---

<sup>1</sup>Immersionöl 518F, Zeiss AG Oberkochen

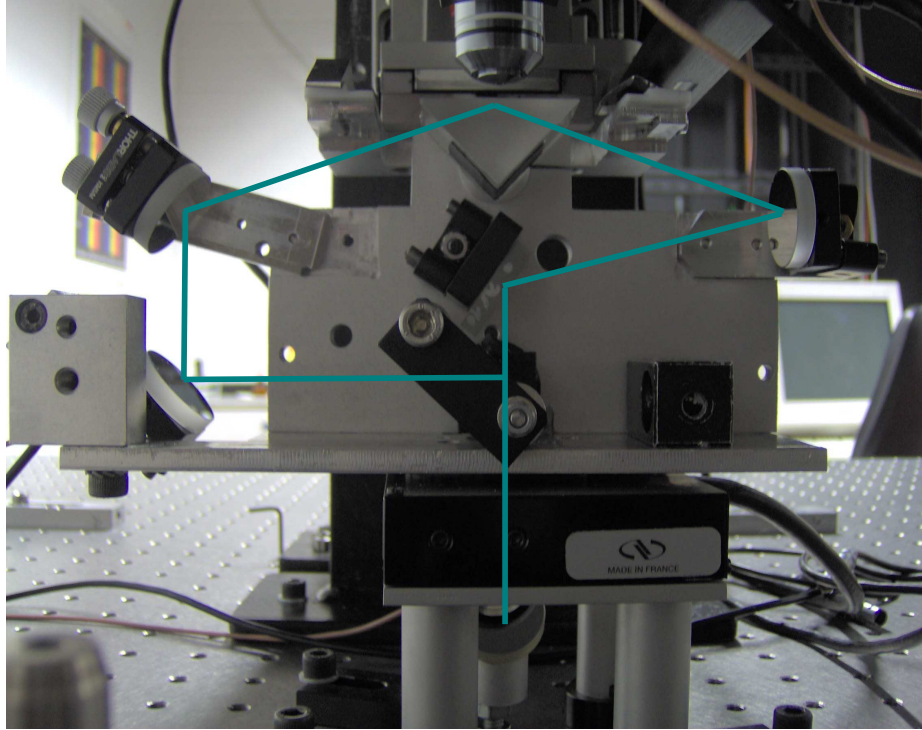


Abb. 3.1: Photo des drehbaren Prismen-Aufbaus mit Objektiv und Probenhalter. Die Einkopplung des Lasers erfolgt mittig über einen Spiegel unterhalb des Drehtisches.

Einkoppelwinkel in das Prisma relativ zur Prismabasis.  $\alpha$  beschreibt den entsprechenden Eintrittswinkel gemessen zum Lot und  $\epsilon$  den angestrebten TIRF-Winkel. Dem Basiswinkel des Prisma entspricht  $\gamma$ ,  $\beta$  bezeichnet den Winkel des gebrochenen Einkoppelstrahls innerhalb des Prisma mit dem Durchmesser  $d_2$  entlang seiner Längsachse. Die Länge der Ellipse bei Totalreflexion wird mit  $d_3$  bezeichnet.

$$A = \frac{\pi}{4} \cdot d_1^2 \cdot \frac{\cos(\arcsin(\frac{n_1}{n_2} \cdot \sin(\frac{\gamma}{2} - \delta)))}{\sin(\frac{\gamma}{2} + \arcsin(\frac{n_1}{n_2} \cdot \sin(\frac{\gamma}{2} - \delta))) \cdot \cos(\frac{\gamma}{2} + \delta)} \quad (3.1)$$

$$(3.2)$$

$$\begin{aligned} \alpha &:= \frac{\gamma}{2} - \delta & \beta &:= \arcsin\left(\frac{n_1}{n_2} \cdot \sin \alpha\right) \\ & & \epsilon &:= \frac{\gamma}{2} + \beta \\ & & d_3 &:= \frac{d_2}{\cos \epsilon} \end{aligned}$$

$$A = \pi \cdot \frac{d_3}{2} \cdot \frac{d_1}{2} \tag{3.3}$$

Eine Strahlfläche, die wesentlich größer als das Gesichtsfeld des Detektions-Objektivs ist, minimiert die Effizienz der Anregung, da sich die Photonendichte des anregenden Laserstrahls auf die gesamte Fläche etwa gaußförmig verteilt. Dieser Umstand kann mit erhöhter Laserleistung prinzipiell korrigiert werden - obgleich dies nicht sehr effizient ist, da das Quadrat des Strahldurchmessers, wie aus obigen Gleichungen zu ersehen ist, den begrenzenden Faktor darstellt und somit auch die Laserleistung für eine lineare Erhöhung des Photonenflusses quadratisch ansteigen muß. Weiterhin ist zu bedenken, daß die Probenpräparation auf dem Objektträger erfolgen muß, da nur dieser in optischem Kontakt zur Prismabasis steht. Falls handelsübliche Deckgläser verwendet werden, haben diese jedoch den selben Brechungsindex wie der Objektträger. Damit Totalreflexion am Objektträger entstehen kann, muß somit der Brechungsindex-Sprung an der Grenzfläche zwischen Objektträger und Einbettungsmedium erfolgen. Für die Detektion bedeutet dies aber eine Fehlanpassung im Brechungsindex, was zu einer Verbreiterung der Punktbildfunktion (PSF) führt, da sich der maximal detektierbare Raumwinkel verringert. Als Folge der breiteren PSF werden weniger emittierte Photonen detektiert. Weniger detektierte Photonen bedeuten jedoch auch eine schlechtere Lokalisationsgenauigkeit.

Neben Messungen mit handelsüblichen Objektträgern aus N-BK7 und Wasser als Einbettungsmedium wurden auch Messungen mit speziell beschichteten Objektträgern durchgeführt. Hierzu wurden Objektträger auf der Probenseite mit einer 100nm  $Al_2O_3$ -Schicht versehen. Diese weist einen Brechungsindex von etwa 1.68 auf, weshalb als Einbettungsmedium ein an das Detektions-Objektiv angepasstes Medium, hier *VectaShield*, verwendet werden konnte. Damit konnten die obigen Nachteile weitestgehend reduziert werden. Damit größere Winkel zur TIRF-Anregung realisiert werden konnten, wurde als Material für das Einkoppelprisma N-F2 verwendet. Dieses weist einen Brechungsindex von 1.632 bei 486nm auf.

## 3.2 2D SW-TIRF mit Objektiv-Einkopplung

Ein wesentlicher Nachteil des Prismen-Aufbaus stellt der notwendige optische Kontakt zwischen Prisma und Objektträger dar. Dies führt dazu, daß neben dem Objektiv zum Auffinden der angeregten TIRF-Ebene auch das Prisma und der Objektträger in axialer

Richtung verschiebbar sein müssen und die Probe somit von beiden Seiten aus zugänglich sein muß.

Dies wird bei TIRF-Erzeugung durch das Objektiv umgangen, da hierbei nur das Objektiv bewegt werden muß. Die Intensität des Anregungslichts ist, sofern keine weiteren Maßnahmen getroffen werden, deutlich höher als bei der vorherigen Methode, da die Anregung kollimiert mit einem Strahldurchmesser, je nach numerischer Apertur und Wellenlänge, von etwa  $70\mu\text{m}$  erfolgt. Ein solcher 2D SW-TIRF-Aufbau mit Objektiv-einkopplung wurde im Rahmen dieser Arbeit zweimal realisiert und wird im folgenden beschrieben.

### 3.2.1 Der Dove-Prisma Aufbau

Der erste Aufbau mit Objektiv-einkopplung bestand primär aus einem Strahlteilerwürfel mehreren Spiegeln zur Ein- und Auskopplung, einem in seiner Längsachse drehbar montiertem Dove-Prisma sowie einer Einfokussierlinse für die hintere Fokusebene des Objektivs. Beide Strahlen werden in einer festen Einfallsebene mit einem frei wählbaren aber konstanten Winkel in das Dove-Prisma eingekoppelt, die Austrittsebene kann variabel durch Rotation des Prismas eingestellt werden. Dies bietet die Möglichkeit zur strukturierten Beleuchtung in der gesamten lateralen Ebene. Die folgende Skizze zeigt schematisch den realisierten Aufbau um einen besseren Überblick zu bekommen. Der

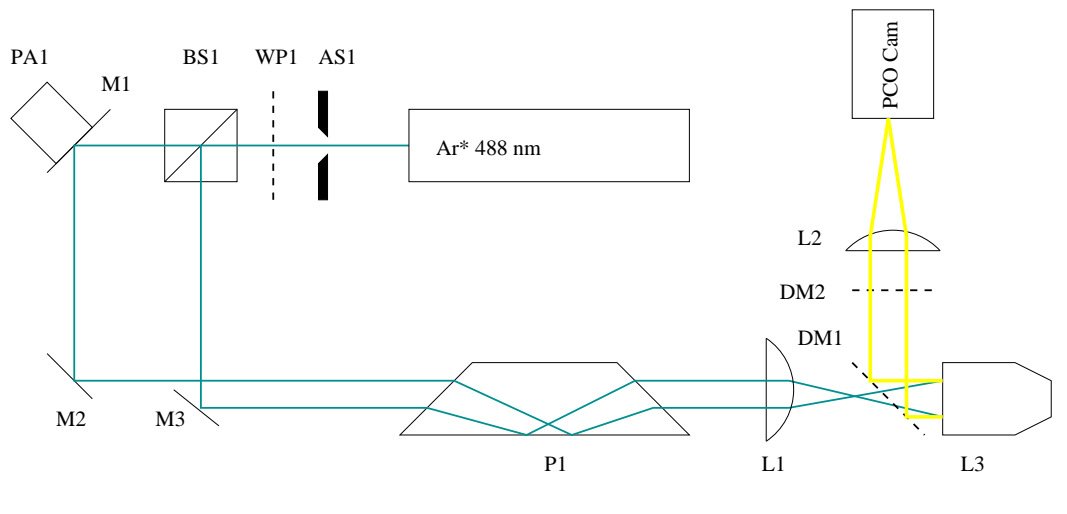


Abb. 3.2: 2D SW-TIRF Dove-Prisma-Aufbau. Mit dem Dove-Prisma P1 werden die beiden Strahlen in der Ebene gedreht und anschließend mit der Linse L1 in Randnähe in die hintere Fokusebene des Objektiv L3 fokussiert.

Strahlteilerwürfel BS1 (Linios G335520000) erzeugt zwei kohärente Strahlen, die mit den Spiegeln (M2 und M3) um den gewählten TIRF-Winkel zueinander verkippt werden und mit dem Dove-Prisma P1 (Melles Griot 01PDE005) in der XY-Ebene gedreht werden.

Die Einfokussierlinse L1 (Spindler & Hoyer,  $f=500\text{mm}$ ) koppelt die beiden gedrehten Strahlen in die hintere Fokusebene des Objektivs L3 (Leica PL APO 100x NA1.40-0.70 OIL CS) ein, so daß eine strukturierte Beleuchtung in 2D mit kollimierten Strahlen erfolgt. Die Phase der stehenden Welle wird mittels eines piezoverstellbaren PA1 (PI P770.10) Spiegels M1 eingestellt. Die Einstellung der entsprechenden Polarisationsrichtung in Abhängigkeit vom Drehwinkel des Prismas erfolgt mittels einer  $\lambda/2$ -Platte WP1 (Melles Griot, 02WRC039/488) vor dem Strahlteilerwürfel. Der Detektionsweg entspricht dem üblichen Aufbau von Fluoreszenzmikroskopen, d.h. einem dichroitischen Strahlteiler DM1 (AHF Z488RDC), einem Filter zur Unterdrückung des Anregungslichts DM2 (AHF HQ500LP), einer entsprechenden Tubuslinse L2 (Leica 020-515.075-020) mit Faktor 1.0 für das Objektiv und einer CCD Kamera (PCO SensiCam QE).

Nachteilig an dieser Methode ist, dass zum Einen das Dove-Prisma sehr schwierig auszurichten ist (3 Freiheitsgrade im Ort, 3 Freiheitsgrade zu möglichen Verkippungen gegenüber der Einfallsebene der Laserstrahlen sowie 1 Freiheitsgrad in der Einkoppelhöhe zur Prismabasis), damit die Rotation der beiden Strahlen um ein gemeinsames Zentrum erfolgt, zum Anderen sind diese Einstellungen nur für einen einzigen TIRF-Winkel erfüllbar. Ist einer dieser Parameter falsch eingestellt, rotieren beide Strahlen nicht um ein gemeinsames Zentrum, was eine winkelabhängige TIRF-Eindringtiefe und im Falle von 2D-SW-TIRF auch eine winkelabhängige Periodenlänge zur Folge hat. Eine Erweiterung des Aufbaus für mehrere Anregungswellenlängen ist Aufgrund der Dispersion des Dove-Prismas nur sehr schwierig möglich, da sich die Einkoppelhöhe für die verschiedenen Wellenlängen unterscheiden muß.

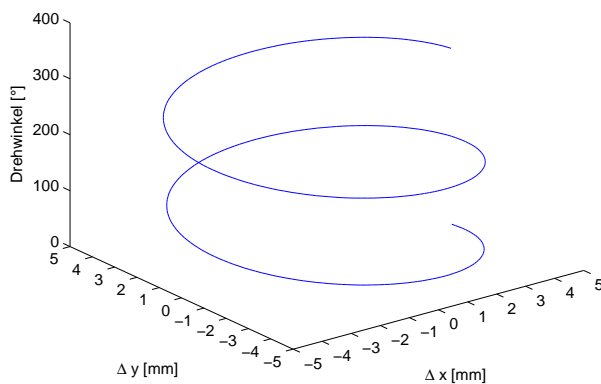


Abb. 3.3: Simulierter Strahlverlauf bei Rotation des Prismas

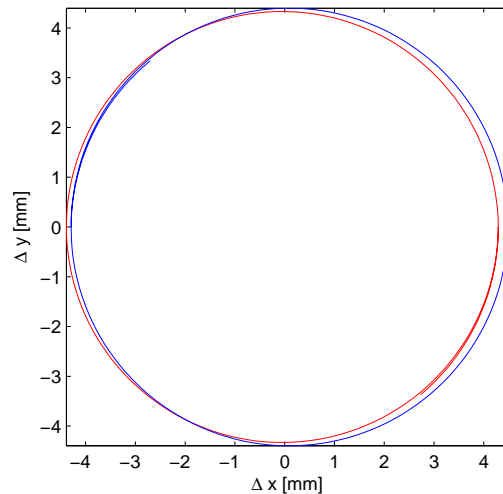


Abb. 3.4: Simulierter Strahlverlauf in der  $xy$ -Ebene



Damit das Prisma in die richtige Position gebracht werden konnte, wurde dieses zusammen mit der Strahleinkopplung in Matlab virtualisiert; die Trajektorien der beiden Strahlen, deren Strahlausbreitung in der 3D-Virtualisierung mittels geometrischer Optik nachgebildet wurden, sind in den obigen Abbildungen dargestellt. Das Prisma wurde an einem 3-Achsen-Verschiebetisch (Newport, M-462) mittels einer selbstgebauten Drehvorrichtung befestigt.

Aus diesen Graphen ist zum Einen die doppelte Drehgeschwindigkeit des Bildes gegenüber dem Prisma zu erkennen, zum Anderen ist am letzten Graph die Auswirkung einer minimalen Dejustage erkennbar, da hierbei eine Abweichung zur exakten Kreisform erkennbar ist. Beide Strahlen wurden im letzteren Graph farblich verschieden dargestellt, um die Abweichungen besser hervorzuheben.

### 3.2.2 Der Interferometer-Aufbau

Aufgrund der aufwendigen Justage des Dove-Prismas, die für jeden TIRF-Winkel neu durchgeführt werden mußte sowie der starken Einschränkung auf nur eine einzige Wellenlänge für die Anregung entstand die endgültige Version des multispektralen 2D-SW-TIRF Mikroskops. Hierbei sollten die obigen Nachteile weitestgehend beseitigt werden, die Justage und Handhabung anwenderfreundlicher gestaltet werden sowie die Möglichkeit einer vielseitigeren Verwendung des Aufbaus gegeben werden. Das Mikroskop wurde in Gruppen zu logischen Einheiten entwickelt, damit sowohl die Justage vereinfacht wurde als auch die Möglichkeit zu weiteren Ergänzungen gegeben war.

Den erste Teil bildet die Strahlaufbereitung. Hierbei werden zunächst alle vier Laserlinien kollinear zueinander ausgerichtet und anschließend mit einem Raumfrequenzfilter<sup>2</sup>, welcher auf einer Mikrobank aus den Linsen L3 (f=10mm, Linos G052004000), L4 (f=80mm, Linos G063128000) und einer 10 $\mu$ m Lochblende (Linos G040150000) PH1 in einem Linsenpositionierer (Linos G061025000) montiert ist, das Modenspektrum gereinigt sowie eine Strahlaufweitung um den Faktor acht durchgeföhrt. Anschließend wird aus dem kollimierten, multispektralen Strahl mittels zwei zentrierten Blenden AS3 und AS4 ein Strahl mit einer homogenen Intensitätsverteilung von etwa 7mm Durchmesser ausgeschnitten und der zweiten logischen Einheit zugeföhrt. Der 404nm DPSS-Laserstrahl (CrystalLaser BCL-450-405) mußte in einer eigenen Vorstufe mit den Linsen L1 (f=10mm, Linos G063046000) und L2 (f=80mm, Linos G052107000) nochmals um den Faktor acht aufgeweitet werden, damit mit einer separaten Blende AS1 ein akzeptables TEM00-Profil am Eingang des Raumfrequenzfilters zur Verfügung stand.

Die zweite logische Einheit bildet ein abstimmbares Interferometer. Der prinzipielle Aufbau entspricht dem eines Michelson-Morley bzw. Twyman-Green Interferometers. Der kollimierte Strahl wird mittels eines nichtpolarisierenden 50 : 50 Strahlteilerwürfels BSC2 (Linos G335520000) in zwei kohärente Strahlen aufgeteilt, die jeweils an zwei parallel zum Strahlteilerwürfel stehenden Spiegeln M9 und M10 zurückreflektiert werden.

---

<sup>2</sup>Spatial mode filter

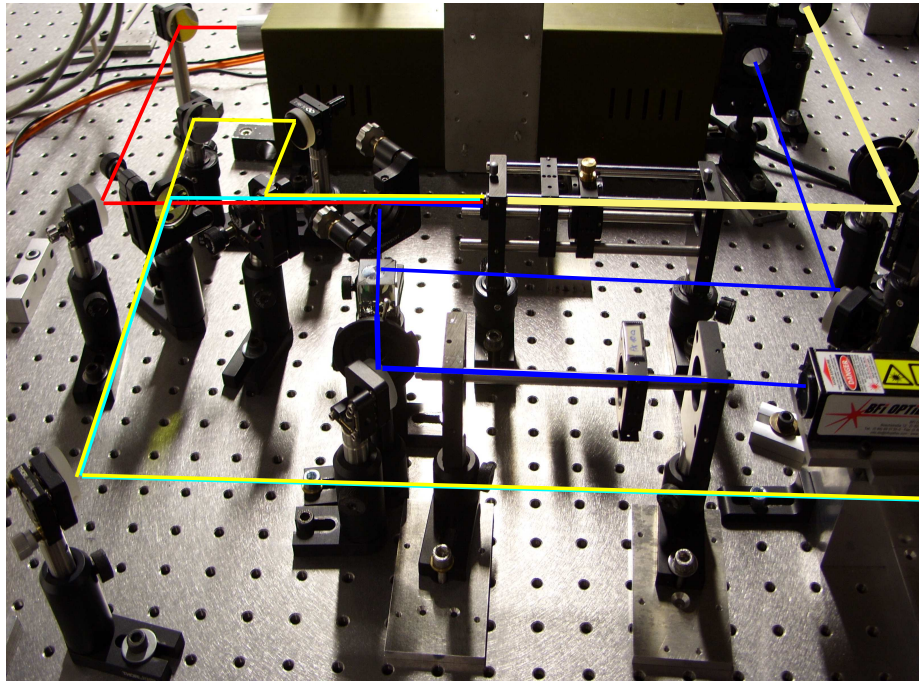


Abb. 3.5: Photo der Strahlauflbereitung für den Interferometer-Aufbaus.

Einer der beiden Spiegel ist an einem Piezoaktuator PA1 (PI P770.10) befestigt, so daß die Länge eines der beiden Interferometerarme eingestellt werden kann. Dies führt zu einem Interferenzmuster in der Strahlebene, dessen Phase mit dem Piezoaktuator einstellbar ist. Durch Rotation des Strahlteilerwürfels gegenüber den beiden Interferometerspiegeln mit dem Drehtisch RS1 (Newport SR50CC) kann das Interferenzmuster in seiner Periodenlänge verändert werden. Eine Veränderung in der Orientierung erfolgt durch Verkippung des Strahlteilerwürfels relativ zu dem piezoverstellbaren Spiegel mit dem Linearantrieb LA1 (Newport CMA-12CCCL).

Die praktische Realisierung erfolgte in dieser Arbeit wie auf dem Photo 3.6 zu sehen ist mit einem Linearverschiebetisch LS1 (Newport M-UMR8.25), auf dem sich ein Drehtisch RS1 mit einem kinematischen Linsenhalter (Newport U100-P) und darauf montiert einem Strahlteilerwürfel BSC2 befindet. Der Linearverschiebetisch LS1 dient hierbei zum Einstellen der beiden Interferometerarme auf die entsprechende Kohärenzlänge der Laser. Dies hat sich besonders bei dem 404nm DPSS Laser als sehr günstig erwiesen, da dessen Kohärenzlänge unter 1mm liegt, da kein Etalon im Resonator vorhanden ist. Der Drehtisch, welcher im Closed-Loop Modus betrieben wird, besitzt eine minimale uni-

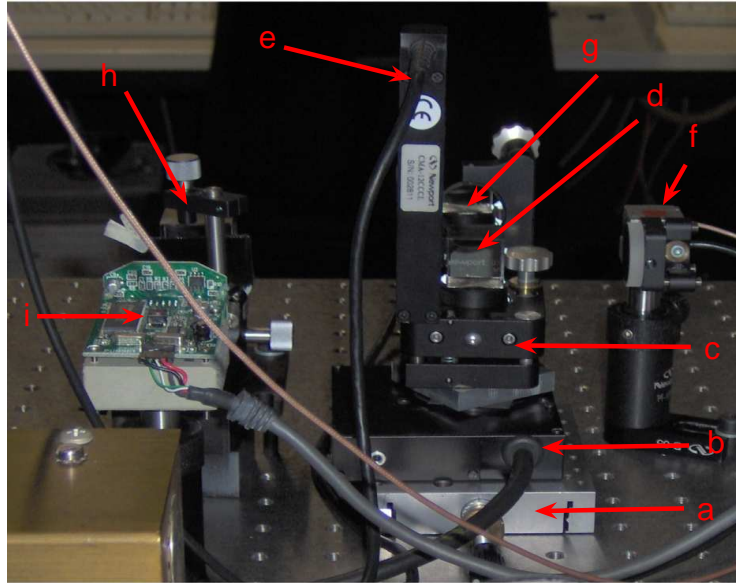


Abb. 3.6: Photo des abstimmbaren Interferometers. Die einzelnen Komponenten sind: a) Linearverschiebetisch, b) Drehtisch, c) kinematischer Halter, d) Strahlteilerwürfel, e) Linearantrieb, f) piezoverstellbarer Spiegel, g) fester Interferometerarm, h) Strahlteilerwürfel zur Webcam, i) Webcam.

direktionale Positionsgenauigkeit von  $0,003^\circ$ , wobei die Auflösung  $0,001^\circ$  beträgt. An dem kinematischen Linsenhalter wird die Verkippung in einer Achse mit einem ebenfalls im Closed-Loop Modus betriebenen Linearmotor LA1 durchgeführt. Die Ansteuerung des Linearaktuators LA1 sowie der beiden Drehtische RS1 und RS2 erfolgt mit einem 3-Achsen-Controller (Newport ESP3000).

Diese Anordnung gestattet eine symmetrische Einstellung für beide Strahlen, was eine variable Interferenzstruktur in der 2D-Ebene ermöglicht. Sowohl die Breite des Interferenzmusters als auch dessen Orientierung in der Ebene lassen sich frei einstellen und mittels des piezoverstellbaren Spiegel läßt sich noch die Phase der Interferenzstruktur beliebig einstellen. Diese variable Einstellungen gestatten es, die Probe zunächst mit Laser-Aufflicht zu beleuchten, den Fokuspunkt exakt einzustellen und erst danach die Probe mit Totalreflexion zu beleuchten. Ein selbstgebauter Shutter vor einem der beiden Interferometerspiegel wechselt zwischen strukturloser Beleuchtung und der Beleuchtung mit stehenden Wellen.

Das Interferenzmuster, welches durch dieses Interferometer entsteht, wird mit einer langbrennweitigen Einfokussierlinse L5 ( $f=500\text{mm}$ , Spindler & Hoyer), in deren Brennpunkt sich der  $50 : 50$  Strahlteilerwürfel BSC2 befindet, in die hintere Fokusebene eines hoch-

numerischen Mikroskop-Objektiv L7 (Leica PL APO 100x NA1.40-0.70 OIL CS) eingekoppelt. Zusätzlich befindet sich zwischen der Einfokussierlinse und dem Interferometer noch ein weiterer Strahlteilerwürfel (1 : 1) BSC3 (Edmund Optics, 004657), der das Interferenzmuster auf eine CMOS-Kamera (Typhoon STV0673) mit vorgeschaltetem Graufilter auskoppelt, so daß Betrag und Richtung der Wellenfront vor der Einfokussierlinse bekannt sind. Ein weiterer motorisierter Drehtisch RS2 (Newport PR50CC) rotiert eine  $\lambda/2$  Platte WP1 (Melles Griot, 02WRC039/488) vor der Einfokussierlinse L5, so daß eine variable Ausrichtung der Polarisationsrichtung möglich ist. Dies ist speziell für den Fall der Totalreflexion sehr wichtig, da sich nur bei p-polarisiertem Licht stehende evaneszente Wellen ausbilden können. Weiterhin kann eine polarisationsabhängige Anregung von Farbstoffmolekülen durchgeführt werden.

Das hochnumerische Objektiv befindet sich in der dritten logischen Einheit, welche primär der Detektion dient. Das parallel zur optischen Bank verlaufende Anregungslicht wird mit der Einfokussierlinse und einem dichroitischen Strahlteiler DM4 (AHF F63-488) in die hintere Fokusebene des senkrecht zur optischen Bank stehenden Objektivs eingekoppelt, welches die beiden interferierenden Strahlen abbildet. Das Objektiv selbst kann entlang der optischen Achse mit einem Piezofokussierer PA2 (PI P725.1CD) positioniert werden. Hierbei erfüllt die Einfokussierlinse zwei wichtige Aufgaben. Zum Einen bildet sie zusammen mit dem Objektiv einen Kollimator, so daß bei Einkoppelwinkeln unterhalb des kritischen Winkels zwei kollimierte Strahlen aus dem Objektiv austreten und die Probe mit einem konstanten Muster strukturiert beleuchtet wird. Zum zweiten reduziert die Einfokussierlinse den Strahldurchmesser in der hinteren Fokusebene des Objektivs auf wenige  $10\mu\text{m}$ , so daß Totalreflexion oberhalb des kritischen Winkel möglich ist. Bei einem Strahldurchmesser von mehreren Millimetern wäre dies nicht möglich, da nur eine Einkopplung am Randbereich des Objektivs die benötigten hohen Winkel erlaubt.

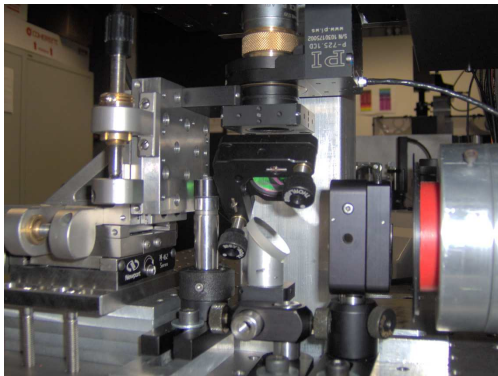


Abb. 3.7: Photo der Detektionseinheit ohne lichtdichter Box

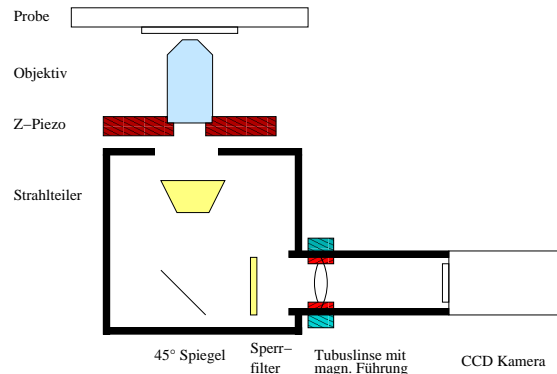


Abb. 3.8: Skizze der Detektionseinheit mit lichtdichter Box.

Das von der Probe emittierte Fluoreszenzlicht trifft senkrecht und kollimiert (da das Objektiv für eine auf unendlich eingestellte Tubuslänge berechnet wurde) auf den dichroi-



tischen Strahlteiler und hinter diesem auf einen Umlenkspiegel M13, gefolgt von einem weiteren dichroitischen Filter DM5 (AHF F62-568) um das Detektionsspektrum einschränken zu können sowie mögliches diffus gestreutes Anregungslicht zu unterdrücken. Eine für das Objektiv angepaßte Tubuslinse L6, Faktor 1.0 (Leica 020-515.075-020), sowie eine gekühlte CCD-Kamera (PCO SensiCam QE) schließen die Detektionseinheit ab. Der exakte Abstand der Tubuslinse zum CCD-Chip kann von der Außenseite des Tubusrohres, welches die Tubuslinse sowohl auf Achse mit dem Kamerachip hält, als auch einen lichtdichten Abschluß gewährt, mittels eines hierfür angefertigten magnetischen Führungssystems eingestellt werden.

Die inverse Anordnung der Detektion bietet im Gegensatz zur gewöhnlichen aufrechten Anordnung den Vorteil, daß *in vitro* sowie *in vivo* Untersuchungen an diesem Aufbau grundsätzlich möglich sind.

Als eigenständige Einheit kann zusätzlich zu der strukturierten Beleuchtung ein UV-Mikrostrahl in das Objektiv eingekoppelt werden. Hierzu wird ein Teil der UV-Laserleistung mit dem 50 : 50 Strahlteilerwürfel BSC1 (Linos G335520000) in den Kollimator aus L8 (Spindler & Hoyer,  $f=250\text{mm}$ ) und L5 in das Objektiv eingekoppelt. Dieser parallele UV-Strahl wird in der Objektebene auf etwa  $1,5\mu\text{m}$  fokussiert. Die Linse L5 befindet sich auf einem Linsenpositionierer wodurch eine laterale Verschiebung des Mikrostrahls innerhalb des Gesichtsfeldes ermöglicht wird.

Weiterhin steht eine LED<sup>3</sup>-Durchlichtbeleuchtung zur Verfügung. Es wurde eine weiß emittierende LED verwendet, da ein Großteil des Spektrums die Filter transmittieren kann und somit bei geeigneten Proben genügend Kontrast geliefert wird.

Eine Skizze des gesamten Aufbaus ist in Abbildung 3.9 zu sehen.

### 3.3 Justage des objektivbasierten SW-TIRF Aufbau

Da der gesamte Aufbau so konstruiert wurde, dass er aus voneinander unabhängigen Einheiten besteht, können diese auch innerhalb gewisser Grenzen getrennt voneinander justiert werden, wie im folgenden beschrieben wird. Hierbei wird vorausgesetzt, dass bereits alle optischen und mechanischen Komponenten einmal justiert waren, so daß die Geometrie des Aufbaus, wie sie in der Skizze 3.9 zu sehen ist, noch vorhanden ist.

Die Strahlaufbereitung der vier Laserlinien erfolgt ganz am Anfang. Zunächst wird die 404nm DPSS-Laserlinie ohne den Kollimator, bestehend aus den Linsen L1 und L2, bei vollständig geöffneten Blenden AS1 und AS2 mit dem Spiegel M4 und dem dichroitischen Strahlteiler DM3 (AHF Z405RDC) in den Kollimator aus den Linsen L3 und L4 eingekoppelt, wobei sich das  $10\mu\text{m}$  Pinhole zu diesem Zeitpunkt nicht zwischen den Linsen L3 und L4 befindet. Mit einer *Sheering-Plate* werden die Kollimatorlinsen L3 und L4 auf Kollimation ausgerichtet. Eine Feinjustage von DM3 und M4 erfolgt bei minimalem Öffnungsdurchmesser der Blende AS2, welche danach wieder auf 3-4mm Durchmesser

---

<sup>3</sup>engl. light emitting diode

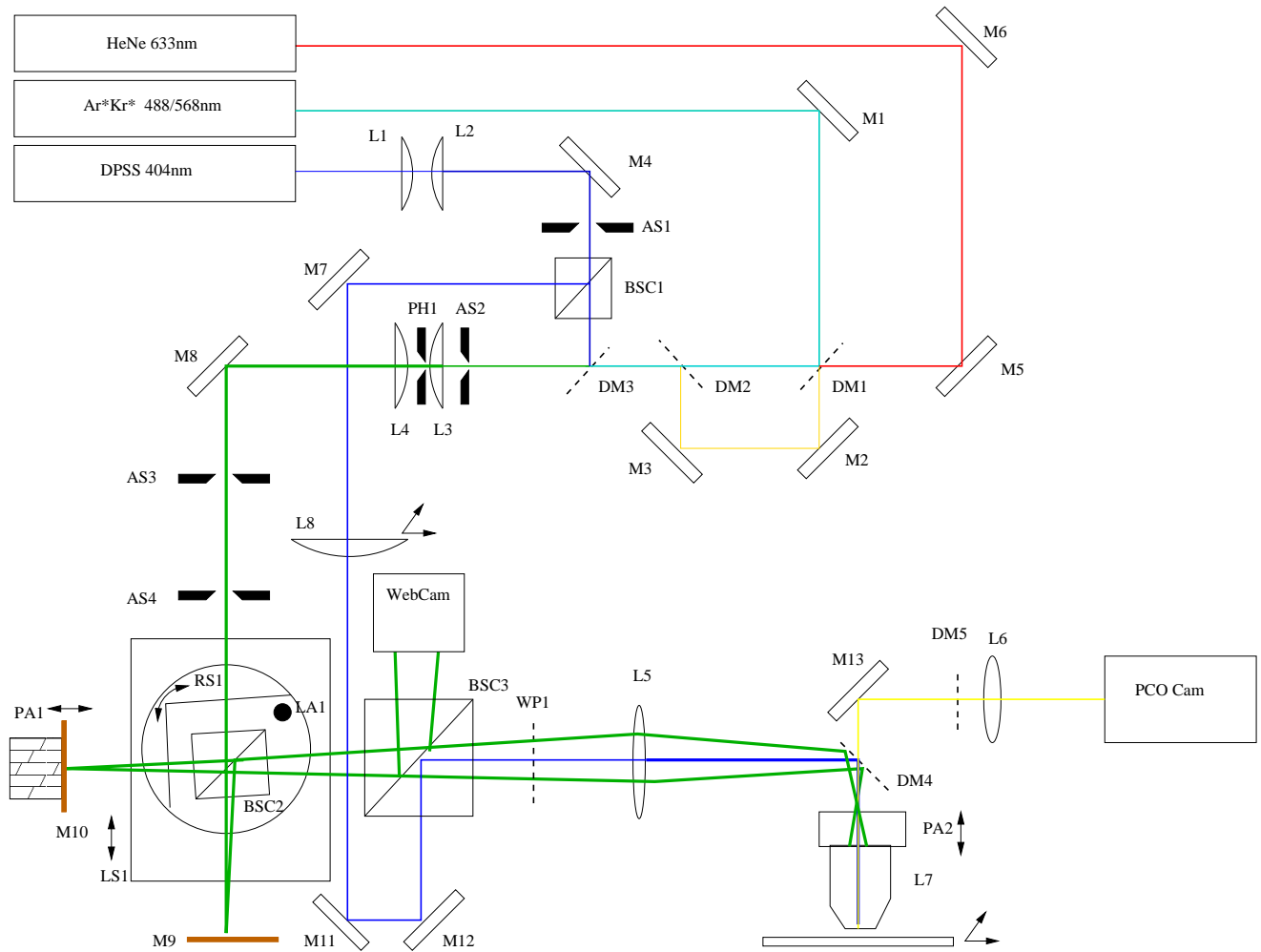


Abb. 3.9: Schematischer Aufbau der lateral strukturierten Beleuchtung für 2D

geöffnet wird. AS1 wird zentrisch zu dem Strahl ausgerichtet. Nun wird das  $10\mu\text{m}$  Pinhole PH1 in dem gemeinsamen Fokus von L3 und L4 positioniert und in allen 3 Achsen ausgerichtet, bis am kollimierten Strahl maximale Intensität gemessen wird. Die Rückreflexion des Pinhole an M4 bzw. dem Shutter des 404nm Laser dient hierbei zur groben Orientierung. Danach werden die Linsen L1 und L2 in den ersten Kollimator eingesetzt und ebenfalls mit einer Sheering-Plate zentrisch auf Kollimation ausgerichtet, so daß auch die aufgeweitete 404nm Linie das Spatial-Mode-Filter durchlaufen kann.

Der nächste Schritt besteht in der Einkopplung der 568nm- und 488nm-Laserlinien, welche zuvor kollinear zueinander ausgerichtet wurden (wird derzeit an zwei Mikroskopen verwendet). Hierzu wird zunächst der dichroitische Strahlteiler DM2 (AHF Z568RDC) entfernt, so daß mit dem Spiegel M1 und dem dichroitischen Strahlteiler DM1 die Einkopplung in das Spatial-Mode-Filter aus L3, PH1 und L4 erfolgt. Danach wird DM2

eingesetzt und ggf. M1 und DM1 leicht nachjustiert. Da beide Laserlinien kollinear ausgerichtet sind, gibt es keinen Höhenversatz zwischen diesen, so daß mit den Spiegeln M2 und M3 sowie DM2 die Einkopplung der dritten Laserlinie in den Kollimator erfolgt. Als letzte Linie wird die 633nm HeNe-Linie über die Spiegel M6 und M5 eingekoppelt, wobei sich an den dichroitischen Spiegeln DM1, DM2 und DM3 jeweils die transmittierten und reflektierten Strahlen am gleichen Punkt treffen müssen, was zur groben Justage sehr hilfreich ist. Da alle vier Strahlen den Spatial-Mode-Filter durchlaufen, sind die Strahlen kollinear zueinander und weisen zusätzlich noch eine sehr gute TEM<sub>00</sub>-Verteilung der Intensität auf.

Als nächste Einheit wird der Interferometerblock justiert. Hierzu wird M8 unter Einhaltung der Strahlhöhe in 45° zu dem Kollimator ausgerichtet. Der Spiegel M9 wird auf exakte Rückreflexion ausgerichtet, ohne daß der Strahlteilerwürfel BSC2 eingesetzt ist. Die Blenden AS3 und AS4 sind dabei geöffnet. Danach wird die Blende AS3 auf minimalen Durchmesser geschlossen, M9 mit einem Karton abgedeckt, BSC2 eingesetzt und mit dem Drehtisch sowie der x-Achse der kinematischen Halterung des Strahlteilerwürfels ebenfalls auf Rückreflexion (4%-Reflexion an der Grenzfläche von Luft zu Glas) zu M8 ausgerichtet. Die Abdeckung von M9 wird danach entfernt und die y-Achse des kinematischen Halters derart ausgerichtet, daß der Strahl von M9 und BSC2 erneut die System-Strahlhöhe aufweist. Hierdurch sind der Strahlteilerwürfel BSC2 und der Spiegel M9 auf den Einkoppelspiegel M8 ausgerichtet. Abschließend wird der piezoverstellbare Spiegel M10 montiert und derart ausgerichtet, daß die Strahlen von M9 und M10 nach dem Strahlteilerwürfel BSC2 an einem Stück Karton maximale konstruktive Interferenz aufweisen. Damit beide Interferometerarme exakt gleich lang sind, wird unter Verwendung der 404nm DPSS-Linie (da diese die kürzeste Kohärenzlänge aufweist) BSC2 mit dem Linearverschiebetisch LS1 entlang der optischen Achse zwischen M8 und M9 verschoben, bis auch mit dieser Laserlinie mit ihrer Kohärenzlänge von  $< 1\text{mm}$  maximaler Interferenzkontrast auftritt.

Als dritte Einheit wird die Detektionseinheit justiert. Hierzu wird das Objektiv entfernt und ein an der Hypothenuse verspiegeltes 90° Prisma Anstelle des Dichroitens DM4 zur Strahlumlenkung positioniert sowie ein Planspiegel auf die Auflagefläche des Piezofokussierers PA2 gelegt. Ohne die Einfokussierlinse L5 und den Strahlteiler BSC3 wird der 3-Achsen Tisch (Newport M-462) des Piezofokussierers ausgerichtet, damit der Strahl senkrecht auf den Justagespiegel auf der Auflagefläche trifft und exakt auf die Blende AS3 zurückreflektiert wird. Durch leichtes Drehen des Prismas kann die Verkippung des Piezofokussierers in der Ebene orthogonal zur Strahlausbreitung überprüft werden. Hierzu wird die Befestigung des 3-Achsen Tisches, welche mit M6-Schrauben und Federpaketen erfolgte, derart nachgestellt, daß dieser in zwei Achsen ggf. minimal verkippt wird, um die Rückreflexion des Strahls vom Justagespiegel über das Prisma zu BSC2 zu ermöglichen. Somit ist der Piezofokussierer exakt senkrecht zur Strahlrichtung ausgerichtet. Der Strahlteilerwürfel BSC3 wird wieder eingesetzt und senkrecht zu den beiden Strahlen ausgerichtet, so daß der von dem Justagespiegel zurückreflektierte Strahl am Ausgang von BSC3 nicht mehr wandert, wenn der Justagespiegel durch den Piezofok-

kussierer bewegt wird. Nun wird das verspiegelte Prisma entfernt und der dichroitische Strahlteiler DM4 an dessen Stelle mittig unter dem Piezofokussierer positioniert und auf die gleiche Position für die Rückreflexion an BSC3 ausgerichtet. Im nächsten Schritt wird das Objektiv eingesetzt und ein verspiegelter Objektträger als Probe anfokusiert. Der Objektträger befindet sich im Fokus, wenn am Ausgang von BSC3 der zurückreflektierte Strahl den gleichen Durchmesser aufweist wie der eingekoppelte Strahl. Die Spiegel M9 und M10, welche immer noch durch den Strahlteilerwürfel BSC2 auf maximaler konstruktiver Interferenz stehen, werden nacheinander abgedeckt, damit das Objektiv mit den Mikrometerschrauben des 3-Achsen Tisches exakt mittig zu den Strahlen ausgerichtet werden kann. Als letztes Element für die Anregung wird die Einfokussierlinse L5 in etwa 500mm Entfernung zur Mitte von BSC2 zentrisch in den Strahlengang gebracht. Die zur Strahlrichtung senkrechte Achsen der Linse werden ausgerichtet, so daß durch Verändern der Fokusposition der zurückreflektierte Strahl an BSC3 nicht mehr wandert. Als letzter Schritt wird der Spiegel M13 ohne den Filter DM5 und der Kamera mit der 633nm-Linie und dem verspiegelten Objektträger im Fokus ausgerichtet, so daß der an M13 reflektierte Strahl (transmittiertes Restlicht durch DM4) parallel zur optischen Bank in Höhe der Kameramitte verläuft. Die Kamera wird zusammen mit der Tubuslinse auf Höhe der Strahlachse montiert. Bei minimal geöffneter Blende AS3 und minimaler Integrationszeit der Kamera wird die Kamera mittig zu dem durch DM4 transmittierten Restlicht ausgerichtet, so daß beim Ändern der Fokusposition der Spot auf der Kamera sein Zentrum nicht verändert. Dies wird jeweils für beide Strahlen einzeln und abschließend gemeinsam überprüft. Danach wird der Filter DM5 zur Unterdrückung dieses Rest-Anregungslichts wieder eingesetzt.

Mit einer Streuscheibe und einem Objektträger kann die Position der Linse L5 überprüft werden, indem der Strahlteilerwürfel BSC2 mittels der Software gedreht wird nachdem sich das Objektiv an der Fokusposition befindet. Auf der Streuscheibe müssen beide Strahlen symmetrisch auseinanderlaufen. Der gleiche Effekt muß auch durch Verkippung von BSC2 auftreten, wobei die Strahlen nun senkrecht zur ersten Richtung symmetrisch auseinander laufen müssen.

Die Justage des UV-Mikrostrahls erfolgt separat nachdem die obige Justage durchgeführt wurde. Hierzu wird der Strahlteilerwürfel BSC1 zwischen der Blende AS1 und dem Dichroiten DM3 eingesetzt, so daß der reflektierte Strahl parallel zu dem Spatial-Mode-Filter verläuft. Ohne die Linse L8 werden die beiden Spiegel M11 und M12 derart ausgerichtet, dass an der  $\lambda/2$ -Platte WP1 der UV-Strahl symmetrisch zu den beiden Strahlen des Interferometers verläuft. Danach wird L8 eingesetzt und auf bestmögliche Kollimation mit L5 ausgerichtet.



## 4 Mikrofluoreszenz-Koordinator

Damit vergleichende Messungen in der Mikroskopie durchgeführt werden können ist es notwendig, daß gleiche Objekt mit einem zweiten Mikroskop erneut zu finden und zu vermessen. Die Suche nach diesem Objekt ist mit den kommerziell am Markt erhältlichen Systemen<sup>1</sup> sehr zeitintensiv. Zudem sind diese Systeme nur unter bestimmten Voraussetzungen anwendbar.

Die bisherigen Systeme konnten nur mit einer Durchlichtbeleuchtung genutzt werden. Weiterhin ist ein schnelles und fehlerfreies Wiederauffinden des gleichen Objektes an verschiedenen Mikroskopen immer noch aufwendig gewesen, da stets die Hilfsmarkierungen gesucht werden mußten, bevor die Zellen in deren Umgebung gesucht werden konnten. Das Hilfsmuster zum Auffinden der Objekte ist bei diesen Systemen auf dem ganzen Deckglas verteilt, so daß dies häufig störend bei der Detektion wirkt. Das im Rahmen dieser Arbeit weiterentwickelte und zum Patent angemeldete System [Amb06] vereinigt die Eigenschaften der am Markt befindlichen Systeme mit der Neuerung, daß dieses nun auch in der Fluoreszenzmikroskopie einsetzbar ist und eine Freifläche von  $15 \times 15 \text{ mm}^2$  ohne Markierungen aufweist. Auf ein handelsübliches Deckglas wird in Randnähe aus fluoreszierendem Photolack ein Koordinatensystem mit zwei Achsen aufgebracht. Die Schichtdicke des Photolacks beträgt etwa 400 nm. Dieses Deckglas kann entweder direkt zur Probenpräparation verwendet werden oder aber mit einer Schutzschicht aus  $\text{SiO}_2$  versehen werden. Hierdurch wird der Photolack vor Alkoholen, Lösungsmitteln und sonstigen Chemikalien, die bei der Präparation von biologischen Proben häufig verwendet werden, geschützt. Weiterhin wird die mechanische Belastbarkeit der strukturierten Lackschicht erhöht, so daß dieses Deckglas, falls notwendig, mehrmals verwendet werden kann. Die Dicke dieser Schutzschicht beträgt  $1 \mu\text{m}$ .

Die Optimierung bestand in der Änderung der Strukturierung. Das Herstellungsverfahren selbst, welches auf Photolithographie beruht, sollte nicht geändert werden, da es die Herstellung großer Stückzahlen innerhalb kurzer Zeiten erlaubt. Das ursprüngliche System bestand aus zwei jeweils 1mm langen und  $3 \mu\text{m}$  dicken fluoreszenten Linien, die sich in der Mitte des Deckglases geschnitten hatten und damit den Ursprung eines kartesischen Koordinatensystems gebildet haben. Weiterhin wurde dadurch das Deckglas in vier Quadranten unterteilt. Zur besseren Orientierung sowie zum leichteren Auffinden der Fokusebene ist der vierte Quadrant mit einem fluoreszierenden Vollkreis von  $400 \mu\text{m}$  versehen worden. Im ersten Quadrant ist ein ebenfalls fluoreszierendes Quadrat mit  $20 \times 20 \mu\text{m}$  Kantenlänge zu finden gewesen. Dadurch konnte eine eindeutige Orientierung

---

<sup>1</sup>Eppendorf, CELLocate Grid ; Ibidi  $\mu$ -Slide; Microlab ,CellFinder Mikroskop-Objektträger

der Linien auf dem Deckglas sichergestellt werden. Der entscheidende Nachteil dieses Systems ist, daß mit einem Objektiv bei einem 63 oder 100fachen Abbildungsmaßstab das Gesichtsfeld etwa  $0,1\text{mm} \times 0,1\text{mm}$  klein ist und es dadurch immer noch sehr schwierig ist, eine der beiden Linien auf dem Deckglas zu finden. Ebenfalls von Nachteil ist, daß alle Positionen von Objekten relativ zum Schnittpunkt der beiden Linien in Einheiten des jeweils verwendeten Mikroskopverschiebetisches bestimmt werden und es somit beim Wechsel zwischen verschiedenen Mikroskopen zu falschen Positionen aufgrund von Abweichungen zwischen den verwendeten Tischen kommen kann.

Die neue Struktur mußte daher sowohl eine große Freifläche für die Probenpräparation bereitstellen, als auch eine Möglichkeit zu einer von den verwendeten Mikroskopverschiebetischen unabhängigen, präzisen Positionsbestimmung bieten und sowohl für die Fluoreszenzmikroskopie als auch für die übliche Lichtmikroskopie weiterhin geeignet sein. Als weiterer Punkt sollte das Auffinden dieser neuen Struktur vereinfacht werden. Die optimierte Struktur besteht aus einem Koordinatensystem, welches sich an zwei Seiten des Deckglases in etwa 4mm Abstand zum Rand befindet. Jede der Koordinatenachsen ist 15mm lang und  $10\mu\text{m}$  breit. Der Schnittpunkt beider Achsen bildet erneut den Ursprung. Die Unabhängigkeit der Positionsbestimmung von den verwendeten Tischen erforderte eine eindeutige Koordinatentransformation der jeweiligen Mikroskopkoordinaten auf das Koordinatensystem des Deckglas. Hierzu ist jede der beiden Linien im  $500\mu\text{m}$  Abstand mit einer Markierung versehen. Jeder volle Millimeter ist darüber hinaus fortlaufend nummeriert. In der Mitte der Linie gibt es ein Feinraster mit einem Linienabstand von  $50\mu\text{m}$ , dessen Linienstärke  $10\mu\text{m}$  beträgt. Die ausgedehnte Linienstruktur erlaubt ein schnelles und einfaches Auffinden dergleichen. Zusätzlich kann mit den Längenmarkierungen an den Linien eine Kalibrierung der Längeneinheiten des verwendeten Mikroskopverschiebetisches durchgeführt werden. Diese Kalibrierung sollte sowohl bei einer kleinen als auch bei einer großen Wegdifferenz durchgeführt werden, um sowohl den Fehler der Auflösung klein zu halten, als auch um Nichtlinearitäten im gesamten Verschieberegion erkennen zu können. Ebenfalls ist die Bestimmung der Verdrehung zwischen Deckglas und Verschiebetisch aufgrund der langen Achsen genauer bestimmbar, als bei den ursprünglichen Systemen.

Zum Wiederauffinden von Zellen bzw. beliebigen Objekten sind nur die Relativkoordinaten des verwendeten Mikroskops sowie für jeden Probenwechsel eine einmalige Bestimmung der Relativkoordinaten des System-Ursprungs und eines weiteren Punktes auf einer der beiden Achsen, der als Referenzpunkt dient. Aus diesen beiden Koordinaten kann sowohl die Verdrehung des Deckglases gegenüber dem Mikroskopverschiebetisch bestimmt werden als auch eine Kalibrierung der Mikroskop-Längeneinheiten auf die Einheiten des Deckglases sowie eine lineare Verschiebung der beiden Achsen relativ zum Ursprung der Mikroskopachsen. Mit diesen drei Größen kann eine eindeutige Koordinatentransformation der Relativkoordinaten von jedem gefundenen Objekt auf das als Inertialsystem wirkende Deckglassystem durchgeführt werden.

Die Skizze 4.1 zeigt schematisch die Verdrehung des Deckglases um den Winkel  $\varphi$ . Hierbei erscheint der Punkt  $X_s$  und  $Y_s$ , bezogen auf das Deckglassystem, am Mikroskop

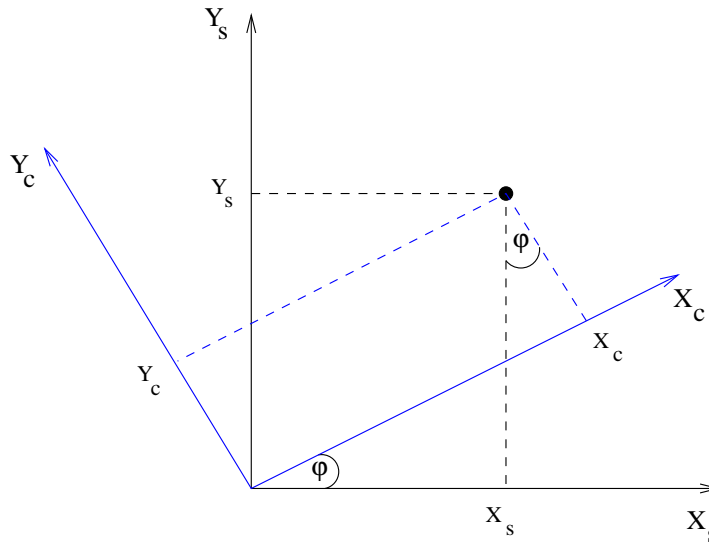


Abb. 4.1: Drehung der Koordinatensysteme  $X_c, Y_c$  und  $X_s, Y_s$  um den Winkel  $\varphi$ . Zur besseren Übersicht ist eine Verschiebung der Systeme zueinander nicht eingezeichnet.

unter den Koordinaten  $X_c$  und  $Y_c$ .

Die Anwendung des Mikrofluoreszenz-Koordinators (MFK) erfordert bei jeder neuen Verwendung des Präparates zwei Justagemessungen.

Der erste Schritt besteht im Auffinden des MFK-Ursprungs. Dessen aktuelle  $X_s$ - und  $Y_s$ - Koordinaten vom Verschiebetisch werden notiert. Im zweiten Schritt wird eine bekannte Referenzposition auf einer der beiden fluoreszenten Achsen aufgesucht. Diese sollte möglichst weit vom Ursprung entfernt sein. Als geeignetes Referenzobjekt hat sich die 7,5mm-Markierung erwiesen, da nur an dieser Stelle rechts und links das Feinraster vorhanden ist. Anhand der Orientierung der Zahlen neben den Teilstrichen kann die jeweilige Achse unterschieden werden. Auf der einen Achse sind die Zahlen unterhalb der Markierung zu finden, an der anderen Achse aufgrund der orthogonalen Anordnung neben den Teilstrichen. Von diesem Referenzpunkt werden ebenfalls die aktuellen Koordinaten  $X_s$  und  $Y_s$  des Verschiebetisches notiert. Damit sind die Justagemessungen abgeschlossen und es kann mit der Suche nach Objekten begonnen werden. Es wird für jedes gefundene und vermessene Objekt jeweils dessen Koordinate  $X_s$  und  $Y_s$  notiert, so daß es in einer späteren Messung wieder schnell und eindeutig relokalisiert werden kann. Nachdem die Messung an der Probe beendet ist, wird zunächst die Verdrehung des Deckglases zum Verschiebetisch aus den Koordinaten des Ursprungs und des gewählten Referenzpunktes wie folgt berechnet:

$$\varphi = \text{atan} \left( \frac{(Y_s^R - Y_s^O) - Y_c^R}{(X_s^R - X_s^O) - X_c^R} \right)$$

Hierbei stehen die Indizes  $s$  für Koordinaten des Mikroskopverschiebetisches,  $c$  für Koordinaten des Koordinatensystems des Deckglases. Der Index  $O$  bezeichnet die Ursprungs-  
 koordinate vom MFK-System,  $R$  steht für die Koordinate des Referenzobjektes.

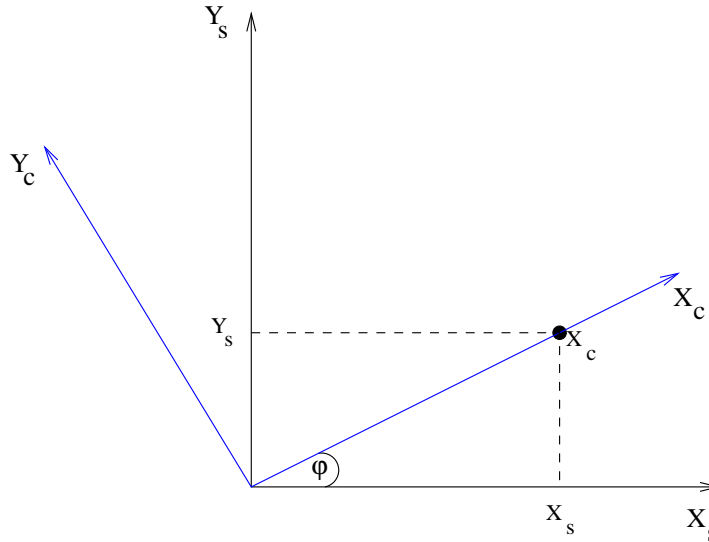


Abb. 4.2: Skizze zur Bestimmung des Drehwinkels  $\varphi$

Nachdem der Drehwinkel  $\varphi$  bekannt ist, wird eine Koordinatentransformation für jedes gefundene Objekt auf das System des Deckglases durchgeführt. Die Transformation der einzelnen Komponenten der Objektkoordinaten  $X_s$  und  $Y_s$  auf die Koordinaten  $X_c$  und  $Y_c$  des Deckglases erfolgen wie aus Abbildung 4.1 zu sehen ist mit:

$$\begin{aligned} x_s &= x \cos(\varphi) + y \sin(\varphi) \\ y_s &= y \cos(\varphi) - x \sin(\varphi) \end{aligned} \quad (4.1)$$

Bei erneuter Verwendung der Probe wird der Drehwinkel sowie die lineare Verschiebung einen neuen Wert annehmen. Hierzu wird erneut der Ursprung und die Referenzkoordinate aufgesucht und aus deren Koordinaten der neue Drehwinkel  $\epsilon$  bestimmt. Da alle Objekte bereits relativ zu dem Deckglassystem berechnet sind, können diese mit dem neuen Drehwinkel sofort auf die aktuelle Probenposition mit einer einfachen Drehmatrix zurückgerechnet werden.

$$\vec{r}_{Messung2} = \begin{pmatrix} \cos(\varphi - \epsilon) & \sin(\varphi - \epsilon) \\ -\sin(\varphi - \epsilon) & \cos(\varphi - \epsilon) \end{pmatrix} \cdot \vec{r}_{Messung1} \quad (4.2)$$

Zur einfacheren Handhabung wurde das bestehende Excel-Script in ein Script umgeschrieben, daß mit jedem Webbrowser aufgerufen werden kann. Es werden jeweils die Mikroskopkoordinaten für den Ursprung, den Referenzpunkt sowie die Position des Referenzpunktes auf dem Deckglas eingegeben. Diese Daten werden pro Mikroskop und Probe einmal eingegeben. Der Drehwinkel wird dem Anwender zur Kontrolle angezeigt. In einer Tabelle werden alle Mikroskopkoordinaten für die jeweiligen Objekte eingetragen. Hinter jedem dieser Werte wird automatisch der aufgrund der beiden Drehwinkel und der Verschiebung zu erwartende Wert für die zweite Messung in den aktuellen Mikroskopkoordinaten berechnet.

Aus diesen Formeln sowie einem angenommenen Ablesefehler des Anwenders von  $10\mu\text{m}$  wurde eine Berechnung des Fehlers für die Koordinatentransformation für einen Referenzpunkt in 5mm Abstand zum Ursprung durchgeführt. Die Entwicklung dieses Fehlers als Funktion des Abstandes zum Ursprung ist in Abbildung 4.3 graphisch dargestellt. Farblich kodiert ist der Fehler in der Position, welche einen Bereich von  $0\text{nm}$  bis  $100\mu\text{m}$  abdeckt

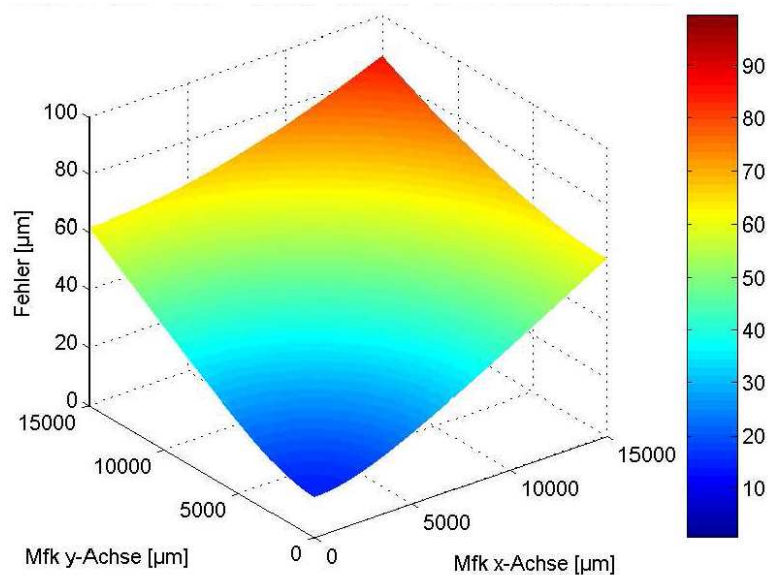


Abb. 4.3: Verlauf der theoretischen Fehlerentwicklung des MFK-Deckglases in Abhängigkeit von der Objektposition. Als Referenzpunkt wurde die Koordinate (5,0) auf der x-Achse gewählt. Es liegt diesem Graphen ein Ablesefehler von  $10\mu\text{m}$  pro Objektcoordinate zugrunde. Die Farbcodierung reicht von blau(0) bis rot( $100\mu\text{m}$ ).

Die Abbildung 4.4 zeigt links das Maskenlayout der Deckglasstruktur sowie auf der rechten Seite einen Ausschnitt des Feinrasters, aufgenommen mit einem konfokalen Laser-Raster-Mikroskop. Als Objektiv wurde ein 63x Öl-Immersionsobjektiv mit  $\text{NA}=1.4$  ver-

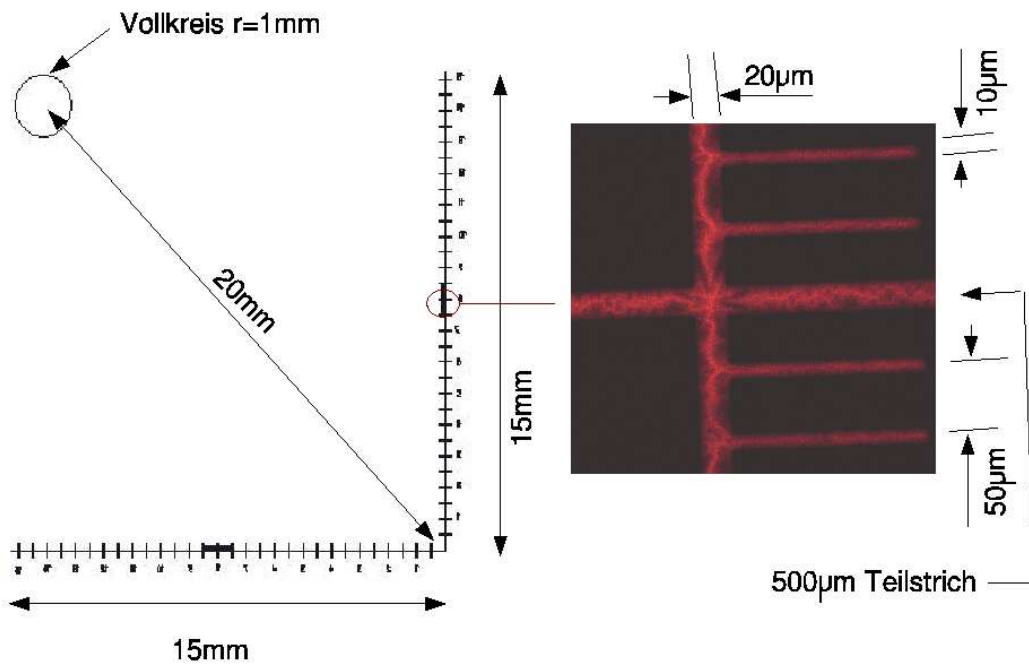


Abb. 4.4: links: Maskenlayout der MFK-Struktur, rechts: konfokale Aufnahme (63x NA1.4) des Feinrasters der Deckglasstruktur

wendet. Der Photolack wird mittels *Spincoating* auf das Deckglas aufgebracht. Bei diesem Verfahren kann die Dicke der Lackschicht durch die Drehzahl des Spincoaters eingestellt werden. Als Zielwert wurden 400..500nm angestrebt, damit die Gesamtdicke des Deckglases sich nicht merklich ändert und trotzdem sichergestellt ist, daß sich ein geschlossener Lackfilm auf dem Deckglas ausbildet. Mit einem neuentworfenen Maskenlayout wurde der Photolack entsprechend einem hierzu etablierten Protokoll belichtet und entwickelt. Zur Erhöhung der mechanischen Festigkeit dieser dünnen Lackschicht sowie zum Schutz dieser vor Alkoholen, Säuren und Lösungsmitteln, welche je nach Art der Zellfixierung verwendet werden, wurde die gesamte Oberfläche des strukturierten Deckglases mit einer etwa  $1\mu\text{m}$  dicken Schutzschicht aus  $\text{SiO}_2$  versehen. Diese wurde in einer Sputteranlage aufgebracht.

Zur Kontrolle der Schichtdicke sowie zur Beurteilung der Belichtungs- und Entwicklungsqualität wurde ein Teil der Lackstruktur mit einem AFM<sup>2</sup> näher untersucht. Die

<sup>2</sup>engl.: atomic force microscope



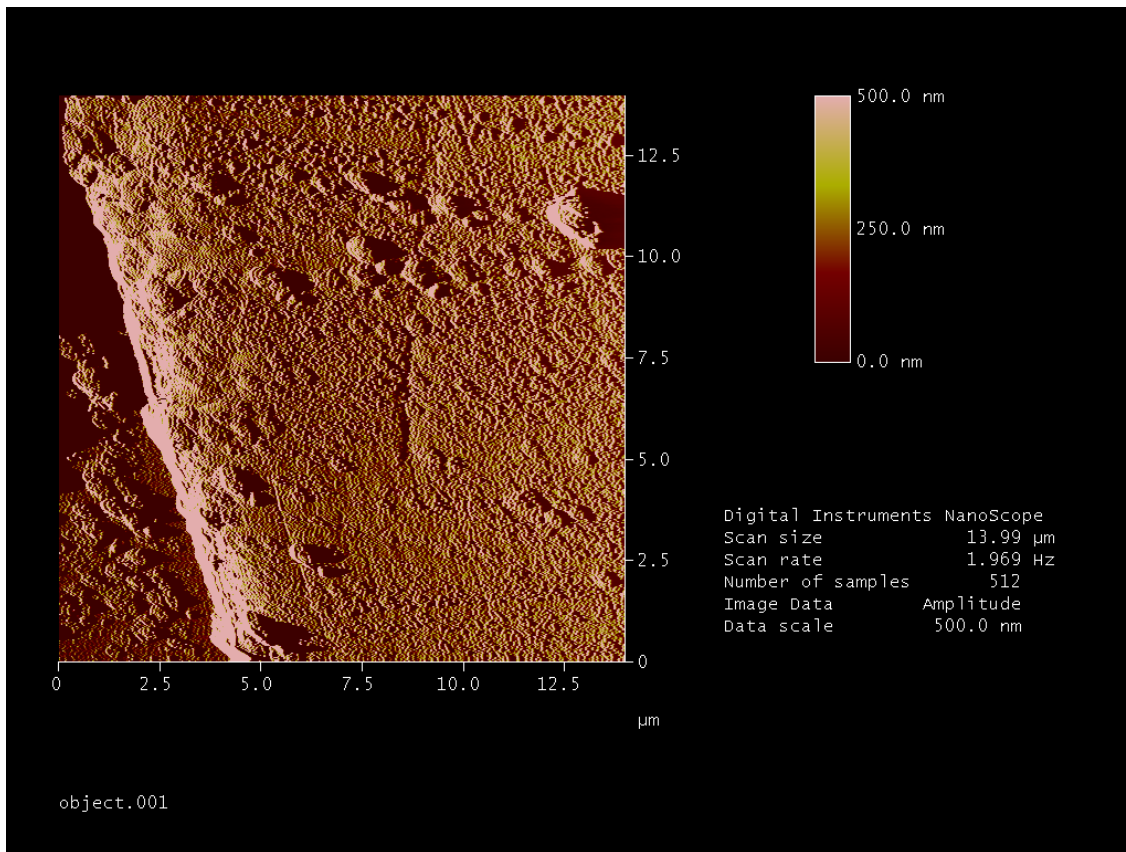


Abb. 4.5: AFM-Messung (Amplitudenbild) zur Bestimmung der Filmhöhe des Photolacks. Hierbei ist die Kante des Photolack entlang einer  $500\mu\text{m}$  Markierung zu sehen. Aufgenommen an einem NanoScope III (Veeco)

Daten dieser Messungen sind in Abbildung 4.5 zu sehen.

In dieser Messung ist deutlich die scharfe Kante beim Übergang vom Deckglas zum Photolack zu erkennen. Die Höhe beträgt an dieser Stelle etwa  $500\text{nm}$ . Sehr auffällig ist die glatte Oberflächenstruktur der Lackschicht. Dies zeigt, daß die Lackdicke in einem vernünftigen Bereich liegt. Eine zu dünne Schicht sollte Lücken aufgrund einer nicht homogenen Bedeckung der Glasoberfläche aufweisen. Blasen und Krater, wie sie beim Aushärten der Lackschicht entstehen können, sind ebenfalls nicht erkennbar.

Die Breite der Lackstruktur wurde ebenfalls näher untersucht. Abbildung 4.6 zeigt das Höhenprofil durch eine  $500\mu\text{m}$  Markierung des Feinrasters. In diesem sind ebenfalls die steilen Flanken zu erkennen. Weiterhin ist der Verlauf der Schichtdicke erkennbar. Die Höhe fällt dabei um etwa  $100\text{nm}$  von  $600\text{nm}$  auf  $500\text{nm}$  entlang einer Länge von  $10\mu\text{m}$  ab.

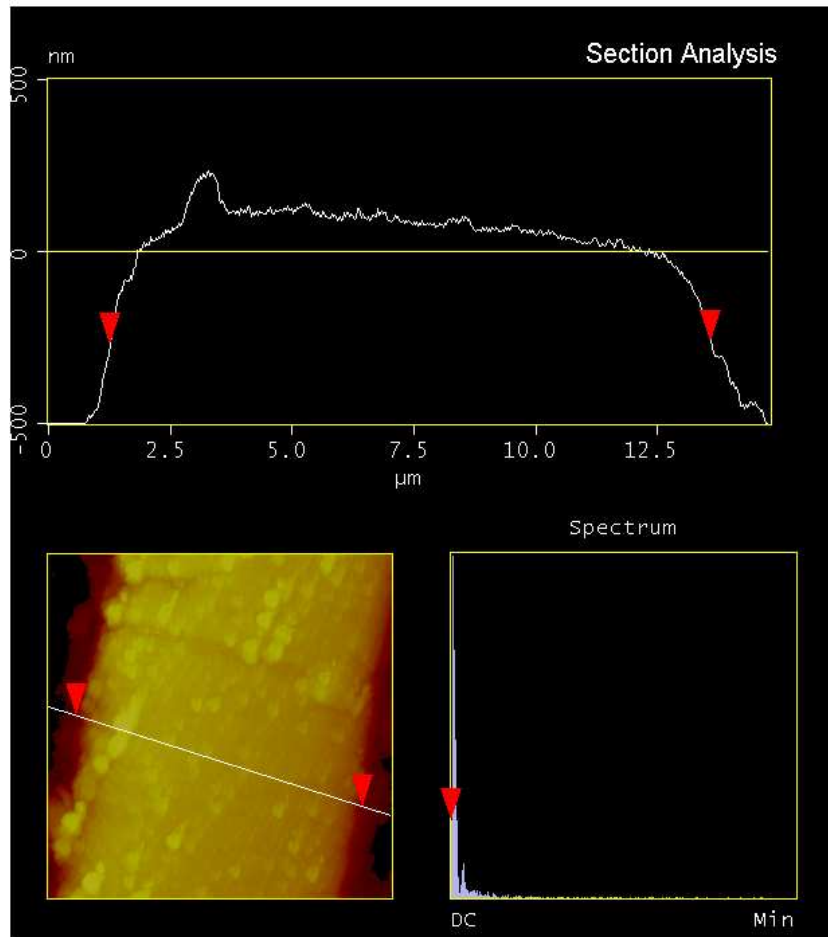


Abb. 4.6: Höhenprofil einer AFM-Messung (Amplitudenbild) durch eine  $10\mu m$  Markierung am Feinraster.

Neben diesen quantitativen Messungen wurden verschiedene Fixierungsmethoden von Zellen auf der aufgesputterten Oberfläche durchgeführt. Sowohl  $PFA^3$  als auch *Methanol-Eisessig* konnte zur Zellfixierung verwendet werden, ohne daß hierbei die Lackstruktur beschädigt worden ist. Die Dicke der Schutzschicht wurde demnach ausreichend gewählt. Weiterhin wurde die Verwendung des Deckglases mit Flüssigstickstoff untersucht. Mit dieser Methode wird die Porösität der Zellmembran erhöht. Auch diese Tests sind positiv verlaufen da es zu keiner Zerstörung der Schutzschicht gekommen ist. Die folgenden Abbildungen zeigen Zellpräparate zusammen mit der Lackstruktur an verschiedenen Mikroskopen.

---

<sup>3</sup>Paraformaldehyd



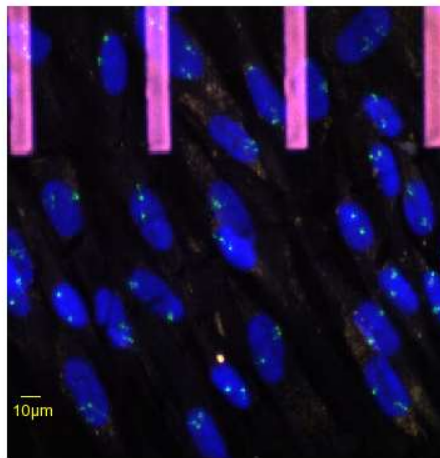


Abb. 4.7: Konfokale Aufnahme des MFK-Deckglases mit Fibroblasten. Die Markierung an den Fibroblasten zeigt das Zentrum 1.

In diesen beiden Abbildungen sind zwei verschiedene Zelltypen auf der Oberfläche der Schutzschicht der MFK-Deckgläser zu sehen. Im oberen Bild wurden Fibroblasten auf dieser  $SiO_2$ -Schicht anwachsen lassen, im unteren Bild wurden mit Methanol-Eisessig ficierte Lymphozyten aufgenommen. An beiden Bildern ist sowohl die Lackstruktur als auch die Zellen im Fokus sichtbar, so daß eine Orientierung auf dem Deckglas erleichtert wird.

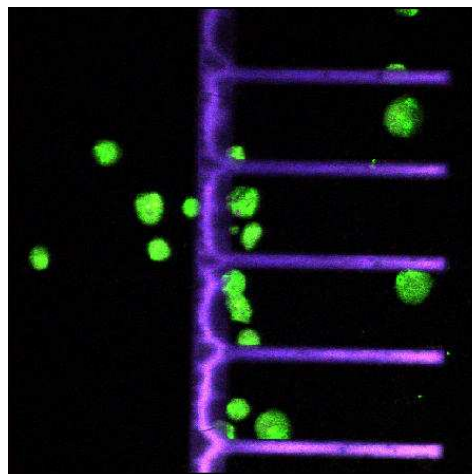


Abb. 4.8: Konfokale Aufnahme des MFK-Deckglases mit Lymphozyten.

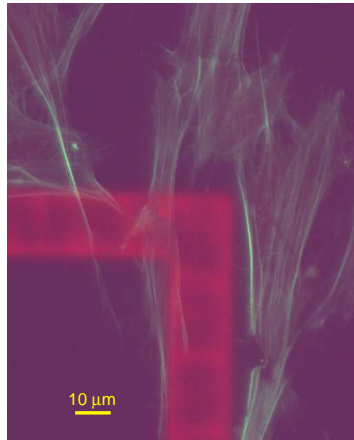


Abb. 4.9: Epi-Aufnahme (63x NA1.4) des MFK-Deckglases mit Alexa488 markierten Aktinfasern.

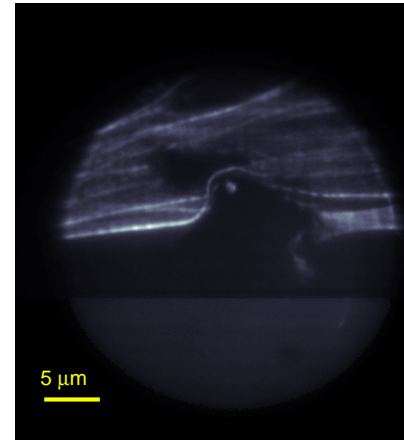


Abb. 4.10: Aufnahme des MFK-Deckglases zusammen mit Alexa488 markierten Aktinfasern mit dem Interferometeraufbau.

Diese beiden Aufnahmen zeigt die gleiche Position des MFK-Deckglases, aufgenommen mit einem kommerziellen EPI-Mikroskop, sowie mit dem Interferometeraufbau. Deutlich sichtbar ist das kleine Gesichtsfeld von etwa  $30\mu m$  Durchmesser des Interferometeraufbau im Vergleich zu dem beinahe hundert  $\mu m$  großen Gesichtsfeld des konventionellen Epi-Mikroskopes.

# 5 Software-Entwicklung

Höchstaflösende Mikroskopie steht immer im Zusammenhang mit dem Einsatz von Computern zur Rekonstruktion der gemessenen Daten in ein hochauflösendes Bild, wobei je nach Methode 2D- oder 3D-Bilder berechnet werden. Neben der Rekonstruktion der Messdaten ist auch eine Simulation der gleichen notwendig, einerseits um die Rekonstruktionsalgorithmen mit bekannten Objekten zu verifizieren, andererseits auch um Grenzen des Systems betrachten zu können. Ein weiterer Bereich der Software-Entwicklung beschäftigt sich mit der Ansteuerung der verwendeten Geräte selbst. Im folgenden wird die im Rahmen dieser Arbeit entwickelte und eingesetzte Software näher beschrieben.

## 5.1 Hardware-Ansteuerung

Die Hardware des SW-TIRF-Aufbau, welche mit dem PC verbunden ist, besteht aus einer CCD-Kamera, einer CMOS-Webcam, dem Phasenpiezo und dem Piezofokussierer samt Controller, einer drehbaren  $\lambda/2$ -Platte, dem Drehtisch des Interferometer-Strahlteilerwürfel, einem Linearantrieb um den Strahlteilerwürfel zu verkippen sowie zwei Getriebemotoren zur xy-Positionierung der Probe.

Die Ansteuerung dieser Geräte erfolgt mit Scripte, die in *Python* geschrieben wurden. Da es sich bei Python um eine Interpretersprache handelt, sind die Programme weitestgehend von dem Betriebssystem unabhängig. Ein weiterer Vorteil der Interpretersprache ist, daß Änderungen an der Software durchgeführt werden können, ohne daß danach der Quellcode neu kompiliert werden muß.

Da bereits andere Mikroskope der Arbeitsgruppe mit der gleichen Python-Oberfläche bedient wurden, ist diese auch für das in dieser Arbeit entwickelte Mikroskop eingesetzt worden. Das modulare Konzept des bestehenden Programmcode konnte mit geeigneten Modifikationen verwendet werden, ohne den gesamten Code erneut zu schreiben. Es wurde primär Code von [Bad07] verwendet, der bereits die Ansteuerung der CCD-Kamera und diverser Piezo-Controller enthielt. Dieser wurde im Rahmen der Arbeit mit weiteren Modulen für die Ansteuerung des Phasenpiezo, für die Ansteuerung der zwei Schrittmotoren zur Objektpositionierung, einem Modul zur Drehung der  $\lambda/2$ -Platte sowie einem Modul zur Manipulation des Interferometer erweitert. Weiterhin wurde ein Modul zur Ansteuerung einer Auflicht- oder Durchlicht-Beleuchtung für die Probe sowie zur Auswertung des mit der Webcam detektierten Interferenzmuster geschrieben. Dieses berechnet bei maximal 10 Bilder pro Sekunde das Fouriersignal des Interferenzmuster.

## 5.2 Strahlgeometrie zur Prisma-Einkopplung

Die klassische Methode zur Erzeugung von evaneszenten Wellen ist, einen Laserstrahl in einen Halbzylinder einzukoppeln, der mit einem Objektträger in optischen Kontakt steht, so daß Totalreflexion an der Grenzfläche zwischen Objektträger und Einbettungsmedium auftreten kann. Unabhängig vom Eintrittspunkt des Laser wird dieser immer zum Zentrum des Halbzylinder fokussiert, dessen Stirnfläche um die Dicke des Objektträger verkürzt ist, so daß an dem Objektträger der Fokuspunkt liegt.

Sollen ebene Wellenfronten aus zwei interferierenden Strahlen entstehen, müssen beide Strahlen kollimiert sein. Dies ist mit einem Halbzylinder nicht möglich, so daß an dessen Stelle ein Prisma aus Flintglas N-F2 verwendet wurde. Der Basiswinkel beträgt  $60^\circ$ , die Leistung wurde mit 1W angenommen wobei der Strahldurchmesser bei der Einkopplung zwischen 0,1 und 1mm variiert. Aus dieser Simulation ist die Verzerrung des Totalreflexi-

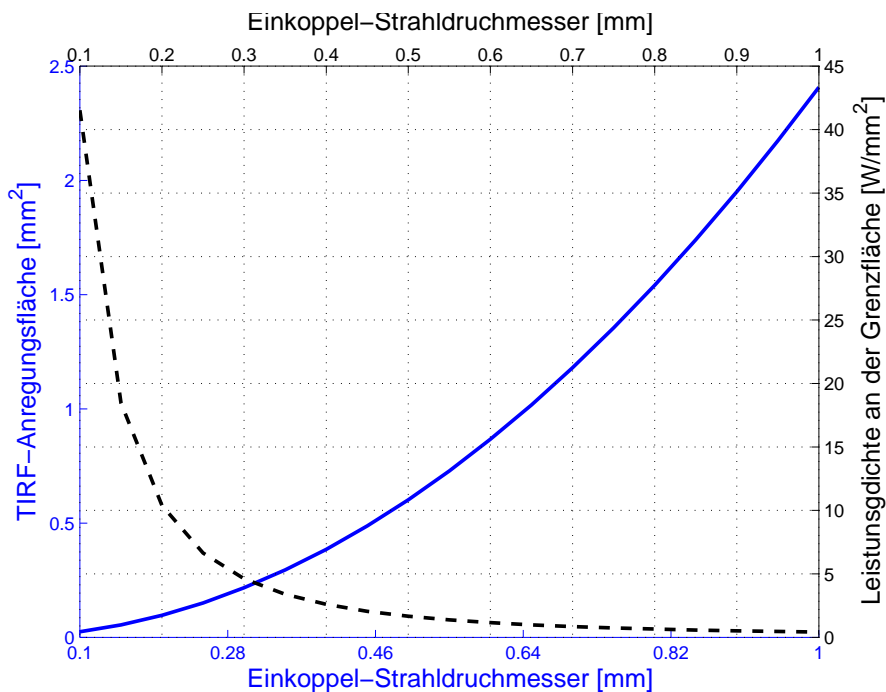


Abb. 5.1: Simulation zur Strahlgeometrie und Laserintensität für ein TIRF-Mikroskop mit  $60^\circ$ -Prisma-Einkopplung (N-F2 Glas). Die durchgezogene blaue Linie zeigt die Anregungsfläche an der Grenzschicht an, die gestrichelte schwarze Linie die entsprechende Leistungsdichte. Der eingekoppelte Strahldurchmesser variiert zwischen 0,1 und 1mm. Die Leistung wurde mit 1W angenommen.

onspunktes entlang der Einkoppelrichtung deutlich zu erkennen, da die Fläche elliptisch wird. Weiterhin ist die rapide Abnahme der Intensität für hohe Einkoppelwinkel zu erkennen, da die Ellipsenfläche mit dem Winkel anwächst.

## 5.3 Simulation des Dove-Prisma-Strahlengangs

Der Einsatz eines  $45^\circ$  Doveprisma zur Bilddrehung ist in der Optik nicht ungewöhnlich. Hierzu wurde das im Aufbau verwendete Dove-Prisma und der zugehörigen Einkoppelung der beiden Laserstrahlen in Matlab virtualisiert. Mit diesem Modell konnte zum Einen die exakte Einkoppelposition für beide Strahlen ermittelt werden, zum Anderen konnten auch Probleme im Vorfeld erkannt werden. Wie in Abbildung 5.2 zu sehen ist,

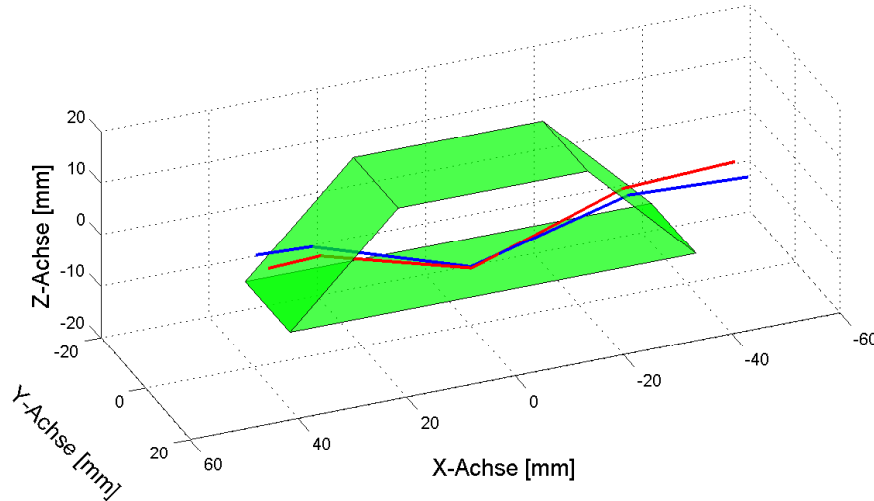


Abb. 5.2: 3D-Simulation zum Strahlengang des Dove-Prisma-Aufbau

wurde die Einkoppelung der beiden kollimierten Laserstrahlen derart gestaltet, daß diese ohne Versatz zueinander an der Prismenbasis für jeden beliebigen Drehwinkel reflektiert werden. Der laterale Winkel in der Einkoppelung der beiden Strahlen dient hierbei zur Einstellung des gewünschten Winkels, unter welchem die Strahlen interferieren sollen. Die Einkoppelhöhe der beiden Strahlen über der Prismabasis kann aus der Bedingung, daß kein Strahlversatz erfolgen soll, sowie aus der Geometrie des Doveprisma wie folgt bestimmt werden:

$$h = \frac{h_p}{2} - \frac{\frac{l_p}{2} \cdot \tan(45^\circ - \text{asin}(\frac{n_{Luft}}{n_{Glas}} \cdot \sin 45^\circ))}{1 + \tan(45^\circ - \text{asin}(\frac{n_{Luft}}{n_{Glas}} \cdot \sin 45^\circ))} \quad (5.1)$$

Hierbei wurde ein Strahlverlauf parallel zur Prismabasis angenommen.  $h_p$  steht für die Höhe des Prisma,  $l_p$  für die Länge der Basisseite sowie  $n_{Glas}$  für den Brechungsindex der verwendeten Glassorte.

## 5.4 Simulation des Interferometer-Strahlengangs

Damit die durch Messungen gewonnenen Daten richtig bewertet werden können, ist es unumgänglich, die wesentlichen Teile des Aufbaus mathematisch zu beschreiben und den Strahlengang an diesen Stellen zu simulieren. So ist in Abbildung 6.17 eine deutliche Oszillation für den Wellenvektor der Phasenmodulation erkennbar gewesen, obgleich dies bei sehr kleinen Drehwinkeln nicht unbedingt zu erwarten gewesen ist. Durch die Simulationen konnten solche Erscheinungen eingehend untersucht werden, Positionen von optischen Komponenten auf die jeweiligen Anforderungen optimiert werden und vorab Informationen über die zu erwartenden Daten einer realen Messung dargestellt werden. Die folgenden Skizzen zeigen zum einen den in *Matlab* als 3D-Modell simulierten Interferometer mit dem Strahlteilerwürfel, den beiden Spiegeln und den jeweiligen Strahlengängen sowie die aus Kapitel 4 bekannte Kurve des Phasenvektors, ausgehend aus dieser Simulation. Hierzu wurde komponentenweise die Differenz der optischen Weglänge

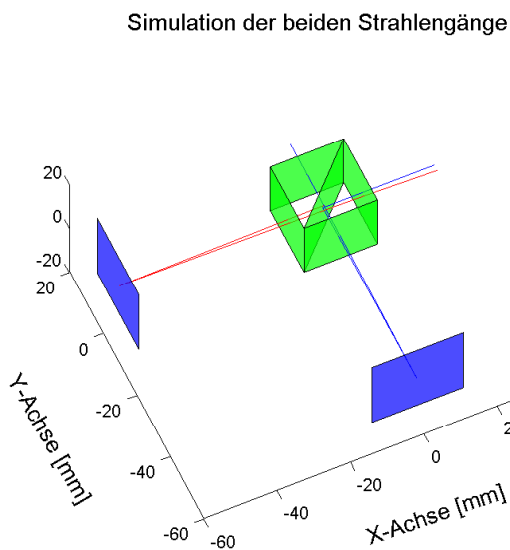


Abb. 5.3: 3D-Simulation des Interferometers

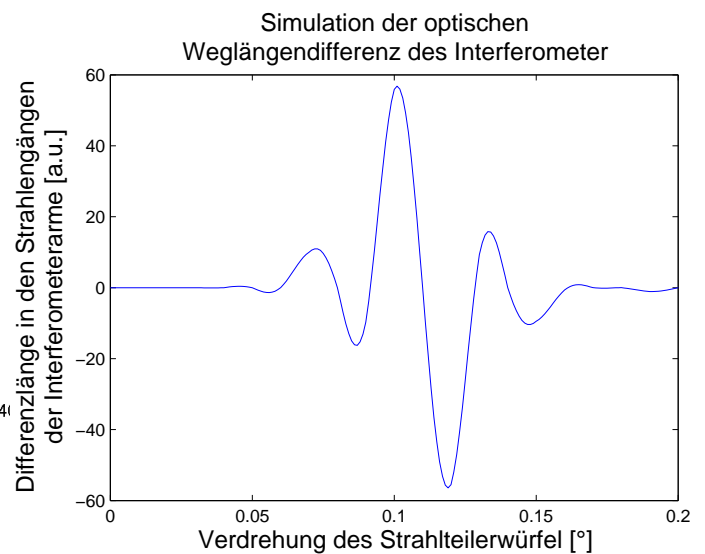


Abb. 5.4: Simulation des Phasenvektorverlaufs bei Rotation

für beide Strahlen berechnet und pro Drehwinkel die Summe aller drei Komponenten als Maß für die Abweichung in 3D dargestellt.

Ein weiterer Vorteil der Simulation ist, daß bevor eine Messung im Labor stattfindet, diese bereits als virtuelle Messung durchgeführt werden kann und auf deren Realisierbarkeit bzw. Eignung für diesen Aufbau geprüft werden kann.

## 5.5 Größenbestimmung durch Modulationskontrast

Ausgehend von den positiven Ergebnissen der Messungen zur Krümmung der Wellenfront im Objektraum sowie dem linearen Verhalten des detektierten Interferenzmusters mit der Webcam und der PCO-Kamera besteht die Möglichkeit, aus einem phasenmodulierten Datenstapel Rückschlüsse auf die Objektgröße zu ziehen, solange keine Totalreflexion zur Anregung verwendet wird.

Ein Objekt, welches kleiner als die Periodenlänge des Interferenzmuster ist, wird abhängig von der Phasenlage des Muster mehr oder weniger stark zur Fluoreszenz angeregt. Das relative Verhältnis von Maximum zu Minimum der detektierten Intensität ist hierbei abhängig von der Größe des Objektes, welches für die folgenden Betrachtungen als sphärisch angenommen wurde. Die Stärke  $I$  der Modulation wird über eine Faltung der Objektfunktion  $O(x)$  mit dem Wellenfeld berechnet.

$$I = O(x) \otimes \cos\left(\frac{2 \cdot \pi \cdot n}{\lambda} \cdot x\right) \quad (5.2)$$

Für sphärische Objekte entspricht die Objektfunktion einer auf dem Kopf stehenden Parabel, mit jener die Farbstoffdichte beschrieben wird. Der Modulationskontrast wurde für die Radien 50nm, 55nm, 70nm und 100nm in Abhängigkeit zu der Periodenlänge des Interferenzmuster berechnet. Das Ergebnis ist im folgenden Graphen zu sehen. Der

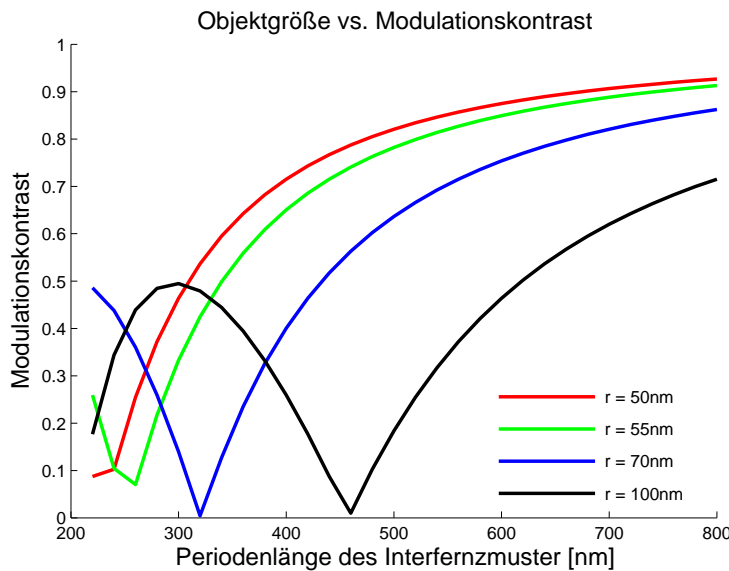


Abb. 5.5: Simulation des Modulationskontrasts für sphärische Objekte in Abhängigkeit zur Periode des Interferenzmuster. In rot sind Objekte mit 50nm Radius dargestellt, in grün mit 55nm, in blau mit 70nm sowie in schwarz mit 100nm Radius.

Modulationskontrast wurde hierbei als  $(Max - Min)/Max$  der Intensitätsverteilung definiert. Aus diesen Kurven ist deutliche die Abhängigkeit des Modulationskontrasts von

der Objektgröße für eine bestimmte Periodenlänge des Interferenzmusters zu erkennen. Weiterhin kann aus diesen Kurven die ideale Periodenlänge, d.h. der Bereich mit der maximalen Kurvensteigung bei grober Kenntnis der Objektgröße gewählt werden, um diese anhand des Modulationskontrast präzise bestimmen zu können.

## 5.6 Simulation und Rekonstruktion der strukturierten Beleuchtung

Die Methode der strukturierten Beleuchtung stellt bei der Detektion ein Summenbild aus drei verschiedenen Raumfrequenzbereichen dar. Neben dem durch die Nullfrequenz des Beleuchtungsmusters übertragenen Frequenzbereiches wird jeweils ein weiterer Frequenzbereich als Summe und Differenz zur Raumfrequenz der Modulation simultan übertragen. Im folgenden wird die Simulation eines solchen Bildes sowie dessen Rekonstruktion beschrieben.

Hierzu soll die periodische Modulation in Form einer stehenden elektromagnetischen Welle die fluoreszent markierte Probe anregen. Dieser Schritt wird mehrfach wiederholt, wobei die Phase der stehenden Welle pro Messung um einen genau definierten Phasenversatz zur vorherigen Messung verschoben wird. Die folgende Abbildung zeigt schematisch die einzelnen Teileschritte für die Simulation einer SW-TIRF-Beleuchtung entlang einer Achse. Als Parameter wurde  $NA=1.2$ ,  $\lambda_{em} = 520nm$ ,  $\lambda_{ex} = 488nm$  eine Phasenver-

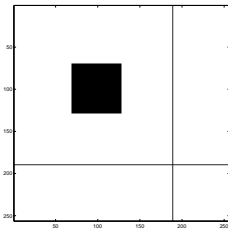


Abb. 5.6: Objekt für die Simulation, Voxelgröße 27nm

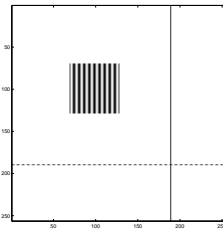


Abb. 5.7: Das mit einer  $\cos^2$ -Funktion angeregte Objekt

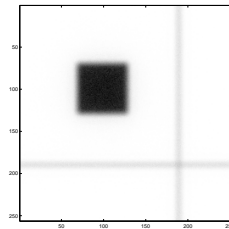


Abb. 5.8: Gemittelt detektiertes Weitfeld-Bild für  $NA=1.2$

schiebung entlang der x-Achse von  $\pi/12$ , ein  $70^\circ$  TIRF-Winkel für Schwerflintglas mit  $n=1.6$  sowie einen Brechungsindex von  $n=1.46$  für das Einbettungsmedium bei 27nm Voxelgröße angenommen. Das gemittelte Weitfeld-Bild entstand aus der Faltung des mit der  $\cos$ -Funktion angeregten Objektes mit einer gewöhnlichen Weitfeld-PSF, passend zu den obigen Parametern.

Ausgehend von einer Gittermaske mit einer Pixelgröße, welche feiner als die kleinste zu erwartende detektierbare Objektstruktur ist, wird die virtuelle Objektstruktur *obj* defi-



niert. Für ein zur Detektion angenommenes ideales Objektiv wird ausgehend von dessen numerischer Apertur die Punktbildfunktion sowie die optische Transferfunktion zu der gewählten Pixelgröße berechnet. Das Weitfeldbild  $w_{im}$  entspricht einer Faltung von Objekt und Punktbildfunktion, welche im Fourierraum auf eine Multiplikation von Objekt und optischer Transferfunktion mit anschließender Rücktransformation reduzierbar ist. Die Phasenmodulation der strukturierten Beleuchtung erzeugt anstatt eines Bildes einen Bildstapel. Hierzu wird zu jedem Phasenschritt  $\Delta\phi$  die virtuelle Objektstruktur  $obj_{struct}$  mit der Kosinusfunktion in Abhängigkeit des aktuellen Phasenschrittes gewichtet. Jedes Bild  $img(\phi)$  des Bildstapel wird analog zum Weitfeldbild berechnet wobei die mit der jeweiligen Phasenlage gewichtete Objektstruktur in die einzelnen Bilder eingeht. Bei der Rekonstruktion werden zunächst zwei Bilder aus den modulierten Daten erzeugt. Das eine Bild  $B_{cos}$  besteht aus der Summe der pro Phasenschritt mit einer Kosinusfunktion gewichteten Bilddaten. Das zweite Bild  $B_{sin}$  ist entsprechend mit einer Sinusfunktion pro Phasenschritt gewichtet. Anschließend werden diese beiden Bilder zu einem komplexwertigen Bild  $B$  addiert, wobei der Realteil aus dem mit der Kosinusfunktion gewichteten Bild besteht, der Imaginärteil entsprechend der Sinusgewichtung entspricht. Zur Berechnung des hochauflösten Rekonstruktionsbildes  $C$  wird der Absolutbetrag aus der Summe des Weitfeldbild und des komplexwertigen Bildes berechnet, wobei dieses mit einer Exponentialfunktion um die entsprechende Frequenz des Interferenzmuster verschoben ist.

$$w_{im} = \text{ifft}(\text{fft}(obj) \cdot OTF) \quad (5.3)$$

$$obj_{struct}(\phi) = obj \cdot \cos\left(\frac{2 \cdot \pi \cdot n \cdot pixelsize}{\lambda} \cdot x + \Delta\phi + \phi_0\right) \quad (5.4)$$

$$img(\phi) = \text{ifft}(\text{fft}(obj_{struct}(\phi)) \cdot OTF) \quad (5.5)$$

$$A_{im} = \text{mean}(img) \quad (5.6)$$

$$B_{cos} = \sum obj_{struct}(\phi_i) \cdot \cos(2 \cdot \Delta\phi(i)) \quad (5.7)$$

$$B_{sin} = \sum obj_{struct}(\phi_i) \cdot \sin(2 \cdot \Delta\phi(i)) \quad (5.8)$$

$$B = B_{cos} + i \cdot B_{sin} \quad (5.9)$$

$$C = \text{abs}(A + 2 \cdot B \cdot e^{i \cdot 2 \cdot k \cdot x}) \quad (5.10)$$

Aus dem rechten Bild ist erkennbar, daß nur aus der interferometrischen Beleuchtung die Auflösung bei Weitfeld-Detektion nicht verbessert wird. Die detektierten Bildstapel (das Objekt wurde mit  $\pi/12$  Phasenverschiebung zur vorherigen Messung beleuchtet) müssen nach Gl.5.3 bis 5.10 zu einem auflösungsverbesserten Bild rekonstruiert werden. Hierzu wird zunächst der Mittelwert über den gesamten Bildstapel gebildet, da dieser Wert der Nullfrequenz-Komponente im Fourierraum entspricht. Anschließend erfolgt die Gewichtung mit den Sinus- und Kosinus-Komponenten der jeweiligen Phase pro gemessenen Bild. Anschließend werden die einzelnen Komponenten der gewichteten Bilder

addiert und aufgrund ihrer orthogonalen Komponenten zu einem komplexwertiger Ausdruck zusammengefaßt. Dieser Ausdruck enthält nun die erweiterten Frequenzanteile, welche jedoch erst an die entsprechende Stellen verschoben werden müssen. Das hochaufgelöste Gesamtbild wird nun als Summe aus der zuvor ermittelten Nullfrequenzkomponente und komplexwertigen Ausdruck, multipliziert mit der  $\exp$ -Funktion gebildet, deren Argument für die richtige Verschiebung der erweiterten Frequenzkomponenten aufgrund der strukturierten Beleuchtung sorgt.

Bei einer realen Messung muß sowohl  $\lambda$  als auch  $\Delta\phi$  sowie die beliebige Anfangsphase  $\phi_0$  bekannt sein, damit die Rekonstruktion durchgeführt werden kann. Zur Dekonvolution kann ein Wiener-Filter auf diese Daten angewendet werden, um Artefakte aus der Fouriertransformation aufgrund des endlichen Intervalls zu unterdrücken. Die folgende Abbildung zeigt links das bereits bekannte, gemittelte Weitfeldbild, rechts das rekonstruierte und mit einem Wiener-Filter aufbereitete Bild.

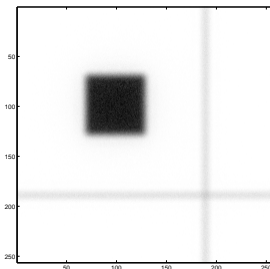


Abb. 5.9: Gemitteltes detektiertes Weitfeld-Bild für  $NA=1.2$

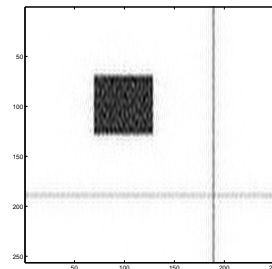


Abb. 5.10: Das rekonstruierte Bild nach Wiener-Filterung

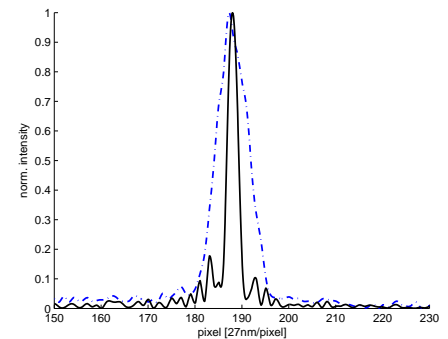


Abb. 5.11: Intensitätsverteilung entlang der x-Achse

An der Intensitätsverteilung des gemittelten Weitfeld-Bildes sowie des hochaufgelösten Bildes nach Dekonvolution unter Anwendung eines Wiener-Filter ist deutlich die Reduzierung der Halbwertsbreite sichtbar.

## 6 Messungen und Ergebnisse

Damit eine Rekonstruktion von Messdaten erfolgen kann, muß zunächst der gesamte Aufbau auf seine physikalischen Eigenschaften hin untersucht werden. Hierzu sind sowohl mechanische als auch optische Parameter auf deren Übereinstimmung zu den theoretischen Werten zu überprüfen.

Im folgenden wird die Positionsgenauigkeit für den Phasenpiezo und den Piezofokussierer bestimmt, um mögliche Nichtlinearitäten in der Ausdehnung zu erkennen. Weiterhin wird aus diesen Daten eine Aussage über Regelschwingungen der Ansteuerelektronik getroffen.

Diesen Messungen folgt die Bestimmung des Abbildungsmaßstabs von Objektiv und Tubuslinse auf die zur präzisen Messung verwendeten PCO Kamera. Hiermit kann sowohl der Abstand der Tubuslinse zum Objektiv überprüft werden, als auch die tatsächliche Pixelgröße im Objektraum mittels einem Objektmikrometer bestimmt werden.

Da die Periodenlänge der strukturierten Beleuchtung variable Werte annehmen kann, im Extremfall bis hinab zur Beugungsbegrenzung des Objektivs, wird diese mit einer Webcam am Ausgang des Interferometers gemessen. Das Interferenzmuster ist an dieser Stelle etwa 250fach größer als in der Objektebene. Für diese Webcam ist sowohl der Betrag des Abbildungsmaßstabs als auch eine mögliche Verkippung der Wellenfront, relativ zu dem detektierten Signal der PCO Kamera, zu bestimmen. Des weiteren muß überprüft werden, ob sich die Interferenzmuster auf beiden Kameras linear unter Variation der Interferenzperiode verhalten.

Schließlich wird der Mikrostrahl für eine Wellenlänge vermessen, damit eine qualitative Aussage über dessen Durchmesser und Energiedichte getroffen werden kann. Aus den Parametern des Mikrostrahls kann eine grobe Abschätzung der Strahleinkopplung bzw. Strahlqualität getroffen werden.

Diesen Messungen folgen erste Experimente zu optischen Schnitten an biologischen Präparaten. Weiterhin wurden Experimente zur Auflösungsverbesserung in 1D und in 2D an Aktinfasern durchgeführt. Die Aufbereitung dieser Daten beruht dabei auf den gewonnenen Parametern der Charakterisierungsmessungen. Ebenfalls konnte die Modulationsstärke in Abhängigkeit von der Polarisation bei Perioden des Interferenzmusters nahe der Auflösungsgrenze gezeigt werden. Weiterhin wurden erste Messungen zur Größenbestimmung von Objekten durchgeführt. Als letzte Anwendung wurden biologische Präparate mit stehenden evaneszenten Wellen zur Fluoreszenz angeregt und deren winkelabhängiges Intensitätsprofil ausgewertet.

## 6.1 Positionsgenauigkeit der Piezoaktuatoren

Die strukturierte Beleuchtung wird mit einem Michelson-Morley Interferometer erzeugt. Zur Erzeugung von optischen Schnitten sowie zur Verbesserung der lateralen Auflösung muß jedoch das Interferenzmuster reaktiv zur Probe bzw. die Probe relativ zu dem Interferenzmuster bewegt werden. Aus Gründen der mechanischen Stabilität wurde auf ein nanometergenaues Verschiebesystem der Probe verzichtet und dafür die Phase des Interferenzmusters variiert. Hierzu wird ein Arm des Interferometers mittels eines piezo-verstellbaren Spiegels in seiner Weglänge verändert. Die Abbildung 6.2 zeigt zum einen die Soll-Ausdehnung des Piezos gegenüber der gemessenen Feedback-Ausdehnung sowie die Differenz der beiden Werte gegenüber der jeweiligen Soll-Ausdehnung. Der Controller verfügt über eine Closed-Loop Regelung, diese muß jedoch auf die entsprechende Last auf dem Piezo eingestellt werden, damit es nicht zu unerwünschten Regelschwingungen kommt. Diese würden speziell bei kurzen Integrationszeiten zu einer zusätzlichen und nicht reproduzierbaren Phasenmodulation bei der Anregung führen.

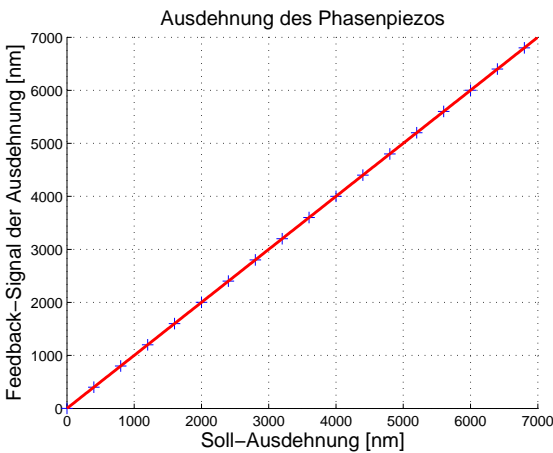


Abb. 6.1: Sollwert vs. Feedback-Wert des Phasenpiezos: Messwerte und linearer Fit. In 10ms Intervallen wurde die Ausdehnung um 40nm erhöht.

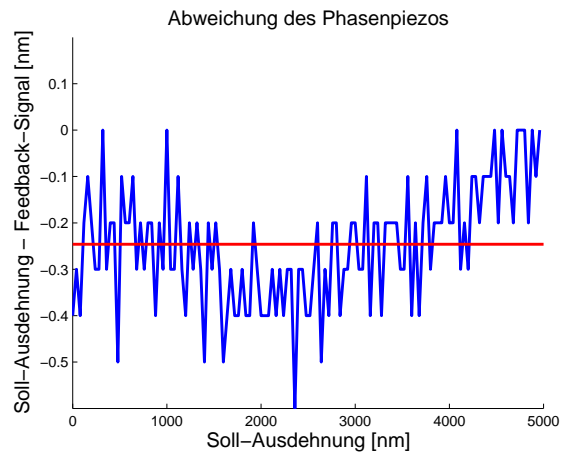


Abb. 6.2: Abweichung des Phasenpiezos vom Sollwert zum Feedback-Wert. In 10ms Intervallen wurde die Ausdehnung um 40nm erhöht. Die rote Linie zeigt den Mittelwert der Abweichung an.

Neben einer präzisen Positionierung ist die Wiederholgenauigkeit des Phasenpiezos wichtig, da für ein einmal eingestelltes Interferenzmuster mehrere Objekte nacheinander unter den gleichen Bedingungen strukturiert beleuchtet werden sollen. Hierzu wurde nach einer Stunde erneut die gleiche Messprozedur angewendet um selbst nach langen Zeiten zwischen zwei Messungen stets die gleiche Phasenmodulation einstellen zu können. Die Abbildung 6.3 zeigt für beide Messungen jeweils die Abweichung der programmierten Soll-Position zur gemessenen. Auch hieran ist eine Differenz der beiden Kurven pro

40nm-Schritt unterhalb von 1nm erkennbar, so daß eine Serie von Messungen unter den gleichen Bedingungen durchgeführt werden kann.

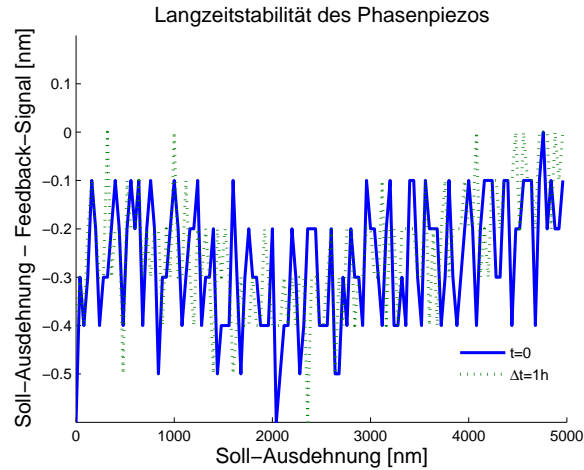


Abb. 6.3: Wiederholgenauigkeit der Phasenmodulation innerhalb einer Stunde.

Alle Messungen verlaufen innerhalb eines  $5\mu\text{m}$ -Fensters, wobei die maximale Ausdehnung  $7\mu\text{m}$  sein kann. Zum Einen ist für Phasenmessungen nur das exakte Einstellen einer oder weniger Perioden notwendig, zum Anderen hat sich, wie in Abbildung 6.4 zu sehen ist, ein Plateau an den ersten  $5\mu\text{m}$  ausgebildet, an dem die Abweichungen von Soll- zu Ist-Positionen sehr viel geringer ausfallen als im gesamten Verfahrensbereich.

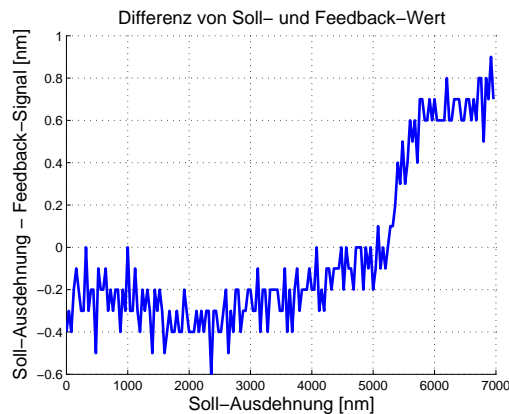


Abb. 6.4: Genauigkeit des Phasenpiezos über die maximale Ausdehnung von  $7\mu\text{m}$ .

An diesen Messkurven ist eindeutig das lineare Verhalten des Piezos sowie dessen Wiederholgenauigkeit erkennbar, so daß für die Rekonstruktion die Phasenverschiebung innerhalb des Plateau-Bereiches als konstant betrachtet werden kann.

Auch für den Piezofokussierer wurde der Regelkreis auf eine geringe Masse als die tatsächliche Objektivmasse abgeglichen, um Schwankungen des Fokusbereichs weitestgehend zu unterdrücken. Zur Bestimmung und Optimierung dieses Regelkreises wurde die gleiche Methode wie für den Phasenpiezo verwendet. Hierbei ist die relativ hohe Masse des Objektivs sowie der große Verfahrbereich von  $100\mu\text{m}$  zu beachten. Der große Verfahrbereich von  $100\mu\text{m}$  ist notwendig, damit bei einer Probendicke von etwa  $20 - 30\mu\text{m}$  sowohl Objekte am Deckglas (der bevorzugten Position) als auch am Objektträger anfokusiert werden können. Weiterhin sind einige  $10\mu\text{m}$  an Verfahrbereich aufgrund der verschiedenen Deckglasdicken zu berücksichtigen gewesen.

Die folgenden Abbildungen zeigen analog zum Phasenpiezo die Linearität des Piezos sowie dessen Abweichung zum Sollwert. Sehr deutlich ist der Plateau-Bereich zwischen  $30\mu\text{m}$  und  $70\mu\text{m}$  zu erkennen, welcher aufgrund dieser Resultate als Arbeitsbereich für alle Messungen gewählt wurde.

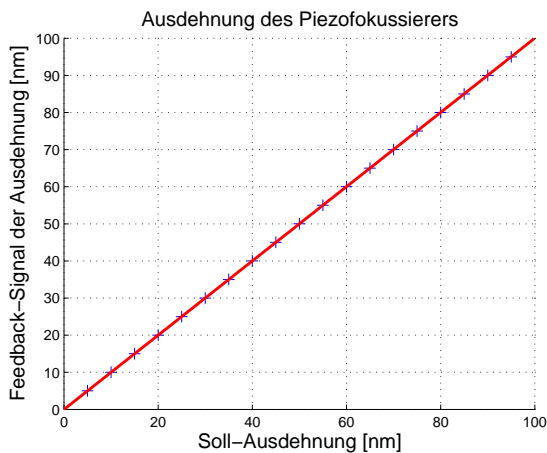


Abb. 6.5: Sollwert vs. Feedback-Wert des Piezofokussierers: Messwerte und linearer Fit.

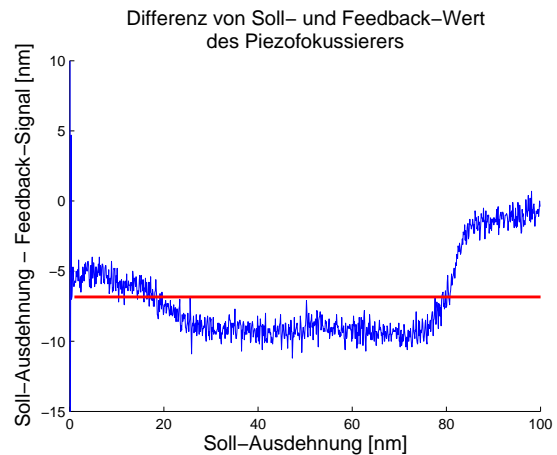


Abb. 6.6: Abweichung des Piezofokussierers vom Sollwert zum Feedback-Wert. Die rote Linie zeigt den Mittelwert der Abweichung.

Der Mittelwert der Abweichung, gemessen über die vollen  $100\mu\text{m}$  beträgt  $6,8\text{nm}$  bei einer Standardabweichung von  $5,7\text{nm}$ . In dem Plateau-Bereich ist der Mittelwert der Abweichung mit  $9,2\text{nm}$  noch stärker dämpfend, die Standardabweichung beträgt hierbei nur  $0,6\text{nm}$ .

Aus diesen Kurven zu den Piezoaktuatoren kann eine Einhaltung der gewünschten Soll-Positionen für die späteren Messungen sichergestellt werden.

## 6.2 Bestimmung des Abbildungsmaßstabs von Objektiv und Tubuslinse

Ebenfalls notwendig ist die exakte Kenntnis über die durch das Objektiv und die Tubuslinse abgebildete Pixelgröße auf dem CCD-Chip der Kamera. Zur Bestimmung des Abbildungsmaßstabs wurde ein Objektmikrometer mit einer LED im Durchlicht-Modus mit der CCD-Kamera aufgenommen. Die Marker des Objektmikrometers haben laut Hersteller einen Abstand von  $10\mu\text{m}$ , der Abstand von einem CCD-Pixel zum nächsten Pixel beträgt  $6,45\mu\text{m}$ . Abbildung 6.7 zeigt die Durchlicht-Aufnahme des für diese Berechnung verwendeten Objektmikrometers sowie das Profil entlang der y-Richtung an der Stelle  $x=800$ . Deutlich sind die Minima an den jeweiligen Markerpositionen erkennbar, da es sich um eine aufgedampfte Chromschicht auf einem Objektträger handelt und somit bei Durchlicht-Beleuchtung eine Abschwächung an diesen Stellen zu erwarten ist.

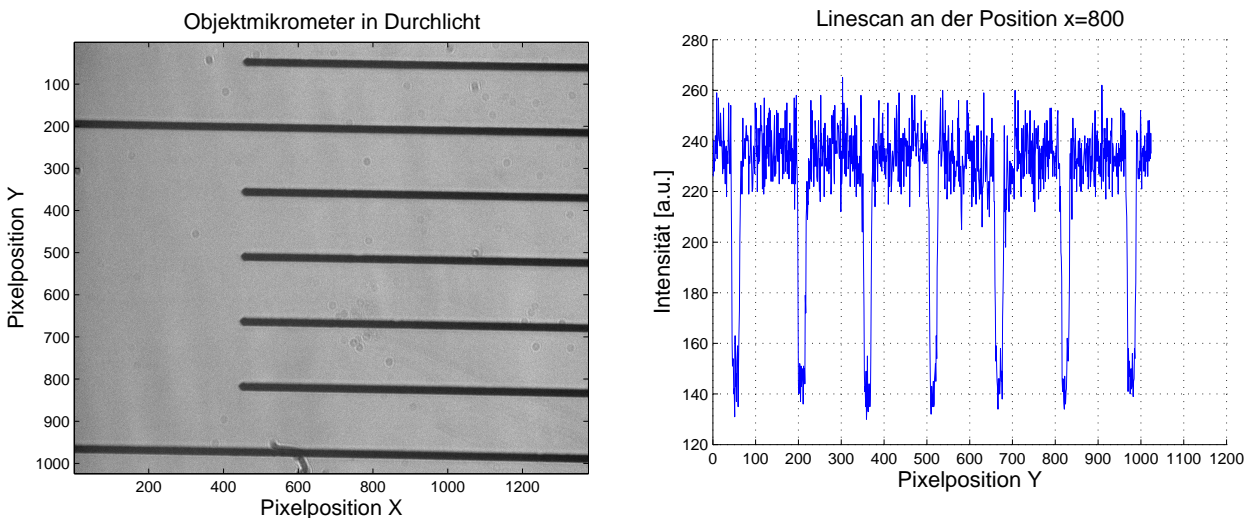


Abb. 6.7: Durchlicht-Aufnahme des Objektmikrometers zur Bestimmung des Abbildungsmaßstabs.

Abb. 6.8: Linienprofil entlang einer Achse des Objektmikrometers. Der Abstand zwischen zwei Markern beträgt  $10\mu\text{m}$ .

Aus diesen beiden Werten und dem gemessenen Pixel-Abstand zwischen zwei Markierungen kann unmittelbar der Abbildungsmaßstab wie folgt bestimmt werden:

$$\begin{aligned} \text{Mag} &= \frac{\text{pixeldist} \cdot \text{pixelnumber}}{\text{markerspacing}} \\ \text{Mag} &= \frac{6,45\mu\text{m} \cdot 155}{10\mu\text{m}} \\ \text{Mag} &= 99,9 \pm 0,6 \end{aligned}$$



Dieser Wert vom  $99,9 \pm 0,6$  stimmt sehr gut mit dem zu erwartenden Wert der verwendeten Tubuslinse (1x) und dem Objektiv (100x) überein.

### 6.3 Abbildungsmaßstab von Webcam zu PCO Kamera

Außer den bisherigen Größen ist es notwendig, die Richtung der strukturierten Beleuchtung sowie den Betrag des Wellenvektors der interferierenden Wellen exakt zu kennen. Hierzu wurde zwischen Interferometer und Einfokussierlinse ein weiterer Strahlteilerwürfel in den Strahlengang gebracht. Eine WebCam mit CMOS-Chip und vorgeschalteten Graufilter bildet dabei ohne weitere optische Elemente das Interferenzmuster aus einem Ausgang des Strahlteilerwürfels ab, während das zweite, nicht abgelenkte Ausgangssignal auf die Einfokussierlinse trifft. Die Einfokussierlinse und das Mikroskopobjektiv bilden einen Kollimator, da sie einen gemeinsamen Fokuspunkt haben - die hintere Fokusebene. Aus dem Abbildungsmaßstab von Einfokussierlinse und Objektiv kann unmittelbar von dem Interferenzsignal auf dem CMOS-Chip auf die Interferenzstruktur in der Gegenstandsebene des Objektivs zurückgeschlossen werden. An dieser Stelle das Interferenzmuster sehr viel größer als im Objektraum. Somit stehen alle Informationen, die für eine Rekonstruktion notwendig sind, bereits während der Messung zur Verfügung.

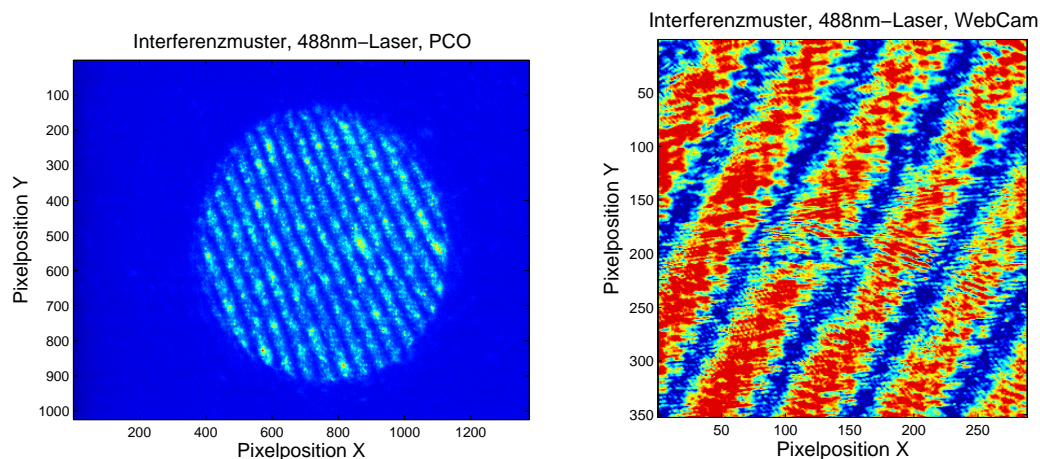


Abb. 6.9: Aufnahme des Interferenzmusters mit der PCO-Kamera.

Abb. 6.10: Aufnahme des Interferenzmusters mit der WebCam.

Die obigen Abbildungen zeigen ein grobes Interferenzmuster einer der Laserlinien, welches sowohl mit der WebCam am Strahlteiler als auch mit der PCO-Kamera detektiert wurde, indem ein metallisierter Objektträger als spiegelnde Probe verwendet wurde. Aus dem Verhältniss der beiden Wellenvektoren kann der Faktor des Anregungskollimators bestimmt werden. Dessen theoretischer Wert sollte 250 betragen, da die Brennweite der



Einfokussierlinse 500mm und die Brennweite der hinteren Fokuseben des Objektivs 2mm beträgt.

Aus diesen beiden Aufnahmen ergibt sich ein mittlerer Winkel der Wellenfrontverkipfung von  $\alpha = 26,8^\circ \pm 0,5^\circ$ . Für die PCO-Kamera wird der Abstand von Maximum zu Maximum auf  $d_1 = 52 \pm 3$  Pixel bestimmt, bei der WebCam beträgt dieser  $d_2 = 70 \pm 2$  Pixel. Zusammen mit den Pixelgrößen der jeweiligen Kameras und dem aus der vorherigen Aufnahme bestimmten Abbildungsmaßstab bei der Detektion kann der Faktor des Anregungskollimators wie folgt bestimmt werden.

$$\begin{aligned}
 M &= \frac{l_2}{l_1} \\
 M &= \frac{d_2 \cdot 6.45\mu m / pix \cdot 1 / Mag \cdot \cos \alpha}{d_1 \cdot 12\mu m / pix \cdot \cos \alpha} \\
 M &= \frac{749,772\mu m}{2,994\mu m} \\
 M &= 250,2 \pm 16,2
 \end{aligned} \tag{6.1}$$

Zur Bestimmung der Linearität des Interferenzmuster von der Webcam zum detektierten Interferenzmuster in der Objektebene mittels der PCO-Kamera wurde ein fluoreszierendes Objekt unter verschiedenen Winkeln mit beiden Strahlen beleuchtet und jeweils eine Aufnahme mit beiden Kameras durchgeführt.

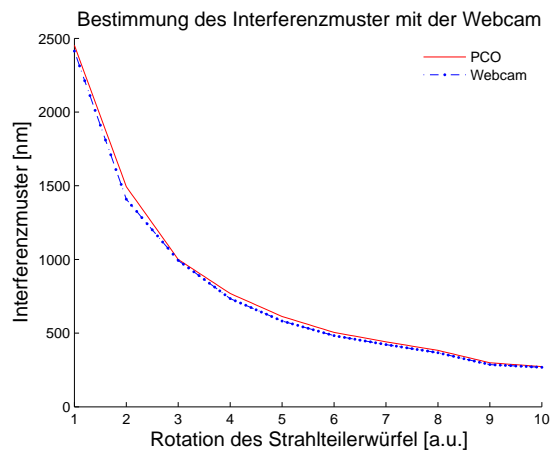


Abb. 6.11: Wellenfrontvergleich zwischen Webcam und PCO-Kamera.

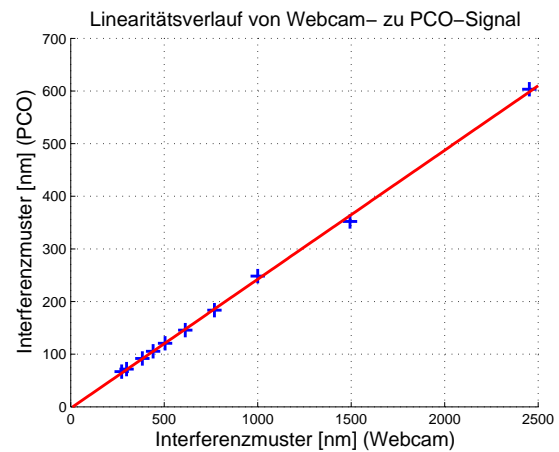


Abb. 6.12: Linearitätsverhalten von der WebCam zur PCO-Kamera.

Das Ergebnis dieser Messreihe ist in den Abbildungen 6.11 und 6.12 zu sehen. Hierbei wird der lineare Zusammenhang zwischen den beiden Detektoren über einen weiten Bereich der Wellenlänge des Interferenzmusters deutlich. Aus diesen fundamentalen

Messreihen etablierte sich eine Methode zur Bestimmung der Wellenfront (Betrag und Richtung) des Interferenzmuster im Objektraum auf Grundlage des stark vergrößerten Webcam-Bildes.

## 6.4 Der UV-Mikrostrahl

Neben der Analyse zur strukturierten Beleuchtung bezüglich des Abbildungsmaßstabes zwischen WebCam und der CCD-Kamera, der Bestimmung des Abbildungsmaßstabes von Objektiv und Tubuslinse sowie der Charakterisierung der Piezoaktuatoren ist der UV-Mikrostrahl näher untersucht worden. Hierzu wurde auf einen Objektträger eine dünne Schicht mit einem Textmarker aufgetragen und anschließend mit dem Mikrostrahl bestrahlt. Die Abbildung 6.13 zeigt die fluoreszente Textmarkerschicht mit der strukturierten Weitfeldbeleuchtung, nachdem der Mikrostrahl für 300ms die Probe beleuchtet hat. Im rechten Diagramm ist entlang der rot markierten Linie das Intensitätsprofil dargestellt. Sehr deutlich ist das Intensitätsminimum zu sehen, welches durch den Mikrostrahl verursacht wurde.

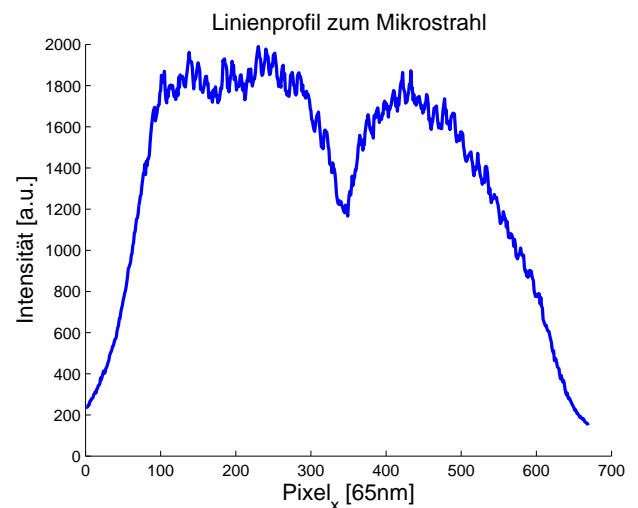
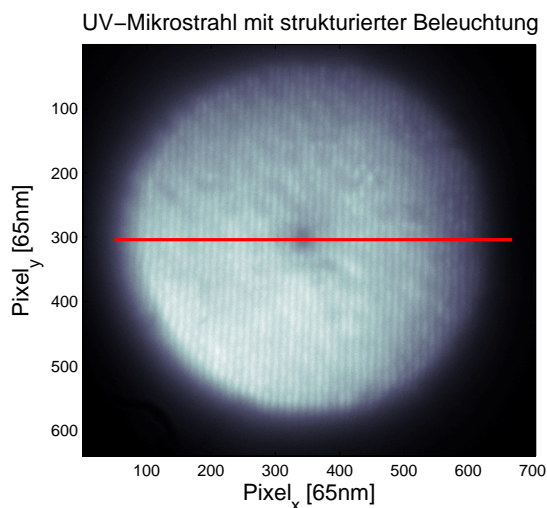


Abb. 6.13: Aufnahme einer Textmarkerschicht mit strukturierter Weitfeldbeleuchtung nach 300ms UV-Mikrobestrahlung.

Abb. 6.14: Linienprofil entlang der mikrobestrahlten Fläche.

Aus diesen Messungen kann eine Breite der durch Mikrobestrahlung ausgebleichten Fläche von  $23 \pm 3$  Pixeln aus dem Linienprofil abgelesen werden. Dies entspricht einem Durchmesser von  $1,50 \pm 0,20 \mu\text{m}$ . Bei diesem Durchmesser ist zu beachten, daß es sich bei der Einkopplung in das Objektiv nicht um ein TEM<sub>00</sub>-Profil gehandelt hat, da das Modenspektrum des verwendeten DPSS-Laser nicht sehr hochwertig ist. Hinzu

kommt die Tatsache, daß der Abstand der Einfokussierlinse L5 (verglichen zu deren Brennweite) zum Objektiv, welches während der Mikrobestrahlung als Kollimator mit der Linse L5 dient, sehr dicht am Objektiv ist und somit mit einem nicht vollständig kollimierten Strahl bei der Einkopplung in das Objektiv zu rechnen ist. Da die Linse L5 kein Achromat ist, wirkt sich dies ebenfalls negativ auf die Kollimation aus. Die gesamte ausgeleuchtete Fläche beträgt etwa  $525 \pm 6$  Pixel, was einem Durchmesser von  $34,13 \pm 0.39 \mu m$  entspricht.

Als Intensität dieses Mikrostrahl wurden  $52 \mu W$  bei einem Durchmesser von 4mm vor der Kollimatorlinse gemessen. Unter Berücksichtigung der ausgebleichten Fläche von etwa  $1,77 \mu m^2$  entspricht dies einer Leistungsdichte im Fokus von:

$$\begin{aligned} I_{Obj} &= \frac{P}{A} \\ I_{Obj} &= \frac{52 \cdot 10^{-6} W}{1.77 \cdot 10^{-4} cm^2} \\ I_{Obj} &= 0,29 \frac{W}{cm^2} \end{aligned} \quad (6.2)$$

Der Aufbau wurde derart konzipiert, daß ein Mikrostrahl aus jeder der vier verfügbaren Laserlinien durch ein einfaches Verschieben des Strahlteilerwürfels BS1 erfolgen kann. Da die UV-Linie ein breiteres Anwendungsspektrum im Gegensatz zu den restlichen Laserlinien bietet, wurde die 404nm Linie als Standardlinie selektiert.

Neben der Möglichkeit gezielt Defekte an biologischen Strukturen durch photochemische Effekte, welche durch einen UV-Mikrostrahl hervorgerufen werden können [Cre74][Hen83], kann dieser Strahl bei verminderter Leistungsdichte zur Aktivierung von photoschaltbaren Molekülen verwendet werden. Diese können danach mittels lateral strukturierter Beleuchtung zur Fluoreszenz angeregt werden.

## 6.5 Analyse der Wellenfront im Objektraum

Innerhalb des  $30 \times 30 \mu m$  Gesichtsfeld wurde die Krümmung der Wellenfront analysiert. Diese sollte theoretisch vollkommen eben sein, da das Interferenzmuster des Michelson-Morley Interferometers in die hintere Fokusebene des Objektivs fokussiert wurde, so daß im Objektraum zwei kollimierte Strahlen konstruktiv miteinander interferieren sollten. Dies setzt ein planes Gesichtsfeld des verwendeten Objektivs voraus, weshalb u.a. ein Plan-Apochromat verwendet wurde.

Zur Analyse der Wellenfront im Objektraum wurden fluoreszente Mikrosphären (Beads) im gesamten Gesichtsfeld mit der lateral strukturierten Beleuchtung für verschiedene Phasenlagen der stehenden Welle angeregt und deren Fluoreszenzlicht in Abhängigkeit zur Phasenlage ausgewertet. Da jedes Objekt im Gesichtsfeld mit der gleiche Beleuchtungsquelle angeregt wurde, sollten alle Objekte die gleiche Periodenlänge aufweisen und sich nur durch eine konstante Phaseverschiebung unterscheiden. Das folgende Histogramm zeigt für 81 dieser Beads die Verteilung der Wellenvektoren, welche aus den

Fits zu der Phasenmessung zu jedem einzelnen Bead entstanden. Die Periodenlänge des Interferenzmusters war  $222 \pm 4$  nm, die Anregungswellenlänge war 488nm, als Beads wurden grün fluoreszierende 100nm Vollkugeln (Duke Scientific) verwendet.

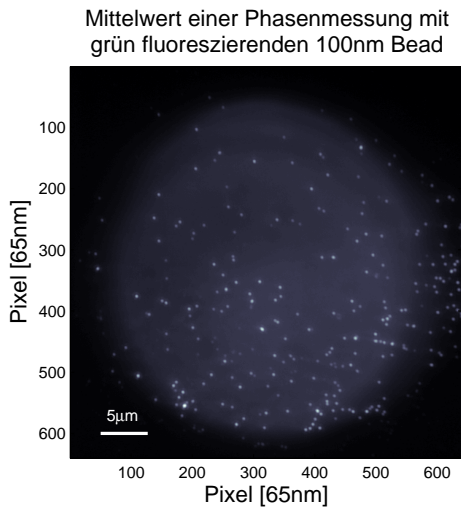


Abb. 6.15: Übersichtsbild zur Bestimmung der Wellenfrontverzerrung im Gesichtsfeld. Als Objekte wurden grün fluoreszierende 100nm Beads verwendet, die strukturierte Anregung erfolgte mit 488nm

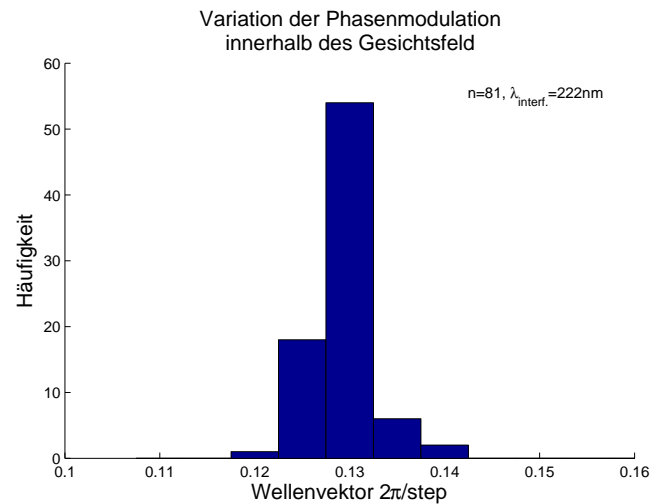


Abb. 6.16: Variation der Periodenlänge einer Phasenmessung für 81 Objekte im Gesichtsfeld. Die Wellenlänge des Interferenzmusters betrug 222nm. Als Objekt wurden grün fluoreszierende 100nm Beads verwendet.

Aus dieser Verteilung kann ein mittlerer Wellenvektor für die Phasenmodulation von  $0,129 \pm 0,0031/\text{Schritt}$  abgelesen werden. Hierbei ist zu beachten, daß es sich um den Abstand von einem Maxima zum übernächsten Maxima handelt. Dies entspricht einer tatsächlichen Periodenlänge zwischen zwei Maxima von  $24,35 \pm 0,42$  Phasenschritten. Die Abweichung der Periodenlängen für die Phasenmessung der einzelnen Beads beträgt hierbei etwa 2%, weshalb die Wellenfront als eben angesehen werden kann.

Ausgehend von der Anregungswellenlänge und dem obigen Abstand zwischen zwei Maxima kann die durch den Phasenpiezo verursachte Änderung der Weglänge eines der beiden Interferometerarme überprüft werden.

$$\begin{aligned}\Delta x &= \lambda_{ex}/\text{Abstand}_{\text{maxmax}} \\ &= 488\text{nm}/24,35 \\ \Delta x &= (20.04 \pm 0.34)\text{nm}\end{aligned}\tag{6.3}$$

Da sich durch die Bewegung eines der beiden Interferometerarme dessen Armlänge um den doppelten Wert verändert, ist die tatsächliche Ausdehnungsänderung des Phasenpiezos  $10.02 \pm 0.17\text{nm}$ , was innerhalb des Fehlers mit der Sollausdehnung von 10,0nm pro

Phasenschritt übereinstimmt. Zusammen mit den Ergebnissen zur Positionsgenauigkeit des Phasenpiezos vom Anfang dieses Kapitel ist dessen Verhalten innerhalb des Aufbaus präzise bestimmt. Bedingt durch die Geometrie des Aufbaus sollte der Wellenvektor für die Phasenmodulation nur geringfügig von der Periodenlänge des Interferenzmusters abhängig sein. Wie aus der Aufbauskizze 3.9 zu sehen ist, erfolgt die Phasenmodulation durch Änderung der Weglänge eines der beiden Interferometerarme. Da die Verdrehung des Interferometer-Strahlteilerwürfels in  $1/100^\circ$ -Schritten erfolgt, wobei die maximale Verdrehung etwa  $0.15^\circ$  aufweist, ändert sich die Weglänge der Interferometerarme durch diese Verdrehung nur geringfügig. Hierzu wurden für verschiedene Interferenzmusterabstände die Wellenvektoren der Phasenmodulation ausgewertet. Die Anregung erfolgte bei 488nm, als Objekte dienten 100nm Beads, welche über das gesamte Gesichtsfeld verteilt waren. Die Periodenlänge der strukturierten Beleuchtung variierte zwischen 222nm und 890nm.

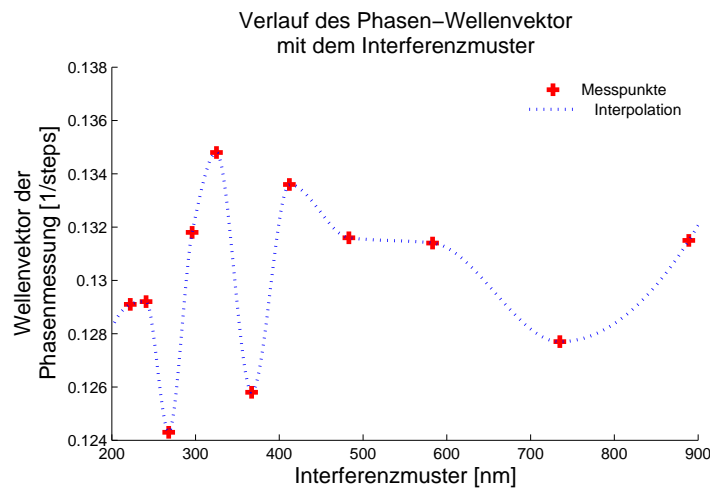


Abb. 6.17: Wellenvektor der Phasenmodulation in Abhängigkeit des Interferenzmusterabstandes

Auffällig an diesem Kurvenverlauf für den Wellenvektor der Phasenmodulation ist die an den interpolierten Messpunkten ersichtliche Tendenz der Oszillation. Hierbei wurde für jede Komponente der beiden Strahlengänge die Differenz berechnet und für jeden Drehwinkel aufsummiert. Das Ergebnis repräsentiert ein Maß für die 3D-Abweichung der beiden Strahlengänge zueinander. Die Amplitude der Oszillation weicht um weniger als 5% von deren Mittelwert ab. Ebenfalls ist eine leichte Asymmetrie der Kurve im Gegensatz zu der Simulation zu erkennen, was daran liegt, dass der Strahlteilerwürfel neben der Rotationsbewegung auch noch mit dem Linearantrieb LA1 orthogonal zur Rotationsachse verkippt wurde. Dies erlaubt es sowohl die Drehung als auch die Verkipfung des Strahlteilerwürfels aus den Daten zu ermitteln. Das oszillatorische Verhalten ist an der Simulation zu dem Interferometer (Abb.5.4) zu erkennen, da je nach Drehwinkel sich beide laterale Ortskomponenten in den jeweiligen Armen unterschiedlich stark ändern.

## 6.6 Chromatische Fehler

Bei der Detektion von Objekten welche am gleichen Ort unterschiedliche spektrale Signaturen besitzen, erscheinen diese lateral versetzt. Der Grund für diesen Versatz ist die Dispersion der optischen Komponenten im Detektionsstrahlengang, sowie Dispersion in der Probe selbst. Zur Minimierung dieses Versatzes wurde ein Achromat als Objektiv verwendet, da diese für drei Wellenlängen korrigiert sind. Eine vollständige Korrektur im gesamten Spektrum ist nicht möglich, da diese Fehler ortsabhängig sind und bei steigender Linsenanzahl die Transmissionsverluste immer mehr zunehmen. Damit die Stärke des Bildversatzes quantitativ abgeschätzt werden kann, wurden 110nm Beads, welche je nach Anregungswellenlänge grün, gelb oder auch rot emittieren können, unmittelbar nacheinander mit den Wellenlängen 404nm, 488nm und 633nm zur Fluoreszenz angeregt, wobei ohne lateral strukturierte Beleuchtung gearbeitet wurde. Die Größe des Gesichtsfeldes wurde mit  $9 \times 9 \mu\text{m}$  in der Mitte des sonst verwendbaren  $30 \times 30 \mu\text{m}$  Feldes gewählt, da dies in etwa der projizierten Fläche einer Zelle entspricht und üblicherweise Objekte zentriert beobachtet werden. Die folgenden zwei Graphen zeigen für die drei verwendeten Wellenlängen den Versatz der einzelnen Messungen in x- bzw. y-Richtung. Der Schwerpunkt wurde jeweils durch eine 2D-Gaußfunktion angefitet. Die einzelnen 2D-Rohdaten wurden jeweils nach aufsteigender x-Koordinate ausgewertet, so daß in den Graphen die linken Messpunkte in etwa 30% links neben der Mitte des maximalen  $30 \mu\text{m}$  Gesichtsfeld liegen. Das rechte Ende des Graphen befindet sich etwa 30% rechts neben der maximalen Bildmitte. Analoges gilt für die y-Koordinaten. Hiermit konnte weitestgehend ein symmetrischer Bereich von  $\pm 4,5 \mu\text{m}$  um die Bildmitte analysiert werden.

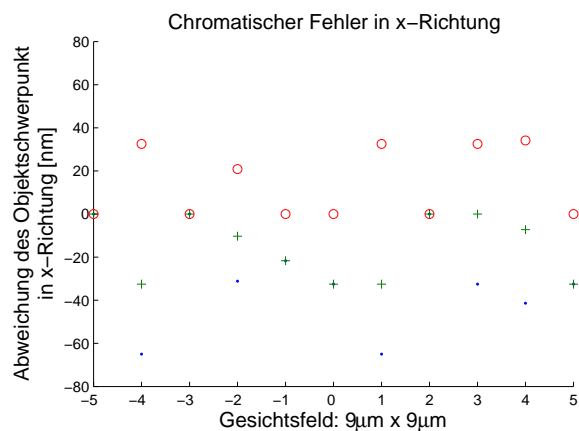


Abb. 6.18: Spektrale Verschiebung der Detektion in x-Richtung. Objekte: 110nm TetraSpec-Beads, Anregung: 404nm, 488nm, 633nm.

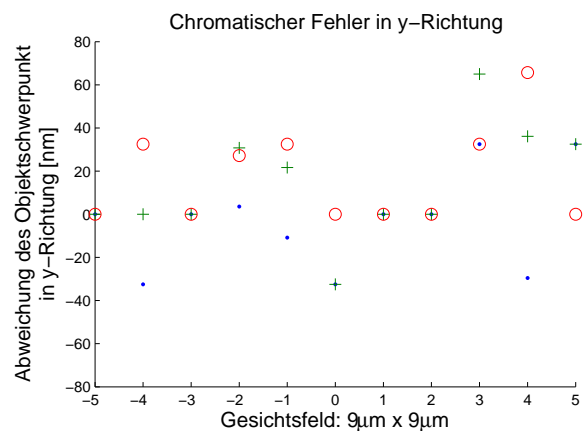


Abb. 6.19: Spektrale Verschiebung der Detektion in y-Richtung. Objekte: 110nm TetraSpec-Beads, Anregung: 404nm, 488nm, 633nm.

Wie aus diesen Graphen ersichtlich ist, sind die chromatischen Fehler keineswegs linear vom Ort abhängig. Weiterhin ist eine maximale Verschiebung von etwa 40nm erkennbar. Dieser Wert liegt jedoch unterhalb der mit strukturierter Beleuchtung erreichbaren optischen Auflösung, gleichwohl hat dies aber auf die Lokalisation von Objekten einen entscheidenden Einfluß.

## 6.7 Fluoreszenzanregung mit Totalreflexion

Die Untersuchung von Membranstrukturen stellt besondere Anforderungen an ein Fluoreszenzmikroskop. Zum Einen muß der Aufbau mechanisch sehr stabil sein, um die Markierungen an der dünnen Membran bestmöglich wiederzugeben, zum Anderen muß die Eigenfluoreszenz aus dem Inneren des Zellkern möglichst gut unterdrückt werden, damit ein maximaler Kontrast entsteht.

Die ideale Methode zur Beobachtung von Membranstrukturen ist die Fluoreszenzanregung mittels Totalreflexion an der Grenzfläche von Deckglas und Zelle [Ohe99]. Aus dem Brechungsgesetz von Snell folgt dies unmittelbar beim Übergang von einem optisch dichten Medium zu einem optische dünnen Medium. Zur Erzeugung von Totalreflexion muß die Probe in PBS<sup>1</sup> als Einbettungsmedium eingebettet sein. Die Zellen, hier Lymphozyten, wurden attarent an dem Deckglas anwachsen lassen und die Membran mit DAPI angefärbt. Die Anregung des DAPI erfolgte mit 404nm bei verschiedenen Interferenzmusterabständen, was gleichbedeutend mit verschiedenen Eintrittswinkeln ist. Hierdurch kann TIRF-Mikroskopie bei variablem Winkel durchgeführt werden [Sto02]. Die Bestimmung des Eintrittswinkels erfolgte indirekt durch Bestimmung des Interferenzmusters mit der Webcam unter Verwendung des Abbildungsmaßstabes von Webcam und Objektebene des Objektivs wie folgt:

$$d_i = \frac{\lambda_0}{2 \cdot n_{Glas} \cdot \cos(\alpha_i)} \quad (6.4)$$

$$d_i = \frac{d_i^{Webcam}}{250 \cdot n_{Glas}} \quad (6.5)$$

$$\alpha_i = \arccos\left(\frac{250 \cdot \lambda_0}{2 \cdot d_i^{Webcam}}\right) \quad (6.6)$$

Die Gleichung 6.5 beschreibt die Periodenlänge eines Zweistahl-Interferenzmusters in Abhängigkeit von der Verkippung der beiden Strahlen zueinander. Gleichung 6.6 entspricht dem in die Objekteben des Objektivs abgebildeten Interferenzmuster der Webcam. In den obigen Formeln bezeichnet  $\lambda_0$  die verwendete Anregungswellenlänge im Vakuum, die Konstante 250 steht für den Abbildungsmaßstab von der Webcam zur Objektebene,  $d_i^{Webcam}$  ist die aus dem Webcam-Bild bestimmte Periodenlänge des Interferenzmusters und  $\alpha_i$  bezeichnet den Winkel zwischen der Grenzfläche und dem Strahl.

---

<sup>1</sup>engl.: phosphate buffered saline



Der Eintrittswinkel an der Grenzfläche ist dementsprechend  $90^\circ - \alpha_i$ .

Die Abbildung 6.20 zeigt die Intensitätsverteilungen entlang einer Linie für einen Lymphozytenkern bei verschiedenen Eintrittswinkeln. Hierbei wurden Winkel verwendet, die sowohl kleiner als der kritische Winkel für Totalreflexion sind, als auch Winkel, die über diesem Wert liegen.

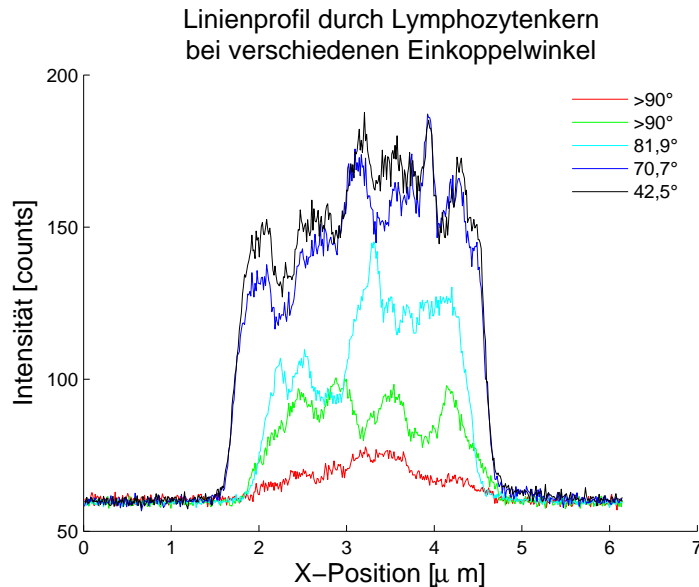


Abb. 6.20: Linienprofil entlang der X-Achse durch einen Lymphozytenkern für verschiedene Eintrittswinkel der Beleuchtung. Die Membran wurde mit DAPI angefärbt. Die Eintrittswinkel sind farblich kodiert dargestellt; in schwarz  $42,5^\circ$ , in blau  $70,7^\circ$ , in cyan  $81,9^\circ$  sowie in grün und rot zwei Winkel, bei denen der Realteil des Winkels bei  $90^\circ$  gelegen hat. Totalreflexion war bei Winkeln oberhalb von  $61^\circ$  zu erwarten. Die Integrationszeit betrug jeweils 100ms.

Der kritische Winkel für ein auf dem Deckglas präpariertes Objekt mit PBS als Einbettungsmedium beträgt etwa  $61^\circ$ . Das verwendete Objektiv mit  $\text{NA}=1,4$  kann maximal Winkel mit  $68^\circ$  übertragen. Aufgrund des Brechungsindex-Sprunges an der Grenzfläche werden die Strahlen vom Lot weggebrochen. Im Fall von Totalreflexion laufen diese gebrochenen Strahlen bei einem Einkoppelwinkel, der dem kritischen Winkel entspricht, entlang der Grenzfläche, weshalb sich ein Winkel von  $90^\circ$  zwischen diesen ergeben hat. Eine weitere Erhöhung des Einkoppelwinkels führt aufgrund der Totalreflexion zu einer Rückreflexion in das Deckglas und einer exponentiellen Abnahme der Intensität in Abhängigkeit zum Abstand von der Grenzfläche.

An diesen detektierten Intensitätsverteilungen, die jeweils bei 100ms Integrationszeit entstanden, ist deutlich das verringerte Anregungsvolumen für große Winkel zu erkennen, da in diesem Fall nur die Auflagefläche des markierten Zellkerns selbst, bei einer sehr geringen Höhe zur Fluoreszenz angeregt wurde. Bei flacheren Winkeln wird der



gesamte markierte Zellkern zur Fluoreszenz angeregt. In beiden Extremfällen war die Tiefenauflösung des Objektivs identisch bei etwa  $1\mu\text{m}$ . Aus der Verbreiterung der Intensitätsverteilungen bei flacheren Winkeln sowie dem steilen Anstieg der Intensitäten an den Flanken wird der Rand der Membran deutlich sichtbar. Ebenfalls ein Indiz für die Richtigkeit dieser Methode ist, daß sich bei flacheren Winkeln die Steigung der Flanken nicht mehr ändert, da bereits das gesamte detektierbare Volumen zur Fluoreszenz angeregt wurde.

## 6.8 Optische Schnitte an biologischen Präparaten

Die lateral strukturierte Beleuchtung kann nicht nur zur Erhöhung der optischen Auflösung in der lateralen Ebene genutzt werden, sondern bietet darüber hinaus die Möglichkeit optische Schnitte zu erzeugen.

Hierzu wurde ein grobes Interferenzmuster eingestellt und anschließend die Phase des Interferenzmusters mit dem Phasenpiezo in 10nm Schritten verschoben. Als Probe wurden Aktinfasern von Lymphozyten mit dem Farbstoff Alexa488 markiert, da deren Aktinskelet eine 3D-Struktur aufweist. Die Lymphozyten wurden am Deckglas anwachsen lassen, als Einbettungsmedium wurde Vectashield<sup>2</sup> HZ100 verwendet. Die folgenden Abbildungen zeigen oben links das gewöhnliche Epi-Fluoreszenzbild, daneben das aus dem gesamten Phasen-Datenstapel gemittelte Bild.

Die Methode der Mittelwertbildung zeigt gegenüber der reinen Epi-Fluoreszenzaufnahme, welche mit nur einem der beiden Interferometerarme entstanden ist, einen besseren Kontrast der fluoreszenten Aktinfasern zum Hintergrund der Probe. Der Hintergrund weist ebenfalls eine Eigenfluoreszenz auf. Dies ist auf das Einbettungsmedium zurückzuführen, da dies im Rahmen der Arbeit häufiger bei Vectashield beobachtet wurde. Eine Übliche Methode zur Erzeugung von optischen Schnitten ist, eine Maximumprojektion entlang der Phasenmodulation durchzuführen bzw. das Differenzbild aus Maximum minus dem Minimum entlang der Phasenmodulation zu bilden. Diese sind für die gleiche Bildposition in den Abbildungen rechts und links unten dargestellt. Die Linie markiert jeweils  $2\mu\text{m}$ . Aus dem Webcam-Signal wurde die Periodenlänge des Interferenzmusters auf  $1,7\mu\text{m}$  bestimmt.

Beim Vergleich dieser vier Bilder ist sehr deutlich die Kontrastverbesserung im Vergleich zu dem Epi-Fluoreszenzbild zu erkennen. Speziell die nichtmodulierenden Anteile außerhalb des Fokus werden mit den letzten beiden Methoden merklich unterdrückt. Eine Verbesserung der optischen Auflösung kann durch diese Methode jedoch nicht erreicht werden, da die Interferenzmuster zur Erzeugung von optischen Schnitten sehr grob sein müssen. Ebenfalls deutlich erkennbar sind die Signale der Phasenmodulation, obwohl die Integrationszeit nur 10ms pro Bild betragen hat. Eine Reduzierung der Intensität ist daher problemlos möglich. Somit steht diese Methode prinzipiell auch für in-vivo-Untersuchungen zur Verfügung, sofern die Messung sofort nach der Präparation erfolgt.

---

<sup>2</sup>Vectorlabs, Burlingame, CA

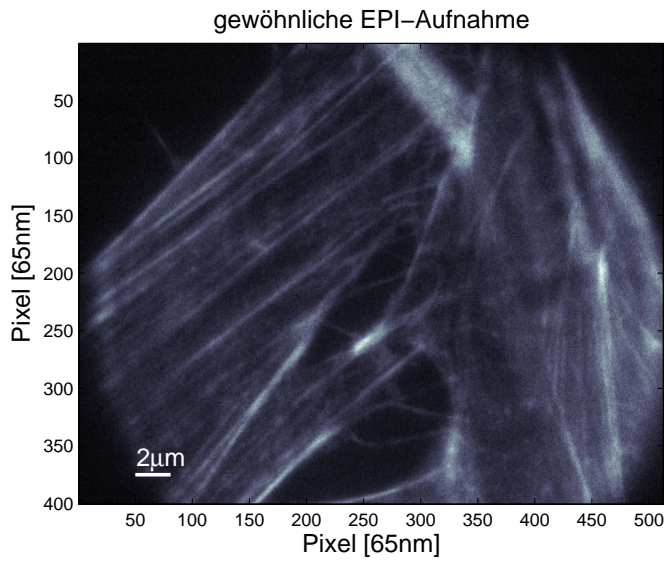


Abb. 6.21: Epi-Fluoreszenzaufnahme von Lymphozyten mit Alexa488 angefarbten Aktinfasern bei einer Anregung von 488nm. Die Integrationszeit der Aufnahme war 40ms.

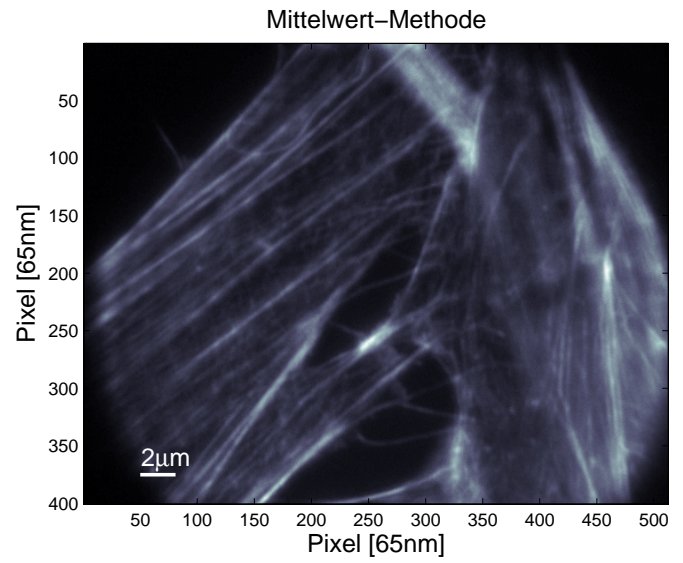


Abb. 6.22: Mittelwert der Fluoreszenzaufnahmen von Lymphozyten mit Alexa488 angefarbten Aktinfasern mit 488nm Anregung in 30 Phasenschritten mit 10nm Schrittweite und 10ms Integrationszeit.

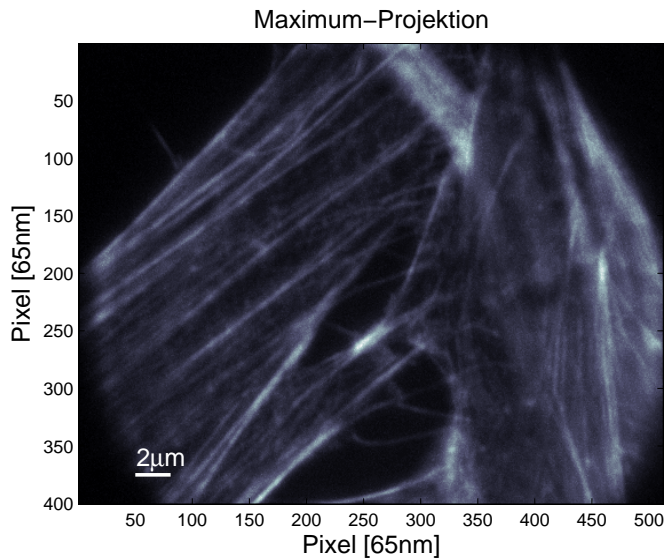


Abb. 6.23: Maximumsprojektion der obigen Fluoreszenzaufnahmen.

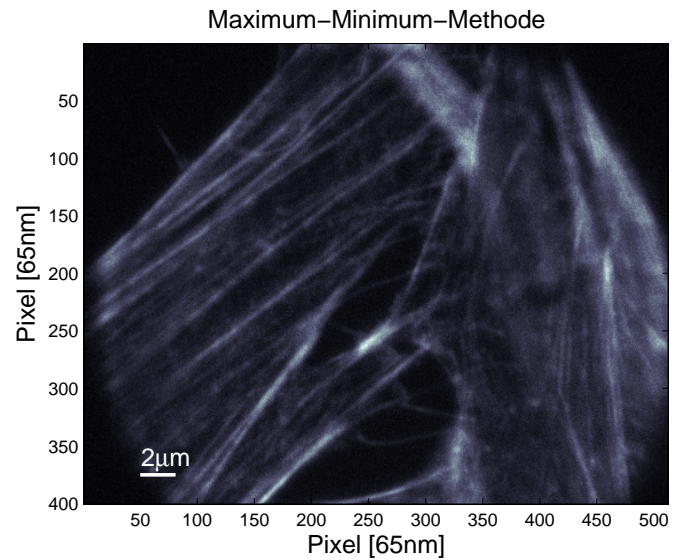


Abb. 6.24: Maximum-Minimum-Methode der obigen Fluoreszenzaufnahmen.

## 6.9 Auflösungsverbesserung in einer Richtung

Ein weiterer Vorteil der strukturierten Beleuchtung liegt in der Möglichkeit, die optische Auflösung zu erhöhen. Hierbei werden indirekt Frequenzkomponenten zugänglich gemacht, welche ohne die Strukturierung nicht erfasst werden können. Nachteilig an dieser Methode ist, daß das hochaufgelöste Bild erst mathematisch aus mindestens drei Einzelbildern berechnet werden muß.

Es wurden erste qualitative Messungen an Aktinfasern durchgeführt. Als Fluoreszenzfarbstoff wurde Alexa488, als Einbettungsmedium PBS verwendet. Die Periodenlänge der strukturierten Beleuchtung wurde mit 220nm sehr fein gewählt und parallel zur X-Achse ausgerichtet. Der Phasenziezo wurde pro Schritt um 10nm bewegt. Insgesamt wurden 40 Schritte zur Rekonstruktion verwendet. Die folgende Abbildung zeigt eine Epi-Fluoreszenzaufnahme der Aktinfasern. Die Rekonstruktion einer Phasenmessung für

Weitfeldbild von Alexa488 markierten Aktinfasern ohne strukturierter Beleuchtung

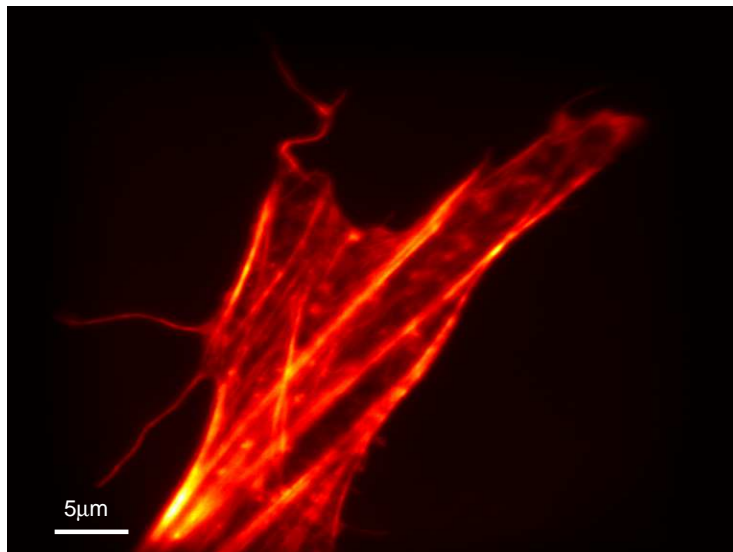


Abb. 6.25: Epi-Fluoreszenzaufnahme von Lymphozyten mit Alexa488 angefärbten Aktinfasern bei einer Anregungswellenlänge von 488nm und PBS als Einbettungsmedium.

die gleiche Zelle zeigt die verbesserte Auflösung entlang der Richtung der strukturierten Beleuchtung und ist in Abbildung 6.26 zu sehen. Das verbleibende Interferenzmuster im rekonstruierten Bild ist auf eine Rückreflexionen am Strahlteilerwürfel zurückzuführen.

Rekonstruktion von Alexa488 markierten  
Aktinfasern mit 1D strukturierter Beleuchtung

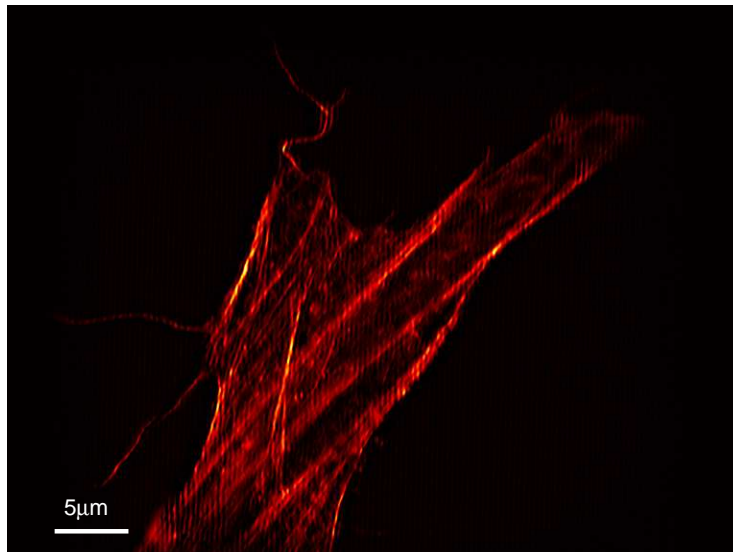


Abb. 6.26: Rekonstruktion der Fluoreszenzaufnahmen von Lymphozyten mit Alexa488 angefärbten Aktinfasern mit 488nm Anregung; 40 Phasenschritten zu je 10nm.

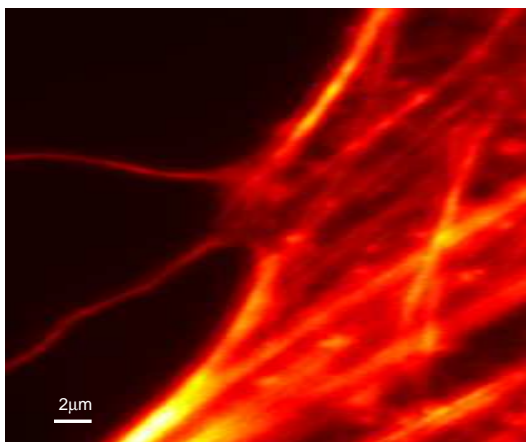


Abb. 6.27: Ausschnitt aus dem Epifluoreszenzbild.

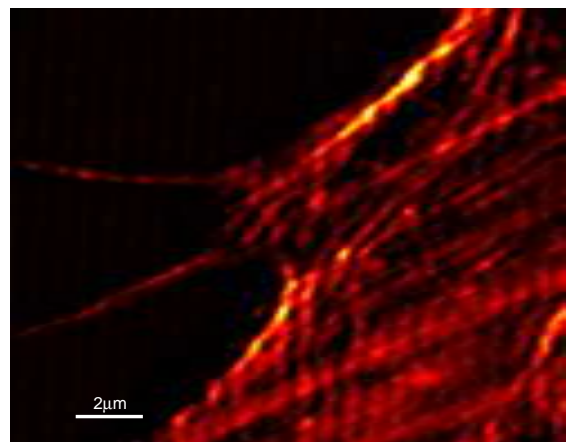


Abb. 6.28: Ausschnitt aus dem rekonstruierten Bild.

## 6.10 Auflösungsverbesserung in der lateralen Ebene

Analog zur Verbesserung der optischen Auflösung in einer Richtung kann diese auch in der ganzen lateralen Ebene erhöht werden. Hierzu muß das Objekt aus mindestens drei verschiedenen Winkeln ebenfalls mit mindestens 3 Phasenschritten beleuchtet werden. Bedingt durch die frei wählbare Größe sowie Ausrichtung des Wellenvektors durch Rotation und Verkippung des Strahlteilerwürfels am Interferometer unter gleichzeitiger Korrektur der Polarisation wurde die Auflösungsverbesserung an Aktinfasern mit PBS als einbettungsmedium getestet. In der Abbildung 6.29 ist das mit dem Aufbau aufgenommene Epifluoreszenzbild zu sehen.

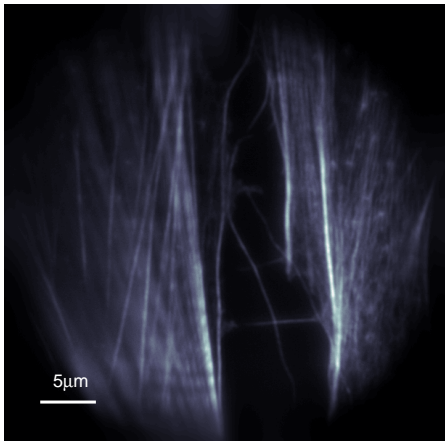


Abb. 6.29: Epifluoreszenzbild von Alexa488 markierten Aktinfasern in PBS am Interferometeraufbau

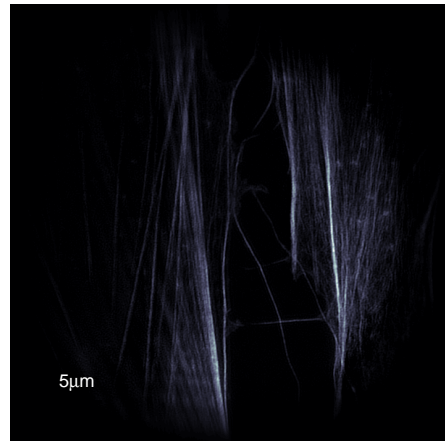


Abb. 6.30: Rekonstruktion von Aktinfasern mit einer 2D strukturierten Beleuchtung.

Zur Erhöhung der Auflösung wurde die Phasenmodulation nacheinander aus drei verschiedenen Richtungen durchgeführt. Die Orientierung der Wellenfront gegenüber der x-Achse war hierbei  $1^\circ$ ,  $62^\circ$  und  $86^\circ$ . Die Periodenlänge des Interferenzmusters lag bei etwa 360nm. Daneben ist die entsprechende 2D-Rekonstruktion der Daten zu sehen.

In Abbildung 6.31 ist ein Ausschnitt aus beiden Messungen für die rechte untere Bilddecke zur Verdeutlichung der Auflösungsverbesserung dargestellt. Entlang der roten und blauen Markierung wurde ein Linienprofil der Intensitätsverteilung für Abbildung 6.33 angefertigt. An den Linienprofilen sowie an den Bildausschnitten ist deutlich die Verbesserung der lateralen Auflösung zu erkennen. Die rote Kurve des Epifluoreszenzbild läßt eine Strukturinformation nur vermuten. Die blue Kurve der 2D-Rekonstruktion hingegen zeigt deutlich sechs Aktinfasern. Die Auflösungsverbesserung wurde aus diesen Daten mit dem Faktor 1,9 bestimmt. An dem Epifluoreszenzbild ist für eine Aktinfaser



eine Halbwertsbreite von  $350 \pm 15\text{nm}$ , am rekonstruierten Bild  $184 \pm 13\text{nm}$  abgelesen worden. Hierbei ist zu beachten, daß PBS als Einbettungsmedium verwendet wurde um die prinzipielle Eignung für *in vivo* Messungen in wässriger Umgebung zu demonstrieren.

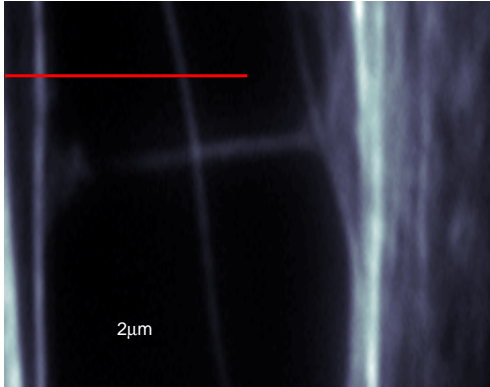


Abb. 6.31: Ausschnitt aus der rechten unteren Ecke des Epifluoreszenzbildes am Interferometeraufbau.

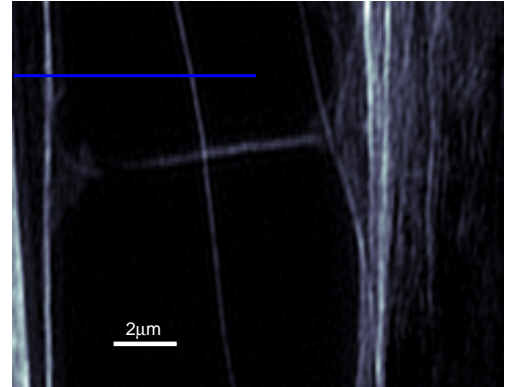


Abb. 6.32: Ausschnitt aus der rechten unteren Ecke der 2D-Rekonstruktion.

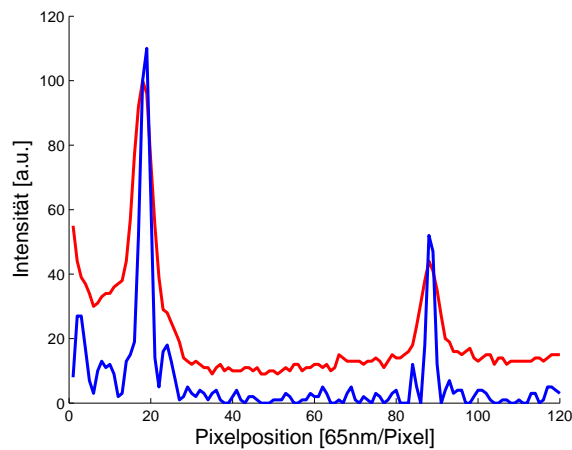


Abb. 6.33: Linienprofil entlang des Bildausschnitt für das EPI-Bild in rot sowie für die 2D-Rekonstruktion in blau.

# 7 Diskussion und Ausblick

Die Charakterisierung des durch Optimierungsphasen entstandenen Aufbaus bildet die Grundlage für alle weiteren Anwendungen des Geräts, so daß die Ergebnisse dieser Messungen mit deren Interpretation von besonderer Wichtigkeit sind.

## 7.0.0.1 Interferometereinheit

Das Grundprinzip des hier entwickelten Mikroskops besteht in der kollimierten Abbildung eines Interferenzmuster in die Objektebene eines Objektivs. Das Muster selbst wird mit einem Interferometer erzeugt, dessen beide Arme sowohl zueinander verdreht als auch verkippt werden können. Einer der beiden Arme kann zusätzlich in seiner Länge mit einem Piezo verändert werden. An diese drei Komponenten sind deshalb besondere Anforderungen bezüglich Stabilität, Auflösung und Wiederholgenauigkeit zu stellen, weshalb sie aufwendig vermessen wurden.

Die Kurven des Phasenpiezos bezüglich dem Regelverhalten zeigen deutlich den linearen Zusammenhang von der programmierten Soll-Ausdehnung und der detektierten Ist-Ausdehnung. Weiterhin ist an diesen Kurven deutlich erkennbar, daß die gewählten Einstellungen des Regelkreises bezüglich der Filterkurve, der Verstärkung sowie der Dämpfung des detektierten Signals sehr gut auf den verwendeten Spiegel und dessen Halterung eingestellt werden konnten. An den schnellen Positionswechseln im 10ms Intervall, das für die Kurve 6.2 benutzt wurde, sind nur geringfügige Regelschwingungen des Controller zu erkennen. Diese liegen deutlich unterhalb von 1nm pro 40nm Schritt, typischerweise bei etwa 0.5%, so daß auch kleine Werte für eine Phasenänderung sicher einstellbar sind. Auffällig an diesen Messungen ist, daß der Mittelwert der Abweichung bei  $-0,24\text{nm}$  anstatt bei 0nm liegt. Die Standardabweichung wurde mit  $0,13\text{nm}$  aus diesen Daten bestimmt. Diese negative Abweichung bedeutet, dass die Kalibration des Piezos bei einer niedrigeren Last durchgeführt wurde als er tatsächlich belastet wird. Dieser Wert wurde aus zahlreichen Tests gewählt, da er sich als ein akzeptabler Kompromiss aus Regelgeschwindigkeit und Regelschwingung herausgestellt hat. Ein negativer Wert bedeutet in diesem Fall, dass eine stärkere Dämpfung der Regelung erfolgt und daraus weniger starke Regelschwingungen auftreten. Diese Einstellung geht jedoch zu Lasten der Steilheit der Regelflanke, also der Geschwindigkeit selbst. Eine obere Grenze für die Geschwindigkeit ist nicht durch den Piezo sondern durch die verwendete Kamera gegeben, da die maximale Bildrate bei 12 Bilder pro Sekunde liegt und somit deutlich langsamer ist als die 10ms pro Phasenschritt.

Die Auswertung der Wiederholgenauigkeit hat innerhalb einer Stunde eine Abweichung

weit unterhalb von  $1\text{nm}$  im Vergleich zur ersten Messung gezeigt, so daß Mehrfachmessungen als unproblematisch hinsichtlich der Phasenmodulation einzustufen sind. Als maximale Nichtlinearität über den gesamten Verfahrbereich wurden vom Hersteller in der Grundkalibrierung  $13\text{nm}$  für den Piezofokussierer und  $54\text{nm}$  für den Phasenpiezo angegeben. Die Anpassung der Regelkreise sowie die Auswahl eines Arbeitsbereich innerhalb des Plateau zeigte eine signifikante Verbesserung dieser Daten. Daß der Piezofokussierer eine geringere Abweichung bei beinahe 14fach größerer Ausdehnung als der Phasenpiezo aufweist, ist auf dessen Feedback-Sensor zurückzuführen. Hierbei handelt es sich um einen kapazitiven Sensor, wohingegen der Phasenpiezo einen Dehnungsmessstreifen aufweist. Diese sind aufgrund ihrer Funktionsweise ungenauer als kapazitive Sensoren [pi08].

Die Untersuchung des Wellenvektors in Abhängigkeit von der Periodenlänge hat eine minimale Periodenlänge von  $220\text{nm}$  sowie einen maximalen Wert von  $900\text{nm}$  bei  $0,2^\circ$  Verdrehung ergeben. Mit diesem Wertebereich kann sowohl die laterale Auflösung verbessert werden als auch optische Schnitte von räumlich ausgedehnten Objekten angefertigt werden. Die entsprechende Auswertung des Phasenverlauf innerhalb des Gesichtsfelds hat zudem einen fast parallelen Verlauf der Wellenfront ergeben. Die Abweichung der Periodenlänge lag unterhalb von  $2\%$  für 81 ausgewertete Beads innerhalb einer  $900\mu\text{m}^2$  großen Fläche. Da jedes Bead selbst einen Schwankung des Durchmesser von bis zu  $5\%$  aufweisen kann, deuten diese Ergebnisse auf eine richtige Justage des Interferometers samt Einfokussierlinse. Ebenfalls in guter Übereinstimmung zu den Simulationen ist die Auswertung der Phasenverschiebung aufgrund der Rotation des Strahlteilerwürfels ausgefallen. Hierbei zeigte sich erneut die Notwendigkeit zur Simulation eines derartigen Aufbaus, da nur zusammen mit diesen Daten ein Aufbau effektiv optimiert werden kann.

### 7.0.0.2 Abbildungsmaßstab zwischen den Kameras sowie zwischen den Kameras und der Objektebene

Die Bestimmung des Abbildungsmaßstabs von Objektiv und Tubuslinse auf den CCD-Chip ist notwendig, um die entsprechende Pixelgröße im Objektraum zu kennen. Mit dem Objektmikrometer konnte ein Abbildungsmaßstab von  $99,9 \pm 0,6$  bestimmt werden. Eine fehlerhaft positionierte Tubuslinse würde eine deutliche Abweichung von dem theoretisch zu erwartenden Faktor 100 verursachen, da der Fokuspunkt je nach Dejustage vor oder nach dem CCD-Chip liegen würde. Aus der Durchlichtaufnahme ist ebenfalls erkennbar, daß die Tubuslinse sehr gut zu der optischen Achse des Objektivs ausgerichtet ist, da ein seitlicher Versatz eine Verzerrung im Gesichtsfeld sowie ein unscharfes Bild bei Betrachtung des gesamten Gesichtsfelds verursacht.

Ebenfalls neu in dieser Arbeit ist die Idee, das Interferenzmuster mit einer zusätzlichen Kamera in kollimierter Form bereits vor der Einfokussierung in das Objektiv zu detektieren. Hierbei bildet die Einfokussierlinse zusammen mit dem Objektiv einen Kollimator. Mit dem aus den Messungen bekanntem Abbildungsmaßstab von CCD-Kamera und Objektiv wurde mit einem im Fokus befindlichen verspiegelten Objektträger ein



---

grobes Interferenzmuster sowohl mit der Webcam als auch mit der CCD-Kamera detektiert. Die Auswertung hat zwischen der Webcam und der Objektebene einen Faktor von  $250,2 \pm 16,2$  ergeben und stimmt innerhalb des Fehlers eindeutig mit dem theoretischen Wert von 250 überein. Auffällig ist der relativ große Fehler von 16,2. Zum Einen weisen die Ränder des Interferenzmusters kein Rechteckprofil auf, das eine eindeutige Unterscheidung von Signal und Hintergrund liefern würde, zum Anderen wurde das Muster um etwa  $30^\circ$  verkippt, wodurch eine weitere Fehlerquelle entsteht. Die Verkipfung ermöglichte es jedoch, die Orientierung der beiden Kamerabilder zueinander zu bestimmen. Weiterhin ist zu bedenken, dass der Abstand zwischen Objektiv und Einfokussierlinse keinen konstanten Wert aufweist sondern je nach Ausdehnung des Piezofokussierers um bis zu 0,1mm variieren kann. Damit die Kollimation nur geringfügig durch die Fokussierung beeinträchtigt wird, wurde eine langbrennweitige Einfokussierlinse mit 500mm Brennweite verwendet. Bei dieser Brennweite ist eine Veränderung um 0,1mm vernachlässigbar gering, da die Strahlaufweitung aufgrund des Divergenzwinkels vor dem Kollimator sich in der gleichen Größenordnung befindet, wie auch der Fehler in der Kollimation bei maximal 0,1mm Änderung des Linsenabstandes zueinander.

### **7.0.0.3 Optische Schnitte**

Optische Schnitte sind immer dann hilfreich, wenn Objekte mit einer räumlichen Ausdehnung, die größer ist, als die axiale Auflösung des Objektivs, kontrastreich dargestellt werden sollen. An den mit Alexa488 markierten Aktinfasern wurde eine Phasenmessung mit einem groben Interferenzmuster durchgeführt. Neben dem Epifluoreszenzbild wurden drei verschiedene Methoden zur Schnittbildung angewandt, um diese untereinander vergleichen zu können. Hierbei zeigen sich in der Bildmitte klare Unterschiede zwischen dem gewöhnlichen Epifluoreszenzbild und den drei verwendeten Algorithmen. Der Kontrast wurde verbessert. An der Maximum-Minimum-Methode ist die Unterdrückung des nichtmodulierenden Fluoreszenzlichts an den dichteren Stellen im Bild erkennbar. Die Auflösung kann mit dieser Methode nicht verbessert werden, da aufgrund der notwendigen groben Interferenzstruktur keine weiteren Frequenzkomponenten zugänglich werden. Die hier verwendeten Algorithmen verwenden jeweils die gesamte detektierte Bildfläche zur Berechnung des optischen Schnitts. Dies ist nicht ideal, da an den gezeigten Messungen etwa 30% der Bildfläche nur aus Hintergrund bestanden. Eine Optimierung der Software auf den reinen Signalbereich innerhalb des Bildes sollte deutlicher die Auswirkungen der strukturierten Beleuchtung bei der Bildung eines optischen Schnittes zeigen.

### **7.0.0.4 Erhöhung der lateralen Auflösung**

Ebenfalls an Aktinfasern konnte eine Steigerung der optischen Auflösung entlang einer Richtung gezeigt werden. An den rekonstruierten Daten mit strukturierter Beleuchtung in einer Richtung sind jedoch Muster aufgetreten, die im Epifluoreszenzbild nicht zu sehen gewesen sind. Für dieses Muster gibt es mehrere Gründe. Zum Einen muß sowohl

die Phasenlage als auch Betrag und Richtung des Wellenvektor der stehenden Welle im Objektraum für die Rekonstruktion sehr genau bekannt sein, zum Anderen weisen alle optischen Komponenten immer eine gewisse Reflexion auf, die ebenfalls Interferenz erzeugen kann, welche zusätzlich zum Beleuchtungsmuster auftritt. Hierbei ist die Antireflexbeschichtung des Strahlteilers im Interferometer besonders kritisch zu bewerten. Jeder Reflex an dieser Stelle wirkt sich bis in die Objektebene aus. Aufgrund der Symmetrie des Aufbau gibt es keine Vorzugsrichtung für den Einsatz der strukturierten Beleuchtung zur Erhöhung der lateralen Auflösung, so daß eine Serie von Aufnahmen unter verschiedenen Drehwinkeln eine Verbesserung in der ganzen Ebene erzeugen würde. An Aktinfasern konnte ebenfalls eine Erhöhung der optischen Auflösung in der gesamten lateralen Ebene gezeigt werden. Hierbei ist sehr deutlich der Unterschied zwischen einer Messung ohne strukturierter Beleuchtung und dem aus drei verschiedenen Richtungen strukturiert beleuchteten, rekonstruierten Bild zu sehen. Hiermit konnte das Funktionsprinzip des Aufbaus zur Erzeugung von lateralen stehenden ebenen Wellen bei gleichzeitig freier Orientierung innerhalb der lateralen Ebene gezeigt werden.

### 7.0.0.5 Totalreflexion

Die ersten Messungen zur Fluoreszenzanregung mit evaneszenten Wellen an der Zellmembran zeigen deutlich die Eignung des Aufbaus für diese spezielle Anregungstechnik. Trotz des für TIRF ungünstigen Objektivs konnten Experimente bei verschiedenen Eintrittswinkel durchgeführt werden. An den Linienprofilen der Intensitätsverteilungen ist die Zunahme des zur Fluoreszenz angeregten Volumen bei Abnahme des Winkel eindeutig erkennbar. Ebenfalls deutlich ist der Bereich unterhalb des kritischen Winkel zu erkennen, da die Flankensteilheit der Linienprofile nicht weiter zunimmt. Dies ist ein Hinweis dafür, dass bereits die maximale Ausdehnung der Membran innerhalb des zugänglichen Fokusbereichs des Objektivs angeregt wurde. Im Fall von TIRF ist dieser Wert nur etwa 10..20% gewesen, wie an den Kurven zu erkennen ist.

Weiterhin hat sich die Verwendung des Webcam-Bildes zur Bestimmung der Strahlwinkel, speziell bei TIRF, als sehr hilfreich erwiesen. Dieser theoretische Wert kann jedoch unter bestimmten Bedingungen vom tatsächlichen Wert der Strahlverkipfung abweichen. Solche Bedingungen liegen etwa vor, wenn die Grenzfläche des Deckglases nicht vom Einbettungsmedium sondern großflächig von der Probe bedeckt wird. Hierbei treten Abweichungen des Brechungsindex auf, die mit dieser Methode nicht erfasst werden können.

### 7.0.0.6 Mikrofluoreszenzkoordinator

Die Optimierung des Mikrofluoreszenzkoordinator hinsichtlich der mechanischen Stabilität sowie den geforderten Eigenschaften ist derart positiv verlaufen, daß für dieses System eine Patentanmeldung erfolgt ist. Es konnte ein System entwickelt werden, daß sämtlichen in der Arbeitsgruppe verwendeten Fixierungsschritten von Zellen standhalten

---

konnte. Selbst extreme thermische Belastungen mit flüssigem Stickstoff konnten die aufgesputterte Schutzschicht nicht beschädigen. Die  $SiO_2$ -Oberfläche scheint sich darüber hinaus nicht negativ auf das Anwachsverhalten von Zellen auszuwirken, wie speziell an den Fibroblasten zu sehen gewesen ist. Aus den AFM-Messungen konnte die geplante Schichtdicke von ca. 500nm bestätigt werden. Ebenfalls positiv sind an diesen Messungen die steil ausgeprägten Flanken am Rand der Lackstruktur aufgefallen. Die Oberfläche hat eine nur minimale Krümmung von etwa 100nm auf eine Länge von  $10\mu m$  gezeigt, was einem Keilwinkel von  $0,6^\circ$  entspricht. Die Fehler in der Positionsbestimmung konnten für die gesamte nutzbare Fläche von 15mm Kantenlänge bei einer ungünstigen Wahl des Referenzpunktes auf einen Wert kleiner als  $100\mu m$  angegeben werden. Hierbei sind bereits  $10\mu m$  Ablesefehler des Anwenders eingegangen.

### 7.0.0.7 Ausblick

Ausgehend von den ersten experimentellen Daten des Interferometeraufbaus bieten sich eine Optimierung sowie Fortsetzung der Untersuchungen im Rahmen weitere Arbeiten an.

Ein sehr interessanter Punkt bildet hierbei die Größenbestimmung von Objekten unter Verwendung des Modulationskontrast. Ein mögliches Einsatzgebiet dieser Methode stellt die Größenbestimmung von Genregionen in Abhängigkeit der Zellzyklusphase bzw. zwischen dem aktiven und inaktiven Zustand dar, welche zuvor mit einem fluoreszenten Farbstoff markiert wurden.

Eine weitere Anwendung ist in der Totalreflexion mit stehenden evaneszenten Wellen zu sehen. Hierbei kann die laterale Auflösung um den Faktor zwei gesteigert werden. Der Einsatz eines jetzt kommerziell erhältlichen Objektivs mit NA1.46 anstatt des verwendeten NA1.40 würde den nutzbaren Winkelbereich von  $67^\circ$  auf  $74^\circ$  erhöhen. Dies bedeutet zum Einen eine Steigerung der Sensitivität, da ein größeres Raumwinkelement detektiert werden kann, zum Anderen kann der notwendige TIRF-Winkel auch bei Proben eingestellt werden, die einen höheren Brechungsindex als Wasser mit 1,33 aufweisen. Dies ist besonders an der Kontaktfläche von Zelle und Deckglas kritisch, da an dieser Stelle nur eine wenige nm dünne Schicht des Einbettungsmedium vorhanden ist.

Die Reduzierung der Halbwertsbreite bei der Punktbildfunktion kann zur Erhöhung der Lokalisationsgenauigkeit genutzt werden. Ein Ansatz für eine Fortsetzung der Arbeit ist die Verwendung von photoaktivierbaren Farbstoffen bei gleichzeitiger Nutzung der strukturierten Beleuchtung. Neben der lateralen Positionsgenauigkeit kann auch die axiale Positionsgenauigkeit erhöht werden, indem die elliptische Verzerrung der Punktbildfunktion ausgewertet wird. Ein denkbarer Messablauf wäre die gleichzeitige Nutzung des Piezofokussierer und des Phasenpiezo, wie dies bereits in der Steuersoftware vorgesehen ist, wodurch für jede z-Position eine Phasenmessung durchgeführt werden kann. Die Aktivierung des Farbstoff ist mit dem UV-Laser denkbar. Aufgrund der Möglichkeit diese auch strukturiert zu gestalten, kann die optische Isolation ebenfalls verstärkt wer-

den.

Eine vierte Möglichkeit ist die Erweiterung der Detektionseinheit um eine *invivo*-Kammer, so daß Messungen an lebenden Zellen über einen längeren Zeitraum möglich sind.

Weitere offene Fragen sind im Bereich Software zu finden. Die hier verwendeten Algorithmen sind zur Demonstration der prinzipiellen Eignung des Aufbau geschrieben worden und bieten sehr viele Möglichkeiten der Optimierung, sowohl von der Laufzeit als auch von der Güte der rekonstruierten Daten.

## 8 Zusammenfassung

Diese Arbeit gliedert sich in drei Schwerpunktthemen, welche an dieser Stelle nochmals kurz zusammengefaßt werden sollen.

Es wurde drei verschiedene Mikroskope zur Erzeugung einer in der lateralen Ebene frei drehbaren strukturierten Beleuchtung zur Erhöhung der lateralen Auflösung entwickelt und deren Systemeigenschaften untersucht. Der erste Aufbau war ein Interferometeraufbau mit fester Verkipfung der beiden Strahlen zueinander, die an der Basisfläche eines Prismas konstruktiv interferieren. Der gesamte Aufbau samt Interferometer war horizontal drehbar, so daß das Beleuchtungsmuster relativ zur Probe gedreht werden konnte, welche jedoch in optischen Kontakt zum Prisma stehen mußte. Der zweite Aufbau sollte den Nachteil von drehbaren Komponenten an der Probe nicht aufweisen. Zudem sollte die Anregung und Detektion des Fluoreszenzlicht aus der gleichen Richtung erfolgen. Hierzu wurden zwei kohärente Laserstrahlen mit einem Winkelversatz in die hintere Fokusebene eines Objektiv eingekoppelt, so daß diese kollimiert aus dem Objektiv austreten und interferieren können. Zur Drehung des Interferenzmuster wurden beide Strahlen mit einem Dove-Prisma zwischen Einfokussierlinse und Objektiv um jeweils den doppelten Drehwinkel des Prisma gedreht. Hiermit konnten die Nachteile des ersten Aufbau behoben werden. Letzlich entstand als dritte Variante ein invers angeordnetes Fluoreszenzmikroskop, das ein Interferenzmuster aus zwei kohärenten Laserstrahlen mit frei definierbarer Periodenlänge und Polarisation in der Objektebene aufweist. Der Inverse Aufbau erlaubt es im Gegensatz zu dem zweiten Aufbau kurzzeitig Untersuchungen an lebenden Zellen durchzuführen. Das Interferenzmuster kann erneut frei in der Objektebene gedreht werden, ohne dabei die Probe selbst oder aber irgend eine Komponente, die in mechanischen Kontakt zur Probe steht, bewegen zu müssen. Eine Driftbewegung der Probe aufgrund einer Änderung des Beleuchtungsmuster bzw. dessen Richtung kann mit diesem Aufbau ausgeschlossen werden. Die Phasen des Interferenzmuster kann, wie in dieser Arbeit gezeigt wurde, innerhalb der Genauigkeit des Piezocontroller reproduzierbar eingestellt werden. Die frei einstellbare Periodenlänge des Interferenzmuster erlaubt es zusammen mit der präzisen Phasenmodulation sowohl optische Schnitte zur Verbesserung der Tiefendiskriminierung der Probe zu erzeugen, als auch die laterale Auflösung in 1D bzw. 2D um bis zum Faktor zwei gegenüber dem klassischen Abbe-Limit zu verbessern. Weiterhin können mit diesem Aufbau bei geeigneter Probenpräparation Experimente auf Basis von Totalreflexions-Fluoreszenzmikroskopie mit und ohne ebenen stehenden Wellen (SW-TIRF) durchgeführt werden, was besonders für Untersuchungen an der Zellmembran geeignet ist. Desweiteren stehen vier verschiedene Laserliniene (404nm, 488nm, 568nm und 633nm) simultan zur Verfügung, womit Mehrfarbenmessungen möglich sind,

wie sie häufig in der Biologie Anwendung finden. Hierzu wurde der chromatische Fehler der Detektion in ersten Messungen quantifiziert und wurde auf weniger als 50nm innerhalb einer  $(9 \times 9) \mu\text{m}$ -Region bestimmt. Dieser dritte Aufbau ist meinem Wissen nach das einzigste Mikroskop weltweit, das multispektral SW-TIRF-Messungen in der ganzen lateralen Ebene bei beliebigen TIRF-Winkeln erlaubt. Das allgemein bekannte Problem zur Bestimmung von Betrag und Richtung des Wellenvektors der stehenden Welle wurde derart gelöst, daß direkt am Interferometer das Interferenzmuster mit einer Webcam detektiert und bestimmt wurde. Zusätzlich zur strukturierten Beleuchtung kann gleichzeitig ein UV-Mikrostrahl auf die Probe gerichtet werden, um gezielte Strukturschäden an Zellen zu verursachen und die Reparaturmechanismen zu untersuchen bzw. Erholungsmechanismen der Fluorophore beobachtet werden.

Der zweite Schwerpunkt der Arbeit befasste sich mit der Entwicklung von Auswertesoftware sowie der Simulationen der entwickelten Mikroskope. Hierbei wurde der gesamte Aufbau bzw. alle Varianten der in dieser Arbeit entstandenen Aufbauten als 3D-Modell mathematisch beschrieben und deren Strahlengang simuliert. Diese Daten dienten als Ausgangspunkt zur verbesserten Positionierung der optischen Komponenten der Aufbauten sowie zur Verifizierung und Interpretation der späteren Messdaten. Weiterhin konnten potentielle Fehlerquellen schon vor der praktischen Realisierung erkannt und soweit dies technisch möglich gewesen ist, behoben werden. Neben der Simulation der Aufbauten wurden mehrere Softwareprogramme zur virtuellen Mikroskopie geschrieben. Diese nutzt Modelle und Systemparameter zur Simulation von Messungen. Diese virtuelle Mikroskopie ist notwendig, um die ebenfalls im Rahmen dieser Arbeit geschriebenen Algorithmen zur Auswertung der verschiedenen Messdaten auf deren Richtigkeit prüfen zu können. Der dritte Softwarebereich beschäftigte sich mit der Erweiterung und Anpassung einer in Heidelberg etablierten Ansteuerungssoftware für die dort eingesetzten Mikroskope an die Hardware des jeweiligen Aufbau.

Der dritte Schwerpunkt in dieser Arbeit stellte die Weiterentwicklung und Optimierung eines Systems zur Relokalisation von Objekten in der Mikroskopie, speziell der Fluoreszenzmikroskopie, dar. Dieses erlaubt nun ein präzises, schnelles sowie automatisierungsfähiges Wiederauffinden von Objekten einer Probe an verschiedenen Mikroskopen, unabhängig ob es sich um reine Fluoreszenzmikroskope, Aufsicht-, Durchlicht- oder Phasenkontrastmikroskope handelt. Der Fehler in dieser Methode konnte auf etwa  $10 \mu\text{m}$  reduziert werden, was in etwa der Größe eines humanen Zellkerns entspricht. Es wurden Experimente zu verschiedenen Fixierungsmethoden von Zellen mit diesem System unternommen. Hierbei konnte dessen Robustheit gegen Alkohole, Lösungsmittel und gängige Säuren gezeigt werden. Weiterhin wurde die hohe mechanische Belastbarkeit bei Anwendungen mit Flüssigstickstoff gezeigt. Die erfolgreiche Anwendung dieses System im Zusammenhang mit verschiedenen Zelltypen und verschiedenen Fluoreszenzfarbstoffen bestätigt die uneingeschränkte Eignung dieses System für biologische Experimente, bei denen eine Relokalisation des gleichen Objekt notwendig ist.

# Abbildungsverzeichnis

2.1	Strahlengang durch eine dünne Linse . . . . .	9
2.2	Laterale Intensitätsverteilung bei der Gauß-Optik . . . . .	9
2.3	Wellenfrontverlauf in der Gauß-Optik . . . . .	10
2.4	Brechungsgesetz von Snell . . . . .	11
2.5	Eindringtiefe der evaneszenten Welle . . . . .	15
2.6	Jablonski-Energieschema eines Farbstoffmoleküls . . . . .	16
2.7	Auflösungskriterium nach Rayleigh . . . . .	18
2.8	Simulation einer lat. Weitfeld-PSF . . . . .	19
2.9	Intensitätsverteilung entlang der x-Achse durch das Maximum . . . . .	19
2.10	Zusammenhang zwischen lateraler Auflösung und NA . . . . .	20
2.11	Simulation einer 3D Weitfeld-OTF . . . . .	21
2.12	Schnitt durch den simulierten OTF-Donut . . . . .	21
2.13	Lokalisationsgenauigkeit vs. Photonenzahl . . . . .	23
2.14	Schematischer Aufbau eines Achromaten . . . . .	26
2.15	Schematischer Aufbau eines CMOS-Sensors . . . . .	27
2.16	Schematischer Aufbau eines CCD-Sensors . . . . .	28
2.17	Schematischer Aufbau eines EMCCD-Sensors . . . . .	28
2.18	konventionelle Mikroskop-Detektion vs. Radio-Empfang . . . . .	30
2.19	Prinzip der Auflösungsverbesserung . . . . .	32
3.1	Photo des drehbaren Prismen-Aufbaus . . . . .	37
3.2	2D SW-TIRF Dove-Prisma-Aufbau . . . . .	39
3.3	Simulierter Strahlverlauf bei Rotation des Prismas . . . . .	40
3.4	Simulierter Strahlverlauf in der xy-Ebene . . . . .	40
3.5	Strahlaufbereitung des Interferometer-Aufbaus . . . . .	42
3.6	Photo des Interferometers . . . . .	43
3.7	Photo der Detektionseinheit . . . . .	44
3.8	Skizze der Detektionseinheit . . . . .	44
3.9	Schematischer Aufbau der lateral strukturierten Beleuchtung für 2D . . . . .	46
4.1	Skizze zur Drehung der Koordinatensysteme . . . . .	51
4.2	Skizze zur Bestimmung des Drehwinkels $\varphi$ . . . . .	52
4.3	Verlauf des Positionsfehler mit dem MFK . . . . .	53
4.4	Konfokale Aufnahme der Deckglasstruktur . . . . .	54
4.5	AFM-Messung der Lackdicke . . . . .	55



---

4.6	AFM-Messung der Strukturbreite . . . . .	56
4.7	Fibroblasten auf dem MFK-Deckglas . . . . .	57
4.8	Lymphozyten auf dem MFK-Deckglas . . . . .	57
4.9	Aktinfasern auf dem MFK-Deckglas (EPI) . . . . .	58
4.10	Aktinfasern auf dem MFK-Deckglas (Aufbau) . . . . .	58
5.1	Strahlgeometrie und Intensität beim Prisma-Aufbau . . . . .	60
5.2	3D-Simulation zum Strahlengang des Dove-Prisma-Aufbau . . . . .	61
5.3	3D-Simulation des Interferometer . . . . .	62
5.4	Simulation des Phasenvektorverlaufs bei Rotation . . . . .	62
5.5	Simulation des Modulationskontrasts für sphärische Objekte . . . . .	63
5.6	Objekt für die Simulation, Voxelgröße 27nm . . . . .	64
5.7	Das mit einer $\cos^2$ -Funktion angeregte Objekt . . . . .	64
5.8	Gemitteltetes detektiertes Weitfeld-Bild für NA=1.2 . . . . .	64
5.9	Gemitteltetes detektiertes Weitfeld-Bild für NA=1.2 . . . . .	66
5.10	Das rekonstruierte Bild nach Wiener-Filterung . . . . .	66
5.11	Intensitätsverteilung entlang der x-Achse . . . . .	66
6.1	Sollwert vs. Feedback-Wert des Phasenpiezos . . . . .	68
6.2	Abweichung des Phasenpiezos von Sollwert . . . . .	68
6.3	Wiederholgenauigkeit einer Phasenmessung . . . . .	69
6.4	Genauigkeit des Phasenpiezos über $7\mu m$ . . . . .	69
6.5	Sollwert vs. Feedback-Wert des Piezofokussierers . . . . .	70
6.6	Abweichung des Piezofokussierers . . . . .	70
6.7	Durchlicht-Aufnahme des Objektmikrometers . . . . .	71
6.8	Linienprofil entlang einer Achse des Objektmikrometers . . . . .	71
6.9	Aufnahme des Interferenzmusters mit der PCO-Kamera . . . . .	72
6.10	Aufnahme des Interferenzmusters mit der WebCam . . . . .	72
6.11	Wellenfrontvergleich zwischen Webcam und PCO-Kamera . . . . .	73
6.12	Linearitätsverhalten von der WebCam zur PCO-Kamera . . . . .	73
6.13	UV-Mikrostrahl auf Textmarkerschicht . . . . .	74
6.14	Linienprofil entlang der mikrobestrahlten Fläche . . . . .	74
6.15	Verzerrung der Wellenfront im Objektraum . . . . .	76
6.16	Variation der Phasenlage im Gesichtsfeld . . . . .	76
6.17	Phasenmodulation für verschiedene Wellenvektoren . . . . .	77
6.18	Spektrale Verschiebung in x-Richtung . . . . .	78
6.19	Spektrale Verschiebung in y-Richtung . . . . .	78
6.20	Intensitätsverteilung bei versch. Eintrittswinkel . . . . .	80
6.21	Epi-Aufnahme von Aktinfasern . . . . .	82
6.22	Optischer Schnitt mit Mittelwert-Methode . . . . .	82
6.23	Optischer Schnitt mit Maximumsprojektion . . . . .	82
6.24	Optischer Schnitt mit Max-Min-Methode . . . . .	82



6.25 Epi-Aufnahme der Aktinfasern . . . . .	83
6.26 Rekonstruktion der strukturierten Aktinfaser-Messung . . . . .	84
6.27 Ausschnitt aus dem Epifluoreszenzbild. . . . .	84
6.28 Ausschnitt aus dem rekonstruierten Bild. . . . .	84
6.29 Aktinfasern am Interferometeraufbau (EPI) . . . . .	85
6.30 2D-Rekonstruktion der Aktinfasern . . . . .	85
6.31 Epi-Bildausschnitt des Interferometeraufbau . . . . .	86
6.32 Ausschnitt aus der 2D-Rekonstruktion . . . . .	86
6.33 Linienprofil entlang des Bildausschnitt . . . . .	86



# A Teileliste

- Gemeinsame Komponenten aller Aufbauten

488nm Laser	Spectra Physics Typ 2065-6S incl. Z-Lok und J-Lok
Spiegel	Linos Typ G340346000, Al-Planspiegel 25,4mm
Spiegelhalter	Newport Typ U50-P
Objektiv	Leica Typ PL APO 100x NA1.40-0.70 OIL CS
Tubuslinse	Leica Typ 020-515.075-020, 1fach
CCD-Kamera	PCO Imaging Typ SensiCam QE
Phasenpiezo	Physik Instrumente Typ P770.10
Controller zum Phasenpiezo	Physik Instrumente Typ E662CR
Piezo-Fokussierer	Physik Instrumente Typ P725.1CD
Controller zum Piezo-Fokussierer	Physik Instrumente Typ E662CR
$\lambda/2$ -Platte	Melles Griot Typ 02WRC039-488

- Spezielle Komponenten der Prisma-Einkopplung

Prisma	Linos Typ G336612000
Dichroit (Einkopplung)	AHF-Analysetechnik Typ Z488RDC
Dichroit (Sperrfilter)	AHF-Analysetechnik Typ HQ500LP
Strahlteilerwürfel	Linos Typ G335520000
Drehtisch für den Aufbau	Newport Typ PR50CC
3-Achsen-Controller	Newport Typ ESP300

- Spezielle Komponenten des Dove-Prisma-Aufbau

Dove-Prisma	Melles Griot 01PDE005 , 20x28x84mm BK7
Strahlteilerwürfel (Interferometer)	Linos Typ G335520000
Strahlteilerwürfel	Linos Typ G335520000
Dichroit (488nm Einkopplung)	AHF-Analysetechnik Typ Z488RDC
Dichroit (Detektions-Sperrfilter)	AHF-Analysetechnik Typ HQ500LP
Einfokussierlinse	Spindler & Hoyer, f=500mm, d=40mm

- Spezielle Komponenten des Interferometeraufbau

Objektiv-Verschiebetisch	Newport Typ M-462
Mikroskopie-Kreuztisch	Märzhäuser Wetzlar EK32
Kreuztisch-Controller	MultiControl 2000
Dichroit 488nm/568/647nm Einkopplung	AHF-Analysetechnik Typ F63-488
Dichroit Detektions-Sperrfilter	AHF-Analysetechnik Typ F62-568
Einfokussierlinse	Spindler & Hoyer, f=500mm, d=40mm
Drehtisch für $\lambda/2$ -Platte	Newport Typ PR50CC
Strahlteilerwürfel (Webcam)	Edmund Optics Typ 004657
Halter zum Strahlteiler	Newport Typ M-PO32N
Webcam	Typhoon STV0673
Strahlteilerwürfel (Interferometer)	Linos Typ G335520000
Halter zum Strahlteilerwürfel	Newport Typ U100-P
Drehtisch zum Strahlteilerwürfel	Newport Typ SR50CC
Linearantrieb zum Strahlteilerwürfel	Newport Typ CMA-12CCCL
3-Achsen-Controller	Newport Typ ESP300
Verschiebetisch zum Strahlteilerwürfel	Newport Typ M-UMR8.25
Linse f=10mm	Linos Typ G052004000, Achromat, d=16mm
Reduzierring 25/16mm	Linos Typ G050309000
Lochblende $10\mu m$	Linos Typ G040150000
Zentrieraufnahmeplatte für Lochblende	Linos Typ G061025000
Linse f=80mm	Linos Typ G063128000, Achromat, d=25mm
Mikrobankhalter für das Filter	Linos Typ G065061000, d=25mm
Dichroit 404nm Einkopplung	AHF-Analysetechnik Typ Z405RDC
Dichroit 568nm Einkopplung	AHF-Analysetechnik Typ Z568RDC
Dichroit 488/633nm Beamcombiner	AHF-Analysentechnik Typ F33-488
Strahlteilerwürfel (UV-Mikrostrahl)	Linos Typ G335520000
404nm Laser	CrystalLaser Typ BCL-450-405
568nm Laser	Lexel Laser Typ 95L
633nm Laser	Melles Griot Typ 05-LHR-551-64

# B Protokoll zum Mikrofluoreszenz-Deckglas

Die Belackung der MFK-Deckgläser wurde mittels AZ1505-Photolack® (MicroChem) entsprechend den Angaben des Herstellers durchgeführt. Als Deckglas werden handelsübliche Mikroskopiedeckgläser aus N-BK7 verwendet.

Protokoll:

Reinigung des Deckglases:

- Deckglas 10 min. in HCl + Isopropanol + Millipore Wasser (1:1:1) legen
- mit Millipore Wasser abspülen
- Wasser mit gasförmigen Stickstoff abspülen

Belacken, Belichtung und Entwicklung des Deckglases (AZ-1505 Photolack):

- 180 $\mu$ l AZ-1505 mit Pipette gleichmäßig auf das Deckglas auftragen
- Spincoater 400 rpm (15s) um den Lack darauf zu verteilen
- Spincoater 4000 rpm (50s) für die gewünschte Lackdicke von 500nm
- belackte Deckglas auf Heizplatte (80<sup>0</sup>C 30 min) zum Softbake legen
- UV-Kontaktbelichtung (15s) bei Pegel 110
- 15s in AZ-351B 1:6 mit Millipore Wasser verdünnt entwickeln, danach sofort
- mit Millipore Wasser abspülen
- mit gasförmigen Stickstoff abspülen



# C Protokoll zur Aktinfärbung

Die Markierung der Aktinfilamente wurde mittels Alexa<sup>®</sup>488-Phalloidin (Invitrogen) entsprechend den Angaben des Herstellers durchgeführt. Die verwendeten humanen, dermalen Fibroblasten (VH7) wurden uns freundlicherweise von Prof. Dr. Beaukamp, DKFZ, Heidelberg zur Verfügung gestellt.

Reagenzien:

PBS

4% PFA in PBS

0.2 % Triton-X in PBS

Alexa<sup>®</sup>488-Phalloidin-Methanol-Stocklösung

Blocklösung: 2% BSA in PBS

Protokoll:

- Fibroblasten aussäen auf Deckgläser und bis zur gewünschten Dichte im Brutschrank bei 37 °C inkubieren
- Präparate kurz mit PBS bei 37 °C waschen
- Fixieren in 4% PFA/PBS für 10 min bei RT
- Waschen in PBS, 3 x 5 min
- Inkubieren in 0.2 % Triton-X/PBS für 3 min
- 2 × kurz in PBS waschen
- 10 min inkubieren in Blocklösung
- 5 µl Phalloidin-Stocklösung in 200 µl PBS verdünnen
- Phalloidin/PBS auf die Präparate aufbringen und 20 min bei RT im Dunkeln inkubieren
- Mindestens 2 x 3 min waschen in PBS
- Einbetten in PBS







# D Verwendete Abkürzungen und physikalische Größen

A	allg. Fläche
APD	<b>A</b> valanch <b>P</b> hoto <b>D</b> iode
$\alpha, \beta$	allg. Winkel
$\vec{B}$	magnetische Induktion
$c$	Lichtgeschwindigkeit im Medium
$c_0$	Vakuumlichtgeschwindigkeit
CCD	<b>C</b> harge <b>C</b> oupled <b>D</b> evice – Bildwandler auf Halbleiterbasis
CLSM	<b>C</b> onfocal <b>L</b> aser <b>S</b> canning <b>M</b> icroscopy
CMOS	<b>C</b> omplementary <b>M</b> etal <b>O</b> xide <b>S</b> emiconductor – Bildwandler auf Halbleiterbasis
$\vec{D}$	dielektrische Verschiebung
$D$	Strahldurchmesser in der Gauß-Optik
DOF	<b>D</b> ept <b>H</b> <b>O</b> f <b>F</b> ocus
EM-CCD	<b>E</b> lectron <b>M</b> ultiplied <b>C</b> harge <b>C</b> oupled <b>D</b> evice
EUV	<b>E</b> xtr <b>U</b> ltra <b>V</b> iolet (UV-Strahlung im 10nm-Bereich)
$\vec{E}$	elektrischer Feldvektor
$\epsilon_0$	Dielektrizitätskonstante des Vakuum
$\epsilon_r$	Dielektrizität des Medium
$e^-$	Elementarladung
$f$	Brennweite der Linse
FISH	<b>F</b> luorescence <b>I</b> nsitu <b>H</b> ybridisation
fps	<b>f</b> rames <b>p</b> er <b>s</b> econd – Bildwiederholrate
$\gamma$	Basiswinkel von einem Prisma
$h$	Planksches Wirkungsquantum
$\vec{H}$	magnetische Feldstärke
$I, I_0$	Intensitäten
IC	<b>I</b> nternal <b>C</b> onversion
ICCD	<b>I</b> ntensified <b>C</b> harge <b>C</b> oupled <b>D</b> evice – CCD mit Bildverstärker
I5M	<b>I</b> ncoherent <b>I</b> nterference <b>I</b> llumination <b>I</b> mage <b>I</b> nterference <b>M</b> icroscopy
ISC	<b>I</b> nter <b>S</b> ystem <b>C</b> rossing
$\vec{j}_{ext}$	induzierte Stromdichte
$\vec{k}, k, k_1, k_2$	Wellenvektor bzw. Wellenzahl
$\lambda$	Wellenlänge des Lichts
$\mu_0$	Permeabilitätskonstante des Vakuum
$\mu_r$	Permeabilität des Medium
$n, n_1, n_2$	allg. Brechungsindex
NA	Numerische Apertur
$\nu$	Frequenz des Lichts
N-BK7, N-F2	Glassorten

---

$O(r)$	Objektfunktion
$\omega_0$	minimaler Strahlradius in der Gauß-Optik, allg. Kreisfrequenz
$\omega(x)$	Strahldurchmesser in der Gauß-Optik
OMX	<b>O</b> ptical <b>M</b> icroscope <b>X</b>
OTF	<b>O</b> ptical <b>T</b> ransfer <b>F</b> unction – optische Transferfunktion
$P(r)$	rad. Leistungsverteilung in der Gauß-Optik, Punktbildfunktion
$P(\infty)$	ges. Leistung in der Gauß-Optik
$p_{ex}$	Anregungswahrscheinlichkeit
PALM	<b>P</b> hoto <b>A</b> tivated <b>L</b> ocalization <b>M</b> icroscopy
PBS	<b>P</b> hosphate <b>B</b> uffered <b>S</b> aline – Pufferlösung
$Ph$	Phosphoreszenz
PMT	<b>P</b> hoto <b>M</b> ultiplier <b>T</b> ube – Bildverstärkerröhre
PSF	<b>P</b> oint <b>S</b> pread <b>F</b> unction – Punktbildfunktion
$r$	Strahlradius, Abstand
$\rho_{ext}$	frei Ladung
$\rho, \varrho$	generalisierte optische Koordinaten
$R(x)$	Krümmungsradius der Wellenfront in der Gauß-Optik
ROI	<b>R</b> egion <b>O</b> f <b>I</b> nterest – Bildausschnitt
$\sigma$	molekulare Wirkungsquerschnitt der Absorption
SMI	<b>S</b> patially <b>M</b> odulated <b>I</b> llumination
STED	<b>S</b> Timulated <b>E</b> mission <b>D</b> epletion
STORM	<b>S</b> tochastic <b>O</b> ptical <b>R</b> econstruction <b>M</b> icroscopy
SW-TIRF	<b>S</b> tanding <b>W</b> ave TIRF
$t$	Zeit
TIRF	<b>T</b> otal <b>I</b> nternal <b>R</b> eflection <b>F</b> luorescence
$\theta$	Divergenzwinkel in der Gauß-Optik, allg. Winkel
$\vec{p}$	Normalenvektor
$\vec{v}, v_{refl}, v_{refr}$	allg. Richtungsvektor
xFP	<b>F</b> luorescent <b>P</b> rotein



# Literaturverzeichnis

- [Amb06] R. Amberger, C. Cremer *Vereinfachtes Verfahren zur lichtmikroskopischen Relokalisation von Objekten mit Hilfe eines fluoreszierenden Koordinatensystems unter Verwendung eines photolithographischen Strukturierungsprozess*, Offenlegungsschrift Deutsches Patent- und Markenamt, DE102006050259A1, München (2006)
- [And08] Homepage Andor Technology, [www.andor.com](http://www.andor.com)
- [Bad07] D. Baddeley *Dissertation: Precision measurements with SMI and 4Pi Microscopy*, Universität Heidelberg (2007)
- [BaW99] M. Born, E. Wolf *Principles of Optics*, 7. Auflage, Cambridge University Press - Cambridge (1999)
- [Bet06] E. Betzig, G. H. Patterson, R. Sougrat, O. W. Lindwasser, S. Olenych, J. Bonifacino, M. W. Davidson, J. Lippincott-Schwartz, H. F. Hess *Imaging intracellular fluorescent proteins at nanometer resolution*, *Science* 313: 1642-1645 (2006)
- [Bor98] H. Bornfleth, K. Sätzer, R. Eils, C. Cremer *High precision distance measurements and volume-conserving segmentation of objects near and below the resolution limit in three-dimensional confocal fluorescence microscopy.*, *J. Microsc.* 189: 118-136 (1998)
- [Bra96] J. Bradl, B. Rinke, A. Esa, P. Edelmann, H. Krieger, B. Schneider, M. Hausmann, C. Cremer *Comparative study of three-dimensional localization accuracy in conventional, confocal laser scanning and axial tomographic fluorescence light microscopy.* *Proc. SPIE* 2926: 201-206 (1996)
- [Cel92] D. Celeda, U. Bettag, C. Cremer *A simplified combination of DNA probe preparation and fluorescence in situ hybridization*, *Zeitschr. Naturf.* 47c: 739-747 (1992)
- [Chu07] E. Chung, D. Kim, Y. Cui, Y. Kim, P. T. C. So *Two-Dimensional Standing Wave Total Internal Reflection Fluorescence Microscopy: Superresolution Imaging of Single Molecular and Biological Specimens.*, *Biophys. J.* 93: 1747-1757 (2007)
- [Cre01] T. Cremer, C. Cremer *Chromosome territories, nuclear architecture and gene regulation in mammalian cells.* *Nat. Rev. Genet.* 2: 292-301 (2001)

- [Cre74] C. Cremer, C. Zorn, T. Cremer *An ultraviolet laser microbeam for 257 nm.*, Microscopica Acta 75: 331-337 (1974)
- [Crem96] C. Cremer, M. Hausmann, J. Bradl, B. Rinke *Verfahren zur multispektralen Präzisionsdistanzmessung in biologischen Mikroobjekten. Deutsches Patentamt 1996*
- [Fre00] Freitag, Busam *Funktionentheorie 1*, 3. Auflage, Springer Verlag Berlin - Heidelberg - New York (2000)
- [Fro00] J. T. Frohn, H. F. Knapp, A. Stemmer *True optical resolution beyond the Rayleigh limit achieved by standing wave illumination*, Proc. Nat. Acad. Sci. (USA) 93: 7232-7236 (2000)
- [Froh01] J.T. Frohn, H. F. Knapp, A. Stemmer *Three-dimensional resolution enhancement in fluorescence microscopy by harmonic excitation*, Opt. Lett. 26: 828-830 (2001)
- [Gust00] M. G. L. Gustafsson *Surpassing the lateral resolution limit by a factor of two using structured illumination microscopy*, J. Microsc. 198: 82-87 (2000)
- [Haa94] F. M. Haar, M. Durm, M. Hausmann, H. Ludwig, C. Cremer *A rapid FISH technique for quantitative microscopy*, BioTechniques 17: 346-353 (1994)
- [Hak93] Haken, Wolf *Molekülphysik und Quantenchemie*, 5. Auflage, Springer Verlag Berlin - Heidelberg - New York (1993)
- [Hel92] S. W. Hell, E. H. K. Stelzer *Fundamental improvement of resolution with a 4Pi-confocal fluorescence microscope using two-photon excitation.*, Opt. Commun. 93: 277-282 (1992)
- [Hen83] L. Hens, H. Baumann, T. Cremer, A. Sutter, J.J. Cornelis, C. Cremer *Immunocytochemical localization of chromatin regions wv-microirradiated in S phase or anaphase.*, Exp. Cell Res. 149: 257-269 (1983)
- [Hop50] H. H. Hopkins, P. M. Barham *Illumination with partial incoherent light*, Proc. Phys. Soc. 63: (1950)
- [Hua08] B. Huang, W. Wang, M. Bates, X. Zhuang *Three-Dimensional Super-Resolution Imaging by Optical Reconstruction Microscopy*, Science 319: 810-813 (2008)
- [Jac62] J. D. Jackson *Classical Electrodynamics*, Wiley Verlag - New York (1962)
- [Jank04] I. Janke *Dissertation: Anwendung von Weitfeldmikroskopie mit strukturierter Beleuchtung für funktionelle Hirnabbildung*, Universität Heidelberg (2004)



- [Kin65] R. Kingslake *Applied Optics and Optical Engineering*, Volume III, Academic Press - New York and London (1965)
- [Kla00] Th. A. Klar, S. Jakobs, M. Dyba, A. Egner, S. W. Hell *Fluorescence microscopy with diffraction resolution barrier broken by stimulated emission*, Proc. Nat. Acad. Sci (USA) 97: 8206-8210 (2000)
- [Kra06] B. Kramer *Die ersten fünfzig Jahre der Halbleiterzeit*, Physik in unserer Zeit 6, 28: 266-269 (2006)
- [Kre07] G. Kreth, S.K. Pazhanisamy, M. Hausmann, C. Cremer *Cell type-specific quantitative predictions of radiation-induced chromosome aberrations: A computer model approach*. Radiat. Res. 167: 515-525 (2007)
- [Kre98] G. Kreth, Ch. Mnkcl, J. Langowski, T. Cremer, C. Cremer *Chromatin structure and chromatin aberrations: Modelling of damage induced by isotropic and localized irradiation*. Mutat. Res. 404: 77-88. (1998)
- [Lei73] *Abbildende und beleuchtende Optik des Mikroskops*, Liste 512-99a, Ernst Leitz GmbH - Wetzlar (1973)
- [Mue02] M. Müller *Introduction to Confocal fluorescence microscopy*, 1. Edition, Shaker Publishing BV - Maastricht (2002)
- [Ohe99] M. Oheim, D. Loerke, R. Chow, W. Stühner *Evanescent-wave microscopy: a new tool to gain insight into the control of transmitter release*, The Royal Society B 354: 307-318 (1999)
- [Pawl06] J. Pawley *Handbook of biological confocal microscopy*, Springer Verlag Berlin - Heidelberg - New York (2006)
- [pi08] Produktkatalog 2007 Physik Instrumente GmbH Waldbronn
- [Sch05] W. Schönfeld *Vorläufer der heutigen Capillarmikroskopie*, Arch. Dermatol. Res. 3 178: 201-215 (2005)
- [Shi62] O. Shimonura, F. H. Johnson, Y. Saiga *Extraction, purification and properties of aequorin, a bioluminescent protein from the luminous hydromedusan, Aequorea.*, J. Cell. Comparat. Physiol. 59: 223-239 (1962)
- [Som89] A. Sommerfeld *Optik Band IV*, 3. Auflage, Verlag Harri Deutsch, Thun - Frankfurt am Main (1989)
- [Sto02] R. Stock, R. Sailer, W. S. Strauss, M. Lytttek, R. Steiner, H. Schneckenburger *Variable-angle total internal reflection fluorescence microscopy: realization and application of a compact illumination device*, J. Microsc. 211: 19-29 (2002)

- [Thom02] Thompson et al. *Precise Nanometer Localization Analysis for Individual Fluorescent Probes*, Biophys. J. 82: 2775-2783, (2002)
- [Toom01] D. Toomre, D.J. Mannstein *Lighting up the cell surface with evanescent wave microscopy*, Trends Cell Biol. 11, 7: 298-303 (2001)

# E Danksagung

Meinen besonderen Dank gilt all jenen, die mich im Rahmen dieser Arbeit unterstützt haben, da die Arbeit in dieser Form ohne sie nicht möglich gewesen wäre:

- Herrn Professor Dr. Markus Sauer für die Annahme als externer Doktorand sowie das großzügige Vertrauen in den Fortschritt und Erfolg der Arbeit.
- Herrn Professor Dr. Dr. Christoph Cremer für die Aufnahme in seine Arbeitsgruppe in Heidelberg sowie die stetige Hilfsbereitschaft. Hier konnte ich optimale Ausbildungsbedingungen aufgrund der langjährigen Erfahrung auf dem Gebiet der strukturierter Beleuchtung antreffen und aufgrund der interdisziplinären Struktur der Arbeitsgruppe eine weit über den fachlichen Bereich hinausreichende Ausbildung erfahren.
- Dr. David Baddeley und Alexander Urich für die Unterstützung bei der Softwareentwicklung zur Bildrekonstruktion
- Yanina Weiland für die Anfertigung sämtlicher biologischer Präparate
- allen weiteren Mitgliedern (und Ehemaligen) der Arbeitsgruppe die mit ihrer Freundlichkeit eine angenehme Arbeitsatmosphäre geschaffen haben: Dr. Gregor Kreth, Dr. Jutta Schwarz-Finsterle, Dr. Johann v. Hase, Dr. Jürgen Reymann, Heinz Eipel, Dr. Nick Kepper, Dr. Claudia Batram, Patrick Müller, Paul Lemmer, Rainer Kaufmann, Thomas Ruckelshausen, Manuel Gunkel, Wei Jiang, Reza Shaigan, Constanze Grossmann und Margund Bach.