

RUPRECHT-KARLS-UNIVERSITÄT HEIDELBERG



KIRCHHOFF-INSTITUT FÜR PHYSIK

INAUGURAL-DISSERTATION

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

vorgelegt von
Dipl.-Phys. Benno Albrecht
aus Saulgau

Tag der mündlichen Prüfung: 13. Februar 2002

Hochpräzisions-Fluoreszenzmessungen mit Räumlich Modulierter Anregung

Gutachter: Prof. Dr. Dr. Christoph Cremer
Prof. Dr. Bernd Jähne

Hochpräzisions-Fluoreszenzmessungen mit Räumlich Modulierter Anregung

In zellbiologischen Untersuchungen sind Distanzmessungen zwischen Fluoreszenzmarkern ein wichtiges Hilfsmittel zur Analyse von Strukturen, deren Abmessungen unterhalb der klassischen Auflösungsgrenze für Lichtmikroskope liegen. In der vorliegenden Arbeit wird ein Verfahren der Fernfeld-Lichtmikroskopie vorgestellt, das solche Messungen an fluoreszierenden, im Vergleich zur Auflösungsgrenze kleinen, „punktförmigen“ Objekten mit einer hohen Präzision in Richtung der optischen Achse erlaubt. Zu diesem Zweck wird die Anregungsintensität räumlich moduliert, indem zwischen zwei Objektiven zwei kollimierte Laserstrahlen kohärent überlagert bzw. zur Interferenz gebracht werden (Spatially Modulated Illumination (SMI) Microscopy).

Die Arbeit enthält eine Darstellung relevanter Grundlagen der Mikroskopie und beschreibt, wie man die räumlich modulierte Anregung zur Erhöhung der Distanzpräzision verwendet und wie daraus zusätzlich Informationen über die Abmessungen von „punktförmigen“ Objekten deutlich unterhalb der optischen Auflösungsgrenze gewonnen werden können. Außerdem wird der Mikroskopaufbau vorgestellt und die axiale Distanzpräzision durch mehrfach wiederholte und voneinander unabhängige Einzelmessungen belegt. Die berechneten Standard-Abweichungen der Distanzergebnisse bewegten sich dabei im Bereich von wenigen Nanometern. Darüberhinaus wurde durch Messungen an fluoreszenzmarkierten Oligonukleotiden auf Chromosom 9 und an mRNA-Komplexen von menschlichen HeLa-Zellen die Einsetzbarkeit des SMI-Mikroskops an biologischen Objekten demonstriert.

High-Precision Fluorescence Measurements with Spatially Modulated Illumination

In investigations in cell biology distance measurements between fluorescence labelled markers are an important tool for the analysis of structures of sizes below the classical resolution limit of light microscopy. Here, a method of far-field light microscopy is presented which allows such measurements between fluorescent subwavelength-sized “point-like“ objects with high distance precision in the direction of the optical axis. For this purpose, the excitation intensity respectively the illumination is spatially modulated by interfering two collimated laser beams in the interspace between two objectives (Spatially Modulated Illumination (SMI) Microscopy).

This thesis contains a presentation of some relevant theory of microscopy and gives a description on how the spatially modulated illumination is used for the improvement of the distance precision and how additional information about object sizes considerably below the optical resolution limit can be obtained. Furthermore, the microscope setup is being described and the distance precision is being shown by repeated, independent measurements. The calculated standard deviations obtained from the distance results were in the order of a few nanometers. Also, the usefulness of the SMI microscope for biological examinations was demonstrated by measurements of fluorescence labelled oligonucleotides on chromosome no. 9 and of mRNA sites of human HeLa cells.

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung und Motivation	1
2	Grundlagen	5
2.1	Fluoreszenz	5
2.1.1	Farbstoffmoleküle in Lösung	5
2.1.2	Einige Mechanismen des Ausbleichens	8
2.2	Geometrische Optik	9
2.2.1	Abbildungsgleichung für eine dünne Linse in Luft	9
2.2.2	Strahlengang im konventionellen Mikroskop	10
2.2.3	Abbildungsfehler	12
2.2.4	Aplanatische Objektive	14
2.3	Bildentstehung	16
2.3.1	Elektromagnetische Wellen	16
2.3.2	Abbildung durch eine begrenzte Linse	18
2.3.3	Punktbildfunktion	21
2.3.4	Auflösungsvermögen	23
2.3.5	Optische Transferfunktion	26
2.3.6	Abtastung und Digitalisierung	27
2.4	Spektrale Präzisions-Distanzmikroskopie	30
2.4.1	Lokalisation	30
2.4.2	Distanzmessungen	32
3	Mikroskopie mit Räumlich Modulierter Anregung	35
3.1	Abbildungseigenschaften	35
3.1.1	Räumlich Modulierte Anregung	35
3.1.2	Punktbildfunktion	37
3.1.3	Optische Transferfunktion	40
3.2	Methoden zur Auswertung	41
3.2.1	Vorverarbeitung der Bilddaten	41
3.2.2	Distanzmessungen	42
3.2.3	Modellbasierte Methoden zur axialen Distanzmessung	47

3.2.4	Schwerpunktbasierte Methode zur axialen Distanzmessung	49
3.2.5	Vergleich Objekt-/Phasen-Rasterung	50
3.2.6	Zusammenhang zwischen Form der AID und Objektgröße	51
3.3	Räumlich modulierte Anregung in mehreren Richtungen	54
3.3.1	Erzeugung einer lateralen Modulation der Anregung	54
3.3.2	Bildrekonstruktion	55
4	Experimentelle Realisierung	57
4.1	Übersicht	57
4.2	Anregungs-Strahlengang	59
4.2.1	Laser und optische Faser	59
4.2.2	Interferometer	60
4.3	Objekt- und Spiegelpositionierung	62
4.3.1	Piezoelektrische Verschiebetische	63
4.3.2	Verschiebetisch mit Schrittmotoren	63
4.4	Fluoreszenzdetektion	65
4.4.1	Detektions-Strahlengang	65
4.4.2	CCD-Kamera	67
4.5	Datenaufnahme	71
4.5.1	Steuer-PC und Software	71
4.5.2	Bedienung des Mikroskops	71
5	Messungen und Ergebnisse	75
5.1	Messungen an Testobjekten	75
5.1.1	Präparation der Objektträger	76
5.1.2	Messungen der Axialen Intensitätsverteilung	76
5.2	Distanzmessungen mit einer Wellenlänge	80
5.2.1	Laterale Distanzen	81
5.2.2	Axiale Positionen	82
5.2.3	Axiale Distanzen	82
5.3	Messungen mit zwei Wellenlängen	84
5.3.1	Axiale Positionen	85
5.3.2	Axiale Distanzen	86
5.3.3	Systematische Störungen der Wellenfronten	88
5.4	Vergleich modell-/schwerpunktbasierte Methode	90
5.5	Biologische Anwendungen	91
5.5.1	Fluoreszenzmarkierte Oligonukleotide auf dem ABL-Gen	91
5.5.2	Gefrierschnitte mit Messenger-RNA	93
6	Diskussion und Ausblick	97
6.1	Zusammenfassung	97

6.2	Diskussion	100
6.3	Perspektiven	102
A	Montage des Mikroskopaufbaus	105
A.1	Interferometer	106
A.2	Detektions-Strahlengang	107
B	Steuer-Software	109
B.1	Anforderungen und Konzept	109
B.2	Installation, Start und Initialisierung	112
B.3	Menü „Datei“	114
B.3.1	Laden und Speichern der Programm-Parameter	114
B.3.2	Laden und Speichern der Bilddaten	115
B.4	Menü „Ansicht“	116
B.5	Menü „Sequenz“	117
B.5.1	Dialogfeld „Sequenz“	118
B.5.2	Dialogfeld „Protokoll-Datei“	119
B.6	Menü „Kamera/Bild“	121
B.6.1	Dialogfeld „Kamera/Darstellung“	121
B.6.2	Dialogfeld „Histogramm“	125
B.6.3	Dialogfeld „Profil“	126
B.6.4	Dialogfeld „Statistik“	127
B.7	Menü „Positionierung“	128
B.7.1	Dialogfeld „z-Intervall ändern/setzen“	128
B.7.2	Dialogfelder „Schrittmotor-Ansteuerung“, „Piezo-Ansteuerung“	129
B.7.3	Weitere Einstellungen	131
C	Auswerte-Software	133
	Literaturverzeichnis	135
	Publikationen	143
	Danksagung	145

Kapitel 1

Einleitung und Motivation

Ein sehr großer Teil unseres heutigen Wissens über die innere räumliche Struktur biologischer Systeme auf zellulärer Ebene beruht auf lichtmikroskopischen Messungen. Da die räumliche optische Auflösung herkömmlicher, kommerziell erhältlicher Mikroskope auf einige hundert Nanometer nach unten beschränkt ist, wurden in den letzten Jahrzehnten alternative, inzwischen etablierte Mikroskopie-Verfahren entwickelt wie z. B. die Rasterelektronen- oder die Röntgenmikroskopie. Auch für die Untersuchung von Oberflächen gibt es mittlerweile spezialisierte Verfahren mit höherer Auflösung, z. B. die optische Nahfeld-Rastermikroskopie (Scanning Nearfield Optical Microscopy, SNOM) oder die atomare Rasterkraft-Mikroskopie (Atomic Force Microscopy, AFM).

All diese Verfahren besitzen jedoch den Nachteil, dass sie entweder nur sehr eingeschränkte Möglichkeiten zur Untersuchung des Zellinneren bieten oder diese, wie im Falle der Rasterelektronen- oder der Röntgenmikroskopie, nur um den Preis einer sehr aufwändigen Präparation gestatten können. Insbesondere sind Untersuchungen an Zellen im lebenden oder lebensnahen Zustand mit diesen Methoden prinzipiell unmöglich.

Dieser Sachverhalt sowie die rasante Entwicklung auf den Gebieten der Steuer- und Messtechnik und vor allem der Informationsverarbeitung während der letzten Jahre mögen eine Rolle spielen bei dem inzwischen wieder gestiegenen allgemeinen Interesse an neuen Methoden der Fernfeld-Lichtmikroskopie. Der erste Schritt vom „Urmikroskop“ hin zu einer Erhöhung der optischen Auflösung wurde mit der Entwicklung der konfokalen Laser-Raster-Mikroskopie (Confocal Laser Scanning Microscopy, CLSM) [CCremer78] getan, einem Verfahren, das, inzwischen sehr weit ausgereift, heute in vielen kommerziell erhältlichen Geräten Anwendung findet.

Obwohl die optische Auflösung eines CLSM bei biologischen Materialien in der Praxis nur ca. 250 nm in lateraler Richtung, d. h. in der Bildebene, und ca. 650 nm in axialer Richtung, d. h. in Richtung der optischen Achse, beträgt, lassen sich die Positionen von Objekten mit Abmessungen deutlich unterhalb der Auflösungsgrenze („punktförmige“ Objekte) mit einer im Vergleich zur optischen Auflösung weitaus höheren Genauigkeit messen. Gleiches gilt für die Bestimmung von Distanzen zwischen entsprechenden Objekten. Besitzen die Objekte Fluoreszenzfarbstoffe mit unterschiedlichen Anregungs- bzw. Emissionsspektren („spektrale Signaturen“), kann der Absolutbetrag der gemessenen Distanz sogar sehr klein im Vergleich zur optischen Auflösung sein (Spektrale Präzisions-Distanzmikroskopie, SPDM) [Bornfleth98a, VanOijen98, Edelmann00]. So wurden inzwischen Abstände von

punktförmigen Objekten bis herunter zu 25 nm mit einer Genauigkeit von 10 nm gemessen [Lacoste00]. Voraussetzung bei diesem Verfahren ist die Detektion jedes Objekts in einem bestimmten, von der Emission des Farbstoffs des anderen Objekts möglichst unabhängigen Kanal des Detektionssystems. Außerdem muss eine exakte Kalibrierung sowie eine Korrektur der optischen Aberrationen des Mikroskops mit Hilfe von Bildverarbeitungs-Algorithmen erfolgen [Edelmann99a]. Anstelle der unterschiedlichen Emissionsspektren der Fluoreszenzfarbstoffe können zur Identifikation der Objekte auch Farbstoffe mit unterschiedlichen Fluoreszenzlebensdauern verwendet werden [Lakowicz92, Schoenle00].

Die Bestimmung von Distanzen zwischen punktförmigen Objekten hat in vielen zellbiologischen Untersuchungen eine große Bedeutung. In diese Kategorie fallen z. B. Distanzmessungen an spezifischen, mittels Fluoreszenz-In Situ-Hybridisierung (FISH) spektral unterschiedlich fluoreszenzmarkierten DNA-Abschnitten [Esa00, Speicher96]. Die gemessenen Distanzen bilden eine wichtige Grundlage zur Bestimmung der räumlichen Strukturen im Innern des Genoms bzw. von *Genom-Nanostrukturen* [TCremer01]. Unter der Annahme einer funktionellen dreidimensionalen Architektur der Chromosomenterritorien und ihrer Untereinheiten in intakten Zellkernen könnten viele pathologische Erscheinungen mit kleinen Veränderungen in der Nanostruktur von individuellen Genen verbunden sein [DePinho98, Czarnota97]. Die Abmessungen dieser Strukturen können dabei weit unterhalb der praktischen optischen Auflösung liegen und wären damit einer konventionellen lichtmikroskopischen Untersuchung nicht zugänglich.

Für die Analyse funktioneller supramolekularer Biostrukturen („Biomolekulare Maschinen“) müssen jedoch noch kleinere als die oben genannten Distanzen gemessen werden, d. h. es müssen Abstände im Bereich von 10 nm und darunter bestimmt werden. Gegenwärtig kommen dafür überwiegend Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer(FRET)-Verfahren zur Anwendung [Lilley00]. Diese Methoden erlauben die Messung individueller Distanzen im Bereich von 2 bis 10 nm, sie sind jedoch wenig geeignet für die Bestimmung der Positionen mehrerer Objekte und derer gegenseitiger Distanzen. Im Gegensatz zum SPDM-Verfahren ermöglichen sie also nur die Analyse der unmittelbaren Umgebung zweier gegebener molekularer Einheiten und nicht die Untersuchung der Topologie einer komplexen Struktur. Unter Topologie ist in diesem Zusammenhang die aus exakten quantitativen Messungen hergeleitete räumliche Anordnung von fluoreszenzmarkierten Objekten zu verstehen. Das wesentliche Ziel, um topologische Messungen an sehr kleinen Strukturen mit Hilfe der SPDM zu ermöglichen, besteht nun darin, die Genauigkeit der Lokalisierung und damit die Präzision von Distanzmessungen an punktförmigen Objekten zu erhöhen.

Theoretische Betrachtungen zeigen [Edelmann00], dass Distanzmessungen mit einem Fehler (Standard-Abweichung der Distanz-Einzelmessung) im Nanometer-Bereich und unter Bedingungen, wie sie für viele fluoreszenzmarkierte biologische Objekte typisch sind, d. h. geringer Photonenfluss und hoher Rauschanteil, mit zur Zeit kommerziell erhältlichen konfokalen Mikroskopen nicht praktikabel sind [Bornfleth98a, Bornfleth99]. Um dennoch die Genauigkeit der Distanzmessungen bis auf einen Fehler von maximal wenigen Nanometern erhöhen zu können, muß die Punktbildfunktion des Mikroskopsystems (Bild eines punktförmigen Objekts, Point Spread Function, PSF) in geeigneter Weise modifiziert werden, so dass sich die Lokalisationsgenauigkeit eines Objekts bei einer gegebenen Anzahl detektierter Photonen erhöht („Point Spread Function Engineering“).

Dies kann beispielsweise dadurch erreicht werden, dass man die Halbswertbreite (Full Width at Half Maximum, FWHM) der PSF reduziert, wie es in der Mikroskopie mit Un-

terdrückung der Fluoreszenz durch stimulierte Emission (STimulated Emission Depletion-, STED-Mikroskopie) realisiert wird [Hell94b, Klar00]. Bei diesem auf dem konfokalen Prinzip beruhenden System wird zusätzlich zum Anregungsstrahl ein zweiter Abregungsstrahl in die Probe eingestrahlt. Dieser Strahl ist gegenüber dem Anregungsstrahl rot verstimmt und wird mittels geeigneter Verzögerungsplatten so geformt, dass er um den Anregungsfokus herum eine Art „dreidimensionalen Donut“ bildet. Ein sehr steiler Anstieg der Abregungseffizienz erlaubt dabei eine gezielte Unterdrückung der Fluoreszenz in der unmittelbaren Umgebung des Anregungsfokus, wodurch sich die Halbwertsbreite der Gesamt-PSF manipulieren lässt. Hier wurden bereits Halbwertsbreiten im Bereich von 100 nm in allen drei Raumrichtungen gemessen. Für dieses Verfahren werden allerdings spezielle Farbstoffe benötigt.

Eine andere Möglichkeit, die FWHM der Punktbildfunktion zu verringern, stellt die 4Pi-konfokale Laser-Raster-Mikroskopie dar [Hell94a, Hänninen95, Schrader98]. Dort werden zwei gegenüberliegende Objektive verwendet und die Längen der beiden optischen Wege von der Laserquelle zum Objekt und vom Objekt zum Detektor über Spiegel und Strahlteiler gegenseitig angeglichen. Dadurch kann die Fluoreszenzanregung der Probe, die Detektion des Fluoreszenzlichts oder beides gleichzeitig kohärent erfolgen (A-, B- oder C-Typ). Mit Typ-C der konfokalen 4Pi-Mikroskopie kann dabei die Halbwertsbreite der axialen PSF auf ca. 100 nm verringert werden. In Verbindung mit SPDM wurden damit Distanzen von 60 nm ($\leq 1/10\lambda$) zwischen einem Objekt mit Abmessungen deutlich unterhalb der Anregungswellenlänge und einer fluoreszierenden Schicht mit einer Genauigkeit von 1,2 nm gemessen [MSchmidt00].

Ein generelle Schwierigkeit bei konfokalen Systemen besteht darin, dass die punktweise Abrasterung der Probe eine hohe Fluoreszenzintensität der Objekte erfordert, die jedoch aufgrund des Sättigungsverhaltens der meisten Farbstoffe nach oben begrenzt ist. Folglich sind der maximalen Raster- bzw. Aufnahmegeschwindigkeit Grenzen gesetzt. Zusätzlich reduziert das Pinhole die Photonenausbeute des Systems, was die Messzeiten nochmals verlängert und das Ausbleichen der Fluoreszenzfarbstoffe verstärkt. Es bleibt abzuwarten, in wie weit diese Probleme durch zur Zeit noch in der Entwicklungsphase befindliche multifokale CLSM-Mikroskope gelöst werden können. Bei diesen Geräten werden die Aufnahmezeiten durch die gleichzeitige Einstrahlung bzw. Detektion mehrerer Anregungs- bzw. Detektionsstrahlen verkürzt [Bewersdorf98, Nielsen01].

In der vorliegenden Arbeit wird mit der Mikroskopie mit räumlich modulierter Fluoreszenzanregung bzw. mit der Spatially Modulated Illumination (SMI) Microscopy ein weiteres Verfahren des Point Spread Function Engineering vorgestellt, das hochpräzise Distanzmessungen erlaubt. Die Nachteile konfokaler Systeme werden hierbei umgangen, da die Detektion analog zu einem konventionellen Epifluoreszenz-Mikroskop mit Hilfe einer CCD-Kamera erfolgt. Es wird gezeigt, wie durch die räumliche Modulation der Fluoreszenzanregung die Lokalisations- bzw. Distanzpräzision in axialer Richtung bis auf wenige Nanometer erhöht werden konnte. Diese Methode des PSF Engineering kann zur Klasse der optischen Interferometrie gezählt werden, die zu einer der genauesten Messtechniken der Physik gehört und beispielsweise auch zur Messung der Wellenlänge des Lichts oder des Brechungsindex von Gasen verwendet wird.

Das SMI-Mikroskop ist optimiert worden für Distanzmessungen in axialer Richtung, es können jedoch auch die Ausdehnungen von Objekten mit Abmessungen deutlich unterhalb der Wellenlänge in Richtung der optischen Achse gemessen werden. Es besteht im

Kern ebenfalls aus zwei gegenüberliegenden Objektiven, von denen allerdings nur eines zur Detektion verwendet wird. Dadurch vereinfacht sich die Justage im Vergleich zu Systemen, die durch zwei Objektive kohärent detektieren, erheblich. Außerdem können sich die zu untersuchenden Proben auf herkömmlichen Objektträgern befinden, wodurch die praktische Anwendung des Mikroskops wesentlich erleichtert wird.

Die räumlich modulierte Anregung wird erzeugt, indem zwischen den zwei Objektiven zwei gegenläufige Laserstrahlen gleicher Intensität und Polarisation zur Interferenz gebracht werden. Dadurch bildet sich ein stehendes Lichtwellenfeld, dessen Ebenen konstruktiver Interferenz senkrecht auf der optischen Achse stehen, und es findet eine räumlich selektive Fluoreszenzanregung der Probe statt [Bailey93, Lanni86a]. Die axiale Punktbildfunktion des SMI-Mikroskops setzt sich aus dem Produkt des \cos^2 -förmigen Intensitätsverlaufs mit der axialen PSF eines konventionellen „klassischen“ Epifluoreszenz-Mikroskops zusammen, hat also die Form einer konventionellen axialen PSF, der eine \cos^2 -förmige räumliche Modulation aufgeprägt ist. In der Bildebene, d. h. in lateraler Richtung unterscheidet sich die Punktbildfunktion dagegen nicht von einem konventionellen Mikroskop [Schneider99a].

Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Experimente schließen sich an die in [Schneider99a] vorgestellten Arbeiten an. Das Mikroskop wurde dabei nochmals vollständig neu aufgebaut und in vielen Teilen verbessert. Außerdem wurde eine Software zur Steuerung der Messungen entwickelt, und es fand eine Weiterentwicklung der Methoden zur Auswertung der Bilddaten statt. Darüberhinaus wurden erstmals Distanzmessungen zwischen verschiedenen Objekten durchgeführt und die Präzision der Distanzbestimmung durch mehrfache Wiederholung der Messungen systematisch untersucht.

Inhaltlich gliedert sich die Arbeit wie folgt: Kapitel 2 stellt zunächst die wichtigsten Grundlagen der Fluoreszenzmikroskopie sowie der Spektralen Präzisions-Distanzmikroskopie dar. Die Eigenschaften der optischen Abbildung im SMI-Mikroskop und die in dieser Arbeit verwendeten und entwickelten Methoden zur Auswertung beschreibt das dritte Kapitel. Kapitel 4 widmet sich dem experimentellen Teil dieser Dissertation, indem es den Aufbau und die Bedienung des SMI-Mikroskops erläutert. Die durchgeführten Messungen und Ergebnisse werden im fünften Kapitel vorgestellt, bevor das letzte Kapitel diese Arbeit mit einer Bewertung der Ergebnisse und einem Ausblick abschließt. Der Anhang enthält außerdem einige Hinweise zum Aufbau und zur Justage des Experiments, stellt die entwickelte Steuer-Software des Mikroskops vor und gibt einen kurzen Überblick über die zur Auswertung verwendeten Programme.

Kapitel 2

Grundlagen

Bevor im nächsten Kapitel auf die Einzelheiten der Mikroskopie mit räumlich modulierter Anregung eingegangen wird, widmet sich dieses Kapitel zunächst einigen Grundlagen der Fernfeld-Fluoreszenzmikroskopie. Der erste Abschnitt gibt einen Überblick über die Eigenschaften von Fluoreszenzfarbstoffen, da diese hier von großer praktischer Bedeutung sind. Die nächsten beiden Abschnitte erläutern die wichtigsten Merkmale der optischen Abbildung, soweit sie im Rahmen dieser Arbeit unmittelbar relevant sind oder zum allgemeinen Verständnis der Mikroskopie beitragen. Der vierte Abschnitt vermittelt schließlich einen Einblick in die Grundlagen der Spektralen Präzisions-Distanzmikroskopie.

2.1 Fluoreszenz

Die einfachsten Beispiele für Elektronensysteme, die nach der Anregung in einen energetisch höheren Zustand spontan und unter gleichzeitiger Emission eines Photons wieder in einen energetisch niedrigeren Zustand übergehen, stellen einzelne Atome dar. Der angeregte Zustand geht dort nach einer mittleren Lebensdauer von lediglich einigen Femtosekunden wieder in Grundzustand über, und die Linienbreite der Emission beträgt nur wenige MHz, d. h. sie liegt deutlich unter 1 nm.

2.1.1 Farbstoffmoleküle in Lösung

Bei der **Fluoreszenz** von Farbstoffmolekülen ist die Situation nicht nur wegen des Umstandes, dass es sich um Mehrelektronensysteme handelt, sondern auch aufgrund vielfältiger Wechselwirkungen der Moleküle untereinander und mit der physiologischen bzw. wässrigen Umgebung wesentlich komplexer. Zu den elektronischen Energieniveaus in Atomen kommen bei Molekülen weitere Zustände aufgrund zusätzlicher Rotations- und Schwingungs-Freiheitsgrade hinzu. Die oben angedeuteten Wechselwirkungen führen zu fortlaufenden Änderungen der Kernabstände innerhalb der Moleküle, so dass die von diesen Abständen abhängigen Energien der Molekülzustände ständigen Fluktuationen unterworfen sind. Dies hat wiederum eine sehr starke Verbreiterung der entsprechenden Molekülübergänge zur Folge. Daher sind bei Molekülen in Lösung anstelle diskreter Anregungs- und Emissionsspektren nur noch breite, kontinuierliche Anregungs- und Emissionsbänder mit Halbwertsbreiten von üblicherweise mehreren zehn Nanometern zu beobachten.

Im Grundzustand befindet sich ein Farbstoffmolekül im vibratorischen Grundniveau (ν_0) des elektronischen Singulett- (S_0) Zustands, und die Kerne besitzen einen Gleichgewichtsabstand r_0 , siehe Abbildung 2.1. Trifft ein Photon passender Energie $h\nu_{ex}$ auf das Molekül, wird es in höherenergetische Zustände überführt. Für die Fluoreszenz sind von diesen angeregten Zuständen nur die S_1 -Zustände von Bedeutung. Höher energetische Zustände sind auch anregbar, gehen jedoch meistens innerhalb typischerweise 10 fs strahlungslos in den S_1 -Zustand über [WSchmidt94]. Sowohl die Zeitdauer der Anregung als auch die Dauer der Emission beträgt jeweils nur einige fs, so dass der Kernabstand nach dem **Franck-Condon-Prinzip** währenddessen als konstant angesehen werden kann [WSchmidt94].

Der angeregte S_1 -Zustand besitzt eine andere Elektronenverteilung als der S_0 -Zustand, so dass sich das vibratorische Grundniveau ν_0 bei einem anderen Kernabstand r_1 einstellt. Dadurch werden aufgrund des konstanten Kernabstands während der Anregung überwiegend höhere Vibrationsniveaus des S_1 -Zustands angeregt. Die Wahrscheinlichkeit für die einzelnen Übergänge bzw. die Anregung ist umso höher, je mehr die Aufenthaltswahrscheinlichkeitsdichten der Anfangs- und der Endzustände mit Energiedifferenz $h\nu_{ex}$ überlappen.

Die in den höheren Vibrationsniveaus des S_1 -Zustands vorhandene Schwingungsenergie wird in wässriger Lösung sehr schnell, d. h. in einigen ps, an andere Moleküle in der Umge-

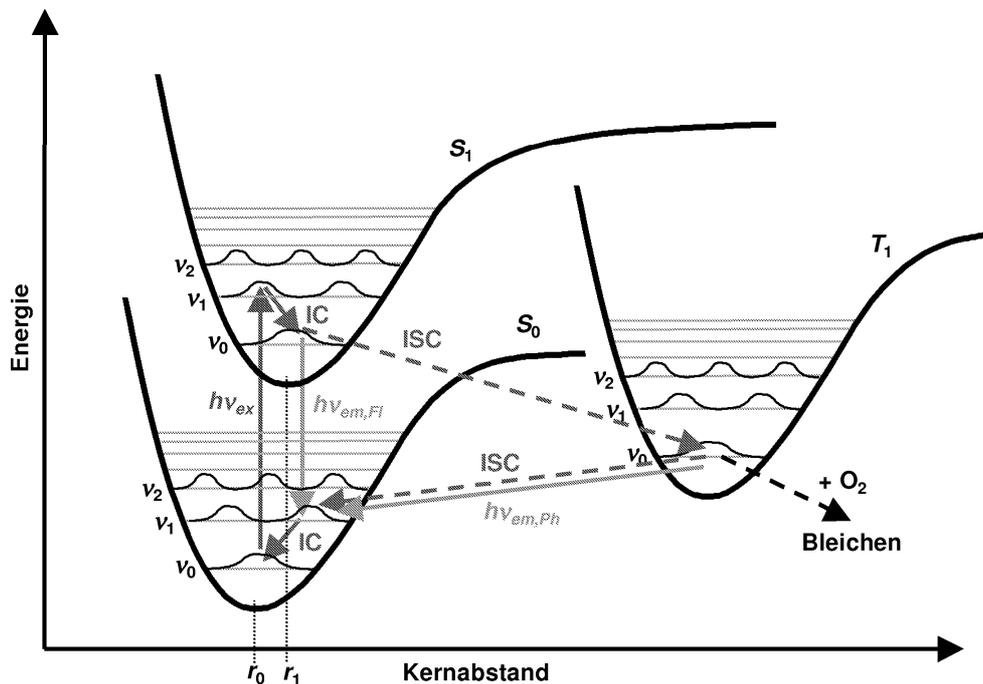


Abbildung 2.1: Ausschnitt aus dem schematischen Zustandsdiagramm eines zweiatomigen Farbstoffmoleküls. Die elektronischen Singulettzustände S_0 , S_1 und der Triplettzustand T_1 setzen sich jeweils aus vibratorischen Unterniveaus ($\nu_0\dots$) zusammen, welche wiederum in Rotationsniveaus zerlegbar sind. IC: Internal Conversion, ISC: Inter System Crossing, ex: Anregung, em: Emission, Fl: Fluoreszenz, Ph: Phosphoreszenz.

bung des Farbstoffmoleküls abgegeben [Sandison95]. Diese strahlungslosen Übergänge in den ν_0 -Zustand werden als *interne Konversion* bezeichnet (Internal Conversion, IC, siehe Abb. 2.1) [WSchmidt94]. Die Wechselwirkung mit anderen Molekülen bewirkt auch eine Abschwächung der Kohärenz des Emissionslichts gegenüber der Kohärenz des Anregungslichts, sofern z. B. Laserlicht zur Anregung verwendet wird. Die Kohärenzlänge berechnet sich nach [Schröder90] zu

$$l_C = \frac{c}{\Delta\nu} \quad (2.1)$$

mit c : Lichtgeschwindigkeit und $\Delta\nu$: Emissionsbreite des Farbstoffs in Hz. Ein typischer Fluoreszenzfarbstoff mit einer Breite des Emissionsspektrums von 60 nm hat damit eine Kohärenzlänge von ca. 5 μm .

Moleküle im unteren Vibrationsniveau des S_1 -Zustands können nun unter Aussendung eines Photons der Energie $h\nu_{em,Fl}$ wieder in den S_0 -Grundzustand übergehen. Da dieser Vorgang innerhalb der Fluoreszenzlebensdauer τ von einigen ns, d. h. vergleichsweise schnell abläuft (vgl. unten), bezeichnet man ihn als *Fluoreszenz*. Die Fluoreszenzlebensdauer ist eine spezifische Eigenschaft des Moleküls; sie kann nach gepulster Anregung gemessen und daher neben der Energie $h\nu_{em,Fl}$ bzw. der Emissionswellenlänge als weiteres spezifisches Identifikationsmerkmal des Farbstoffs genutzt werden.

Da das Franck-Condon-Prinzip auch auf den Emissionsvorgang anwendbar ist, werden hier analog zum Anregungsvorgang zunächst nur höhere Vibrationsniveaus des S_0 -Grundzustands besetzt, welche anschließend durch interne Konversion in das ν_0 -Grundniveau übergehen. Die Intensität des Fluoreszenzübergangs hängt wie die Anregungswahrscheinlichkeit vom Überlapp der Aufenthaltswahrscheinlichkeiten zwischen dem S_1, ν_0 - und einem höheren Vibrationsniveau des S_0 -Zustands mit der Energiedifferenz $h\nu_{em,Fl}$ ab. Diese Wahrscheinlichkeit, d. h. die Wahrscheinlichkeit, mit der ein angeregtes Molekül Fluoreszenzemission zeigt, wird Quanteneffizienz (QE) genannt.

Der Energieverlust im S_1 - und S_0 -Zustand durch IC hat die wichtige praktische Konsequenz, dass das Maximum der Anregungseffizienz bei einer kleineren Wellenlänge liegt als das Maximum des Fluoreszenz-Emissionsspektrums (**Stokes-Verschiebung**). Dadurch ist es möglich, das Fluoreszenz- vom Anregungslicht spektral zu trennen. Je größer die Stokes-Verschiebung, desto besser kann diese Trennung erfolgen und den Kontrast in der Bildebene des Mikroskops erhöhen. Die Stokes-Verschiebung beträgt typischerweise 20 – 30 nm.

Wichtig für den praktischen Umgang mit Fluoreszenzfarbstoffen ist außerdem der Umstand, dass die Intensität des Fluoreszenzlichts nur bei, im Vergleich zur **Sättigungsintensität** geringen Anregungsintensitäten *proportional* zur Anregungsintensität ist. Die Sättigungsintensität wird durch die Dauer eines Fluoreszenzzyklus festgelegt. Das heißt, ein Farbstoffmolekül kann nicht beliebig viele Fluoreszenzzyklen pro Zeit durchlaufen. Übersteigt die Anregungsintensität die Sättigungsintensität, können nicht mehr alle Photonen, die ein Molekül treffen, in Fluoreszenzphotonen „umgewandelt“ werden.

Ein Farbstoffmolekül kann außer über einen Fluoreszenzübergang auch auf andere Art zurück vom S_1 - in den S_0 -Zustand gelangen: Strahlungslose, direkte Übergänge sind möglich, oder das Molekül kann in einen Triplettzustand T_1 übergehen (Interkombinations-Übergang, Inter System Crossing, ISC), s. Abb. 2.1. ISC-Übergänge können bei (meist mittelschweren) Atomen auftreten, in denen eine Mischform aus LS - und jj -Kopplung für die Kopplung von Spin- und Bahnmomenten der Elektronen vorliegt [Haken90]. Da

optische Dipolstrahlung ein Umklappen der Elektronenspins bedingt, ist ein Übergang vom T_1 - in den S_0 -Zustand unter gleichzeitiger Emission eines Photons quasi verboten. Aufgrund der Wechselwirkungen des Moleküls mit seiner Umgebung treten dennoch optische Übergänge mit der Energie $h\nu_{em,Ph}$ auf. Deren Rate ist jedoch sehr klein, d. h. die Lebensdauer des T_1 -Zustands kann mehrere Sekunden betragen. Dieser Vorgang wird als **Phosphoreszenz** bezeichnet. Bevor der T_1 -Zustand durch Phosphoreszenz zerfällt, kann er auch durch einen erneuten ISC-Übergang in den S_0 -Zustand übergehen.

2.1.2 Einige Mechanismen des Ausbleichens

Bei konstanter Beleuchtung bzw. Anregung von Farbstoffen nimmt die Gesamt-Fluoreszenzintensität kontinuierlich ab. Die Geschwindigkeit dieses Ausbleichens ist individuell und hängt von der Art der Farbstoffmoleküle und der chemischen Umgebung ab. Sie führt aber stets zu einer endlichen Anzahl insgesamt detektierbarer Fluoreszenzphotonen eines Moleküls. So lassen sich beispielsweise von auf Glasoberflächen in Luft adsorbierten Farbstoffmolekülen in einem konfokalen Mikroskop typischerweise 10^4 Photonen detektieren. In [Tinnefeld01] wurden unter diesen Bedingungen die in der Nähe von $\lambda = 650$ nm anregbaren Farbstoffe JA242, CF9 und Cy5 untersucht. Bei einer mittleren Anregungsintensität von 500 W/cm^2 konnten dort im Mittel 77 000, 82 000 und 33 000 Photonen detektiert werden. Diese Grenze führt zu einer Limitierung der Bildqualität und damit zu einer begrenzten Lokalisationsgenauigkeit fluoreszierender Objekte in Mikroskopaufnahmen (siehe auch Abschnitt 2.4).

Ursache für diesen Effekt ist eine photo-induzierte Zerstörung der Farbstoffmoleküle. Die wichtigste Rolle spielt in diesem Zusammenhang der Tripletzustand, den das Molekül nach einem ISC-Übergang einnehmen kann, vgl. Abb. 2.1. Wie oben erwähnt, kann sich ein Molekül sehr lange, d. h. bis zu einigen Sekunden in diesem Zustand aufhalten. Im Vergleich zum S_0 -Zustand besitzt der T_1 -Zustand eine höhere Energie und damit eine höhere chemische Reaktivität. Dieses führt insbesondere zur Reaktion mit molekularem Sauerstoff, in deren Folge hochreaktiver atomarer Sauerstoff entstehen kann, mit gleichzeitiger chemischer Umwandlung des Farbstoffmoleküls in eine nicht-fluoreszierende Konfiguration [Sandison95]. Darüberhinaus ist eine weitere Anregung des Tripletzustands mit anschließender Dissoziation des Moleküls möglich.

Um einen Übergang in den Tripletzustand zu verhindern, werden der Probe oftmals chemische Agentien zugegeben. Diese erhöhen z. B. die Wahrscheinlichkeit eines ISC-Übergangs vom T_1 - zurück in den S_0 -Zustand, so dass gleichzeitig die Wahrscheinlichkeit unerwünschter Sauerstoffreaktionen im T_1 -Zustand reduziert wird („chemisches Quenchen“). Eine weitere Möglichkeit zur Reduzierung des Bleichens besteht in der Zugabe von Antioxidantien zur Verringerung des Sauerstoffgehalts in der Probe [Tsien95].

In neueren Arbeiten wird die Entwicklung einer neuen Klasse von Farbstoffen, den sogenannten „Nanocrystals“ oder „Quantum Dots“ beschrieben [Banin99, Bruchez98]. Diese sehr kleinen Kristalle mit einem Durchmesser von wenigen Nanometern bestehen z. B. aus Cadmium-Selenium oder Indium-Arsen und haben sphärische Gestalt. Ihr Anregungs- und Fluoreszenz-Verhalten kann mit Methoden der Festkörperphysik beschrieben werden. Sie zeichnen sich durch ein sehr breites Anregungsspektrum von mehreren hundert Nanometern bei gleichzeitig vergleichsweise schmalen Emissionsspektrum aus (einige zehn Nanometer). Ein weiteres herausragendes Merkmal ist ihre extrem hohe Photostabilität.

Außerdem kann sowohl das Maximum ihres Emissionsspektrums (siehe z. B. [Banin98]) als auch ihre Fluoreszenzlebensdauer gezielt verändert und damit an experimentelle Randbedingungen wie z. B. bestimmte Filtersätze angepaßt werden. Das macht sie zu nahezu idealen fluoreszenten Markern für die Untersuchung von Genom-Nanostrukturen.

2.2 Geometrische Optik

Mit den Methoden der geometrischen Optik lassen sich bereits die meisten praktischen Fragestellungen bezüglich optischer Geräte relativ einfach zufriedenstellend behandeln, wie z. B. die Berechnung von Strahlengängen. Voraussetzung für ihre Anwendbarkeit ist, dass die Abmessungen der Größen, über die man eine Aussage treffen möchte, groß gegenüber der Wellenlänge λ des Lichts sind. Daher können Effekte wie das endliche Auflösungsvermögen eines Mikroskops nicht mit ihr behandelt werden.

In diesem Abschnitt werden einige Aspekte der klassischen Strahlentheorie für Systeme aus dünnen Linsen in der **paraxialen Näherung** dargestellt. Das heißt, es werden nur Strahlen betrachtet, die sich annähernd parallel bzw. mit kleinen Winkeln zur optischen Achse ausbreiten und sich an Grenzschichten gemäß dem **Brechungsgesetz von Snellius** verhalten. Letzteres wird daher linearisiert, d. h. $n_1 \sin \alpha_1 = n_2 \sin \alpha_2$ wird durch $n_1 \alpha_1 = n_2 \alpha_2$ angenähert, und es wird $\theta = \sin \theta = \tan \theta$ gesetzt.

2.2.1 Abbildungsgleichung für eine dünne Linse in Luft

Betrachtet wird zunächst eine einzelne lichtbrechende Oberfläche mit dem Krümmungsradius r_1 an der Stelle $z = 0$, wie in Abbildung 2.2 gezeigt. Für den Brechungsindex gilt auf der linken Seite $n_1 = 1$, rechts sei $n_2 = n$; die Lichtstrahlen haben ihren Ursprung im Objektpunkt O an der Stelle $z = u$ auf der optischen Achse. Orte links des Vertex V haben negatives Vorzeichen (Vorzeichenkonvention). Ein von O ausgehender Lichtstrahl schneidet die Oberfläche bei $y = y_1$. Er wird aus dem Winkel α_1 in den Winkel α_2 gebro-

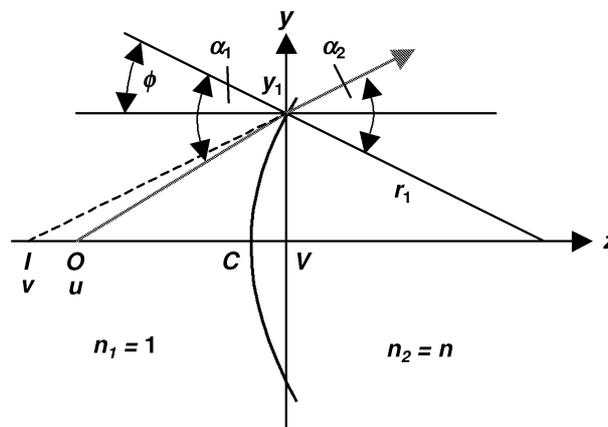


Abbildung 2.2: Brechung eines Lichtstrahls an einer sphärischen Oberfläche. In der paraxialen Näherung ist $y_1 \ll r_1$, so dass $VC \ll r_1$. u und v sind negativ, r_1 sowie die Winkel α_1 und α_2 sind positiv (Vorzeichenkonvention).

chen und scheint daher von einem virtuellen Bild I an der Stelle $z = v$ zu stammen. Es gilt dann

$$\alpha_1 - \phi = -\frac{y_1}{u}, \quad \alpha_2 - \phi = -\frac{y_1}{v}, \quad \phi = \frac{y_1}{r_1}, \quad (2.2)$$

woraus folgt:

$$\frac{\alpha_1}{\alpha_2} = n = \frac{y_1(\frac{1}{r_1} - \frac{1}{u})}{y_1(\frac{1}{r_1} - \frac{1}{v})}. \quad (2.3)$$

Dies lässt sich zu

$$-\frac{n}{v} + \frac{1}{u} = \frac{1}{r_1}(1 - n) \quad (2.4)$$

vereinfachen. n im ersten Term von (2.4) deutet darauf hin, dass sich v auf eine Region mit Brechungsindex n bezieht.

Die Position $z = v'$ des Bildes, das von der dünnen Linse in Luft erzeugt wird, kann aus (2.4) unter Verwendung einer zweiten Oberfläche mit Krümmungsradius r_2 abgeleitet werden, indem man die Position des Objekts durch das gerade berechnete v ersetzt [Lipson97]. Diese Ersetzung setzt voraus, dass die Vertices der beiden Linsen geometrisch übereinanderliegen (entspricht $VC = 0$ in Abb. 2.2), d. h. die Linse tatsächlich dünn im Vergleich zu u und v ist. Vertauscht man nun die Rollen von n und 1, erhält man

$$-\frac{1}{v'} + \frac{n}{v} = \frac{1}{r_2}(n - 1). \quad (2.5)$$

Setzt man hier n/v aus (2.4) ein, erhält man daraus die bekannte **Abbildungsgleichung**

$$-\frac{1}{u} + \frac{1}{v'} = \frac{1}{f} \quad (2.6)$$

mit der **Brechkraft** bzw. **reziproken Brennweite** $1/f$

$$\frac{1}{f} = (n - 1)\left(\frac{1}{r_1} - \frac{1}{r_2}\right). \quad (2.7)$$

Die *Objekt-* und die *Bildweite* u und v' sind zueinander **konjugierte Größen**. Wenn $u \rightarrow \infty$, dann gilt $v' \rightarrow f$. Das bedeutet, dass alle Strahlen, die parallel zur optischen Achse auf die Linse treffen, die optische Achse im **Fokuspunkt** schneiden. Die **Brennebene** ist als Ebene senkrecht zur optischen Achse durch den Fokuspunkt definiert. Alle parallelen Strahlen, welche die Linse unter einem bestimmten kleinen Winkel in der Nähe der optischen Achse treffen, konvergieren in demselben Punkt der Brennebene.

2.2.2 Strahlengang im konventionellen Mikroskop

Beim Mikroskop wird eine Objektivlinse sehr kurzer Brennweite (etwa 1 mm) dazu verwendet, ein sehr stark vergrößertes reelles Bild des Objekts zu erzeugen. Im „klassischen“ Mikroskop befindet sich das Objekt dabei etwas außerhalb der Brennweite f_1 der Objektivlinse. Das so vom Objektiv erzeugte reelle Zwischenbild wird von einer Okularlinse mit der Brennweite f_2 nochmals vergrößert. Die Gesamtvergrößerung ergibt sich zu $t/f_1 \cdot s_0/f_2$, dabei ist $t = 160$ mm die Tubuslänge und $s_0 = 250$ mm die sog. *deutliche Sehweite* bzw. Bezugssehweite.

In heutigen Mikroskopsystemen kommen jedoch überwiegend auf „unendlich“ korrigierte Objektive zum Einsatz, die zur exakten Abbildung von in der Brennebene befindlichen Objekten optimiert sind. Zur Erzeugung des Zwischenbilds wird dann eine weitere **Tubuslinse** verwendet. Abbildung 2.3 zeigt den entsprechenden Strahlengang eines **konventionellen Mikroskops**. Die Vergrößerung dieser Anordnung beträgt (f_t = Brennweite der Tubuslinse):

$$V = \frac{f_t s_0}{f_1 f_2}. \quad (2.8)$$

Der Vorteil dieser Konfiguration besteht darin, dass aufgrund der parallelen Strahlen zwischen Objektiv und Tubuslinse dort weitere optische Elemente wie z. B. Filter, Strahlteiler, Polarisatoren usw. eingesetzt werden können, ohne dass die Qualität der optischen Abbildung beeinträchtigt wird. Außerdem kann der Fokuspunkt mittels einer Verschiebung des Objektivs anstelle einer Bewegung des Objekts eingestellt werden, wie bei vielen inversen Mikroskopen üblich [Keller95].

Um die Probe in Abb. 2.3 im *Durchlicht*, d. h. von links, zu beleuchten, ist auf der dem Objektiv gegenüberliegenden Seite der Probe eine **Kondensorlinse** eingesetzt. Die einfachste Möglichkeit, eine möglichst intensive und gleichmäßige Beleuchtung zu erzielen, wäre eine Lichtquelle im Brennpunkt der Kondensorlinse. Dies hätte jedoch zur Folge, dass benachbarte Punkte auf der Probe durch teilweise kohärentes Licht beleuchtet würden, was eine Verringerung der Auflösung nach sich ziehen würde. Aus diesem Grund sollte die Beleuchtung der Probe möglichst *inkohärent* erfolgen, siehe auch Abschnitt 2.3.4.

In der Praxis werden daher meist zwei Arten von Beleuchtung verwendet: Bei der **kritischen Beleuchtung** wird durch die Kondensorlinse direkt auf dem Objekt ein Bild der Lichtquelle erzeugt, wie in Abbildung 2.4(a) gezeigt. Die Lichtquelle sollte dabei möglichst homogen beschaffen sein, da ansonsten das entstandene Bild durch Unregelmäßigkeiten beeinträchtigt sein kann. Die in Abb. 2.4(b) gezeigte Anordnung der **Köhler-Beleuchtung**, in der eine weitere Hilfslinse und eine ausgedehnte Lichtquelle benutzt wird, vermeidet diesen Nachteil. Obwohl jeder Punkt der Quelle paralleles und kohärentes Licht unter einem bestimmten Winkel erzeugt, ist die Gesamtstrahlung von allen Punkten der Quelle

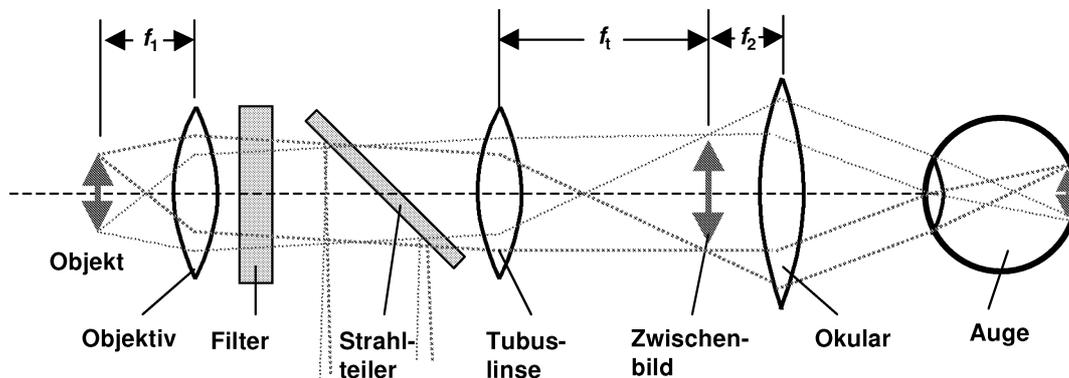


Abbildung 2.3: Abbildungs-Strahlengang eines konventionellen Mikroskops mit auf unendlich gerechneten Objektiven (schematisch). Im Bereich zwischen Objektiv- und Tubuslinse verlaufen die Strahlen parallel, so dass dort weitere optische Elemente wie z. B. Filter und Strahlteiler eingesetzt werden können.

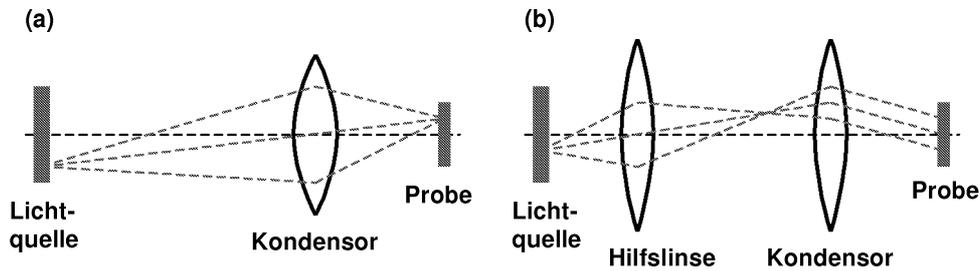


Abbildung 2.4: Arten inkohärenter Beleuchtung. (a) kritisch; (b) nach Köhler.

zusammengenommen beinahe vollständig inkohärent. Der Grund dafür liegt in den zufällig verteilten Phasen und unterschiedlichen Ausbreitungsrichtungen der einzelnen Wellen, welche sich an jedem Punkt des Objekts mit verschiedenen Phasendifferenzen überlagern. Das Objekt befindet sich in der Nähe des von der Kondensorlinse erzeugten Bildes der Hilfslinse. Man kann davon ausgehen, dass die Hilfslinse selbst bei ungleichmäßiger Helligkeit der Lichtquelle gleichmäßig ausgeleuchtet wird.

Anstelle im Durchlichtmodus kann die Probe auch durch das Objektiv im *Auflichtmodus* beleuchtet werden. Mikroskope mit dieser Art von Beleuchtung werden **Epifluoreszenz-Mikroskope** genannt. Der Strahl der Lichtquelle bzw. das Anregungslicht wird dabei im Bereich des Strahlengangs zwischen Objektiv und Tubuslinse über einen **dichroitischen Strahlteiler** eingekoppelt, wie in Abb. 2.3 gezeigt. Die Objektivlinse wirkt dann gleichzeitig als Kondensorlinse, und der Strahlteiler muss so spezifiziert sein, dass er die entsprechenden, aufgrund der Stokes-Verschiebung gegenüber der Anregung verschobenen Emissionswellenlängen der Fluoreszenzfarbstoffe transmittiert.

2.2.3 Abbildungsfehler

Reale Linsen erzeugen bei der Abbildung Fehler, die sich nicht im Rahmen der paraxialen Näherung beschreiben lassen. Trotzdem sollen an dieser Stelle die wichtigsten Fehler aufgrund ihrer großen Bedeutung für die Praxis kurz dargestellt werden. Ausführlichere Darstellungen finden sich in [Kingslake78] und [Welford86].

Monochromatische Aberrationen

Idealerweise sollte eine Linse bei der Abbildung eines leuchtenden Punktobjekts eine sphärische Wellenfront erzeugen, die genau in einem Punkt der Bildebene zusammenläuft. Die Position dieses Punktes innerhalb der Ebene wäre mit der Objektposition linear durch die Vergrößerung V verknüpft. Die Abweichungen von dieser Idealsituation lassen sich einteilen in Aberrationen, welche die Positionen der Bildpunkte verändern, und in Abbildungsfehler, die die Abnahme der Schärfe der Bildpunkte beschreiben (vgl. Abschnitt 2.3.4). Zu ersteren gehört die *Bildfeldwölbung*, welche beschreibt, wie weit vor oder hinter der idealen Bildebene die Bildpunkte zu finden sind, sowie die *Verzeichnung*, die die Abweichungen von einer gleichmäßigen Vergrößerung angibt. Diese Fehler hängen sowohl von der Position des abzubildenden Objektpunkts (x, y, z) als auch von Linseneigenschaften

wie z. B. Linsendurchmesser ab.

Die Abweichungen der realen, von der Linse erzeugten sphärischen Wellenfront von der idealen, in genau einem Punkt konvergierenden Welle lassen sich mit einer Funktion Δ beschreiben. Diese Funktion lässt sich in eine Kombination von Radial- und Winkelfunktionen aufspalten, also $\Delta = \Delta(\rho, \theta)$. Seien (ρ, θ) die Koordinaten in der Linsen-Mittelebene, dann ist die **sphärische Aberration**, welche die „Verschmierung“ eines Bildpunktes aufgrund der zusätzlichen Berücksichtigung achsferner Strahlen beschreibt, darstellbar als

$$\Delta(\rho, \theta) = A\rho^4. \quad (2.9)$$

Wird ein Objektpunkt **lateral** um x , d. h. in Richtung senkrecht zur optischen Achse versetzt, ergibt sich ein zusätzlicher Term proportional zu x , das **Koma**:

$$\Delta(\rho, \theta) = Bx\rho^3 \cos \theta. \quad (2.10)$$

Die sphärische Aberration kann für Objekte innerhalb der Brennweite durch Addieren einer geeigneten Konstante zu beiden inversen Krümmungsradien $1/r_1$ und $1/r_2$ der Linse reduziert werden („Verbiegen“ der Linse, vgl. Gl. (2.7)). Für weit entfernte Objekte empfiehlt es sich dagegen, beinahe plankonvexe Linsen zu verwenden und diese so zu orientieren, dass die flache Seite zum Bild hin zeigt. So wird die Lichtbrechung weitgehend gleichmäßig zwischen beiden Oberflächen aufgeteilt. Beispielsweise ergibt sich bei einem Brechungsindex der Linse von 1,6 die beste Reduzierung der sphärischen Aberrationen für $r_2/r_1 = -12$ [Lipson97].

Für die Vermeidung von sphärischer Aberration und Koma gibt es eine allgemeine Bedingung: Sei θ_1 der Winkel zur optischen Achse, unter dem ein Strahl das Objekt verlässt, und θ_2 der Winkel, unter dem dieser Strahl im Bildpunkt konvergiert. Gilt außerdem für alle Strahlen

$$\frac{\sin \theta_1}{\sin \theta_2} = \textit{konstant}, \quad (2.11)$$

so treten weder sphärische Aberration noch Koma auf. Diese Beziehung wird **Abbe'sche Sinusbedingung** genannt. In den meisten Fällen ist damit eine bezüglich der Mittelebene asymmetrische Linsenform verbunden. Bildverzerrungen sind dagegen am kleinsten bei Linsensystemen, die symmetrisch um ihre Mittelebene sind. Eine möglichst optimale Abbildung bedingt daher oftmals ein System aus *kombinierten Linsen*.

Chromatische Aberrationen

Die Brechkraft bzw. Brennweite einer Linse hängt nach Gl. (2.7) von ihrem Brechungsindex n ab. Aufgrund der *Dispersion* ist n wiederum von der Wellenlänge abhängig: $n = n(\lambda)$. Im sichtbaren Bereich ist $n(\lambda)$ eine streng monoton fallende Funktion, deren Werte vom Material abhängen. Die resultierenden Bildverzerrungen bei der Abbildung mit mehreren Wellenlängen können umgangen werden, indem in einer Kombination aus mehreren Linsen die Krümmungsradien r so gewählt werden, dass die Brennweiten für zwei oder mehrere Wellenlängen gleich sind.

In seiner einfachsten Ausführung besteht ein solches System aus zwei Linsen mit den Krümmungsradien r_1, r_2 und s_1, s_2 und wird *achromatisches Dublett* bzw. *Achromat* genannt. Die Brechungsindexvariation $n(\lambda)$ für jedes Glas wird durch seine *Brechzahlkurve*

beschrieben. Für optische Systeme im Sichtbaren ist sie definiert durch

$$\omega = \frac{n_b - n_r}{n_y - 1}, \quad (2.12)$$

dabei sind n_r , n_y und n_b die Brechungsindizes für rotes, gelbes und blaues Licht; üblicherweise werden die Wellenlängen 656,3 nm, 587,6 nm und 486,1 nm verwendet. Der Kehrwert von ω wird auch als *Abbezahl* bezeichnet und ist in Tabellen für optisches Material zu finden. Man kann zeigen, dass die Brennweiten für rotes und blaues Licht gleich sind, falls

$$(n_{bF} - n_{rF})\left(\frac{1}{r_1} - \frac{1}{r_2}\right) + (n_{bK} - n_{rK})\left(\frac{1}{s_1} - \frac{1}{s_2}\right) = 0 \quad (2.13)$$

gilt [Lipson97], wobei die Indizes F und K die am meisten verwendeten Gläser für chromatische Korrekturen, Flint- und Kronglas, bezeichnen. Gleichung (2.13) kann durch die jeweiligen Brennweiten für gelbes Licht f_F und f_K ausgedrückt werden:

$$\frac{\omega_F}{f_F} + \frac{\omega_K}{f_K} = 0, \quad (2.14)$$

die gemeinsame Brechkraft ist dann

$$\frac{1}{f} = \frac{1}{f_F} + \frac{1}{f_K}. \quad (2.15)$$

Die Gleichungen (2.14) und (2.15) legen nur zwei der vier Krümmungsradien fest. Damit verbleiben zwei Freiheitsgrade, welche z. B. in Achromaten dazu verwendet werden können, zusätzlich die sphärische Aberration zu korrigieren [Lipson97]. Trotzdem ist selbst bei modernen Hochleistungsobjektiven die Fokuspunktverschiebung nicht vollständig korrigiert. Bildet man punktförmige Objekte, welche mit zwei Farben gleichzeitig markiert sind, in den Bildraum ab, haben die Bilder in beiden Farbkanälen meist unterschiedliche Positionen. Deren Abstände bzw. die **chromatischen Verschiebungen in axialer** Richtung, d. h. in Richtung der optischen Achse, können, je nach Emissionswellenlänge der Farbstoffe, größer als 200 nm sein [Edelmann00].

Die Effekte der chromatischen Aberration beschränken sich nicht ausschließlich auf Verschiebungen in axialer Richtung, sondern bewirken auch eine Verzerrung der Abbildung in lateraler Richtung, d. h. senkrecht zur optischen Achse [Edelmann00]. Diese chromatischen Verschiebungen sind zwar mit einigen zehn Nanometern wesentlich kleiner, müssen jedoch genauso wie die axialen Verschiebungen in Hochpräzisions-Distanzmessungen berücksichtigt und mittels Bildverarbeitungsalgorithmen korrigiert werden, siehe auch Abschnitt 2.4.

2.2.4 Aplanatische Objektive

Unter einer **aplanatischen Sphäre** versteht man ein optisches System, bei dem auch bei der Abbildung von Strahlen mit großen Einfallswinkeln zur optischen Achse weder sphärische Aberrationen noch Koma auftreten [Lipson97]. Ihre Funktion lässt sich vollständig mit dem Snellius'schen Brechungsgesetz erklären. Sie kommt hauptsächlich in Hochleistungsobjektiven zur Anwendung (auch in dieser Arbeit), und die mit ihr erreichbare Auflösung liegt in der Nähe der theoretischen Grenze für optische Systeme, siehe auch Abschnitt 2.3.4.

Zum Verständnis der aplanatischen Sphäre betrachte man ein Objekt im Innern einer Kugel am Punkt A , dessen Abstand vom rechten Vertex V der Kugel $u = -r - r/n$ beträgt, wie in Abbildung 2.5(a) gezeigt. Wendet man auf das Dreieck ACP den geometrischen Sinussatz an, sieht man, dass $\sin \beta / \sin \alpha = 1/n$ gilt. Nach dem Snellius'schen Brechungsgesetz ist auch $\sin \beta / \sin \gamma = 1/n$, also $\alpha = \gamma$. Damit sind die Dreiecke ACP und PCA' ähnlich, und es folgt $\overline{A'C}/r = r/(r/n)$. Das bedeutet, dass immer gilt

$$\overline{A'V} = \overline{A'C} + r = r(n + 1). \quad (2.16)$$

Aus diesem Grund erscheinen alle Strahlen, die von einem Punkt mit dem Abstand r/n vom Zentrum der Kugel mit Radius r ausgehen, als stammten sie von einem Punkt der Entfernung nr vom Kugelmittelpunkt. Dieser Sachverhalt gilt für *alle* Einfallswinkel, da in der Rechnung keine Näherungen angewendet wurden. Die beiden möglichen Brennweiten für den Innen- und Außenraum sind gegeben durch $f_1 = r/(n - 1)$ und $f_2 = rn/(n - 1)$.

Wird die Kugel an einer Fläche abgeschnitten, die zwischen dem inneren aplanatischen Punkt A und V liegt, das Objekt in den Punkt A gebracht und in eine Flüssigkeit einge-

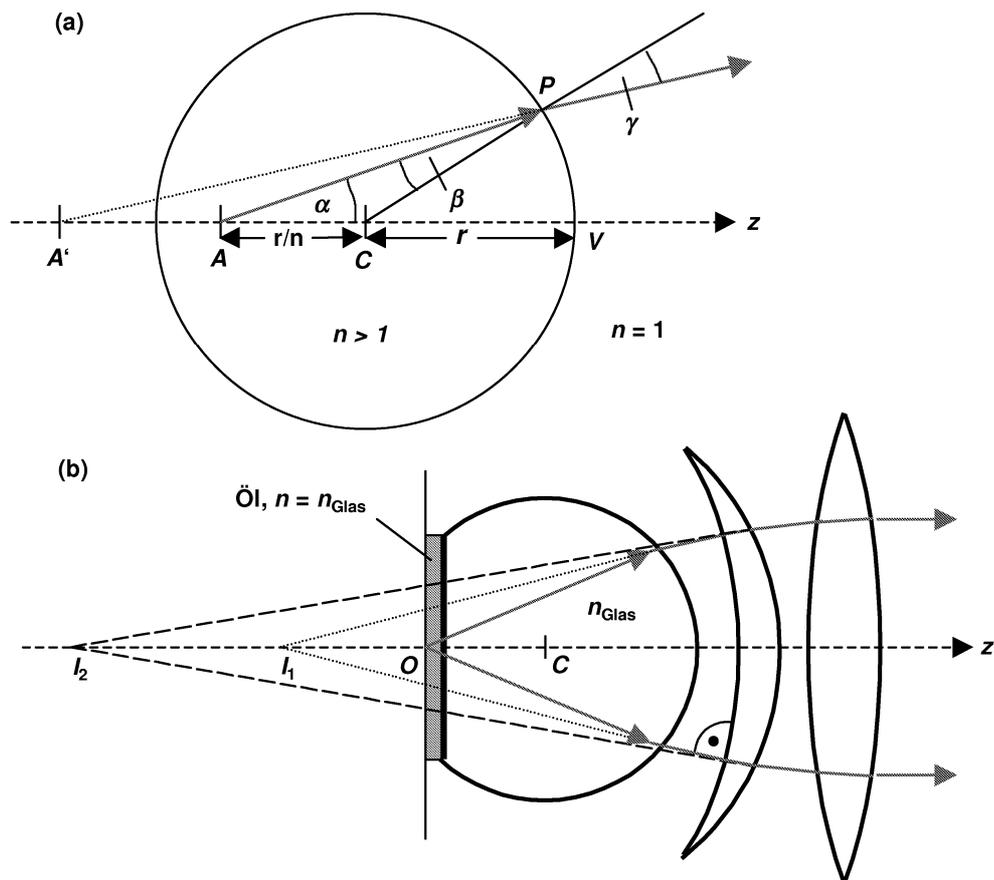


Abbildung 2.5: (a) Aplanatische Punkte A , A' , C , V und P einer Kugel mit Radius r , gezeichnet für $n = 1,5$; (b) Abbildung eines Objekts innerhalb einer Öl-Immersionsschicht in einem aplanatischen Objektiv. Dargestellt ist die Anwendung des aplanatischen Prinzips in zwei aufeinanderfolgenden Schritten. O : Objekt, I_1 , I_2 : Bilder.

bettet, welche möglichst den gleichen Brechungsindex wie Glas hat (oft wird Zedernholzöl verwendet), lässt sich eine perfekte Abbildung erreichen, siehe Abb. 2.5(b). Ein solches **Öl-Immersionssystem** kommt bei fast allen höchstauflösenden Mikroskopen zum Einsatz und bietet zusätzlich den Vorteil, dass die Auflösung aufgrund der kleineren Wellenlänge im Vergleich zu Luft zunimmt.

Die Strahlen der aplanatischen Sphäre können durch eine weitere „verbogene“ Linse abgebildet werden. Das Bild I_1 der ersten, inneren aplanatischen Sphäre befindet sich dabei im Krümmungsmittelpunkt der ersten konkaven Fläche der Linse, welche als äußere aplanatische Sphäre wirkt und das virtuelle Bild I_2 erzeugt. Dieses Bild wird durch eine weitere relativ schwache Sammellinse ins Unendliche abgebildet.

Abbildungsfehler können dadurch entstehen, dass Punkte abgebildet werden, die nicht auf der aplanatischen Sphäre liegen. Außerdem kann ein nicht optimal angepaßter Brechungsindex des Immersionsmediums die Abbildung stören und den Fokuspunkt verschieben. Bei der Verwendung von Wasser als Immersionsflüssigkeit (interessant für Untersuchungen an lebenden Zellen) ist zudem auf eine sehr exakt definierte Deckglasdicke zu achten, da das in Wasser befindliche Glas zwischen dem Objekt und der Objektivlinse aufgrund des Brechungsindexunterschiedes einen Strahlversatz bewirkt, der sehr genau korrigiert werden muss.

2.3 Bildentstehung

Die geometrische Optik ist nur solange zur Beschreibung der Bildentstehung geeignet, wie die Größe der abgebildeten Gegenstände die Wellenlänge deutlich übertrifft. Bei der Abbildung kleiner Gegenstände, also vor allem in der Mikroskopie, tragen jedoch Beugungseffekte wesentlich zur Entstehung des Bildes bei. Es folgt deshalb zunächst eine kurze Betrachtung elektromagnetischer Wellen und des Beugungsbildes eines Objekts bei der Abbildung durch eine Linse. Daraus lässt sich die *Punktbildfunktion* als wichtiges Charakteristikum optischer Mikroskope und bedeutendes Kriterium zur Bestimmung der *Auflösung* herleiten. Das in der Bildebene entstandene Bild wird schließlich mittels Detektoren *abgetastet* und *digitalisiert*, wobei eine weitere Reduktion der Objektinformation stattfindet.

2.3.1 Elektromagnetische Wellen

Die Behandlung elektromagnetischer Wellen beschränkt sich hier auf die Beschreibung in Vakuum bzw. Luft und Glas, d. h. die freie Ladungs- und Stromdichte sowie die elektrische Leitfähigkeit sind identisch null. Außerdem wird ein lineares und homogenes Medium vorausgesetzt. Damit hängen die *magnetische Induktion* \mathbf{B} und das *Magnetfeld* \mathbf{H} sowie die *dielektrische Verschiebung* \mathbf{D} und das *elektrische Feld* \mathbf{E} zusammen über

$$\mathbf{B} = \mu_r \mu_0 \mathbf{H}, \quad \mathbf{D} = \epsilon_r \epsilon_0 \mathbf{E}, \quad (2.17)$$

dabei sind μ_0 bzw. ϵ_0 die Induktions- bzw. Dielektrizitätskonstante und μ_r bzw. ϵ_r die relative Permeabilität bzw. relative Dielektrizitätskonstante. Für diese Situation lauten die **Maxwell-Gleichungen** [Nolting92]:

$$\begin{aligned}\operatorname{div}\mathbf{E} &= 0, & \operatorname{div}\mathbf{B} &= 0, \\ \operatorname{rot}\mathbf{E} &= -\dot{\mathbf{B}}, & \operatorname{rot}\mathbf{B} &= \epsilon_r\epsilon_0\mu_r\mu_0\dot{\mathbf{E}}.\end{aligned}\quad (2.18)$$

Diese Gleichungen stellen ein gekoppeltes System von linearen, partiellen und homogenen Differentialgleichungen erster Ordnung für die Felder \mathbf{E} und \mathbf{B} dar. Sie lassen sich für jede Komponente von \mathbf{E} und \mathbf{B} in die **homogene Wellengleichung** überführen [Nolting92]:

$$\left(\Delta - \frac{1}{u^2} \frac{\partial^2}{\partial t^2}\right) \psi(\mathbf{r}, t) = 0. \quad (2.19)$$

Die Konstante u hat die Dimension einer Geschwindigkeit und lässt sich mit der **Lichtgeschwindigkeit** in dem betreffenden, durch ϵ_r und μ_r charakterisierten Medium identifizieren:

$$u = \frac{1}{\sqrt{\epsilon_r\epsilon_0\mu_r\mu_0}} = \frac{c}{n} \quad (2.20)$$

mit dem **Brechungsindex**

$$n = \sqrt{\epsilon_r\mu_r}. \quad (2.21)$$

Die Differentialgleichung (2.19) besitzt mehrere Lösungen, die die Ausbreitung elektromagnetischer Wellen beschreiben. Eine Klasse von Lösungen beschreibt die Ausbreitung **ebener Wellen** wie z. B. parallele, auf eine Linse zulaufende Lichtstrahlen (hier und im Folgenden wird nur die Teillösung für das \mathbf{E} -Feld von ψ betrachtet):

$$\mathbf{E}(\mathbf{r}, t) = \mathbf{E}_0 e^{i(\mathbf{k}\cdot\mathbf{r} - \omega t + \varphi)}. \quad (2.22)$$

Hierbei gibt der *Wellenvektor* \mathbf{k} mit $k = 2\pi/\lambda$ die Ausbreitungsrichtung der Welle an, und die Kreisfrequenz ω ist über $\omega = 2\pi\nu$ mit der Frequenz ν verknüpft. Für die **Phasengeschwindigkeit** bzw. Ausbreitungsgeschwindigkeit der Welle gilt $u = \omega/k$ (vgl. Gl. (2.19)), φ gibt die Phasenlage bzw. Phase der Welle relativ zum Koordinatenursprung an. Aus Gl. (2.19) folgt auch, dass es sich um eine **transversale Welle** handelt, da \mathbf{E} immer senkrecht auf \mathbf{B} steht und beide wiederum senkrecht auf \mathbf{k} stehen. **Linear polarisierte Wellen** sind dadurch gekennzeichnet, dass sich der Vektor \mathbf{E}_0 in Gl. (2.22) zeitlich nicht verändert, z. B. indem $E_x = \text{konst.}$ und $E_y, E_z = 0$.

Eine weitere wichtige Klasse von Lösungen von Gl. (2.19) sind **Kugelwellen**. Dieser Gestalt sind z. B. Wellen, die konvergierende Lichtstrahlen nach dem Durchgang durch eine Linse beschreiben:

$$\mathbf{E}(\mathbf{r}, t) = \mathbf{E}_0 \frac{1}{r} e^{i(\mathbf{k}\cdot\mathbf{r} - \omega t + \varphi)}. \quad (2.23)$$

Für den Wellenvektor, die Kreisfrequenz, die Phasengeschwindigkeit und die Phasenlage gelten die gleichen Beziehungen wie für ebene Wellen; ebenso handelt es sich hier um transversale Wellen. Die **Wellenfronten**, d. h. Punkte gleicher Phase bzw. gleichen E -Wertes liegen allerdings nicht auf parallelen Ebenen, sondern auf konzentrischen Kugelflächen mit Radius r . Die Amplitude nimmt mit wachsendem Abstand vom Ursprung gemäß $1/r$ ab.

Detektoren wie z. B. CCD-Kameras messen nicht die Größe des elektrischen Feldes, sondern die **Intensität** \mathbf{I} des Lichts bzw. deren zeitliches Integral. Die Intensität der Welle ist mit der Amplitude \mathbf{E}_0 verknüpft über [Nolting92]

$$\mathbf{I}(\mathbf{r}, t) = \frac{1}{2} \sqrt{\frac{\epsilon_r\epsilon_0}{\mu_r\mu_0}} |\mathbf{E}_0|^2 \frac{\mathbf{k}}{k}. \quad (2.24)$$

In theoretischen Abhandlungen wird Gl. (2.24) auch als *zeitlich gemittelte Energiestromdichte* bezeichnet.

Beim Übergang einer elektromagnetischen Welle von einem Medium in ein anderes, z. B. beim Durchgang einer Welle durch eine Linse, kommt es zu Reflexions- und Brechungseffekten. Auch diese Effekte lassen sich aus den Maxwell-Gleichungen unter Berücksichtigung geeigneter Randbedingungen berechnen. Diese Bedingungen bestehen im wesentlichen aus der Forderung, dass die Komponenten von \mathbf{E} und \mathbf{H} parallel zur Oberfläche auf beiden Seiten gleich sein müssen, entsprechend die Normalkomponenten von \mathbf{D} und \mathbf{B} . Insbesondere lassen sich das Brechungsgesetz von Snellius, das Verschwinden der Reflexion von parallel polarisiertem Licht unter dem *Brewster-Winkel* sowie die *Totalreflexion* beim Übergang einer Welle in ein Medium mit kleinerem Brechungsindex herleiten. Außerdem kann die teilweise Reflexion von Licht an einer Grenzfläche richtig beschrieben werden. Beim Durchgang des Lichts durch ein Linsensystem würden diese Reflexionen die Lichtintensität deutlich schwächen, daher sind die Glasoberflächen von Linsen oft durch das Aufbringen von reflexmindernden Schichten *vergütet*.

2.3.2 Abbildung durch eine begrenzte Linse

Bei der Abbildung durch eine Linse treten an den Rändern der Linse bzw. an den Rändern der Linsenfassung Beugungseffekte auf, die sich mit der **Fraunhofer-Beugung** beschreiben lassen. Die Fraunhofer-Beugung ist im Gegensatz zur *Fresnel-Beugung* durch eine bezüglich der lateralen Koordinaten (x, y) linearen Veränderung der Phase des Lichts charakterisiert. Experimentell bedeutet dies, dass sowohl die Lichtquelle als auch das Bild unendlich weit vom abzubildenden Beugungsobjekt entfernt sein müssen. Darum werden Beugungseffekte hier nur näherungsweise, aber für die meisten praktischen Zwecke trotzdem ausreichend beschrieben.

Betrachtet wird ein bei $z = -g$ befindliches Beugungsobjekt, charakterisiert durch die **Amplitudentransmissionsfunktion** $f_t(x, y)$, wie in Abbildung 2.6 gezeigt. Die von links ankommende Lichtwelle breitet sich parallel zur z -Achse aus, d. h. die Wellenfronten

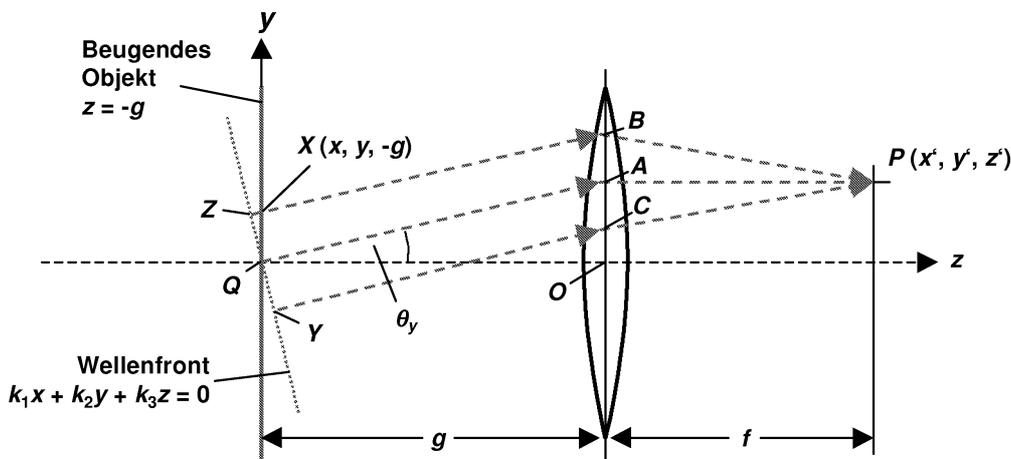


Abbildung 2.6: Zur Fraunhofer-Beugung an einem zweidimensionalen Objekt. Die Objektebene steht senkrecht auf der Zeichenebene.

stehen senkrecht auf der z-Achse, und das gebeugte Licht wird von einer dünnen Linse der Brennweite f gesammelt, die sich in einer zur z-Achse senkrechten Ebene befindet.

Alle Lichtwellen, die die Beugungsebene bei $z = -g$ unter einem bestimmten Winkel verlassen, werden von der Linse in einem Punkt der Brennebene fokussiert. In der Abbildung sind z. B. die Strecken \overline{XB} , \overline{QA} und \overline{YC} parallel und konvergieren jeweils im Punkt P . Daher ist die Amplitude des Lichts in P gleich der Summe der Amplituden der von X , Q , Y ... ausgehenden parallelen Lichtwellen, jeweils mit dem passenden Phasenfaktor $\exp(ik\overline{XBP})$ versehen. Dabei bedeutet \overline{XBP} die optische Weglänge von X nach P über den Ort B in der Linse.

Die Amplitude im Punkt X der Ebene mit den Koordinaten $(x, y, -g)$ ist gleich der Amplitude der einfallenden Welle (hier auf 1 gesetzt) multipliziert mit der Transmissionsfunktion $f_t(x, y)$. Für die Berechnung des optischen Wegs \overline{XBP} lässt sich das **Fermat'sche Prinzip** anwenden. Danach sind alle optischen Weglängen von verschiedenen Punkten auf einer Wellenfront zum Brennpunkt gleich lang. Die Richtung von \overline{XB} , \overline{QA} , ... ist identisch mit dem Normalenvektor $\mathbf{k} = (k_1, k_2, k_3)$ mit $|\mathbf{k}| = 1$, der die Richtung der Wellenfronten bestimmt. Das heißt, die durch Q gehende und in P fokussierte Wellenfront ist gegeben durch

$$k_1x + k_2y + k_3z = 0, \quad (2.25)$$

und alle optischen Wege innerhalb dieser Wellenfront von Z , Q , ... nach P sind gleich. Wenn k_2 den Richtungskosinus zwischen dem Normalenvektor und der y-Achse darstellt, dann ist $\overline{ZX} = k_2 \cdot \overline{QX} = k_2 \cdot y$, vgl. Abb. 2.6, entsprechendes gilt für die x-Achse. Man kann also schreiben

$$\overline{ZX} = k_1x + k_2y. \quad (2.26)$$

Setzt man noch $\overline{AP} = k_3 \cdot z$, folgt daraus

$$\overline{XBP} = \overline{QA} + k_3z - k_1x - k_2y. \quad (2.27)$$

Die Gesamtamplitude in P lässt sich nun bis auf einen konstanten, von der absoluten Intensität abhängigen Faktor durch Integration von $f_t(x, y) \exp(ik\overline{XBP})$ über das Beugungsobjekt berechnen:

$$E_{0,P} = e^{ik\overline{QA}} \int \int \int f_t(x, y) e^{ik(k_3z - k_1x - k_2y)} dx dy dz. \quad (2.28)$$

Da zeitliche Variationen des E-Feld-Betrags hier nicht von Belang sind, kann der Zeitanteil $\sim \exp(i\omega t)$ weggelassen werden (vgl. Gl. (2.24)).

Der Richtungskosinus k_1 bzw. k_2 ist identisch mit dem Sinus des Winkels θ_x bzw. θ_y zwischen der Wellenfront und der x- bzw. y-Achse, d. h. $k_1 = \sin \theta_x$ und $k_2 = \sin \theta_y$. Daher kann die Position des Bildes P beschrieben werden, indem man die lateralen Bildkoordinaten $u = k_1k$ und $v = k_2k$ sowie $w = k_3k$ für die axiale Richtung verwendet. Man erhält

$$E_0(u, v, w) = e^{ik\overline{QA}} \int \int \int f_t(x, y) e^{i(wz - ux - vy)} dx dy dz. \quad (2.29)$$

Wenn die Brennweite der Linse bekannt ist, können die Bildkoordinaten von $P(x', y', z')$ bezüglich des Mittelpunkts O der Linse mit u , v und w verbunden werden. In der paraxialen Näherung ist $k_3 \approx 1$, also folgt für kleine Winkel

$$x' = f \frac{k_1}{k_3} \approx f \frac{u}{k}, \quad y' = f \frac{k_2}{k_3} \approx f \frac{v}{k} \quad \text{und} \quad z' = f \frac{k_3}{k_3} \approx f \frac{w}{k} \approx f. \quad (2.30)$$

Zur Berechnung des **lateralen** Beugungsbildes können die Terme in Gl. (2.29), welche w bzw. z enthalten, wegen des Fermat'schen Prinzips weggelassen werden. Gleiches gilt für den Phasenfaktor $\exp(ik\overline{QA})$, da am Ort P nur die Intensität von Interesse ist. Damit folgt für die Amplitude des elektrischen Feldes an der Stelle (u, v) [Lipson97]:

$$E_0(u, v) = \iint f_t(x, y) e^{-i(ux+vy)} dx dy. \quad (2.31)$$

Das Beugungsbild der Fraunhofer-Beugung ist also durch die **zweidimensionale Fourier-Transformation** der Transmissionsfunktion $f_t(x, y)$ des Beugungsobjekts gegeben.

Um das Beugungsbild einer Linse zu berechnen, deren effektive Fläche z. B. durch eine runde Blende mit Durchmesser r_0 begrenzt wird, muß Gl. (2.31) über die Blendenöffnung integriert werden. Dabei wird die Amplitudentransmissionsfunktion f_t in der Blendenöffnung auf 1 und sonst auf 0 gesetzt. Es bietet sich an, **Polarkoordinaten** sowohl für Punkte auf der Blende als auch im Beugungsmuster zu verwenden. Setzt man diese in Gl. (2.31) ein, erhält man ein Integral, das mit Hilfe der **Besselfunktion** erster Ordnung J_1 gelöst wird. Die Lösung ist rotationssymmetrisch bezüglich der optischen Achse, d. h. sie hängt, sofern die Beleuchtung der Linse mit zur optischen Achse parallelen Strahlen erfolgt und P auf der z -Achse liegt, nur noch vom Abstand r' zur optischen Achse ab. Man erhält schließlich zusammen mit Gl. (2.30)

$$I_{\text{lateral}}(p) = I_0 \left(\frac{2J_1(p)}{p} \right)^2. \quad (2.32)$$

Abbildung 2.7(a) zeigt den Verlauf von (2.32). p ist die *generalisierte optische Koordinate* [Born83]:

$$p = \frac{2\pi}{\lambda} \frac{r_0}{f} \cdot r' \quad \text{mit} \quad r' = \sqrt{x'^2 + y'^2}, \quad (2.33)$$

dabei bezeichnet λ die Wellenlänge. Das zugehörige Beugungsbild nennt man **Airy-Scheibe**.

Eine qualitative Herleitung des **axialen** Beugungsbildes der Linse unter den gleichen Bedingungen wie oben besteht darin, Gl. (2.29) zunächst über die laterale Blendenöffnung zu integrieren. Dabei können u und v auf 0 gesetzt werden, da sich P auf der optischen Achse befindet. Setzt man f_t wie oben innerhalb der Blende auf 1, sonst auf 0, ergibt sich

$$E_0(w) = \pi r_0^2 \int e^{ikz} dz. \quad (2.34)$$

Das Ergebnis dieses Integrals ist die Fourier-Transformierte $F(k)$ eines Rechteckpulses mit der Breite b : $F(k) = \sin(kb/2)/(kb/2) = \text{sinc}(kb/2)$. Das heißt, das axiale Beugungsbild kann als Fourier-Transformation eines Rechteckpulses auf der optischen Achse interpretiert werden.

Eine ausführliche Herleitung der axialen Intensitätsverteilung kann in [Gu00] nachgeschlagen werden. Als Ergebnis wird dort die folgende, in Abbildung 2.7(b) dargestellte Funktion angegeben:

$$I_{\text{axial}}(q) = I_0 \left(\frac{\sin(q/4)}{q/4} \right)^2 \quad (2.35)$$

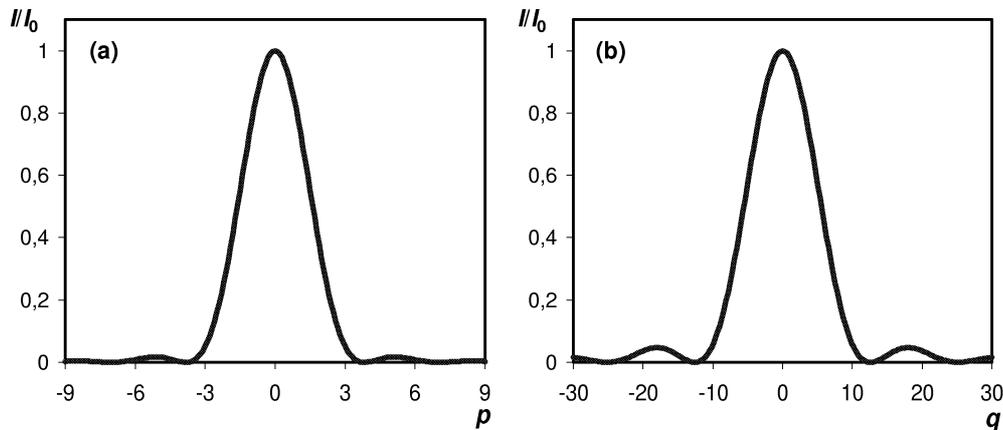


Abbildung 2.7: Intensitätsverteilung im Fokus einer dünnen, durch eine runde Blende begrenzten Linse. (a) innerhalb der Fokusebene, (b) entlang der optischen Achse. p , q : generalisierte optische Koordinaten.

mit der generalisierten optischen Koordinate

$$q = \frac{2\pi}{\lambda} \frac{r_0^2}{f^2} \cdot (z' - f). \quad (2.36)$$

Es bleibt nochmals zu bemerken, dass die hier dargestellten Intensitätsverläufe nur im Rahmen der paraxialen Näherung gerechnet wurden. Trotzdem entsprechen sie gemessenen Intensitätsverläufen auf der optischen Achse und in der Fokusebene relativ gut [Bornfleth98b]. Eine weitere sehr ausführliche Behandlung des Themas, auch unter Berücksichtigung größerer Winkel, findet sich ebenfalls in [Gu00].

2.3.3 Punktbildfunktion

Wie im vorhergehenden Abschnitt gezeigt, haben die Lichtwellenlänge und die Eigenschaften einer Linse großen Einfluss auf die Intensitätsverteilung im Fokuspunkt. Vor allem der effektive Radius bzw. der Linsendurchmesser und die Brennweite sind in diesem Zusammenhang entscheidende Größen, wie (2.32) und (2.35) zeigen. Es stellt sich nun die Frage, inwiefern sich diese Parameter auf das von der Linse erzeugte Bild auswirken.

Die Herleitung in Abschnitt 2.3.2 ging von einer mit parallelem Licht beleuchteten Linse aus. Beim Abbildungs-Strahlengang eines Mikroskops liegt allerdings gerade die umgekehrte Situation vor, d. h. die Linse erzeugt ein Bündel paralleler Strahlen von einem im Fokuspunkt auf der optischen Achse befindlichen, leuchtenden Objekt, vgl. Abb. 2.3. Die Umkehrbarkeit optischer Strahlengänge erlaubt nun folgendes (Gedanken-)Experiment: Das Objekt sei unendlich klein, und es würden nur die Strahlen aufgefangen, welche von der Linse genau in Richtung der z -Achse gebündelt würden. Würde man dann die gemessene Intensität über dem Abstand des Objekts von der optischen Achse innerhalb der Fokusebene und über seiner Entfernung auf der optischen Achse vom Fokuspunkt auftragen, erhielte man dieselben Intensitätsverläufe wie in Abb. 2.7 dargestellt.

Die laterale Intensitätsverteilung erhält man direkt als Bild, indem man alle parallelen Strahlen (nicht nur die, die parallel zur optischen Achse verlaufen) mit einer weiteren Linse z. B. auf einen Schirm abbildet. Die Größe des Bildes hängt dann von den Brennweiten der Linsen ab. Um den axialen Intensitätsverlauf zu messen, muss man das Objekt jedoch, wie oben angedeutet, relativ zur Fokusebene der ersten Linse, d. h. im Objektraum in axialer Richtung bewegen und die Intensitäten in der Bildebene der zweiten Linse bei verschiedenen Objektpositionen z detektieren. Natürlich könnten hierbei auch an den Rändern der zweiten Linse Beugungseffekte entstehen, die berücksichtigt werden müssten. Hat die zweite Linse aber einen deutlich größeren Radius als die erste, tritt an ihren Rändern keine Beugung mehr auf.

Das bedeutet, dass von einem punktförmigen Objekt kein punktförmiges Bild, sondern eine ausgedehnte Intensitätsverteilung erzeugt wird. Dieser Intensitätsverlauf heißt **Punktantwort** und wird durch die **Punktbildfunktion** bzw. **PSF** (Point Spread Function = „Punkt-Ausbreitungsfunktion“) beschrieben. Damit wird die *Abbildungseigenschaft* eines optischen Systems charakterisiert, die durch Messung von im Vergleich zur Wellenlänge kleinen Objekten einfach bestimmt werden kann.

Gl. (2.32) und (2.35) sind also identisch mit der Punktbildfunktion h eines *konventionellen Mikroskops* bzw. eines *Epifluoreszenz-Mikroskops*. In der Fokusebene gilt

$$h_{z=0}(r) = h_0 \left(\frac{2J_1(p(r))}{p(r)} \right)^2, \quad (2.37)$$

dabei bezeichnet r den Abstand zur optischen Achse. Auf der optischen Achse ist

$$h_{r=0}(z) = h_0 \left(\frac{\sin(q(z)/4)}{q(z)/4} \right)^2, \quad (2.38)$$

hierbei gibt z den Abstand zum Fokuspunkt an. Die generalisierten optischen Koordinaten $p(r)$ und $q(z)$ werden jetzt durch die Wellenlänge λ , den Brechungsindex n des Immersionsmediums und die **Numerische Apertur** NA der Linse bzw. des Objektivs ausgedrückt [Born83]:

$$p(r) = \frac{2\pi}{\lambda} NA \cdot r \quad \text{und} \quad q(z) = \frac{2\pi}{\lambda} \frac{NA^2}{n} \cdot z. \quad (2.39)$$

Die Gleichungen (2.37) und (2.38) beschreiben eine Abbildung mit der Vergrößerung $V = 1$. Allgemein kann die Vergrößerung berücksichtigt werden, indem man r in (2.37) bzw. (2.39) durch V und h_0 in (2.37) und (2.38) durch V^2 dividiert.

Die numerische Apertur ist neben der Vergrößerung die wichtigste Kennzahl eines Objektivs und bestimmt seine **Auflösung** (siehe unten). Die numerische Apertur berechnet sich nach

$$NA = n \cdot \sin \alpha \approx n \cdot \frac{r_0}{f} \quad (2.40)$$

mit dem Radius r_0 der Objektivlinse und der Brennweite f des Objektivs. Der Winkel α wird als halber *Öffnungswinkel* des Objektivs bezeichnet. Moderne Öl-Hochleistungsobjektive besitzen eine numerische Apertur von normalerweise 1,4 bei einem Brechungsindex von $n \approx 1,5$.

2.3.4 Auflösungsvermögen

Jedes Objekt lässt sich aus vielen einzelnen Punkten zusammensetzen, von denen jeder eine Intensitätsverteilung in die Bildebene projiziert, die der PSF entspricht. Das Bild entsteht daher durch räumliche Integration über alle Punktantworten [Jähne97]. Seien $I'(\mathbf{r}')$ die zu den Objektpunkten konjugierten, d. h. ohne Abbildungsstörungen abgebildeten Bildpunkte, berechnet sich die Intensität am Ort \mathbf{r} also über die **Faltung** der Bildpunkte mit der Punktbildfunktion h :

$$I(\mathbf{r}) = \int I'(\mathbf{r}')h(\mathbf{r} - \mathbf{r}')d^3r' = (I' * h)(\mathbf{r}), \quad (2.41)$$

dabei sei h nicht vom Ort \mathbf{r}' abhängig. Diese Operation bewirkt eine „Verschmierung“ des Bildes und damit eine Reduzierung der Auflösung.

Es gibt kein universelles Kriterium zur genauen Bestimmung der Auflösung, je nach Fragestellung und konkreten Rahmenbedingungen werden unterschiedliche Kriterien verwendet. Oftmals betrachtet man die Abbildung von *zwei* dicht nebeneinander liegenden punktförmigen Objekten und definiert als Auflösung denjenigen minimalen Abstand, bei dem die Objekte noch als getrennt wahrgenommen werden können. Das bekannteste Kriterium hierfür ist das **Rayleigh-Kriterium** für *inkohärent* leuchtende bzw. emittierende Objekte. Es definiert die Auflösung als den Abstand zweier Punkte, in dem sich das Maximum der PSF des einen Punktes an der Stelle des ersten Minimums der PSF des anderen Punktes befindet. Die Funktion (2.37) hat ihr erstes Minimum bei der ersten Nullstelle der Besselfunktion $J_1(p)$, d. h. bei $p = 3,83$. In axialer Richtung (Gl. (2.38)) befindet sich das erste Minimum bei $q = 4\pi$. Daraus folgt für den minimalen Abstand r_{min} in der Fokusebene und z_{min} auf der optischen Achse

$$r_{min} = 0,61 \frac{\lambda}{NA} \quad \text{und} \quad z_{min} = 2 \frac{n\lambda}{NA^2}. \quad (2.42)$$

Den entsprechenden Verlauf der Einzelintensitäten und der Gesamtintensität zweier in der Fokusebene befindlicher Punkte zeigt Abbildung 2.8(a).

Alternativ bietet sich das **Sparrow-Kriterium** an. Es basiert auf der Eigenschaft des menschlichen Auges, *Intensitätsunterschiede* gut wahrnehmen zu können [Lipson97]. Hierbei werden zwei gleich intensive Punkte dann als aufgelöst betrachtet, wenn ihre gemeinsame Intensitätsfunktion I_G entlang ihrer Verbindungslinie ein Minimum besitzt, also $d^2I_G/dr^2 = 0$. Für die laterale Richtung erhält man den Wert $r_{min} = 0,48 \cdot \lambda/NA$. Man bekommt ein anderes Bild, wenn man nicht, wie bisher stillschweigend angenommen, von zwei *inkohärenten*, sondern von zwei *kohärenten* Objekten bzw. Lichtpunkten ausgeht. In diesem Fall müssen erst die Amplituden von beiden Objekten $E_{1,2}$ addiert werden, und dann wird die Summe quadriert, also $I \sim (E_1 + E_2)^2$ und nicht $I \sim E_1^2 + E_2^2$. Emittieren beide Lichtquellen mit der gleichen Phase, liefert das Sparrow-Kriterium nun den größeren Wert $r_{min} = 0,73 \cdot \lambda/NA$ für die Auflösung in lateraler Richtung. Dies zeigt die große *Bedeutung von inkohärenter Beleuchtung* in der Mikroskopie. Sorgt man jedoch dafür, dass beide Objekte mit unterschiedlichen Phasen emittieren, kann die Auflösung in einigen Fällen auch erhöht werden wie z. B. bei der in der Photolithographie verwendeten *Phasenmaske*.

Im speziellen Fall der Fluoreszenzmikroskopie kann allerdings die Emission der Farbstoffe (auf diese kommt es ja an) selbst bei kohärenter Beleuchtung als **inkohärent** angesehen werden, so dass die Auflösung nur für den inkohärenten Fall betrachtet werden

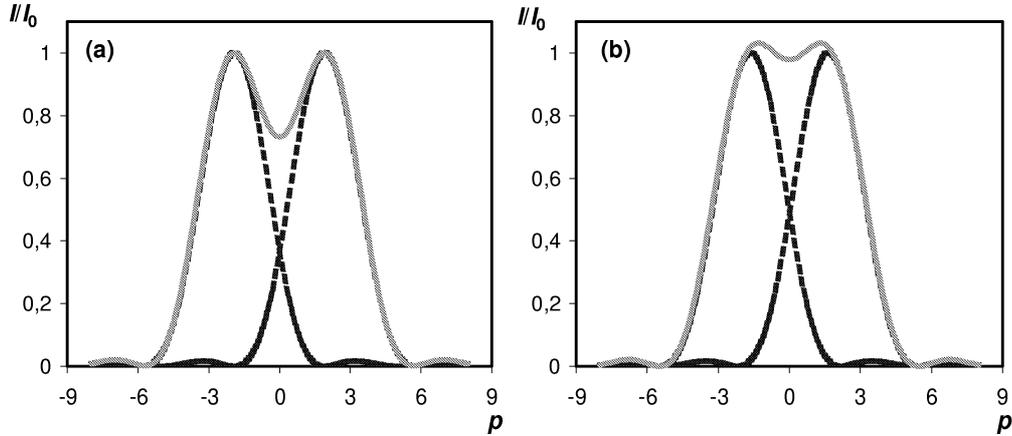


Abbildung 2.8: Überlagerung der Bilder zweier punktförmiger Objekte bei inkohärenter Beleuchtung mit einem Abstand, der (a) dem Rayleigh-Kriterium und (b) dem FWHM-Kriterium entspricht. Gestrichelt: Einzelintensitäten; Durchgezogen: Gesamtintensität. p : laterale generalisierte optische Koordinate.

muss. Der Grund liegt in der kurzen Kohärenzlänge von Fluoreszenzlicht (s. Gl. (2.1)), die verhindert, dass sich in der Bildebene störende Interferenzen ausbilden können.

Ein weiteres gebräuchliches Kriterium besteht darin, die Auflösung mit der sogenannten **Halbwertsbreite** der PSF (Full Width at Half Maximum, **FWHM**) gleichzusetzen, d. h. mit ihrer Breite bei der halben Maximalintensität. Ausgehend von Gl. (2.37) beträgt die FWHM innerhalb der Fokusebene

$$FWHM_{\text{lateral}, z=0} = 0,52 \frac{\lambda}{NA}, \quad (2.43)$$

auf der optischen Achse folgt aus Gl. (2.38)

$$FWHM_{\text{axial}, r=0} = 1,77 \frac{n\lambda}{NA^2}. \quad (2.44)$$

Abbildung 2.8(b) zeigt die Intensitätsverläufe von zwei Punkten in der Fokusebene im Abstand $FWHM_{\text{lateral}}$. Setzt man $\lambda = 550 \text{ nm}$, $NA = 1,4$ und $n = 1,5$ ein, erhält man eine laterale Auflösung von $\approx 200 \text{ nm}$ und in axialer Richtung ein Auflösungsvermögen von $\approx 750 \text{ nm}$. Besonders hervorzuheben ist an dieser Stelle, dass – unabhängig davon, welches Kriterium man verwendet – die laterale Auflösung ca. *dreimal* höher ist als die axiale Auflösung.

Man kann sich die durch die Faltung in Gl. (2.41) verursachte endliche Auflösung anhand der Abbildung einer periodischen Struktur veranschaulichen: Solange deren Wiederholungslänge bzw. *Wellenlänge* größer als die Breite der PSF ist, treten keine wesentlichen, beugungsbedingten Abbildungsfehler auf. Bei kleineren Wellenlängen umfasst die PSF aber mehr als ein lokales Maximum bzw. Minimum der Welle, und von Strukturen mit sehr kleinen Wellenlängen wird schließlich nur noch eine Fläche konstanter Intensität abgebildet. Diese Betrachtung zeigt die Bedeutung periodischer Strukturen auf und führt hin zum Verständnis der Abbildung im Fourier-Raum und zur Verwendung der optischen Transferfunktion, siehe auch Abschnitt 2.3.5.

Verbesserung der Auflösung

Aus den Betrachtungen über das Zustandekommen der Punktbildfunktion im Zusammenhang mit Gl. (2.31) folgt, dass die laterale Punktantwort der Fourier-Transformierten der Blendenöffnung der Objektivlinse entspricht. Das bedeutet, dass durch Verändern der Blendenform die Punktbildfunktion modifiziert werden kann. Eine solche Technik der *räumlichen Filterung* ist die **Apodisation**. Eine mögliche Änderung der Blendenform besteht darin, das Zentrum der Linse abzudecken, so dass die resultierende PSF der Fourier-Transformierten einer Ringöffnung gleicht (quadrierte Bessel-Funktion 0. Ordnung J_0^2). Wendet man darauf das Rayleigh- bzw. das Sparrow-Kriterium an, findet man $r_{min} = 0,38\lambda/NA$ bzw. $r_{min} = 0,35\lambda/NA$ verglichen mit $r_{min} = 0,61\lambda/NA$ und $r_{min} = 0,48\lambda/NA$ [Lipson97]. Allerdings sind hierbei die Nebenmaxima bzw. Beugungsringe im Vergleich zur lateralen PSF-Funktion (2.37) wesentlich stärker ausgeprägt, so dass diese Methode wenig zur Anwendung gelangt. Ein weiterer Nachteil besteht in der Verringerung der Bildintensität, da nur die Randbereiche der Linse zum Photonenfluss beitragen. Die Verwendung anderer Blendenformen beinhaltet ähnliche Schwierigkeiten.

Bis jetzt wurde zur Bestimmung der Punktbildfunktion von einer räumlich gleichmäßigen, homogenen Beleuchtung des Objektraumes ausgegangen. Eine Folge dieser Homogenität bestand in der Unabhängigkeit der PSF von der Lage des Objektpunktes. Modifiziert man die *Beleuchtung*, d. h. die Form des Anregungslichtfelds im Objektraum, ändern sich die Abbildungseigenschaften des optischen Systems. Man beschreibt nun die Beleuchtung bzw. Anregung durch die sogenannte **Anregungs-PSF** h_L , und die bisher diskutierte Punktbildfunktion wird als **Detektions-PSF** h_D bezeichnet. Nach [Lindek95] ist dann die **Gesamt-PSF** h_G gleich dem Produkt

$$h_G(\mathbf{r}) = h_L(\mathbf{r}) \cdot h_D(\mathbf{r}). \quad (2.45)$$

Das heißt, die Detektions-PSF hängt nur vom Detektionssystem ab, also hauptsächlich vom verwendeten Objektiv, während die Anregungs-PSF von der Form des Lichtfelds, in dem sich das Objekt befindet, abhängig ist. Alle bisher angestellten Betrachtungen bezüglich der Punktbildfunktion bezogen sich auf ein System, dessen Anregungs-PSF überall den Wert 1 besitzt. Daraus folgt, dass durch eine Modifikation der Form des Anregungslichtfelds bzw. der Beleuchtung die Halbwertsbreite der Gesamt-PSF reduziert und damit die Auflösung eines Mikroskops erhöht werden kann. Dieses Prinzip ist von fundamentaler Bedeutung für moderne Verfahren zur Verbesserung der Auflösung wie z. B. die konfokale Laser-Raster-Mikroskopie (CLSM-Mikroskopie) oder die Methoden des sogenannten „*Point-Spread-Function-Engineering*“. Auch in der in dieser Arbeit realisierten Mikroskopie mit räumlich modulierter Anregung fand dieses Prinzip Anwendung (siehe Abschnitt 3.1.2).

Praktisch erreichbare Auflösung

In der Praxis verändern viele Effekte, abgesehen von den oben durchgeführten Näherungen bei ihrer Berechnung, die Form der PSF und reduzieren damit die erreichbare Auflösung. Zunächst ist die axiale Punktbildfunktion (2.38) aufgrund des Einflusses des Deckglases meist nicht exakt symmetrisch [Hell93]. Eigenschaften der Probe und ihrer Umgebung stören die Abbildung: Die verwendeten Öl-Immersionsobjektive sind meist auf Deckgläser

und Öl mit einem Brechungsindex von $n = 1,515$ korrigiert (Zeiss), Einbettungsmedien besitzen dagegen oftmals einen leicht unterschiedlichen Brechungsindex, z. B. Vectashield Antifade mit $n \approx 1,46$ [Edelmann99a]. Hinzu kommen Brechungsindexvariationen hervorgerufen durch Strukturen innerhalb der Zellen. Bei schwach fluoreszierenden Objekten ist die PSF aufgrund der Photonenstatistik zudem merklich verrauscht, d. h. das Signal-zu-Rausch-Verhältnis fällt stark ab.

Auf der Geräteseite kommen zusätzliche Rauschanteile z. B. durch das Ausleserauschen von CCD-Chips elektronischer Kameras hinzu. Eine mangelnde Digitalisierungstiefe kann dazu führen, dass nah beieinanderliegende Intensitäten nicht mehr unterschieden werden können (vgl. Sparrow-Kriterium). Außerdem erfolgt die Detektion der Lichtintensität immer nur an diskreten Punkten bzw. Flächen des Bildraums (Abtastweite), siehe dazu auch Abschnitt 2.4. Trotzdem verschlechtert sich die tatsächliche Auflösung meist nicht um mehr als das Zweifache gegenüber dem theoretischen Limit, vorausgesetzt, *alle* Komponenten des optischen System sind optimal aufeinander abgestimmt.

2.3.5 Optische Transferfunktion

Die Faltung (2.41) ist eine relativ komplexe Operation. Aus diesem Grund kommt der Fourier-Transformierten der Punktbildfunktion $h(\mathbf{r})$, d. h. der **optischen Transferfunktion** (OTF) $\hat{h}(\mathbf{k})$ große Bedeutung zu, denn nach dem *Faltungstheorem* entspricht eine Faltung im Ortsraum einer einfachen Multiplikation komplexer Zahlen im Fourier-Raum. Das heißt, die Bildentstehung wird dort durch eine *Multiplikation* der Fourier-Transformierten \hat{I}' des Objekts mit $\hat{h}(\mathbf{k})$ beschrieben:

$$I(\mathbf{r}) = (I' * h)(\mathbf{r}) \quad \Leftrightarrow \quad \hat{I}(\mathbf{k}) = (\hat{I}' \cdot \hat{h})(\mathbf{k}). \quad (2.46)$$

Die Behandlung des Abbildungsprozesses mit Hilfe der OTF bietet zudem oftmals einen leichteren anschaulichen Zugang zu bestimmten Abbildungsphänomenen.

Die optische Transferfunktion $\hat{h}(\mathbf{k})$ gibt an, wie stark eine periodische räumliche Struktur mit der Wellenlänge λ bzw. dem Wellenvektor \mathbf{k} ($|\mathbf{k}| = k = 2\pi/\lambda$) durch ein optisches System übertragen wird. $\hat{h}(\mathbf{k}) = 1$ bedeutet vollständige Transmission, ist $\hat{h}(\mathbf{k}) = 0$, wird die entsprechende Struktur gar nicht abgebildet. Als Beispiel stelle man sich die Abbildung eines Gitters mit der Gitterkonstante $d = \lambda = 500$ nm durch ein Objektiv mit der numerischen Apertur von 1,4 bei einer Wellenlänge von 550 nm vor. Nach dem FWHM-Kriterium beträgt die Auflösung dann 200 nm, so dass das Gitter nahezu unverfälscht abgebildet wird, also $\hat{h}(k = 2\pi/\lambda) \approx 1$. Von einem Gitter mit $d = 150$ nm wäre dagegen kaum noch etwas zu sehen ($\hat{h} \ll 1$).

Zur Herleitung der Gestalt der OTF bietet es sich an, zunächst die *Amplituden-Transmissionsfunktion* zu verwenden [Heintzmann99]. Sie gibt an, mit welcher Stärke eine Welle mit einer gegebenen *Amplitude* transmittiert wird. Betrachtet man ein mit der Wellenlänge λ_0 kohärent emittierendes punktförmiges Objekt, liegen alle k_0 -Vektoren des Emissionslichts im reziproken Raum auf einer Kugel mit Radius k_0 . Von diesen können nur die von einer Objektivlinse aufgefangen werden, die auf einer Kugelschale mit dem Öffnungswinkel 2α (vgl. NA) liegen, wie in Abbildung 2.9(a) gezeigt. Wegen der Beschränkung auf eine Wellenlänge wird der Bereich auf der Kugelschale auch *kohärente* OTF genannt. Die maximale Raumfrequenz in lateraler Richtung beträgt $4\pi(\sin \alpha)/\lambda$, in axialer Richtung ist $k_{z,max} = 2\pi(1 - \cos \alpha)/\lambda$. Die in Abb. 2.9(b) schematisch dargestellte OTF erhält man

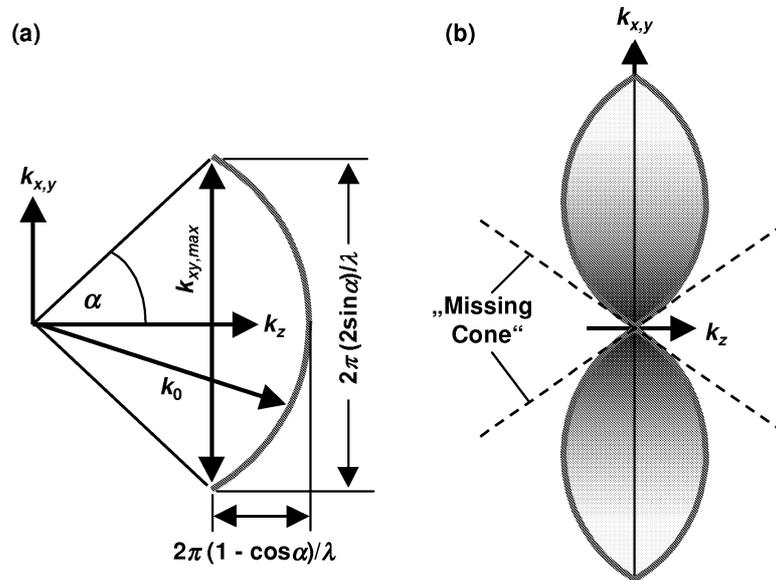


Abbildung 2.9: Zur Herleitung der optischen Transferfunktion (OTF) einer Objektivlinse. (a) Transmittierte k -Vektoren eines kohärent emittierenden, punktförmigen Objekts (kohärente OTF); (b) OTF (schematisch). Aus dem „Missing Cone“ werden keine räumlichen Strukturen abgebildet.

durch Anwendung des Faltungstheorems. Das heißt, die OTF ist gleich der Autokorrelation der Amplituden-Transmissionsfunktion, was der einfachen und für den inkohärenten Fall zulässigen Quadrierung der Amplitude im Ortsraum entspricht [Gustafsson95].

In drei Dimensionen entspricht die Form der OTF der Gestalt eines Donuts, jedoch ohne in der Mitte ein Loch zu besitzen. Dort beträgt ihr Wert auch nahezu 1, d. h. alle entsprechenden Strukturen werden beinahe fehlerfrei abgebildet. Weiter außen bei größeren k -Werten fällt ihr Wert stark ab, so dass feine Strukturen nur noch unscharf abgebildet werden. Rauschteile im Detektionssignal können diese Bereiche verdecken und zu einer Reduzierung der maximal übertragbaren Raumfrequenzen führen und die Auflösung verringern. Der „Missing Cone“ (fehlender Kegel) führt zu dem interessanten Effekt, dass Strukturen, die nur in axialer Richtung vorhanden und lateral weit ausgedehnt sind, z. B. dünne Schichten senkrecht zur optischen Achse, nicht sichtbar gemacht werden können.

Die oben beschriebene Zusammensetzung der Gesamt-PSF aus Anregungs- und Detektions-PSF hat auch im Fourier-Raum Gültigkeit. Für die Gesamt-OTF gilt also

$$\hat{h}_G(\mathbf{r}) = \hat{h}_L(\mathbf{r}) * \hat{h}_D(\mathbf{r}), \quad (2.47)$$

d. h. die Gesamt-OTF wird durch die Faltung der Anregungs-OTF mit der Detektions-OTF gebildet [Cox82, Shaw95].

2.3.6 Abtastung und Digitalisierung

Der letzte Schritt der Bildentstehung besteht in der Detektion der Bildintensitäten in der Bildebene. Diese Detektion geschieht räumlich nicht kontinuierlich, sondern nur an

diskreten Punkten, d. h. der kontinuierliche Intensitätsverlauf wird auf diskrete Elemente einer Matrix transformiert.

Man betrachte zunächst ein unendlich ausgedehntes, kontinuierliches Bild $I(\mathbf{x})$, das auf eine endliche, rechteckige $M \times N$ -Matrix I abgebildet wird. Die Orte auf I werden durch $\mathbf{x}_{m,n} = m \cdot \Delta x_1 \cdot \mathbf{e}_1 + n \cdot \Delta x_2 \cdot \mathbf{e}_2$ beschrieben. Dabei gilt $m = 0, 1, \dots, M-1$ und $n = 0, 1, \dots, N-1$, \mathbf{e}_1 und \mathbf{e}_2 sind Einheitsvektoren in x- und y-Richtung, und die Abstände zwischen den Punkten betragen Δx_1 bzw. Δx_2 . Meist werden die Lichtintensitäten nicht genau an den diskreten Punkten $\mathbf{x}_{m,n}$ aufgenommen, sondern auf einer Fläche um sie herum wie z. B. bei einer CCD-Kamera, welche aus einer Matrix von direkt nebeneinanderliegenden, identischen Photodioden besteht. In der Bildebene wird $I(\mathbf{x})$ also über die Fläche der einzelnen Photodioden integriert [Jähne97]. Die im Punkt $\mathbf{x}_{m,n}$ detektierte Intensität $I_{m,n}$ berechnet sich dann nach

$$I_{m,n} = \int_{(m-1/2)\Delta x_1}^{(m+1/2)\Delta x_1} \int_{(n-1/2)\Delta x_2}^{(n+1/2)\Delta x_2} I(\mathbf{x}) dx_1 dx_2. \quad (2.48)$$

Dies stellt eine Faltung mit einer Rechteckfunktion und eine **Abtastung** an den Gitterpunkten dar. Im Allgemeinen wird das Bild dadurch unschärfer, und feine Details gehen verloren. Im Fourier-Raum führt das zu einer Abschwächung bei hohen k-Werten bzw. Wellenzahlen. Bei der Bilddarstellung, z. B. auf einem Monitor, werden die einzelnen Intensitätswerte $I_{m,n}$ durch **Pixel** (Picture Elements) dargestellt, die entsprechend den Photodioden einer CCD-Kamera angeordnet sind.

Die Transformation der $I_{m,n}$ in den Fourier-Raum wird durch die **Diskrete Fourier-Transformation (DFT)** bewirkt. Die resultierenden Elemente $\hat{I}_{u,v}$ des **reziproken Gitters** besitzen dabei die charakteristische Periodizität

$$\hat{I}_{u,v} = \hat{I}_{u+kM, v+lN}, \quad (2.49)$$

wobei k und l ganze Zahlen sind. Das bedeutet, dass sich die Spektren im Fourier-Raum nach M bzw. N Elementen wiederholen, also (kM, lN) Translationsvektoren des reziproken Gitters sind. Daher begrenzt man den Wertebereich von u bzw. v genau wie für m und n im Ortsraum auf Zahlen von 0 bis $M-1$ bzw. $N-1$.

Abtasttheorem

Durch die Periodizität der Spektren im Fourier-Raum ist es nicht möglich zu entscheiden, ob eine Intensität $\hat{I}_{u,v}$ dem zentralen Punkt des reziproken Gitters oder einer der Kopien zugeordnet werden muss. Das *Abtasttheorem* stellt eine Eindeutigkeit her, indem es fordert, dass das Spektrum der detektierten Wellenzahlen bzw. Raumfrequenzen auf den Bereich um den Ursprung des reziproken Gitters beschränkt bleibt. Wenn k_{Gitter} der kleinste von Null verschiedene Translationsvektor des reziproken Gitters ist (vgl. Gl. (2.49)), dürfen im Bild also keine größeren Frequenzen als $k_{max} = k_{Gitter}/2$ vorkommen. Dies lässt sich schreiben als

$$k_{max} \leq \frac{\pi}{\Delta x}, \quad (2.50)$$

hierbei folgt die Abtastweite Δx im Ortsraum aus $k_{Gitter} = 2\pi/\Delta x$. Das heißt, eine periodische Struktur wird nur dann korrekt abgebildet, wenn pro Wellenlänge mindestens zwei Abtastpunkte gesetzt sind. Die maximal ohne Fehler abtastbare Wellenzahl

k_{max} wird *Nyquist-Wellenzahl* genannt. Die *Auflösung im Fourier- bzw. Wellenzahlraum* wird im Gegensatz zur Ortsauflösung nicht von der Abtastweite bestimmt, sondern von der Anzahl der in x- bzw. y-Richtung vorhandenen Pixel, also $\Delta k_1 = 2\pi/(M\Delta x_1)$ bzw. $\Delta k_2 = 2\pi/(N\Delta x_2)$.

Um aus Gl. (2.50) eine Bedingung für eine geeignete Abtastweite Δx in der Mikroskopie zu erhalten, wählt man die maximale Wellenzahl k_{max} so, dass sie der Auflösung des optischen Systems entspricht. Bei Verwendung des FWHM-Kriteriums (2.43) bzw. (2.44) bedeutet das $k_{max} = 2\pi/FWHM$, so dass für die Abtastweite folgt

$$\Delta x \leq \frac{1}{2}FWHM, \quad (2.51)$$

d. h. der Abstand der Detektoren sollte höchstens halb so groß wie die Halbwertsbreite der Punktbildfunktion sein.

Bei der Abbildung von Strukturen mit Wellenzahlen, die größer als die Nyquist-Wellenzahl sind, geht nicht nur Information verloren, sondern es treten sogar *Bildverfälschungen* auf. So erzeugt ein Abbilden von Objekten, deren Raumfrequenzen nur wenig größer als k_{max} sind, künstliche Strukturen im Bildraum mit wesentlich kleineren Wellenzahlen (*Moiré-Effekt*). Eine genauere Betrachtung zeigt außerdem, dass im oben genannten Beispiel der Abtastung mit einer CCD-Kamera (*Standardabtastung*) das Abtasttheorem nicht exakt erfüllt ist [Jähne97]. Daher sollte für eine korrekte Bildaufnahme die Abtastweite Δx immer deutlich kleiner als nach Gl. (2.51) sein.

Die Weiterverarbeitung der Bilddaten mit einem Computer bedingt außer der oben beschriebenen Detektion an diskreten Orten, dass aufgrund der **Digitalisierung** auch die gemessenen Intensitätswerte selbst nur diskrete Werte annehmen können. Die kontinuierlichen Intensitäten I werden bei dieser *Quantisierung* durch eine der Q Quantisierungsstufen i_j ersetzt, also $I \rightarrow i_0, i_1, \dots, i_{Q-1}$. Q ist meist eine gerade Zweierpotenz und gibt die *Digitalisierungstiefe* an. Sie richtet sich nach der Anzahl der pro Quantisierungsstufe verwendeten Bits, d. h. $Q = 2^8, 2^{10}, \dots$

Sind die Abstände Δi zwischen den Digitalisierungsstufen identisch, und sind alle I -Werte gleich wahrscheinlich, gilt für die Varianz aufgrund der Quantisierung [Jähne97]

$$\sigma_j^2 = \frac{1}{\Delta i} \int_{i_j - \Delta i/2}^{i_j + \Delta i/2} (I - i_j)^2 dI = \frac{1}{12}(\Delta i)^2, \quad (2.52)$$

es wird also immer dasjenige i_j gewählt, das am nächsten bei dem tatsächlichen Intensitätswert I liegt. Die Standard-Abweichung σ_j entspricht etwa 0,3 mal dem Abstand der Quantisierungsstufen Δi , und der maximale Fehler beträgt die Hälfte der Differenz zwischen zwei Quantisierungsstufen. Durch Mittelwertbildung nach N Mehrfachmessungen kann der Fehler auf σ_j/\sqrt{N} reduziert werden, die Genauigkeit der Messung kann also auch größer sein als durch die Quantisierungsstufen vorgegeben.

Die absolute Genauigkeit wird durch *systematische Fehler* beschränkt. Die größte Fehlerquelle besteht in der Ungleichmäßigkeit der Quantisierungsstufen; bei realen Analog-Digital-Wandlern können diese Abweichungen bis zur Hälfte des nominellen Quantisierungsintervalls betragen.

2.4 Spektrale Präzisions-Distanzmikroskopie

Das Ziel der Spektralen Präzisions-Distanzmikroskopie (SPDM) besteht darin, mit Hilfe der gemessenen quantisierten Bildintensitäten I die Distanzen zwischen Markern im Objektraum möglichst genau zu bestimmen. Werden für diese Marker unterschiedliche *spektrale Signaturen* verwendet, d. h. besitzen die Objekte unterschiedliche, vom Detektionssystem trennbare Fluoreszenzspektren, können die gemessenen Distanzen deutlich kleiner als die Auflösungsgrenze sein. Alternativ können auch unterschiedliche Fluoreszenzlebensdauern zur spezifischen Detektion der Marker verwendet werden. Die folgenden Betrachtungen beschränken sich auf punktförmige Objekte, deren Ausdehnung deutlich unterhalb der Wellenlänge λ liegt, da nur diese im Rahmen von topologischen Untersuchungen des Zellkerns unterhalb der Auflösungsgrenze von Interesse sind.

2.4.1 Lokalisation

Voraussetzung für die Distanzbestimmung ist die Lokalisation, also die Bestimmung der Positionen der Objekte. Man kann zwei unterschiedliche Verfahren der Lokalisation unterscheiden: die modell- und die schwerpunktbasierte Lokalisation.

Modellbasierte Lokalisation

Bei der modellbasierten Lokalisation werden bestimmte Annahmen bezüglich des von einem Objekt gemessenen Intensitätsverlaufs getroffen. Anhand dieser Annahmen wird ein Modell in Gestalt einer Funktion aufgestellt; die Funktion enthält dabei mehrere Parameter wie z. B. Objektposition, Halbwertsbreite, Maximalintensität usw. Handelt es sich um punktförmige Objekte in einem konventionellen Mikroskop, wird deren Fluoreszenzverteilung in der Bildebene und auf der optischen Achse durch Gl. (2.37) und (2.38) beschrieben.

Anpassungs- bzw. Fit-Algorithmen vergleichen nun die Funktionswerte ausgehend von *Startparametern* mit den gemessenen Intensitätswerten und verändern die Parameter in der Weise, dass die Modellfunktion möglichst gut an den gemessenen Intensitätsverlauf angepasst wird. Für die Anpassung kommen überwiegend zwei Methoden zum Einsatz: Verfahren, die die Summe der Abweichungsquadrate, gebildet aus den Differenzen der Funktionswerte und den gemessenen Werten, minimieren, und das sogenannte *Maximum-Likelihood-Verfahren*, das zusätzlich die Eigenschaften der Photonenstatistik berücksichtigt [Press92].

Der Vorteil der modellbasierten Methode ist hauptsächlich ihre sehr hohe Genauigkeit. Je nach Signal-zu-Rausch-Verhältnis des detektierten Signals kann die Position eines Objekts mit einem Fehler von $\leq 1/20 \cdot \Delta x$, d. h. mit einer **Lokalisationsgenauigkeit** von $1/20$ der Abtastweite und darunter bestimmt werden. Komplikationen können auftreten, wenn das Modell bzw. die Fitfunktion von der Form der gemessenen Intensitätsverteilung systematisch abweicht. In der Praxis sind die Funktionen (2.37) und (2.38) oft nicht ausreichend und müssen durch ein anderes Modell ersetzt werden. Bei jedem Modell besteht jedoch die prinzipielle Schwierigkeit, dass schon kleine Abweichungen in der mikrooptischen Umgebung des Objekts, z. B. durch Variationen des Brechungsindex, die Form des Intensitätsverlaufs in nicht vorhersehbarer Weise ändern können [Heintzmann99]. Außerdem kann das Ergebnis der Anpassung von der Wahl der Startparameter beeinflusst

werden [Wagner01]. Man sollte als Startparameter Werte verwenden, die schon möglichst dicht bei den zu erwartenden Ergebnissen liegen. Es ist evident, dass die Genauigkeit der Positionsbestimmung mit abnehmender Gesamtphotonenzahl stark abnimmt.

Schwerpunktbasierte Lokalisation

Hierbei wird auf ein konkretes Modell zur Beschreibung des Intensitätsverlaufs verzichtet. Stattdessen werden die zu lokalisierenden Objekte zunächst **segmentiert**. Das heißt, es wird ein Schwellwert festgelegt, und Pixel mit Intensitäten größer oder gleich dieses Schwellwerts werden als zum Objekt gehörend definiert; Pixel mit kleineren Werten werden nicht mehr berücksichtigt.

Seien \mathbf{x}_i die Positionen der zum Objekt gehörenden Pixel und I_i die entsprechenden, quantisierten Intensitätswerte, bestimmt man die Objektposition \mathbf{x} nach der Formel

$$\mathbf{x} = \frac{1}{N} \sum \mathbf{x}_i I_i \quad \text{mit} \quad N = \sum I_i, \quad (2.53)$$

d. h. die Berechnung der Objektposition entspricht der Berechnung des *Massenschwerpunkts* in der Mechanik. N ist die Anzahl der berücksichtigten Photonen, d. h. es wird vorausgesetzt, dass eine Quantisierungsstufe genau einem detektierten Photon entspricht. Diese Berechnung der Position ist zulässig, solange die zu erwartende Form der Intensitätsverteilung symmetrisch ist. Dies trifft insbesondere auf punktförmige Objekte zu. Zur Optimierung der Lokalisation ist es zweckmäßig, vor der Anwendung von (2.53) den Untergrund „abzuschneiden“, d. h. von allen Objektpixeln den Minimalwert zu subtrahieren [Heintzmann99].

Geht man von punktförmigen Objekten aus und berücksichtigt nur das Photonenrauschen, kann die Genauigkeit bzw. der Fehler von \mathbf{x} für alle drei Raumrichtungen berechnet werden nach [Edelmann00]

$$\sigma_{x,y,z} = \frac{1}{\sqrt{8 \ln 2}} \frac{FWHM_{x,y,z}}{\sqrt{N}}, \quad (2.54)$$

hierbei bezeichnet $FWHM_{x,y,z}$ wieder die Halbwertsbreite der gemessenen Punktbildfunktion in der x-,y-,z-Richtung. In Gleichung (2.54) sind von der Abtastung hervorgerufene systematische Fehler noch nicht berücksichtigt. Solche Fehler können vernachlässigt werden, falls die Abtastung so gewählt wird, dass $\Delta x = 1/4 \cdot FWHM$ [Heintzmann99]. In der Praxis reicht allerdings in der Regel eine Abtastung nach Gl. (2.51). Gleichung (2.54) zeigt auch die große *Bedeutung der Auflösung* für die Lokalisationsgenauigkeit: je größer die Auflösung, d. h. je kleiner die Halbwertsbreite der Punktbildfunktion, desto größer ist die Lokalisationsgenauigkeit.

Der große Vorteil des schwerpunktbasierten Verfahrens besteht nun gerade darin, dass *keine* genauen Annahmen bezüglich der Intensitätsverteilung getroffen werden müssen. Dafür erreicht seine maximale Genauigkeit nicht ganz das Niveau der modellbasierten Methode. Außerdem kann das Ergebnis von der Wahl des Schwellwerts abhängen. Es gibt keine eindeutige Vorschrift für die Festlegung des Schwellwerts; als Faustregel kann man jedoch angeben $I_{Schwell} = 0,3(I_{Max} - I_{Min})$, wobei sich I_{Min} bzw. I_{Max} auf den Minimal- bzw. Maximalwert der Intensitäten innerhalb einer weiteren Umgebung des Objekts beziehen.

Die bisherigen Betrachtungen bezüglich der Lokalisationsgenauigkeit bezogen sich ausschließlich auf Methoden der **Bilddatenauswertung**. Unabhängig von diesen Verfahren können experimentelle Randbedingungen die erreichbare Lokalisationsgenauigkeit weiter verschlechtern. Neben den in Abschnitt 2.3.4 geschilderten Effekten sind hier hauptsächlich **mechanische Drifts**, d. h. Verschiebungen in der Apparatur bzw. des Objektverschiebetischs während der Messzeit zu nennen.

2.4.2 Distanzmessungen

Für die Distanz d zwischen zwei punktförmigen Objekten gilt zunächst erwartungsgemäß: $d = |\mathbf{x}_1 - \mathbf{x}_2|$. Die Objektpositionen \mathbf{x}_1 und \mathbf{x}_2 können aber nur solange nach den oben beschriebenen Verfahren zuverlässig berechnet werden, wie der gegenseitige Abstand der Objekte in allen drei Raumrichtungen größer als etwa die doppelte Halbwertsbreite der PSF ist. Je näher die Objekte beeinander liegen, umso mehr überlappen die gemessenen Intensitätsverteilungen, und die systematischen Fehler der Lokalisationen wachsen. Verwendet man ein modellbasiertes Verfahren zur Lokalisation, könnte man natürlich das Modell so wählen, das es beide Objekte enthält. Doch spätestens, wenn das Sparrow-Kriterium der Auflösung nicht mehr erfüllt ist, kann nicht mehr entschieden werden, ob es sich um zwei Objekte handelt oder um eines, dessen Intensitätsverteilung aufgrund seiner Größe oder wegen Abbildungsfehlern verbreitert ist. Auch beim schwerpunktbasierten Verfahren lässt sich selbst bei unendlich kleiner Abtastweite kein Schwellwert mehr finden, bei dem beide Objekte getrennt werden können. Selbst wenn eine Trennung der beiden Objekte noch möglich wäre, wäre das Ergebnis mit systematischen Fehlern behaftet (Bias-Effekt, [Manders96]).

Die Lösung des Problems besteht darin, die Intensitätsverteilungen der Objekte *unabhängig voneinander* zu detektieren. Man erreicht dies, indem die Objekte mit Fluoreszenzfarbstoffen, deren Spektren sich möglichst wenig überlappen, d. h. mit verschiedenen **spektralen Signaturen** versehen werden. Die Intensitätsverteilungen der Objekte können dann in verschiedenen Kanälen des Detektionssystems voneinander unabhängig aufgenommen und ihre Positionen bestimmt werden. Dieses Verfahren wird als **Spektrale Präzisions-Distanzmikroskopie** bezeichnet [Edelmann99a]. Im Prinzip können beliebig viele verschiedene Signaturen verwendet werden, die maximale Anzahl wird nur durch das Trennvermögen des Detektionssystems begrenzt (siehe unten).

Auflösungsäquivalent

In Analogie zur Auflösung wird als **Auflösungsäquivalent** (Resolution Equivalent, RE) die kleinste Distanz zwischen zwei punktförmigen Objekten definiert, die gerade noch zuverlässig gemessen werden kann. [CCremer99a]. Das Auflösungsäquivalent wird durch Mehrfachmessung der Abstände von zwei *kolokalisierten* Objekten mit verschiedenen spektralen Signaturen bestimmt. Dabei erhält man aufgrund der begrenzten Lokalisationsgenauigkeit in den meisten Einzelmessungen Distanzen größer Null. In [Edelmann99a] ist das Auflösungsäquivalent RE so definiert, dass 75% dieser individuellen Distanzmessungen ein Ergebnis kleiner als RE liefern. Eine Abschätzung für RE erhält man, indem man den Lokalisationsfehler σ mit $\sqrt{2}$ multipliziert (folgt aus dem Gauß'schen Fehlerfortpflanzungsgesetz, sofern σ für beide Objekte gleich groß ist).

Fehlerquellen

Neben den Effekten, die die Lokalisationsgenauigkeit beeinträchtigen, kommen bei Distanzmessungen als systematische Fehlerquellen monochromatische und vor allem *chromatische Aberrationen* des optischen Systems hinzu. Diese können nach **Kalibrationsmessungen** an zwei- oder mehrfarbigen kolokalisierten Objekten in den Bilddaten wieder korrigiert werden. Hierbei ist allerdings besonders darauf zu achten, dass die Kalibrationsmessungen unter genau den gleichen optischen Bedingungen (gleiche Brechungsindizes, Wellenlängen, mikro-optische Umgebungen usw.) wie die eigentlichen Distanzmessungen durchgeführt werden. Die *chromatischen Verschiebungen* sind außerdem ortsabhängig, vgl. Abschnitt 2.2.3. Da in die Genauigkeit der Distanzmessung auch der Fehler der Kalibrationsmessungen eingeht, verschlechtert sich das Auflösungsäquivalent nochmals um mindestens den Faktor $\sqrt{2}$. Verzerrungen der Intensitätsverteilungen beider Objekte aufgrund monochromatischer Aberrationen stören dagegen nicht, sondern heben sich gegenseitig auf, sofern diese Effekte für beide Objekte gleich stark sind. In [Edelmann99a] wird für die konfokale Laser-Raster-Mikroskopie in fixierten Zellen ein maximales „In Situ“-Auflösungsäquivalent von 35 nm in lateraler und 50 nm in axialer Richtung angegeben.

Eine weiterer störender Effekt ist das sogenannte **Übersprechen (Cross-Talk)** zwischen den einzelnen Farbkanälen des Detektionssystems. Das bedeutet, dass beispielsweise die von einem grünen Objekt emittierten Intensitäten teilweise im roten Kanal detektiert werden und umgekehrt, d. h. das Bild eines Objekts wird auch in Kanälen, die anderen spektralen Signaturen zugeordnet sind, partiell sichtbar. Das Übersprechen tritt dann auf, wenn die Spektren der einzelnen Farbstoffe mit den Durchlassbereichen der Filter des Detektionssystems für andere Farbstoffe überlappen. Der Effekt kann durch Bildverarbeitungsmethoden kompensiert werden [Heintzmann99, Wagner01], allerdings nur wenn die Übersprech-Anteile nicht zu groß sind (< ca. 20%). Aufgrund der relativ breiten Fluoreszenzspektren heute üblicher Farbstoffe ist die maximale Anzahl gleichzeitig verwendbarer Farbstoffe im sichtbaren Bereich also begrenzt. Dieses Problem könnte durch den Einsatz von Nanocrystals mit schmalere Emissionsspektren entschärft werden, vgl. [Banin99, Bruchez98].

Die Schwierigkeiten in der Korrektur der chromatischen Verschiebungen lassen sich umgehen, wenn man beide Objekte mit spektralen Signaturen der gleichen Fluoreszenzwellenlänge, aber unterschiedlicher **Fluoreszenzlebensdauer** markiert. In diesem Fall muss die Anregung gepulst erfolgen, und die Abklingkurven der Farbstoffe werden z. B. durch schaltbare Bildverstärker gemessen, die eine zeitliche Modulation der Verstärkung der Fluoreszenzintensität vor der Detektion erlauben.

Kapitel 3

Mikroskopie mit Räumlich Modulierter Anregung

Nachdem einige Grundlagen der Fernfeld-Fluoreszenzmikroskopie dargestellt wurden, folgt in diesem Kapitel die Beschreibung des Konzepts der Mikroskopie mit räumlich modulierter Anregung bzw. der Spatially Modulated Illumination- (SMI-) Mikroskopie im Detail. Der erste Abschnitt beschreibt das Zustandekommen sowie die Merkmale der räumlich axial modulierten Anregung und erläutert die Konsequenzen für die optische Abbildung des Mikroskops. Anschließend werden im zweiten Abschnitt die im Rahmen dieser Arbeit angewandten und entwickelten Methoden zur Distanzbestimmung vorgestellt. Dabei wird auch gezeigt, wie die Analyse des axialen Intensitätsverlaufs außer zur Erhöhung der Präzision von Distanzmessungen auch dazu verwendet werden kann, Rückschlüsse auf die Größe der aufgenommenen Objekte zu ziehen. Ein kurzer Überblick über weitere Variationen der räumlichen Modulation des Anregungslichtfelds und die damit verbundenen Möglichkeiten schließen das Kapitel ab.

3.1 Abbildungseigenschaften

3.1.1 Räumlich Modulierte Anregung

Die räumlich modulierte Anregung im SMI-Mikroskop wird erzeugt, indem im Objektraum zwei gleich linear polarisierte Laserstrahlen gleicher Intensität kohärent zur Interferenz gebracht werden. Man verwendet dazu zwei direkt gegenüberliegende Objektive, in deren hintere Fokusebenen man das Laserlicht einfokussiert wie in Abbildung 3.1 schematisch gezeigt. Liegen beide Laserstrahlen in einer Ebene und haben beide Fokuspunkte den gleichen Abstand d_f zur optischen Achse, bildet sich eine **stehende Lichtwelle**, deren **Wellenfronten**, d. h. Ebenen maximaler Intensität senkrecht auf der gemeinsamen optischen Achse der Objektive stehen. Man nennt diese Form der Anregung auch *Stehwellenfeld*; sie wird in der sogenannten „Stehwellen-Mikroskopie“ bzw. in der *Standing-Wave Fluorescence Microscopy* verwendet [Lanni86a, Lanni86b]. Der Objektträger (in Abb. 3.1 nicht eingezeichnet) befindet sich zwischen den Objektiven und ist senkrecht zur optischen Achse orientiert; der Abstand der Objektive beträgt ca. 2 mm.

Die Intensitätsverteilung entlang der optischen Achse hat entsprechend dem Quadrat

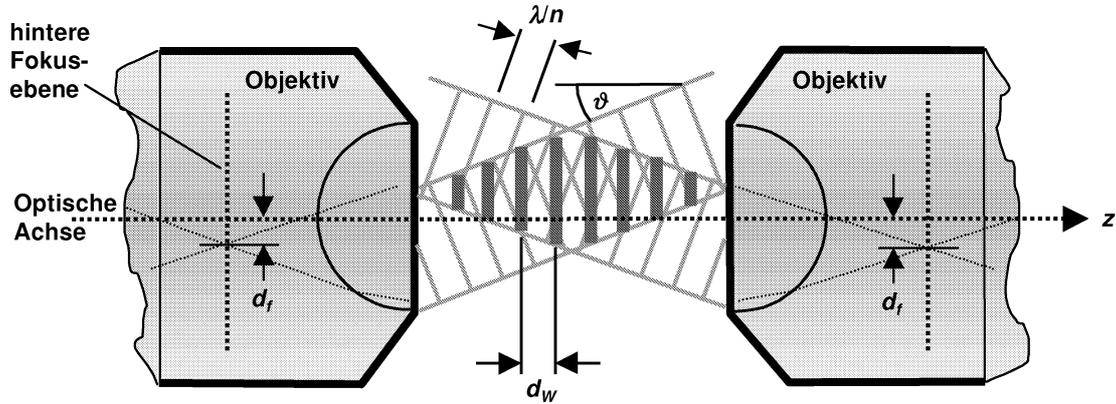


Abbildung 3.1: Anregungs-Schema des SMI-Mikroskops. Durch Einfokussierung zweier kohärenter Laserstrahlen in die hinteren Fokusebenen von zwei gegenüberliegenden Objektiven bildet sich ein stehendes Wellenfeld, dessen Wellenfronten senkrecht auf der optischen Achse stehen. Der Abstand der Objektive beträgt etwa 2 mm.

der Summe der Amplituden von zwei gegenläufigen elektromagnetischen Wellen \cos^2 -Form. In den Wellenvektor k_z der stehenden Welle geht außer dem Brechungsindex n des Mediums im Objektivzwischenraum noch der Winkel ϑ zwischen der optischen Achse und der Richtung der kollimierten Strahlen zwischen den Objektiven ein. Für die Lichtintensität entlang der optischen Achse gilt also [Schneider99a]

$$I(z) = I_0 \cdot \cos^2\left(k_z z + \frac{d\phi}{2}\right), \quad (3.1)$$

dabei ist $k_z = n \cos \vartheta \cdot 2\pi/\lambda$, und $d\phi$ bezeichnet die Phasendifferenz zwischen beiden Teilstrahlen. $d\phi$ kann durch Variation der optischen Weglängen des Interferometers im Mikroskopaufbau gezielt *geändert* und damit das Wellenfeld verschoben werden (siehe auch Kapitel 4), der genaue Betrag von $d\phi$ ist im Experiment allerdings nicht bekannt. Die Formel für k_z erhält man durch Zerlegung der von beiden Objektiven ausgehenden Strahlen in Teilstrahlen innerhalb der Einfallsebene und in z -Richtung. Aus Gl. (3.1) folgt für den Abstand zwischen den Intensitäts-Maxima des Wellenfeldes bzw. den **Wellenfrontabstand** d_W

$$d_W = \frac{\lambda}{2n \cos \vartheta}. \quad (3.2)$$

Der Wellenfrontabstand kann durch Variation des Winkels ϑ ebenfalls verändert werden [Kirsten97]. Man erreicht dies durch eine Veränderung des Abstands d_f der Fokuspunkte von der optischen Achse, für kleine Winkel gilt dann $\sin \vartheta \approx d_f/f_1$ (f_1 : Brennweite des Objektivs). Bei den im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Messungen war jedoch meist $\vartheta \approx 0$. Für $n = 1,515$ und die im Experiment verwendeten Laserwellenlängen 647 nm und 488 nm ergeben sich daraus für d_W Werte von 214 nm und 161 nm.

Die Ebenen gleicher Intensität sind nicht vollkommen plan, sondern weisen **Wellenfrontverzerrungen** auf. In [Schneider00] wurden mittlere Verzerrungen von $\lambda/109$ auf einer lateralen Objektregion der Größe $2,5 \mu\text{m} \times 2,5 \mu\text{m}$ gemessen, d. h. die Standard-Abweichung der gemessenen axialen Positionen der Intensitätsmaxima lag bei 1,5 nm

($\lambda = 488 \text{ nm}$). Die maximale Wellenfrontverzerrung betrug dort $\lambda/30$. Innerhalb biologischer Präparate wurden Wellenfrontverzerrungen von bis zu $\lambda/12$ gemessen [Schneider99a].

Von den Wellenfrontverzerrungen abgesehen kann die Intensitätsverteilung im Objektraum als unabhängig von den lateralen Koordinaten (x, y) betrachtet werden, da der mit einer CCD-Kamera betrachtete Objektbereich mit einer lateralen Ausdehnung von typischerweise einigen $10 \mu\text{m}$ klein im Vergleich zur Breite b_1 des Stehwellenfelds zwischen den Objektiven ist. b_1 hängt von der effektiven Brennweite f_1 der Objektive und der Brennweite f_2 der zum Einfokussieren verwendeten Linsen ab (*Einfokussierlinsen*); außerdem muss der $1/e^2$ -Durchmesser b_2 der Laserstrahlen (gaußförmiges Strahlprofil) vor den Einfokussierlinsen bzw. der Durchmesser der Einfokussierlinsen berücksichtigt werden. Geht man von einem Winkel $\vartheta = 0$ aus (Strahlen parallel), gilt $b_1 = b_2 \cdot f_1/f_2$. Im Experiment sind die Strahlen vor den Einfokussierlinsen auf $b_2 \approx 15 \text{ mm}$ aufgeweitet; zusammen mit $f_1 \approx 1,5 \text{ mm}$ und $f_2 = 60 \text{ mm}$ folgt daraus für die Breite des Strahlprofils zwischen den Objektiven $b_1 \approx 380 \mu\text{m}$.

Bei der Betrachtung von Abb. 3.1 stellt sich die Frage, ob der Intensitätsverlauf nach Gl. 3.1 nicht genauso gut mit einem einzigen Objektiv in Kombination mit einem Spiegel erreicht werden kann. Die Antwort lautet ja, sofern sich im Objektraum ein optisch homogenes Medium befindet, das kein Anregungslicht absorbiert. Genau dies ist jedoch nicht der Fall. Wegen der geringeren Intensität des reflektierten Strahls würde die Intensität in den Knoten des Wellenfelds nicht mehr auf 0 abfallen, und die Stärke der Modulation bzw. der Kontrast in den Bilddaten wäre verändert. Dieses würde die Analyse der aufgenommenen Bildinformation wesentlich erschweren, siehe auch Abschnitt 3.2. Außerdem würden biologische Objekte aufgrund ihres inhomogenen Brechungsindex-Verlaufs die Wellenfronten doppelt verzerren, da die reflektierte Welle das Objekt zweimal durchläuft.

3.1.2 Punktbildfunktion

Wie in Abschnitt 2.3.4 in Zusammenhang mit Gl. (2.45) beschrieben, ist die Punktbildfunktion (PSF) eines Mikroskops gleich dem Produkt von Anregungs- und Detektions-Punktbildfunktion. Im SMI-Mikroskop entspricht die Anregungs-PSF der Intensitätsverteilung in axialer Richtung Gl. (3.1). Die axiale Punktbildfunktion h des SMI-Mikroskops ist also gleich dem Produkt von Gl. (3.1) und Gl. (2.38) für die Detektions-PSF eines konventionellen Mikroskops:

$$h_{r=0}(z) = h_0 \cdot \cos^2\left(k_z(z - z_F) + \frac{d\phi}{2}\right) \cdot \text{sinc}^2\left(\frac{1}{4}q(z - z_F)\right) \quad (3.3)$$

mit der Wellenzahl

$$k_z = \frac{2\pi}{\lambda} n \cdot \cos \vartheta \quad (3.4)$$

und der optischen Koordinate (vgl. Gl. (2.39))

$$q(z) = \frac{2\pi}{\lambda} \frac{NA^2}{n} \cdot z. \quad (3.5)$$

Der Parameter z_F gibt die Position des Fokuspunkts des zur Detektion verwendeten Objektivs im Objektraum auf der optischen Achse an, wie in Abbildung 3.2 gezeigt; außerdem ist $\text{sinc}(z) = \sin(z)/z$. Gl. (3.3) beschreibt also die Intensität im zum Objektpunkt konju-

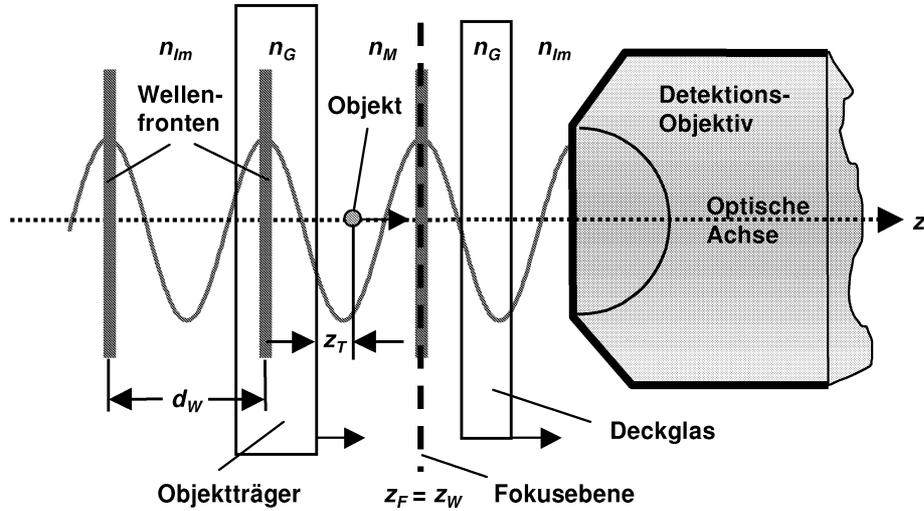


Abbildung 3.2: Detektions-Schema des SMI-Mikroskops. Zur Messung der Punktantwort wird der Objektträger inkl. Objekt in Richtung der optischen Achse durch das ortsfeste Wellenfeld bewegt. Besitzt die Anregungsintensität in der Fokusebene des Detektions-Objektivs ein Maximum, d. h. $z_F = z_W$, entspricht der gemessene Intensitätsverlauf der in Abb. 3.3 dargestellten Kurve. Dabei wird vorausgesetzt, dass die Brechungsindizes n_{Im} , n_G und n_M von Immersionsöl, Glas und dem Medium, in dem sich das Objekt befindet, gleich sind.

gierten Punkt in der Bildebene des Mikroskops, wenn sich das Objekt an einem Ort mit der axialen Koordinate z befindet.

Die Punktbildfunktion hängt von der Anregungs-Wellenlänge λ , der numerischen Apertur NA des Objektivs, dem Winkel ϑ , der Phasendifferenz $d\phi$ der Laserstrahlen und dem Brechungsindex n ab. Hierbei wird davon ausgegangen, dass das Immersionsöl, der Objektträger, das Deckglas und das Einbettungsmedium, in dem sich das Objekt befindet, den gleichen Wert von n besitzen. Der Verlauf der SMI-Punktbildfunktion ist dann von der Position z des Objekts *unabhängig*. $d\phi$ lässt sich mit einem Ort z_W der Wellenfronten im Objektraum verbinden:

$$\frac{d\phi}{2} = k_z(z_F - z_W) + \delta. \quad (3.6)$$

Setzt man hier $\delta = d\phi/2$, besitzt die Anregungsintensität an der Stelle $z = z_F = z_W$ ein Maximum, wie in Abb. 3.2 gezeigt.

Zur **Messung** der Punktbildfunktion wird der Objektträger in Richtung der optischen Achse verschoben und an äquidistanten Objektträger-Positionen z_{OT} mit einer Kamera jeweils ein Bild aufgenommen. Die Positionen z der einzelnen Objekte während der Messung hängen dabei von den axialen Positionen z_T der Objekte bezüglich der Objektträgerenebene ab, d. h. in Gl. (3.3) gilt $z = z_{OT} + z_T$, wobei z_{OT} für alle Objekte gleich ist.

Dieses Messverfahren wird **Objekt-Rasterung** bzw. **Optical Sectioning** („Optisches Schneiden“) genannt. Die Schrittweite dz der axialen Abtastung muss dabei so gewählt sein, dass das Abtasttheorem für jeden einzelnen Wellenzug („Fringe“) der gemessenen axialen Intensitätsverteilung erfüllt ist. Bei einem Wellenfrontabstand von z. B. $d_W = 161$ nm ($\lambda = 488$ nm, $n = 1,515$, $\vartheta = 0$) bedeutet dies $dz \leq 40$ nm.

Nach einer Messung werden die aufgenommenen Bilder zu einem **Bildstapel** zusammengesetzt, und der axiale Intensitätsverlauf bzw. die axiale PSF eines Objekts wird daraus mittels Bildverarbeitungsmethoden extrahiert (s. u.). Die gemessenen *Bilddaten* können mit Gl. (3.3) und (3.6) beschrieben werden, indem man z_F und z_W durch die neuen Variablen z_0 und z'_0 ersetzt:

$$h_{r=0}(z) = h_0 \cdot \cos^2(k_z(z - z'_0) + \delta) \cdot \text{sinc}^2\left(\frac{1}{4}q(z - z_0)\right). \quad (3.7)$$

Für z gilt nun: $z = i \cdot dz$, dabei gibt i die Nummer des Bildes im Bildstapel und dz die Schrittweite der axialen Abtastung an (s. o.). Abbildung 3.3 zeigt den Verlauf von Gl. (3.7) für die Parameter $z_0 = z'_0 = 3 \mu\text{m}$, $\delta = 0$, $\lambda = 647 \text{ nm}$, $NA = 1,4$ und $n = 1,5$. Die Funktion setzt sich aus mehreren **Wellenzügen** unterschiedlicher Höhe zusammen, deren Abstand von dem Winkel ϑ abhängt (vgl. Gl. (3.2)). z'_0 gibt die um δ/k_z verschobenen Positionen der Wellenzüge an, d. h. für $\delta = 0$ entspricht z'_0 dem Maximum eines (beliebigen) Wellenzuges. Das Maximum der Einhüllenden der Wellenzüge ist durch z_0 gegeben.

Es muss betont werden, dass die Punktbildfunktion (3.3) bzw. Gl. (3.7) und die im nächsten Abschnitt besprochenen Eigenschaften der optischen Transferfunktion für den Fall gelten, dass die Abbildung durch *eines* der beiden Objektive erfolgt, also der Abbildung in einem konventionellen Mikroskop entspricht. Ist der Abstand der Objektive so gewählt, dass beide Objektebenen übereinstimmen und überlagert man die Bilder beider Objektive kohärent, ändern sich die Abbildungseigenschaften grundlegend [Gustaffson96]. Die Gleichsetzung der Anregungs-PSF mit der Intensitätsverteilung im Objektraum setzt voraus, dass sich die Fluoreszenzintensität direkt proportional zur Anregungsintensität verhält. Auf Fluoreszenzfarbstoffe übertragen bedeutet dies, dass die Anregungsintensität deutlich kleiner als die Sättigungsintensität der Farbstoffe sein muss. In konventionellen

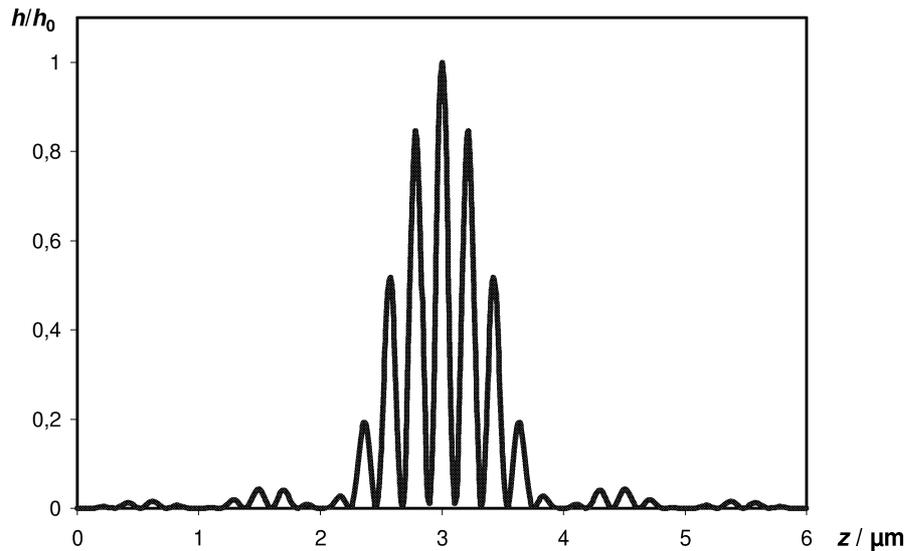


Abbildung 3.3: Axialer Intensitätsverlauf im SMI-Mikroskop nach Gl. (3.7) mit den experimentell realisierten Werten $n = 1,5$; $\lambda = 647 \text{ nm}$, $NA = 1,4$ und $\vartheta = 0$. Außerdem ist $z_0 = z'_0 = 3 \mu\text{m}$ und $\delta = 0$. Da $\delta = 0$, entspricht z'_0 der Position bzw. dem Maximum eines Wellenzuges.

Mikroskopen und im SMI-Mikroskop ist diese Bedingung jedoch erfüllt. Da außerdem die Anregungsintensität bzw. Anregungs-PSF als unabhängig vom Abstand r zur optischen Achse betrachtet werden kann, ist die laterale Punktbildfunktion des SMI-Mikroskops identisch mit der lateralen PSF eines konventionellen Mikroskops Gl. (2.37).

Um sehr kleine Distanzen zu messen, kann eine Messung auch mit **Phasen-Rasterung** durchgeführt werden. Dabei wird nicht das Objekt, sondern ein Spiegel im Interferometer bzw. Anregungs-Strahlengang des SMI-Mikroskops mit einer definierten Schrittweite bewegt (siehe dazu Kapitel 4). Die Bilder einer Messung werden dann bei unterschiedlichen Phasendifferenzen $d\phi$ aufgenommen, und die gemessene axiale Intensitätsverteilung entspricht einer \cos^2 -Funktion entsprechend dem ersten Faktor in Gl. (3.3). Die Positionen der Wellenzüge in den Bilddaten hängen von der jetzt festen Position z in Gl. (3.3) ab. Die Amplituden der Wellenzüge sind dagegen vom Abstand zwischen dem Objekt und der Fokusebene abhängig. Um ein gutes Signal-zu-Rausch-Verhältnis zu erhalten, ist es daher sinnvoll, das Objekt vor dem Start einer Phasen-Rasterung bei $z = z_F$ zu positionieren. Dieses Aufnahmeverfahren ist vor allem für die Messung sehr kleiner Distanzen in der Größenordnung weniger Nanometer von Bedeutung.

3.1.3 Optische Transferfunktion

Wie in Abschnitt 2.3.5 erläutert, erhält man die gesamte Optische Transferfunktion (Gesamt-OTF) eines Mikroskops durch Faltung der Anregungs-OTF mit der Detektions-OTF im Fourier-Raum. Die Anregungs-OTF des SMI-Mikroskops, d. h. die Fourier-Transformation von Gl. (3.1) $\hat{I}(k)$ setzt sich aus drei Peaks bei $k = -2k_z$, $k = +2k_z$ und $k = 0$ zusammen, von denen der Peak bei $k = 0$ doppelt so hoch wie die beiden anderen Peaks ist. Die Faltung von $\hat{I}(k)$ mit der Detektions-OTF eines konventionellen Mikroskops ergibt daher eine Gesamt-OTF $\hat{h}_{SMI}(k)$, wie in Abbildung 3.4 für einen Winkel $\vartheta = 0$ schematisch gezeigt. Sie besteht aus drei auf der inversen optischen Achse nebeneinander liegenden optischen Transferfunktionen eines konventionellen Mikroskops. Der Abstand zwischen den Zentren der einzelnen Teil-OTFs beträgt jeweils $2k_z$, und die Raumfrequenzen aus dem mittleren Teil werden doppelt so stark wie die Frequenzen aus den äußeren Teilen abgebildet [Krish96].

In Abb. 3.4 ist deutlich zu erkennen, dass mit der räumlich modulierten Anregung in axialer Richtung keine unmittelbare Erhöhung der Auflösung verbunden ist. Zwischen den Bereichen mit $|\hat{h}_{SMI}| > 0$ liegen große Gebiete mit $|\hat{h}_{SMI}| = 0$, aus denen keine Raumfrequenzen abgebildet werden, d. h. eine verbesserte Abbildung erfolgt nur für bestimmte k -Werte in der Nähe von $\pm 2k_z$, jedoch auch nur mit jeweils halber Intensität im Vergleich zum mittleren Teil der Gesamt-OTF. Durch Vergrößerung des Winkels ϑ in Abb. 3.1 und damit des Wellenfrontabstands Gl. (3.2) kann man den Absolutbetrag von k_z in Gl. (3.4) verringern und die äußeren Teile der Gesamt-OTF näher an den zentralen Teil heranschieben. Für $\vartheta = 60^\circ$ tritt sogar schon eine Überlappung zwischen den neben der inversen optischen Achse liegenden „Flügeln“ der Teil-OTFs auf [Schneider99a]. Trotzdem bleiben die von der Abbildung des konventionellen Mikroskops herrührenden „Missing Cones“ (vgl. Abschnitt 2.3.5) bestehen.

Um die in den OTF-Flügeln befindliche Bildinformation sichtbar zu machen, muss bei mindestens drei unterschiedlichen Phasendifferenzen $d\phi$ der Anregungsstrahlen jeweils ein vollständiges 3D-Bild aufgenommen werden [Krish96]. Mit Bildverarbeitungsalgorithmen

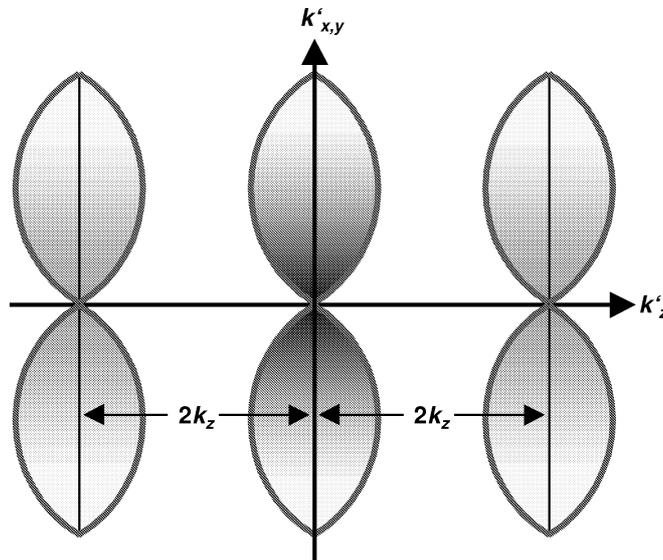


Abbildung 3.4: Optische Transferfunktion des SMI-Mikroskops für $\vartheta = 0$ (schematisch, vgl. Abb. 3.1). Die Raumfrequenzen aus den beiden äußeren Teilen werden nur halb so stark wie die Frequenzen aus dem mittleren Teil abgebildet.

lässt sich aus diesen Bildern dann ein Bild mit einer höheren effektiven axialen Auflösung berechnen, siehe dazu auch Abschnitt 3.3.2.

3.2 Methoden zur Auswertung

Dieser Abschnitt erläutert die Verfahren, mit denen aus den gemessenen Bilddaten die Distanzen der Objekte ermittelt werden. Außerdem wird gezeigt, wie man daraus Informationen über die axiale Ausdehnung der Objekte in Richtung der optischen Achse erhält. Die ermittelten Größen beziehen sich dabei auf die *Farbstoffverteilungen* in den Objekten. Das heißt, bei Distanzmessungen werden die Abstände zwischen den Schwerpunkten der Fluoreszenzverteilungen ermittelt, welche z. B. von den Distanzen zwischen den Polymerverteilungen von Beads abweichen können. Entsprechendes gilt für die axialen Ausdehnungen der Farbstoffverteilungen.

3.2.1 Vorverarbeitung der Bilddaten

Zunächst werden in den Bilddaten Objekte „von Hand“ ausgewählt. Ausgesucht werden möglichst punktförmige, d. h. kleine Objekte mit einer genügend hohen Fluoreszenzintensität und gutem Signal-zu-Rausch-Verhältnis, um eine eindeutige Identifizierung sicherzustellen. In vielen Fällen stellt es sich als sinnvoll heraus, vor der weiteren Auswertung den Einfluss der in axialer Richtung ebenfalls modulierten *Hintergrundintensität* zu reduzieren, indem von jedem **Voxel** eines Bildstapels bzw. 3D-Bildes der Mittelwert des 2D-Bildes, indem das Voxel liegt, subtrahiert wird. Dadurch werden Modulationen an den Rändern des axialen Intensitätsverlaufs, d. h. außerhalb der Fokusebene reduziert, und die

gemessenen Intensitäten entsprechen besser dem theoretischen Verlauf der PSF.

Der *axiale* Intensitätsverlauf wird aus den 3D-Bildern gewonnen, indem man in jedem lateralen 2D-Bild die Werte der Pixel aus einer 3×3 -Pixel oder 5×5 -Pixel großen *Umgebung* um die laterale Position (x, y) des Objekts herum aufsummiert, siehe dazu auch [Kirsten97]. Dadurch werden mehr Photonen eines Objekts berücksichtigt, so dass sich das Signal-zu-Rausch-Verhältnis erhöht. Dies gilt aber nur, wenn das Abtasttheorem in lateraler Richtung eingehalten wurde, d. h. die Breite der oben definierten Umgebung sollte die laterale Halbwertsbreite der Punktbildfunktion nicht wesentlich überschreiten. Auch in *lateral*er Richtung kann das Signal-zu-Rausch-Verhältnis verbessert werden, indem man die Pixel aus benachbarten 2D-Bildern um die axiale Position des Objekts herum in axialer Richtung aufsummiert, d. h. eine Projektion der Intensitäten auf die x-y-Ebene durchführt.

Im Folgenden wird sich zeigen, dass, auch wenn die Durchmesser der gemessenen Objekte mit typischerweise 100 nm immer noch klein im Vergleich zur Wellenlänge sind, diese trotzdem nicht mehr als punktförmig angesehen werden können, da die gemessenen Intensitätsverteilungen zum Teil deutlich von der oben hergeleiteten Punktbildfunktion abweichen. Im Zusammenhang mit experimentellen Daten sollte daher nicht mehr von „Punktbildfunktion“, sondern nur noch von **Axialer Intensitätsverteilung** (Axial Intensity Distribution, **AID**) gesprochen werden. Im Gegensatz zur PSF, die aus theoretischen Überlegungen folgt, ist die AID das unmittelbare Ergebnis einer Messung, die man aber durch das Anpassen einer Funktion wie z. B. Gl. (3.7) charakterisiert.

3.2.2 Distanzmessungen

Da sich die Abbildungseigenschaften des SMI-Mikroskops in *lateral*er Richtung nicht von denen eines konventionellen Mikroskops unterscheiden, kann die Bestimmung von Distanzen innerhalb der Objekt- bzw. Bildebene genauso erfolgen, wie in Abschnitt 2.4 beschrieben. Dabei wird im Rahmen dieser Arbeit wegen der in vielen Fällen leichteren und praktischeren Anwendbarkeit ein schwerpunktbasierter Algorithmus verwendet.

Auch in axialer Richtung kann so vorgegangen werden, dass jedes Objekt zunächst lokalisiert wird, indem man z. B. Gl. (3.7) als Anpassungsfunktion verwendet. Die Objektposition enthält man dann durch Bestimmung von z_0 im zweiten, von der Detektions-PSF stammenden Faktor, d. h. über das Maximum der Einhüllenden (vgl. Abb. 3.3). Die Genauigkeit dieser Bestimmung hängt jedoch wie im konventionellen Fall von der Halbwertsbreite *FWHM* der *Einhüllenden* ab und beträgt (Gl. (2.54) und [Schneider99a])

$$\Delta z_0 \approx \frac{1}{\sqrt{8 \ln 2}} \frac{FWHM}{\sqrt{N}}, \quad (3.8)$$

hierbei gibt N die gesamte Anzahl detektierter Photonen an. Das bedeutet, dass man gegenüber einer konventionellen Beleuchtung (Anregungs-PSF = *konst.*) keine Verbesserung der Lokalisationsgenauigkeit erzielt hätte.

Vereinfacht man dagegen die Kurve in Abb. 3.3 und zerlegt sie in 7 *Wellenzüge* gleicher Höhe, lässt sich die räumlich modulierte Anregung begründen: Geht man von der gleichen Anzahl insgesamt detektierter Photonen aus, enthält jeder Wellenzug $N/7$ Photonen. Gleichzeitig ist die Halbwertsbreite jedes Wellenzugs gegenüber der axialen Halbwertsbreite der Einhüllenden um einen Faktor $\approx 1/7$ reduziert. Setzt man dies in Gl. (3.8) ein, verringert sich der Fehler in der Lokalisation eines Wellenzuges gegenüber der

Lokalisation der Einhüllenden bereits um einen Faktor $\approx 0,4$. Lokalisiert man auch alle anderen Wellenzüge, kann der Fehler der gemeinsamen Lokalisation aller Wellenzüge durch den statistischen Fehler des Mittelwerts z'_0 aus den 7 einzelnen Lokalisationen abgeschätzt werden. Das bedeutet, dass sich der Fehler um einen weiteren Faktor $1/\sqrt{7}$ reduziert.

Den hier gemeinten Mittelwert erhält man, indem vor der Mittelwertbildung alle Wellenzüge durch Addition bzw. Subtraktion einer geeigneten ganzen Anzahl von Wellenfrontabständen d_W an die Stelle eines (z. B. des mittleren) Wellenzuges „geschoben“ werden. Unter Berücksichtigung dieser Korrektur kann man dann die Lokalisationen als voneinander unabhängige Einzelmessungen auffassen. Insgesamt lässt sich also der Fehler der gemeinsamen Lokalisation der Wellenzüge abschätzen durch

$$\Delta z'_0 \approx \frac{1}{\sqrt{8 \ln 2}} \frac{1}{\sqrt{7}} \frac{FWHM/7}{\sqrt{N/7}} = \frac{1}{7} \Delta z_0. \quad (3.9)$$

Das heißt, die Lokalisationsgenauigkeit der Wellenzüge ist in axialer Richtung etwa 7 mal höher als die Präzision der Bestimmung der Einhüllenden.

In der AID hängen die äquidistanten Positionen der Wellenzüge von der, durch Anpassung von Gl. (3.7) auch bestimmbar Phasenkonstante $\delta - k_{z1} z'_{01}$ ab. Da diese Konstante nicht von dem Maximum z_0 der Einhüllenden abhängt und auch δ unbekannt ist, kann daraus keine zusätzliche Information über die axiale *Position* eines Objekts erhalten werden.

Zwei Objekte mit gleicher spektraler Signatur

Betrachtet man nun die axialen Punktbildfunktionen von *zwei* gleichzeitig gemessenen Objekten an den Positionen z_1 und z_2 , deren Farbstoffe von derselben Wellenlänge angeregt werden, gilt für die Phasen Φ_1 und Φ_2 für Objekt 1 und 2 im Argument des Kosinus von Gl. (3.3):

$$\Phi_1 = k_{z1}(z_1 - z_F) + \frac{d\phi_1}{2} \quad (3.10)$$

und

$$\Phi_2 = k_{z2}(z_2 - z_F) + \frac{d\phi_2}{2}. \quad (3.11)$$

Da sich beide Objekte im selben Wellenfeld befinden, kann nun $k_{z1} = k_{z2} = k_z$ und $d\phi_1 = d\phi_2$ gesetzt werden. Bildet man die Differenz von Gl. (3.10) und (3.11), findet man

$$z_2 - z_1 = \frac{1}{k_z}(\Phi_2 - \Phi_1). \quad (3.12)$$

Das heißt, aus der Phasendifferenz $\Phi_2 - \Phi_1$ kann zusammen mit k_z die Objektdistanz in axialer Richtung bestimmt werden.

Um $\Phi_2 - \Phi_1$ und k_z anhand der gemessenen Daten zu bestimmen, muss man Funktion (3.7) an die AID jedes Objekts anpassen. Die Phasen Φ_1 und Φ_2 für jedes Objekt im Argument des Kosinus von Gl. (3.7) lauten nun

$$\Phi_1 = k_{z1}(z - z'_{01}) + \delta_1 \quad (3.13)$$

und

$$\Phi_2 = k_{z2}(z - z'_{02}) + \delta_2 \quad (3.14)$$

Aus dem gleichen Grund wie bei der Herleitung von Gl. (3.12) kann man wieder $k_{z1} = k_{z2} = k_z$ und $\delta_1 = \delta_2$ setzen, also

$$z'_{02} - z'_{01} = \frac{1}{k_z}(\Phi_1 - \Phi_2). \quad (3.15)$$

Zusammen mit Gl. (3.12) folgt daraus, dass die **Objektdistanz** und die gemessene **Wellenzugdistanz** dz'_0 dem Betrag nach gleich sind. Unter Wellenzugdistanz ist hierbei die Distanz zwischen den aufgenommenen Wellenzügen von *zwei* Objekten zu verstehen, welche ortsunabhängig ist, wenn beide Objekte von derselben Wellenlänge angeregt werden. Es ist also

$$dz'_0 = z'_{02} - z'_{01} = z_1 - z_2. \quad (3.16)$$

Da diese Gleichung nicht von der unbekanntem Konstante δ abhängt, kann hierfür in Gl. (3.7) ein beliebiger Wert angenommen werden. Man kann daher auch $\delta = 0$ setzen, so dass z'_0 der Position eines Wellenzugs entspricht. In Abbildung 3.5 sind zur Veranschaulichung die axialen Punktbildfunktionen (3.7) von zwei Objekten mit der axialen Distanz $dz = 300$ nm dargestellt.

Geht man davon aus, dass z'_{02} und z'_{01} mit einem Fehler nach Gl. (3.9) behaftet sind, erhält man unter Berücksichtigung des Fehlerfortpflanzungs-Gesetzes als Abschätzung für den Fehler von dz'_0

$$\Delta dz'_0 = \frac{1}{7} \Delta dz_0, \quad (3.17)$$

hierbei bezeichnet Δdz_0 den Fehler der Distanz der Einhüllenden.

Die Phasen Φ_1 und Φ_2 können aufgrund der Periodizität der Kosinus-Funktion aber nicht eindeutig bestimmt werden. Damit verbunden ist eine *Vieldeutigkeit* von dz'_0 , d. h.

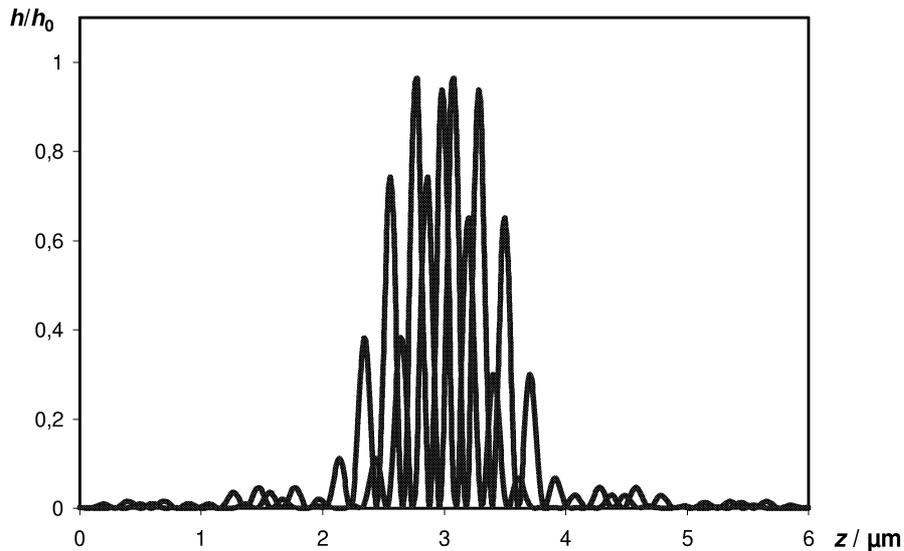


Abbildung 3.5: Axiale Punktbildfunktionen (3.7) von zwei Objekten mit gleicher spektraler Signatur mit $z_{01} = 3,15 \mu\text{m}$ und $z_{02} = 2,85 \mu\text{m}$ sowie $z_{01} - z'_{01} = z_{02} - z'_{02} = 80$ nm. Alle anderen Parameter sind gleich wie in Abb. 3.3.

Lösungen sind auch die Distanzen, die man durch Addition bzw. Subtraktion einer ganzen Anzahl n von Wellenfrontabständen d_W (Gl. (3.2)) zu dz'_0 erhält:

$$dz = dz'_0 + n \cdot d_W. \quad (3.18)$$

Diese Vieldeutigkeit kann man durch Berücksichtigung der Differenz $dz_0 = z_{02} - z_{01}$ der Maxima der Einhüllenden aufheben: Wählt man n in Gl. (3.18) so, dass $|dz - dz_0| \leq d_W$, erhält man ein eindeutiges Ergebnis mit einem Fehler entsprechend Gl. (3.17). Voraussetzung dafür ist allerdings, dass der Fehler der Distanz der Einhüllenden Δdz_0 wesentlich kleiner als der halbe Wellenfrontabstand $d_W/2$ ist.

Besitzen beide Objekte die gleiche spektrale Signatur (d. h. gleiche Emissionswellenlängen), dürfen sich die entsprechenden Intensitätsverteilungen jedoch nicht überlappen, um das oben dargestellte Verfahren anwenden zu können (siehe Abschnitt 2.4).

Objekte mit unterschiedlicher spektraler Signatur

Um die axialen Distanzen von Objekten bestimmen zu können, deren gegenseitiger Abstand kleiner als die klassische Auflösungsgrenze ist, können die Objekte mit zwei unterschiedlichen Fluoreszenzfarbstoffen versehen und mit verschiedenen Wellenlängen λ_1 und λ_2 angeregt werden.

Zur Bestimmung der Distanz kann Gleichung (3.16) jetzt aber nicht mehr angewendet werden, da $k_{z1} \neq k_{z2}$ und beide Wellenfelder unterschiedliche, unbekannte Phasendifferenzen $d\phi_1$ und $d\phi_2$ aufweisen. Die Distanz zwischen den Wellenzügen von zwei Objekten ist daher nicht mehr ortsunabhängig und kann nicht mit der Objektdistanz gleichgesetzt werden kann. Abbildung 3.6 zeigt die Punktbildfunktionen von zwei Objekten im

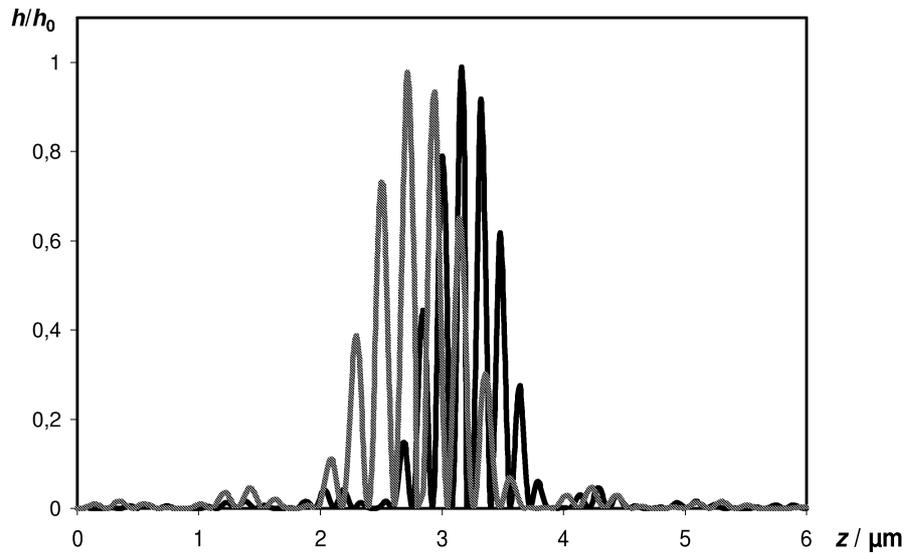


Abbildung 3.6: Axiale Punktbildfunktionen (3.7) von zwei Objekten mit unterschiedlicher spektraler Signatur. Objekt 1 wird mit $\lambda_1 = 647$ nm angeregt und befindet sich bei $z_{01} = 2,8$ μm , Objekt 2 mit $z_{02} = 3,2$ μm absorbiert bei $\lambda_2 = 488$ nm. Alle anderen Parameter sind gleich wie in Abb. 3.5.

Abstand $dz = 400$ nm, von denen eines bei $\lambda_1 = 647$ nm (rot) und eines bei $\lambda_2 = 488$ nm (grün) absorbiert.

Um die axiale Distanz zwischen zwei Objekten dennoch bestimmen zu können, muss vorher durch eine **Kalibrationsmessung** an einem Referenzobjekt die Differenz der Phasendifferenzen $d\Theta = d\phi_2 - d\phi_1$ der beiden Wellenfelder bestimmt werden (bei Objekten mit $\lambda_1 = \lambda_2$ ist $d\Theta = 0$). Dabei muss das Referenzobjekt bei beiden Wellenlängen gleichzeitig absorbieren und die Schwerpunkte der beiden Farbstoffverteilungen in dem Objekt sollten koinzidieren.

Zur Berechnung von $d\Theta$ geht man genauso vor wie zur Herleitung von Gl. (3.16), wobei man in (3.10) und (3.11) die Objektpositionen gleichsetzt, also $z_1 = z_2$. Entsprechend setzt man in Gl. (3.13) und (3.14) $z'_{01} = z'_{02}$, man erhält $\Theta = \delta_2 - \delta_1$. Durch eine weitere Messung an den zu untersuchenden Objekten kann man nun, sofern $k_{z1} = k_{z2}$, nach der im letzten Abschnitt beschriebenen Methode die Objektdistanz aus der Wellenzugdistanz ermitteln. Dabei muss in Gl. (3.16) $d\Theta$ berücksichtigt werden:

$$z_1 - z_2 = z'_{02} - z'_{01} - \frac{1}{k_z} d\Theta. \quad (3.19)$$

Die im Zusammenhang mit Gl. (3.18) angestellten Betrachtungen zur Aufhebung der Mehrdeutigkeit der Phase bei größeren Distanzen gelten auch hier. Bei der Berechnung der Differenz $z_{02} - z_{01}$ der Einhüllenden muss allerdings zusätzlich die axiale *chromatische Verschiebung* des Objektivs berücksichtigt werden.

Eine Möglichkeit, k_{z1} und k_{z2} anzugleichen, besteht darin, unter Berücksichtigung von Gl. (3.2) bzw. (3.4) die Laserstrahlen so in die hinteren Fokusebenen der Objektive einzufokussieren, dass die Wellenfrontabstände d_W für beide Wellenlängen gleich sind. Für $\lambda_1 = 647$ nm und $\lambda_2 = 488$ nm ist dies z. B. für die Winkel $\vartheta_1 = 0^\circ$ und $\vartheta_2 = 41,04^\circ$ erfüllt. Eine weitere, sehr elegante Möglichkeit besteht darin, zwei Farbstoffe mit gleichem Anregungs-, jedoch unterschiedlichen Emissionsspektren zu verwenden. Hierfür kommen unter Umständen sog. „Nanocrystals“ oder „Quantum Dots“ in Betracht, siehe Abschnitt 2.1. In diesem Fall kann sogar auf eine Kalibrationsmessung verzichtet werden, da sich wieder beide Objekte im gleichen Wellenfeld befinden.

Trotzdem lässt sich im Prinzip auch aus den Wellenzügen von zwei Wellenfeldern mit unterschiedlichen Wellenfrontabständen eine Distanzinformation gewinnen, indem man ausnutzt, dass die Distanzen zwischen den Wellenzügen in systematischer Weise vom Ort abhängen: Seien z'_{01} und z'_{02} die Positionen zweier beliebiger Wellenzüge von zwei verschiedenen Wellenfeldern mit unterschiedlichen Wellenfrontabständen d_{W1} und d_{W2} , wobei gilt $dz'_0 = z'_{02} - z'_{01}$. Nummeriert man alle folgenden Wellenzüge in positiver Richtung gehend fortlaufend für jedes Wellenfeld getrennt durch und beginnt jeweils bei z'_{01} und z'_{02} mit 0, gilt für den Abstand dz'_n zwischen den jeweils n -ten Wellenzügen bzw. die Wellenzugdistanz

$$dz'_n = dz'_0 + n \cdot (d_{W2} - d_{W1}), \quad (3.20)$$

sofern $d_{W2} > d_{W1}$. Man kann nun in jedem der beiden überlagerten Wellenfelder einen „Referenz-Wellenzug“ an den Stellen z'_{Ref1} und z'_{Ref2} definieren. Durch die oben beschriebene Kalibrationsmessung lässt sich dann die Referenzdistanz

$$dz'_{Ref} = z'_{Ref2} - z'_{Ref1} \quad (3.21)$$

bestimmen. Eine Messung an den zu untersuchenden Objekten liefert dann einen anderen Wert dz'_{Mess} als Distanz zwischen den Referenz-Wellenzügen. Befinden sich die Objekte an einer anderen axialen Position im Objektraum als das Referenzobjekt bei der Kalibrationsmessung, kann der richtige Wert für dz'_{Mess} durch entsprechendes Abzählen der Wellenzüge nach Gl. (3.20) korrigiert werden. Die gesuchte Objektdistanz erhält man schließlich aus

$$dz'_{Obj} = dz'_{Mess} - dz'_{Ref}. \quad (3.22)$$

Der Nachteil dieser Methode besteht darin, dass die entsprechenden Wellenzüge in jeder Messung „wiedergefunden“ werden müssen. Dies dürfte sich insbesondere bei großen Streuungen der zu erwartenden Distanzen als nicht praktikabel erweisen. Das Verfahren ist daher nur für die Messung von Distanzen, die wesentlich kleiner als die Wellenfrontabstände d_{W1} und d_{W2} sind, geeignet.

Bei der Messung solcher sehr kleiner Distanzen sind auch die Abstände der Einhüllenden viel kleiner als die Wellenfrontabstände, also $d_{z0} \ll d_{1,2}$, und in Gl. (3.18) ist $n = 0$. In diesem Fall können die Distanzmessungen auch mit einer *Phasen-Rasterung*, d. h. durch Variation der Phasendifferenzen $d\phi$ anstelle der Objektpositionen z , durchgeführt werden (siehe Abschnitt 3.1.2). Man setzt dann für $d\phi$ in Gl. (3.3) bzw. z'_0 in Gl. (3.7) die Spiegelpositionen z_S im Interferometer multipliziert mit einem Korrekturfaktor c ein, der die Verschiebung der Wellenfronten mit der Verschiebung des Spiegels in Relation setzt: Entspricht der Wellenfrontabstand d_W einer Verschiebung des Objekts um $z = d_W$ und einer, vom Brechungsindex abhängigen, Verschiebung des Spiegels um z. B. $z_S = 2d_W$, so ist $c = 1/2$.

Es sei hier nochmals bemerkt, dass die in diesem Abschnitt beschriebenen Verfahren zur axialen Distanzmessung nicht auf zwei spektrale Signaturen begrenzt sind. Im Prinzip können beliebig viele unterschiedliche Fluoreszenzfarbstoffe eingesetzt werden. Die experimentellen Schwierigkeiten steigen mit der Anzahl der Farben jedoch, vor allem wegen zunehmender Überlappungen der einzelnen Absorptions- und Emissionspektren, stark an.

Alle Betrachtungen in diesem Kapitel gehen von einem gleichen Brechungsindex n von Immersionsöl, Objektträger, Einbettungsmedium des Objekts und Deckglas aus, vgl. Abb. 3.2. Ändert man den Brechungsindex des Einbettungsmediums, ändert sich auch der Wellenfrontabstand im Medium entsprechend. Eine genaue Betrachtung der Vorgänge auch unter Berücksichtigung von Objektträger und Deckglas zeigt, dass der *detektierte* Wellenfrontabstand nur vom Brechungsindex des *Immersionsöls* abhängt, die gemessenen Distanzen dagegen aufgrund der veränderten Wellenlänge im Einbettungsmedium **systematische Fehler** aufweisen. Das heißt, die in den Bilddaten ermittelten Distanzen sind gegenüber der wahren Distanz im gleichen Verhältnis verkleinert/vergrößert, wie der Wellenfrontabstand im Medium gegenüber dem Wellenfrontabstand im Immersionsöl vergrößert/verkleinert ist, siehe hierzu auch [Kirsten97].

3.2.3 Modellbasierte Methoden zur axialen Distanzmessung

In den meisten Messungen wird die Axiale Intensitätsverteilung (AID) leider nicht korrekt durch Gl. (3.7) beschrieben. Wie in Abschnitt 2.3.4 dargelegt, beeinflussen Aberrationen, Brechungsindexvariationen in der Mikro-Umgebung der Objekte usw. die Abbildung. Man versucht daher, andere Funktionen „empirisch“ zu finden, die die AID möglichst gut beschreiben.

Die bisher diskutierte theoretische PSF (3.7) unterscheidet sich vor allem in der **Halbwertsbreite** der Einhüllenden und in der **Amplitude der Modulation** von der gemessenen AID. Erstere ist gegenüber der PSF aufgrund der unter realen Bedingungen auftretenden Reduzierung der optischen Auflösung meist vergrößert und muss im Vergleich zu Gl. (3.7) durch einen zusätzlichen Parameter berücksichtigt werden. Die Größe der nicht punktförmigen, realen Objekte bewirkt, neben einer weiteren Verbreiterung der Einhüllenden, eine deutliche Reduktion der Amplitude der Modulation und erfordert mindestens einen weiteren Fit-Parameter. Die Intensitäten in den lokalen Minima der AID zwischen jeweils zwei Wellenzügen fallen also nicht mehr auf null bzw. den Hintergrundwert ab, sondern liegen signifikant darüber. Da die Wellenzüge dann nicht mehr so stark ausgeprägt sind, wirkt sich dieser Effekt einerseits nachteilig auf die Lokalisationsgenauigkeit bzw. den Fehler der gemessenen Distanzen aus, bietet aber andererseits die Möglichkeit, die Ausdehnung der Objekte in axialer Richtung sehr genau zu bestimmen, wie in Abschnitt 3.2.6 noch dargelegt wird. Darüberhinaus muss im Bedarfsfall durch einen weiteren Parameter eine evtl. auftretende Asymmetrie der AID erfasst werden.

In [Schneider99a] wird zur Charakterisierung der gemessenen Daten die folgende Anpassungsfunktion verwendet:

$$f(z) = I_B + A \cdot z + I_0 \cdot \left(\frac{E_{Env}}{2} + (1 - E_{Env}) \cdot \text{sinc}^2 \left(2\pi \frac{z - E_{Max}}{\sigma_{Epi}} \right) \right) \cdot \left(\frac{W_{Env}}{2} + (1 - W_{Env}) \cdot \cos^2 \left(2\pi \frac{z - W_{Max}}{d_W} \right) \right). \quad (3.23)$$

Hierbei gibt I_B die Hintergrundintensität und I_0 die Maximalintensität der Einhüllenden an, A charakterisiert die Asymmetrie der AID. Der Parameter E_{Env} beschreibt die Verbreiterung der Einhüllenden aufgrund der Objektausdehnung und W_{Env} ist ein Maß für die entsprechende Reduktion der Modulationsamplitude („Verwaschung“). E_{Max} enthält die Position des Maximums der Einhüllenden und W_{Max} die vieldeutigen Position(en) der Wellenzüge. Schließlich gibt σ_{Epi} die Halbwertsbreite der Einhüllenden an, und d_W ist der Wellenfrontabstand.

Es ist nicht unbedingt notwendig, für die Darstellung der Einhüllenden bzw. der Detektions-PSF eine sinc-Funktion zu verwenden. Die von ihr stammenden Nebenmaxima können in der gemessenen AID nicht immer beobachtet werden. Es kann daher sinnvoll sein, anstelle des sinc eine einfachere Gauß-Funktion zu verwenden. Dies spart Rechenzeit, da die Anpassungsfunktion zur Optimierung ihrer Parameter, wie z. B. beim Levenberg-Marquardt-Verfahren zur Minimierung der Abweichungsquadrate [Press92], sehr oft mit unterschiedlichen Parametersätzen berechnet werden muss.

Eine alternative Anpassungsfunktion, gebildet aus der Superposition einer Funktion der Form $\text{sinc}^2 \cdot \cos^2$ mit einer zweiten sinc^2 -Funktion, lautet:

$$f(z) = I_B + A_1 \text{sinc}^2 \left(\frac{z - z_0}{B} \right) \cdot \cos^2 \left(\frac{z - z_1}{C} \right) + A_2 \text{sinc}^2 \left(\frac{z - z_2}{E} \right). \quad (3.24)$$

Dabei gibt A_1 die Amplitude der Modulation und A_2 den Maximalwert der „inneren“ Einhüllenden an; A_1 und A_2 hängen zusammen von der Größe bzw. Ausdehnung des Objekts ab (siehe Abschnitt 3.2.6). B und z_0 geben die Breite und die Position der „äußeren“ Einhüllenden an, während z_1 mit der Phase (Position der Wellenzüge) und C mit dem

Wellenfrontabstand verbunden ist. Die Breite und die Position des Maximums der „inneren“ Einhüllenden werden durch die Parameter E und z_2 angegeben, I_B ist wieder die Hintergrundintensität. Abbildung 3.7 zeigt den Verlauf von (3.24) für $z_0 = z_1 = z_2 = 3 \mu\text{m}$ und $B = 4,0 \cdot 10^{-7} \text{ m}$, $C = 6,86 \cdot 10^{-8} \text{ m}$ (entsprechend einem Wellenfrontabstand von $d_W = 214 \text{ nm}$) und $E = 4,0 \cdot 10^{-7} \text{ m}$. Außerdem ist $A_1 = 0,94$ und $A_2 = 0,06$; das entspricht einer Objektausdehnung in axialer Richtung von 40 nm .

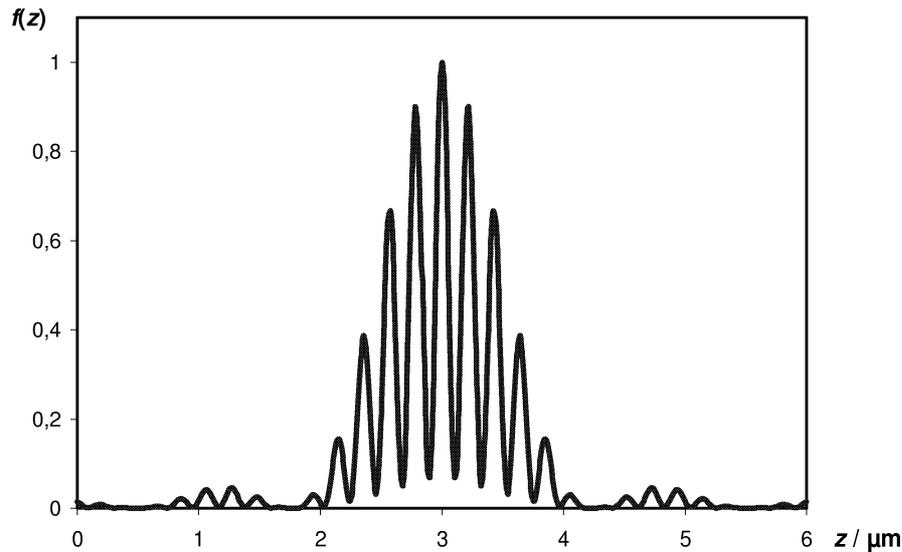


Abbildung 3.7: Verlauf der Anpassungsfunktion (3.24) für $I_B = 0$, $B = 4,0 \cdot 10^{-7} \text{ m}$, $C = 6,86 \cdot 10^{-8} \text{ m}$ (entspricht einem Wellenfrontabstand von $d = 214 \text{ nm}$), $E = 4,0 \cdot 10^{-7} \text{ m}$, $z_0 = z_1 = z_2 = 3,0 \mu\text{m}$ und $A_1 = 0,94$; $A_2 = 0,06$; d. h. für ein ausgedehntes, nicht punktförmiges Objekt. Die Ausdehnung des Objekts von 40 nm bewirkt bereits eine deutliche Abnahme der Modulationsamplitude, vgl. Abb. 3.3.

3.2.4 Schwerpunktbasierte Methode zur axialen Distanzmessung

Obwohl durch Anpassen von (3.23) und (3.24) an die gemessene AID die Wellenzüge im Prinzip sehr genau lokalisierbar sind, erweist sich diese Methode in der Praxis häufig als problematisch.

Dies liegt einerseits an der Komplexität der Anpassungsfunktion und der damit verbundenen Vielzahl zu bestimmender Parameter. So müssen z. B. beim Anpassen von (3.24) oder (3.23) jeweils 9 Zahlenwerte mit hinreichender Genauigkeit ermittelt werden. Das bedeutet, dass in einem 9-dimensionalen Raum das globale Minimum z. B. der Summe der Fehlerquadrate, gebildet aus den Differenzen der Funktionswerte $f(z)$ und der AID-Werte, gefunden werden muss. Die Größe dieses Raumes lässt sich zwar durch eine geeignete Wahl der Startparameter wesentlich einschränken, das Ergebnis der Anpassung kann jedoch trotzdem nur ein lokales Minimum sein, so dass die bestimmten Distanzen vom wahren Wert signifikant abweichen. Mittels Computersimulationen wurde in [Wagner01] außerdem gezeigt, dass sich die Ergebnisse bereits enorm, d. h. um mehr als 10 nm verändern, wenn die Startparameter um etwas mehr als $1,5\%$ vom wahren, bei einer Messung zunächst

nicht bekannten, Wert abweichen. Dieses Problem lässt sich evtl. lösen, indem man durch mehrfaches Anpassen mit unterschiedlichen Startwerten versucht, das globale Maximum zu finden. Allerdings würde dies einen erheblichen Mehraufwand an Rechenkapazität mit sich bringen.

Andererseits ist es oftmals schwierig festzustellen, ob das gewählte Modell bzw. die verwendete Anpassungsfunktion die AID wirklich zutreffend beschreibt. So können z. B. Brechungsindex-Variationen oder eine inhomogene Hintergrundintensität die AID in nicht vorhersehbarer Weise beeinflussen und zu systematischen Fehlern in der Distanzbestimmung führen.

Eine Möglichkeit zur Reduzierung dieser Probleme besteht darin, die Positionen der einzelnen Wellenzüge durch die Berechnung ihrer **Intensitätsschwerpunkte** nach Gl. (2.53) zu bestimmen. Dazu müssen zunächst die einzelnen Wellenzüge *segmentiert* werden. Für die in Abb. 3.7 gezeigte Kurve beträgt der hierzu erforderliche Schwellwert z. B. $0,06 = A_2$, und man lokalisiert $n = 9$ Wellenzüge. Eine Auftragung der Wellenzugpositionen z_i über dem Index $i = 1..n$ der einzelnen Wellenzüge, beginnend bei dem Wellenzug mit der kleinsten Koordinate, ergibt eine Gerade, an die die einfache lineare Funktion

$$z(i) = z_{OA} + i \cdot d_W \quad (3.25)$$

mit dem Ordinatenabschnitt z_{OA} und der Steigung d_W angepasst wird; dabei ist d_W gleichzeitig der Wellenfrontabstand.

Aufgrund des Einflusses der beiden Einhüllenden sind die Schwerpunkte der einzelnen Wellenzüge allerdings nach innen, d. h. zum Maximum z_0 der „äußeren“ Einhüllenden hin verschoben, und aus den ermittelten Positionen z_i resultiert ein kleinerer Wert für d_W im Vergleich zum tatsächlichen Wellenfrontabstand. Um den Einfluss dieser systematischen Verschiebungen auf die gemessenen Distanzen zu eliminieren, berechnet man zunächst für jedes Objekt mit Gl. (3.25) die Position desselben Wellenzugs. Hierbei bietet es sich an, jeweils die Positionen z_{Max1} und z_{Max2} der dem Maximum der „äußeren“ Einhüllenden nächstgelegenen Wellenzüge zu bestimmen. Wenn in Gl. (3.7) $\delta \neq 0$, ist $z_{Max1,2}$ gegenüber $z_{01,2}$ immer noch leicht systematisch verschoben. Diese Verschiebung ist aber bei beiden Objekten gleich, da der Verlauf der SMI-Punktbildfunktion nicht von der Objektposition abhängt. Die mit Hilfe der Werte von z_{Max1} und z_{Max2} berechneten wechselseitigen Distanzen sind also mit keinem systematischen Fehler behaftet.

Die Methode hat in gewissen Situationen auch Nachteile: Je größer die Objekte sind, desto mehr verschiebt sich das Maximum der „inneren“ Einhüllenden nach oben. Damit wird die Anzahl segmentierbarer Wellenzüge kleiner, und der Lokalisationsfehler steigt an, siehe auch Abschnitt 3.2.6. Ist die axiale Distanz der Objekte so groß, dass zur Aufhebung der Vieldeutigkeit der Wellenfrontabstand d_W verwendet werden muss (vgl. Gl. 3.18), muss außerdem der gemessene Wellenfrontabstand in Abhängigkeit von der Objektgröße korrigiert werden.

3.2.5 Vergleich Objekt-/Phasen-Rasterung

Wie bereits in Abschnitt 3.2.2 beschrieben, kann die axiale Distanz auch durch *Phasen-Rasterung*, d. h. durch Variation der Phasendifferenz der Anregungs-Laserstrahlen gemessen werden, sofern die zu messenden Distanzen deutlich kleiner als der Wellenfrontabstand

d_W sind. Dieses Verfahren sollte vor allem vor dem Hintergrund der in den letzten beiden Abschnitten beschriebenen Schwierigkeiten sowohl für die modell- als auch für die schwerpunkt-basierte Methode einige nennenswerte **Vorteile** bieten.

Der größte Vorteil für das modellbasierte Verfahren besteht darin, dass sich die Anpassungsfunktion deutlich vereinfacht:

$$f(z) = I_B + A \cos^2 \left(\frac{z - z_1}{C} \right), \quad (3.26)$$

d. h. man hat nur noch 4 Parameter an die AID anzupassen: die Hintergrundintensität I_B , die Amplitude A der Modulation, die Position z_1 der Wellenfronten und den mit dem Wellenfrontabstand verbundenen Parameter C . Es lassen sich allerdings keine Rückschlüsse auf die Größe des Objekts ziehen (siehe nächster Abschnitt).

Vorteilhaft für die schwerpunkt-basierte Methode wirkt sich aus, dass die einzelnen Wellenzüge **nicht mehr asymmetrisch verzerrt** sind. Dadurch kann jeder Wellenzug ohne den von der Einhüllenden bzw. der Detektions-PSF verursachten systematischen Fehler lokalisiert werden.

Darüberhinaus können im Prinzip *beliebig* viele Wellenzüge aufgenommen und damit die Genauigkeit der Distanzbestimmung entsprechend erhöht werden. Die maximale Anzahl detektierbarer Wellenzüge ist nur durch den maximalen Hub des für die Bewegung des Interferometerspiegels verwendeten piezoelektrischen Tisches limitiert. Außerdem ist das Signal-zu-Rausch-Verhältnis bzw. die *Photonenausbeute*, d. h. das Verhältnis zwischen detektierten und aus den Farbstoffmolekülen emittierten Fluoreszenzphotonen erhöht, da sich beide Objekte während der gesamten Aufnahme in der Fokusebene des Detektions-Objektivs befinden.

3.2.6 Zusammenhang zwischen Form der AID und Objektgröße

Wie bereits mehrfach angedeutet, hängt die Form der axialen Intensitätsverteilung (AID) im SMI-Mikroskop von der **axialen Ausdehnung** der Fluoreszenzverteilung im Objekt ab. Die Größe bzw. die Gestalt des Objekts selbst, wie z. B. unter dem Raster-Elektronenmikroskop sichtbar, kann davon jedoch mehr oder weniger stark abweichen. Im Folgenden ist daher mit „Objekt“ immer nur seine Fluoreszenzverteilung gemeint.

Die Verringerung der Modulationsamplitude der AID bei zunehmender Objektgröße kann man leicht verstehen, wenn man zunächst die Abbildung eines unendlich kleinen, d. h. punktförmigen Objekts im Wellenfeld nachvollzieht: Befindet sich dieses an einer Stelle z' genau im Minimum zwischen zwei Ebenen maximaler Anregungsintensität, so dass $I(z') = 0$ in Gl. (3.1), hat die AID bzw. PSF an der entsprechenden Stelle den Wert 0 (vgl. Abb. 3.3). Bei einer axialen Ausdehnung größer als 0 gibt es jedoch keine Objektposition mehr, an der nicht bestimmte Teile des Objekts zur Fluoreszenz angeregt werden, da die Ebenen, in denen die Laserintensität null ist, unendlich dünn sind. Folglich ist die Intensität in den lokalen Minima der AID größer als null. Je größer das Objekt, desto stärker tritt dieser Effekt zu Tage, und die Amplitude der Modulation nimmt weiter ab. Abbildung 3.8 zeigt zur Veranschaulichung schematisch (a) ein Objekt im Wellenfeld, dessen Ausdehnung gleich dem halben Wellenfrontabstand d_W ist und (b) ein größeres Objekt mit einem Durchmesser von genau $d_W = 161$ nm sowie die entsprechenden Anpassungsfunktionen nach Formel (3.24). Die vertikalen Linien im linken Teil der Abbildung deuten die Ebenen

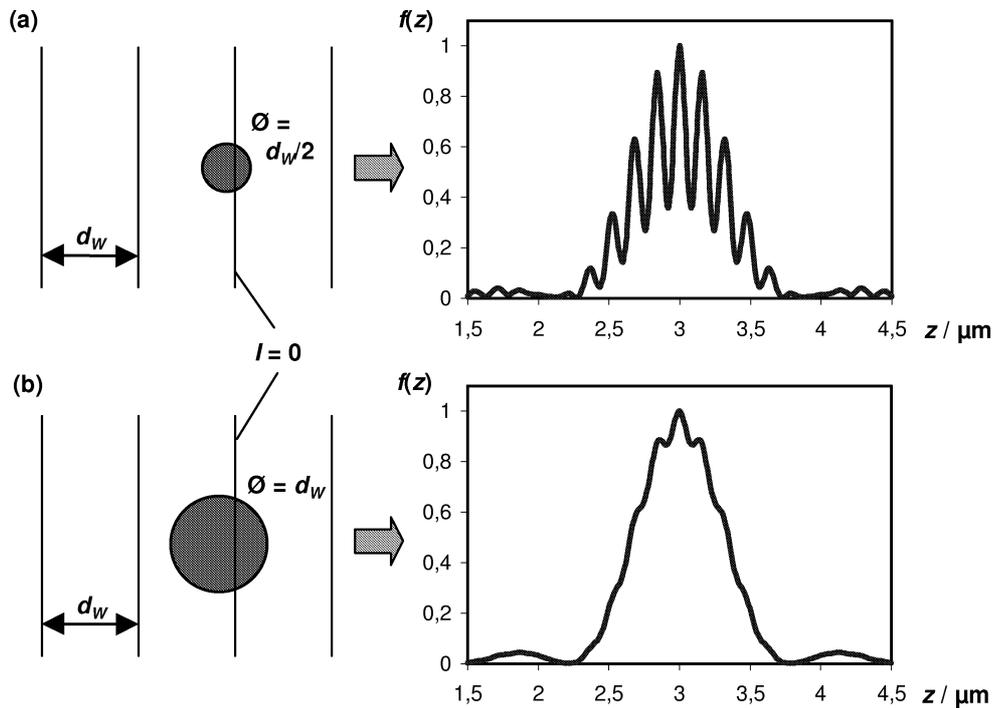


Abbildung 3.8: Schematische Darstellung zweier unterschiedlich großer Objekte im Wellenfeld und entsprechende Verläufe der Anpassungsfunktion (3.24): (a) Objektausdehnung = halber Wellenfrontabstand d_W ; (b) Objektausdehnung = d_W ; bei dieser Objektgröße ist die Modulation bereits sehr stark abgeschwächt.

an, wo die Anregungsintensität null ist, die Parameter für die rechts dargestellten Kurven entsprechen bis auf A_1 und A_2 und $d_W = 161$ nm den für Abb. 3.7 verwendeten. Deutlich ist zu erkennen, dass die Modulation bei (b) bereits sehr stark abgeschwächt ist.

Bei einer axialen Objektausdehnung von ca. dem zweifachen Wellenfrontabstand d_W ist schließlich überhaupt keine Modulation mehr erkennbar, d. h. die Ebenen mit größerer und die mit kleinerer Fluoreszenzintensität gleichen sich gegenseitig aus. Das bedeutet auch, dass sich die Abbildung eines Objekts, das größer als $2d_W$ ist, nicht mehr von der Abbildung in einem konventionellen Epifluoreszenz-Mikroskop unterscheidet.

Der Zusammenhang zwischen den Parametern A_1 und A_2 in Formel (3.24) und der Objektausdehnung wurde mit Verfahren der **Virtuellen Mikroskopie**, d. h. mit Computersimulationen der optischen Abbildung im SMI-Mikroskop ermittelt [Failla01]. Dabei wurde von kugelförmigen Objekten ausgegangen; die Durchmesser der Kugeln reichten von einigen wenigen Nanometern bis in die Nähe der klassischen optischen Auflösungsgrenze von mehreren hundert Nanometern. Die Resultate der Simulationen ergaben einen eindeutigen Zusammenhang zwischen dem **Kontrast der Modulation**

$$R = \frac{A_2}{A_1 + A_2}, \quad (3.27)$$

mit $A_1 > 0$ und $A_2 > 0$, und dem Durchmesser D bzw. der axialen Ausdehnung der Kugeln. Abbildung 3.9 zeigt die entsprechenden Kurven für die gängigen Laserwellenlängen

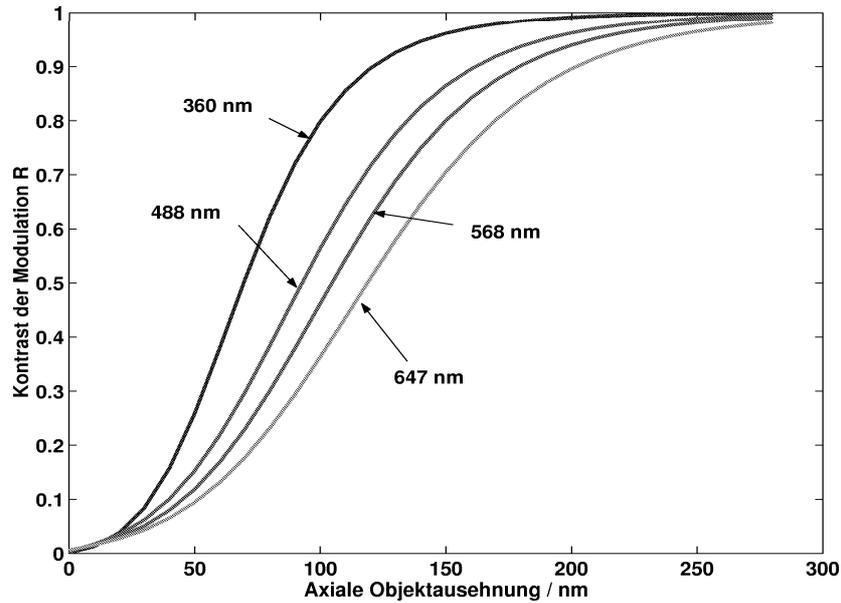


Abbildung 3.9: Zusammenhang zwischen Kontrast R der Modulation der AID und Objektdurchmesser D bzw. axialer Objektausdehnung unter der Annahme kugelförmiger Objekte bei verschiedenen Anregungswellenlängen λ_{ex} bzw. Wellenfrontabständen d_W . Die Kurven sind das Ergebnis von Computersimulationen der optischen Abbildung im SMI-Mikroskop [Failla01].

360 nm, 488 nm, 568 nm und 647 nm; die jeweiligen Wellenfrontabstände erhält man aus Gl. (3.2) mit $n = 1,515$ und $\vartheta = 0$.

Die in Abb. 3.9 gezeigten Relationen lassen sich dazu verwenden, die *Objektausdehnung in axialer Richtung zu messen*, indem man die Parameter A_1 , A_2 bestimmt und Gl. (3.27) benutzt. Dies ist aber nur in dem Bereich gut möglich, in dem die Kurven näherungsweise linear verlaufen; in den Randbereichen sind die Steigungen zu klein, um ein hinreichend genaues Ergebnis zu erhalten. Das heißt, man kann die Objektgröße sehr gut bestimmen, wenn sie zwischen ca. 20 nm und dem Wellenfrontabstand d_W liegt. Größere und kleinere Objekte können nicht mehr zuverlässig vermessen werden.

An dieser Stelle sei nochmals erwähnt, dass man durch eine Aufnahme der AID nur die *axiale* Ausdehnung eines Objekts messen kann. Von *Durchmesser* darf nur unter der Annahme gesprochen werden, dass das Objekt Kugelgestalt besitzt.

Die Computersimulationen zeigten außerdem keinen systematischen Einfluss der Objektgröße auf die Position der Wellenzüge und damit auf die gemessenen Distanzen. Im Experiment muss zur Vermeidung systematischer Fehler streng darauf geachtet werden, dass die Intensitäten der beiden interferierenden, zur Fluoreszenzanregung verwendeten Laserstrahlen *gleich* sind. Andernfalls können die in Abb. 3.9 gezeigten Kurven nicht mehr verwendet werden, da der Kontrast der Modulation der AID aufgrund der bereits verringerten Amplitude der *Modulation des Anregungswellenfeldes* verfälscht wird.

3.3 Räumlich modulierte Anregung in mehreren Richtungen

Bisher wurden die räumlich modulierte Anregung in axialer Richtung und die sich daraus ergebenden Konsequenzen für die Punktbildfunktion sowie Methoden der Auswertung, d. h. insbesondere zur Distanzmessung beschrieben, wie sie im Rahmen dieser Arbeit verwendet wurden. Dieser Abschnitt gibt einen kurzen Überblick über weitere Möglichkeiten zur Modulation der Anregungsintensität und skizziert, wie daraus Bilder mit einer höheren effektiven Auflösung rekonstruiert werden können.

3.3.1 Erzeugung einer lateralen Modulation der Anregung

Die einfachste Möglichkeit, eine Modulation in lateraler Richtung zu erreichen, besteht darin, die Abstände d_f zwischen den beiden Fokuspunkten und der optischen Achse in Abb. 3.1 *unterschiedlich* einzustellen. Die Wellenfronten stehen dann nicht mehr senkrecht auf der optischen Achse, und der axialen Modulation des Anregungslichtfeldes wird zusätzlich eine laterale Modulation innerhalb der Bildebene aufgeprägt. Die Richtung des Wellenvektors \mathbf{u} der Modulation in der Bildebene kann dabei durch Drehen der gemeinsamen Einfallsebene beider Strahlen geändert werden.

Alternativ kann man in jedes Objektiv *zwei* Laserstrahlen symmetrisch so einfokussieren, dass die Fokuspunkte in den hinteren Fokusebenen gegenüber liegen, also bei d_f und $-d_f$. Die im Objektraum interferierenden Strahlenbündel bewirken dann auch in lateraler Richtung eine Modulation der Anregungsintensität [Jäckle99]. Dieses Verfahren lässt sich im Prinzip – allerdings mit hohem experimentellem Aufwand – auch für beide laterale Richtungen gleichzeitig realisieren, indem man in jedes Objektiv ein zweites Paar Laserstrahlen in einer zum ersten Paar senkrechten Ebene einfokussiert. Eine weitere Möglichkeit, das Anregungslicht lateral zu modulieren besteht darin, in einer zur Objektebene konjugierten Ebene des Anregungs-Strahlengangs ein Beugungsgitter zu positionieren [Heintzmann98].

Die Punktbildfunktion bzw. laterale Intensitätsverteilung bei lateraler Modulation ist analog zu Gl. (3.3) wieder gleich dem Produkt von Anregungs-PSF und Detektions-PSF; entsprechend lassen sich die oben dargestellten Verfahren zur Distanz- und Größenmessung anwenden. Damit könnte die Präzision der Distanzmessungen in allen drei Dimensionen erhöht werden, und aus Messungen der Objektausdehnung in den drei Raumrichtungen ließe sich zusätzlich Information über die Form eines Objekts gewinnen.

Die **Motivation** für die in dieser Arbeit realisierte **axiale** Modulation des Anregungslichtfeldes liegt in den unterschiedlichen Halbwertsbreiten der PSF eines konventionellen Mikroskops in lateraler und axialer Richtung begründet: Da die Punktbildfunktion in axialer Richtung eine wesentlich größere Halbwertsbreite als in lateraler Richtung aufweist, ist die Präzision der Distanzmessung in axialer Richtung entsprechend reduziert. Dies gilt sowohl für ein konventionelles Mikroskop (Abschnitt 2.3.4 und 2.4) als auch für die konfokale Laser-Raster-Mikroskopie. Mit Hilfe der axialen Modulation kann dagegen die Genauigkeit der axialen Distanzmessung soweit verbessert werden, dass sie sogar die Präzision der Abstandsmessung in lateraler Richtung übertrifft (vgl. Abschnitt 3.2.2).

3.3.2 Bildrekonstruktion

Mit Hilfe der räumlich modulierten Anregung lässt sich nicht nur eine Erhöhung der Präzision von Distanzmessungen erreichen, sondern man kann auch die effektive *optische Auflösung* in einer oder in mehreren Raumrichtungen erhöhen, wie bereits in Abschnitt 3.1.3 angedeutet wurde. Das Prinzip des Verfahrens besteht darin, zunächst für jede Richtung bzw. jeden Wellenvektor \mathbf{u} der Modulation (entspricht $2\mathbf{k}_z$ in Abb. 3.4) mindestens drei 3D-Bilder mit verschiedenen Positionen bzw. Phasenlagen Δ_j der Wellenzüge der Modulation aufzunehmen [Krish96, Gustaffson00]. Die entsprechenden Frequenzspektren im reziproken Raum

$$\hat{\rho}_j(\mathbf{k}) = \hat{h}(\mathbf{k}) \left(2\hat{I}(\mathbf{k}) + e^{i\Delta_j} \hat{I}(\mathbf{k} + \mathbf{u}) + e^{-i\Delta_j} \hat{I}(\mathbf{k} - \mathbf{u}) \right) \quad (3.28)$$

bilden dabei ein Gleichungssystem, mit dem die verschobenen Objektspektren („Flügel“) $\hat{I}(\mathbf{k})$, $\hat{I}(\mathbf{k} + \mathbf{u})$ und $\hat{I}(\mathbf{k} - \mathbf{u})$ berechnet werden können [Heintzmann98, Frohn01]. Unter der Größe $I(\mathbf{r})$ im Ortsraum ist hierbei die Verteilung der Fluoreszenzfarbstoffe bzw. -intensität im Objektraum zu verstehen, \hat{h} ist die OTF des Systems ohne modulierte Anregung, siehe auch Abschnitte 2.3.5 und Abb. 3.4.

Eine Änderung der Richtung von \mathbf{u} ermöglicht nun eine Verschiebung der Flügel der OTF in Abb. 3.4 an (nahezu) beliebige Stellen im Fourier-Raum, und die entsprechenden Spektren können mit dem oben beschriebenen Verfahren detektiert und rekonstruiert werden. Führt man dies mehrfach hintereinander für verschiedene \mathbf{u} durch und wählt \mathbf{u} jeweils so, dass die Flügel für verschiedene \mathbf{u} überlappen, lassen sich die einzelnen Spektren zu einem Gesamtspektrum zusammensetzen. Abbildung 3.10 zeigt schematisch eine entsprechende Gesamt-OTF [Schneider99a, Frohn01]. Gegenüber der Optischen Transferfunktion

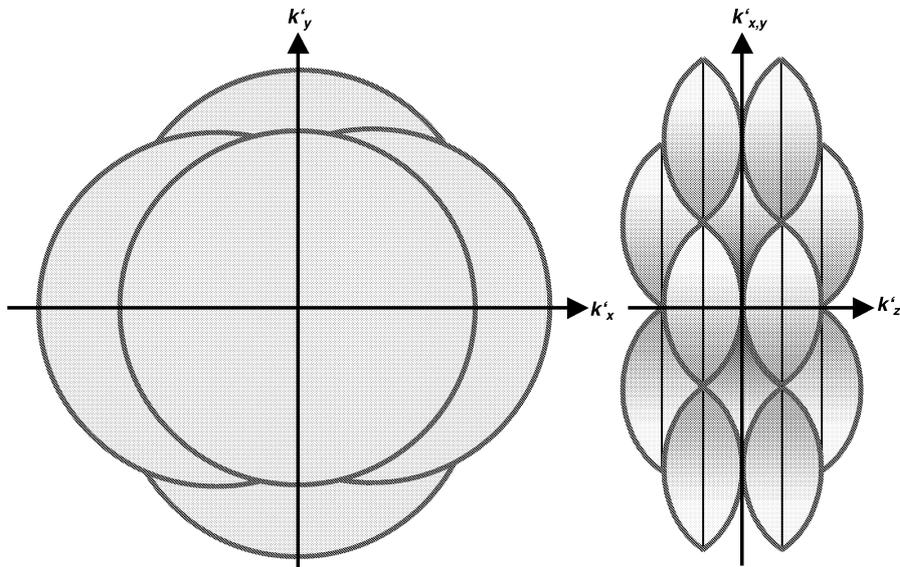


Abbildung 3.10: Schematische Darstellung der Gesamt-OTF in der $k_x - k_y$ - und der $k_{x,y} - k_z$ -Ebene nach mehrfach durchgeführten 3D-Aufnahmen mit jeweils unterschiedlichen Wellenvektoren \mathbf{u} der Anregungsmodulation. \mathbf{u} ist bei jeder Aufnahme so gewählt, dass sich die „Flügel“ der einzelnen OTFs überlappen. Dadurch wird die effektive Auflösung erhöht.

eines konventionellen Mikroskops (Abb. 2.9) besitzt diese OTF in allen Raumrichtungen eine größere Ausdehnung, so dass sich die effektive räumliche Auflösung erhöht. Außerdem ist der „Missing Cone“ nicht mehr vorhanden, d. h. es gibt keine Raumfrequenzen in der Nähe des Ursprungs, die nicht detektiert werden können. Die Aufnahmedauer verlängert sich allerdings erheblich, denn es müssen z. B. für das in Abb. 3.10 gezeigte Beispiel insgesamt 11 3D-Aufnahmen hintereinander durchgeführt werden [Frohn01].

Selbstverständlich lassen sich auf Objekte in solchen rekonstruierten Bildern die in Abschnitt 2.4 dargestellten Verfahren zur Lokalisation anwenden. Aufgrund der reduzierten Halbwertsbreite der PSF würde man auch auf diesem „Umweg“ gegenüber der direkten Analyse der modulierten Intensitätsverteilung (Abschnitt 3.2) eine Verbesserung der Lokalisationsgenauigkeit erreichen.

Kapitel 4

Experimentelle Realisierung

Inhalt dieses Kapitels ist die experimentelle Realisierung der Mikroskopie mit räumlich modulierter Anregung bzw. der Spatially Modulated Illumination-Mikroskopie. Der hier vorgestellte Mikroskopaufbau wurde im Rahmen dieser Arbeit vollständig neu aufgebaut, entspricht jedoch in vieler Hinsicht dem in [Schneider99a] beschriebenen Experiment. Er enthält allerdings – neben neuer „Hardware“ (Piezotisch, CCD-Kamera) – auch einige Erweiterungen und Veränderungen wie z.B. die Überlagerung der beiden Anregungs-Laserstrahlen am Ausgang der optischen Fasern unmittelbar vor dem Strahlteiler des Interferometers.

Es folgt zunächst eine Übersicht über das gesamte Experiment und die Labor-Infrastruktur, an die sich in den Abschnitten 2 und 3 eine detaillierte Beschreibung des Anregungs-Strahlengangs und der Vorrichtungen zur Objekt- und Spiegelpositionierung anschließt. Abschnitt 4 hat den Detektions-Strahlengang des Mikroskops sowie die CCD-Kamera zum Inhalt; der letzte Abschnitt enthält die wichtigsten Spezifikationen des zur Steuerung des Mikroskopaufbaus verwendeten Personal Computers, beschreibt kurz die Steuer-Software und schildert die Durchführung der Messungen. Eine Kurzanleitung zur Montage und Justage des Aufbaus sowie eine ausführliche Beschreibung der Steuer-Software finden sich im Anhang.

4.1 Übersicht

Der in Abbildung 4.1 schematisch dargestellte Mikroskopaufbau befindet sich mit Ausnahme der Laser auf einem 90 cm × 90 cm-großen „**Breadboard**“, welches aus einer speziellen Metall-Legierung (SuperInvar M-XI-22, Newport GmbH¹) gefertigt ist. Diese Legierung besitzt bei Raumtemperatur einen im Vergleich zu herkömmlichen Metallen etwa 10-fach niedrigeren Temperatúrausdehnungskoeffizienten, wodurch störende, temperaturbedingte Verschiebungen der optischen Elemente (Spiegel, Strahlteiler usw.) minimiert werden. Das Breadboard befindet sich wiederum auf einem schwingungsgedämpften optischen Tisch älterer Bauart. An der Decke über dem Aufbau ist eine **Metallhaube** befestigt, welche zum Schutz der optischen Elemente vor Staub und zur Vermeidung von Luftzirkulationen während einer Messung auf das Mikroskop abgesenkt werden kann.

¹Holzhof-Allee 19-21, 64295 Darmstadt, <http://www.germany@newport.com>

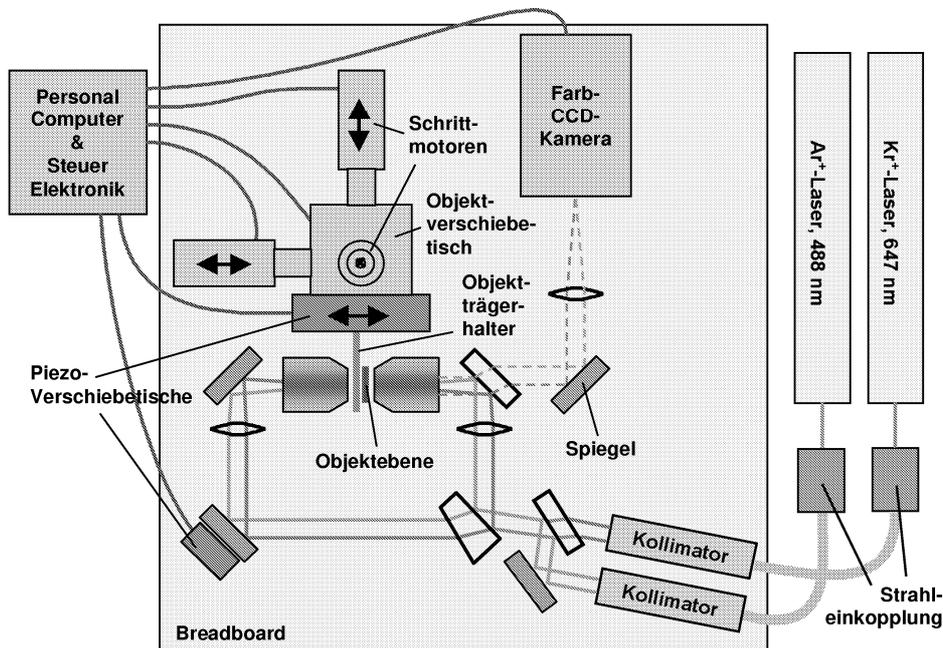


Abbildung 4.1: Schematische Ansicht des SMI-Mikroskopaufbaus. Die beiden rechts dargestellten Laser befinden sich auf einem separaten optischen Tisch.

Um den Aufbau möglichst kompakt zu gestalten und um die beiden zur Fluoreszenz-anregung verwendeten Laser und das Mikroskop voneinander unabhängig justieren zu können, sind die Laser auf einem **separaten optischen Tisch** aufgestellt. Die Übertragung des Laserlichts zum Aufbau erfolgt über Glasfasern. Auf separaten Regalen bzw. Tischen befinden sich auch die Geräte zur Ansteuerung der Schrittmotoren usw. sowie der Personal Computer zur Steuerung des Messvorgangs (Steuer-PC). Die Weiterleitung und Speicherung der Messdaten erfolgt über ein mit dem Steuer-PC verbundenes 100 MBit-Netzwerk. So können die umfangreichen Datenmengen von typischerweise mehreren 10 MByte pro Einzelmessung schnell übertragen werden, siehe auch [Schneider99a].

Die im Mikroskopaufbau einsetzbaren Fluoreszenzfarbstoffe hängen im Wesentlichen von der verwendeten Farb-CCD-Kamera ab. Solche Kameras besitzen meist drei verschiedene Farbkanäle mit Detektoren bzw. Pixeln für die Farben Rot, Grün und Blau (RGB-Farbschema). Um eine optimale Detektion der Farbstoffe zu gewährleisten, sollten deren Emissionsspektren möglichst gut mit den entsprechenden Empfindlichkeitsspektren der Pixel überlappen, siehe auch Abschnitt 4.4.1 und 4.4.2. Der gesamte experimentelle Aufbau ist daher für Farbstoffe optimiert, die diese Forderung erfüllen, wie beispielsweise Fluorescein Isothiocyanat (FITC, Maximum der Anregung/Emission bei 490/525 nm) im grünen und Cyanine5 (Cy5, 649/670 nm) im roten Spektralbereich. Auf den Einsatz von blauen Farbstoffen wird dagegen aufgrund praktischer Probleme, wie z. B. der Abschwächung der Lichtintensität im UV-Bereich beim Durchgang des Lichts durch Glas, verzichtet.

4.2 Anregungs-Strahlengang

4.2.1 Laser und optische Faser

Als Lichtquelle werden entsprechend den oben genannten Randbedingungen ein Ar^+ -**Laser**, der auf eine Wellenlänge von $\lambda_{\text{Ar}} = 488 \text{ nm}$ eingestellt ist, und ein Kr^+ -**Laser**, der bei $\lambda_{\text{Kr}} = 647 \text{ nm}$ betrieben wird, eingesetzt. Beide Geräte vom Typ 95.4 (Ar^+) und 95-K (Kr^+) stammen von der Lexel Laser Inc.² und werden im „Single Mode“, d. h. im TEM_{00} -Modus betrieben. In dieser Betriebsart liefert Typ 95.4 bei einer Leistungsaufnahme von $P_{\text{in}} = 12,9 \text{ kW}$ eine maximale Lichtleistung von $1,3 \text{ W}$, der Kr^+ -Laser erzeugt Laserlicht mit einer Leistung von maximal 265 mW bei $P_{\text{in}} = 10,9 \text{ kW}$. Während der Messungen wird üblicherweise eine Leistung von 400 mW (Ar^+) bzw. 200 mW (Kr^+) eingestellt.

Die Frequenzbandbreite beider Laser-Ausgangsstrahlen wird durch ein temperaturgeregeltes Wellenselektionsprisma (**Etalon**) zusätzlich eingeengt und zeitlich stabilisiert (Option 503, Polytec GmbH³). Zur Leistungsstabilisierung werden die Laser im sog. „Light Control“-Modus betrieben, d. h. die Ausgangsleistung wird durch einen geschlossenen Regelkreis konstant gehalten (Stabilität besser $0,2\%$). Der Durchmesser der Strahlen nach dem Laseraustrittsfenster beträgt $1,3 \text{ mm}$.

Die Einkopplung der Laserstrahlen in die Glasfasern erfolgt durch zwei **Miniaturfaserkoppler** („Fiber Launcher“) des Typs OFL-802, Polytec GmbH, die jeweils in einem eigenen Gehäuse (OFL-842, Polytec GmbH) untergebracht sind. Der zur Einkopplung des Ar^+ -Strahls verwendete Faserkoppler ist zur leichteren Justage mit Piezo-Verstellelementen versehen, die mittels einer Steuereinheit, Modell LVE-581 (Polytec GmbH), verstellt werden. Die polarisationserhaltenden **Mono Mode-Glasfasern** sind werkseitig bereits fertig konfektioniert, d. h. vor jedem Ende ist in Fokusslänge eine Linse so angebracht, dass der (kollimierte) Laserstrahl unter einem geeigneten Öffnungswinkel in die Faser eintritt bzw. diese verlässt. Zur Übertragung des Ar^+ -Strahls wird eine Faser des Typs OFL-811PP (Polytec-GmbH) verwendet, die für $\lambda = 488 \text{ nm}$ und $\lambda = 514 \text{ nm}$ optimiert ist sowie einen Kerndurchmesser von $3,5 \mu\text{m}$ und eine Dämpfung von 50 dB/km besitzt. Aufgrund der größeren Wellenlänge weist die für den Kr^+ -Strahl benutzte Faser (Modell OFL-815-PP-633-10, Polytec GmbH) einen größeren Kerndurchmesser von $4,5 \mu\text{m}$ auf; ihre Dämpfung beträgt 12 dB/km .

Beide Laser und die gesamte Einkoppeloptik sind, wie bereits erwähnt, nebeneinander auf einem separaten optischen Tisch montiert. Der Bereich über den Laser-Austrittsfenstern und den Fasereinkopplern ist zum Schutz vor Staub ebenfalls mit einer Haube abgedeckt.

Zur möglichst gleichmäßigen Ausleuchtung des Gesichtfeldes der CCD-Kamera (vgl. Abschnitt 3.1.1) werden die Strahlen nach dem Verlassen der Fasern jeweils auf einen $1/e^2$ -Durchmesser von $w \approx 15 \text{ mm}$ aufgeweitet. Hierzu werden zwei **Kollimatoren** vom Typ 09LCM011 der Melles Griot GmbH⁴ mit einer Wellenfrontverzerrung von weniger als $\lambda/4$ verwendet (einer der Kollimatoren ist zusätzlich mit dem „Spatial Filter“ 09LSF011 ausgerüstet). Die Faserenden in den Kollimatoren sind jeweils so orientiert, dass die Laserstrahlen senkrecht zur Breadboard-Oberfläche polarisiert sind. Der Abstand zwischen

²48503 Milmont Dr., Fremont, CA 94538

³Polytec Platz 1-7, 76337 Waldbronn, <http://www.polytec.de>

⁴Lilienthalstraße 30-32, 64625 Bensheim, <http://www.mellesgriot.com>

den optischen Achsen der horizontal angeordneten Kollimatoren und dem Breadboard entspricht jeweils der **einheitlichen Strahlhöhe** im Interferometer von ca. 70 mm.

4.2.2 Interferometer

Nach dem Verlassen der beiden Kollimatoren werden die Laserstrahlen mit Hilfe eines Spiegels und eines wellenlängenselektiven **Strahlteilers** („Beam Combiner 488/647“, Typ F33-488, AHF Analysetechnik⁵), der auf Transmission der 647 nm-Laserlinie sowie Reflexion der 488 nm-Linie unter 45° optimiert ist, überlagert, wie in Abbildung 4.2 gezeigt. Anschließend treffen die Strahlen unter einem Einfallswinkel von 51° (Brewsterwinkel) auf ein spezielles **Strahlteilerprisma** aus dem Substratmaterial Suprasil 3 (Sonderanfertigung, DoroTEK Gesellschaft für Systemtechnik mbH⁶). Länge und Breite der Grundfläche sowie die Höhe der um 90° gegenüber der Grundfläche gekippten, reflektierenden Seite betragen jeweils 25 mm, die Wellenfrontdeformation ist mit $< \lambda/20$ angegeben. Das Prisma ist so spezifiziert, dass die beiden senkrecht polarisierten Laserstrahlen im Verhältnis 50:50 transmittiert bzw. reflektiert werden, wobei der reflektierte Strahl einen Winkel von 90° zum transmittierten Strahl einnimmt. Um störende Vielfachreflexionen von seiner Rückseite aus dem Interferometer auszukoppeln, besitzt der Strahlteiler einen Keilwinkel von

⁵Bei der Kirche 2, 72074 Tübingen, <http://www.ahf.de>

⁶Grenzweg 25, 15344 Strausberg

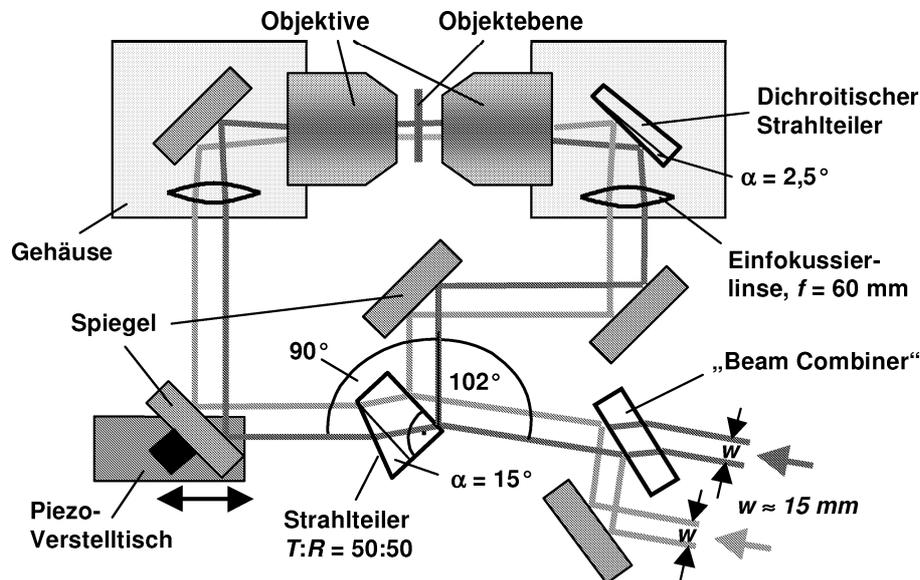


Abbildung 4.2: Schematische Ansicht des Anregungs-Strahlengangs. Die von rechts kommenden, aufgeweiteten Laserstrahlen werden mit Hilfe eines „Beam Combiners“ überlagert und anschließend durch einen 50:50-Strahlteiler in zwei Teilstrahlen gleicher Intensität aufgeteilt. Beide Strahlen werden jeweils in die hinteren Fokusebenen der gegenüberliegenden Objektive einfokussiert. Mit Hilfe des piezoelektrischen Verschiebetischs lässt sich die Phasendifferenz der Teilstrahlen verändern.

$\alpha = 15^\circ$.

Obwohl das Strahlteilerprisma durch entsprechende Oberflächenbeschichtungen beide Laserwellenlängen im Verhältnis 50:50 trennt, ist seine Prismenwirkung aufgrund der Dispersion des Substratmaterials nicht beseitigt. Treffen also zwei parallele Laserstrahlen mit verschiedenen Wellenlängen auf das Prisma, sind sowohl die entsprechenden transmittierten Strahlen als auch die Wellenfronten des roten und des grünen Laserlichts zwischen den Objektiven gegeneinander verkippt (wie in [Schneider99a], wo die einfallenden Strahlen parallel ausgerichtet waren, da für beide Strahlen bzw. Wellenlängen nur eine optische Faser und derselbe Kollimator verwendet wurde). Dieser unerwünschte Effekt wird vermieden, indem man zwei optische Fasern verwendet und mit dem Beam Combiner die einfallenden Strahlen vor dem Strahlteiler in geeigneter Weise gegeneinander verkippt. Weitere **Vorteile** dieser Anordnung sind:

- Da beide Strahlen durch, für die entsprechende Wellenlänge optimierte, Glasfasern mit einem passenden Kerndurchmesser übertragen werden, treten im Strahl mit der kleineren Wellenlänge keine höheren Schwingungsmoden auf, die eine gleichmäßige Ausleuchtung des Objektraums erschweren.
- Durch den Einsatz weiterer, passender Beam Combiner können leicht weitere Anregungsstrahlen in das Interferometer eingekoppelt werden.

Beide Teilstrahlen werden nun jeweils über Spiegel auf eine Antireflex(AR)-beschichtete **Achromatlinse** (Bestell-Nr. 322266, Linos Photonics GmbH⁷) mit der Brennweite $f = 60$ mm und einem Durchmesser von 18 mm geführt. Die hinter den Linsen konvergierenden Strahlen weisen einen Öffnungswinkel von ca. 14° auf und werden über einen Spiegel bzw. dichroitischen Strahlteiler in die hinteren Fokusebenen zweier Öl-Immersions-**Hochleistungs-Objektive** einfokussiert, die horizontal und gegenüberliegend auf dem Breadboard angebracht sind. Die Objektive (Modell PL APO, $100 \times /1.40 - 0.70$, OIL, Leica Microsystems GmbH⁸) besitzen eine numerische Apertur von $NA = 1,4$ und 100-fache Vergrößerung, ihr gegenseitiger Abstand beträgt ca. 2 mm. Das im Objektraum zwischen den Objektiven erzeugte stehende Wellenfeld (vgl. Abschnitt 3.1.1) besitzt bei den in Abschnitt 4.2.1 genannten Laserleistungen von 400 mW bzw. 200 mW eine räumlich gemittelte Intensität von ca. 200 W/cm^2 bzw. 100 W/cm^2 .

Der aus dem synthetischen Quarzglas Suprasil gefertigte **dichroitische Strahlteiler** (Typ 51608, AHF Analysetechnik) wird dazu verwendet, das Anregungslicht vom Detektionslicht zu trennen. Seine Beschichtung ist dafür optimiert, senkrecht polarisiertes Licht mit den Wellenlängen 488 nm und 647 nm unter einem Einfallswinkel von 45° zu reflektieren und einen möglichst großen Spektralbereich zwischen 488 nm und 647 nm sowie für $\lambda > 647$ nm zu transmittieren (siehe auch Abschnitt 4.4.1). Er besitzt einen Durchmesser von 25 mm sowie eine Mittendicke von 3,0 mm, und er ist ebenfalls keilförmig mit einem Keilwinkel von $\alpha = 2,5^\circ$ beschaffen, um störende Reflexionen des Laserlichts von seiner Rückseite aus dem Strahlengang fernzuhalten. Zur Minimierung solcher Reflexionen ist die dem Laserstrahl abgewandte Rückseite des Keils zusätzlich AR-beschichtet.

Der gesamte Anregungs-Strahlengang kann mit einem *Mach-Zehnder-Interferometer* verglichen werden. Um die Längendifferenz zwischen den beiden optischen Wegen und

⁷Königsallee 23, 37081 Göttingen, <http://www.linos-photonics.de>

⁸Lilienthalstraße 39-45, 64625 Bensheim, <http://www.leica-microsystems.com>

damit die Positionen der Wellenfronten zwischen den Objektiven variieren zu können, ist einer der Spiegel auf einem **piezoelektrisch verstellbaren Verschiebetisch** (siehe nächster Abschnitt) montiert. Im Unterschied zu der in [Schneider99a] gezeigten Variante (und gegenüber dem in Abb. 4.1 gezeigten Schema) besitzen beide optischen Wege des Interferometers vom Strahlteiler zur Objektebene nahezu dieselbe Länge. Auch wenn die Weglängendifferenz mit einigen Millimetern noch weit jenseits einer Wellenlänge liegt (eine Genauigkeit in der Größenordnung von λ wäre nur bei kohärenter Detektion durch beide Objektive erforderlich, vgl. [Gustaffson96]) bietet diese Konfiguration zwei **Vorteile**:

- Der Einfluss temperatur- oder anderweitig bedingter Drifts der Laserwellenlängen oder von optischen Elementen vor dem Interferometer auf die Positionen und Orientierungen der Wellenfronten im Objektraum wird minimiert. Eine maximal erlaubte Verschiebung der Wellenfronten von 1 nm würde dagegen z. B. bei der (im früheren Versuchsaufbau vorhandenen) größeren Weglängendifferenz von ca. 10 cm eine relative Frequenzstabilisierung des Lasers von besser als 10^{-8} erfordern.
- Eine gleichartige Modifikation beider Teilstrahlen wird vereinfacht. Man kann beispielsweise die beiden bisher verwendeten Einfeldkussierlinsen durch eine einzige Linse vor dem 50:50-Strahlteiler ersetzen. Außerdem können die Fokuspunkte der grünen Strahlen ($\lambda = 488$ nm) in den hinteren Fokusebenen der Objektive durch eine Verkipfung des Beam Combiners so weit verschoben werden, dass beide Wellenfelder den gleichen Wellenfrontabstand besitzen, vgl. Abschnitt 3.1.1 und 3.2.2.

Als **Spiegel** werden Reflektoren des Typs 10Z40BD.1 (Newport GmbH) aus Zerodur mit einem Durchmesser von 25 mm verwendet. Sie besitzen eine dielektrische Breitbandbeschichtung mit einer Güte bzw. Planarität von $\lambda/20$ und eine Reflektivität $> 99\%$ für Einfallswinkel von $0^\circ..45^\circ$. Zur Halterung der Spiegel bzw. des Beam Combiners werden **kinematische Spiegelhalter** vom Typ U50-P bzw. U100-A (Newport GmbH) verwendet. Das Strahlteilerprisma befindet sich auf einem **Dreh-Kipp-Tisch**, Modell M-P032N (Newport), und die Einfeldkussierlinsen werden von **Drei-Achsen-Translationshaltern** des Typs M-LP-05-XYZ (Newport) fixiert. Letztere sind zusammen mit den Objektiven an von der Werkstatt des Instituts gefertigten Gehäusen befestigt. Diese Gehäuse beinhalten auch den dichroitischen Strahlteiler bzw. den gegenüber befindlichen Spiegel und können durch drei übereinander montierte Linearverschiebetische des Typs M-461 (Newport) in alle drei Raumrichtungen verschoben werden.

4.3 Objekt- und Spiegelpositionierung

Der Objektträger zwischen den Objektiven (Standard-Objektträger, $L \times B \times H = 76$ mm \times 25 mm \times 1 mm) wird von einem speziell angefertigten **Objektträgerhalter** fixiert, der abnehmbar auf einer **Magnethalterplatte** gelagert ist. Diese ist wiederum an einem piezoelektrischen Verschiebetisch befestigt. Eine spezielle Dreipunktlagerung auf der Magnethalterplatte sorgt dafür, dass der Objektträgerhalter nach einem Abnehmen und anschließendem Aufsetzen auf die Magnethalterplatte wieder dieselbe Position einnimmt. Dadurch ist es möglich, die Objektträger schnell und sicher auszuwechseln [Jäckle99].

4.3.1 Piezoelektrische Verschiebetische

Um das Objekt bzw. den Objektträger während der Messung mit der erforderlichen Genauigkeit von 1 nm und einer Schrittweite von wenigen 10 nm bewegen zu können (Abschnitt 3.1.2), kann auf einen piezoelektrischen Verschiebetisch nicht verzichtet werden. In dem hier vorgestellten Mikroskopaufbau wird ein sogenanntes XY-Piezo-Nano-Positioniersystem des Typs P-731.20 der Physik Instrumente (PI) GmbH & Co.⁹ eingesetzt.

Dieses Positioniersystem erlaubt eine sehr schnelle Positionierung (Ansprechzeit < 50 ms) über einen Stellbereich von $100 \mu\text{m} \times 100 \mu\text{m}$ und ist im Mikroskop so angeordnet, dass der Objektträger in horizontaler Richtung entlang der optischen Achse der Objektive und in vertikaler Richtung bewegt werden kann. Das System ist mit kapazitiven Sensoren ausgerüstet, die über einen geschlossenen Regelkreis eine Positionsauflösung von 1 nm und eine Wiederholbarkeit von ± 5 nm ermöglichen; die Kalibrierung des Systems wurde bereits vom Hersteller vorgenommen. Die eigentliche Positionierung wird von Niedervolt-Piezoantrieben (0..100 V) bewerkstelligt, die zur Eliminierung von Reibungskräften in ein Führungssystem aus Festkörpergelenken integriert sind.

Der Interferometerspiegel (s. Abb. 4.2) ist auf einem sog. LISA (LInear Stage Actuator) Piezo-Nano-Positioniersystem vom Typ P-753.11C desselben Herstellers befestigt. Es besitzt einen eindimensionalen Verstellweg von $12 \mu\text{m}$ Länge, eine geregelte Positionsauflösung von 0,05 nm sowie eine Wiederholbarkeit von ± 1 nm.

Zur Ansteuerung der zwei Achsen des Piezo-Objektverschiebetischs wird ein Regler des Typs E-509.C2 zusammen mit zwei Verstärkern, Typ E-505.00, verwendet. Der Spiegelverschiebetisch ist ebenfalls an einem Verstärker des Typs E-505.00 angeschlossen, der mit einem Regler, Modell E-509.C1, verbunden ist. Alle Regler und Verstärker sind zusammen mit einem Display- und Schnittstellenmodul E-515.IX in ein E-500-Chassis eingebaut. Das Modul E-515.IX besitzt neben einer Anzeige zur Kontrolle der jeweiligen Aktuatorpositionen eine serielle RS-232-Schnittstelle, über die alle Regler mit dem Steuer-PC verbunden sind. Sämtliche in diesem Abschnitt aufgezählten Komponenten des Aufbaus stammen von der PI GmbH & Co.

4.3.2 Verschiebetisch mit Schrittmotoren

Der oben beschriebene Piezo-Objektverschiebetisch samt Objektträgerhalter ist an einem weiteren, **temperaturstabilisierten** Verschiebetisch befestigt [Jäckle99], der durch drei Schrittmotoren des Typs ZSS 422-200-1.2 (Phytron GmbH) angetrieben wird. Mit diesem Verschiebetisch werden makroskopische Bewegungen durchgeführt, um den Objektträger in den Zwischenraum der Objektive hinein und wieder heraus zu fahren, das Objekt in die Fokusebene des zur Detektion verwendeten Objektivs zu bewegen und um den Objektträger lateral zu verschieben, wie es bei der manuellen Suche nach Objekten vor einer Messung erforderlich ist. Während der Messungen bleibt der schrittmotorgetriebene Objektverschiebetisch, im Folgenden Objektverschiebetisch genannt, passiv.

Die Ansteuerung der Motoren erfolgt über eine **Schrittmotorsteuerung**, Modell mc compact, der Firma ITK Dr. F. Kassen¹⁰, die mit dem Steuer-PC ebenfalls durch eine

⁹Polytec Platz 1-7, 76337 Waldbronn, <http://www.physikinstrumente.com>

¹⁰Beim Eberacker 3, 35633 Lahnau

RS-232-Schnittstelle verbunden ist. Über diese Verbindung werden Kommandos gesendet, um z. B. bestimmte Positionen anzufahren. Darüberhinaus kann der Objektträger mittels eines an die Schrittmotorsteuerung angeschlossenen Joysticks manuell verfahren werden, was vor allem die Suche nach interessanten Ausschnitten auf dem Objektträger erleichtert. Durch den Steuer-PC kann man außerdem weitere Parameter der Schrittmotorsteuerung wie z. B. Verfahrgeschwindigkeiten einstellen.

Zusammengesetzt ist der Objektverschiebetisch aus zwei Edelstahlverschiebetischen des Typs M-125 (PI GmbH & Co.) mit einem Verfahrensweg von 25 mm, einem Edelstahlverschiebetisch M-155 (PI) mit einem Stellweg von 100 mm und mehreren Verbindungselementen aus unterschiedlichen Metallen. Der Verschiebetisch mit dem längeren Verfahrensweg ist horizontal auf dem Breadboard angeordnet und wird verwendet, um den Objektträger aus dem Zwischenraum der Objektive heraus bzw. herein zu fahren. Die Materialien und Anschraubpunkte der Verbindungselemente zwischen den Verschiebetischen sind so gewählt bzw. angeordnet, dass sich die Ausdehnungen der Metalle aufgrund der unterschiedlichen Temperatúrausdehnungskoeffizienten in zwei Raumrichtungen in einem Punkt des Objektträgers, der sich in der einheitlichen Strahlhöhe von 70 mm über dem Breadboard befindet, kompensieren. Das heißt, dass sich die Position dieses Punkts bei Raumtemperatur unter dem Einfluss von Temperaturschwankungen in der lateralen y-Richtung und in der axialen z-Richtung (theoretisch) nicht ändert. Unter der lateralen y-Richtung ist hierbei die laterale Richtung parallel zur Oberfläche des Breadboards zu verstehen, mit der axialen Richtung ist die Richtung der optischen Achse der Objektive gemeint.

Stabilität des Objektverschiebetisches

In der lateralen x-Richtung konnte dagegen keine Temperaturstabilisierung erreicht werden [Jäckle99]. Dies zeigen auch die in Abbildung 4.3 dargestellten, mehrfach hintereinander im Abstand von je 25 min. gemessenen, lateralen Positionen zweier fluoreszierender Objekte in zwei verschiedenen Messserien. Es ist deutlich zu erkennen, dass die Drifts in der x-

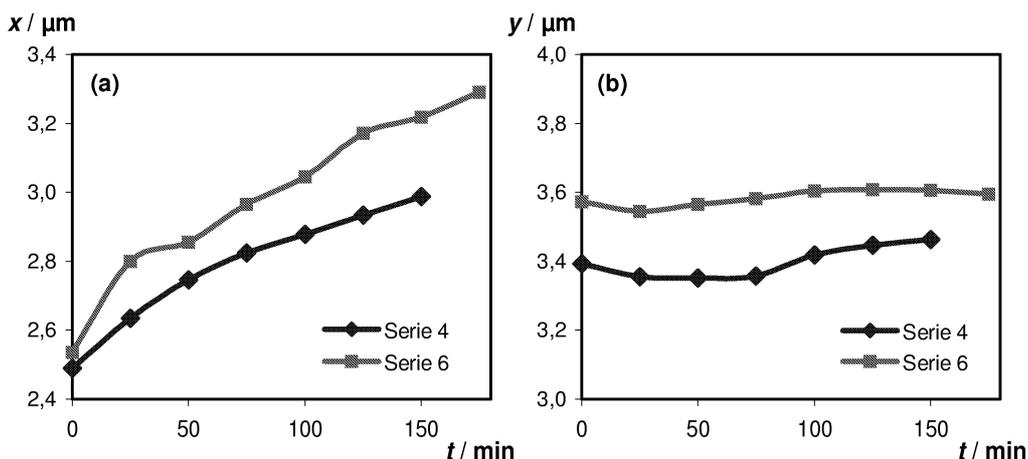


Abbildung 4.3: Mehrfach hintereinander gemessene Positionen fluoreszierender Objekte in zwei Messserien in (a) lateraler x-Richtung und (b) lateraler y-Richtung. Die x-Koordinaten ändern sich stärker und steigen monoton an (positive x-Richtung = Richtung der Schwerkraft), was auf ein systematisches, allmähliches Absinken des Tisches hindeutet.

Richtung (a) deutlich größer sind als in der y-Richtung (b). Unter einer Messserie ist hierbei die mehrfache Durchführung der Aufnahme eines vollständigen Bildstapels bzw. 3D-Bildes zu verstehen, siehe nächstes Kapitel.

Leicht zu sehen ist allerdings auch, dass die x-Koordinaten in systematischer Weise monoton ansteigen und die Steigung der Kurven mit der Zeit leicht abnimmt. Da dieser Effekt in nahezu allen Messserien beobachtet werden konnte und die positive x-Richtung senkrecht zum Breadboard nach unten, d. h. parallel zur Schwerkraft zeigt, kann angenommen werden, dass es sich hierbei nicht um ein temperaturinduziertes Phänomen handelt. Vielmehr ist davon auszugehen, dass diese Verschiebungen von einem **allmählichen Absinken** des Verschiebetischs herrühren, das u. a. von Schmierflüssigkeit verursacht wird, die aus den Zwischenräumen zwischen der Gewindestange und dem Führungsgewinde des vertikalen Edelstahlverschiebetischs langsam herausgedrückt wird.

4.4 Fluoreszenzdetektion

4.4.1 Detektions-Strahlengang

Zur Detektion der Fluoreszenzintensitäten wird das in Abb. 4.2 auf der *rechten* Seite dargestellte Objektiv verwendet (siehe auch Abschnitt 4.2.2). In Abbildung 4.4 ist das Transmissionsspektrum des dahinter befindlichen dichroitischen Strahlteilers für unpolarisiertes Fluoreszenzlicht dargestellt (Hersteller-Angaben). Es wurde an die Emissionsspektren der Farbstoffe FITC und Cy5 angepasst, deren Maxima bei 525 nm und 670 nm liegen.

Abbildung 4.5 zeigt den weiteren Strahlverlauf des Fluoreszenzlichts. Nach dem Passieren des dichroitischen Strahlteilers trifft das Licht zunächst auf einen Spiegel sowie

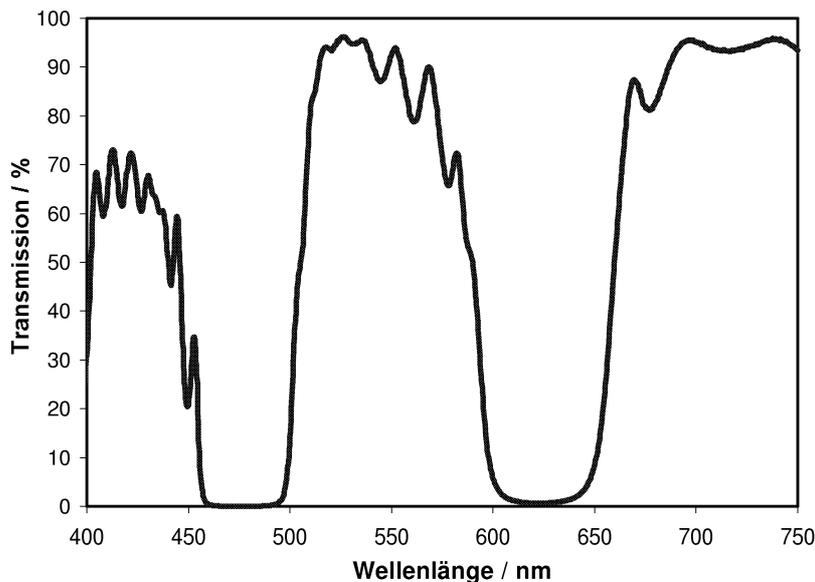


Abbildung 4.4: Transmissionsspektrum des für die Farbstoffe FITC ($\lambda_{\text{ex}} = 525 \text{ nm}$) und Cy5 ($\lambda_{\text{ex}} = 670 \text{ nm}$) optimierten dichroitischen Strahlteilers (Hersteller-Angaben).

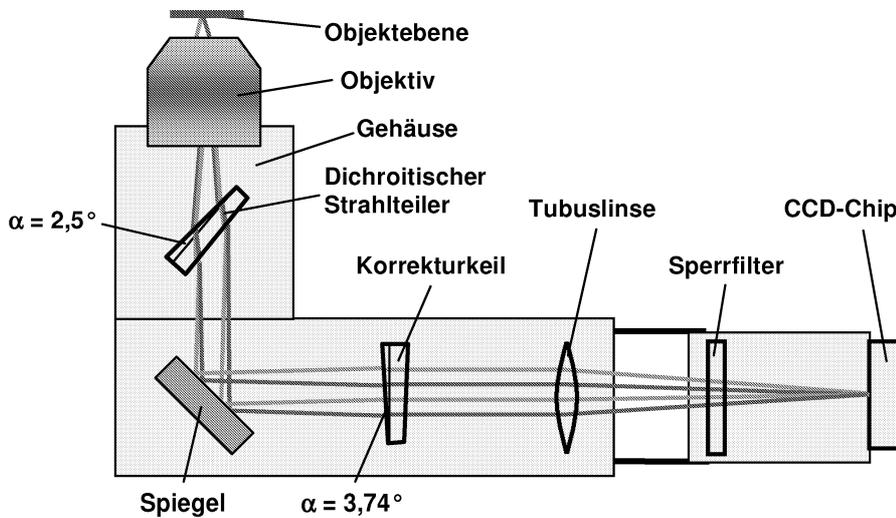


Abbildung 4.5: Schematische Ansicht des Detektions-Strahlengangs. Vor der Detektion durch den CCD-Chip der Kamera passiert das Fluoreszenzlicht den dichroitischen Strahlteiler, einen Korrekturkeil, die Tubuslinse und einen Sperrfilter. Der Korrekturkeil beseitigt die durch die Prismenwirkung des dichroitischen Strahlteilers verursachte Divergenz der Strahlen des roten und grünen Fluoreszenzlichts.

einen Korrekturkeil und wird anschließend durch die Tubuslinse auf den CCD-Chip der Kamera (siehe nächster Abschnitt) fokussiert. Zwischen Tubuslinse und CCD-Kamera ist zusätzlich ein Sperrfilter angebracht.

Besondere Beachtung verdient der dichroitische Strahlteiler in Kombination mit dem hier erstmals eingebauten **Korrekturkeil**: Die Keilform des Strahlteilers bewirkt – neben dem erwünschten Effekt, dass Reflexionen des Laserlichts von seiner Rückseite aus dem Anregungsstrahlengang ausgekoppelt werden – leider auch, dass die transmittierten Strahlen für rotes und grünes Licht unter verschiedenen Winkeln an seinen Grenzflächen gebrochen werden. Folglich besitzt auch der dichroitische Strahlteiler eine Prismenwirkung, die hier jedoch nicht die Anregungsstrahlen, sondern das *Detektionslicht* betrifft, was zu einem seitlichen Versatz der Fokuspunkte beider Farben auf dem CCD-Chip führen würde. Dieser Effekt wird durch den Korrekturkeil (Sonderanfertigung der DoroTEK GmbH) kompensiert. Er ist wie der Strahlteiler aus Suprasil gefertigt, hat einen Durchmesser von 25 mm und weist eine Mittendicke von 3 mm auf. Seine Rückseite steht zur Minimierung von Transmissionsverlusten senkrecht auf der optischen Achse des Detektions-Strahlengangs, zusätzlich ist auf beiden Seiten eine AR-Beschichtung für den Wellenlängenbereich von 514..565 nm angebracht. Sein Keilwinkel von $3,74^\circ$ ergibt sich aus der Forderung nach parallel verlaufenden Lichtstrahlen für $\lambda = 532 \text{ nm}$ und $\lambda = 656 \text{ nm}$ im folgenden Abschnitt des Strahlengangs [Jäckle99].

Die weiteren optischen Elemente des Detektions-Strahlengangs entsprechen im Wesentlichen dem in Abb. 2.3 auf Seite 11 gezeigten Schema eines konventionellen Mikroskops. Als **Tubuslinse** wird das Modell 020-515.075-000 der Leica Microsystems GmbH mit einer 1,25-fachen Vergrößerung verwendet; sie befindet sich in einem Abstand von 20 cm

vor dem CCD-Chip. Diese Tubuslinse stellt zusammen mit dem (auf unendlich gerechneten) Objektiv desselben Herstellers ein optisch korrigiertes System dar, so dass Aberrationen bei der Abbildung minimiert werden. Die optische Weglänge von 16 cm zwischen Objektiv und Tubuslinse sollte nicht mehr wesentlich vergrößert werden, da sich sonst das detektierbare Sehfeld verkleinern würde. Der **Sperrfilter** bzw. „Dualband Rejectionband Filter 488/647“ vom Typ F52-488 (AHF Analysetechnik) blockt Laserlicht aus dem gegenüberliegenden Objektiv ab, das aufgrund der begrenzten Reflektivität des dichroitischen Strahlteilers in den Detektions-Strahlengang gelangt. Dadurch wird der Kontrast der aufgenommenen Fluoreszenzbilder erhöht.

Um die Fluoreszenzdetektion durch Streulicht nicht zu beeinträchtigen, ist der gesamte Detektions-Strahlengang in einem Gehäuse untergebracht bzw. wird durch Verkleidungen geschützt. Um seinen Keilwinkel passend zum Keilwinkel des dichroitischen Strahlteilers auszurichten zu können, wird der Korrekturkeil von einer speziellen, um die optische Achse drehbar gelagerten Vorrichtung gehalten.

4.4.2 CCD-Kamera

Die Eigenschaften der CCD-Kamera sind entscheidend für die Leistungsfähigkeit des gesamten Mikroskopaufbaus. Um kleine Fluoreszenzintensitäten mit ausreichender Genauigkeit detektieren und gleichzeitig die Messungen möglichst schnell durchführen zu können, sind sowohl eine hohe Empfindlichkeit als auch ein geringes Eigenrauschen des Kamerasystems erforderlich. Kurze Messzeiten sind nicht nur aus praktischen Gründen erstrebenswert, sondern reduzieren zusätzlich störende Effekte wie z. B. das Ausbleichen der Farbstoffe.

Um dies zu erreichen, wird im hier vorgestellten Experiment eine **Farb-CCD¹¹-Kamera** des Typs „Quanticam“ der Phase GmbH¹² verwendet. Sie besitzt einen „CCD-Interline Progressive Scan“-Sensor mit 1280 Pixeln in horizontaler und 1024 Pixeln in vertikaler Richtung (SuperVGA-Auflösung). Vor jedem der Pixel ist eine Mikrolinse angebracht, mit der das ankommende Licht auf die aktive Fläche fokussiert wird („Lens on Chip“). Vor dem CCD-Chip befindet sich außerdem ein Farb-Mosaikfilter, mit dem die Empfindlichkeiten der einzelnen Pixel auf jeweils den roten, grünen oder blauen Teil des sichtbaren Spektrums beschränkt werden. Abbildung 4.6(a) zeigt die Anordnung der „roten“, „grünen“ und „blauen“ Pixel auf dem CCD-Chip. Die Detektoren lassen sich in Gruppen mit jeweils 2×2 Pixeln einteilen, bestehend aus einem roten Pixel links oben an der Position (0; 0), zwei grünen Pixeln bei (0; 1) und (1; 0) sowie einem blauen Pixel bei (1; 1). Folglich werden mit dem CCD-Chip vier Bilder in drei verschiedenen Farbkanälen aufgenommen (ein rotes, ein blaues und zwei grüne Bilder), wobei jedes dieser Bilder in jeder Richtung halb so viele Pixel wie der CCD-Chip besitzt, also 640×512 .

Durch das sogenannte *Binning* ist es möglich, mehrere in einer Richtung nebeneinanderliegende Pixel zu einem einzigen effektiven Pixel zusammenzuschalten. Die detektierten Intensitäten der zusammengefassten Pixel werden dabei addiert, so dass sich die Empfindlichkeit des CCD-Chips erhöht. Horizontal können maximal 8, vertikal bis zu 128 Pixel miteinander verbunden werden. Dadurch wird allerdings die Abtastweite in jeder Richtung entsprechend erhöht, außerdem findet keine Unterscheidung der Farben mehr

¹¹Charged Coupled Device

¹²Blücherstraße 2, 23564 Lübeck, <http://www.phase-hl.com>

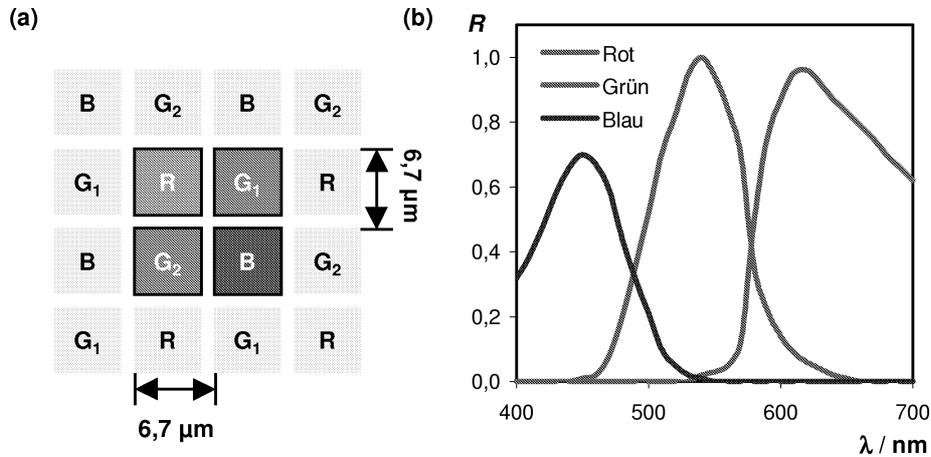


Abbildung 4.6: Detektoren bzw. Pixel der Farb-CCD-Kamera „Quanticam“: (a) Anordnung auf dem CCD-Chip. Die Pixel lassen sich in Gruppen, bestehend aus jeweils einem „roten“, zwei „grünen“ und einem „blauen“ Pixel einteilen; (b) Relative spektrale Empfindlichkeiten der verschiedenen Pixel (Hersteller-Angaben).

statt. Zur Datenreduktion oder Steigerung der Bildwiederholrate kann der Bereich auf dem CCD-Chip, der ausgelesen werden soll, durch das Setzen einer **ROI** (Region Of Interest) eingeschränkt werden. Die kleinste Einheit einer ROI besteht aus 32×32 Pixeln.

Die Pixel haben in beiden Richtungen einen gegenseitigen Abstand von $6,7 \mu\text{m}$, der effektive Pixelabstand pro Farbe bzw. Farbkanal (R, G_1, G_2, B) beträgt demzufolge das Doppelte, also $dx = dy = 13,4 \mu\text{m}$. Zusammen mit der 100-fachen Vergrößerung des Objektivs und der 1,25-fachen Vergrößerung der Tubuslinse folgt daraus für die x- und y-Richtung eine Abtastweite von $107,2 \text{ nm}$ im Objektraum. Berücksichtigt man die praktisch erreichbare Auflösung des Mikroskops (vgl. Gl. (2.43), Abschnitt 2.3.4), ist das Abtasttheorem Gl. (2.51) erfüllt.

Zur Digitalisierung der gemessenen Intensitätswerte werden 12 Bit verwendet, d. h. es gibt $Q = 2^{12} = 4096$ verschiedene Quantisierungsstufen i_j . Die Differenz zwischen zwei Quantisierungsstufen bzw. ein „CCD-Count“ entspricht immer fünf detektierten Photonen. Die gemessenen Werte von i_j können also nicht durch Verändern der internen Verstärkung oder eines variablen „Offsets“ beeinflusst werden, sondern hängen nur von der eingestellten Integrationszeit und der Lichtintensität ab. Es gibt jedoch einen, von der Temperatur des CCD-Chips abhängigen, Offset von ca. 20 CCD-Counts (bei $T \approx -12^\circ\text{C}$). Die maximale Quanteneffizienz der Pixel beträgt 40% bei $\lambda = 520 \text{ nm}$.

Der A/D-Wandler arbeitet mit einer Frequenz von 12,5 MHz bzw. $12,5 \cdot 10^6$ Pixel/s; damit lassen sich pro Sekunde maximal 8 Vollbilder auslesen. Durch das Setzen einer kleineren ROI oder durch Binning kann die Geschwindigkeit auf bis zu ca. 32 (Teil-)Bilder pro Sekunde erhöht werden. Da ein Okular im Detektions-Strahlengang zur direkten Beobachtung des Objektträgers nicht vorgesehen ist, hat die Zahl von 8 Vollbildern pro Sekunde große praktische Bedeutung: Zum Suchen von passenden Objekten ist es wünschenswert, den gerade sichtbaren Objektträgerausschnitt instantan, d. h. mit möglichst wenig Zeitverzögerung auf dem Bildschirm des Steuer-PC anzuzeigen. Eine deutlich geringere Bild-

wiederholrate würde die Suche dagegen wesentlich erschweren.

Um thermisch verursachtes Rauschen im Signal zu reduzieren, wird der CCD-Chip durch eine zweistufige Peltier-Kühlung auf -12°C gekühlt. Die Abwärme von Peltier-Element und Elektronik wird zur Verringerung von störenden Vibrationen nicht über einen Lüfter, sondern durch eine Wasserkühlung abgeleitet. Die Ansteuerung der Kamera und das Auslesen der Bilddaten aus dem Speicher der Kamera-Elektronik erfolgt mit einer speziellen **PCI-Interface-Karte** im Steuer-PC, die mit der Kamera durch ein Glasfaser-Kabel (Fiber Optical Link) verbunden ist. Tabelle 4.1 zeigt nochmals die wichtigsten Daten des Systems.

Der Grund dafür, dass die zum Breadboard senkrechte, vertikal nach unten zeigende Richtung als positive x-Richtung und die Horizontale entsprechend als y-Richtung definiert wird (siehe Abschnitt 4.3.2), ist rein praktischer Natur: Um den CCD-Chip in der einheitlichen Strahlhöhe von 70 mm über dem Breadboard anzuordnen, musste die Kamera in Blickrichtung um 90° nach rechts gedreht angebracht werden.

Anzahl Pixel	1280(H) \times 1024(B)
Pixel-Größe	6,7 μm \times 6,7 μm
Größe des CCD-Chips	8,6 mm \times 6,9 mm
CCD-Temperatur	-12°C
„Full Well Capacity“	25 000 e^{-}
Frequenz des A/D-Wandlers	12,5 MHz
Digitalisierungstiefe	12 Bit
A/D-Konversionsfaktor	5 e^{-} /Count
Auslese-Rauschen	7..8 e^{-}
Maximale Quanteneffizienz	40%
Mittlerer Dunkelstrom	$< 0,1 e^{-}/(\text{Pixel} \cdot \text{s})$
Nichtlinearität	$< 1\%$
Maximale Bildwiederholrate	8/s
Integrationszeit	0,001..1000 s

Tabelle 4.1: Wichtige Daten der „Quanticam“-Farb-CCD-Kamera (Hersteller-Angaben).

Linearität

Um sicherzustellen, dass die Kamera den hohen Anforderungen vor allem bezüglich der Linearität der gemessenen Intensitätswerte entspricht, wurden verschiedene Messungen mit unterschiedlichen Lichtstärken und Integrationszeiten durchgeführt. Die Kamera wurde hierzu auf ein konventionelles Leica-Mikroskop (Modell DMRB) aufgesetzt und der CCD-Chip mit Hilfe der eingebauten Glühlampe im Gegenlicht mit zeitlich konstanter Intensität homogen beleuchtet. Aus den anschließenden Messungen mit verschiedenen *Integrationszeiten* wurden jeweils die Mittelwerte der CCD-Counts von allen roten, grünen und blauen Pixeln berechnet, wie in Abbildung 4.7 gezeigt. Die R^2 -Bestimmtheitsmaße, gebildet aus drei linearen Regressionen an die gemessenen Werte, betragen 0,9997; 0,9994 und 0,9984. Damit konnte die vom Hersteller angegebene Nichtlinearität von unter 1%

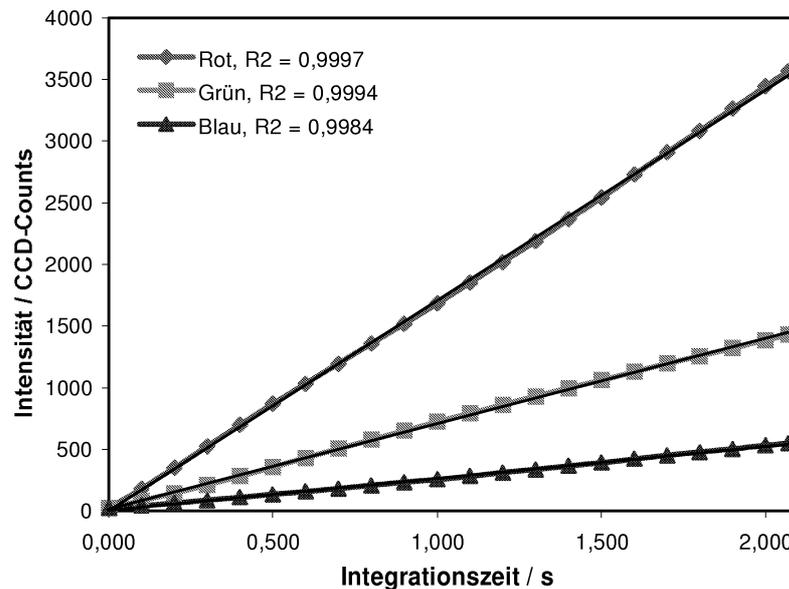


Abbildung 4.7: Ergebnis der Messungen zur Linearität der „Quanticam“-Farb-CCD-Kamera. Die Angabe des Herstellers, wonach die Nichtlinearität unter 1% liegt, konnte bestätigt werden.

bestätigt werden.

Darüberhinaus wurde getestet, ob die in den einzelnen Farbkanälen detektierten Intensitäten voneinander *unabhängig* sind. Dazu wurde die Lichtintensität so weit erhöht, dass sie weit über der maximal bei einer Integrationszeit von einigen Sekunden messbaren, 4095 CCD-Counts entsprechenden Intensität lag. Für diese Messungen wurde die eingebaute Hg-Lampe des DMRB-Mikroskops verwendet, zur Variation des Beleuchtungsspektrums wurden verschiedene Farbfilter eingesetzt. Hierbei konnte kein Übersprechen zwischen den Farbkanälen festgestellt werden. Außerdem wurde der Rauschanteil bei verschiedenen Intensitäten gemessen; auch dieser stimmte mit den Hersteller-Angaben überein.

Alternativ wurden die Intensitätsmittelwerte bei unterschiedlichen *Beleuchtungsintensitäten*, realisiert durch eine Kombination verschiedener Neutralfilter, gemessen. Diese Art der Linearitätsmessung ist gegenüber der oben dargestellten Methode eigentlich zu bevorzugen, da sie der Realität sehr viel näher kommt. Die Ergebnisse hier waren aber deutlich schlechter als die in Abb. 4.7 gezeigten. Dafür besaßen die entsprechenden Kurven einen, von der Referenzintensität der Glühlampe und von der Anzahl der CCD-Counts unabhängigen, jedoch für die verwendeten Filter charakteristischen Verlauf. Folglich konnten aus diesen Messungen daher keine zuverlässigen Erkenntnisse über die Linearität der Kamera gewonnen werden.

4.5 Datenaufnahme

4.5.1 Steuer-PC und Software

Die Ansteuerung des Mikroskopaufbaus wird von einem herkömmlichen Personal Computer (PC) übernommen. Das heißt, alle Aktionen des schrittmotorbetriebenen Objektverschiebetisches, der Piezotische und der CCD-Kamera wie z. B. das Ausführen bestimmter Verfahrbefehle, das Setzen der Integrationszeit oder die Speicherung der Bilddaten werden dort koordiniert.

Der PC besitzt einen Pentium II Prozessor mit einer Taktfrequenz von 333 MHz, einen RAM-Speicher von 256 MByte sowie eine Festplatte mit einer Speicherkapazität von 8 GByte. Die Taktfrequenz begrenzt hauptsächlich die für die manuellen Suche nach geeigneten Objekten erforderliche Echtzeit-Visualisierung des Objektträgerausschnitts. Vom gegenwärtigen System werden ca. 4-5 Vollbilder pro Sekunde bewältigt, was noch unter der maximalen Geschwindigkeit der CCD-Kamera liegt; eine Taktfrequenz von knapp einem GHz dürfte dagegen angemessen sein. Der bei einer Messung aufgenommene Bildstapel kann, je nach Größe der gesetzten ROI und Anzahl der Bilder, eine Datenmenge von mehr als 100 MByte umfassen. Durch den großen RAM-Speicher wird ein Zwischenspeichern der Daten auf der Festplatte während der Messung vermieden, was die Aufnahmegeschwindigkeit reduzieren würde. Die Festplatte ist nur als temporärer Speicher gedacht, zur Weiterverarbeitung bzw. Auswertung können die Daten über das angeschlossene Netzwerk an einen Server weitergeleitet oder mit einem eingebauten CD-Brenner auf CD gespeichert werden.

Die Steuer-Software erledigt nicht nur die Ansteuerung der oben beschriebenen Geräte, sondern besitzt auch einige Funktionen zur Visualisierung und Analyse der Bilddaten. Bei laufender Echtzeit-Visualisierung ist es z. B. möglich, Helligkeit und Schwellwert für jeden Farbkanal einzeln zu ändern und ein Histogramm des angezeigten Bildes darzustellen. Durch Mausklick kann ein Intensitätsprofil in x-, y- und z-Richtung angezeigt werden. Auf diese Weise kann sofort nach einer Messung insbesondere die Axiale Intensitätsverteilung (AID) begutachtet und entschieden werden, ob die Daten für eine weitere Verarbeitung geeignet sind. Darüberhinaus stehen einige einfache Statistikfunktionen zur Verfügung.

Zur Speicherung der Daten stehen vier verschiedene Bildformate zur Verfügung. Dabei kann zusätzlich eine Protokoll-Datei erzeugt werden, die neben selbst eingegebenen Informationen, wie z. B. der Art der Probe, Laserleistung usw. sämtliche Einstellungen des Programms während der Messung enthält. Um die Bilddaten auch zu einem späteren Zeitpunkt nach der Messung begutachten zu können, ist es möglich, diese wieder zu laden. Darüberhinaus kann eine *Sequenz-Aufnahme* bzw. Messung inkl. Speicherung der Daten mehrfach automatisch wiederholt werden.

4.5.2 Bedienung des Mikroskops

Bevor mit den eigentlichen Messungen begonnen werden kann, muss zunächst eine **Fein-Justage** des Mikroskopaufbaus erfolgen, um die Wellenfronten senkrecht zur optischen Achse der Objektivs bzw. parallel zum Objektträger auszurichten. Hierzu wird ein Objektträger mit einer dünnen, gleichmäßigen Referenzschicht von rot und grün fluoreszierenden sogenannten „Beads“, d. h. Kunststoff-Kügelchen mit einem Durchmesser, der kleiner als

der Wellenfrontabstand sein sollte (empfehlenswert sind Durchmesser < 100 nm), verwendet.

Nachdem der Objektträger in den Objektträgerhalter eingespannt, dieser auf die Magenthalerplatte aufgesetzt und der schrittmotorbetriebene Objektverschiebetisch zwischen die Objektive gefahren ist, ermittelt man mit Hilfe des Joysticks diejenige z-Position des Verschiebetischs, an der sich die Referenzschicht in der Fokusebene des Detektions-Objektivs befindet. Damit später ohne eine erneute Änderung der z-Position des Schrittmotortisches mit der Sequenz-Aufnahme begonnen werden kann, sollte zuvor der Piezo-Objektverschiebetisch an eine mittlere Position bewegt werden.

Die CCD-Kamera wird nun auf „Fortlaufende Aufnahme“ (vgl. Anhang) und eine verhältnismäßig kurze Integrationszeit von maximal 100 ms eingestellt, so dass das Gesichtsfeld des CCD-Chips nahezu in Echtzeit auf dem Monitor angezeigt wird. Dabei werden für die Helligkeiten („Gain“) der Farbkanäle große und für die unteren Schwellwerte („Schw.“) der angezeigten Intensitäten kleine Werte eingestellt. Ist die z-Position, an der die Schicht scharf auf dem Monitor dargestellt wird, erreicht, stellt man durch *leichtes* Drehen die Schrauben des piezoverstellbaren Spiegels und des 50:50-Strahlteilers so ein, dass die im *roten* Kanal des Kamerabilds sichtbaren Streifen breiter werden und schließlich möglichst ganz verschwinden. Ändert man jetzt die Phase(-ndifferenz) der Anregungs-Laserstrahlen, d. h. die Position des Piezotischs, auf dem der Spiegel montiert ist, wird das gesamte Bild abwechselnd heller und dunkler. Anschließend wiederholt man die gleiche Prozedur für den grünen Farbkanal, wobei man allerdings nur noch an den Schrauben des Beam Combiners drehen sollte.

Die Fein-Justage des Mikroskops ist damit abgeschlossen. Bevor man den Referenz-Objektträger durch den Objektträger mit den zu untersuchenden Objekten ersetzt, empfiehlt es sich, die aktuellen Schrittmotorpositionen zu speichern. Dadurch kann der neue Objektträger automatisch wieder an die Position des alten und damit in die eingestellte Fokusebene bewegt werden.

Bei der folgenden Suche nach geeigneten Objekten wird der Objektträger ebenfalls mit Hilfe des Joysticks manuell in lateraler Richtung bewegt. Um eine gute Darstellung der Fluoreszenzintensitäten zu erhalten, sind hierbei gegebenenfalls die Parameter der Kamera sowie die Einstellungen für „Gain“ und „Schw.“ anzupassen. Ist ein geeigneter Objektträgerausschnitt gefunden, wird zunächst um die Zielobjekte herum eine ROI von typischerweise 64×64 oder 128×128 Pixeln gesetzt, um den für die Sequenz-Aufnahme benötigten Speicherplatz zu beschränken. Außerdem werden die Integrationszeit und die Einstellungen für „Gain“ und „Schw.“ angepasst. Die Integrationszeit wird meist so gewählt, dass das Signal-zu-Rausch-Verhältnis in der Umgebung der aufzunehmenden Objekte größer als 5 ist. Bei der Aufnahme von synthetischen Beads sind in der Regel Zeiten von ≤ 500 ms pro 2D-Bild ausreichend, biologische Proben erfordern dagegen oftmals Integrationszeiten von 1 s und mehr.

Bevor die **Sequenz-Aufnahme**, d. h. die Messung gestartet wird, werden bei Bedarf noch einige weitere Einstellungen angepasst. Dazu gehören i) Anzahl der Bilder, ii) Schrittweite, iii) Anfangs- und iv) Endposition des Piezo-Verschiebetischs (entweder für Objekt oder für Spiegel bzw. Phase) und v) die Anzahl der Messungen. Im Objekt-Scan-Modus (Objekt-Rasterung) werden meistens zwischen 300 und 400 Bilder bei einer Schrittweite von 20 nm und im Phasen-Scan-Modus (Phasen-Rasterung) ca. 200 Bilder

bei einer Schrittweite von 30 oder 40 nm aufgenommen. Um die laterale Drift des Objektträgers während der Messung zu reduzieren, empfiehlt es sich, bis zum Start der Sequenz-Aufnahme ca. 30 bis 60 Minuten warten. In dieser Zeit sollten die Schrittmotoren nicht betätigt werden (vgl. Abschnitt 4.3.2), und die Laser sollten abgeblockt sein, um die Probe nicht unnötig auszubleichen.

Nach der ca. 2-3 Minuten dauernden Messung kann der im RAM-Speicher des PC befindliche Bildstapel mit den oben erwähnten Analysefunktionen begutachtet und abgespeichert werden. Anschließend wird das Programm bzw. die Kamera zusammen mit den entsprechenden Einstellungen für „Gain“ und „Schw.“ wieder in den Modus der Fortlaufenden Aufnahme versetzt, und der oben beschriebene Vorgang beginnt von Neuem.

Kapitel 5

Messungen und Ergebnisse

In diesem Kapitel werden die im Verlauf dieser Arbeit durchgeführten Messungen und Auswertungen vorgestellt. Der erste Abschnitt erläutert die Präparation der Testobjekte, die für die Messungen verwendet wurden, und stellt einige Beispiele für aufgenommene axiale Intensitätsverläufe vor. Im Anschluss wird in den folgenden zwei Abschnitten die Durchführung der Distanzmessungen beschrieben, dabei zeigt Abschnitt 2 die Ergebnisse der Experimente mit einer Wellenlänge, und Abschnitt 3 widmet sich den Resultaten der Messungen, die mit zwei Wellenlängen durchgeführt wurden. Der nächste Abschnitt enthält eine Gegenüberstellung des modell- und des schwerpunktbasierten Algorithmus zur Distanzbestimmung; im letzten Abschnitt werden zwei Beispiele für Messungen an biologischen Präparaten gezeigt.

5.1 Messungen an Testobjekten

Um die optischen Eigenschaften des SMI-Mikroskops experimentell zu untersuchen und die in Kapitel 3 vorgestellten Methoden zur Distanzbestimmung anzuwenden, wurden Messungen an unterschiedlichen Testobjekten durchgeführt. Dabei wurden „Fluorescent Microspheres“ bzw. „FluoSpheres“ der Molecular Probes Inc.¹ verwendet. Diese auch als „Bead“ bezeichneten kugelförmigen Partikel bestehen aus Polymeren, welche mit Fluoreszenzfarbstoffen markiert sind. Für die in dieser Arbeit durchgeführten Messungen wurden Beads mit Durchmessern von 40, 100 und 170 nm verwendet, deren Maxima der Absorption/Emission bei 505/515 nm („yellow-green“) oder 660/680 nm („dark red“) liegen. Vom selben Hersteller wurden darüberhinaus „TetraSpeck“-Beads mit einem Durchmesser von 100 nm eingesetzt, von denen jedes Bead mit insgesamt vier verschiedenen Fluoreszenzfarbstoffen versehen ist. Neben yellow-green und dark red handelt es sich hierbei um Farbstoffe mit einer Absorption/Emission bei 365/430 nm („blue“) und 560/580 nm („orange“).

Beads besitzen im Vergleich zu biologischen Präparaten – außer der sehr einfachen Präparierbarkeit, siehe nächster Abschnitt – vor allem den Vorteil einer wesentlich höheren **Photostabilität**. Dies ist eine wichtige Voraussetzung für die Durchführung wiederholter Messungen, wie sie zur Bestimmung der Distanzpräzision erforderlich waren.

¹PO Box 22010, Eugene, Oregon 97402-0469, <http://www.probes.com>

5.1.1 Präparation der Objektträger

Zur Vorbereitung der Messungen wurden i. a. 10 μl einer verdünnten Lösung aus Beads auf einen Standard-Objektträger mit den Abmessungen $L \times B \times H = 76 \text{ mm} \times 25 \text{ mm} \times 1 \text{ mm}$) getropft und auf eine Fläche von ca. $20 \times 10 \text{ mm}^2$ verteilt. Nach dem Trocknen der Lösung wurde ein Tropfen des Einbettungsmediums „Vectashield“ ($n \approx 1,46$, Vector Laboratories²) auf den Objektträger gegeben und dieser mit einem Standard-Deckglas der Dicke $d = 170 \mu\text{m}$ abgedeckt. Der Raum zwischen Deckglas und Objektträger wurde schließlich, nachdem sich das Einbettungsmedium unter dem gesamten Deckglas verteilt hatte, an den Rändern des Deckglases versiegelt.

Die Konzentrationen der Lösungen der Beads, die für das Auftropfen verwendet wurden, richteten sich nach dem jeweiligen Zweck der durchzuführenden Messungen. Für Objektträger mit einer Referenzschicht von dicht nebeneinanderliegenden Beads zur Fein-Justage des Mikroskops (Abschn. 4.5.2) wurde eine 10..100-fach höhere Konzentration gewählt als für Objektträger, auf denen einzelne Beads voneinander getrennt detektierbar sein sollten. Bei letzteren stellte sich eine Verdünnung von 1:100..1:1000 relativ zu der vom Hersteller gelieferten Lösung als sinnvoll heraus.

5.1.2 Messungen der Axialen Intensitätsverteilung

Zur Durchführung der Messungen wurde für beide Objektive ein Immersionsöl mit einem Brechungsindex von $n = 1,515$ verwendet. Der Ar^+ -Laser wurde i. a. mit einer Laserleistung von 400 mW, der Kr^+ -Laser mit einer Leistung von 200 mW betrieben. Die räumlich gemittelte Anregungsintensität im Objektraum betrug dementsprechend ca. 200 W/cm^2 bzw. 100 W/cm^2 (vgl. Abschnitt 4.2.2). Die in jeder Messung bzw. Sequenz-Aufnahme aufgenommenen Bildstapel enthielten 300 oder 400 Einzelbilder mit jeweils 64×64 bzw. 128×128 Bildpunkten. Die Schrittweite der Objekt-Rasterung betrug 20 nm, d. h. es wurde ein Volumen von etwa $6,9 \mu\text{m} \times 6,9 \mu\text{m} \times 7 \mu\text{m} = 330 \mu\text{m}^3$ bzw. $1320 \mu\text{m}^3$ abgerastert. Weiterhin wurden Stapel von 200 Bildern mit Phasen-Rasterung bei einer Schrittweite des Piezo-Spiegelverschiebetisches von 30 oder 40 nm aufgenommen. Für die Aufnahme der Einzelbilder wurde eine Integrationszeit von typischerweise 0,5 s eingestellt, die Aufnahme eines Bildstapels dauerte ca. drei Minuten.

Zur systematischen Untersuchung der Präzision der axialen Distanzmessungen wurden **Serien** aus jeweils zehn Bildstapeln aufgenommen, d. h. in jeder Serie wurde eine Objektregion zehnmal hintereinander gemessen. Während der Aufnahme einer Serie, die ca. 30 Minuten dauerte, nahmen die mittleren Fluoreszenzintensitäten der kleinen Beads ($d = 40 \text{ nm}$) um bis zu 20% ab, bei den größeren Beads ($d \geq 100 \text{ nm}$) betrug diese Abnahme meist weniger als 10%. Das Signal-zu-Rausch-Verhältnis, mit dem die Objekte detektiert wurden, lag in den meisten Fällen zwischen 10 und 20. Insgesamt wurden über 50 Serien aufgenommen (vgl. Abschn. 5.2 und 5.3).

Objekt-Rasterung

Abbildung 5.1 zeigt eine typische AID (Axial Intensity Distribution), also den gemessenen axialen Intensitätsverlauf eines Beads im SMI-Mikroskop, gemessen mit Objekt-Rasterung

²Burlingame, California

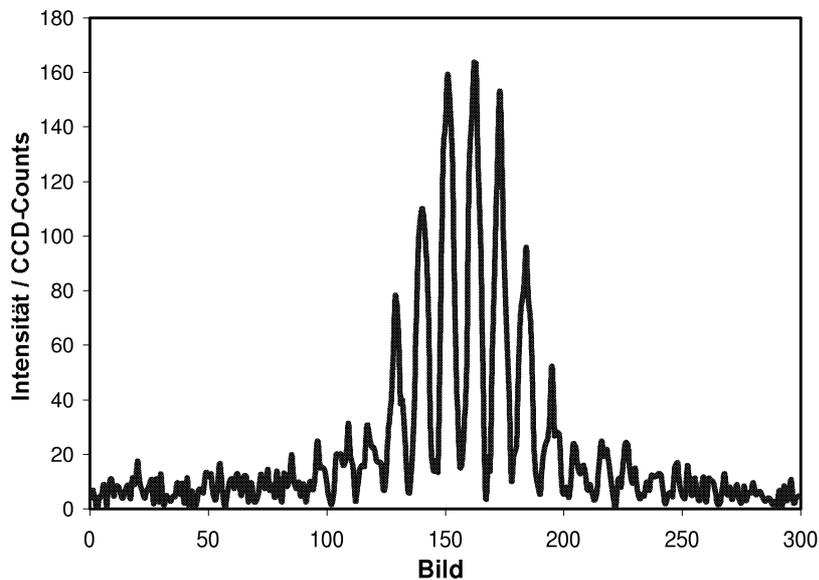


Abbildung 5.1: Gemessener axialer Intensitätsverlauf (AID) eines Beads im Wellenfeld, angeregt mit $\lambda_{ex} = 647$ nm (Bead-Durchmesser: 40 nm). Zwischen den Aufnahmen der einzelnen Bilder des Bildstapels wurde das Objekt jeweils um 20 nm in Richtung der optischen Achse verschoben.

bei einer Schrittweite von 20 nm. Das Bead wurde mit dem Kr^+ -Laser bei einer Wellenlänge von $\lambda_{ex} = 647$ nm angeregt und besaß laut Hersteller einen Durchmesser von 40 nm. Die einzelnen Werte der AID wurden mit dem in Abschnitt 3.2.1 beschriebenen Verfahren inkl. Hintergrund-Subtraktion aus den aufgenommenen Bilddaten extrahiert.

Die in Abb. 5.1 dargestellte AID entspricht, abgesehen vom Hintergrund-Rauschen, weitgehend der theoretischen Punktbildfunktion des SMI-Mikroskops, vgl. Abb. 3.3 auf Seite 39. Beide Kurven besitzen sieben stark ausgeprägte lokale Maxima bzw. Wellenzüge, und die Abstände zwischen den Wellenzügen der AID betragen $d_W = 216$ nm, was beinahe dem theoretischen Wert für den Wellenfrontabstand von 214 nm entspricht (Abschn. 3.1.1). Die u. a. von der numerischen Apertur des Objektivs (bzw. der Detektions-PSF) abhängige Halbwertsbreite der Einhüllenden beträgt ca. $1,2 \mu\text{m}$. Dieser Wert ist erwartungsgemäß etwas größer als die theoretische, nach Gl. (2.44) auf Seite 24 berechnete Halbwertsbreite von 880 nm. Die in Abb. 3.3 sichtbaren Nebenmaxima der Einhüllenden sind auch hier nur sehr schwach ausgeprägt und von Hintergrund-Rauschen teilweise überlagert.

Allerdings ist deutlich zu erkennen, dass die Intensitäten in den lokalen Minima der AID etwas größer als die Hintergrund-Intensität sind. Man findet daher tatsächlich eine bessere Übereinstimmung mit dem in Abb. 3.7 auf Seite 49 gezeigten Verlauf der Anpassungsfunktion (3.24), in welcher die axiale Ausdehnung des Objekts berücksichtigt wird. Der Kontrast der Modulation lässt sich nach Gl. (3.27) aus Abb. 5.1 zu $R \approx 0,07$ bestimmen. Zusammen mit den entsprechenden in Abb. 3.9 auf Seite 53 gezeigten Relationen zwischen R und axialer Objektausdehnung folgt damit für die Größe des Beads ein Wert von ca. 42 nm.

In Abbildung 5.2 sind vier weitere Beispiele für gemessene axiale Intensitätsverläufe

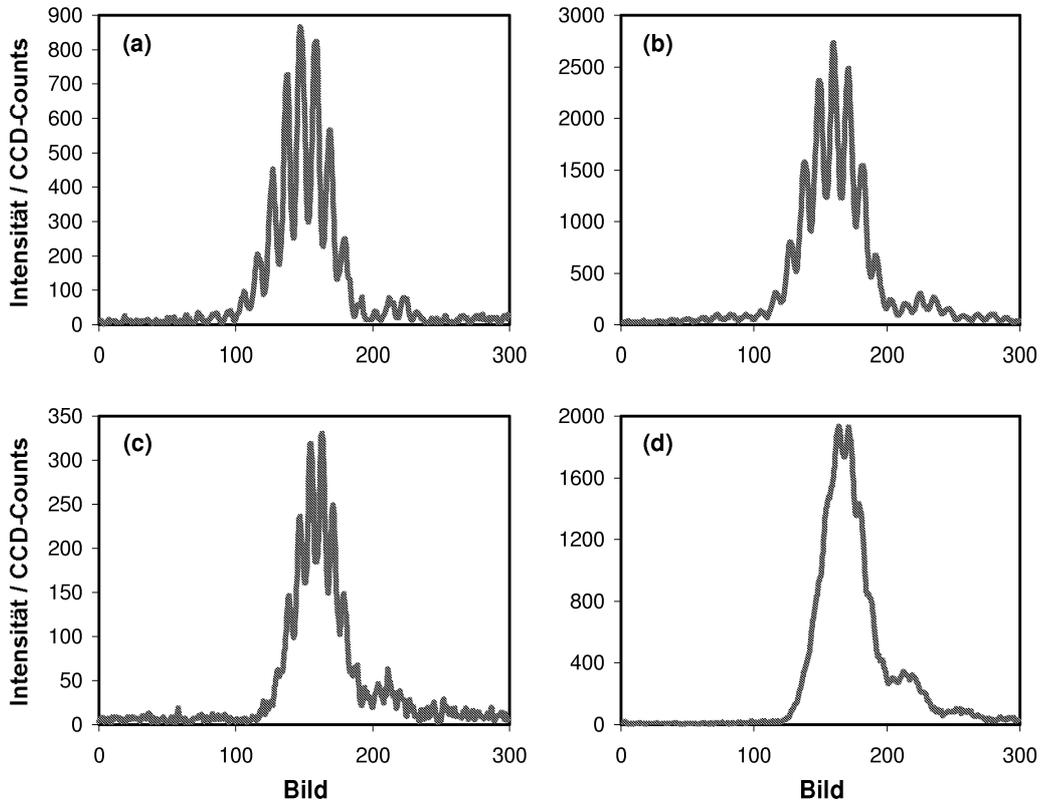


Abbildung 5.2: Weitere gemessene axiale Intensitätsverläufe: (a) Bead mit Durchmesser $d = 100$ nm und (b) mit $d = 170$ nm, angeregt mit $\lambda_{ex} = 647$ nm. Die Beads zu (c) und (d) besitzen ebenfalls Durchmesser von 100 bzw. 170 nm, wurden aber mit $\lambda_{ex} = 488$ nm angeregt. In (d) entspricht der Bead-Durchmesser fast dem Wellenfrontabstand von 164 nm.

von Beads mit größeren Durchmessern gezeigt. Die beiden oberen Kurven wurden bei $\lambda_{ex} = 647$ nm aufgenommen, in (a) ist die AID eines Beads mit einem Durchmesser von $d = 100$ nm dargestellt, (b) zeigt die AID eines Beads mit $d = 170$ nm (d : Herstellerangaben). (c) und (d) stellen ebenfalls die axialen Intensitätsverläufe zweier Beads mit $d = 100$ nm und $d = 170$ nm dar, jedoch mit dem Ar^+ -Laser bei $\lambda_{ex} = 488$ nm angeregt. Das in den Kurven erkennbare Nebenmaximum ist vermutlich auf das Deckglas bzw. den Einfluss von leichten Brechungsindexvariationen zwischen den einzelnen Schichten aus Öl, Glas und Immersionsmedium zurückzuführen. Ein interessanter Sonderfall ist in Teilabbildung (d) dargestellt, denn dort entspricht der Durchmesser des Beads fast genau dem Wellenfrontabstand von 164 nm, siehe auch Abb. 3.9(b) auf Seite 53.

Phasen-Rasterung

Zwei typische, mit Phasen-Rasterung gleichzeitig aufgenommene axiale Intensitätsverteilungen von einem rot und einem grün fluoreszierenden Bead sind in Abbildung 5.3 gezeigt; die Schrittweite des Piezo-Spiegelverschiebetisches betrug 40 nm. Die einzelnen Werte der AID wurden auch hier mit dem in Abschnitt 3.2.1 beschriebenen Verfahren (jedoch ohne

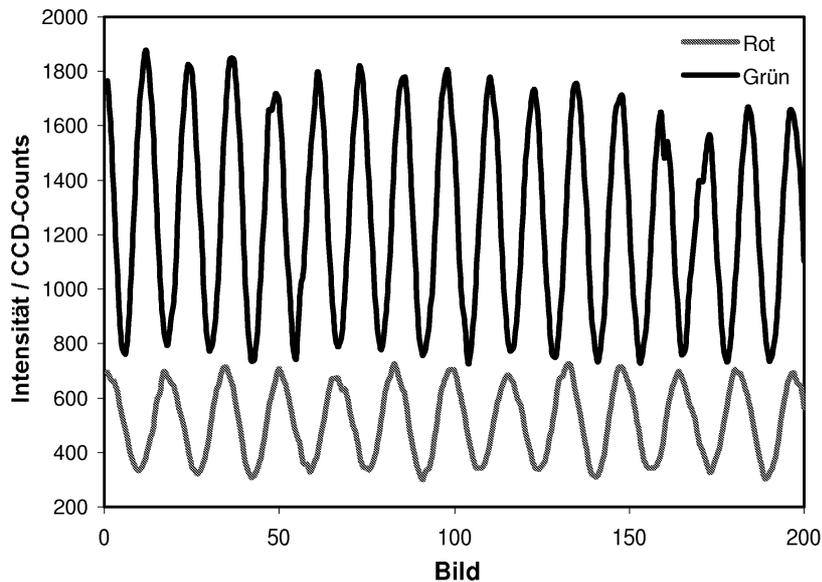


Abbildung 5.3: Beispiel für zwei gleichzeitig mit Phasen-Rasterung aufgenommene Intensitätsverteilungen von Beads im Wellenfeld, angeregt mit $\lambda_{\text{ex1}} = 647 \text{ nm}$ (untere Kurve) und $\lambda_{\text{ex2}} = 488 \text{ nm}$ (obere Kurve). Zwischen den Aufnahmen der einzelnen Bilder wurde der piezoverstellbare Spiegel des Interferometers jeweils um 40 nm verschoben, was einer Verschiebung der Wellenfronten im Objektraum von $13,40 \text{ nm}$ entspricht.

Hintergrund-Subtraktion) aus dem Bildstapel gewonnen. Beide Kurven weichen von einer idealen \cos^2 -Kurve deutlich ab. Neben Rauscheffekten sind diese Störungen vermutlich auf externe Einflüsse, wie z. B. Schwankungen der Laserintensität oder Vibrationen, zurückzuführen. Die leichte Abnahme der Amplitude der oberen AID deutet außerdem auf ein Ausbleichen des „grünen“ Beads während der Messung hin.

Bei einer Aufnahme mit Phasen-Rasterung ist die Schrittweite der Verschiebung der Wellenfronten bezüglich der Objekte zunächst nicht bekannt, da nicht wie bei der Objekt-Rasterung die Objekte selbst (mit einer definierten Schrittweite von 20 nm , s. o.), sondern die Wellenfronten von einem Spiegel *außerhalb* der Objektregion verschoben werden. Daher muss man zunächst durch Objekt-Rasterung den Wellenfrontabstand d_W von einem der Wellenfelder bestimmen; für das oben gezeigte Beispiel wurde ein Wert von $d_W = 217,2 \text{ nm}$ für das „rote“ Wellenfeld gemessen. Der Abstand der roten Wellenzüge in Abb. 5.3 beträgt $16,21$ Bilder bzw. Pixel in axialer Richtung. Daraus folgt, dass eine Verschiebung des Spiegels im Interferometer um 40 nm einer Verschiebung der Wellenfronten im Objektraum von $dz = 13,40 \text{ nm}$ entspricht. Für die Distanzmessungen bedeutet dies: Sind die Wellenzüge zweier Objekte z. B. um 1 Bild gegenseitig verschoben, beträgt ihr Abstand in axialer Richtung im Beispiel oben $13,40 \text{ nm}$. Die Größe von dz hängt von der Bewegungsrichtung des Spiegel-Piezoverschiebetisches im Interferometer (s. Abb. 4.2) und dem Brechungsindex n in der Objektregion ab. Geht man von gleichbleibendem n aus, muss dz jedoch nicht vor jeder Messung neu bestimmt werden.

5.2 Distanzmessungen mit einer Wellenlänge

Für die Distanzmessungen mit einer Wellenlänge wurden TetraSpeck-Beads verwendet, da diese sich durch eine besonders hohe Photostabilität auszeichnen. Obwohl dadurch die Amplitude der Modulation in den gemessenen AIDs aufgrund des Bead-Durchmessers von 100 nm bereits deutlich reduziert war (vgl. Abb. 5.2(a)), konnten die Distanzbestimmungen mit sehr hoher Präzision erfolgen (s. u.). Zur Fluoreszenzanregung wurde der Kr^+ -Laser des SMI-Mikroskops eingesetzt, die Anregungswellenlänge betrug also $\lambda_{ex} = 647$ nm.

Zur Ermittlung der Reproduzierbarkeit bzw. Präzision der Distanzmessungen wurden dieselben Objektregionen jeweils 10-mal hintereinander gemessen, d. h. eine Serie setzt sich aus 10 voneinander unabhängig aufgenommenen Bildstapeln zusammen. Bei der Auswertung einer Serie wurden in jedem Bildstapel dieselben Beads segmentiert. Um dabei die Beads voneinander trennen zu können, wurden für die Auswertungen nur Objekte ausgewählt, die einen im Vergleich zur optischen Auflösung großen lateralen Abstand besaßen. Die gemessenen *lateralen* Distanzen reichten daher von ca. $0,5 \mu\text{m}$ bis $3,0 \mu\text{m}$. Anschließend wurden in jedem Bildstapel die gegenseitigen Distanzen der Beads bestimmt, jede Distanz wurde also 10-mal hintereinander gemessen. Als Maß für die Präzision der Messungen diente die aus diesen 10 Distanzwerten berechnete **Standard-Abweichung**. Das bedeutet aber nicht, dass bei den Aufnahmen keine systematischen Fehler bzw. Störungen aufgetreten sind (vgl. Abb. 5.5 mit Drifts der axialen Objektpositionen).

Im Gegensatz zu den lateralen Abständen der Beads lagen die *axialen* Distanzen nur im Bereich zwischen 0 nm und einigen 10 nm. Bei einer glatten Glasoberfläche des Objektträgers und darauf nebeneinanderliegenden identischen Beads würde man zwar zunächst erwarten, keine axiale Distanzen größer als 0 nm zu messen. In der Realität findet man diese ideale Situation jedoch nicht vor, da zum einen sowohl die Glasoberfläche als auch die Wellenfronten des Anregungslichtfeldes Verzerrungen aufweisen, und zum anderen die Formen und die Durchmesser der Farbstoffverteilungen in den Beads Schwankungen unterworfen sind. In den Experimenten waren Abstände von der Größenordnung einiger Nanometer allerdings erwünscht, da sie genau den Distanzen entsprechen, die man beispielsweise bei Messungen zur Untersuchung der funktionell bedeutsamen Struktur supramolekularer Biostrukturen erwartet.

In den beiden folgenden Abschnitten werden die Ergebnisse der Distanzmessungen von zwei mit Objekt-Rasterung aufgenommenen Serien mit jeweils 400 Bildern vorgestellt. Diese Serien wurden ausgewählt, da die in ihnen enthaltenen axialen Distanzen sehr klein sind, d. h. weniger als 20 nm betragen. Von den insgesamt in dieser Arbeit gemessenen Serien wurden in 8 weiteren ähnlich kleine Distanzen gefunden. In den hier vorgestellten Serien sind darüberhinaus auch die Standard-Abweichungen der Distanzen sehr klein (< 3 nm). Die Standard-Abweichungen in den anderen, hier nicht gezeigten Serien liegen unterhalb 7 nm.

Die Bildstapel der einen vorgestellten Serie enthalten vier, die der anderen Serie sieben Objekte. Eine dreidimensionale Ansicht eines Bildstapels aus der Serie mit vier TetraSpeck-Beads ist in Abbildung 5.4 gezeigt. Auch in dieser Darstellung ist der Einfluss der Modulation deutlich erkennbar; die Bilder im Hintergrund zeigen die Projektionen des Datensatzes auf die x-y-, x-z- und y-z-Ebene. Die Ergebnisse dieser Serie sind in den Abbildungen 5.5 und 5.6 gezeigt.

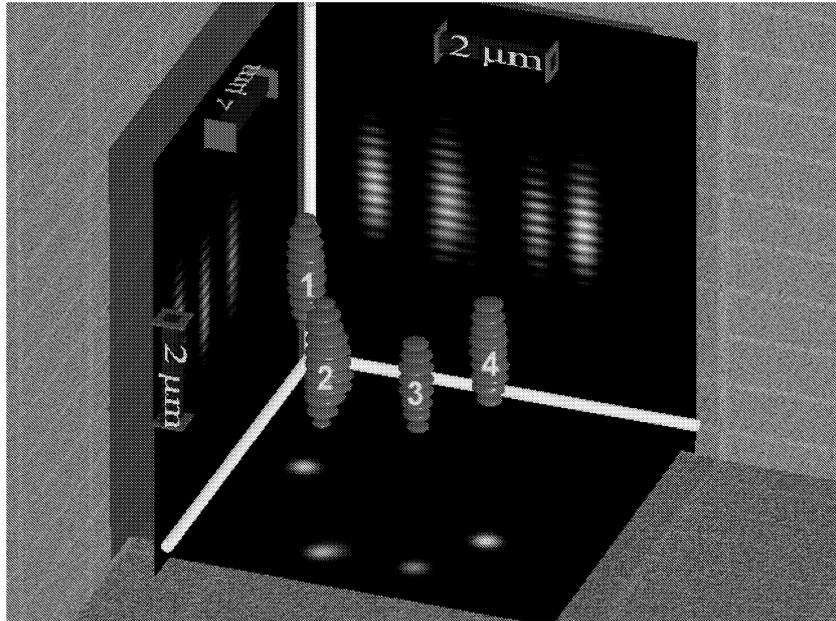


Abbildung 5.4: Dreidimensionale Ansicht eines Bildstapels mit vier TetraSpeck-Beads ($d = 100$ nm, $\lambda_{\text{ex}} = 647$ nm). Die Ergebnisse der entsprechenden Serie sind in den Abbildungen 5.5 und 5.6 dargestellt.

5.2.1 Laterale Distanzen

Zur Bestimmung der lateralen Distanzen wurde zunächst gemäß Abschnitt 3.2.1 von jedem Bild die Hintergrundintensität subtrahiert und anschließend auf die segmentierten Objektintensitäten ein schwerpunktbasierter Algorithmus angewendet. Vor der Segmentierung wurde das Signal-zu-Rausch-Verhältnis durch das Aufsummieren mehrerer (2D-)Bilder um die axiale Position des Objekts herum verbessert. Hierbei wurden zwei Fälle unterschieden: Im ersten Fall wurden für die Projektion sämtliche 300 - 400 Bilder eines Bildstapels berücksichtigt, im zweiten Fall nur jeweils 10 Bilder um die axiale Objektposition herum aufsummiert. Damit sollte untersucht werden, ob durch die Verwendung aller Bilder das Signal-zu-Rausch-Verhältnis optimiert ist, oder ob sich Aberrationen des optischen Systems und Rauschen aus den nicht in der Fokusebene befindlichen Einzelbildern soweit nachteilig auf die laterale Lokalisation auswirken, dass es besser ist, weniger Bilder zu verwenden.

Die Berücksichtigung aller 300 - 400 Bilder der Bildstapel führte auf eine berechnete Standard-Abweichung der lateralen Distanzen von durchschnittlich 20 nm. Dieser Wert konnte beträchtlich verbessert werden, indem immer nur 10 Bilder um die zuvor bestimmte axiale Objektposition herum aufsummiert wurden. Die berechneten Standard-Abweichungen lagen hierbei im Mittel bei 10 nm, in einigen Fällen betrug sie sogar nur 5 nm. Diese Fehler beinhalten auch z. B. von optischen Aberrationen oder mechanischen Verschiebungen des Objektträgers verursachte Distanzvariationen. Damit wird offensichtlich, dass die Lokalisations- bzw. Distanzgenauigkeit in der Tat stark von Aberrationen des optischen Systems und von Rauschanteilen aus Bildern, die nicht in der Fokusebene liegen, beeinträchtigt werden kann.

5.2.2 Axiale Positionen

Die axialen Positionen der Objekte bzw. Wellenzüge wurden mit Hilfe der modellbasierten Methode bestimmt, als Anpassungsfunktion wurde Gl. (3.24) auf Seite 48 verwendet. Dabei wurden systematische Drifts der Beads über die einzelnen Bildstapel hinweg beobachtet, wie in Abbildung 5.5 für die Serie, deren Beads in Abb. 5.4 dargestellt sind, exemplarisch gezeigt ist (siehe hierzu auch [Schneider00]). Auffällig ist, dass sich zwar die Objektpositionen während der Aufnahme der Serie um bis zu 100 nm änderten, diese Verschiebungen jedoch für jedes der vier Objekte (laterale Distanzen im Bereich von $1 \mu\text{m}$) beinahe gleich waren. Schon dieses Verhalten spricht dafür, dass die Variationen in den entsprechenden *Distanzen* zwischen den Objekten wesentlich kleiner sein müssen. Es bedeutet auch, dass die Wellenfronten und/oder der Objektträger gleichmäßig drifteten und offensichtlich keine oder nur sehr kleine Verkippungen des Wellenfeldes oder des Objektträgers stattfanden. Hierbei wird davon ausgegangen, dass die Beads selbst gut fixiert waren, d. h. ihre Position auf dem Objektträger nicht änderten.

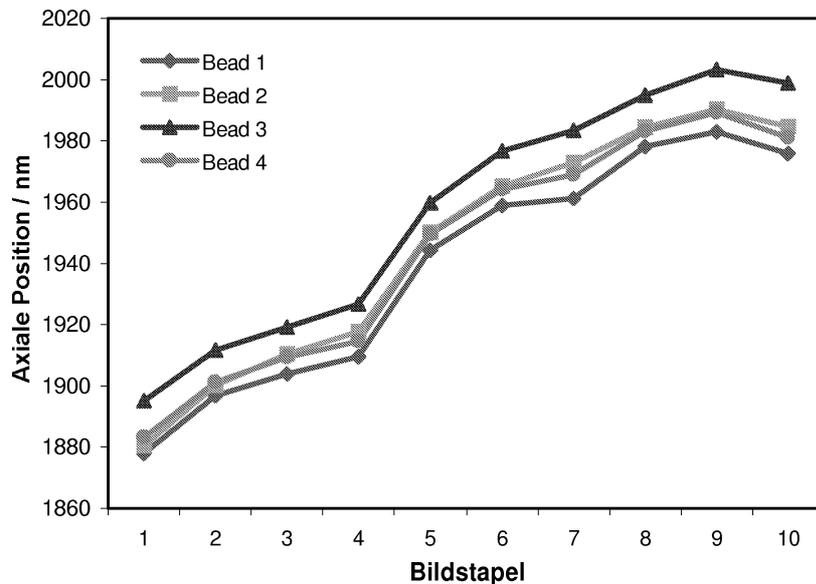


Abbildung 5.5: Hintereinander gemessene axiale Positionen der vier in Abb. 5.4 gezeigten TetraSpeck-Beads. Auf der Abszisse sind die Nummern der hintereinander und unabhängig voneinander gemessenen Bildstapel einer Serie aufgetragen. Die Positionen der einzelnen Objekte (laterale Distanzen im Bereich von $1 \mu\text{m}$) änderten sich in beinahe gleicher Weise.

5.2.3 Axiale Distanzen

Abbildung 5.6 zeigt die aus den Positionen in Abb. 5.5 berechneten axialen Objektdistanzen, in Tabelle 5.1 sind die Mittelwerte und Standard-Abweichungen der entsprechenden Abstände aus einer anderen Serie mit sieben Beads aufgeführt. Wie bereits oben beschrieben, wurden in beiden Serien jeweils 10 unabhängige Bildstapel mit 300 bzw. 400 Bildern hintereinander aufgenommen und ausgewertet.

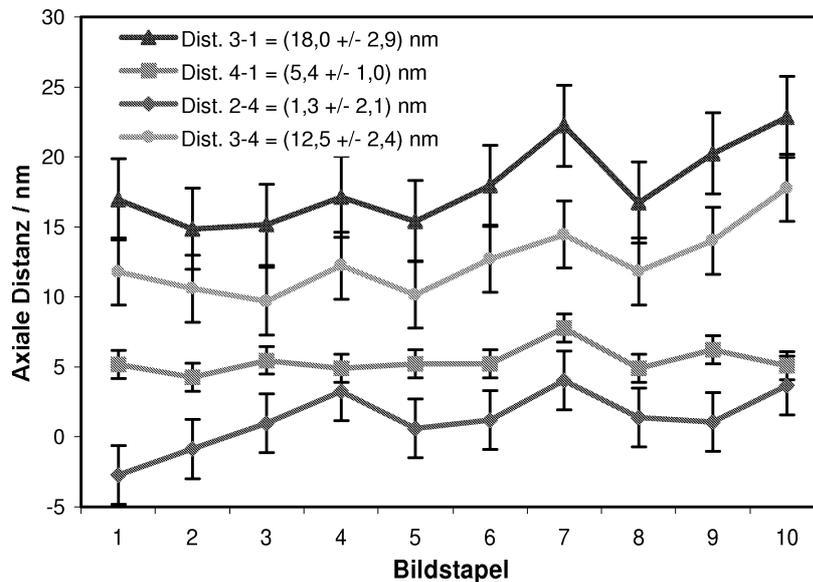


Abbildung 5.6: Axiale Distanzen zwischen den Objekten, deren Positionen in Abb. 5.5 gezeigt sind. Die Standard-Abweichungen der einzelnen Distanzen betragen 2,9; 1,0; 2,1 und 2,4 nm.

Zwischen den in Abb. 5.4 und 5.5 gezeigten Beads bzw. Objektpositionen wurden mittlere axiale Distanzen im Bereich von 1,3 bis 18,0 nm gemessen. Im einzelnen ergaben sich Abstände von 1,3; 5,4; 12,5 bzw. 18,0 nm, die Standard-Abweichungen betragen 2,1; 1,0; 2,4 bzw. 2,9 nm. Die verbleibenden, aus Gründen der Übersichtlichkeit in Abb. 5.6 nicht gezeigten, Distanzen (zwischen vier Objekten gibt es sechs unterschiedliche Abstände) haben Werte von $(6,7 \pm 2,6)$ nm und $(11,3 \pm 2,0)$ nm.

Die Distanz von 1,3 nm entspricht etwa der Größe der mittleren Wellenfrontverzerrungen von 1,5 nm, die in einer Objektregion mit einem Durchmesser von einigen Mikrome-

	Objekt 2	Objekt 3	Objekt 4	Objekt 5	Objekt 6	Objekt 7
Objekt 1	$6,6 \pm 2,6$	$2,0 \pm 1,6$	$2,3 \pm 1,8$	$6,5 \pm 2,3$	$1,7 \pm 2,3$	$6,4 \pm 3,2$
Objekt 2		$8,7 \pm 1,3$	$4,3 \pm 1,2$	$0,1 \pm 1,5$	$4,9 \pm 2,2$	$13,0 \pm 2,7$
Objekt 3			$4,3 \pm 0,7$	$8,6 \pm 1,2$	$3,7 \pm 1,6$	$4,3 \pm 2,6$
Objekt 4				$4,2 \pm 1,2$	$0,6 \pm 1,4$	$8,7 \pm 1,2$
Objekt 5					$4,8 \pm 2,3$	$12,9 \pm 3,0$
Objekt 6						$8,0 \pm 2,2$

Tabelle 5.1: Ergebnisse der axialen Distanzmessungen einer anderen Serie, als in Abb. 5.4 bis 5.6 gezeigt. Diese Serie enthält sieben Objekte, d. h. 21 verschiedene Distanzen. Die Abstände (Mittelwert \pm Standard-Abweichung; Einheit: nm) und ihre jeweiligen, aus den Standard-Abweichungen der gemessenen Distanzen berechneten Fehler sind ähnlich wie die in Abb. 5.6 dargestellten Ergebnisse.

tern beobachtet wurden [Schneider00]. Solche Distanzen können mit dem gegenwärtigen System also nicht signifikant von einer wahren Distanz von null Nanometern unterschieden werden. Das axiale Auflösungsäquivalent, d. h. die kleinste messbare z-Distanz, kann daher durch die zweifache mittlere Wellenfrontverzerrung von rund 4 nm abgeschätzt werden. Folglich sind die anderen drei in Abb. 5.6 gezeigten Distanzen eindeutig größer als null und in jeder der 10 Messungen von den anderen Abständen klar unterscheidbar; nur in einigen Fällen überschneiden sich die Fehlerbalken an ihren Enden. Das bedeutet, dass Distanzen, die um ca. 4 nm voneinander abweichen, mit einem Konfidenzlimit von etwa 90% gemessen bzw. unterschieden werden können.

Die Anzahl der pro Objekt zur Auswertung verwendeten Photonen, d. h. die Zahl der Photonen, die in den Bildpunkten enthalten waren, die nach der Segmentierung für die Auswertung berücksichtigt wurden, lag in der Größenordnung von 10^5 . Zur Umrechnung der gemessenen CCD-Counts in detektierte Photonen wurde hierbei die Angabe des Herstellers zum A/D-Konversionsfaktor der CCD-Kamera benutzt (Abschn. 4.4.2). Um einen Vergleich mit der Distanzpräzision zu erhalten, die bei der oben genannten Photonenzahl theoretisch zu erwarten ist, wurden Computersimulationen durchgeführt, in denen auch Fehler berücksichtigt wurden, die durch die Digitalisierung in der Kamera entstehen (A. V. Failla). Die hierbei ermittelte Standard-Abweichung der axialen Distanzen beträgt 0,5 nm. Solche kleinen Werte wurden auch in den anderen, hier nicht gezeigten Serien nicht gefunden, in einigen Fällen konnten jedoch Abstände von wenigen Nanometern mit einer Präzision von 1,0 nm bestimmt werden.

5.3 Messungen mit zwei Wellenlängen

Bei der Bestimmung der Präzision der Distanzmessungen mit zwei Wellenlängen wurde wie in Abschnitt 5.2 vorgegangen. Auch hier wurden dieselben Objektregionen jeweils 10-mal hintereinander aufgenommen, und zur Abschätzung der Distanzpräzision wurde für jede gemessene Distanz die Standard-Abweichung berechnet.

Die Fluoreszenzanregung fand bei $\lambda_{ex1} = 647$ nm und $\lambda_{ex2} = 488$ nm statt, als Testobjekte wurden „dark red“- bzw. „yellow-green“-markierte „FluoSpheres“ mit Durchmessern von 40 nm bzw. 100 nm verwendet (vgl. Abschn. 5.1). Um die Einflüsse von Wellenfrontverzerrungen auf die gemessenen axialen Distanzen zu minimieren, wurden für die Auswertung **Bead-Paare**, bestehend aus zwei Beads mit unterschiedlichen spektralen Signaturen (ein rotes und ein grünes Bead, vgl. SPDM, Abschnitt 2.4) mit *minimalem* lateralem Abstand, ausgewählt.

Die hier vorgestellten Distanzen und Standard-Abweichungen gelten nur für die Positionen der *Wellenzüge*. Bei zwei Anregungswellenlängen können die Wellenzugdistanzen von Objekten mit *unterschiedlicher* spektraler Signatur, im Gegensatz zu Wellenzugdistanzen zwischen Beads der gleichen spektralen Signatur, nicht mit den „wahren“ axialen Objektdistanzen gleichgesetzt werden. Die für eine Abstandsbestimmung zwischen Beads mit unterschiedlicher spektraler Signatur erforderlichen Kalibrationsmessungen sowie die Angleichung der Wellenfrontabstände beider Wellenfelder (Abschnitt 3.2.2) konnten im Rahmen der vorliegenden Arbeit nicht mehr realisiert werden.

Ursprünglich war es vorgesehen, eine Kalibration mit Hilfe von TetraSpeck-Beads vorzunehmen. Diese Beads schienen zunächst aufgrund ihrer Mehrfach-Markierung für diesen

Zweck ideal zu sein. Bei den ersten Messungen stellte sich allerdings heraus, dass der in diesen Beads enthaltene Farbstoff „orange“, dessen Maximum der Emission bei 580 nm liegt (Maximum der Absorption: 560 nm), offensichtlich auch noch bei 488 nm anregbar ist. Folglich fand auf dem CCD-Chip der Kamera ein Übersprechen („Cross-Talk“) vom grünen in den roten Farbkanal statt, d. h. im roten Kanal wurden nicht nur „rote“, sondern auch „grüne“ Wellenzüge detektiert. Der Übersprechanteil in den roten Kanal war hierbei so groß ($\approx 100\%$ bezogen auf den roten Kanal), dass es nicht möglich war, die resultierende Schwebung auf den Wellenzügen durch Bildverarbeitungsmethoden zu eliminieren. Die daraufhin verwendeten „dark red“- und „yellow-green“-markierten Beads verursachten dagegen kein Übersprechen.

Die unten angegebenen, berechneten Standard-Abweichungen der Wellenzugdistanzen sollten aber mit den Standard-Abweichungen der axialen Objektdistanzen übereinstimmen, da sich beide nur durch eine, bei der Kalibration zu messende, additive Konstante $dz = d\Theta/k_z$ ($d\Theta$: Differenz der Phasendifferenzen der Laserstrahlen, k_z : Wellenzahl der Modulation, s. Abschn. 3.2.2) unterscheiden. Damit dies gilt, muss allerdings der Fehler bzw. die Unsicherheit von dz wesentlich kleiner als die berechnete Standard-Abweichung einer Wellenzugdistanz sein. Diese Bedingung dürfte jedoch z. B. durch Mehrfachmessung von dz zu erfüllen sein. Andernfalls vergrößert sich der Fehler der Objektdistanz entsprechend. Nimmt man beispielsweise an, dass dz selbst mit dem gleichen Fehler bzw. mit derselben Standard-Abweichung wie eine Wellenzugdistanz behaftet ist, müssen die nachstehend genannten Standard-Abweichungen der Wellenzugdistanzen mit $\sqrt{2}$ multipliziert werden, um die Standard-Abweichungen der Objektdistanzen zu erhalten.

Bei der Durchführung der Messungen wurden Serien sowohl mit Objekt- als auch mit Phasen-Rasterung aufgenommen. Im Folgenden werden die repräsentativen Ergebnisse von zwei mit **Phasen-Rasterung** gemessenen Serien vorgestellt. Die berechneten Standard-Abweichungen in den anderen mit Phasen-Rasterung aufgenommenen Serien weichen kaum von den unten gezeigten Ergebnissen ab, in den mit Objekt-Rasterung gemessenen Serien wurden in der Regel um 20.30% größere Standard-Abweichungen gefunden. Die Ursache hierfür dürfte vor allem in den in Abschnitt 3.2.5 bereits dargelegten vorteilhaften Eigenschaften der Phasen-Rasterung liegen. Außerdem ist die Wahrscheinlichkeit für das Auftreten von minimalen Verkippungen oder Verbiegungen des Objektträgers reduziert, da dieser bei der Messung nicht bewegt wird.

5.3.1 Axiale Positionen

Zur Bestimmung der Positionen der Wellenzüge wurde der schwerpunkt-basierte Algorithmus verwendet. Analog zu den Messungen mit einer Wellenlänge konnten auch hier systematische Drifts von etwa 100 nm über die einzelnen Bildstapel der Serien hinweg beobachtet werden, wie in Abbildung 5.7 dargestellt ist. Die lateralen Abstände zwischen Beads mit gleicher spektraler Signatur (Beads 1-3: rot, Beads 4-6: grün) liegen hier wie bei den Distanzmessungen mit einer Wellenlänge ebenfalls in der Größenordnung von 1 μm . Die Beads der einzelnen Paare, d. h. Bead 1 und 4, 2 und 5 sowie 3 und 6 liegen wesentlich näher beieinander, ihre gegenseitigen lateralen Distanzen liegen im Bereich um 100 nm (die Bestimmung der lateralen Abstände erfolgte wie in Abschn. 5.2.1, d. h. mit der verbesserten Version; chromatische Verschiebungen wurden nicht korrigiert). Auch hier ändern sich alle Positionen nahezu synchron, allerdings weichen die Wellenzugpositionen

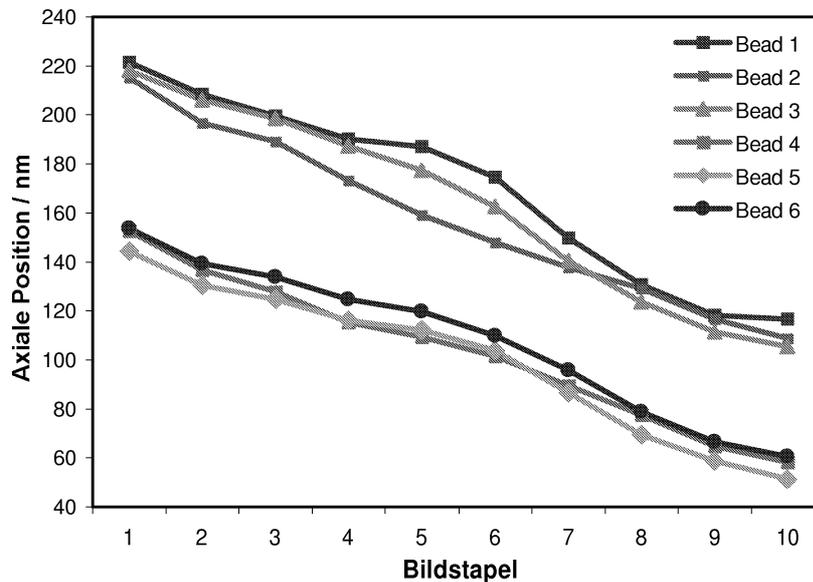


Abbildung 5.7: Hintereinander gemessene axiale Positionen der Wellenzüge von sechs „FluoSphere“-Beads, angeregt mit $\lambda_{\text{ex1}} = 647 \text{ nm}$ (Beads 1 - 3) und $\lambda_{\text{ex2}} = 488 \text{ nm}$ (Beads 4 - 6). Auf der Abszisse sind die Nummern der hintereinander gemessenen Bildstapel einer Serie aufgetragen. Die Positionen der einzelnen Objekte (laterale Distanzen zwischen Bead 1 und 4, 2 und 5 sowie 3 und 6 im Bereich von 100 nm) änderten sich auch hier in ähnlicher Weise; bei den roten Beads sind stärkere Abweichungen von einer gleichmäßigen Bewegung zu erkennen.

der roten Beads stärker von einer gleichmäßigen Linie bzw. Drift ab als die entsprechenden Positionen der grünen Beads.

Da die Abstände zwischen den einzelnen Wellenzügen unterschiedlicher Wellenfelder von der axialen Position selbst abhängen (vgl. Abb. 5.3 und Abschn. 3.2.2), mussten für jede der in Abb. 5.7 gezeigten Positionen in dem entsprechenden Bildstapel jeweils *dieselben* Wellenzüge identifiziert werden, um vergleichbare Ergebnisse zu erhalten. Das heißt, es wurde jeweils im ersten Bildstapel einer Serie für jede Farbe ein bestimmter Wellenzug ausgewählt. Anschließend wurden die entsprechenden Wellenzugpositionen in den aufeinanderfolgenden Bildstapeln für jedes Objekt bestimmt, wobei natürlich die anderen Wellenzüge mit berücksichtigt wurden (vgl. Abschn. 3.2.4). Da sowohl die tatsächlichen axialen Distanzen (Abschnitt 5.2.2) als auch die Drifts zwischen den Bildstapeln wesentlich kleiner als die Wellenfrontabstände waren, kann dieses Verfahren als zuverlässig angesehen werden.

5.3.2 Axiale Distanzen

In Abbildung 5.8 sind die, aus den Positionen in Abb. 5.7 berechneten, axialen Distanzen zwischen den Wellenzügen der Beads der einzelnen Paare, d. h. der Beads 1 und 4, 2 und 5 sowie 3 und 6 dargestellt. Tabelle 5.2 zeigt alle 15 in dieser Serie ermittelten Distanzen inkl. der berechneten Standard-Abweichungen.

Die Mittelwerte der in Abb. 5.8 gezeigten, jeweils 10-mal hintereinander bestimmten

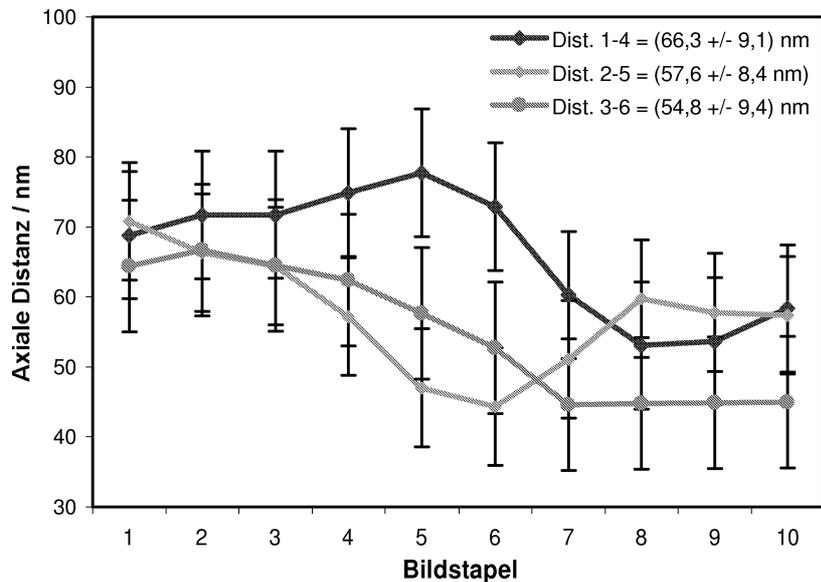


Abbildung 5.8: Distanzen zwischen den, in Abb. 5.7 gezeigten, Wellenzügen der nebeneinanderliegenden Beads verschiedener spektraler Signatur 1 und 4, 2 und 5 sowie 3 und 6. Die berechneten Standard-Abweichungen betragen 9,1; 8,4 und 9,4 nm.

Wellenzugdistanzen betragen für die Beads 1 und 4 66,3 nm, für die Beads 2 und 5 57,6 nm, und zwischen Bead 3 und 6 wurde ein Wert von 54,8 nm gefunden. Die entsprechenden berechneten Standard-Abweichungen betragen 9,1; 8,4 und 9,4 nm. Im Gegensatz zu Abb. 5.6 sind die Überlappungen der Fehlerbalken in Abb. 5.8 wesentlich größer, so dass keine der gezeigten Distanzen signifikant von einer anderen unterschieden werden kann. Erst Distanzunterschiede von ca. 18 nm können mit einem Konfidenzlimit von 90% gemessen werden.

Beim Vergleich der Werte in Tabelle 5.2 fällt auf, dass die Standard-Abweichungen der

	Bead 2	Bead 3	Bead 4	Bead 5	Bead 6
Bead 1	12,2 ± 9,1	6,6 ± 3,9	66,3 ± 9,1	69,8 ± 7,0	61,3 ± 7,0
Bead 2		5,6 ± 8,6	54,1 ± 5,9	57,6 ± 8,4	49,1 ± 7,6
Bead 3			59,7 ± 10,9	63,3 ± 9,6	54,8 ± 9,4
Bead 4				3,5 ± 4,2	5,0 ± 3,6
Bead 5					8,5 ± 1,1

Tabelle 5.2: Axiale Distanzen (Mittelwert ± Standard-Abweichung; Einheit: nm) der Serie, deren Resultate auch in Abb. 5.7 und 5.8 gezeigt sind. Es wurden jeweils drei rot und drei grün fluoreszierende Beads ausgewertet, daraus ergaben sich 15 verschiedene Distanzen. Die berechneten Standard-Abweichungen der Distanzen von grünen Beads (Nr. 4-6) liegen zwischen 1,1 und 4,2 nm, in allen anderen Fällen ergaben sich Werte zwischen 3,9 und 10,9 nm.

Wellenzugdistanzen von Beads mit roter spektraler Signatur (Nr. 1-3) oder von einem roten und einem grünen Bead zwischen 3,9 und 10,9 nm liegen, die Standard-Abweichungen der Distanzen von grünen Beads (Nr. 4-6) dagegen nur 1,1; 3,6 und 4,2 nm betragen. Folglich konnten die Distanzen zwischen den Wellenzügen der grünen Beads wesentlich genauer gemessen werden. Der minimale, mit einem Konfidenzlimit von 90% messbare Distanzunterschied beträgt hier nur ca. 6 nm. Auch in Abbildung 5.7 ist dies bereits qualitativ erkennbar, da die Positionen der roten Wellenzüge stärker von einer geraden Linie abweichen als die Orte der grünen.

Tabelle 5.3 zeigt die Ergebnisse einer weiteren Serie mit 15 ausgewerteten Distanzen zwischen drei Beads mit roter und drei Beads mit grüner spektraler Signatur. Die Standard-Abweichungen der Distanzen zwischen den Wellenzügen der grünen Beads liegen hier zwischen 2,0 nm und 3,6 nm. Die anderen Standard-Abweichungen bewegen sich im Bereich von 5,0 nm bis 12,8 nm und sind damit ebenfalls deutlich größer als die Standard-Abweichungen der Wellenzugdistanzen zwischen Beads mit grüner spektraler Signatur.

Darüberhinaus konnte auch in den anderen, unter den gleichen Bedingungen gemessenen Serien keine Abhängigkeit der Standard-Abweichungen der Wellenzugdistanzen vom *lateralen* Abstand der Objekte beobachtet werden. Es fanden daher offensichtlich auch bei den Messungen mit zwei Wellenlängen höchstens sehr geringe Verkippungen des Objektträgers oder der Wellenfronten statt. Da die Distanzen in Abb. 5.8 in den zuletzt gemessenen Bildstapeln tendenziell etwas kleiner sind als in den zu Beginn der Serie aufgenommenen 3D-Bildern, haben sich eventuell die Wellenfronten beider Wellenfelder untereinander etwas verkippt. Dies könnte auf eine leichte Veränderung der Differenz der Phasendifferenzen, d. h. auf eine ungleichmäßige Verschiebung der Wellenfronten beider Laser während der Messung der Serie hindeuten. Diese Effekte spielen aber, sofern tatsächlich vorhanden, im Vergleich zur bisher erreichten Distanzpräzision nur eine untergeordnete Rolle.

	Bead 2	Bead 3	Bead 4	Bead 5	Bead 6
Bead 1	$5,6 \pm 5,0$	$0,6 \pm 7,5$	$16,4 \pm 8,4$	$28,6 \pm 8,2$	$23,5 \pm 8,0$
Bead 2		$5,1 \pm 5,8$	$22,4 \pm 8,9$	$34,2 \pm 10,1$	$29,1 \pm 8,9$
Bead 3			$17,0 \pm 11,8$	$29,2 \pm 12,8$	$24,0 \pm 11,1$
Bead 4				$12,2 \pm 3,6$	$7,1 \pm 2,0$
Bead 5					$5,1 \pm 3,0$

Tabelle 5.3: Axiale Distanzen (Mittelwert \pm Standard-Abweichung; Einheit: nm) einer anderen Serie als in Abb. 5.7 und 5.8 gezeigt. Auch hier wurden aus den Wellenzugpositionen von jeweils drei rot und drei grün fluoreszierenden Beads 15 verschiedene Distanzen ausgewertet. Die berechneten Standard-Abweichungen der Distanzen von grünen Beads (Nr. 4-6) liegen hier zwischen 2,0 und 3,6 nm, die anderen Standard-Abweichungen reichen von 5,0 bis 12,8 nm.

5.3.3 Systematische Störungen der Wellenfronten

Die glatten Verläufe der Kurven in Abb. 5.7 und Abb. 5.8 legen den Verdacht nahe, dass sich die Positionen der Wellenfronten nicht zufällig, sondern *systematisch* ändern.

Schätzt man die Lokalisationsgenauigkeit der Wellenzüge ab, indem man die Standard-Abweichung aus den unterschiedlichen Positionen berechnet, die man durch Variation der Segmentierschwelle innerhalb gewisser Grenzen erhält [Marczinzik98], ergibt sich ein Wert von lediglich 0,5 nm für die roten und 0,3 nm für die grünen Wellenzüge. Der Lokalisationsfehler der Wellenzüge ist also offensichtlich wesentlich kleiner, als es die in Abb. 5.8 und Tab. 5.2 gezeigten Standard-Abweichungen vermuten lassen.

Eine mögliche Erklärung für die beobachteten Distanzvariationen liefert Abbildung 5.9. Das Bild wurde nach der Fein-Justage des Mikroskops (vgl. Abschnitt 4.5.2), d. h. bei zum Objektträger parallel ausgerichteten Wellenfronten aufgenommen und zeigt eine Schicht von dicht nebeneinanderliegenden rot und grün fluoreszierenden „FluoSpheres“. Wie man sehen kann, waren dabei nicht alle Beads gleichmäßig zur Fluoreszenz angeregt, sondern es traten **parallel verlaufende Streifen** mit unterschiedlichen Helligkeiten auf wie bei einer zusätzlichen lateralen Modulation der Anregungsintensität. Falls die Streifen oder die Beads ihre laterale Position während der Aufnahme einer Serie ändern, würde das auch die Positionen der detektierten Wellenzüge in axialer Richtung beeinflussen (vgl. Abb. 4.3 auf S. 64). Die relative Intensität der Streifen betrug im roten Farbkanal ca. 5 – 10% bezogen auf die Amplitude der axialen Modulation, im grünen Kanal lag sie deutlich darunter. Dies könnte auch erklären, warum die Wellenzugdistanzen von Beads mit grüner spektraler Signatur mit einer höheren Präzision gemessen werden konnten.

Die Ursache für den Streifeneffekt konnte bisher noch nicht geklärt werden. Reflexionen von der Rückseite des dichroitischen Strahlteilers oder der Vorderseite des gegenüberliegenden Objektivs wurden als Ursache bereits ausgeschlossen. Möglicherweise spielen Reflex-

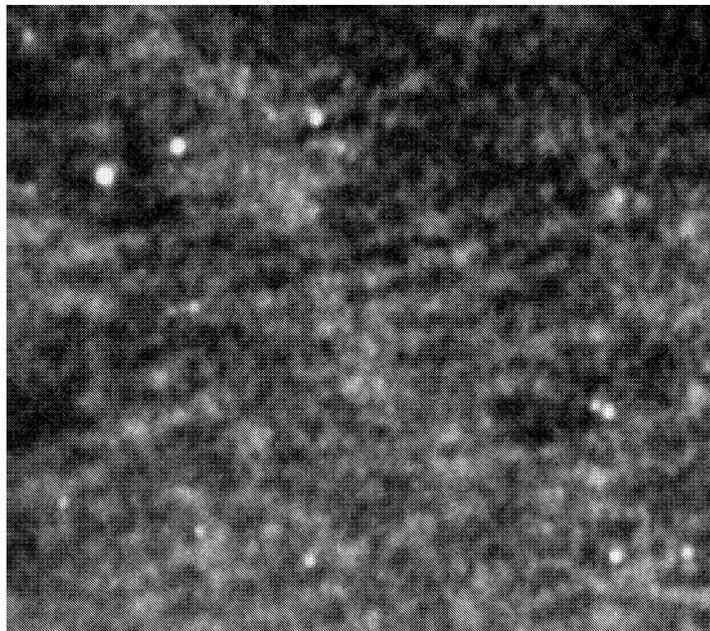


Abbildung 5.9: (2D-)Aufnahme einer Schicht von dicht nebeneinanderliegenden rot und grün fluoreszierenden Beads. Obwohl die Wellenfronten des Anregungslichts parallel zu der Schicht ausgerichtet waren, erkennt man deutlich schräg verlaufende Streifen mit unterschiedlichen Intensitäten.

ionen zwischen den Grenzflächen des Deckglases und/oder des Objektträgers eine Rolle. Diese könnten eventuell von den verschiedenen Brechungsindizes von Einbettungsmedium ($n \approx 1,46$) und Glas ($n = 1,515$) verursacht werden.

5.4 Vergleich modell-/schwerpunktbasierte Methode

Wie in den Abschnitten 2.4 und 3.2.4 bereits dargelegt wurde, ist die Anwendung modellbasierter Lokalisations-Methoden in der Praxis manchmal mit Schwierigkeiten verbunden. Dafür besitzen diese Verfahren häufig eine höhere Genauigkeit als schwerpunktbasierte Methoden. Um dies zu überprüfen, wurden einige mit **Objekt-Rasterung** aufgenommene Serien mit beiden Verfahren ausgewertet. Beim modellbasierten Verfahren wurde außerdem zwischen zwei Modellen unterschieden, indem sowohl Anpassungsfunktion (3.23) als auch Gl. (3.24) verwendet wurde (siehe Seite 48f).

Um eine direkte Gegenüberstellung zu erhalten, wurden die Algorithmen jeweils auf *die-selben* Objekte innerhalb einer Serie angewendet und die entsprechenden axialen Distanzen voneinander unabhängig bestimmt. Zur Abschätzung der Fehler der einzelnen Verfahren wurde genau wie in Abschn. 5.2 vorgegangen, d. h. die Objektdistanzen wurden mit jeder Methode 10-mal hintereinander bestimmt und daraus jeweils die Standard-Abweichung berechnet. Für diese Auswertungen wurden insgesamt sechs Serien herangezogen, die Ergebnisse sind in Tabelle 5.4 zusammengestellt. Spalte „Modell 1“ enthält die Ergebnisse des modellbasierten Verfahrens mit Anpassungsfunktion (3.23) (im Folgenden Methode 1 genannt), für die Bestimmung der in Spalte „Modell 2“ aufgeführten Distanzen wurde Gl. (3.24) verwendet (Methode 2), und in der letzten Spalte sind die Ergebnisse des schwerpunktbasierten Verfahrens dargestellt (Methode 3).

Auffällig ist, dass nur in den Serien 1 und 2 mit allen drei Methoden ähnliche bzw. vergleichbare Ergebnisse erzielt wurden. Hierbei werden diejenigen Distanzen einer Serie als ähnlich bezeichnet, deren Differenzen im Bereich der berechneten Standard-Abweichungen liegen. In den Serien 3 - 5 konnte dagegen eine weitgehende Übereinstimmung nur zwischen

Methode	Modell 1	Modell 2	Schwerpunkt
Serie 1	$30,0 \pm 10,6$	$24,6 \pm 6,4$	$26,0 \pm 7,0$
Serie 2	$20,9 \pm 8,9$	$15,7 \pm 3,7$	$16,7 \pm 4,3$
Serie 3	$22,5 \pm 13,7$	$5,0 \pm 1,3$	$16,0 \pm 3,9$
Serie 4	$10,5 \pm 8,7$	$1,3 \pm 4,3$	$7,3 \pm 10,4$
Serie 5	$9,6 \pm 6,2$	$1,4 \pm 1,2$	$8,5 \pm 9,5$
Serie 6	$52,6 \pm 10,2$	$10,4 \pm 1,3$	$29,7 \pm 6,4$

Tabelle 5.4: Distanzauswertungen mit drei unterschiedlichen Algorithmen (Mittelwert \pm Standard-Abweichung; Einheit: nm). **Modell 1:** modellbasierte Methode mit Anpassungsfunktion (3.23), **Modell 2:** modellbasierte Methode mit Anpassungsfunktion (3.24), **Schwerpunkt:** schwerpunktbasierter Algorithmus. In einigen Fällen wurden stark voneinander abweichende Ergebnisse erhalten, sowohl hinsichtlich der berechneten Standard-Abweichung als auch des Distanz-Mittelwerts selbst.

Methode 1 und 3 gefunden werden, in Serie 6 lieferten alle drei Verfahren vollkommen unterschiedliche Ergebnisse. Die berechneten Standard-Abweichungen von Methode 2 sind in allen Fällen kleiner als die Fehler der anderen Methoden, davon sind wiederum die Fehler von Methode 3 in vier Serien kleiner als die von Methode 1. Bemerkenswert ist, dass in den Serien, in denen alle drei Methoden ähnliche Distanzen lieferten, auch die berechneten Standard-Abweichungen ähnlich sind. Vor allem in den Serien 3, 5 und 6 ist dagegen bei Methode 2 eine gewisse Relation zwischen den bestimmten Distanzen einerseits und den entsprechenden Standard-Abweichungen andererseits erkennbar. Das heißt, im Vergleich zu den Ergebnissen der anderen beiden Methoden besitzen hier nicht nur die Standard-Abweichungen, sondern auch die ermittelten Distanz-Mittelwerte selbst signifikant kleinere Werte.

Insgesamt scheint sich damit zu bestätigen, dass die axialen Distanzen mit der modellbasierten Methode in Verbindung mit Anpassungsfunktion (3.24) tatsächlich am präzisesten bestimmt werden können. Es bleibt jedoch angesichts der teilweise sehr unterschiedlichen Ergebnisse der anderen Methoden eine gewisse Unsicherheit bezüglich etwaiger systematischer Fehler der ermittelten Distanzwerte bestehen. Umgekehrt gilt dies natürlich auch für die modellbasierte Methode in Verbindung mit Anpassungsfunktion (3.23) und für das schwerpunktbasierte Verfahren. Darüberhinaus wird deutlich, dass die ermittelte Distanz bei der modellbasierten Methode sehr stark von der gewählten Anpassungsfunktion abhängt. Das Ergebnis kann unter Umständen allerdings auch noch von anderen Faktoren wie z. B. den Startparametern beeinflusst werden.

Für mit **Phasen-Rasterung** aufgenommene Bildstapel konnte kein sinnvoller Vergleich der Methoden angestellt werden. Die Standard-Abweichungen, die aus den mit Anpassungsfunktion Gl. (3.26) von Seite 51 ermittelten Distanzen berechnet wurden, lagen im Bereich einiger 10 Nanometer und damit um ein Vielfaches über den mit der schwerpunktbasierten Methode erhaltenen Werten. Der Grund hierfür liegt vermutlich darin, dass die gemessenen, unregelmäßigen Wellenzüge (vgl. Abb. 5.3) durch die vier in Gl. (3.26) enthaltenen Parameter i. a. nicht ausreichend charakterisiert werden können. Dieses Problem könnte evtl. durch eine Anpassungsfunktion mit mehr Parametern gelöst werden, wobei aber der Vorteil der Einfachheit von Gl. (3.26) nicht mehr gegeben wäre, oder indem man jeden Wellenzug einzeln lokalisiert, wie bei der schwerpunktbasierten Methode.

5.5 Biologische Anwendungen

Dieser Abschnitt stellt zwei Beispiele von Messungen an biologischen Präparaten vor, die im Rahmen der vorliegenden Arbeit durchgeführt wurden. Damit sollte untersucht werden, in wie fern Messungen an Zellen mit dem derzeitigen Mikroskop-Prototyp bereits *praktikabel* sind. Außerdem wurde überprüft, ob mit der Methode der Fluoreszenz-In Situ-Hybridisierung (FISH) genügend kleine Sonden hergestellt werden können, die eine für die Auswertung hinreichende räumliche Modulation der Fluoreszenzintensität zeigen.

5.5.1 Fluoreszenzmarkierte Oligonukleotide auf dem ABL-Gen

Das ABL-Gen steht in starkem Interesse der Molekularbiologie, da reziproke Translokationen bzw. Umlagerungen zwischen dem ABL-Gen auf Chromosom 9 und dem BCR-Gen

auf Chromosom 22 zur Bildung eines verkürzten Chromosoms 22, das als Philadelphia-Chromosom bekannt geworden ist, führen. Das Philadelphia-Chromosom trägt zum Ausbruch der chronisch myeloischen Leukämie (CML) bei, einer bei Menschen häufig diagnostizierten Krebsart [Knippers95].

Für die hier vorgestellten Experimente wurden die Blöcke 1 und 3 auf dem ABL-Gen mit FITC- bzw. Cy5-markierten Oligonukleotiden hybridisiert [Kroll01]. Bei den Messungen wurden sowohl in der Metaphase als auch in der Interphase befindliche Zellkerne von menschlichen Fibroblasten, menschlichen Tumorzellen, sog. HeLa-Zellen und menschlichen Knochenmarkzellen aufgenommen. Aus der ermittelten Distanz zwischen den Blöcken 1 und 3 lassen sich noch keine Aussagen bezüglich der Wahrscheinlichkeit der oben beschriebenen Translokation zwischen Chromosom 9 und 22 treffen. Es konnte jedoch gezeigt werden, dass die fluoreszenzmarkierten Oligonukleotide einerseits klein genug sind, d. h. eine im Vergleich zum Wellenfrontabstand kleine Ausdehnung besitzen, und andererseits genügend Fluoreszenzphotonen liefern, um weiterführende Messungen an den Chromosomen 9 und 22 mit dem SMI-Mikroskop zu ermöglichen.

In Abbildung 5.10 sind hierzu zwei Beispiele gezeigt. Dargestellt sind die (2D-)Bilder

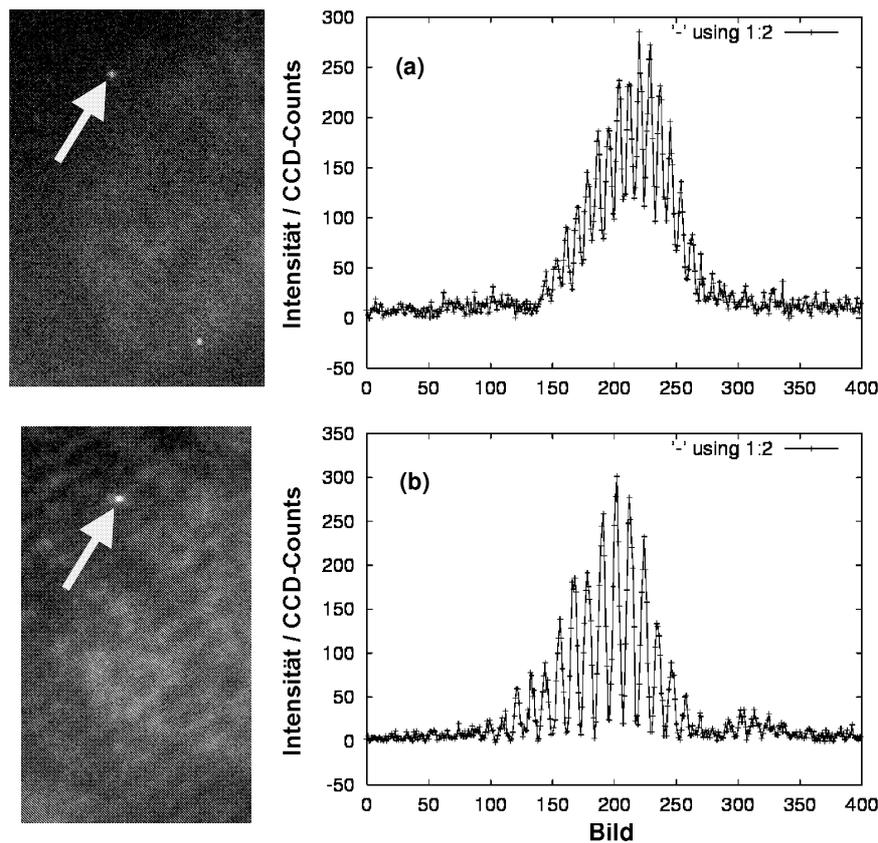


Abbildung 5.10: Bilder und axiale Intensitätsverteilungen eines mit FITC (a) und Cy5 (b) markierten Oligonukleotids. Die Integrationszeit pro Bild betrug 0,25 s (a) und 2,0 s (b), die Schrittweite des Objektverschiebetisches war 20 nm. Die Modulationen der AID sind sehr gut ausgeprägt, so dass axiale Distanzmessungen hoher Präzision möglich sind.

und entsprechenden axialen Intensitätsverteilungen von einem mit (a) FITC (grün) und einem mit (b) Cy5 (rot) markierten Oligonukleotid. Die Bildstapel enthalten jeweils 400 Bilder, zwischen den Aufnahmen der einzelnen Bilder wurde der Objektverschiebetisch um 20 nm verschoben. Die Integrationszeit pro Bild betrug in (a) 0,25 s und in (b) 2,0 s. Die aufgenommenen Kurven besitzen eine ausgeprägte Modulation, so dass axiale Distanzmessungen mit hoher Präzision möglich sind. Für das FITC- bzw. Cy5-Fluorochrom wurden Durchmesser von 80 nm bzw. ≤ 60 nm ermittelt.

Insgesamt wurden 13 Zellkerne aufgenommen. Bei der Auswertung wurden die, mit Messungen an TetraSpeck-Beads ermittelten, chromatischen Verschiebungen berücksichtigt. Ebenso ist das Übersprechen bzw. der „Cross-Talk“ der einzelnen Fluoreszenzintensitäten in die jeweils anderen Farbkanäle der CCD-Kamera nach dem in [Heintzmann99] beschriebenen Verfahren korrigiert worden. Da Kalibrationsmessungen zur Bestimmung der gegenseitigen Verschiebung der Wellenfelder noch nicht durchgeführt werden konnten (Abschn. 5.3), wurden keine Wellenzugdistanzen ermittelt. Die axialen Abstände wurden daher aus den Distanzen zwischen den *Einhüllenden* der axialen Intensitätsverteilungen mit der modellbasierten Methode unter Verwendung von Gl. (3.23) (mit Gauß-Funktion als Detektions-PSF, Abschn. 3.2.3) berechnet. Dementsprechend war die Genauigkeit der Distanzbestimmung dieselbe wie bei einer Messung mit einem konventionellen Epifluoreszenzmikroskop.

Als Ergebnis wurde schließlich für die 3D-Distanz zwischen Block 1 und 3 von Chromosom 9 ein Wert von $(88,5 \pm 50,7)$ nm (Mittelwert \pm Standard-Abweichung) gefunden [Kroll01]. Zur Kontrolle dieses Ergebnisses wurden dieselben Objekte mit einem konfokalen Laser-Raster-Mikroskop aufgenommen. Dort wurde, im Gegensatz zu den Messungen mit dem SMI-Mikroskop, zwischen Interphase- und Metaphase-Chromosomen unterschieden. In den Interphase-Zellen wurde eine Distanz von $(82,7 \pm 36,8)$ nm und in den Metaphase-Chromosomen ein Abstand von $(75,0 \pm 35,6)$ nm gemessen. Die Ergebnisse von beiden Mikroskopen stimmen im Rahmen der berechneten Standard-Abweichungen überein. Interessant ist in diesem Zusammenhang, dass das Verhältnis der Standard-Abweichungen in etwa dem Verhältnis der Auflösungen von einem konventionellen und einem Laser-Raster-Mikroskop entspricht.

5.5.2 Gefrierschnitte mit Messenger-RNA

In einigen biologischen Experimenten ist es von Interesse, die Größen von Messenger-RNA- bzw. mRNA-Komplexen zu kennen. Die RNA fungiert im Zellkern als Intermediat zwischen der DNA und den Proteinen. Das bedeutet, mit Hilfe der RNA wird die in der DNA enthaltene Information zur Proteinsynthese ausgelesen. Die mRNA ist im Gegensatz zu den anderen RNA-Typen (t- und rRNA) in ihrer Sequenz sehr variabel und kurzlebig, sie stellt außerdem das letzte Transkript der Erbinformation vor der Umsetzung in eine Proteinsequenz dar [Trommer96].

Bisher konnte die Größe der mRNA nur mit Hilfe von aufwändigen elektronenmikroskopischen Aufnahmen gemessen werden. Das Ziel der hier durchgeführten Experimente bestand darin, herauszufinden, ob diese Größen auch mit dem SMI-Mikroskop ermittelt werden können (vgl. Abschnitt 3.2.6). Hierzu wurden in Zusammenarbeit mit Dr. Ana Pombo³ Messungen an dünnen Gefrierschnitten von Kernen menschlicher HeLa-Zellen

³MRC Clinical Sciences Centre, London

durchgeführt [Pombo99a]. Dabei wurden beide Laser des Mikroskops eingesetzt.

Die Proben besaßen eine Dicke von 100 – 150 nm und enthielten sog. Poly(A)⁺-RNA mit Durchmessern von unter 200 nm. Diese mRNA enthält einen, nach der Gentranskription angehängten sog. Poly(A)-Schwanz, welcher den Transport der RNA aus dem Kern erleichtert, die molekulare Stabilität erhöht sowie als Signalgeber für weitere Ereignisse wirkt („Transcription Factory“, [Pombo99b]).

Abbildung 5.11 zeigt ein (2D-)Bild aus einem Bildstapel mit 200 Bildern, die Integrationszeit pro Bild betrug 1,0 s. Die Poly(A)⁺-RNA (grüne Punkte) wurde zuvor mittels Fluoreszenz-In Situ-Hybridisierung fluoreszenzmarkiert, dabei wurde eine mit FITC markierte Poly-dT-Probe, die an den komplementären Poly(A)-Schwanz der mRNA bindet, verwendet [Xie01]. Der Zellkern wurde mit dem Nukleinsäure-Farbstoff TOTO-3(rot) gefärbt. Die Poly(A)⁺-RNA-Komplexe sind an ihren Ursprungsorten, d. h. im gesamten Nukleoplasma erkennbar. Sie konnten ebenfalls in den Interchromatin-Bereichen, in denen sie sich in das Zytoplasma bewegen (geringe TOTO-3-Intensität), und im Zytoplasma selbst, in dem sie als Vorlagen für die Proteinsynthese wirken, detektiert werden.

Von den isolierten mRNAs konnten Signale mit ausreichender Modulation gemessen werden; demzufolge sind Auswertungen zur Bestimmung der Größe bzw. axialen Ausdehnung möglich. Abbildung 5.12 zeigt als Beispiel die axialen Intensitätsverteilungen von zwei mRNA-Komplexen aus Abb. 5.11, die axialen Ausdehnungen betragen (a) 70 nm und (b) 92 nm. Die vollständige Auswertung aller Bilddaten ist zur Zeit noch nicht abgeschlossen; für die Größen der in Abb. 5.11 gezeigten „Transcription Factories“ wurde ein Wert von $(90,2 \pm 11,7)$ nm ermittelt (Auswertung: A. V. Failla).

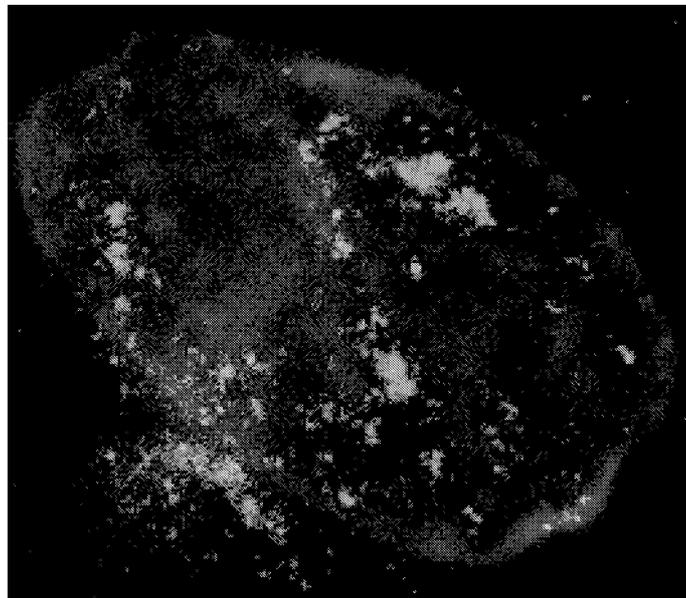


Abbildung 5.11: Bild aus einem der aufgenommenen Bildstapel von Gefrierschnitten menschlicher HeLa-Zellen. Die einzelnen Poly(A)⁺-RNA-Komplexe (grüne Punkte) konnten im Nukleoplasma, in den Interchromatin-Bereichen und im Zytoplasma detektiert werden. Der Zellkern wurde mit dem Farbstoff TOTO-3 (rot) gefärbt.

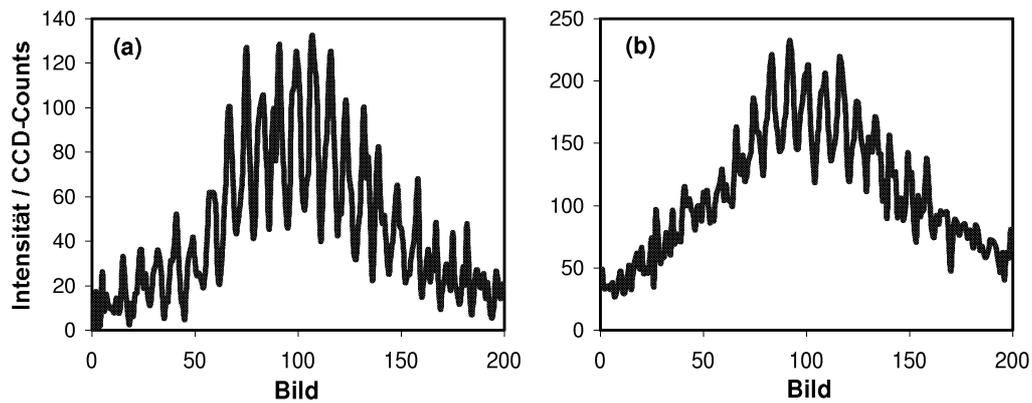


Abbildung 5.12: Axiale Intensitätsverteilungen von zwei mRNA-Komplexen aus Abb. 5.11. Zwischen den einzelnen Bildern wurde das Objekt um 20 nm verschoben. Für die Größen der Objekte wurden Werte von 70 nm (a) und 92 nm (b) gefunden.

Kapitel 6

Diskussion und Ausblick

Im ersten Abschnitt dieses letzten Kapitels werden die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zusammengefasst und die Verbesserungen im Vergleich zu [Schneider99a] aufgezeigt, gefolgt von einer Diskussion der Resultate im zweiten Abschnitt. Schließlich werden denkbare Modifikationen und Weiterentwicklungen des Experiments skizziert und weitere Perspektiven der Mikroskopie mit räumlich modulierter Anregung aufgezeigt.

6.1 Zusammenfassung

In dieser Arbeit werden der experimentelle Aufbau eines Fluoreszenzmikroskops mit räumlich modulierter Anregung bzw. eines Spatially Modulated Illumination (SMI) Microscope, Methoden zur Distanzmessung und hierzu durchgeführte Messungen und Auswertungen vorgestellt.

Vor der Durchführung der hier beschriebenen Experimente wurde das SMI-Mikroskop vollständig neu aufgebaut und im Vergleich zu [Schneider99a] in vielen Einzelheiten verbessert. Durch die Verwendung von zwei optischen Fasern zur Übertragung des Anregungslichts von den Lasern zum Versuchsaufbau konnten die Wellenfronten von zwei Wellenfeldern mit unterschiedlichen Wellenlängen erstmals parallel zueinander ausgerichtet werden. Die Längen der optischen Wege beider Teilstrahlen des Interferometers wurden angeglichen, um gegenseitige Verschiebungen der Wellenfronten beider Wellenfelder zu minimieren. Außerdem wurde durch den Einbau eines Korrekturkeils in den Detektionsstrahlengang der durch die Keilform des dichroitischen Strahlteilers verursachte Versatz zwischen den Strahlen des roten und des grünen Fluoreszenzlichts aufgehoben. Darüberhinaus wurden eine neue Farb-CCD-Kamera sowie neue piezoelektrische Verschiebetische in den Mikroskopaufbau integriert.

Da die neue CCD-Kamera an die in [Schneider99a] verwendete Software zur Steuerung des Mikroskops nicht angepasst werden konnte, wurde die **Steuer-Software** vollständig neu entwickelt (siehe Anhang). Hierbei wurde besonderer Wert auf eine einfache und komfortable Bedienbarkeit gelegt. Hervorzuheben ist, dass die gemessenen axialen Intensitätsverteilungen unmittelbar nach einer Messung angezeigt werden können.

Die Auswertung der Messdaten konnte durch eine verbesserte Anpassungsfunktion optimiert werden, und mit der schwerpunktbasierten Methode wurde ein neuer Algorithmus

zur axialen Distanzbestimmung entwickelt und angewendet.

Im Rahmen der durchgeführten Experimente wurden Distanzen zwischen den Fluoreszenz-Schwerpunkten von im Vergleich zur Lichtwellenlänge kleinen, „punktförmigen“ Objekten mit **gleicher spektraler Signatur** gemessen. Die Objekte besaßen laterale Abstände zwischen ca. $0,5 \mu\text{m}$ und $3 \mu\text{m}$, die axialen Distanzen lagen im Bereich zwischen null und einigen zehn Nanometern. Zur Abschätzung der Präzision der Distanzbestimmungen wurden die Messungen in Serien jeweils 10-mal hintereinander durchgeführt und aus den Einzelmessungen die Standard-Abweichung berechnet. Hierbei wurden in axialer Richtung Standard-Abweichungen von weniger als 7 nm, in einigen Messungen auch Standard-Abweichungen bis herunter zu 1 nm gefunden. Die Präzision der lateralen Distanzbestimmung lag zwischen 5 und 10 nm.

Im Gegensatz dazu ist die Genauigkeit der axialen Distanzbestimmung in konventionellen und konfokalen Laser-Raster-Mikroskopen um das Zwei- bis Dreifache gegenüber der Präzision der lateralen Distanzmessung *reduziert*. Folglich konnte die Genauigkeit der axialen Distanzmessung durch die axiale Modulation der Anregungsintensität unter ansonsten gleichen optischen Bedingungen (gleiche Anzahl detektierter Photonen) wesentlich erhöht werden.

Es konnte außerdem gezeigt werden, dass Messungen von axialen *Distanzen* mit einer Präzision von wenigen Nanometern tatsächlich *reproduzierbar* sind. Dies kann als Bestätigung von [Schneider99a] aufgefasst werden, wo bereits ähnliche Werte für die Präzision der *Lokalisation* von *einzelnen* Objekten angegeben wurden. Im Gegensatz zu den dort als Maß für die Präzision verwendeten Konfidenzintervallen, die mit einer modellbasierten Methode in Verbindung mit einem Levenberg-Marquardt-Algorithmus aus Einzelmessungen ermittelt wurden, sind in dieser Arbeit mehrere voneinander unabhängige Distanzmessungen an denselben Objekten durchgeführt worden.

Darüberhinaus wurden SPDM-Messungen an Objekten mit **verschiedenen spektralen Signaturen** und mit gegenseitigen lateralen Distanzen im Bereich von 100 nm durchgeführt. Da noch keine Kalibrationsmessungen zur Eichung der Phasenbeziehung beider Wellenfelder durchgeführt werden konnten, waren mit diesen Messungen nur Distanzmessungen an den detektierten Wellenzügen der Objekte möglich, und es konnten keine realen axialen Distanzen bestimmt werden. Die aus den Mehrfachmessungen berechneten Standard-Abweichungen erlaubten dennoch eine Abschätzung der axialen Distanzpräzision. Hierfür wurden Werte zwischen 1 und 13 nm ermittelt. Bei diesen Messungen waren die Standard-Abweichungen von Distanzen zwischen je zwei roten Objekten und zwischen Objekten mit verschiedener spektraler Signatur größer als die Standard-Abweichungen von Abständen zwischen je zwei grünen Objekten. Dieses Verhalten und eine vermutlich systematische Änderung der axialen Distanzen in den aufeinanderfolgenden Messungen der Serien lassen auf systematische Störungen der Wellenfronten schließen. Die Daten wurden mit Objekt-Rasterung und erstmals auch mit Phasen-Rasterung aufgenommen. Dabei wurde festgestellt, dass die mit Phasen-Rasterung gemessenen Distanzen kleinere Standard-Abweichungen aufweisen.

Da bei sämtlichen Distanzmessungen jeweils dieselben Objekte in Serien mehrfach hintereinander aufgenommen wurden, sind in den oben angegebenen Standard-Abweichungen bereits sämtliche störenden Effekte wie unterschiedliche mikro-optische Umgebungen der einzelnen Objekte, mechanische Instabilitäten, Wellenfrontverzerrungen, von der CCD-

Kamera zusätzlich verursachtes Rauschen sowie Effekte der Bilddaten-Auswertung enthalten. Insbesondere hat sich herausgestellt, dass sich die Objektpositionen zwar im Verlauf einer Serie um bis zu 100 nm änderten, diese Drifts jedoch alle bei einer Messung aufgenommen Objekte gleichermaßen betrafen. Hierin liegt eine Erklärung für die hohe Präzision der Messungen.

Die gemessenen Distanzwerte müssen allerdings nicht mit den wahren Distanzen zwischen den Testobjekten bzw. verwendeten Beads übereinstimmen. Die Ergebnisse der Distanzmessungen wurden z. B. durch inhomogene Farbstoffverteilungen innerhalb der Beads oder Störungen der Wellenfronten selbst beeinflusst. Außerdem waren die Wellenfronten in vielen Messungen vermutlich nicht ideal parallel zur Oberfläche des Objektträgers ausgerichtet. Aufgrund des daraus resultierenden Kippwinkels zwischen Objektträger und Wellenfronten wurden so axiale Distanzen gemessen, die nicht den tatsächlichen Abständen in Richtung der optischen Achse entsprachen. Dies gilt vor allem für die axialen Distanzen zwischen Beads mit gleicher spektraler Signatur, da deren laterale Distanzen im μm -Bereich lagen.

Um die **Einflüsse der Auswertung** auf die Ergebnisse der axialen Distanzmessungen genauer zu untersuchen, wurden einige Serien mit zwei unterschiedlichen modellbasierten Methoden und mit dem in dieser Arbeit entwickelten schwerpunktbasierten Verfahren ausgewertet. Die dabei gefundenen Resultate weichen in einigen Fällen um mehrere Nanometer voneinander ab.

Mittels Computersimulationen konnte ein Zusammenhang zwischen der Form der gemessenen axialen Intensitätsverteilung und der **Objektgröße** bzw. der Größe der Fluoreszenzverteilung eines Objekt hergestellt werden. Dies wurde anhand einiger Messungen an Testobjekten überprüft und bestätigt. Folglich können mit dem SMI-Mikroskop die Größen von Objekten, die kleiner als etwa die halbe Lichtwellenlänge und größer als ca. 40 nm sind, bestimmt werden (Zusammenarbeit mit A. V. Failla).

Darüberhinaus wurde die Eignung des SMI-Mikroskops für Messungen an **biologischen Proben** untersucht. Dazu wurden SPDM-Messungen an menschlichen Fibroblasten, menschlichen Tumorzellen, sog. HeLa-Zellen und menschlichen Knochenmarkzellen durchgeführt, und die Distanz zwischen den mit Oligonukleotiden fluoreszenzmarkierten Blöcken 1 und 3 von Chromosom 9 wurde gemessen. Die aufgenommenen axialen Intensitätsverteilungen besitzen eine für Hochpräzisions-Distanzmessungen ausreichende Modulation. Die Positionen der aufgenommen Wellenzüge konnten allerdings wegen der noch nicht möglichen Kalibration nicht zur Erhöhung der Distanzpräzision verwendet werden. Die aus den Einhüllenden der gemessenen Intensitätsverteilungen ermittelte Distanz stimmt dennoch mit Vergleichsmessungen an einem konfokalen Laser-Raster-Mikroskop überein. Des weiteren wurden mRNA-Komplexe in 100 – 150 nm dünnen Gefrierschnitten von menschlichen HeLa-Zellen aufgenommen. Dabei hat sich herausgestellt, dass die gemessenen axialen Intensitätsverteilungen auch hier eine ausreichende Modulation zeigen, die eine Größenbestimmung der mRNA-Komplexe erlauben. Die systematische Auswertung der Messdaten dauert zur Zeit noch an.

6.2 Diskussion

Vergleicht man die Standard-Abweichungen der axialen Distanzen, die aus den Messungen mit einer Wellenlänge erhalten wurden, mit denen, die bei den Experimenten mit zwei Wellenlängen gefunden wurden, fällt eine gewisse Inkonsistenz der Ergebnisse auf. In den Messungen mit einer Wellenlänge, die mit Objekt-Rasterung an Beads mit *roter* spektraler Signatur durchgeführt wurden, sind nämlich Standard-Abweichungen bis herunter zu ≈ 1 nm gefunden worden. Dagegen sind in den Messungen mit zwei Wellenlängen zwischen Beads mit roter Signatur meistens größere Standard-Abweichungen > 5 nm aufgetreten. Dies ist umso erstaunlicher, da vieles (z. B. verbesserte Photonenausbeute, siehe auch Abschnitt 3.2.5) darauf hindeutet, dass mit der Phasen-Rasterung, die bei den Messungen mit zwei Wellenlängen verwendet wurde, eine höhere Distanzpräzision erreicht werden kann als mit Objekt-Rasterung.

Eine gegenseitige Beeinflussung der Farbkanäle der CCD-Kamera scheidet als Ursache aus, da kein Übersprechen (Cross-Talk) beobachtet werden konnte. Es lassen sich nun zwei **Hypothesen** aufstellen, die durch zukünftige Experimente bestätigt bzw. widerlegt werden müssen:

Die erste Hypothese besagt, dass die statistisch verteilten Verzerrungen oder systematischen lateralen Modulationen der Wellenfronten (Abschnitt 5.3.3) bei den Messungen mit einer Wellenlänge tatsächlich schwächer ausgeprägt waren als bei den später durchgeführten Experimenten mit zwei Wellenlängen. Man kann diese Hypothese nicht ausschließen, da die Orientierung der Streifen nicht in allen Experimenten dieselbe war, sondern die Streifen ihre Richtung in Abhängigkeit von den Einstellungen der Spiegel und der Strahlteiler des Interferometers änderten. Es ist möglich, dass sich dabei die Amplitude der lateralen Modulation veränderte. An den Bilddaten lässt sich dies im Nachhinein nicht mehr feststellen, da die Bead-Konzentration auf dem Objektträger bei den Messungen zu gering war, um solche Streifen erkennen zu können.

In der zweiten Hypothese wird davon ausgegangen, dass bei den Auswertungen der Bilddaten, die mit einer Anregungswellenlänge aufgenommen wurden, systematische Fehler aufgetreten sind. Diese Hypothese wird vor allem durch die Ergebnisse von Abschnitt 5.4 gestützt, denn die dort vorgestellten Resultate der verschiedenen Algorithmen unterscheiden sich teilweise signifikant.

Hier wird eine **generelle Schwierigkeit** bei Hochpräzisions-Distanzmessungen mit Fluoreszenzanregung deutlich. Das bedeutet u. a., dass nicht immer ohne weiteres entschieden werden kann, ob beobachtete Standard-Abweichungen der Distanzen auf Fehler im Experiment selbst oder im zur Auswertung verwendeten Algorithmus zurückzuführen sind. Zur ersten Kategorie von Störfaktoren gehören z. B. Fluktuationen innerhalb der mikro-optischen Umgebung der Objekte oder mechanische Instabilitäten des Mikroskopaufbaus, zur zweiten Gruppe von Fehlerquellen zählen beispielsweise verschiedene Segmentierungsschwellen oder die Wahl ungeeigneter Startwerte in Anpassungs-Algorithmen.

Insgesamt jedoch wurde mit der räumlichen Modulation der Anregungsintensität eine **deutliche Verbesserung** der axialen Distanzpräzision erreicht. Die Standard-Abweichungen der axialen Distanzen zwischen Beads mit *grüner* spektraler Signatur, die bei den Messungen mit zwei Wellenlängen erhalten wurden, liegen ebenfalls zwischen 1 nm und 7 nm und bewegen sich damit im gleichen Rahmen wie die Standard-Abweichungen von Distanzen zwischen roten Beads. Mit dem derzeitigen Mikroskopaufbau können also, un-

abhängig von den oben aufgestellten Hypothesen, axiale Distanzen mit einer Präzision bzw. Standard-Abweichung von weniger als 7 nm reproduzierbar gemessen werden. Sollte die in Abschnitt 5.3.3 geäußerte Vermutung stimmen, dass die beobachteten systematischen Wellenfrontstörungen eine höhere Präzision der Distanzmessungen verhindern, sollte es jedoch möglich sein, die Genauigkeit auf ≈ 1 nm zu erhöhen, falls es gelingt, die Störungen zu beseitigen.

Bis jetzt deutet alles darauf hin, dass dies auch für axiale Distanzen zwischen Objekten mit unterschiedlicher spektraler Signatur gelten würde. Die dafür erforderliche Stabilität der Differenz der Phasendifferenzen bzw. der Phasenbeziehung zwischen dem roten und dem grünen Wellenfeld ist, zumindest im Rahmen der derzeitigen Präzision von ca. 9 nm für solche Distanzen, gegeben. Das heißt, es konnte bisher keine systematische, zeitliche Verschiebung der Wellenfronten beider Wellenfelder untereinander festgestellt werden.

Ein in diesem Zusammenhang noch nicht gelöstes Problem stellt die **Kalibrierung** bzw. Messung der Phasenbeziehung der beiden Wellenfelder dar. Die hierzu durchgeführten Experimente an mit mehreren Fluoreszenzfarbstoffen versehenen TetraSpeck-Beads konnten wegen des hohen Übersprechanteils vom grünen in den roten Kanal der CCD-Kamera nicht ausgewertet werden (Abschnitt 5.3). Selbst wenn die axialen Intensitätsverteilungen der beiden Farbstoffe ohne gegenseitige Beeinflussung hätten gemessen werden können, ist fraglich, ob die Resultate eine Bestimmung der Phasenbeziehung beider Wellenfelder mit der hier erforderlichen Präzision von 1 nm gestattet hätten. Der Grund für diese Unsicherheit liegt in den inhomogenen Farbstoffverteilungen in solchen Beads. Dadurch ist nicht gewährleistet, dass die Schwerpunkte der Verteilungen der verschiedenen Farbstoffe mit der entsprechenden Genauigkeit koinzidieren.

Als Alternative für TetraSpeck-Beads kommen unter Umständen sogenannte kolloidale Glaskugeln in Frage [vanBlaaderen95]. Diese Kugeln besitzen einen Außendurchmesser von ca. $0,5 \mu\text{m}$ und einen mit Fluoreszenzfarbstoffen gefüllten Hohlraum mit einem Durchmesser von typischerweise 100 nm. Eine Füllung des Hohlraums mit Farbstoffen unterschiedlicher Anregungs- und Emissionsspektren würde es erlauben, die Phasenbeziehung der Anregungsstrahlen mit der geforderten Genauigkeit zu messen. Für Kalibrationsmessungen könnten sich außerdem sogenannte „Nanocrystals“ bzw. „Quantum Dots“ aufgrund ihrer geringen Größe von wenigen Nanometern sehr gut eignen. Würde es dagegen gelingen, verschiedene Nanocrystals mit gleichen Anregungs-, jedoch unterschiedlichen Emissionsspektren [Banin98] als Farbstoffe einzusetzen, könnte auf eine Kalibration ganz verzichtet werden, da in diesem Fall zur Fluoreszenzanregung nur ein Wellenfeld nötig wäre.

Eine weitere, für Distanzmessungen an Objekten mit verschiedenen spektralen Signaturen durchzuführende Maßnahme sollte darin bestehen, die **Wellenfrontabstände** der beiden Wellenfelder anzugleichen. Dadurch wird die Ortsabhängigkeit der Abstände zwischen den Wellenfronten beider Wellenfelder beseitigt, und die gemessenen Wellenzugdistanzen hängen nicht mehr von den axialen *Positionen* der Objekte ab. (vgl. Abschnitt 3.2.2). Die hierfür erforderliche unabhängige Verkippung beider Anregungsstrahlen sollte aufgrund der jetzt angeglichenen optischen Weglängen der Teilstrahlen des Interferometers ohne größere Schwierigkeiten möglich sein. Da die axialen Objektdistanzen aus den Distanzen zwischen den detektierten Wellenzügen, d. h. aus dem Anteil der Anregungs-PSF bestimmt werden, muss die gewöhnliche, vom Detektions-Anteil stammende axiale chromatische Verschiebung des Objektivs jedoch nicht korrigiert werden (vgl. Abschnitt 3.2.2), sofern die zu messenden axialen Distanzen deutlich kleiner als die Wellenfrontabstände sind, da in

diesem Fall die Distanz zwischen den Maxima der Einhüllenden zur Aufhebung der durch die Modulation verursachten Vieldeutigkeit nicht benötigt wird.

Fasst man die Ergebnisse der Distanzmessungen in lateraler und axialer Richtung zusammen, so ergibt sich, dass mit dem SMI-Mikroskop Distanzmessungen zwischen fluoreszierenden, punktförmigen Objekten mit Standard-Abweichungen von unter 10 nm in *drei* Dimensionen möglich sind. Die Anzahl der zur Auswertung verwendeten Photonen lag bei den im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen in der Größenordnung von 10^5 . Computersimulationen der optischen Abbildung im SMI-Mikroskop deuten jedoch darauf hin, dass Standard-Abweichungen der axialen Distanzbestimmung von 1 nm schon bei Photonenzahlen von 10^4 möglich sind (A. V. Failla). Es sollte also möglich sein, bei gleichbleibender Präzision der Distanzmessungen die Anzahl der detektierten Photonen wesentlich zu reduzieren, d. h. man sollte die Aufnahmegeschwindigkeit deutlich erhöhen können. In zukünftigen Experimenten sollten darüberhinaus die Integrationszeit, die Anzahl der Bilder und die Schrittweite des piezoelektrischen Objekt- bzw. Spiegelverschiebetischs optimiert werden. Erste Computersimulationen hierzu haben ergeben, dass es besser ist, weniger Bilder mit einer höheren Integrationszeit aufzunehmen, da so der Anteil des Ausleserausens der CCD-Kamera am Gesamtrauschen reduziert wird [Wagner01].

Schließlich ist festzustellen, dass mit den in dieser Arbeit durchgeführten Verbesserungen des Mikroskop-Aufbaus und der neu entwickelten Steuer-Software die Voraussetzungen dafür geschaffen wurden, eine Nutzung des Systems auch anderen, mit den physikalischen Eigenschaften des Experiments nicht vertrauten Personen zu gestatten. Durch die Möglichkeit der Anzeige der gemessenen axialen Intensitätsverteilungen unmittelbar nach einer Messung wurde außerdem die praktische Anwendung des SMI-Mikroskops sehr erleichtert, da nun eine schnelle Beurteilung der aufgenommenen Daten möglich ist. Eine denkbare Erweiterung der Software besteht darin, die Algorithmen zur Distanz- bzw. Größenbestimmung direkt zu implementieren. Auf diese Weise könnte der zur Zeit getrennt laufende Prozess der Auswertung deutlich beschleunigt werden.

6.3 Perspektiven

Nachdem im letzten Abschnitt aus den Ergebnissen dieser Arbeit schon Konsequenzen für künftige Experimente abgeleitet wurden, folgen nun einige Perspektiven für weitergehende Versuche mit dem SMI-Mikroskop.

In einigen Experimenten mit biologischen Präparaten konnte ein befriedigendes Signal-zu-Rausch-Verhältnis erst durch Integrationszeiten von 2 s oder mehr erreicht werden. Die Ursache hierfür liegt in dem Farb-Mosaikfilter vor dem CCD-Chip der Kamera (Abb. 4.6 auf S. 68). Dieser reduziert die detektierte Fluoreszenzintensität erheblich, da Photonen, die nicht auf ein Pixel bzw. Filter mit einer zur Photonenenergie passenden spektralen Empfindlichkeit treffen, verloren sind. Auch Photonen, die auf die richtigen Pixel treffen, werden teilweise absorbiert. Ziel zukünftiger Umbauten sollte es daher sein, die Detektionseffizienz durch den Einbau mehrerer **Schwarz/Weiss-CCD-Kameras**, die keine Farb-Mosaikfilter besitzen, zu erhöhen. Die spektrale Trennung der Fluoreszenzintensitäten würde in diesem Fall z. B. durch dichroitische Strahlteiler erfolgen. Würde man hochempfindliche sogenannte „Back-illuminated“-Kameras verwenden, könnten sogar einzelne Fluoreszenzmoleküle detektiert werden [Koberling99, Mews00]. Alternativ zu einer

Konfiguration mit mehreren Kameras und dichroitischen Strahlteilern könnte man auch eine S/W-CCD-Kamera in Verbindung mit einem wellenlängenselektiven optischen Filter („Liquid Crystal Tunable Filter“) verwenden. Ein solches System hätte den Vorteil einer hohen Flexibilität bezüglich der Anwendbarkeit verschiedener Farbstoffe, allerdings würde durch den Filter erneut ein nicht unerheblicher Anteil der Fluoreszenzintensität absorbiert werden.

Eine weitere Limitation des derzeitigen Mikroskopaufbaus liegt in den **Wellenlängen** der zur Fluoreszenzanregung verwendeten Laser (647 nm & 488 nm). Dadurch können viele, in biologischen Experimenten häufig verwendete Farbstoffe nicht eingesetzt werden. Wünschenswert wären beispielsweise Wellenlängen in der Nähe von 400 nm zur Anregung von UV-Farbstoffen (z. B. AMCA-6-dUTP) oder 514 nm zur Anregung von YFP (Yellow Fluorescent Protein). Durch den Umbau des SMI-Mikroskops in einen Aufbau mit **horizontalem Objektträger** könnten außerdem Messungen an lebenden Zellen durchgeführt werden. Eine entsprechende Modifikation würde daher viele neue Untersuchungsmöglichkeiten eröffnen.

Um die Präzision der Abstandsmessungen in einer weiteren Raumrichtung zu erhöhen, könnte man die zu untersuchenden Proben auf einer runden Glasfaser anbringen. Durch Drehen der Faser wäre es möglich, den Verbindungsvektor von zwei in der x-z- bzw. y-z-Ebene befindlichen Objekten parallel zur optischen Achse der Objektive auszurichten, so dass die Objektdistanz mit hoher Präzision gemessen werden könnte. Dieses **Mikro-Axial-Tomographie** (MAT) genannte Verfahren wurde bereits in Verbindung mit Bildrekonstruktions-Algorithmen sowohl in konventionellen als auch in konfokalen Laser-Raster-Mikroskopen eingesetzt, um die effektive axiale Auflösung zu erhöhen [Brad192, Brad194, Brad196, Heintzmann99]. Sofern die Brechungsindizes von Glasfaser und Einbettungsmedium nicht perfekt angepasst sind, könnte sich hierbei allerdings eine systematische Verzerrung der Wellenfronten durch die Faser als problematisch erweisen. Darüberhinaus kann man die Intensität des Anregungslichtfelds im Mikroskop auch **lateral modulieren**, wie in Abschnitt 3.3 beschrieben. Damit könnte nicht nur die Distanzpräzision in beiden lateralen Richtungen, sondern zusammen mit geeigneten Aufnahme- und Auswerteverfahren auch die effektive Auflösung in allen drei Dimensionen erhöht werden [Krish96, Heintzmann98, Frohn01].

Die in der vorliegenden Arbeit vorgestellten Experimente wurden bei verhältnismäßig geringen Laserintensitäten ($\approx 100 \text{ W/cm}^2$) durchgeführt. Geht man zu höheren Intensitäten über, treten verstärkt **Zwei-Photonen-Effekte** (allgemein Mehr-Photonen-Effekte) auf. In der konfokalen Laser-Raster-Mikroskopie wird die Zwei-Photonen-Anregung bereits erfolgreich eingesetzt [Lindek95]. Sie bietet einige Vorteile, die im Rahmen eines derzeit in der Arbeitsgruppe „Angewandte Optik und Informationsverarbeitung“ im Aufbau befindlichen Experiments auch für die SMI-Mikroskopie nutzbar gemacht werden sollen (A. Schweitzer, H. Eipel & C. Cremer).

Da die Fluoreszenzintensität hier eine quadratische Abhängigkeit von der Anregungsintensität besitzt, können durch Zwei-Photonen-Anregung in Verbindung mit der räumlichen Modulation des Anregungslichtfelds einzelne Objektregionen mit einer größeren Selektivität zur Fluoreszenz angeregt werden, d. h. die *Tiefenselektion* der Anregung wird gesteigert. Außerdem lassen sich Anregungs- und Detektionslicht besser voneinander trennen, da die Wellenlänge der Fluoreszenz im Vergleich zur Anregungswellenlänge zu wesentlich kleineren Wellenlängen hin verschoben ist. Die zur Anregung verwendeten Wellenlängen

liegen dementsprechend im nahen Infrarot ($\approx 700 - 900$ nm). Aufgrund der kleineren Absorption von Wasser in diesem Wellenlängenbereich können die Anregungsstrahlen zudem besser in dicke Proben eindringen. Darüberhinaus ist es möglich, *zwei* Farbstoffe mit *einer* Wellenlänge anzuregen (einer über Ein-Photon-Anregung, der andere über Zwei-Photonen-Anregung). Um die benötigten hohen Anregungsintensitäten zu erreichen, erfolgt die Anregung gepulst; dies bietet zusätzlich die Möglichkeit, Farbstoffe aufgrund ihrer unterschiedlichen Fluoreszenzlebensdauern zu unterscheiden (Fluorescence Lifetime Imaging, FLIM) [Marriott91], womit sich eine Korrektur von chromatischen Verschiebungen erübrigt.

Die Realisierung des Experiments ist jedoch nicht einfach. Als Hauptschwierigkeit ist hier die exakte Justage des Interferometers zu nennen, denn der Unterschied in den optischen Weglängen beider Interferometerarme darf nicht größer als die Kohärenzlänge des gepulsten Anregungslichts von $10 - 30 \mu\text{m}$ sein. Zur Identifikation der Farbstoffe aufgrund ihrer Fluoreszenzlebensdauer müssen zudem mehr Photonen detektiert werden als bei herkömmlicher SPDM. Hierfür sind längere Messzeiten erforderlich, und das Ausbleichen der Proben wird verstärkt. Außerdem ist z. B. noch nicht geklärt, in wie weit die hohen Anregungsintensitäten zu einer Aufheizung der Proben führen.

Die Experimente in dieser Arbeit haben gezeigt, dass aus den aufgenommenen axialen Intensitätsverteilungen auch Informationen über die Abmessungen von Objekten mit Größen unterhalb der Wellenlänge erhalten werden können (Dissertation A. V. Failla, in Vorbereitung). Solche Messungen waren bisher nur mit aufwändigen elektronenmikroskopischen Verfahren möglich. Aus diesem Grund ergibt sich hieraus in Zukunft eventuell eine weitere interessante Anwendungsmöglichkeit der SMI-Mikroskopie. Man könnte auf diese Weise zusätzliche Kenntnisse über individuelle biologische Nanostrukturen in biologischen Proben erhalten. Es versteht sich hierbei von selbst, dass man umso detailliertere Informationen aus den Messungen erhält, je mehr unterschiedliche spektrale und/oder lebensdauerbasierte Signaturen zur Verfügung stehen bzw. vom Detektionssystem des Mikroskops voneinander getrennt werden können [CCremer99b]. Eine Anwendung von besonderem Interesse wäre die Untersuchung der dreidimensionalen Topologie von spezifischen Chromatin-Nanostrukturen und ihrer räumlichen Anordnungen relativ zu supramolekularen Komplexen z. B. für Transkription oder Reparatur in intakten menschlichen Zellkernen [TCremer93, TCremer00, TCremer01, Lamond98].

Anhang A

Montage des Mikroskopaufbaus

Dieser Abschnitt enthält einige Hinweise zum Aufbau und zur Justage des in Abb. 4.1 auf Seite 58, Abb. 4.2 auf Seite 60 und Abb. 4.5 auf Seite 66 schematisch dargestellten Mikroskopaufbaus. Abbildung A.1 zeigt eine Fotografie des Mikroskops. Der tatsächliche Aufbau entspricht, abgesehen von der Anordnung der Laserkollimatoren und des Piezo-Spiegelverschiebetischs, die sich aus platztechnischen Gründen auf der jeweils anderen Seite

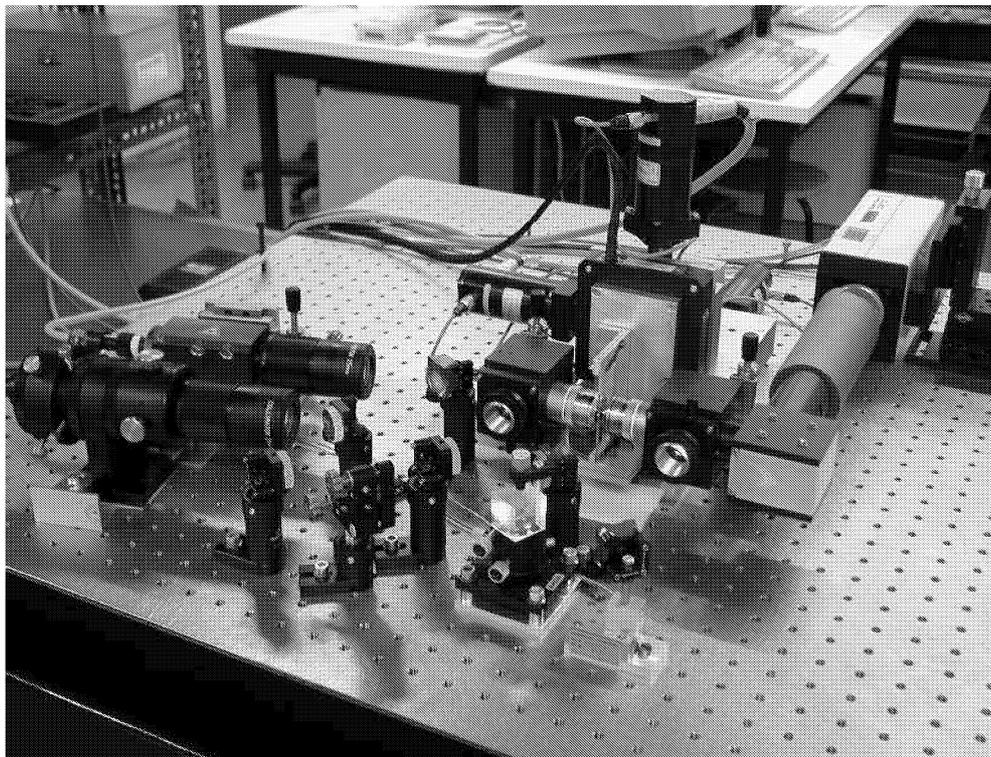


Abbildung A.1: Fotografie des Mikroskopaufbaus. Links sind die Laserkollimatoren erkennbar, in der Mitte befinden sich das Interferometer und der Objektverschiebetisch mit den Schrittmotoren. Auf der rechten Seite sind die Gehäuse des Detektions-Strahlengangs und die Farb-CCD-Kamera zu sehen.

des Interferometers befinden, den im Kapitel 4 in den Abbildungen 4.2 und 4.5 gezeigten Schemata.

A.1 Interferometer

Es empfiehlt sich, den Aufbau zunächst *ohne* die optischen Komponenten wie Spiegel, Linsen usw. auf dem Breadboard aufzubauen. Hierbei sollte berücksichtigt werden, dass

1. die Objektivgehäuse so auf den Linearverschiebetischen montiert sind, dass sie sich von der Arbeitsposition, in der die Objektivlinsen einen gegenseitigen Abstand von ca. 2 mm haben, um ca. 1 cm auseinander schieben lassen. Nur dann können die Objektive später ein- bzw. ausgebaut werden.
2. der Schrittmotor-betriebene Objektverschiebetisch (inkl. angebautem Piezo-Objektverschiebetisch und Objektträgerhalterung) über seinen *gesamten* Verfahrbereich hinweg, d. h. in jeder Richtung bis zu den jeweiligen Endabschaltern, verfahren werden kann, ohne z. B. an die Objektivgehäuse zu stoßen
3. keine der Komponenten des Aufbaus über die Außenkante des Breadboards ragt.

Insbesondere Punkt 2. sollte *sehr sorgfältig* beachtet werden, da die Schrittmotoren unter Umständen eine beachtliche Kraftwirkung entfalten können und bei Kollision im günstigsten Fall den Aufbau dejustieren, im schlimmsten Fall jedoch die Objektive oder den Piezo-Objektverschiebetisch beschädigen könnten. Außerdem sollten sämtliche Kanten der Objektivgehäuse parallel ausgerichtet sein, und die Verfahrrichtungen der drei Schrittmotoren müssen parallel bzw. senkrecht auf der optischen Achse der Objektive stehen.

Anschließend werden die Spiegel und Strahlteiler eingesetzt, und man justiert das Interferometer *ohne* die Linsen und Objektive, wobei man den *roten* Laser verwendet. Es ist darauf zu achten, dass die kollimierten und aufgeweiteten Laserstrahlen möglichst symmetrisch in die Öffnungen der Objektivgehäuse für die Objektive bzw. die Einfokussierlinsen ein- bzw. austreten. Alle Spiegel sollten das Licht unter einem Einfallswinkel von 45° reflektieren.

Im Folgenden wird zunächst nur ein Objektiv und die dazugehörige Einfokussierlinse eingebaut. Das Objektiv wird nun *von vorne* mit dem kollimierten Laserstrahl beleuchtet und der Drei-Achsen-Translationshalter mit der Einfokussierlinse so eingestellt, dass die Mitte des aus der Einfokussierlinse austretenden Strahls auf der Symmetrieachse der Öffnung des Objektivgehäuses liegt. Der Strahl sollte außerdem wieder auf das 50:50-Strahlteilerprisma treffen und muss kollimiert sein. Wie schon zur Einstellung der Kollimatoren an den Enden der optischen Fasern, verwendet man auch hier am besten eine „Shearing Plate“ [Dickey78, Melles99]. Die richtige Einstellung der Einfokussierlinse könnte auch ermittelt werden, indem man den Laserstrahl andersherum, d. h. von hinten durch die Einfokussierlinse in das Objektiv schickt. Die Kollimation des dann vorne aus dem Objektiv austretenden Strahls ließe sich aber nicht sehr zuverlässig überprüfen, da Beugungseffekte an der kleinen vorderen Objektivöffnung das Strahlprofil schon in einer Entfernung von einigen Zentimetern sehr stark verwaschen.

Anschließend schraubt man das Objektiv und den Drei-Achsen-Translationshalter mit der Einfokussierlinse von dem Objektivgehäuse ab, bringt das zweite Objektiv und die

zweite Einfokussierlinse am anderen Objektivgehäuse an und wiederholt die Prozedur. Dabei sollte darauf geachtet werden, dass der abmontierte Drei-Achsen-Translationshalter nicht wieder verstellt wird. Ist auch das zweite Objektiv inklusive Einfokussierlinse justiert, werden das erste Objektiv und die erste Einfokussierlinse wieder eingebaut. Die Spiegel sollten gegebenenfalls noch so nachgestellt werden, dass beide Teilstrahlen des Interferometers wieder auf das 50:50-Strahlteilerprisma treffen und auf der Rückseite des Prismas ein Interferenzmuster sichtbar wird.

Nun werden der *grüne bzw. blaue* Laserstrahl und der rote Strahl vor dem 50:50-Strahlteilerprisma mit dem Beam Combiner koaxial zur Deckung gebracht. Damit die Strahlen parallel verlaufen, sollte die Überdeckung an zwei mindestens 1 m voneinander entfernten Orten überprüft werden. Hierzu sollte man allerdings nur noch an den Feinverstellungsschrauben des Beam Combiners oder an einem der vorgelagerten Spiegel im „blauen“ Strahlengang drehen, um das Interferometer nicht wieder für den roten Strahl zu dejustieren. Man kann das Interferometer auch zuerst für den blauen Strahl justieren und anschließend den roten Strahl überlagern. Es ist jedoch einfacher andersherum vorzugehen, da der Beam Combiner das blaue Licht reflektiert und das rote transmittiert.

Die Grundjustage des Interferometers ist damit abgeschlossen. Zur weiteren Fein-Justage wird so vorgegangen, wie in Abschnitt 4.5.2 beschrieben.

A.2 Detektions-Strahlengang

Die Justage des Detektions-Strahlengangs gestaltet sich wesentlich einfacher. Es ist hier hauptsächlich darauf zu achten, dass die Lichtstrahlen durch die Zentren von Korrekturkeil, Tubuslinse und Sperrfilter verlaufen, um Aberrationen zu minimieren und eine Einengung des Gesichtsfelds zu vermeiden. Außerdem sollte natürlich der Abstand von 20 cm zwischen Tubuslinse und CCD-Chip eingehalten werden.

Zur Einstellung der richtigen Orientierung des Korrekturkeils verwendet man am besten Objekte, die gleichzeitig zwei Fluoreszenzfarbstoffe mit zu den Lasern passenden Anregungs- bzw. Emissionsspektren besitzen, z. B. TetraSpeck-Beads von Molecular Probes, und regt diese mit beiden Lasern gleichzeitig an. Ist der Keil richtig eingestellt, stimmen die Bilder der Beads bei gleichzeitiger Darstellung des roten und grünen Kanals in beiden Farben überein. Andernfalls sieht man jedes Bead doppelt, d. h. die verschiedenfarbigen Bilder sind gegenseitig versetzt, und das gesamte Monitorbild ist unscharf.

Dieses Verfahren ist natürlich zu einem gewissen Grad subjektiv. Das heißt, für eine laterale Präzisions-Distanzmessung zwischen verschiedenfarbigen Objekten wäre die Genauigkeit der Justage sicherlich unzureichend. Dies stellt hier jedoch kein zusätzliches Problem dar, denn zur Korrektur der chromatischen Verschiebungen müssen ohnehin Kalibrationsmessungen an Objekten mit koinzidierenden Farbstoffverteilungen durchgeführt werden.

Anhang B

Steuer-Software

Die im Rahmen dieser Dissertation durchgeführten Programmierarbeiten zur Ansteuerung des SMI-Mikroskops nahmen ca. 1 1/2 Jahre in Anspruch. Dies soll in diesem Teil des Anhangs mit der Vorstellung der Steuer-Software dokumentiert werden. Dabei wird zuerst kurz auf das Konzept des Programms eingegangen; anschließend werden die wichtigsten Dialogfelder vorgestellt und ihre Funktionsweise bzw. Bedienung erläutert.

B.1 Anforderungen und Konzept

Da die Software routinemäßig eingesetzt wird, ist das Kriterium der *Stabilität* und *Zuverlässigkeit* von großer Bedeutung. Daneben sind als Anforderungen an das Programm zu stellen:

- Die Bilddaten müssen gut sichtbar und mit ausreichender Geschwindigkeit, d. h. hoher Bildwiederholfrequenz dargestellt werden können.
- Die grafische Benutzeroberfläche soll leicht und komfortabel bedienbar sein.
- Neue Hardware-Komponenten wie z. B. eine neue Kamera müssen ohne großen Programmieraufwand einzubinden sein.
- Um das Programm leicht warten zu können, sollte der Quellcode möglichst modular aufgebaut sein.

Als Plattform für die Programmierarbeiten wurde aufgrund seiner hervorragenden Betriebssicherheit und Stabilität sowie hohen Verbreitung im professionellen Bereich das Betriebssystem **Windows NT**, Version 4.0 (heute Windows 2000) gewählt. Zum Schreiben der Steuer-Software ist die Entwicklungsumgebung von „Visual C++“ (Version 6.0) von Microsoft eingesetzt worden. Darin sind außer einem leistungsfähigen C++-Compiler eine Vielzahl vordefinierter Klassen und Bibliotheken enthalten, von denen die *Microsoft Foundation Classes* (MFC) besonders hervorzuheben sind. Diese wurden benutzt, um z. B. Dialogfelder zu erstellen, Mausaktionen des Benutzers zu koordinieren oder Dateioperationen durchzuführen.

Um mit Visual C++ eine **Windows-Anwendung** zu erstellen, lässt man sich von der Entwicklungsumgebung zunächst automatisch ein *Quellcode-Gerüst* generieren. Daraus kann durch *Compilieren* ein ausführbares Programm erzeugt werden, das bereits die

typischen Merkmale einer Windows-Anwendung wie z. B. eine obere Menüleiste mit den Menüpunkten „Datei“, „Bearbeiten“, „Ansicht“, „?“ und die entsprechenden Menüeinträge „Neu“, „Öffnen...“ usw. enthält. Mit diesen Menüeinträgen sind jedoch noch keine Aktionen wie z. B. Speichervorgänge oder das Erscheinen von Dialogfeldern verknüpft. Solche Funktionen muss der Programmierer hinzufügen, indem er z. B. mit Hilfe des *Resourcen-Editors* neue Menüpunkte und Dialogfelder erstellt. Außerdem müssen weitere Objekte und Methoden in den Quellcode eingefügt werden, z. B. zur Darstellung der Programmdateien auf dem Hauptansichtsfenster der Anwendung.

Der Quellcode besitzt eine **Objektorientierte Struktur**, die der sogenannten **Dokument-/Ansicht-Architektur** folgt, wie in Abbildung B.1 schematisch am Beispiel der Steuer-Software für das SMI-Mikroskop gezeigt ist. Der Programmcode setzt sich aus vier Hauptobjekten zusammen: einem Anwendungsobjekt (Klasse CWinApp), einem Objekt für das Rahmenfenster (CFrameView), dem Dokumentobjekt (CDocument) und dem Ansichtsobjekt (CScrollView). Dabei kann, je nach Komplexität der Anwendung, jedes dieser Objekte wieder mehrere Unterobjekte enthalten.

Eines der wichtigsten Merkmale der Dokument-/Ansicht-Architektur besteht in der strikten Trennung von der im Dokumentobjekt durchgeführten *Verwaltung* der Daten und der durch das Ansichtsobjekt vermittelten *Darstellung* der Daten. Wenn z. B. Text im Hauptansichtsfenster eines Textverarbeitungsprogramms mit verschiedenen *Vergrößerungen* angezeigt werden kann, liegt den unterschiedlichen Darstellungen die gleiche Buchsta-

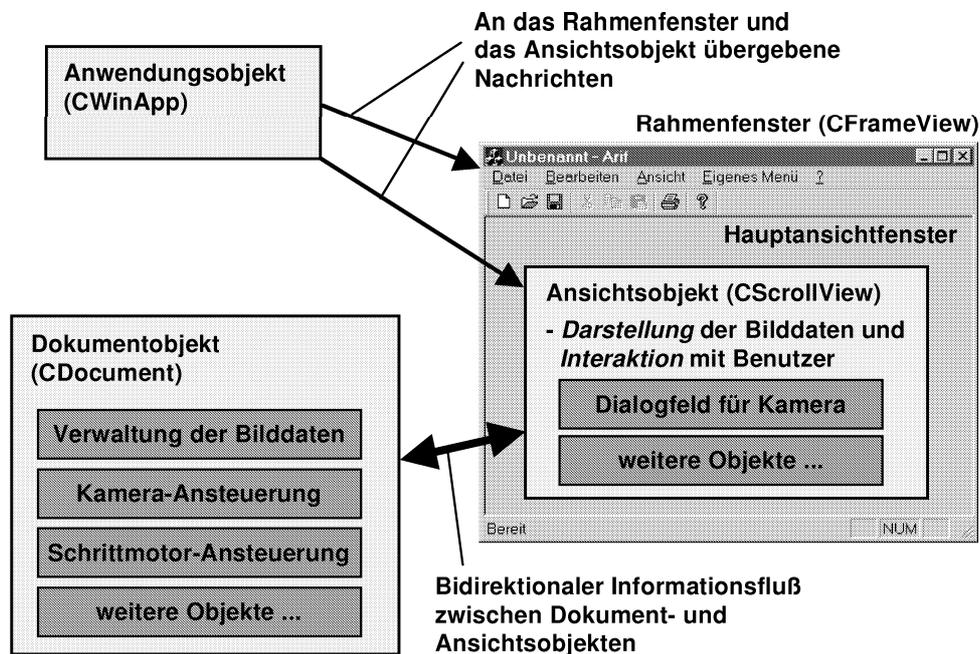


Abbildung B.1: Schematische Ansicht der Dokument-/Ansicht-Architektur einer Windows-Anwendung am Beispiel der Steuer-Software für das SMI-Mikroskop, erstellt unter Microsoft Visual C++. Die Verwaltung der Daten ist streng von der Anzeige der Daten und der Interaktion mit dem Benutzer getrennt.

benfolge und die gleiche Schriftgröße, d. h. derselbe Dokumentinhalt zugrunde, und nur die Größen der Anzeigen auf dem Bildschirm sind unterschiedlich. Der Dokumentinhalt ändert sich dagegen dann, wenn die Größe der Schriftart selbst geändert wird (betrifft natürlich auch wieder das Ansichtobjekt, da eine größere Schriftart auch größer angezeigt werden muss). Das Ansichtobjekt regelt außerdem die *Interaktion* mit dem Benutzer, indem es die in Form von Tastatur- oder Mauseingaben getätigten Eingaben verarbeitet. Das bedeutet im Beispiel oben: Möchte der Benutzer die Schriftgröße im Dokument ändern, gibt er eine entsprechende Zahl in das Textfeld eines Dialogfensters ein. Diese Eingabe löst im Ansichtobjekt zunächst ein *Ereignis* aus, d. h. es erfolgt ein Funktionsaufruf im Ansichtobjekt mit der Übermittlung der Zahl („Eingegeben(Zahl)“). Anschließend wird von dieser Funktion eine Funktion des Dokuments zur Änderung der Schriftgröße aufgerufen („NeueSchriftgröße(Zahl)“), man sagt auch: Das Dokument erhält eine *Nachricht*. Tritt ein Fehler auf, weil z. B. die maximale Schriftgröße nicht überschritten werden darf, kann das Dokumentobjekt auch das Ansichtobjekt benachrichtigen und ihm mitteilen, dass eine entsprechende Fehlermeldung angezeigt werden soll.

Auf die Struktur des Programmcodes der Steuer-Software „SMIProject“ übertragen bedeutet dies, dass alle Objekte für die Verwaltung der Dialogfelder (Dialogfeldobjekte) sowie das Objekt CViewOp, das die Anzeige der Bilddaten und die Mauseingaben auf dem Hauptansichtfenster (z. B. zum Setzen der Kamera-ROI) durchführt bzw. koordiniert, in das Ansichtobjekt eingebettet sind (vgl. Abb. B.1). Im Dokumentobjekt CDocument sind dagegen die jeweils eigenständigen Objekte zur Ansteuerung von CCD-Kamera, Schrittmotoren und Piezo-Tischen, zur Verwaltung der Bilddaten sowie u. a. zur Speicherung der manuellen Protokolldatei-Einträge (s. u.) untergebracht. Der modulare Aufbau des Mikroskops spiegelt sich also im Quellcode des Programms wieder, so dass die Anwendung z. B. an eine neue Kamera leicht angepasst werden kann.

Eine Besonderheit der Steuer-Software besteht darin, dass insgesamt bis zu 9 sogenannte **nicht-modale** Dialogfenster *gleichzeitig* dargestellt werden können, während jedes der Fenster in der Lage ist, auf Eingaben des Benutzers zu reagieren. Es handelt sich hierbei um die Dialogfelder für Sequenz-Aufnahme, Schieberegler für Sequenz-Anzeige, Protokolldatei, Bilddatendarstellung und Kamera-Ansteuerung, Histogramm, Profile, Statistik sowie Schrittmotor- und Piezo-Steuerung.

Im Gegensatz zu *modalen* Dialogfenstern, die erst geschlossen werden müssen (meist durch „OK“ oder „Abbrechen“), bevor man bei der Bedienung des Programms an anderer Stelle fortfahren kann, erlauben *nicht-modale* Dialogfenster eine wesentlich *komfortablere* Bedienung. Es ist beispielsweise nicht notwendig, das Dialogfeld für die Kamera-Ansteuerung zu schließen, um eine der Einstellungen im Dialogfeld „Sequenz“ zu ändern oder eine Sequenz-Aufnahme zu starten.

Der hierfür erforderliche programmiertechnische Aufwand war teilweise jedoch beträchtlich, da die Inhalte einiger Dialogfelder an den Inhalt des Hauptansichtfensters und an Einstellungen in anderen Dialogfeldern gekoppelt sind und daher gegebenenfalls wechselseitig *aktualisiert* werden müssen. Ändert man beispielsweise die Einstellungen für „Gain“ oder „Thresh“ im Dialogfeld „Kamera/Darstellung“, werden sowohl die entsprechenden Marker im Dialogfeld „Histogramm“ als auch das Bild im Hauptansichtfenster der Anwendung neu dargestellt.

Weitere Informationen zur Entwicklungsumgebung und zu Visual C++ selbst finden sich außer in der entsprechenden Dokumentation von Microsoft z.B. in [Chapman98, Kruglinski98] oder [Pallmann99].

B.2 Installation, Start und Initialisierung

Die Anwendung wurde so erstellt, dass eine langwierige Installationsprozedur nicht erforderlich ist. Benötigt werden jedoch das Verzeichnis „C:\Programme\SMI“ sowie die darin enthaltenen Dateien

- „senntcam.dll“, beinhaltet die Treiber-DLL für die CCD-Kamera,
- „StepInit.txt“ mit den Initialisierungskommandos für die Schrittmotorsteuerung,
- „StepArea.dat“ zum Speichern des z-Verfahrbereichs der Schrittmotoren und
- „PiezoInit.txt“ mit den Initialisierungskommandos für die Piezo-Steuerung.

Es wird empfohlen, auch die Programmdatei „SMIProjectV33.exe“, die die Anwendung selbst enthält, in dasselbe Verzeichnis zu kopieren. Das Programm liest beim Start außerdem die Datei „H:\SMI\SMIFrame.dat“¹ mit den bei der letzten Ausführung des Programms aktuellen Koordinaten des Rahmenfensters auf dem Desktop ein und positioniert dieses entsprechend.

Fehlen die Dateien „StepInit.txt“ oder „PiezoInit.txt“, erscheint eine Fehlermeldung, und die Schrittmotoren oder die Piezo-Steuerung können nicht angesprochen werden. Ist die Datei „StepArea.dat“ nicht vorhanden, kann das z-Intervall der Schrittmotoren nicht automatisch gesetzt werden. Näheres hierzu in Abschnitt B.7. Ist eine oder sind alle der Hardware-Komponenten (CCD-Kamera, Schrittmotoren, Piezo-Aktuatoren) defekt oder nicht vorhanden, ist die Anwendung dennoch lauffähig, so dass Bilddaten geladen und begutachtet werden können. Die Datei „senntcam.dll“ muss dagegen in jedem Fall vorhanden sein.

Nach dem Start des Programms werden zunächst die Schrittmotor- und die Piezo-Steuerung initialisiert, und es erscheint das in Abbildung B.2 gezeigte Dialogfeld, in

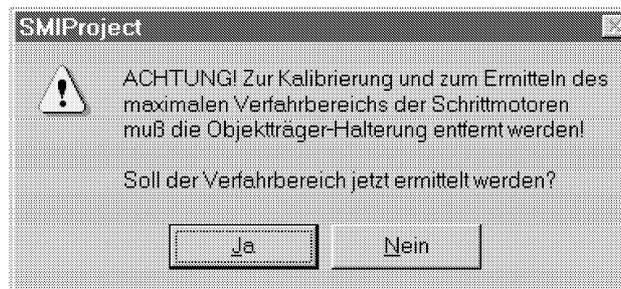


Abbildung B.2: Nach dem Programmstart wird der Benutzer gefragt, ob die Kalibrierung durchgeführt und der Verfahrbereich der Schrittmotoren ermittelt werden soll.

¹H: Netzlaufwerk

dem der Benutzer gefragt wird, ob die Kalibrierung erfolgen, d.h. der Verfahrbereich der Schrittmotoren ermittelt werden soll. Falls dieser mit „Ja“ antwortet, werden alle drei Motoren jeweils zuerst an die unteren und anschließend an die oberen Endabschalter der Lineartische des Objektverschiebetischs bewegt, um den Bezugspunkt des Koordinatensystems (= untere Endabschalter) und den gesamten Verfahrbereich der Motoren zu ermitteln. Da bei diesem, ca. 1 Minute dauernden Vorgang der aufgesetzte Objektträgerhalter mit den Objektiven kollidieren würde, muss dieser vorher **unbedingt** von der Magnethalterplatte des Objektverschiebetischs **entfernt** werden. Nachdem die oberen Bezugspunkte festgestellt sind, wird der Verschiebetisch wieder automatisch aus dem Zwischenraum der Objektiv heraus- und in die Mitte des *z-Intervalls* gefahren, wobei die aus der Datei „StepArea.dat“ geladenen Koordinaten verwendet werden, siehe hierzu auch Abschnitt B.7. Während des gesamten Vorgangs wird ein weiteres Dialogfeld mit einem entsprechenden Hinweistext sowie dem Button „Abbrechen“ angezeigt, mit dem die Schrittmotoren jederzeit gestoppt werden können. Nach einem solchen Abbruch, oder wenn die Prozedur gar nicht durchgeführt wurde, kann kein *z-Intervall* gesetzt werden, die

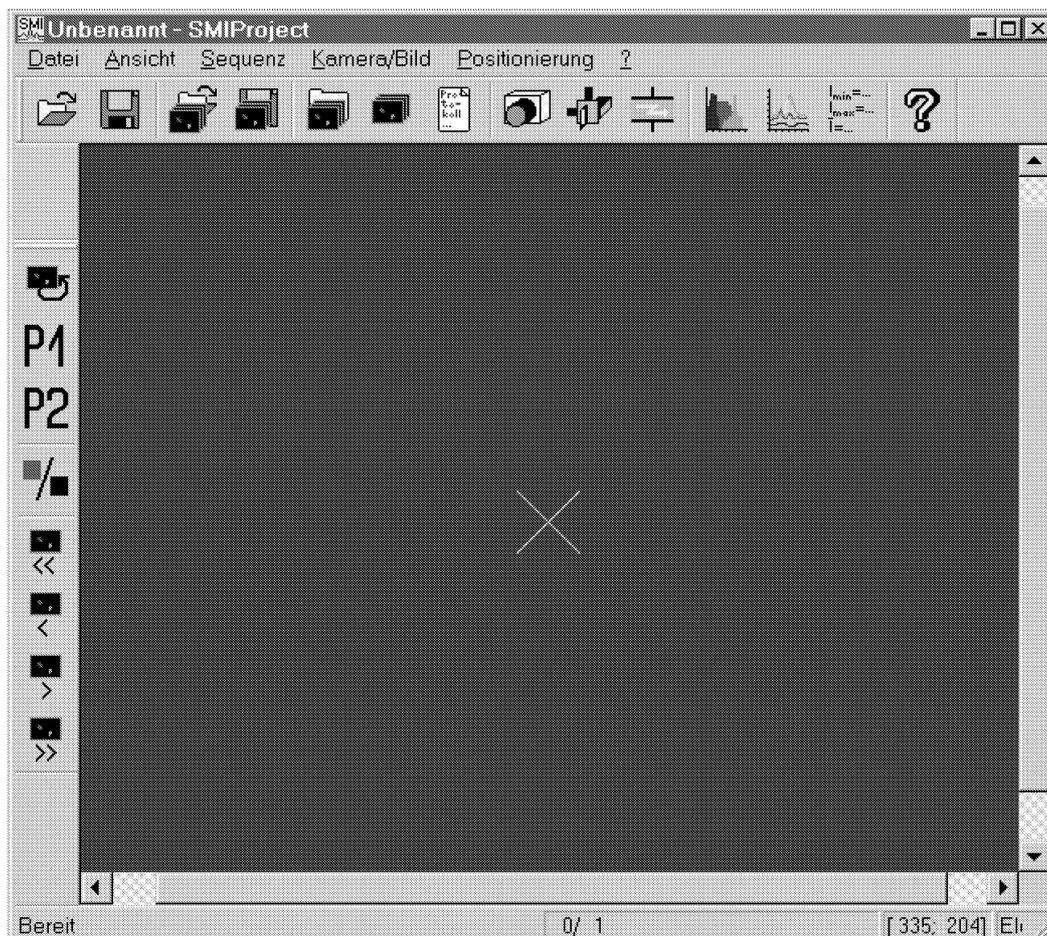


Abbildung B.3: Rahmenfenster mit leerem Hauptansichtfenster, wie es nach dem Start der Anwendung erscheint. Über die Werkzeugleisten an der linken und oberen Seite können häufig verwendete Funktionen des Hauptmenüs schnell aufgerufen werden.

Schrittmotoren sind aber trotzdem ansteuerbar.

Anschließend erscheint das Rahmenfenster der Anwendung mit leerem Hauptansichtfenster, wie in Abbildung B.3 gezeigt. Es enthält zwei Werkzeugleisten auf der linken und oberen Seite, mit denen man häufig verwendete Funktionen des Hauptmenüs unter der Titelleiste wie z. B. das Speichern oder Laden der Bilddaten schnell ausführen kann. In der Statusleiste unten werden die Nummer des gerade angezeigten Bildes und die Anzahl der insgesamt im RAM-Speicher befindlichen Bilder („0/ 1“) sowie die Koordinaten des Mauszeigers angezeigt („[335; 204“).

B.3 Menü „Datei“

Abbildung B.4 zeigt das Hauptmenü mit dem heruntergeklappten Untermenü „Datei“ mit Funktionen zum Laden und Speichern der Programm-Parameter und Bilddaten.

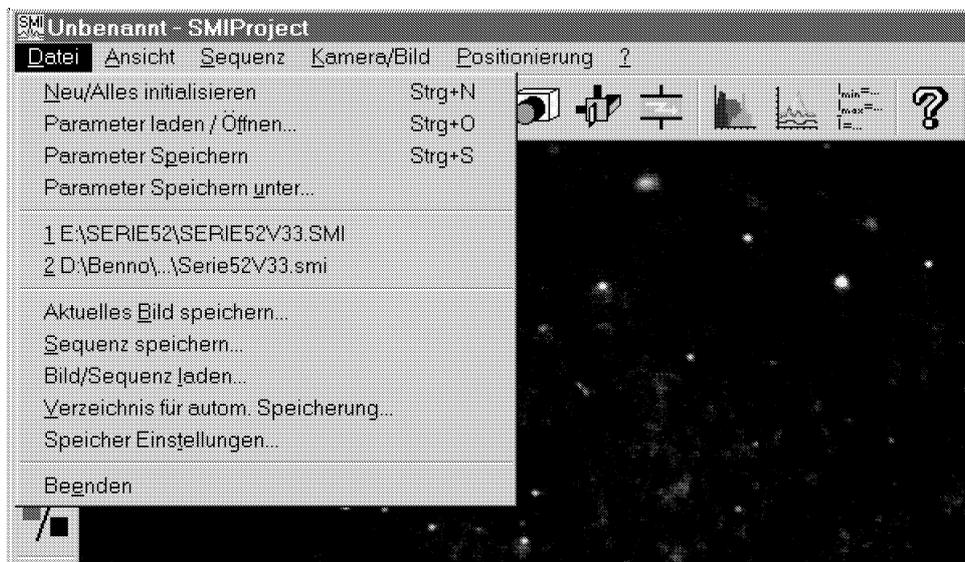


Abbildung B.4: Menü „Datei“ zum Laden und Speichern der Programm-Parameter und Bilddaten.

B.3.1 Laden und Speichern der Programm-Parameter

Sämtliche Parameter der Anwendung (außer dem z-Intervall der Schrittmotoren) wie z. B. die Einstellungen der Kamera oder der Schrittmotorsteuerung sowie die Positionen der nicht-modalen Dialogfelder auf dem Desktop können in einer .smi-Datei gespeichert bzw. daraus geladen werden. Dadurch ist es möglich, z. B. nach dem Programmstart die bei einer früheren Messung verwendeten Einstellungen schnell wieder zu setzen, und eine zeitraubende manuelle Konfiguration der Dialogfelder entfällt.

Diese Aktionen werden durch die ersten sechs Menüpunkte des Menüs „Datei“ durchgeführt. Sie entsprechen in ihren Funktionen dem aus den meisten Windows-Anwendungen bekannten Schema für das Öffnen bzw. Speichern von Dateien. Der Menüpunkt „Neu/Alles

initialieren“ setzt jedoch nicht nur alle Parameter auf bestimmte voreingestellte Werte, sondern initialisiert darüberhinaus CCD-Kamera, Schrittmotorsteuerung und Piezo-Steuerung.

B.3.2 Laden und Speichern der Bilddaten

Zum Speichern der Bilddaten stehen vier verschiedene Dateiformate zur Verfügung: B16-, KDF-, Raw- und BMP-Format. Im B16-Format gespeicherte Bilder können von der Steuer-Software der CCD-Kamera gelesen werden, die vom Hersteller mitgeliefert wurde. Dieses Format wird normalerweise nicht benötigt. Am komfortabelsten ist das Speichern der Bilddaten im KDF-Format (Khoros Data Format, siehe auch Anhang C), da dort alle Bilder einer Sequenz in einer einzigen Datei abgelegt werden und nicht wie bei den anderen Formaten jedes (2D-)Bild für sich abgespeichert wird. Dies vereinfacht vor allem das spätere Laden der Daten, das auch mit dem B16-Format möglich ist. Verwendet man das Raw-Format, werden die Bilddaten ohne einen „Header“ abgespeichert, der Informationen wie z. B. Breite und Höhe der Bilder enthält. Mit diesem Format kann man die Bilddaten auch anderen Programmen zugänglich machen, die keines der oben genannten Formate verstehen (aber Raw-Daten importieren können).

Außerdem ist es möglich, die Bilddaten im Windows-Bitmap(BMP)-Format abzuspeichern, jedoch mit einem wesentlichen Unterschied zu den anderen Formaten: Während dort die 12-Bit-Rohdaten genauso gespeichert werden, wie sie im RAM-Speicher abgelegt sind (und von der CCD-Kamera in den PC übertragen wurden), wird im BMP-Format das im Hauptansichtfenster angezeigte Bild gespeichert, dessen Intensitäten nur mit 8 Bit digitalisiert sind. Die Werte der 8-Bit-Daten hängen von den Einstellungen im Dialogfeld „Kamera/Darstellung“ ab, wie in Abschnitt B.6.1 noch erläutert wird. Dieses Format eignet sich bevorzugt zur Dokumentation der Aufnahmen.

Der Menüpunkt „Verzeichnis für autom. Speicherung...“ ruft ein Dialogfeld zur Dateiauswahl auf, in dem ein Verzeichnisname für die automatische Sequenz-Speicherung, die während einer mehrfachen Sequenz-Aufnahme erfolgt, angegeben werden kann (siehe auch Dialogfeld „Sequenz“).

Mit dem Menüpunkt „Speicher Einstellungen“ wird das in Abbildung B.5 gezeigte Dialogfeld dargestellt. Hier kann festgelegt werden, welche der Farbkanäle (Rot, Grün1, Grün2, Blau) beim Sichern der Bilddaten abgespeichert werden sollen. Ein Häkchen z. B. im Optionsfeld für Rot bewirkt, dass nur die „roten“ Pixel der CCD-Kamera verwendet werden, vgl. Abb. 4.6 auf Seite 68. Außerdem kann die automatische Speicherung der Protokolldatei (de-)aktiviert werden (Abschnitt B.5). Der Button unten rechts entspricht dem Menüpunkt „Verzeichnis für autom. Speicherung...“ des Menüs „Datei“.

Mit „Beenden“ wird die Anwendung geschlossen. Falls die Programm-Parameter nach dem letzten Speichern verändert wurden, erscheint vor dem Schließen ein Dialogfeld und fragt nach, ob das Speichern nachgeholt oder die Anwendung doch nicht geschlossen werden soll.

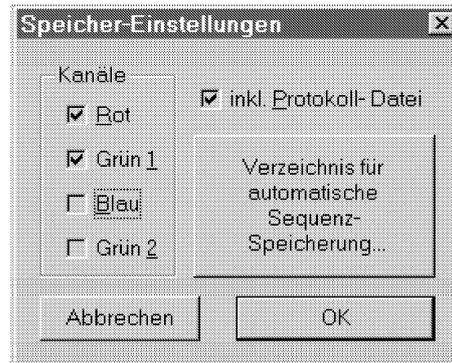


Abbildung B.5: Dialogfeld zum Ändern der Speicher-Einstellungen (modales Dialogfeld). Hier kann festgelegt werden, welche der Farbkanäle beim Speichern der Bilddaten abgespeichert werden sollen und ob dabei zusätzlich eine Protokoll-Datei erstellt werden soll.

B.4 Menü „Ansicht“

Abbildung B.6 zeigt das Menü „Ansicht“, mit dem die Größe des auf dem Hauptansichtsfenster angezeigten Bildes geändert und der *Modus* der Anwendung umgeschaltet werden kann. Außerdem können die Werkzeugleisten und die Statusleiste am unteren Rand des Rahmenfensters ein- und ausgeblendet werden.



Abbildung B.6: Menü „Ansicht“. Hier kann die Bildgröße auf dem Hauptansichtsfenster geändert oder in einen anderen Programmmodus umgeschaltet werden. Außerdem kann man die Werkzeugleisten und die Statusleiste ein- bzw. ausblenden.

Die Prozentangaben in den oberen drei Menüpunkten geben die Größe (oder den „Zoom“-Faktor) des auf dem Hauptansichtsfenster angezeigten Bildes relativ zu den Gruppen aus je 2×2 Pixeln auf dem CCD-Chip der Kamera an, wie in Abb. 4.6 auf Seite 68 gezeigt. „100%“ bedeutet, dass je *ein* Monitorpixel einer 2×2 -Gruppe von CCD-Pixeln

zugeordnet wird. Diese Zusammenfassung ist sinnvoll, da jedes einzelne Pixel der Kamera nur eine Farbe detektieren kann, die Pixel auf dem Monitor aber alle drei Farbwerte für Rot, Grün, Blau gleichzeitig anzeigen. Stellt man „200%“ bzw. „400%“ ein, stellen jeweils 2×2 bzw. 4×4 Pixel die gleichen Farbwerte dar.

Mit den Menüpunkten „Kamera-Modus“ bzw. „Anzeige-Modus“ wird die Reaktion der Anwendung auf Mausektionen auf dem Hauptansichtfenster gesteuert. Klickt man im **Kamera-Modus** mit der linken Maustaste auf das Hauptansichtfenster, wird an der Mauszeigerposition die ROI (Region Of Interest) der CCD-Kamera in ihrer aktuellen Größe gesetzt und im Dialogfeld „Kamera/Darstellung“ dargestellt, siehe auch Abschnitt B.6.1. Klickt man dagegen im **Anzeige-Modus** auf das Bild im Hauptansichtfenster, wird eine ROI oder eine Linie entsprechend dem Status der Dialogfelder „Profile“ oder „Statistik“ angezeigt und eines dieser Dialogfelder aktualisiert. Im Kamera-Modus wird immer nur das zuletzt aufgenommene Kamerabild im RAM-Speicher aufbewahrt und angezeigt; im Anzeige-Modus kann sich auch eine vollständige Bild-Sequenz im Speicher befinden. Ein weiterer Unterschied besteht darin, dass im Kamera-Modus die in der Statusleiste angezeigten Koordinaten des Mauszeigers CCD-Koordinaten entsprechen und im Anzeige-Modus die Mauszeigerposition bezüglich der linken oberen Ecke des angezeigten Bilds dargestellt wird.

Die Menüpunkte „Kamera-Modus“ bzw. „Anzeige-Modus“ werden jedoch meistens nicht benötigt, da der Anzeige-Modus beim Aufruf der entsprechenden Dialogfelder automatisch eingestellt wird und der Kamera-Modus auch vom Dialogfeld „Kamera/Darstellung“ aus aktiviert werden kann (s. u.).

B.5 Menü „Sequenz“

Abbildung B.7 zeigt das Untermenü für Sequenz-Aktionen. Mit den beiden ersten Menü-



Abbildung B.7: Menü „Sequenz“ zum Einstellen der Parameter für die Sequenz-Aufnahme. Alle Menüpunkte außer „Schieberegler...“ sind auch über die Werkzeugleisten erreichbar.

punkten kann das Dialogfeld „Sequenz“ aufgerufen bzw. eine Sequenz-Aufnahme gestartet werden. Die folgenden fünf Menüpunkte dienen der Navigation durch eine aufgenommene Bild-Sequenz bzw. einen Bildstapel: „<< Bild“/„>> Bild“ bedeutet 10 Bilder zurück/vor, beim Klick auf „< Bild“/„> Bild“ wird das vorhergehende/nächste Bild angezeigt. Um viele Bilder schnell zu überspringen, kann zusätzlich ein nicht-modales Dialogfeld mit einem Schieberegler aufgerufen werden. Sämtliche Menüpunkte außer „Schieberegler...“ sind auch über die Werkzeuggestreife erreichbar.

B.5.1 Dialogfeld „Sequenz“

Über das in Abbildung B.8 dargestellte nicht-modale Dialogfeld „Sequenz“ werden die Parameter für eine Sequenz-Aufnahme eingestellt. Im Auswahlfeld „Scan-Modus“ wird festgelegt, ob das Objekt oder der Spiegel („Phase“) während der Aufnahme verschoben werden soll. Unter „Intervall“ stellt man die Grenzen des Verfahrbereichs des bei der Aufnahme bewegten Piezo-Aktuators ein:

- Ist das Auswahlfeld „aktuelle Pos. = Mitte“ aktiviert, werden die Intervallgrenzen z_{min} und z_{max} folgendermaßen berechnet:

$$z_{min} = z_0 - N/2 \cdot dz \quad \text{und} \quad z_{max} = z_0 + N/2 \cdot dz. \quad (\text{B.1})$$

Hierbei ist z_0 die aktuelle Position, N gibt die Anzahl der aufzunehmenden Bilder an, und dz ist die Schrittweite.

- Bei der Einstellung „[Pos. 1; Pos. 2]“ können die Intervallgrenzen beliebig gesetzt werden, indem man den entsprechenden Piezo-Verschiebetisch manuell an die gewünschte Anfangs- bzw. Endposition bewegt (Dialogfeld „Piezo-Ansteuerung“) und diese Positionen durch Klick auf die Buttons „Pos. 1“ bzw. „Pos. 2“ speichert. Die Anzahl der Bilder wird in diesem Fall automatisch berechnet.

In dem Kombinationsfeld „Sequenzen“ unter „Anzahl“ wird eingestellt, wie oft die Sequenz-Aufnahme durchgeführt werden soll. Ist ein Wert größer als 1 gewählt, werden

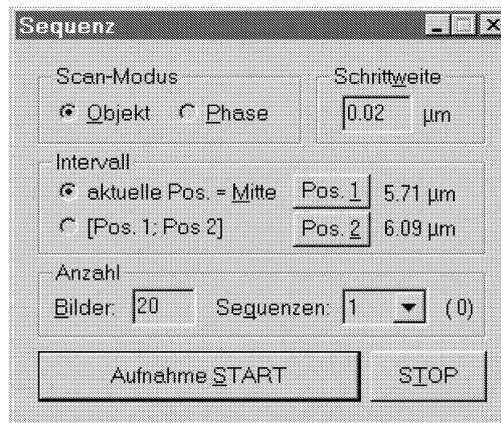


Abbildung B.8: Dialogfeld „Sequenz“ zum Festlegen der Einstellungen für die Sequenz-Aufnahme (nicht-modales Dialogfeld).

die Bilddaten nach jedem Durchgang automatisch auf Festplatte gespeichert. Aus diesem Grund muss vor dem Starten einer mehrfachen Sequenz-Aufnahme unter dem Menüpunkt „Verzeichnis für autom. Speicherung...“ im Menü „Datei“ ein Verzeichnisname angegeben werden. Zum Speichern wird dann für jede Sequenz ein eigenes Verzeichnis mit dem angegebenen Namen und einer Nummer für den jeweiligen Durchgang erstellt.

Nach dem Beenden oder Abbrechen (Button „STOP“) einer Sequenz-Aufnahme geht die Anwendung automatisch in den Anzeige-Modus über und aktualisiert die Dialogfelder „Histogramm“ und „Profile“ oder „Statistik“.

B.5.2 Dialogfeld „Protokoll-Datei“

Bei jedem Speichervorgang der Sequenzen wird, sofern die entsprechende Option aktiviert ist (Abschnitt B.3.2), automatisch ein Protokoll erstellt und als .log-Datei ebenfalls gespeichert. Diese Datei enthält alle wichtigen Einstellungen des Programms zur Zeit der Sequenz-Aufnahme. Darüberhinaus können auch individuelle Informationen z. B. über die eingestellte Laserleistung abgespeichert werden. Der Eingabe dieser Informationen dient das in Abbildung B.9 gezeigte nicht-modale Dialogfeld „Protokoll-Datei“.

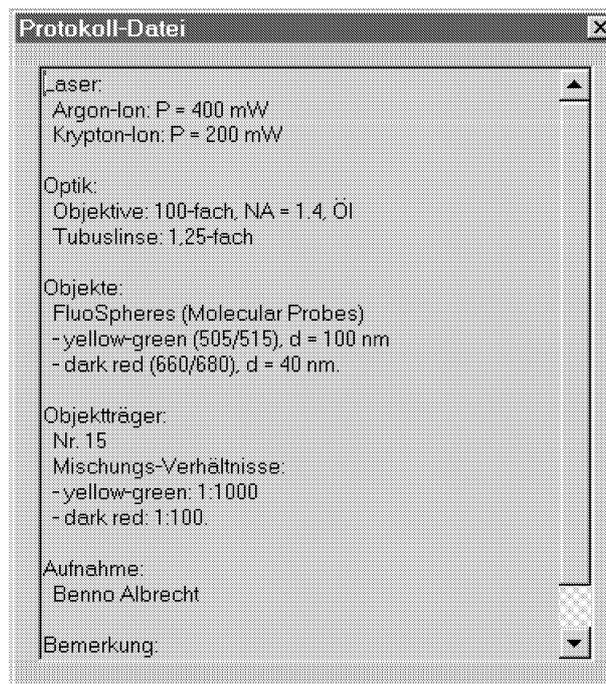


Abbildung B.9: Dialogfeld „Protokoll-Datei“ (nicht-modal). Hier eingegebene Informationen werden bei der automatischen Erstellung der Protokoll-Datei mit abgespeichert.

Außer dem Inhalt des in Abb. B.9 dargestellten Dialogfelds enthält die Protokoll-Datei folgende Informationen (Protokoll einer im Scan-Modus „Phase“ durchgeführten Aufnahme; die vom Benutzer eingegebenen Daten werden unten an die Datei angehängt):

```
00 Protokoll-Datei SMI-Aufnahme
01 =====
```

```
02
03 Programm-Version 3.3.03
04
05 Datum: Monday, 13. August 2001
06 Startzeit [HH:MM:SS]: 14:39:34
07 Dauer      [HH:MM:SS]: 00:01:50
08
09 Bilddaten:
10  Breite [Pixel]: 128
11  Hoehe [Pixel]: 128
12  Tiefe [Pixel]: 200
13  Kanaele: Rot Gruen1
14  Digitalisierung: 12 Bit
15  Datentyp: Unsigned Short
16
17 Kameraparameter:
18  Integrationszeit [s]: 0.500
19  Region Of Interest (ROI):
20    X-Koordinate: 192
21    Y-Koordinate: 176
22    Breite: 128
23    Hoehe: 128
24  Binning (X/Y): 1
25  Anfangs-CCD-Temperatur [C]: -11
26  Anfangs-Elektroniktemp. [C]: 45
27  End-CCD-Temperatur [C]: -11
28  End-Elektroniktemp. [C]: 45
29  Kamera-Typ: LongExposure
30  Version: 2.0
31  A/D-Wandler: 12 Bit / 12.5 MHz
32  CCD-Typ: 1280 x 1024, RGB
33  Pixelgroesse [ $\mu\text{m}$  x  $\mu\text{m}$ ]: 6.7 x 6.7
34  A/D-Konv.-faktor: 5
35
36 Schrittmotor-Positionen (absolut):
37  X [m]: 94538.63
38  Y [m]: 22087.50
39  Z [m]: 12016.74
40
41 Piezoaktuatoren:
42  Objekt (Kanal 2):
43    Position [m]: 36.200
44  Phase (Kanal 3):
45    Startposition [m]: 1.02
46    Endposition [m]: 8.98
47    Schrittweite [m]: 0.04
```

B.6 Menü „Kamera/Bild“

Abbildung B.10 zeigt das Menü für das Aufrufen der nicht-modalen Dialogfelder „Kamera/Darstellung“ (Menüpunkt „Ansteuerung/Darstellung“), „Histogramm“, „Profile“ und „Statistik“ (auch über Werkzeugleiste aufrufbar). Die häufig verwendeten Kamerafunktionen „ROI-Größe“, „Laden“ (von Kameraeinstellungen) und „Fortlaufende Aufnahme START*“ sind auch über das Dialogfeld „Kamera/Darstellung“ und die Werkzeugleisten zu erreichen; „1 Bild aufnehmen“ kann ebenfalls durch das Dialogfeld „Kamera/Darstellung“ ausgelöst werden. Der erste Menüpunkt initialisiert die CCD-Kamera und setzt alle Kameraparameter auf voreingestellte Werte. Außerdem kann man sich die technischen Daten der CCD-Kamera (inkl. CCD- und Elektroniktemperatur) und Informationen über die im Speicher befindlichen Bilddaten (Breite, Höhe, Anzahl Bilder, Farbkanäle) anzeigen lassen.



Abbildung B.10: Menü „Kamera/Bild“ zum Aufrufen des Dialogfelds für die Kamera-Ansteuerung und Darstellung der Bilddaten sowie für die Dialogfelder „Histogramm“, „Profile“ und „Statistik“. Außerdem können die wichtigsten CCD-Kamerafunktionen ausgelöst und die Eigenschaften von Kamera und Bilddaten angezeigt werden.

B.6.1 Dialogfeld „Kamera/Darstellung“

Mit dem in Abbildung B.11 dargestellten Dialogfeld „Kamera/Darstellung“ wird die Kamera angesteuert und die Parameter für die Anzeige der Bilddaten auf dem Hauptansichtsfenster bzw. Monitor gesetzt.

Ansteuerung der Kamera

Im Eingabefeld unter „t-Int. [s]“ wird die Integrationszeit der Kamera eingestellt, möglich sind Werte von 0,001 s bis 10 s. Um die eingestellte Integrationszeit schnell zu ändern, kann

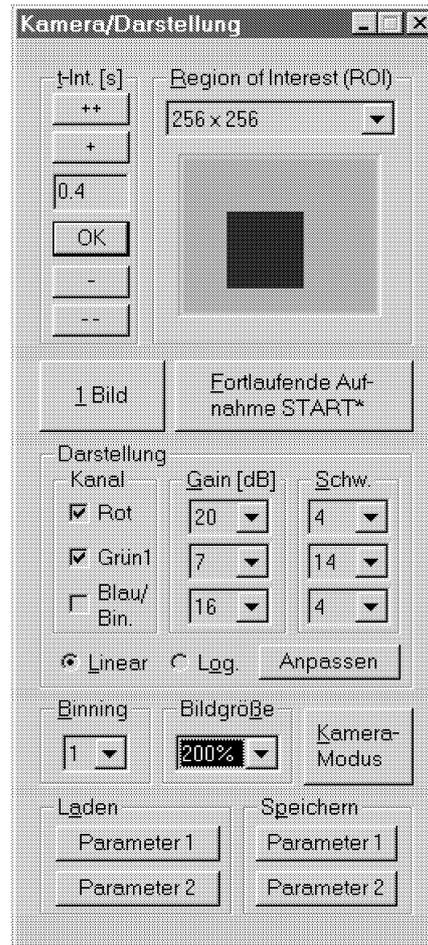


Abbildung B.11: Dialogfeld „Kamera/Darstellung“ zur Ansteuerung der CCD-Kamera (nicht-modal). Außerdem können die Einstellungen für die Anzeige der Bilddaten geändert werden, wie z. B. die Helligkeit („Gain“).

der Wert durch Klick auf die Buttons „+“/„++“ bzw. „-“/„--“ mit dem Faktor 1,1 / 2 bzw. 0,91 / 0,5 multipliziert werden.

Im Kombinationsfeld unter „**Region of Interest (ROI)**“ kann die Größe der Region auf dem CCD-Chip (in Einheiten aus je 2×2 CCD-Pixeln, s. Abschn. 4.4.2), die bei einer Aufnahme ausgelesen wird, eingestellt werden. Es stehen die Einstellungen „Ganze CCD“ (640×512), „ 512×512 “, „ 256×256 “, „ 128×128 “, „ 64×64 “, „ 32×32 “, „ 16×16 “ und „Selbstdef.“ zur Verfügung (die aktuelle Position und Größe der ROI werden als blaues Rechteck unter dem Kombinationfeld angezeigt). Ändert man die ROI-Größe oder klickt man auf das Hauptansichtfenster, erscheint dort eine ROI-Markierung in Form eines Rechtecks, wie in Abbildung B.12 gezeigt. Hält man die *linke* Maustaste gedrückt, kann die ROI an jede beliebige Stelle auf dem Bild bzw. CCD-Chip geschoben werden. Ist die ROI-Einstellung „Selbstdef.“ gewählt, kann man alternativ durch Drücken auf die *rechte* Maustaste Breite und Höhe der ROI beliebig einstellen. Alle späteren Aufnahmen erfolgen dann gemäß der gesetzten ROI, und die Bilder werden auf dem Hauptansichtfenster in dem markierten Gebiet angezeigt.

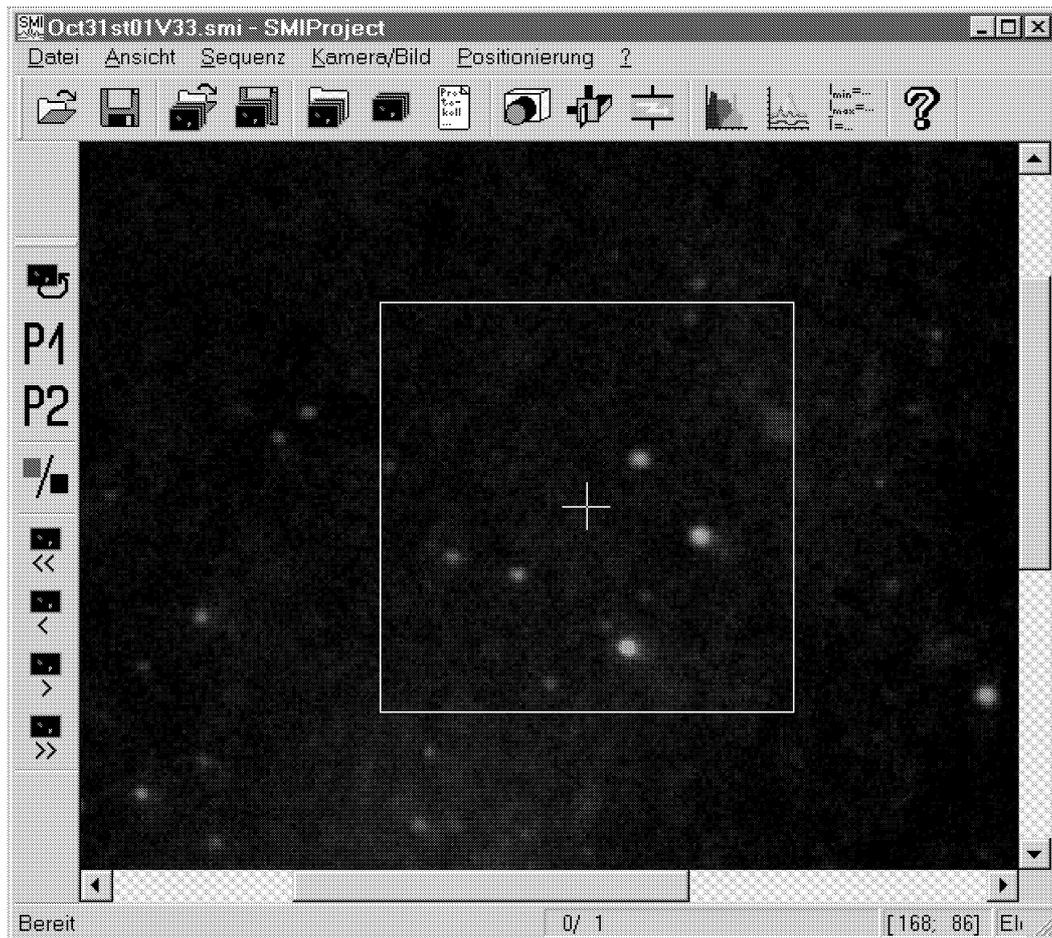


Abbildung B.12: Hauptansichtfenster mit ROI-Markierung. Durch Drücken der linken Maustaste kann die ROI an jede Stelle auf dem Bild bzw. CCD-Chip geschoben werden.

Button „1 Bild“ löst eine Einzelaufnahme aus, durch Klick auf „**Fortlaufende Aufnahme START***“ werden die Aufnahmen ständig wiederholt und auf dem Hauptansichtfenster angezeigt. Der Button wird auch dazu verwendet, die Fortlaufende Aufnahme wieder anzuhalten (Beschriftung ändert sich nach Start in „Fortlaufende Aufnahme STOP“).

Befindet sich die Anwendung im „Anzeige-Modus“ (z. B. nach einer Sequenz-Aufnahme), muss mit dem Button „**Kamera-Modus**“ erst wieder der Kamera-Modus eingeschaltet werden, um die Funktionen zur Kamera-Ansteuerung nutzen zu können (vgl. Abschnitt B.4). Dabei wird ein evtl. im RAM-Speicher befindlicher Bildstapel sowie das im Hauptansichtfenster gezeigte Bild automatisch gelöscht und die ROI-Markierung der Kamera dargestellt (ACHTUNG: Darauf achten, dass die Bilddaten vorher gespeichert wurden, falls erforderlich!). Außerdem werden alle im Anzeige-Modus deaktivierten, die Kamera betreffenden Einstellmöglichkeiten und Buttons des Dialogfelds aktiviert, dazu gehört auch das Kombinationsfeld „Binning“.

Unter „Binning“ können die Werte „1“ oder „2“ eingestellt werden. Bei der zweiten Einstellmöglichkeit werden je zwei CCD-Pixel horizontal und vertikal zu einem effektiven

Pixel zusammenschaltet. Das heißt, es findet keine Farbunterscheidung mehr statt, und es können wie bei einer Schwarz/Weiss-Kamera nur noch Graustufen detektiert werden. Dabei wird allerdings die Auslesezeit des CCD-Chips wesentlich verkürzt und die Bildwiederholfrequenz bei fortlaufender Aufnahme steigt an (vgl. Abschnitt 4.4.2).

Nach dem Klicken auf „Kamera-Modus“ muss z. B. nach einer Sequenz-Aufnahme die ROI-Einstellung erst manuell in „Ganze CCD“ geändert werden, um wieder mit dem gesamten Gesichtsfeld der Kamera nach neuen Objekten auf dem Objektträger suchen zu können. Man kann die wiederholte Aufnahme deswegen auch im *Anzeige-Modus* mit „Fortlaufende Aufnahme START*“ aktivieren, hierbei wird automatisch in den Kamera-Modus umgeschaltet und die ROI auf „Ganze CCD“ gesetzt.

Darstellung der Bilddaten

Mit den Einstellmöglichkeiten unter „**Darstellung**“ lässt sich die Anzeige der Bilddaten im Hauptansichtfenster verändern um z. B. den Kontrast zu erhöhen. Hierzu werden die von der Kamera stammenden und im RAM-Speicher abgelegten 12-Bit-Daten für Rot, Grün und Blau (RGB-Farbschema) in 8-Bit-RGB-Daten *umgerechnet*. Auf dem Hauptansichtfenster bzw. dem Monitor werden immer nur diese 8-Bit-Daten angezeigt (entsprechen 3×8 Bit bzw. 16,8 Millionen Farben).

Unter „**Kanal**“ kann eingestellt werden, welche der drei Farbkanäle bzw. unterschiedlichen CCD-Pixel Rot, Grün1 und Blau dargestellt werden sollen (Kanal Grün2 wird nicht verwendet, vgl. Abschn. 4.4.2). Sind zwei oder drei Kanäle aktiviert, werden die Intensitätswerte jedes Kanals in der entsprechenden Farbe angezeigt, ist dagegen nur ein Kanal gewählt, erfolgt die Darstellung in Grauwerten (gleiche Werte für Rot, Grün, Blau). Auf dem CCD-Chip überlaufende Pixel (Intensität = 4095 CCD-Counts) erscheinen in dieser Darstellung rot auf dem Monitor, bei zwei oder drei angezeigten Farbkanälen sind die entsprechenden Monitorpixel auf 0 (schwarz) gesetzt. Dadurch wird ein Überlauf bzw. Übersteuern der CCD-Kamera sofort auf dem Monitor sichtbar (sollte durch Reduzierung der Integrationszeit immer vermieden werden).

Mit Hilfe der Kombinationsfelder unter „**Gain**“ stellt man die Verstärkung der angezeigten 8-Bit-Helligkeiten gegenüber den 12-Bit-Intensitätswerten in Dezibel (dB) ein, möglich sind Werte von 0 bis 20. Bei der Einstellung 0 entsprechen $4095 = 2^{12} - 1$ CCD-Counts $255 = 2^8 - 1$ Helligkeitsstufen auf dem Monitor (Maximalwert). Unter „**Schw.**“ kann der untere Schwellwert der Anzeige in 41 exponentiell ansteigende Stufen von 0 bis 3540 CCD-Counts eingestellt werden. Die Parameter unter „Gain“ und „Schw.“ definieren auf dem Dynamikbereich der CCD-Kamera für jeden Farbkanal ein Darstellungs-Fenster mit einem unteren und einem oberen Schwellwert (werden durch entsprechende Markierungen im Dialogfeld „Histogramm“ angezeigt). Dabei werden CCD-Counts, die kleiner als die unteren Schwellwerte sind, mit dem Farbwert 0 und CCD-Counts, die größer als die oberen Schwellwerte sind, mit der maximalen Helligkeit 255 dargestellt.

Zwischen oberem und unterem Schwellwert erfolgt die 12-zu-8-Bit-Umrechnung linear oder logarithmisch, je nachdem welches der Auswahlfelder „Linear“ und „Log.“ gewählt ist. Unter bestimmten Bedingungen erhält man mit „Log.“ ein besseres Bild, da dann kleine 12-Bit-Intensitätswerte mehr verstärkt werden als große. Mit dem Button „**Anpassen**“ werden die oben erläuterten Schwellwerte durch entsprechendes Setzen der „Gain“- und „Schw.“-Einstellungen an das Histogramm der 12-Bit-Intensitätswerte angepasst. Das

heißt, für jeden Farbkanal wird die obere bzw. untere Schwelle so eingestellt, dass sie möglichst nahe beim linken bzw. rechten Rand des Histogramms liegt. Dadurch wird meist schon eine recht gute Visualisierung der Bilddaten erreicht, und eine weitere manuelle Anpassung von „Gain“ und „Schw.“ erübrigt sich.

Das Kombinationsfeld „Bildgröße“ enthält die drei möglichen Einstellungen 100%, 200% sowie 400% und entspricht den ersten drei Menüpunkten des „Ansicht“-Menüs. Mit Hilfe der Buttons unter „Laden“ bzw. „Speichern“ ist es möglich, zwei verschiedene Parametersätze mit allen Einstellungen des Dialogfelds außer „Region of Interest (ROI)“ zu laden bzw. speichern. So kann man beispielsweise zwischen den für das Suchen von Objekten und für die Sequenz-Aufnahme verwendeten Einstellungen schnell hin- und herschalten.

B.6.2 Dialogfeld „Histogramm“

In dem in Abbildung B.13 angezeigten nicht-modalen Dialogfeld „Histogramm“ wird ständig das Histogramm der 12-Bit-Bilddaten des gerade auf dem Hauptansichtsfenster dargestellten Bildes angezeigt, sofern das Optionsfeld „Immer Aktualisieren“ aktiviert ist (andernfalls erhöht sich die Bildwiederholfrequenz bei fortlaufender Aufnahme der CCD-Kamera). Außerdem werden Marker dargestellt (senkrechte Linien mit „>“ bzw. „<“), die das mittels der Einstellungen von „Gain“ und „Thresh“ im Dialogfeld „Kamera/Darstellung“ für jeden Farbkanal definierte Darstellungsfenster der 8-Bit-Daten anzeigen.

Mit „Linear“ oder „Logarithmisch“ kann gewählt werden, ob die Histogrammkurve linear oder logarithmisch skaliert wird; mit „Logarithmisch“ sind hierbei sogar noch einzelne Pixel mit bestimmten Intensitätswerten erkennbar. Durch die Auswahlfelder „0..511“ und „0..4095“ ist es möglich, das Intensitätsintervall bzw. die Auflösung des Histogramms zu verändern. Die Einstellung „0..511“ ist zu empfehlen, wenn die Bilddaten nur kleine Intensitätswerte aufweisen.

Mit dem Button „Darst.-Zyklus“ wird die Reihenfolge des Zeichnens der Histogramm-

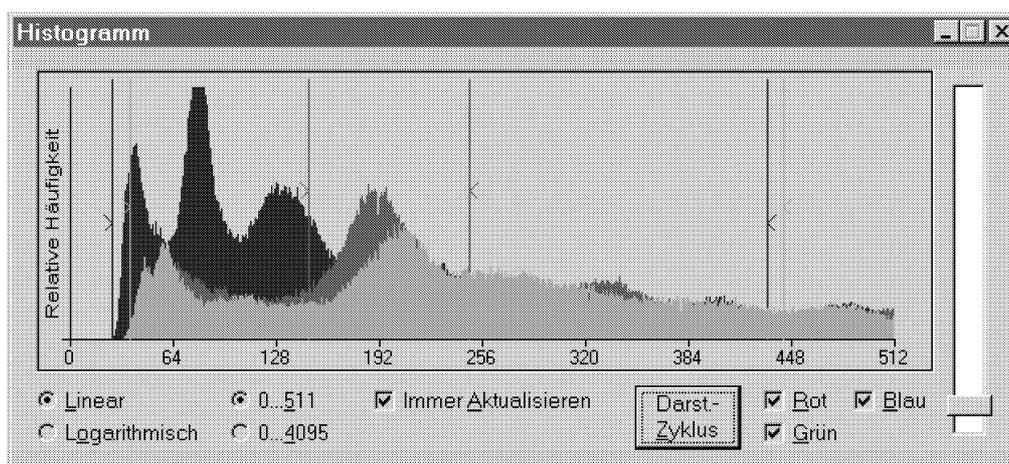


Abbildung B.13: Dialogfeld „Histogramm“ (nicht-modal). Sofern das Optionsfeld „Immer Aktualisieren“ aktiviert ist, wird ständig das Histogramm der 12-Bit-Bilddaten des gerade auf dem Hauptansichtsfenster dargestellten Bildes angezeigt.

kurven für Rot, Grün und Blau zyklisch vertauscht, so dass jede Farbe in die obere Zeichenebene geschoben werden kann. Durch die drei Optionsfelder rechts davon kann die Darstellung für jeden Farbkanal einzeln ein- oder ausgeschaltet werden (unabhängig von den entsprechenden Einstellungen im Dialogfeld „Kamera/Darstellung“). Mit dem Schieberegler rechts können die Kurven nach oben gestreckt bzw. gestaucht werden, um z. B. kleine relative Häufigkeiten besser erkennen zu können.

B.6.3 Dialogfeld „Profile“

Abbildung B.14 zeigt das Dialogfeld „Profile“ zum Anzeigen von Intensitätsprofilen in x-, y- oder z-Richtung. Wird dieses Dialogfeld aufgerufen, geht die Anwendung automatisch in den Anzeige-Modus über, und auf dem Bild im Hauptansichtfenster erscheint eine Markierung, deren Gestalt von der Einstellung in den Auswahlfeldern am unteren rechten Rand des Dialogfelds abhängt:

- Ist die Einstellung „x“ gewählt, erscheint eine horizontale Linie, die durch Gedrückt-Halten der linken Maustaste vertikal verschoben werden kann.
- Bei „y“ erscheint entsprechend eine vertikale Linie, die durch Gedrückt-Halten der linken Maustaste horizontal verschoben werden kann.
- In der Einstellung „z“ erscheint eine rechteckige ROI-Markierung, deren Größe und Position auf dem Bild analog zur Einstellung der Kamera-ROI mit dem Kombinationsfeld rechts unten und mit Hilfe der Maus auf dem Hauptansichtfenster eingestellt werden kann. Die hier verwendete ROI ist in der Regel wesentlich kleiner als bei der CCD-Kamera, sinnvoll sind die Größen 3×3 und 5×5 Pixel.

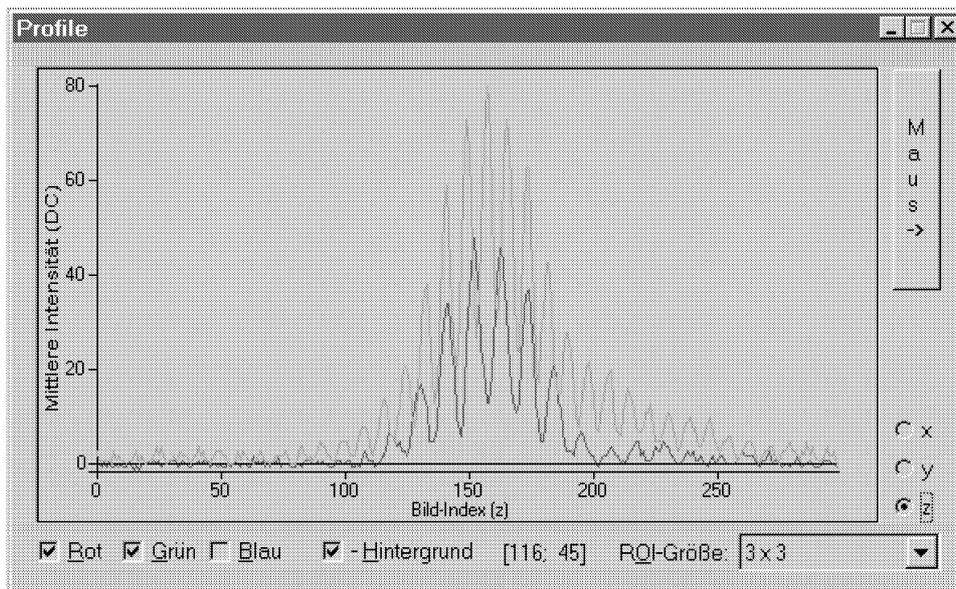


Abbildung B.14: Dialogfeld „Profile“ zum Anzeigen von Intensitätsprofilen in x-, y- oder z-Richtung (nicht-modal). Der Graph im Dialogfeld zeigt den axialen Intensitätsverlauf zweier dicht nebeneinanderliegender, rot und grün fluoreszierender Beads.

Nach dem Loslassen der Maustaste wird das entsprechende Intensitätsprofil im Dialogfeld angezeigt. Hierbei sind auf der Ordinate die Intensitäten in CCD- bzw. Digital Counts (DC) und auf der Abszisse die Indizes der Pixel in x- oder y-Richtung oder der Bilder in z-Richtung aufgetragen.

Vor allem die Anzeige des **Axialen Intensitätsverlaufs**, wie in Abb. B.14 gezeigt, ist eine sehr große Hilfe zur schnellen Beurteilung der gemessenen Daten unmittelbar nach einer Sequenz-Aufnahme. Das Profil wird hierbei aus den arithmetischen Mittelwerten der innerhalb der ROI befindlichen Pixel der einzelnen Bilder zusammengesetzt (und stammt nicht aus einer einzigen Linie wie beim x- und y-Profil). Um das angezeigte Profil noch weiter zu optimieren, kann durch Aktivieren des Optionsfelds „- Hintergrund“ der Hintergrund in Form des Mittelwertes, gebildet jeweils aus *allen* Pixeln der einzelnen Bilder, subtrahiert werden (siehe auch Abschn. 3.2.1).

Die Optionsfelder für „Rot“, „Grün“ und „Blau“ wirken sich auch hier nur auf die Darstellung der einzelnen Kurven innerhalb des Dialogfelds aus. Die Zahlen in der eckigen Klammer unten geben die Mitten-Koordinaten der eingestellten ROI an. Mit dem Button „Maus ->“ können Mausaktionen auf der Ansicht auf das Dialogfeld „Profile“ umgeleitet werden (siehe auch nächster Abschnitt).

B.6.4 Dialogfeld „Statistik“

Mit dem in Abbildung B.15 gezeigten nicht-modalen Dialogfeld „Statistik“ lassen sich die Statistikparameter Minimalwert, Maximalwert, arithmetischer Mittelwert und Standard-Abweichung der durch das Kombinationsfeld „Kanal“ ausgewählten Pixel innerhalb einer ROI anzeigen. Position und Größe der ROI werden analog zur Kamera-ROI eingestellt, die eckige Klammer oben links zeigt die Mitten-Koordinaten der ROI an. Ist die Option „+z“ aktiviert, werden die ROI-markierten Pixel in allen Bildern einer Sequenz berücksichtigt.

Auch beim Aufruf dieses Dialogfelds geht die Anwendung automatisch in den Anzeige-Modus über, und auf dem Bild erscheint wieder eine rechteckige ROI-Markierung. Sind allerdings die Dialogfelder „Profile“ und „Statistik“ beide geöffnet, kann beim Verschieben einer ROI auf dem Bild im Hauptansichtfenster immer nur eines dieser Dialogfelder aktualisiert werden, d. h. es kann nur entweder ein Profil oder es können nur die Statistik-



Abbildung B.15: Dialogfeld „Statistik“ (nicht-modal). Bezogen auf die ROI im Hauptansichtfenster werden der Minimal- und Maximalwert, das arithmetische Mittel sowie die Standard-Abweichung der Pixelintensitäten angezeigt.

Parameter angezeigt werden. Um festzulegen, welche Funktion aktiv sein soll, besitzen daher beide Dialogfelder einen „Maus ->“-Button, der bewirkt, dass die folgenden Mauseaktionen auf dem Hauptansichtfenster an das entsprechende Dialogfeld weitergeleitet werden. Auf diese Weise muss nicht erst ein Dialogfeld geschlossen und das andere geöffnet werden, bevor die Funktion des anderen zur Verfügung steht. Befindet sich die Anwendung im Kamera-Modus, wird mit dem „Maus ->“-Button gleichzeitig in den Anzeige-Modus umgeschaltet.

B.7 Menü „Positionierung“

Abbildung B.16 zeigt das Menü „Positionierung“ zum Aufrufen der auch über die Werkzeugleiste erreichbaren nicht-modalen Dialogfelder „Schrittmotor-Ansteuerung“ und „Piezo-Ansteuerung“. Über den Menüpunkt „Schrittmotoren ⇒“ initialisiert man die Schrittmotorsteuerung und setzt bzw. ändert das z-Intervall der Schrittmotoren. Mit „Joystick EIN(AUS)“ ist es möglich, den Joystick der Schrittmotorsteuerung ein- bzw. auszuschalten. Außerdem wird von hier aus die Piezo-Steuerung initialisiert, und bei Bedarf können bestimmte Einstellungen der Schrittmotor- und der Piezo-Steuerung geändert werden.



Abbildung B.16: Menü „Positionierung“ zum Aufrufen der Dialogfelder für die Schrittmotor- und Piezo-Steuerung. Außerdem können beide Steuerungen initialisiert, das z-Intervall der Schrittmotoren gesetzt (Menüpunkt „Schrittmotoren ⇒“) sowie ein Dialogfeld zum Ändern einiger Einstellungen aufgerufen werden.

B.7.1 Dialogfeld „z-Intervall ändern/setzen“

Mit Hilfe des in Abbildung B.17 gezeigten nicht-modalen Dialogfelds „z-Intervall ändern/setzen“ kann das z-Intervall bzw. der Verfahrbereich der Schrittmotoren in z-Richtung eingestellt werden. Auf diese Weise lässt sich verhindern, dass der Objektträger bzw. der

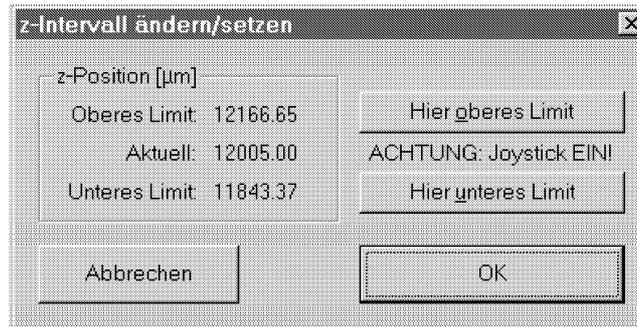


Abbildung B.17: Dialogfeld „z-Intervall ändern/setzen“ zum Festlegen des z-Verfahrbereichs der Schrittmotoren (nicht-modal). Durch die Begrenzung des z-Intervalls wird verhindert, dass der Objektträger bzw. Objektträgerhalter unbeabsichtigt an die Objektivie stößt.

Objektträgerhalter z. B. beim manuellen Verfahren mit dem Joystick unbeabsichtigt an die Objektivie stößt, was eine Dejustierung des Interferometers nach sich ziehen kann.

Beim Aufrufen des Dialogfelds wird der Joystick unabhängig von der Einstellung im Hauptmenü oder im Dialogfeld „Schrittmotor-Ansteuerung“ eingeschaltet. Um die Intervallgrenzen zu setzen, fährt man den Objektverschiebetisch jeweils an das zu setzende untere- bzw. obere Limit und speichert die entsprechenden Positionen mit den Buttons „Hier oberes Limit“ und „Hier unteres Limit“ ab. Die aktuellen Grenzen und die derzeitige axiale Position des Verschiebetischs werden links unter „z-Position [µm]“ angezeigt. Bevor die Intervallgrenzen durch Klick auf „OK“ wirksam werden, muss der Benutzer den Verschiebetisch an eine Position *zwischen* beiden Grenzen verfahren. Andernfalls erscheint eine Fehlermeldung mit der Mitteilung, dass das Intervall nicht gesetzt werden kann.

Möchte man die Grenzen wieder genauso setzen, wie sie *vor* dem Aufrufen des Dialogfelds bestanden, genügt ein Klick auf „Abbrechen“. Befindet sich der Verschiebetisch dann jedoch nicht zwischen den alten Grenzen, erscheint dieselbe Fehlermeldung wie oben, und der *gesamte* axiale physikalisch mögliche Verfahrbereich bleibt geöffnet.

War der Joystick vor dem Aufrufen des Dialogfelds ausgeschaltet, wird er auch nach dem Schließen des Dialogfelds wieder deaktiviert. Die Koordinaten des z-Intervalls werden in der Datei „StepArea.dat“ gespeichert, siehe auch Abschn. B.2.

B.7.2 Dialogfelder „Schrittmotor-Ansteuerung“, „Piezo-Ansteuerung“

Mit den in Abbildung B.18 gezeigten nicht-modalen Dialogfeldern „Schrittmotor-Ansteuerung“ und „Piezo-Ansteuerung“ können die Schrittmotoren bzw. Piezo-Aktuatoren manuell betätigt werden.

Schrittmotoren

Im Dialogfeld für die Schrittmotor-Ansteuerung kann man mit den Buttons unter „**Setzen**“ den Nullpunkt (= Ursprung des Koordinatensystems der Schrittmotoren) festlegen und zwei weitere Positionen speichern. Mit den Buttons unter „**Anfahren**“ wird der Objektträger an die gespeicherten Positionen bewegt. Die Textfelder unter „Position [µm]“ zeigen die aktuellen Koordinaten der drei Motoren an; dort kann man auch von Hand

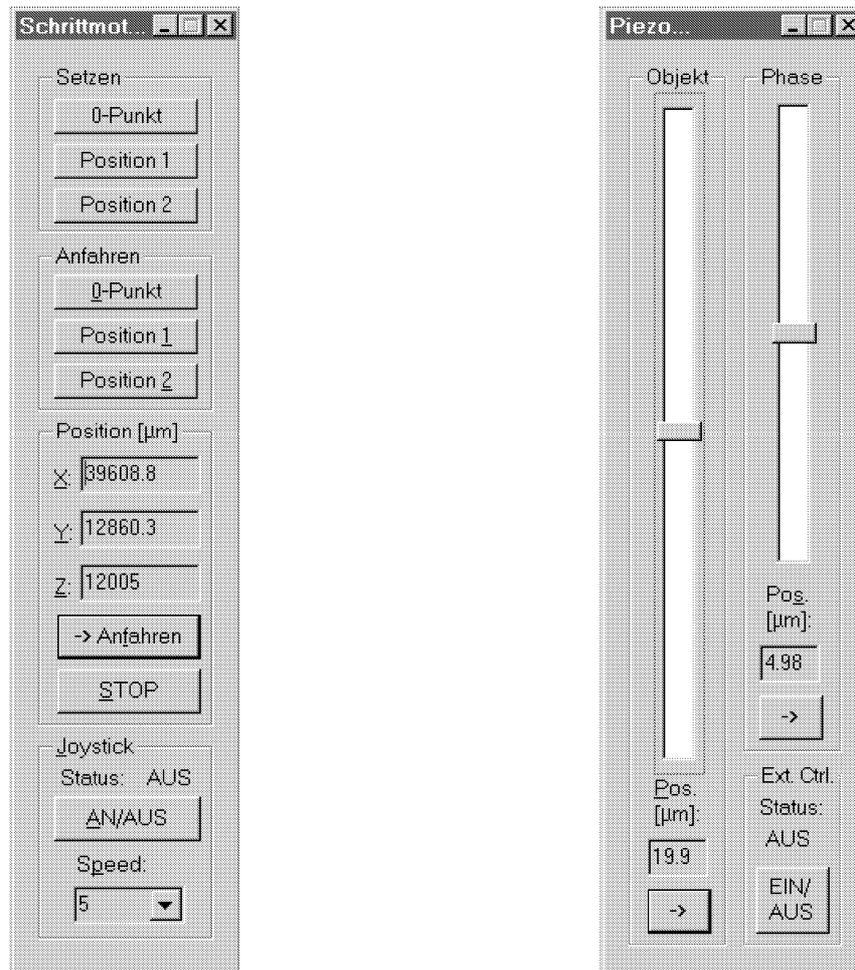


Abbildung B.18: Dialogfelder „Schrittmotor-Ansteuerung“ und „Piezo-Ansteuerung“ (beide nicht-modal). Im Dialogfeld „Schrittmotor-Ansteuerung“ können Schrittmotorpositionen gespeichert und später angefahren werden, die Piezo-Aktuatoren werden durch Schieberegler bewegt.

Zahlenwerte eingeben und den Objektverschiebetisch durch Klick auf „-> Anfahren“ an die eingegebene Position fahren lassen. Während der Ausführung eines *Verfahrbefehls*, ausgelöst durch „-> Anfahren“ oder einen der Buttons unter „Anfahren“, können die Schrittmotoren mit „STOP“ jederzeit angehalten werden. Aus technischen Gründen wird vor einem solchen Befehl der Joystick immer automatisch ausgeschaltet.

Unter „**Joystick**“ kann (wie mit dem Menüpunkt „Joystick EIN(AUS)“ des Hauptmenüs) der an die Schrittmotorsteuerung angeschlossene Joystick ein- bzw. ausgeschaltet werden. Das Kombinationsfeld „Speed“ legt die maximale Verfahrgeschwindigkeit der Motoren bei Betätigung des Joysticks fest. Befindet sich der Objektträger zwischen den Objektiven, ist hierbei die Einstellung 1 zu empfehlen, zum Heraus- bzw. Hereinfahren aus bzw. in den Zwischenraum der Objektive ist ein größerer Wert von ca. 5 angebracht. Das Herein-/Herausfahren kann automatisiert werden, indem man eine Position sowohl zwischen den Objektiven als auch außerhalb davon speichert und den Verschiebetisch durch Klick auf einen der „Anfahren“-Buttons bewegt.

Piezo-Aktuatoren

Durch die zwei Schieberegler im Dialogfeld für die Piezo-Ansteuerung kann sowohl der Piezo-Objektverschiebetisch als auch der Verschiebetisch für den Interferometerspiegel („Phase“) manuell bewegt werden. Die jeweiligen aktuellen Positionen werden in den Textfeldern unter den Schieberegler angezeigt. Analog zum Dialogfeld für die Schrittmotorsteuerung können auch hier von Hand Positionen eingegeben und die Tische jeweils mit „->“ dorthin bewegt werden. Mit dem Button „EIN/AUS“ unter „Ext. Ctrl.“ ist es möglich, bei Bedarf die Kontrolle über die Piezo-Aktuatoren an die externe Piezo-Steuerung abzugeben.

B.7.3 Weitere Einstellungen

In dem in Abbildung B.19 gezeigten Dialogfeld „Einstellungen“ lassen sich einige Parameter für das Verfahren der Schrittmotoren und die Ansteuerung der Piezo-Aktuatoren verändern. Für die Schrittmotorsteuerung kann eingestellt werden, mit welcher Beschleunigung bzw. Verzögerung die Verfahrbefehle ausgeführt werden sollen, die nach dem Klicken auf einen der Buttons unter „Anfahren“ oder auf „-> Anfahren“ im Dialogfeld „Schrittmotor-Ansteuerung“ ausgeführt werden. Darüberhinaus lässt sich die dabei maximal erlaubte

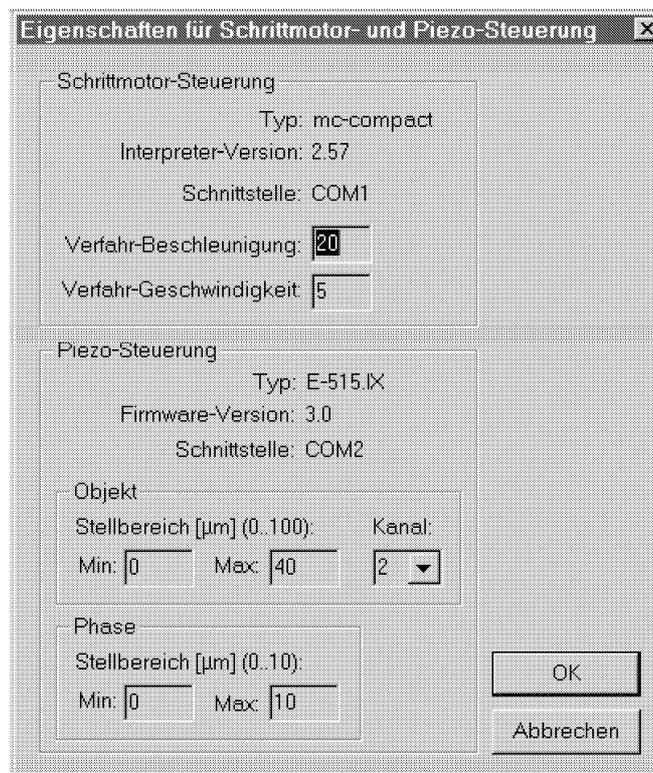


Abbildung B.19: Dialogfeld „Einstellungen“ (modal). Hier kann die Beschleunigung (und Verzögerung) sowie die Verfahrgeschwindigkeit der Schrittmotoren beim Ausführen von Verfahrbefehlen eingestellt werden. Außerdem ist es möglich, die Positionsauflösung der Schieberegler im Dialogfeld „Piezo-Steuerung“ zu ändern.

Verfahrgeschwindigkeit einstellen, die unabhängig von der „Speed“-Einstellung im Dialogfeld „Schrittmotor-Ansteuerung“ ist.

Unter „Piezo-Steuerung“ wird der Positionier- bzw. Stellbereich der Schieberelger im Dialogfeld „Piezo-Ansteuerung“ eingestellt. Wählt man ein kleineres Intervall als das physikalisch mögliche, das beim Piezo-Objektverschiebetisch von 0 bis 100 μm und beim Piezo-Spiegelverschiebetisch von 0 bis 10 μm reicht, erhöht sich die Positionsauflösung der Schieberegler entsprechend. Das heißt, man kann die Empfindlichkeit einstellen, mit der die Piezo-Aktuatoren auf Bewegungen des Schieberegler reagieren. Da der Objektverschiebetisch über zwei Achsen bzw. Bewegungsrichtungen verfügt, kann bei ihm zusätzlich die Verstellrichtung bzw. der Kanal der Piezo-Steuerung gewählt werden. Im aktuellen Mikroskopaufbau ist dieser Verschiebetisch so orientiert, dass die durch Kanal 2 bezeichnete Richtung in axiale Richtung, d. h. parallel zur optischen Achse der Objektiv zeigt. Mit Kanal 1 ist dagegen eine Bewegung des Verschiebetischs in vertikaler Richtung, d. h. senkrecht zum Breadboard möglich.

Im Dialogfeld wird außerdem angezeigt, an welche seriellen Schnittstellen beide Steuerungen angeschlossen sind. Diese und weitere Einstellungen, die im Routinebetrieb normalerweise nicht geändert werden, sind in den Dateien „StepInit.txt“ und „PiezoInit.txt“ enthalten, die die Anwendung nach ihrem Start einliest.

Anhang C

Auswerte-Software

Zur Auswertung der Bilddaten nach den in Kapitel 3 beschriebenen Methoden wurde das unter dem Betriebssystem LINUX laufende Software-Paket „Khoros“ der Khoral Research Inc.¹ verwendet [Rasure91, Konstatinides94]. Dieses Paket beinhaltet eine Vielzahl eigenständiger Programme zur Bildverarbeitung, mit denen sich pixelorientierte Arithmetik, statistische Berechnungen, Matrixmultiplikationen, (3D-)Visualisierungen usw. durchführen bzw. darstellen lassen. Der Quellcode der Programme ist dem Benutzer frei zugänglich und nach eigenen Erfordernissen modifizierbar, außerdem können der Sammlung eigene Routinen hinzugefügt werden. Zwischen den Programmen werden die Bilddaten durch das universelle „Khoros Data Format“ (KDF-Datenformat) übertragen, das unterschiedlichste Daten mit bis zu fünf Dimensionen enthalten kann.

Um die Programme zu verknüpfen, wird die visuelle Programmiersprache „Cantata“ verwendet. Abbildung C.1 zeigt die grafische Benutzeroberfläche, die auf dem Hauptansichtfenster eine Arbeitsfläche („Workspace“) besitzt, auf der die einzelnen Programme bzw. Funktionen in Form von Modulen bzw. „Glyphs“ angeordnet sind. Die Module lassen sich beliebig verschieben, und neue Glyphs können hinzugefügt oder gelöscht werden. Zu jedem Modul kann man durch Klicken auf die linke obere Ecke ein Dialogfeld aufrufen, in dem bestimmte Parameter des entsprechenden Programms eingestellt werden können, wie z. B. Schwellwerte zur Segmentierung oder Koordinaten zum Ausschneiden einer ROI (Region Of Interest). Der Datenfluss zwischen den Modulen wird durch Verbindungslinien dargestellt, die ebenfalls beliebig verlegt werden können.

In dem in Abbildung C.1 gezeigten Beispiel einer Arbeitsfläche werden die Bilddaten nach dem Einlesen bzw. Importieren zunächst in den Typ „Float“ umgewandelt und daraufhin in die Farbkanäle Rot und Grün aufgeteilt. Anschließend wird in jedem Zweig das jeweils interessierende Objekt durch das Glyph „Extract Object“ aus den ursprünglichen Daten extrahiert, bevor in den Gruppen-Modulen „ProcLateral/Axial...“, die ihrerseits andere Glyphs enthalten, eine weitere Verarbeitung stattfindet. Die Module, die nicht mit den Hauptdatensträngen durch Verbindungslinien verbunden sind, werden nur optional verwendet.

Für die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Auswertungen wurden außer den in Khoros enthaltenen Programmen auch Module verwendet, die von Mitgliedern der Arbeits-

¹6200 Uptown Blvd. N.E., Suite 200, Albuquerque, NM 87110-4142, U.S.A, <http://www.khoral.com>

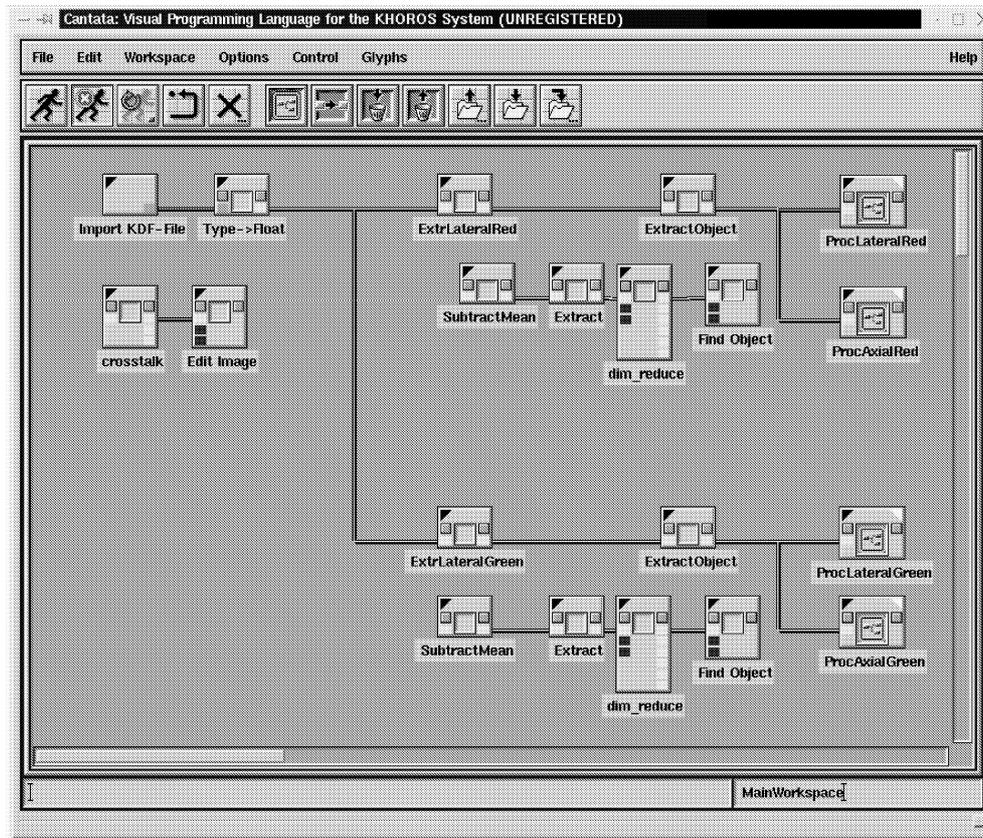


Abbildung C.1: Rahmenfenster der visuellen Programmiersprache „Cantata“. Jedes Modul („Glyph“) auf der Arbeitsfläche repräsentiert eine bestimmte Funktion bzw. ein Programm und kann beliebig verschoben werden. Der Datenfluss zwischen den Modulen wird durch das Setzen von Verbindungslinien geregelt.

gruppe „Angewandte Optik und Informationsverarbeitung“ erstellt wurden [Heintzmann99, Edelman99a].

Literaturverzeichnis

- [Bailey93] B. Bailey, D.L. Farkas, D.L. Taylor & F. Lanni, *Enhancement of axial resolution in fluorescence microscopy by standing-wave excitation*, Nature **366**, 44-48 (1993).
- [Banin98] U. Banin, C. J. Lee, A. A. Guzelian, A. V. Kadavanich, A. P. Alivisatos, W. Jaskolski, G. W. Bryant, A. L. Efros & M. Rosen, *Size-dependent electronic level structure of InAs nanocrystal quantum dots: Test of multiband effective mass theory*, J. Chem. Phys. **109**(6), 2306-2309 (1998).
- [Banin99] U. Banin, M. Bruchez, A. P. Alivisatos, T. Ha, S. Weiss & D. S. Chemla, *Evidence for a thermal contribution to emission intermittency in single CdSe/CdS core/shell nanocrystals*, J. Chem. Phys. **110**(2), 1195-1201 (1999).
- [Bewersdorf98] J. Bewersdorf, R. Pick & S. W. Hell, *Multifocal Multiphoton Microscopy*, Opt. Lett. **23**, 655-657 (1998).
- [Born83] M. Born & E. Wolf, *Principles in Optics*, A. Wheaton & Co., Oxford (1983).
- [Bornfleth98a] H. Bornfleth, K. Sätzler, 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).
- [Bornfleth98b] H. Bornfleth, *Precision distance microscopy and model-based segmentation for the analysis of the functional topology of the cell nucleus*, Dissertation, Universität Heidelberg (1998).
- [Bornfleth99] H. Bornfleth, P. Edelmann, D. Zink & C. Cremer, *Quantitative Motion Analysis of Subchromosomal Foci in Living Cells Using Four-Dimensional Microscopy*, Biophys. J. **77**, 2871-2886 (1999).
- [Bradl92] J. Bradl, M. Hausmann, V. Ehemann, D. Komitowski & C. Cremer, *A tilting device for three-dimensional microscopy: application to in situ imaging of interphase cell nuclei*, J. Microsc. **168**, 47-57 (1992).
- [Bradl94] J. Bradl, M. Hausmann, B. Schneider, B. Rinke & C. Cremer, *A versatile 2Pi-tilting device for fluorescence microscopes*, J. Microsc. **176**, 211-221 (1994).
- [Bradl96] J. Bradl, B. Rinke, B. Schneider, M. Hausmann & C. Cremer, *Improved resolution in „practical“ light microscopy by means of a glass fibre 2 π -tilting device*, In:

- Optical and Imaging Techniques for Biomonitoring*, Hrsg: H.-J. Foth, R. Marchesini, H. Podbielska, M. Robert-Nicaud & H. Schneckenburger, Proc. SPIE **2628**, 140-146 (1996).
- [Bruchez98] J.M. Bruchez, M. Moronne, P. Gin, S. Weiss & A.P. Alivisatos, *Semiconductor Nanocrystals as Fluorescent Biological Labels*, Science **281**(5385), 2013-2016 (1998).
- [Chapman98] D. Chapman, *Teach Yourself Visual C++ in 21 Days*, SAMS Publishing (1998).
- [Cox82] I. J. Cox, C. J. R. Sheppard & T. Wilson, *Super-resolution by confocal fluorescent microscopy*, Optik **60**(4), 391-396 (1982).
- [CCremer78] C. Cremer & T. Cremer, *Considerations on a laser-scanning-microscope with high resolution and depth of field*, Microscopica Acta **81**(1), 31-44 (1978).
- [CCremer99a] C. Cremer, P. Edelmann, H. Bornfleth, H. Luz, G. Kreth, H. Münch & M. Hausmann, *Spectral precision distance confocal microscopy for the analysis of molecular nuclear structure*, In: *Handbook of Computer Vision and Applications* **3**, Editoren: B. Jähne, H. Haußecker & P. Geißler, Academic Press, San Diego, New York, 839-857 (1999).
- [CCremer99b] C. Cremer, P. Edelmann, H. Bornfleth, G. Kreth, H. Muench, H. Luz & M. Hausmann, *Principles of Spectral Precision Distance Confocal Microscopy of Molecular Nuclear Structure*, In: *Handbook of Computer Vision and Applications* **3**(40), Editoren: B. Jähne, H. Haußecker & P. Geiler, Academic Press, San Diego, New York (1999).
- [TCremer93] T. Cremer, A. Kurz, R. Zirbel, S. Dietzel, B. Rinke, E. Schröck, M. R. Speicher, U. Mathieu, A. Jauch, P. Emmerich, H. Scherthan, T. Ried, C. Cremer & P. Lichter, *Role of Chromosome Territories in the Functional Compartmentalization of the Cell Nucleus*, Cold Spring Harbor **58**, 777-792 (1993).
- [TCremer00] T. Cremer, G. Kreth, H. Koester, R. H. A. Fink, R. Heintzmann, I. Solovei, D. Zink & C. Cremer, *Chromosome territories, interchromatin domain compartment and nuclear matrix: An integrated view of the functional nuclear architecture*, Crit. Rev. Euk. Gene Expr. **12**(2), 179-212 (2000).
- [TCremer01] T. Cremer & C. Cremer, *Chromosome territories and the functional nuclear architecture*, Nature Reviews **2**, 292-301 (2001).
- [Czarnota97] G. J. Czarnota, D. P. Bazett-Jones, E. Mendez, V. G. Allfrey & P. Ottentmeyer, *High-Resolution Microscopical and Three-Dimensional Nucleosome Structure Associated with Transcribing Chromatin*, Micron **28**(6), 419-431 (1997).
- [DePinho98] R. A. DePinho, *The cancer-chromatin connection*, Nature **391**, 533-536 (1998).
- [Dickey78] F. M. Dickey & T. M. Harder, *Shearing Plate Optical Alignment*, Opt. Eng. **17**(3), 295-298 (1978).

- [Edelmann99a] P. Edelmann, *Confocal Spectral Precision Distance Microscopy for the investigation of the functional 3D structure of the human genome*, Dissertation, Universität Heidelberg (1999).
- [Edelmann99b] P. Edelmann, A. Esa, H. Bornfleth, R. Heintzmann, M. Hausmann & C. Cremer, *Correlation of Chromatic Shifts and Focal Depth in Spectral Precision Distance Microscopy Measured by Micro Axial Tomography*, Proc. SPIE **3568**, 89-95 (1999).
- [Edelmann99c] P. Edelmann, A. Esa, H. Bornfleth, R. Heintzmann, M. Hausmann & C. Cremer, *Correlation of chromatic Shifts and focal Depth in Spectral Precision Distance Microscopy measured by Micro Axial Tomography*, Proc. SPIE **3568**, 89-95 (1999).
- [Edelmann00] P. Edelmann & C. Cremer, *Improvement of confocal Spectral Precision Distance Microscopy (SPDM)*, In: Optical Diagnostics of Living Cells III, Proc. SPIE **3921**, 313-320 (2000).
- [Esa00] A. Esa, P. Edelmann, G. Kreth, L. Trakhtenbrot, N. Amariglio, G. Rechavi, M. Hausmann & C. Cremer, *Three-dimensional spectral precision distance microscopy of chromatin nanostructures after triple-colour DNA labelling: a study of the BCR region on chromosome 22 and the Philadelphia chromosome*, J. Microsc. **199**, 96-105 (2000).
- [Failla01] A. V. Failla, A. Cavallo & C. Cremer, *Subwavelength size determination using spatially modulated illumination virtual microscopy*, zur Veröffentlichung eingereicht (2001).
- [Frohn01] J. T. Frohn, H. F. Knapp & A. Stemmer, *Three-dimensional resolution enhancement in fluorescence microscopy by harmonic excitation*, Opt. Lett. **26**(11), 828-830 (2001).
- [Gu00] M. Gu, *Advanced Optical Imaging Theory*, Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York (2000).
- [Gustafsson95] M. G. L. Gustafsson, D. A. Agard & J. W. Sedat, *Sevenfold improvement of axial resolution in 3D widefield microscopy using two objective lenses*, Proc. SPIE **2412**, 147-156 (1995).
- [Gustafsson96] M. G. L. Gustafsson, D. A. Agard & J. W. Sedat, *3D Widefield Microscopy with Two Objective Lenses: Experimental Verification of Improved Axial Resolution*, Proc. SPIE **2655**, 62 (1996).
- [Gustafsson00] M. G. L. Gustafsson, *Surpassing the lateral resolution limit by a factor of two using structured illumination microscopy*, J. Microsc. **198**, 82-87 (2000).
- [Hänninen95] P. E. Hänninen, S. W. Hell, J. Salo, E. Soini & C. Cremer, *Two-photon excitation 4Pi confocal microscope: Enhanced axial resolution microscope for biological research*, Appl. Phys. Lett. **66**, 1698-1700 (1995).
- [Haken90] H. Haken & H. C. Wolf, *Atom- und Quantenphysik*, Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York (1990).

- [Heintzmann98] R. Heintzmann & C. Cremer, *Laterally Modulated Excitation Microscopy: Improvement of resolution by using a diffraction grating*, Proc. SPIE **3568**, 185-196 (1998).
- [Heintzmann99] R. Heintzmann, *Resolution Enhancement of Biological Light Microscopic Data*, Dissertation, Universität Heidelberg (1999).
- [Heintzmann00] R. Heintzmann, G. Kreth & C. Cremer, *Reconstruction of axial tomographic high resolution data from confocal fluorescence microscopy: a method for improving 3D FISH images*, Anal. Cell. Path. **20**, 7-15 (2000).
- [Hell93] S. W. Hell, G. Reiner & E. H. K. Stelzer, *Aberrations in confocal fluorescence microscopy induced by mismatches in refractive index*, J. Microsc. **169**, 391-405 (1993).
- [Hell94a] S. W. Hell, S. Lindek, C. Cremer & E. H. K. Stelzer, *Measurement of 4pi-confocal point spread function proves 75 nm axial resolution*, Appl. Phys. Lett. **64**(11), 1335-1337 (1994).
- [Hell94b] S. W. Hell & J. Wichmann, *Breaking the diffraction resolution limit by stimulated emission: stimulated-emission-depletion fluorescence microscopy*, Opt. Lett. **19**, 780-782 (1994).
- [Jäckle99] P. Jäckle, *Temperaturstabilisierte Objekthalterung und chromatisches Korrekturlement zur Optimierung eines Zwei-Laser-Wellenfeld Mikroskops*, Diplomarbeit, Universität Heidelberg (1999).
- [Jähne97] B. Jähne, *Digitale Bildverarbeitung*, Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York (1997).
- [Keller95] H. E. Keller, *Objective Lenses for Confocal Microscopy*, In: it Handbook of Biological Confocal Microscopy, Editor: J. B. Pawley, Plenum Press, New York, London, 111-126 (1995).
- [Kingslake78] R. Kingslake, *Lens Design Fundamentals*, Academic Press, New York (1978).
- [Kirsten97] I. Kirsten, *Untersuchungen zur axialen Auflösungsverbesserung am Heidelberger Wellenfeldmikroskop*, Diplomarbeit, Universität Heidelberg (1997).
- [Klar00] T. A. Klar, S. Jakobs, M. Dyba, A. Egner & S. W. Hell, *Fluorescence microscopy with diffraction resolution barrier broken by stimulated emission*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA **97**, 8206-8210 (2000).
- [Knippers95] R. Knippers, *Molekulare Genetik*, G. Thieme-Verlag, Stuttgart (1995).
- [Koberling99] F. Koberling, A. Mews & T. Basche, *Single-dot spectroscopy of CdS nanocrystals and CdS/HgS heterostructures*, Phys. Rev. B **60**(3), 1921-1927 (1999).
- [Konstatinides94] K. Konstatinides & J. Rasure, *The Khoros Software Development Environment for Image and Signal Processing*, IEEE Trans. Image Proc. **3**(3), 243-252 (1994).

- [Krish96] V. Krishnamurthi, B. Bailey & F. Lanni, *Image processing in 3D standing-wave fluorescence microscopy*, Proc. SPIE **2655**, 18-25 (1996).
- [Kroll01] A. Kroll, *Distanzbestimmung zwischen fluoreszenzmarkierten Oligonukleotiden mit Hilfe des Wellenfeldmikroskops*, Diplomarbeit, Universität Heidelberg (2001).
- [Kruglinski98] D. Kruglinski, S. Wingo & G. Shepherd, *Inside Visual C++ 6.0*, Microsoft Press, Redmond (1998).
- [Lacoste00] T.D. Lacoste, X. Michalet, F. Pinaud, D.S. Chemla, A.P. Alivisatos & S. Weiss, *Ultrahigh-resolution multicolor colocalization of single fluorescent probes*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA **97**(17), 9461-9466 (2000).
- [Lakowicz92] J.R. Lakowicz, H. Szmaczinski & K. Nowaczyk, *Fluorescence lifetime imaging*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA **89**, 1271-1275 (1992).
- [Lamond98] A.I. Lamond & W.C. Earnshaw, *Structure and Function in the Nucleus*, Science **280**, 547-553 (1998).
- [Lanni86a] F. Lanni, *Standing-Wave Fluorescence Microscopy*, In: *Applications of Fluorescence in the Biomedical Sciences*, Editoren: D.L. Taylor, A.S. Waggoner, F. Lanni, R.F. Murphy & R.R. Birge, A.R. Liss. Inc., New York, 505-521 (1986).
- [Lanni86b] F. Lanni, A.S. Waggoner & D.L. Taylor, *Standing-wave luminescence microscopy*, US-Patent No. 4 621 911 (1986).
- [Lilley00] D.M.J. Lilley & T.J. Wilson, *Fluorescence resonance energy transfer as a structural tool for nucleic acids*, Cur. Opin. Chem. Biol. **4**, 507-517 (2000).
- [Lindek95] S. Lindek, E.H.K. Stelzer & S.W. Hell, *Two New High-Resolution Confocal Fluorescence Microscopies (4π , Theta) with One- and Two-Photon Excitation*, In: *Handbook of Biological Confocal Microscopy*, Editor: J.B. Pawley, Plenum Press, New York, London, 417-430 (1995).
- [Lipson97] S.G. Lipson, H.S. Lipson & D.S. Tannhauser, *Optik*, Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York (1997).
- [Manders96] E.M.M. Manders, R. Hoebe, J. Strackee, A.M. Vossepoel & J.A. Aten, *Largest Contour Segmentation: A tool for the localization of spots in confocal images*, Cytometry **23**, 15-21 (1996).
- [Marczinzik98] J. Marczinik, *Vergleichsmessungen zur Lokalisationsgenauigkeit in der Hochpräzisionsdistanzmikroskopie an fluoreszenzmarkierten Zellkernen und Kalibrierungsobjekten unter besonderer Berücksichtigung der Mikroaxialtomographie*, Diplomarbeit, Universität Heidelberg (1998).
- [Marriott91] G. Marriott, R.M. Clegg, D.J. Arndt-Jovin & T.M. Jovin, *Time-resolved imaging microscopy. Phosphorescence and delayed fluorescence imaging*, Biophys. J. **60**, 1374-1387 (1991).
- [Melles99] Melles Griot-Katalog, *Shear-Plate Collimation Testers*, 47.12 (1999).

- [Mews00] A. Mews, F. Koberling, T. Basche, G. Philipp, G. Duesberg, S. Roth & M. Burghard, *Raman Imaging of Single Carbon Nanotubes*, *Advanced Materials* **12**(16), 1210-1214 (2000).
- [Nagorni96] M. Nagorni, *Implementierung von X Window Applikationen zur Bildaufnahme und Steuerung am Heidelberger Wellenfeldmikroskop*, Diplomarbeit, Universität Heidelberg (1996).
- [Nielsen01] T. Nielsen, M. Fricke, D. Hellweg & P. Andresen, *High efficiency beam splitter for multifocal multiphoton microscopy*, *J. Microsc.* **201**, 368-376 (2001).
- [Nolting92] W. Nolting, *Grundkurs: Theoretische Physik, 3. Elektrodynamik*, Verlag Zimmermann-Neufang, Ulmen (1992).
- [Pallmann99] D. Pallmann, *Programming bots, spiders, and intelligent agents in Microsoft Visual C++*, Microsoft Press, Redmond (1999).
- [Pawley95] J.B. Pawley, *Handbook of Biological Confocal Microscopy*, Plenum Press, New York, London (1995).
- [Pombo99a] A. Pombo, M. Hollinshead & P.R. Cook, *Bridging the Resolution Gap: Imaging the Same Transcription Factories in Cryosections by Light and Electron Microscopy*, *J. Histochem. Cytochem.* **47**(4), 471-480 (1999).
- [Pombo99b] A. Pombo, D.A. Jackson, M. Hollinshead, Z. Wang, R.G. Roeder & P.R. Cook, *Regional specialization in the nucleus: visualization of discrete sites of transcription by RNA polymerase III*, *EMBO J.* **18**, 2241-2253 (1999).
- [Press92] W.H. Press et al., *Numerical Recipes in C: The Art of Scientific Computing*, Press Syndicate of the University of Cambridge, Cambridge (1992).
- [Rasure91] J. Rasure & C. Williams, *An Integrated Data Flow Visual Language and Software Development Environment*, *J. Vis. Lang. Comp.* **2**, 217-246 (1991).
- [Sandison95] D.R. Sandison, R.W. Williams, K.S. Wells, J. Strickler & W.W. Webb, *Quantitative Fluorescence Confocal Laser Scanning Microscopy (CLSM)*, In: it Handbook of Biological Confocal Microscopy, Editor: J.B. Pawley, Plenum Press, New York, London, 39-53 (1995).
- [Shaw95] P.J. Shaw, *Comparison of Wide-Field/Deconvolution and Confocal Microscopy for 3D Imaging*, In: it Handbook of Biological Confocal Microscopy, Editor: J.B. Pawley, Plenum Press, New York, London, 373-387 (1995).
- [WSchmidt94] W. Schmidt, *Optische Spektroskopie*, VCH Verlagsgesellschaft mbH, D-69451 Weinheim (1994).
- [MSchmidt00] M. Schmidt, M. Nagorny & S.W. Hell, *Subresolution axial measurements in far-field fluorescence microscopy with precision of 1 nanometer*, *Rev. Scient. Instr.* **71**, 2742-2745 (2000).
- [Schneider99a] B. Schneider, *Spatially Modulated Illumination Microscopy*, Dissertation, Universität Heidelberg (1999).

- [Schneider99b] B. Schneider, I. Upmann, I. Kirsten, J. Bradl, M. Hausmann & C. Cremer, *A Dual-Laser, Spatially Modulated Illumination Fluorescence Microscope*, *Microsc. Anal.* **57**(1), 5-7 (1999).
- [Schneider00] B. Schneider, B. Albrecht, P. Jaeckle, D. Neofotistos, S. Söding, T. Jäger & C. Cremer, *Nanocalization measurements in spatially modulated illumination microscopy using two coherent illumination beams*, In: *Optical Diagnostics of Living Cells III*, *Proc. SPIE* **3921**, 321-330 (2000).
- [Schoenle00] A. Schoenle, M. Glatz & S. W. Hell, *Four-dimensional multiphoton microscopy with time-correlated single-photon counting*, *Appl. Opt.* **39**, 6306-6311 (2000).
- [Schrader98] M. Schrader, K. Bahlmann, G. Giese & S. W. Hell, *4Pi-confocal imaging in fixed biological specimen*, *Biophys. J.* **75**, 1659-1668 (1998).
- [Schröder90] G. Schröder, *Technische Optik*, Kamprath. Vogel-Buchverlag, Würzburg (1990).
- [Speicher96] M. R. Speicher, S. Gwyn Ballard & D. C. Ward *Karyotyping human chromosomes by combinatorial multi-fluor FISH*, *Nat. Genet.* **12**, 368-375 (1996).
- [Tinnefeld01] P. Tinnefeld, D.-P. Herten & M. Sauer, *Photophysical Dynamics of Single Molecules Studied by Spectrally-Resolved Fluorescence Lifetime Imaging Microscopy (SFLIM)*, *J. Phys. Chem. A* **105**, 7989-8003 (2001).
- [Trommer96] W. Trommer, J. Hüttermann, P. D. Vogel & J. G. Wise, *Biochemie und Biophysik*, Lehrbrief zum weiterbildenden Fernstudium *Medizinische Physik und Technik*, Universität Kaiserslautern (1996).
- [Tsien95] R. Y. Tsien & A. Waggoner, *Fluorophores for Confocal Microscopy*, In: *Handbook of Biological Confocal Microscopy*, Editor: J. B. Pawley, Plenum Press, New York, London, 267-279 (1995).
- [vanBlaaderen95] A. van Blaaderen & P. Wiltzius, *Real-space structure of colloidal hard-sphere glasses*, *Science* **270**, 1177-1179 (1995).
- [VanOijen98] A. M. Van Oijen, J. Köhler, J. Schmidt, M. Müller & G. J. Brakenhoff, *3-Dimensional super-resolution by spectrally selective imaging*, *Chem. Phys. Lett.* **292**, 183-187 (1998).
- [Wagner01] C. Wagner, *Untersuchungen zur Optimierung von Distanzmessungen am Spatially Modulated Illumination Mikroskop*, Diplomarbeit, Universität Heidelberg (2001).
- [Welford86] W. T. Welford, *Aberrations of Optical Systems*, Adam Hilger, Bristol (1986).
- [Xie01] S. Xie & A. Pombo, in Vorbereitung (2001).

Publikationen

Einige Ergebnisse dieser Arbeit wurden bereits veröffentlicht:

1. B. Albrecht, A. V. Failla, A. Schweitzer & C. Cremer, *Spatially Modulated Illumination Microscopy allows Axial Distance Resolution in the Nanometer Range*, Appl. Opt. **41**(1) (2002).
2. B. Albrecht, A. V. Failla, A. Schweitzer & C. Cremer, *Spatially Modulated Illumination Microscopy - A New Approach to Biological Nanostructure Analysis*, G. I. T. Imag. & Microsc. **3**(2), 40-42 (2001).
3. B. Albrecht, A. V. Failla, R. Heintzmann & C. Cremer, *Spatially modulated illumination microscopy: online visualization of intensity distribution and prediction of nanometer precision of axial distance measurements by computer simulations*, J. Biomed. Opt. **6**(3), 292-299 (2001).
4. B. Albrecht, B. Schneider, A. Schweitzer, A. V. Failla, T. Jäger, A. Kroll, L. Hildenbrand, A. Weisel, M. Hausmann, P. Edelmann & C. Cremer, *Distance Measurements with Axial Precision in the Nanometer Range using Spatially Modulated Illumination Microscopy*, Proc. QMC 2001, 203-207 (2001).
5. B. Albrecht, R. Heintzmann & C. Cremer, *Online visualization of axial intensity distribution in spatially modulated illumination microscopy*, Proc. SPIE, in Druck (2001).
6. B. Schneider, B. Albrecht, P. Jaeckle, D. Neofotistos, S. Söding, T. Jäger & C. Cremer, *Nanocalization measurements in spatially modulated illumination microscopy using two coherent illumination beams*, In: Optical Diagnostics of Living Cells III, Proc. SPIE **3921**, 321-330 (2000).

Danksagung

Zum Schluss dieser Arbeit möchte ich all jenen ganz herzlich danken, die durch ihre Hilfe, kompetente Ratschläge oder aufmunternde Worte wesentlich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben:

- Herrn Prof. Dr. Dr. Christoph Cremer für seine Betreuung und die Möglichkeit, diese Arbeit in der Arbeitsgruppe „Angewandte Optik und Informationsverarbeitung“ des Kirchhoff-Instituts für Physik durchführen zu dürfen
- den anderen Mitgliedern der Arbeitsgruppe Dr. Gregor Kreth, Dr. Jutta Finsterle, Andreas Schweitzer, Heinz Eipel, Antonio Virgilio Failla, Antonio Cavallo, Udo Spöri, Lars Hildenbrand, Johann von Hase und Margund Bach für die gute Arbeitsatmosphäre und stete Hilfsbereitschaft bei kleineren – und größeren – Problemen.

Dies gilt besonders für

- Dr. Jutta Finsterle, Andreas Schweitzer, Dr. Gregor Kreth, Margund Bach, Udo Spöri und Heinz Eipel für das teilweise äußerst aufopferungsvolle Korrekturlesen dieser Arbeit
- Antonio Virgilio Failla für seine Mithilfe bei den Auswertungen und die Erlaubnis, in dieser Arbeit einige seiner Ergebnisse der Größenmessungen und Computersimulationen zeigen zu dürfen
- Andreas Schweitzer, der ebenfalls bei den Auswertungen zur Distanzmessung mitgewirkt hat
- Dr. Michael Hausmann, der einige Kapitel dieser Arbeit durchsah und mir sehr konstruktive Hinweise gab.

Mein Dank gebührt auch den ehemaligen Mitgliedern der Arbeitsgruppe

- Alexander Kroll, Christian Wagner, Andrea Weisel, Thorsten Jäger, Denis Neofotistos, Philippe Jaeckle und Sabine Söding für die Mitarbeit am Projekt
- Dr. Rainer Heintzmann für zahlreiche, äußerst inspirierende Diskussionen
- Dr. Peter Edelmann für Erläuterungen und Hilfestellungen bei der Auswertung
- Dr. Bernhard Schneider, der mir die Anfangszeit im Projekt erleichterte.

Darüberhinaus möchte ich danken

- den Professoren Dr. Jähne, Dr. Weidenmüller und Dr. Spatz für die Anfertigung des Gutachtens und die Teilnahme an der Disputation
- Dr. Ana Pombo, die es mir ermöglichte, einige sehr interessante Messungen an biologischen Objekten durchzuführen
- Dr. Dirk-Peter Herten für Ratschläge bei der Programmierung mit Visual C++
- Herrn Dr. Sommerauer von der Firma AHF, der mich ausführlich über Eigenschaften von dichroitischen Strahlteilern aufklärte
- Herrn Lamade aus der feinmechanischen Werkstatt unseres Instituts für die Anfertigung einiger Bauteile für das SMI-Mikroskop und kompetente Beratungen.

Schließlich danke ich ganz besonders

- meiner Mutter und meinen Geschwistern Melanie und Julian, die mich im Verborgenen immer unterstützten und mir Mut zusprachen
- Axel Jebens, der sich die Mühe machte, die Arbeit genau zu lesen, und mir einige kritische, dafür aber sehr hilfreiche Anregungen gab
- Simone & Hans-Jürgen Wahner, Christiane & Günther Alius, Heiko Theissen, Wolfram Stein, Marcus Oswald, die mir hier und da mit kleinen Tips zur Seite standen.