
Zweifarben-Zweiphotonen STED-Mikroskopie

Christoph Polzer



München 2019

Zweifarben-Zweiphotonen STED-Mikroskopie

Christoph Polzer

Dissertation
an der Fakultät für Physik
der Ludwig-Maximilians-Universität
München

vorgelegt von
Christoph Polzer
aus Mühldorf am Inn

München, den 15.10.2019

Erstgutachter: Prof. Dr. Joachim O. Rädler

Zweitgutachter: Prof. Dr. Thomas W. Hellerer

Tag der mündlichen Prüfung: 09.12.2019

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung	vii
Abstract	ix
1 Einleitung	1
2 Nichtlineare Mikroskopie - Theorie und Konzept	7
2.1 Zweiphotonen-Anregung	8
2.2 Zweifarben-Zweiphotonen-Anregung	11
2.3 Zweiphotonen STED-Mikroskopie	13
2.3.1 Prinzip der nichtlinearen STED-Mikroskopie	13
2.3.2 Phasenmodulation	17
2.4 Theorie zur Fokussierung eines Lasers bei hoher numerischer Apertur . . .	19
2.4.1 Lineare und zirkulare Polarisierung	23
2.4.2 Punktspreizfunktion (PSF) der nichtlinearen STED-Mikroskopie	27
2.5 Zeitdynamik des STED-Prozesses	29
2.6 Auflösung der STED-Mikroskopie	33
3 Entwicklung des Zweifarben-Zweiphotonen STED-Mikroskops	37
3.1 Prinzip	37
3.2 Optischer Aufbau	40
3.2.1 Lasersysteme	40
3.2.2 Mikroskop und Strahlengang	42
3.2.3 Räumlicher Lichtmodulator	49
3.2.4 Phasenmasken	53
3.3 Software und Bildgebung	55
3.3.1 Ablauf Bildaufnahme	56
3.3.2 LabView-Programm zur automatisierten Bildaufnahme	58
3.4 Probensysteme	59
3.4.1 Fluoreszenzfarbstoffe für biologisches System	60
3.4.2 Referenzprobe zur Laserstrahljustage und Charakterisierung	62
3.4.3 Probe zur nichtlinearen Summenfrequenz-Anregung	64

3.4.4	<i>Streptococcus pneumoniae</i> TIGR4	66
3.5	Justage der Laserstrahlen	68
3.5.1	Räumliche Überlagerung und Wellenfrontkorrektur der Laser	68
3.5.2	Zeitliche Überlagerung	70
4	Ergebnisse und Diskussion	73
4.1	Numerische Simulationen	73
4.1.1	Polarisationsabhängigkeit der nichtlinearen Anregung	74
4.1.2	Zweifarb-Zweiphotonen STED-Mikroskopie	78
4.1.3	Lokalisationspräzision der nichtlinearen Anregung	80
4.2	Zweiphotonen-STED an Nanobeads	82
4.3	Zeitdynamik des STED-Prozesses	91
4.4	Charakterisierung der nichtlinearen Anregung	96
4.4.1	Summenfrequenz-Anregung mit $\text{Fe}(\text{IO}_3)_3$	96
4.4.2	Nichtlineare Fluoreszenz-Anregung	98
4.5	Zweifarb-Zweiphotonen STED-Mikroskopie von <i>Streptococcus pneumoniae</i> Pilus Typ-1	100
5	Ausblick	105
A	Integrale zur Berechnung der Punktspreizfunktionen	109
B	Fluoreszenzfarbstoffe	113
C	Liste der Publikationen	117
C.1	Veröffentlichungen in Fachzeitschriften	117
C.2	Patente und Patentanmeldungen	117
C.3	Konferenzartikel	118
C.4	Artikel	118
	Literaturverzeichnis	119
	Danksagung	129

Zusammenfassung

Die Fluoreszenzmikroskopie stellt eine essentielle Untersuchungsmethode in der biomedizinischen Forschung dar und ermöglicht in Kombination mit der supraauflösenden Mikroskopie funktionelle und strukturelle Analysen auf intrazellulärer Ebene. Zur Visualisierung komplexer Interaktionen unterschiedlicher biologischer Komponenten des Systems werden Methoden der Kolo-kalisation angewendet. Die wesentliche Herausforderung besteht in der exakten und stabilen räumlichen Überlagerung der Fokalvolumina auf der Nanometerskala. Zur Lösung des Problems, wird im Rahmen dieser Arbeit eine neue supraauflösende Mikroskopiemethode für die Kolo-kalisation entwickelt und untersucht. Dadurch wird eine stabile und exakte Überlagerung bei multispektraler Anregung auf dieser Größenskala erzielt, wobei zusätzlich die Komplexität gegenüber bisheriger Techniken reduziert wird.

Der neue Ansatz verwendet eine optisch nichtlineare Anregungsgeometrie zusammen mit der *Stimulated Emission Depletion* Mikroskopie (STED) und ermöglicht die exakte räumliche Überlagerung der Bilddaten. Mit Hilfe zweier synchronisierter, gepulster Laser erfolgt die konfokale Mikroskopie basierend auf einer Zweifarben-Zweiphotonen (2C2P) Anregung. Nachfolgend wird mit der gleichen Laserkombination auch eine Zweiphotonen (2P) STED-Bildgebung realisiert. Beide Laser sind in jeden Bildgebungsprozess involviert, wobei zwischen den Methoden ohne Änderungen am optischen Strahlengang gewechselt wird. Dadurch bildet sich eine intrinsische Referenz zwischen den Bilddaten beider Aufnahmemodi aus. Dies löst das Problem der schwierigen und fehleranfälligen Überlagerung in der Kolo-kalisionsmikroskopie. Die Methode (2C2P-STED) sieht zuerst die probenschonende, konfokale Mikroskopie des Gesamtsystems vor und bietet nachfolgend die Möglichkeit, supraaufgelöste Bilddaten einer Substruktur von Interesse mit exakter Lokalisierung zu generieren.

Für die Entwicklung von 2C2P-STED wird ein hochspezialisierter optischer Aufbau unter Verwendung eines räumlichen Lichtmodulators (SLM) entwickelt und charakterisiert. Der Aufbau ist hierbei für die nichtlineare Mikroskopie mit Laserwellenlängen von $\lambda_1 = 1034\text{nm}$ und $\lambda_2 = 775\text{ nm}$ ausgelegt. Die vollständige Automatisierung der korrelativen Mikroskopie, welche beide Bildgebungen beinhaltet, wird durch eine spezielle Elektronik sowie durch das eigens entwickelte LabView-Programm realisiert. Die nichtlineare Anregung verwendet stark unterschiedliche Pulsdauern beider Laser. Ebenso besteht eine hohe Kolo-kalisation nur, wenn der 2C2P-Anregung gegenüber konkurrierender Prozesse, wie eine direkte 2P-Anregung aus einer der beiden Laser, keinen signifikanten Anteil haben. Sie wird daher ex-

perimentell über Zweifarben-2P – im Vergleich zu Einfarben-2P-Anregung - eingehend untersucht. Dabei wird demonstriert, dass eine äußerst spezifische 2C2P-Fluoreszenzanregung mit einem Signal-zu-Rausch-Verhältnis größer 10 möglich ist. Die exakte zeitliche Abstimmung der gepulsten Laser findet durch die Messung der Dynamik der stimulierten Abregung an einem Fluorophor statt.

Die Polarisationsabhängigkeit der 2C2P-Anregung und die mit dieser Methode erzielbare Lokalisationspräzision, werden mittels numerischer Simulation untersucht. Als Ergebnis findet sich eine Präzision der Lokalisation mit den in dieser Arbeit verwendeten Wellenlängen von $\pm 30,5$ nm. Mit einem um die nichtlineare Anregung erweiterten Ratengleichungssystem bestehend aus gekoppelten Differentialgleichungen, wird die Dynamik der stimulierten Abregung simuliert. Damit wird der optimale zeitliche Pulsabstand für die stimulierte Abregung gefunden. Aus dem Vergleich mit den experimentellen Daten werden zudem molekülspezifische Parameter, wie der STED-Wirkungsquerschnitt des Fluorophors, extrahiert.

2C2P-STED wird an dem biologischen System *Streptococcus pneumoniae* TIGR4 und der Substruktur Pilus Typ-1 eingesetzt. Pili sind haarähnliche Oberflächenstrukturen und stellen einen Virulenzfaktor dieses humanen Pathogens dar. Es konnten erstmals mit optischen Methoden Details der Pili mit einer Auflösung von 70 nm gezeigt werden, wobei sich eine Lokalisation der Pili an den Polen sowie im Bereich des Teilungsseptums findet.

Die gewonnenen Resultate dieser Arbeit ermöglichen den Zugang zur detaillierten, multi-spektralen Strukturanalyse auf einer Größenskala von weniger als 100 nm mit gleichzeitiger Lokalisationspräzision im Bereich weniger 10 nm. Im Vergleich zu bestehenden Ansätzen konnte die Komplexität mit der Verwendung von nur noch zwei Lasersystemen deutlich reduziert werden. Das große Potential der 2C2P-STED-Mikroskopie sowie die Neuheit des Ansatzes spiegeln sich in einer Fachveröffentlichung im Journal *Biomedical Optics Express* aber auch in der Anmeldung eines Patents wieder.

Abstract

Fluorescence microscopy is an essential method in biomedical research and enables in combination with super-resolution microscopy functional and structural investigation at the intracellular level. For the visualization of complex interactions of different biological components of the system, methods of colocalization are necessary. However, the challenge is the exact and stable spatial overlay of the different focal volumes on the nanometer scale. In this thesis a new super-resolution microscopy method for colocalization is developed and investigated. The technique solves the problem of superposition in multispectral excitation in the nanometer scale regime and reduces complexity compared to previous methods.

The new approach applies optically nonlinear excitation combined with *Stimulated Emission Depletion* microscopy (STED) and enables the exact spatial superimposition of the imaging data. Confocal imaging based on two-color two-photon (2C2P) excitation is performed using two synchronized pulsed lasers. Subsequently, two-photon (2P) STED imaging is realized with the same laser combination. Both lasers are involved in the different imaging processes and do not experience any changes in the optical path during imaging. This forms an intrinsic reference between the image data of both capturing modes and solves the problem of difficult and error-prone overlay in colocalization microscopy.

Fristly, the method (2C2P-STED) provides confocal imaging of the biological complex and subsequently allows the generation of super-resolved images of a substructure of interest with exact localization. For the development of 2C2P-STED a highly specialized optical setup employing a spatial light modulator (SLM) is developed and characterized. The setup is designed for nonlinear microscopy with laser wavelengths of $\lambda_1 = 1034$ nm and $\lambda_2 = 775$ nm. The full automation of the colocalization microscopy, which includes both imaging modalities, is realized through dedicated electronics and a home-built LabView program. The nonlinear excitation is enabled by a combination of different pulse durations in the range from femtoseconds to several tens of picoseconds. Moreover, high colocalization occurs only if 2C2P excitation competing processes, such as direct 2P excitation from one of the lasers, do not contribute significantly to the signal. Therefore, two-color 2P and single-color 2P excitation are investigated in detail. It is demonstrated that highly specific 2C2P fluorescence excitation with a signal-to-noise ratio greater than 10 is possible. The exact timing of the pulsed lasers takes place by measuring the dynamics of the stimulated excitation on a fluorophore.

The polarization dependence of the 2C2P excitation and the localization precision achie-

vable with this method are investigated by means of numerical simulations. With the wavelengths used in this work, the localization precision accounts for ± 30.5 nm. A system of rate equations consisting of coupled differential equations is extended by the nonlinear excitation and is used for calculating the dynamics of the stimulated emission depletion. Thus, the optimal temporal pulse interval for the stimulated emission is found. In addition, molecular-specific parameters, such as the STED cross-section of the fluorophore, are extracted by comparison with the experimental data.

2C2P-STED is used on the biological system *Streptococcus pneumoniae* TIGR4 and the substructure pilus type-1. Pili are hair-like surface structures and represent a virulence factor of this human pathogen. For the first time it was possible to show details of the pili with optical resolution of 70 nm and allows for finding a pili localization at the poles and in the region of the dividing septum.

The results obtained in this work enable access to detailed, multispectral structural analysis on a size scale of less than 100 nm with simultaneous localization precision in the range of a few 10 nm. Compared to existing approaches, the complexity could be significantly reduced by using only two laser systems. The great potential of 2C2P-STED microscopy and the novelty of the approach are reflected in a publication in the journal *Biomedical Optics Express* but also in the application for a patent.

Abbildungsverzeichnis

2.1	Vergleich der 1P-Anregung und der 2P-Anregung in der Fluoreszenzmikroskopie	9
2.2	3D 2P-Mikroskopie an TCSPC Zellen	10
2.3	2C2P-Anregung in der Fluoreszenzmikroskopie	12
2.4	Prinzip der 2P-STED-Mikroskopie	17
2.5	Vortex- und π -Phasenmaske	19
2.6	Koordinatensystem und Variablen der vektoriellen Theorie fokussierter Laserstrahlung	21
2.7	Zernike-Polynome	23
2.8	Erläuterung zur Polarisations-Transformationsmatrix	25
2.9	Modell zur Simulation der Zeitdynamik von STED.	30
3.1	Prinzip der 2C2P-STED-Mikroskopie	39
3.2	Optisches Setup des 2C2P-STED Mikroskops	43
3.3	Spektraler Detektionsbereich für Laser- und Probenscanning	47
3.4	Funktionsweise PSD	48
3.5	Funktionsweise des räumlichen Lichtmodulators (SLM)	50
3.6	Prinzip des SLM - Hologramm	52
3.7	Beugung am Gitter mittels SLM	53
3.8	Vortex- und π -Phasenmaske für die STED-Mikroskopie zur Projektion auf SLM	55
3.9	LabView-Ablaufsteuerung	56
3.10	Laserparameter für 2C2P-STED	57
3.11	LabView-Programmoberfläche zur automatisierten Bildaufnahme	58
3.12	Fluoreszenzspektren ATTO425 und AlexaFluor594	61
3.13	Fluoreszenzspektrum Crimson	63
3.14	Organisation und Aufbau des Pilus Typ-1	67
3.15	Jablosnki-Diagramm zur Darstellung der direkten 2P-Anregung für die Laserstrahljustage	69
3.16	Graustufenbilder zur Phasenmodulation für SLM mit Vortex und Astigmatismus	70
3.17	STED-Prinzip der zeitlichen Überlagerung	71

4.1	Polarisationsabhängigkeit der Anregung	77
4.2	Simulation der Punktspreizfunktionen bei 2C2P-STED	79
4.3	Einfluss der Überlagerung auf die nichtlineare Anregung	81
4.4	Halbwertsbreite bei Pulsversatz der 2C2P-Anregung	82
4.5	Räumliche Überlagerung zwischen Anregung und Abregung	83
4.6	Kompensation des Astigmatismus mit überlagertem Vortex	84
4.7	Zeitliche Überlagerung für STED mit 200 nm Crimson Beads	86
4.8	STED-Strahljustage mit 200 nm Crimson Beads	88
4.9	STED-Justage lateral mit Crimson 200 nm Beads mittels Sample-Scanning.	89
4.10	STED-Justage axial an Crimson 200 nm Beads mittels Sample-Scanning. .	90
4.11	Verlauf der Fluoreszenzintensität in Abhängigkeit des STED-Laserpulses: Vergleich Simulation mit Experiment.	93
4.12	Verlauf der Fluoreszenzintensität mit Variation verschiedener Simulations- Parameter	95
4.13	Charakterisierung des STED-Laserpulses im Kurzpulsmodus	97
4.14	2C2P-Anregung und konkurrierende 2P-Direktanregungen	98
4.15	Charakterisierung der Fluoreszenzanregung	99
4.16	2C2P-STED Bildgebung an <i>Streptococcus pneumoniae</i> TIGR4	102
4.17	Organisation der Pili von <i>Streptococcus pneumoniae</i> TIGR4	103
B.1	Übersicht über die nichtlineare Anregung verschiedener Fluorophore	114

Tabellenverzeichnis

3.1	Lasersysteme	41
3.2	Scanner-Systeme	45
3.3	Filterliste	46
4.1	Simulationsparameter Intensitätsverteilungen im Fokus	75
4.2	Simulationsparameter Zeitdynamik	92

Abkürzungsverzeichnis

1P	Einphotonen
2P	Zweiphotonen
2P-STED	Zweiphotonen Stimulierte-Emissions-Abregungs-Mikroskopie
2C2P	Zweifارben-Zweiphotonen
2C2P-STED	Zweifarben-Zweiphotonen Stimulierte-Emissions-Abregungs-Mikroskopie
2D	Zweidimensional
3D	Dreidimensional
AFM	Rasterkraftmikroskopie (<i>Atomic Force Microscopy</i>)
CARS	Kohärente Anti-Stokes Raman Streuung (<i>Coherent Anti-Stokes Raman Scattering</i>)
CGH	Computer generiertes Hologramm
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
Er	Erbium
FLIM	Fluoreszenzlebensdauer-Mikroskopie (<i>Fluorescence Life-Time Imaging Microscopy</i>)
GDD	Gruppen-Geschwindigkeits-Dispersion (<i>Group Velocity Dispersion</i>)
IFT	Inverser Fourier-Transformations-Algorithmus
ITO	Indiumzinnoxid
Kryo-EM	Kryoelektronenmikroskopie
LHP	Linear horizontal polarisiert
LVP	Linear vertikal polarisiert

LCP	Links zirkular polarisiert
RCP	Rechts zirkular polarisiert
NA	Numerische Apertur
NIR	Nahinfrarot
OD	Optische Dichte
PALM	Photoaktivierte Lokalisationsmikroskopie (<i>Photo-activated Localization Microscopy</i>)
PMT	Hochsensitiver Photonendetektor (<i>Photomultiplier Tube</i>)
PSD	Pikosekunden-Verzögerer (<i>Picosecond Delayer</i>)
PSF	Punktspreizfunktion (<i>Point Spread Function</i>)
REM	Rasterelektronenmikroskop
RGS	Resonanz-Galvo-Scanner
ROI	Näher betrachteter Bereich (<i>Region of Interest</i>)
SLM	Räumlicher Lichtmodulator (<i>Spatial Light Modulator</i>)
SNR	Signal-zu-Rausch-Verhältnis (<i>Signal-to-Noise Ratio</i>)
SPR	Oberflächen Plasmonen Resonanz (<i>Surface Plasmonic Resonance</i>)
STED	Stimulierte-Emissions-Abregungs-Mikroskopie (<i>Stimulated Emission Depletion Microscopy</i>)
STROM	Stochastische optische Rekonstruktionsmikroskopie (<i>Stochastic Optical Reconstruction Microscopy</i>)
TEM	Transmissionselektronenmikroskop
TPEF	Zweiphotonen Fluoreszenz (<i>Two-photon Excited Fluorescence</i>)
Yb	Ytterbium

Kapitel 1

Einleitung

In der biomedizinischen Forschung ist die räumliche Struktur oder die Anordnung einzelner Komponenten oft ein wichtiger Indikator, um die Rolle bzw. die Funktion der Komponente innerhalb des Systems zu erkennen [1]. Wie bereits der gängige Ausspruch „*Seeing is believing*“ ausdrückt, stellt die Visualisierung biologischer Strukturen eine der wichtigsten analytischen Methoden, auch in der biomedizinischen Grundlagenforschung, dar. Eine bildgebende Methode alleine reicht allerdings nicht aus, um ein komplexes biologisches System vollständig aufklären zu können. Vielmehr ist die Wahl einer Kombination verschiedener Methoden eine notwendige Voraussetzung und manchmal auch der Schlüssel, für eine erfolgreiche Untersuchung. Daher wird seit jeher die Entwicklung vor allem der optischen Mikroskopie kontinuierlich vorangetrieben. Zunehmend werden aber auch Methoden entwickelt, welche verschiedene Techniken des bildgebenden Spektrums zusammenführen. Dies hat zum Ziel, aus der Kombination der Vorteile und Stärken der jeweiligen Techniken zu profitieren. Die Vorteile können in einer hohen Auflösung, einer schnellen Bildgebung oder aber in der Möglichkeit der Untersuchung lebender Proben, liegen. Ein solcher Ansatz wird als korrelative Mikroskopie bezeichnet und erlaubt sowohl die strukturelle als auch die funktionelle Untersuchung einzelner Komponenten biologischer Systeme [2, 3].

Die Anwendung eines solchen korrelativen Ansatzes zeigt sich zum Beispiel in der Erforschung des kürzlich pandemisch aufgetretenen Zika-Virus [4, 5], welcher neurologische Schäden, wie der Mikrozephalie an ungeborenen Kindern [6–8], hervorruft. Der Ansatz der multimodalen und korrelativen Bildgebung hat einen wesentlichen Beitrag zur Strukturaufklärung und dem Verständnis der Reproduktionsmechanismen des Virus geliefert. Ebenso konnten Auswirkungen des Virus auf menschliche Zellen gezeigt und damit eine mögliche Behandlungsstrategie abgeleitet werden [9]. Das wachsende Spektrum bildgebender Techniken führt jedoch zu einer immer größer werdenden Herausforderung der technischen Umsetzung. Nur wenn eine Vielzahl von Personen verschiedenster Fachrichtungen in der Lage ist, das breite Spektrum zu nutzen, kann auch das Potential moderner Analysemethoden voll ausgeschöpft werden. Methodische Weiterentwicklungen bestehender Prinzipien sind ein wesentlicher Bestandteil gegenwärtiger Entwicklungen und haben zum Ziel, Verfahren zu vereinfachen und deren Anwendungsbereiche zu erweitern. Die korrelative Mikrosko-

pie verbindet Techniken, wie die Transmissionselektronenmikroskopie (TEM) [10, 11] oder die Kryoelektronenmikroskopie (Kryo-EM) [12] mit optischen Methoden, wie der konfokalen Mikroskopie [13, 14]. Die aufwendige Probenpräparation, Einschränkungen in der Lebendzellbildgebung sowie die komplexen Apparaturen der höchstauflösenden Bildgebung limitieren allerdings deren Einsatz. Für eine Vielzahl von Anwendungen stellt daher die Kombination zweier optischer Methoden eine gute Möglichkeit dar, wenn eine supraauflösende mit einer konfokalen Mikroskopiemethode verknüpft wird. Eine solche Kombination birgt den Vorteil, dass eine erste, probenschonende Analyse über die konfokale Mikroskopie stattfindet. Die supraauflösende Mikroskopie erlaubt in einer zweiten Bildgebung die Unterschreitung der ABBE'schen Beugungsgrenze [15], welche lange als fundamentales Limit der Auflösung der optischen Mikroskopie galt. Die wichtigsten Methoden der supraauflösenden Mikroskopie sind die stochastische Rekonstruktionsmikroskopie (STORM, *Stochastic Optical Reconstruction Microscopy*, engl.) [16], die photoaktivierte Lokalisationsmikroskopie (PALM, *Photo-activated Localization Microscopy*, engl.) [17] sowie die stimulierte Emissions Mikroskopie (STED, *Stimulated Emission Depletion Microscopy*, engl.) [18]. Die Relevanz der Mikroskopie unterhalb der Beugungsgrenze und des technischen Fortschritts, zeigt sich auch in der Würdigung mit dem Nobelpreis für Chemie im Jahre 2014 für STEFAN HELL, ERIC BETZIG und WILLIAM MOERNER [19]. Mit der supraauflösenden Mikroskopie besteht für Forschende nun die Möglichkeit, die Brücke zwischen der höchstauflösenden (zum Beispiel TEM, Kryo-EM) und der beugungsbegrenzten Bildgebung zu schlagen. Zudem vereinfacht sich durch den Einsatz zweier optischer Methoden die Probenpräparation wesentlich, wonach ein möglichst nativer Zustand der Probe erhalten werden kann und sogar die Bildgebung lebender Organismen möglich ist. Wichtig zu erwähnen ist, dass bei allen supraauflösenden Mikroskopie-Methoden immer eine beugungsbegrenzte Laserstrahlung oder Beleuchtung eingesetzt wird. Allerdings ist das Resultat dieser Bildgebungen nicht durch die Beugungsgrenze limitiert. In dieser Arbeit wird daher unter beugungsbegrenzter Abbildung oder Bildgebung die konfokale Auflösung verstanden. Es gibt vorwiegend zwei unterschiedliche Grundideen, welche die supraauflösende Mikroskopie ermöglichen. Jede für sich bietet dabei spezielle Vorteile und je nach Anwendung, auch Einschränkungen. Die Techniken können in Bezug auf die Signalerzeugung in stochastische und deterministische Methoden unterteilt werden: Während STORM und PALM den stochastischen Ansätzen zuzuordnen sind und die Signalentstehung zufällig innerhalb der Probe stattfindet, ist STED eine deterministische Methode. In dieser Arbeit wird ausschließlich die STED-Mikroskopie verwendet und daher nur auf diese eingegangen.

Die STED-Mikroskopie bietet für einen rein optischen, korrelativen Ansatz eine Reihe spezieller und vorteilhafter Eigenschaften. Aufgrund des deterministischen Ansatzes ist eine schnelle und zielgerichtete Untersuchung möglich und kann somit auch für die dreidimensionale (3D) Lebendzellbildgebung eingesetzt werden [20–23]. Bei STED werden typischerweise zwei Lasersysteme eingesetzt: Der erste Laser dient zur Fluoreszenzanregung, wohingegen der zweite Laser die stimulierte Abregung eines Bereichs radial zum Zentrum des beugungsbegrenzten Anregungsvolumens induziert [24]. Damit wird das effektive Fluoreszenzvolumen eingeschnürt und erreicht Werte unterhalb der Beugungsgrenze. Die Auf-

lösungsverbesserung hängt nur noch von der STED-Laserleistung ab [25], wodurch bereits Werte von wenigen Nanometern erzielt wurden [26]. Neben den Vorteilen, wie der schnellen und definierten Bildgebung, besteht allerdings eine große Herausforderung darin, beide in die Bildgebung involvierten Laser räumlich und zeitlich im Fokus eines Mikroskopobjektivs zu überlagern. Zur Untersuchung einer Struktur, welche spezifisch mit einem Fluoreszenzfarbstoff markiert ist, werden zwei Laserwellenlängen für die supraaufgelöste Bildgebung verwendet. Wird ein zweiter Fluoreszenzfarbstoff hinzugenommen, ist bereits eine zweite Anregungswellenlänge und ggf. ein weiterer Laser für die stimulierte Abregung notwendig. Dies führt dazu, dass mindestens drei, aber auch bis zu vier unterschiedliche Laserstrahlen räumlich und zeitlich exakt im Fokus überlagert werden müssen. Bei STED findet eine punktuelle Bildgebung über Abtastung des Objekts durch einen Laser- oder Proben-Scanner statt. Die erzeugten Signale werden über einen Punktdetektor erfasst und am Computer durch Zuordnung zur Scanner- bzw. Probenposition zu einem Bild aufgebaut. Werden zwei Fluoreszenzfarbstoffe verwendet, werden auch zwei Detektionsstrahlengänge benötigt. Dies hat aber den Nachteil, dass in Kolokalisationsexperimenten die Zuordnung der Signale nur aus der Zuordnung der Scannerposition zum Zeitpunkt der Signaldetektion stattfindet. Wenn also die Laser nicht unter exakt dem gleichen Winkel in das Objektiv eintreten, könnte im Fokus eine räumliche Abweichung der Laserfoki zueinander vorliegen. Ebenso können chromatische Aberration oder eine abweichende Divergenz zwischen den Laserstrahlen zu unterschiedlichen Fokuslagen führen. Nach dem Prinzip der Laser-Mikroskopie entstehen so möglicherweise Signale an unterschiedlichen Orten, welcher aber der gleichen Position zugewiesen werden. Die exakte Zuordnung der Signale ist allerdings essentiell für die Bewertung von korrelativen oder Kolokalisationsmessungen.

Im Sinne der korrelativen Mikroskopie wäre es also wünschenswert, wenn die mittels unterschiedlichen Methoden generierten Bilddaten über einen gemeinsamen physikalischen Prozess miteinander verbunden sind. Damit kann, im Rahmen bestimmter Grenzen, die Zuordnung der Signale unterschiedlicher Fluorophore von der Qualität der Laserstrahlüberlagerung entkoppelt werden. Die nichtlineare Mikroskopie und im Speziellen die Zweiphotonen-Absorption (2P-Absorption), könnte hier ein geeigneter Ansatz sein, da die räumliche Signalentstehung aufgrund nichtlinearer Effekte auf ein wohldefiniertes Volumen beschränkt ist. Die Zweiphotonen-Absorption, welche erstmals 1931 von Maria Göppert-Mayer theoretisch beschrieben wurde [27], wird in der Mikroskopie seit Einführung durch Denk und Webb [28] im Jahre 1990 häufig eingesetzt und gewinnt immer mehr an Bedeutung. Dies liegt nicht zuletzt an Vorteilen, wie einer intrinsisch hohen axialen Auflösung oder geringeren Phototoxizität, welche durch die verwendeten Wellenlängen im nahinfraroten Spektralbereich (NIR) gegeben sind [29].

Die STED-Mikroskopie wurde bereits in Kombination mit einer Zweiphotonen-Anregung demonstriert [30] und wird als 2P-STED abgekürzt. Hier zeigt sich ein weiterer Vorteil der nichtlinearen Mikroskopie, da durch geschickte Abstimmung der Fluoreszenzfarbstoffe auf die Laserwellenlänge lediglich eine Wellenlänge sowohl für die 2P-Anregung als auch für die stimulierte Abregung verwendet werden kann [31, 32]. Allerdings ist auch hier das

Problem der Überlagerung der Laserfoki, insbesondere im Falle einer multispektralen Anregung nicht gelöst: Der Laser wird bei 2P-STED in zwei Teilstrahlen aufgeteilt, welche eine unterschiedliche räumliche und zeitliche Modulation erfahren und anschließend im Fokus wieder zusammengeführt werden. Diese Überlagerung ist allerdings rein geometrischer Natur und An- und Abregung sind voneinander getrennte Prozesse.

Die allgemeine Form der Zweiphotonen-Absorption, die Zweifarben-Zweiphotonen-Absorption (2C2P, *Two-Color Two-Photon*, engl.), wird ebenfalls zunehmend in der multimodalen Bildgebung eingesetzt [33–37] und bringt den inhärenten Vorteil mit sich, dass die Absorption zweier Photonen unterschiedlicher Wellenlänge nur im Falle des exakten räumlichen und zeitlichen Überlapps stattfindet. Auf die Fluoreszenzmikroskopie übertragen hat das zur Folge, dass ein Fluoreszenzsignal innerhalb der Probe nur dann erzeugt wird, wenn eine ausreichend hohe Qualität der Überlagerung beider Laserfoki besteht. Das Konzept kann nun dahingehend erweitert werden, dass zum einen die Kombination zweier Laser einen Fluoreszenzfarbstoff anregt, einer der beiden Laser jedoch auch einen zweiten Fluoreszenzfarbstoff an exakt dem gleichen Ort anregt. Dadurch bildet sich eine intrinsische Referenz zwischen den Bilddaten zwischen den unterschiedlichen Anregungsprozessen aus, da mindestens einer der Laser in jeden Bildgebungsprozess involviert ist. Aufgrund der nichtlinearen Anregung wird der Ort der Signalerzeugung um den Bereich des Überlapps beider Laserfoki intrinsisch zentriert. Auf die STED-Mikroskopie bezogen, lässt sich mit dieser Methode eine 2C2P-Anregungsgeometrie mit 2P-STED verknüpfen, so dass eine korrelative bzw. kolokalisationsmikroskopische Aufnahme mit intrinsischer Referenz erzeugt werden kann. Ein solcher Ansatz löst das Problem der komplexen Überlagerung der Laserfoki sowie der generierten Bilddaten und ermöglicht es mit nur zwei Lasersystemen zwei oder mehr Fluoreszenzfarbstoffe, teils mit Superauflösung, darzustellen. Um die Vorteile beider Methoden zu nutzen, bietet sich eine Kombination der 2C2P-Anregung mit der 2P-Anregung zu einer Zweifarben-Zweiphotonen STED-Mikroskopie (2C2P-STED) an.

In dieser Arbeit wird das Konzept der **2C2P STED**-Mikroskopie entwickelt und die Erweiterung der STED-Mikroskopie auf diese nichtlineare Methode erbracht. Dabei wird die Herausforderung der Kombination zweier Laserpulse mit stark unterschiedlicher Pulsdauern von Femto- und Pikosekunden genommen und die nichtlineare Anregung sowie stimulierte Abregung charakterisiert. Die Grundlagen für diese Technik werden mit numerischen Methoden und Experimenten erarbeitet und diskutiert. Die Theorie zur Zweifarben-Zweiphotonen-Absorption und deren Anwendung in der Mikroskopie findet sich in **Kapitel 2**, wobei im Speziellen die theoretischen Konzepte der 2P STED-Mikroskopie beschrieben werden sowie die Theorie zur Berechnung der Intensitätsverteilung eines fokussierten Laserstrahls mit Objektiven hoher numerischer Apertur. Das Konzept der 2C2P-STED Mikroskopie ist in **Kapitel 3** ausführlich erläutert. Der voll-elektronische Ansatz erlaubt eine vollständig automatisierte Bildgebung und verwendet einen räumlichen Lichtmodulator (SLM) zur Phasenmodulation der STED-Laserwellenfront. Hierzu ist die Funktionsweise des SLM erläutert und dessen Einsatz in der STED-Mikroskopie beschrieben. Durch Erzeugung eines Hologramms und verschiedener Phasenmasken, wird die vielseitige Ein-

satzmöglichkeit des SLMs dargestellt. In der nichtlinearen STED-Mikroskopie stellen die verwendeten Fluoreszenzfarbstoffe sowie die Methode der Probenpräparation einen kritischen Parameter dar. Daher wird in diesem Kapitel ausführlich auf die Anforderungen sowie die Methodik der Präparation für verschiedene Probensysteme eingegangen. Die Ergebnisse der numerischen Simulation sowie der experimentellen Untersuchung finden sich in **Kapitel 4**. Simulationsergebnisse beinhalten die Untersuchung der Polarisationsabhängigkeit der nichtlinearen Anregung und die zu erzielenden Auflösungen bei 2C2P-STED. Die Zeitdynamik des STED-Prozesses wird experimentell sowie mittels eines Modells gekoppelter Differentialgleichungen numerisch untersucht. Daraus findet sich ein Optimum für die stimulierte Abregung in Abhängigkeit unter anderem der Laserleistung, des zeitlichen Pulsabstands zwischen An- und Abregung sowie des Fluorophors selbst. Aus dem Vergleich der experimentellen Daten mit den numerischen Ergebnissen, können molekülspezifische Parameter, wie Absorptionswirkungsquerschnitte oder Fluoreszenzlebensdauern extrahiert werden. Ebenso werden die nichtlineare Anregung über die Summenfrequenz und die Fluoreszenz experimentell charakterisiert. Im letzten Teil dieser Arbeit wird das Konzept von 2C2P-STED an dem Gram-positiven Bakterium *Streptococcus pneumoniae* angewendet. Hierbei wird der Pilus Typ-1 des Bakterienstamms TIGR4 mit Superauflösung untersucht. Pili sind haarähnliche Oberflächenstrukturen des Pathogens und fördern den Infektionsprozess der Wirtszellen, aber auch die Interaktion der Bakterien untereinander [38–40]. Die im Rahmen dieser Arbeit gewonnen Erkenntnisse entwickeln das Verständnis der nichtlinearen Zweifarben-Zweiphotonen-Mikroskopie wesentlich weiter und ermöglichen die Erweiterung der supraauflösenden Mikroskopie zu einer korrelativen Methode mit intrinsischer Bildüberlagerung. In dieser Arbeit sind erstmals supraaufgelöste Bilddaten von *Streptococcus pneumoniae* TIGR4 Pilus Typ-1 entstanden, wodurch neue Einblicke hinsichtlich der Lokalisation der Pili an der Zelloberfläche gewonnen werden.

Kapitel 2

Nichtlineare Mikroskopie - Theorie und Konzept

MARIA GÖPPERT-MAYER postulierte in ihrer Dissertation von 1931 [27] die simultane Absorption zweier Lichtquanten (Photonen) mit der Folge einer elektronischen Anregung eines Atoms. Diese Art der Wechselwirkung ist allerdings mit einer sehr geringen Wahrscheinlichkeit behaftet [41], so dass erst die Erfindung des Lasers durch T. MAIMAN im Jahre 1960 [42] die experimentelle Umsetzung erlaubte. Mit der Möglichkeit ausreichend hohe Lichtintensitäten zu erzielen, wurden erste nichtlineare Effekte, wie beispielsweise die Frequenzverdopplung durch P. FRANKEN [43] und die Zweiphotonen-Anregung durch KAISER und GARETT [44], gezeigt. Die Notwendigkeit einer hohen Intensität kann aber gerade in der Fluoreszenz-Mikroskopie einen Vorteil bringen, da nur im Fokus eines Mikroskopobjektivs die Intensität ausreichend hoch ist, um eine 2P-Anregung herbeizuführen [28]. Dies führt zu einer intrinsisch dreidimensional beugungsbegrenzten Auflösung ohne eine Lochblende im Detektionsstrahlengang verwenden zu müssen, wie dies in der konfokalen Mikroskopie der Fall ist. Im Folgenden werden wichtige Einflussfaktoren auf die effiziente 2P-Absorption sowie deren Verallgemeinerung - die Zweifarben-Zweiphotonen Absorption - dargestellt. Darüber hinaus wird auf das Prinzip der supraauflösenden Mikroskopie und deren Auflösung eingegangen. Weiter wird die vektorielle Theorie zur Berechnung der elektrischen Feldverteilung im Fokalsvolumen für die nichtlinearen Anregungsprozesse sowie für die STED-Mikroskopie dargelegt und erläutert. Dabei wird im Speziellen auf unterschiedliche Polarisierungen sowie auf Wellenfrontmodulationen des einfallenden Laserstrahls vor der Fokussierung eingegangen. Sowohl die nichtlineare Absorption als auch der STED zugrunde liegende Prozess, weisen energetische Übergangsdynamiken auf. Diese Interaktionen werden für 2P-STED mit Hilfe eines um die nichtlineare Anregung erweiterten Ratengleichungssystems beschrieben und sind in diesem Kapitel dargestellt.

2.1 Zweiphotonen-Anregung

Die Eigenschaften der 2P-Anregung bringen gegenüber der Einphotonen (1P) Anregung in der Fluoreszenz-Mikroskopie einige Vorteile mit sich. Im Folgenden werden einige dieser Vorteile näher erläutert und die Möglichkeiten bzw. die Anwendung der 2P-Mikroskopie dargestellt. In Abbildung 2.1 ist die klassische 1P- der 2P-Anregung gegenüber gestellt. Abbildung 2.1(a) zeigt das vereinfachte Jablonski-Diagramm einer 1P-Anregung. Dabei wird ein eingestrahktes Photon mit definierter Wellenlänge durch ein Fluoreszenzmolekül absorbiert. Der Fluorophor wird dadurch energetisch in einen vibronischen Zustand des ersten elektronisch angeregten Zustands S_1 überführt. Nach strahlungsloser Relaxation befindet sich der Fluorophor im elektronisch angeregten Zustand S_1 und emittiert nachfolgend mittels spontaner Emission ein zur Anregung rotverschobenes Photon. Somit zerfällt der angeregte Zustand in einen vibronischen Zustand des Grundzustands. Zuletzt geht das Molekül nach einer weiteren, strahlungslosen Relaxation in den elektronischen Grundzustand S_0 über. Die Energiedifferenz zwischen Anregung und Emission wird als STOKES-Shift bezeichnet. Die strahlungslosen Übergänge finden auf einer Zeitskala im ps-Bereich [45, 46] statt, während die spontane Emission für organische Fluoreszenzmoleküle Zeitkonstanten im ns-Bereich aufweisen [47]. Diese charakteristische Zeitkonstante wird als Fluoreszenzlebensdauer τ_{Fl} bezeichnet und ist zum einen abhängig von dem Molekül selbst, zum anderen aber auch vom umgebenden Medium und dem pH-Wert [47]. Die Zeitkonstante der spontanen Emission gibt die Wahrscheinlichkeit an, bei der aus einem Ensemble elektronisch angeregter Zustände, deren Anzahl auf das $1/e$ -fache der anfänglich vorliegenden Zustände über spontane Emission zerfallen ist. Für die Anregung ist die Absorptionswahrscheinlichkeit eines Photons durch das Fluoreszenzmolekül entscheidend. Diese wird durch den 1P-Wirkungsquerschnitt σ_{1P} (Einheit $[\text{cm}^2]$) des Fluorophors bei der entsprechenden Anregungswellenlänge λ_{Exc} ausgedrückt. Die Wechselwirkungswahrscheinlichkeit zwischen Photon und Fluoreszenzmolekül im Medium hängt für die konventionelle Fluoreszenzmikroskopie lineare von der eingestrahkten Laserintensität ab. Ist die Absorptionswahrscheinlichkeit ausreichend hoch, reichen bereits wenige μW Lichtleistung aus, um eine Fluoreszenzanregung herbeizuführen. Das hat zur Folge, dass über die gesamte Lichtausbreitung eines fokussierten Laserstrahls prinzipiell Fluoreszenz angeregt wird (s. Abb. 2.1(b)). Die Signalerzeugung ist mit dieser Methode entlang der Lichtausbreitung ausgehend, wodurch insbesondere die axiale Auflösung stark limitiert ist. Abhilfe schafft eine zum Fokus konfokal angeordnete Lochblende im Detektionsstrahlengang, welche Licht von außerhalb der Fokusebene blockiert und somit die axiale Auflösung verbessert. Im Prinzip dient die Lochblende als Raumfilter mit einer winkelabhängigen Transmission, welche von der Transformation der objektseitigen Ortskoordinate r in den bildseitigen Austrittswinkel θ abhängt. Aus der Radialsymmetrie einer kreisrunden Apertur des Objektivs ergibt sich für die Transformation eines im Abstand r zur optischen Achse vorliegenden Punkts $r = f \tan \theta$, wobei f die Brennweite des Objektivs darstellt. Der maximale Akzeptanzwinkels ist dabei durch Lage und Größe der Lochblende definiert und hat wiederum Einfluss auf die zu erzielende Auflösung. Diese Technik wird als konfokale Mikroskopie bezeichnet [13]. Die Schwierigkeit hierbei liegt allerdings darin, die Lochblende exakt zu justieren,

um möglichst viel Signal sowie die bestmöglich erzielbare Auflösung zu erhalten.

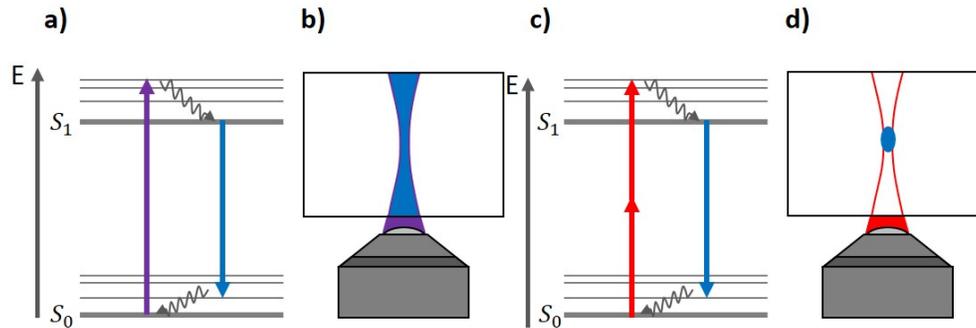


Abbildung 2.1: Vergleich der 1P-Anregung und der 2P-Anregung in der Fluoreszenzmikroskopie. a) Vereinfachtes Jablonski-Diagramm der mittels 1P-Anregung erzeugten Fluoreszenz: Die Energie eines Photons reicht aus, um das Fluoreszenzmolekül energetisch anzuregen. b) Schematische Darstellung des angeregten Fluoreszenzvolumens. c) Jablonski-Diagramm der 2P-Anregung. Die simultane Absorption zweier Photonen stellt die nötige Energie für die Anregung bereit. d) Schema des angeregten Fluoreszenzvolumens: Nur im Fokus reicht die Intensität aus, um eine Fluoreszenz hervorzurufen.

Bei der 2P-Anregung findet ebenfalls eine elektronische Anregung des Fluoreszenzmoleküls statt, wobei anstatt eines Photons, zwei Photonen durch den Fluorophor nahezu simultan absorbiert werden und damit den Übergang aus dem Grundzustand in einen angeregten Zustand induzieren (Abb. 2.1(c)). Die Energie eines Photons ist zu gering, um das Molekül direkt anzuregen. Bedingung für die simultane Absorption zweier Photonen ist, dass ausreichend hohe Photonendichten vorliegen. Simultan bedeutet in diesem Zusammenhang, dass zwei Photonen auf einer Zeitskala von einigen fs mit dem Fluoreszenzmolekül wechselwirken müssen. Die Absorptionswahrscheinlichkeit der 2P-Absorption ist gegenüber der 1P-Absorption wesentlich geringer, so dass nur im Fokus eine ausreichend hohe Photonendichte erzielt werden kann. Die Nichtlinearität der 2P-Absorption führt zudem zu einer quadratischen Abhängigkeit zwischen eingestrahelter Laserintensität und erzeugtem Signal. Mikroskopisch betrachtet, zeigt sich die Signalentstehung innerhalb der Probe nur im Fokus eines Objektivs. Damit ist der Winkelbereich der Detektion klar definiert und es kann ohne Verwendung einer Lochblende eine hohe, beugungsbegrenzte Auflösung erzielt werden. Aufgrund der intrinsisch hohen räumlichen Auflösung, eignet sich diese Methode besonders für die Bildgebung dreidimensionaler Strukturen. Ein gutes Beispiel für den Einsatz der 2P-Mikroskopie ist in Abbildung 2.2 an humanen Sehnervenzellen (TCSPC) demonstriert und wurde in [48] veröffentlicht. Die Bildgebung mittels 2P-Mikroskopie und Auswertung der Daten wurden von dem Verfasser der vorliegenden Arbeit durchgeführt. Abbildung 2.2(a) zeigt in Rot die 2P-Fluoreszenz von mit AlexaFluor594 gefärbten Aktin und in Blau den mit DAPI markierten Zellkern. Die 2P-Mikroskopie erlaubt die hochauflösende 3D-Analyse

der Verteilung des Aktin-Netzwerkes. Mittels farblicher Markierung kann die Topographie des Aktins dargestellt werden (Abbildung 2.2(b)).

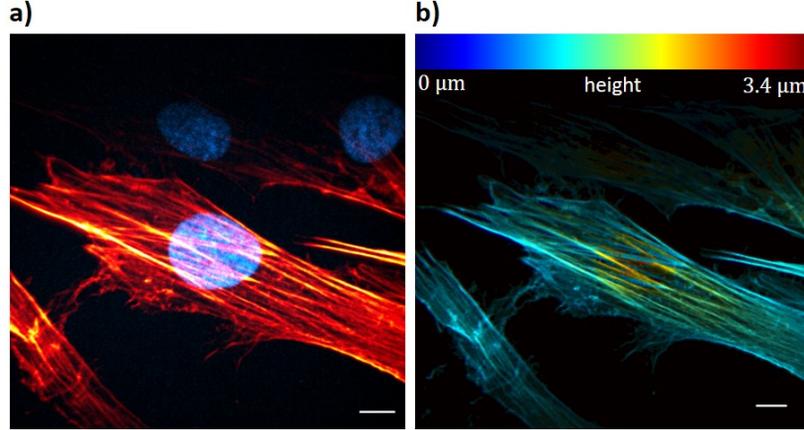


Abbildung 2.2: a) 2P-Fluoreszenzaufnahme humaner Sehnenzellen (TCSPC) mit Aktin (AlexaFluor594, rot) und dem Zellkern (DAPI, blau). b) Topographische Analyse des Aktin-Netzwerks in Falschfarbendarstellung. Skalierung: 10 µm. (aus [48])

Die Effizienz der 2P-Anregung hängt wesentlich vom wellenlängenabhängigen Absorptionswirkungsquerschnitt σ_{2P} , der Photonenflussdichte durch den Laserpuls I_Φ sowie der zur Verfügung stehenden anregbaren Zustände N_0 , ab. Die Änderung der angeregten Zustände pro Zeitintervall lässt sich demnach beschreiben als:

$$\frac{dN}{dt} = N_0 \cdot \sigma_{2P}^\lambda \cdot I_\Phi^2(t) \quad (2.1)$$

Der Wirkungsquerschnitt σ_{2P}^λ liegt in der Größenordnung um $10^{-50} \text{ cm}^4\text{s}/(\text{Photon} \cdot \text{Molekül})$ [41], wobei gilt $1 \cdot 10^{-50} \text{ cm}^4\text{s}/(\text{Photon} \cdot \text{Molekül}) = 1 \text{ GM}$ (= Göppert-Mayer). Die Photonenflussdichte ergibt sich aus der Intensität I mit der Photonenenergie $E_{Ph} = h\nu$ zu:

$$I_\Phi(t) = I(t) \frac{\lambda}{hc} \quad (2.2)$$

mit dem Planck'schen Wirkungsquantum h und der Vakuum-Lichtgeschwindigkeit c . Die Photonenflussdichte trägt die Einheit $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Wird die Beziehung 2.2 in 2.1 eingesetzt und angenommen, dass es sich um einen beugungsbegrenzten, fokussierten Laserstrahl mit der Fläche $A = \pi(\frac{\lambda}{4NA})^2$ und der Intensität $I(t) = \frac{\bar{P}}{\tau_P f_{Rep}}$ handelt, ergibt sich für die 2P-Absorptionsrate:

$$\frac{dN}{dt} = \frac{\bar{P}^2 \sigma_{2P}^\lambda}{\tau_P^2 f_{Rep}^2} \left(\frac{(4NA)^2}{\pi hc \lambda} \right)^2 \quad (2.3)$$

Hierbei sind \bar{P} die mittlere Leistung des Lasers, NA die numerische Apertur des Objektivs und λ die Wellenlänge. Die numerische Apertur geht mit der vierten Potenz in die Anzahl

absorbierter Photonen ein und stellt damit einen erheblichen Parameter für eine effiziente Anregung dar. Die reziproke Abhängigkeit der absorbierten Photonen von der Pulsdauer τ_P gibt an, dass die Wahrscheinlichkeit der 2P-Anregung mit kürzer Pulsdauer stark zunimmt. Ebenso zeigt sich, dass generell mit geringerer Repetitionsrate f_{Rep} und gleicher mittlerer Leistung des Lasers, eine höhere Absorptionswahrscheinlichkeit gegeben ist. Dies liegt vor allem an der höheren Energie, welche pro Puls in die Probe eingetragen wird. Jedoch steigt mit zu hoher Pulsenergie auch die Wahrscheinlichkeit einer Schädigung der Probe [49, 50]. Deshalb empfiehlt es sich, die Repetitionsrate entsprechend der Anwendung zu wählen, um von der generell niedrigeren Photoschädigung der nichtlinearen Mikroskopie zu profitieren [28, 51]. Aus den vorgenannten Gründen werden in der nichtlinearen Mikroskopie neben einer starken Fokussierung, Ultrakurzpuls-Lasersysteme verwendet. Die Laser-Repetitionsraten betragen typischerweise zwischen 20 MHz bis 80 MHz mit mittleren optischen Leistungen im mW bis niedrigen W-Bereich. Die Emissionswellenlängen der Laser liegen überwiegend im NIR-Bereich, da aufgrund der geringeren Photonenenergien dieses Spektralbereichs, geringeres Photobleichen (*Photobleaching*, engl.), geringere Phototoxizität, geringere Streuung sowie Absorption und damit eine höhere Eindringtiefe in biologischen, wasserhaltigem Gewebe gegeben ist [29, 30].

2.2 Zweifarben-Zweiphotonen-Anregung

Die 2P-Anregung stellt einen Spezialfall der nicht-entarteten Zweiphotonen-Absorption dar. Im Falle der 2P-Anregung haben beide, simultan absorbierte Photonen die gleiche Energie und nach $E = h\nu$ die gleiche Frequenz bzw. Wellenlänge. Im Allgemeinen ist jedoch auch die Absorption zweier Photonen mit unterschiedlicher Energie möglich, solange die für die Absorption notwendige Energie durch die Summe beider Einzelphotonen mit den Energien E_1 bzw. E_2 aufgebracht wird:

$$E = E_1 + E_2. \quad (2.4)$$

In Wellenlängen ausgedrückt ergibt sich aus Gl. 2.4:

$$\frac{hc}{\lambda} = \frac{hc}{\lambda_1} + \frac{hc}{\lambda_2}. \quad (2.5)$$

Aus Gleichung 2.5 folgt schließlich die virtuelle Anregungswellenlänge λ_{2C2P} der Zweifarben-Zweiphotonen-Absorption:

$$\lambda_{2C2P} = \frac{\lambda_1 \cdot \lambda_2}{\lambda_1 + \lambda_2} \quad (2.6)$$

Abbildung 2.3(a) zeigt das Prinzip der 2C2P-Absorption. Die Summe der Energien zweier Photonen unterschiedlicher Wellenlänge reicht aus, um ein Fluoreszenzmolekül in einen angeregten Zustand zu überführen. Analog zur 2P-Anregung relaxiert das Molekül nach kurzer Zeit (\approx ps) strahlungslos in den elektronisch angeregten Zustand S_1 . Nach einer

statistischen Verweildauer, welche in Zusammenhang mit der für jedes Molekül spezifischen Übergangswahrscheinlichkeit steht, kehrt das Fluoreszenzmolekül durch Abgabe eines Fluoreszenzphotons in einen vibronischen Grundzustand zurück. Nachfolgend relaxiert das Molekül energetisch durch Stöße mit umliegender Materie über einen weiteren, strahlungslosen Übergang in den elektronischen Grundzustand S_0 . In der 2C2P-Mikroskopie kann durch die Wahl geeigneter Fluoreszenzfarbstoffe erzielt werden, dass nur die Kombination beider Laser die passende Energie für die Anregung bereitstellt. Dieser Umstand ist in Abbildung 2.3(b) und (c) gezeigt. Im ersten Fall (Abb. 2.3(b)) ist die Summe der Energien über zwei Photonen einer Wellenlänge zu groß, so dass keine Absorption stattfindet. Im zweiten Fall (Abb. 2.3(c)) ist die Summe der Energie aus zwei Photonen der zweiten Wellenlänge zu gering, wodurch auch hier keine Absorption stattfinden kann.

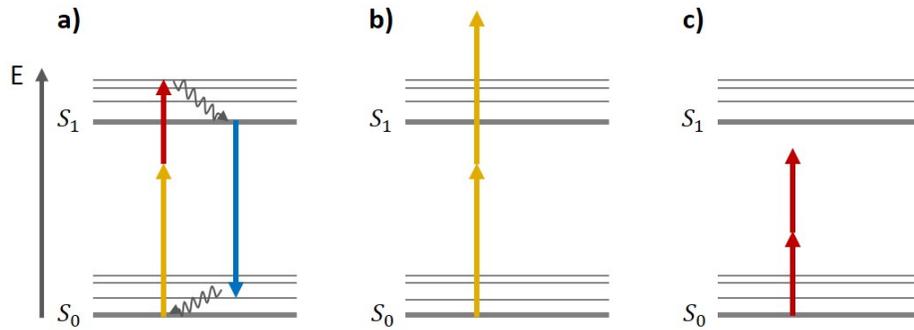


Abbildung 2.3: Prinzip der 2C2P-Anregung im Energieschema. a) Jablonski-Diagramm der 2C2P-Anregung. Die Energie zweier Photonen unterschiedlicher Wellenlänge induziert die Anregung eines Fluorophors und führt zur Fluoreszenz. b) Die Energie zweier Photonen mit gleicher Wellenlänge ist zu groß, es findet keine Absorption statt. c) Die Energie zweier Photonen der zweiten Wellenlänge ist zu gering, so dass ebenfalls keine Absorption stattfindet.

Die Anzahl absorbiertes Photonen pro Zeitintervall ergibt sich in der 2C2P-Anregung aus dem Produkt der Photonenflussdichte der verwendeten Laser $I_{\Phi,1}$ und $I_{\Phi,2}$, wobei sich der Absorptionswirkungsquerschnitt auf die virtuelle Anregungswellenlänge (Gl. 2.6) bezieht und es gilt:

$$\frac{dN}{dt} = N_0 \cdot \sigma_{2P}^{\lambda(2C2P)} \cdot I_{\Phi,1}(t) \cdot I_{\Phi,2}(t) \quad (2.7)$$

Unter Berücksichtigung aller Zweiphotonen-Absorptionsprozesse, ergibt sich die Absorptionsrate (nach [52]) zu

$$\begin{aligned} \frac{d}{dt} N_{abs,2C2P}(x, y, t) = C_0(x, y, t) & \left(\frac{1}{2} \sigma_{2P}^{\lambda_1} I_{\Phi,1}^2(x, y, t) + \right. \\ & \left. + \frac{1}{2} \sigma_{2P}^{\lambda_2} I_{\Phi,2}^2(x, y, t - \Delta\tau) + 2 \sigma_{2P}^{\lambda(2C2P)} I_{\Phi,1}(x, y, t) I_{\Phi,2}(x, y, t - \Delta\tau) \right) \end{aligned} \quad (2.8)$$

Der Abstand von der optischen Achse ist durch x, y gegeben, t ist die Zeit und $\Delta\tau$ gibt die Zeitdifferenz zwischen den Pulsen des ersten und des zweiten Lasers an. Die Konzentration des Fluorophors und damit die Anzahl der anregbaren Zustände, wird über C_0 ausgedrückt. Gleichung 2.8 zeigt, wie in Abbildung 2.3 schematisch dargestellt, dass prinzipiell die Absorption entweder aus einer direkten 2P-Anregung eines der beiden Laser oder aus der Kombination beider Laser stattfinden kann. Voraussetzung für eine direkte 2P-Anregung ist allerdings ein entsprechend hoher Wirkungsquerschnitt für die jeweilige Anregungswellenlänge. In der 2C2P-Mikroskopie werden Laser mit zwei unterschiedlichen Emissionswellenlängen verwendet. Eine Anregung findet jedoch nur statt, falls beide Laserpulse zeitlich und räumlich überlappen. Dies ist über den Term $I_{\Phi,1}(x, y, t) I_{\Phi,2}(x, y, t - \Delta\tau)$ mit dem Zeitversatz $\Delta\tau$ zwischen den Pulsen beschrieben. Daher ist es notwendig, die Emission der Laserpulse beider Systeme zeitlich zu synchronisieren und die optischen Wege beider Laserstrahlen so auszulegen, dass die Pulse zeitgleich im Fokus des Mikroskops auftreffen. Dies stellt je nach verwendeter Lasersysteme und optischem Setup eine große Herausforderung dar.

2.3 Zweiphotonen STED-Mikroskopie

Die vorangestellten Methoden erlauben eine beugungsbegrenzte optische Auflösung in alle drei Raumrichtungen. Die nichtlineare Natur der 2P- und 2C2P-Mikroskopie bringt in der Mikroskopie einige Vorteile mit sich, insbesondere bei Verwendung von Laserwellenlängen im NIR-Spektralbereich. So sind diese Techniken besonders für die Applikation in stark streuenden oder absorbierenden Medien geeignet, wie dies bei biologischem Gewebe der Fall ist. Aufgrund geringerer Wellenfrontdeformationen bei Fokussierung in das Gewebe, kann gegenüber Wellenlängen im sichtbaren Spektralbereich eine wesentlich höhere Auflösung in der Tiefe erzielt werden. Um neben den Vorteilen, wie der hohen Eindringtiefe, der geringen Phototoxizität und der Kombinationen mit anderen nichtlinearen Techniken nun auch eine Auflösung unterhalb der Beugungsgrenze zu erzielen, bietet sich die Erweiterung der 2P-Mikroskopie auf die 2P-STED-Mikroskopie an. Das Prinzip dieser superauflösenden Mikroskopietechnik ist in den folgenden Unterkapiteln 2.3.1 und 2.3.2 beschrieben.

2.3.1 Prinzip der nichtlinearen STED-Mikroskopie

In einem optischen System ist die maximal erzielbare Auflösung begrenzt und kann nicht unendlich groß werden. Ein fokussierter Lichtstrahl führt aufgrund der Wellennatur des Lichts nicht zu einer idealen Punktabbildung, sondern weist eine Intensitätsverteilung im Bereich des Fokus auf [53]. Die resultierende, verschmierte Intensitätsverteilung im Fokus wird als Punktspreizfunktion bezeichnet. Die Abbildung resultiert aus dem detektierten Signal $S(r)$ und ergibt sich mathematisch aus der Faltung der Ortsfunktion $O(r)$ des Objekts mit der Punktspreizfunktion $h(r)$ der Anregung: $S(r) = h(r) * O(r)$. Der Intensitätsverlauf der Punktspreizfunktion kann mit einer skalaren Betrachtung über die Besselfunktion erster Art und erster Ordnung $J_1(v)$, in Abhängigkeit der optischen Koordinate v , ange-

nähert werden [54]:

$$h(\theta) = 2I_0 \left(\frac{J_1(v)}{v} \right)^2 \quad (2.9)$$

Für die optische Koordinate v gilt $v = kr \sin \theta$, die Wellenzahl ist $k = (2\pi)/(\lambda)$, I_0 stellt die maximal eingestrahlte Intensität dar. Wie bereits im vorangegangenen Abschnitt diskutiert, findet in der Mikroskopie die Abbildung durch eine Transformation eines Winkels θ zu einer Ortskoordinate r , entsprechend $\tan \theta = r/f$, statt. Gleiches gilt für die Rücktransformation. Prinzipiell ist über die Besselfunktion erster Art die Wahrscheinlichkeit gegeben, mit der ein fokussiertes Photon eine Ortskoordinate r erreichen kann [55]. Das gleiche gilt für die Wahrscheinlichkeit, mit der ein durch das Objekt ausgesendetes Photon über den Detektionspfad gemessen werden kann, wodurch ein Akzeptanzwinkelbereich für die Detektion definiert ist. Unter Berücksichtigung der paraxialen Näherung, also einer Kleinwinkelnäherung mit $\tan \theta \approx \sin \theta$ und mit der Wellenzahl k , folgt für $v = (2\pi r)/(f\lambda)$. Die Intensitätsverteilung $h(r)$ an einer Ortskoordinate r wird damit zu:

$$h(r) = 2I_0 \left(\frac{J_1\left(\frac{2\pi r}{f\lambda}\right)}{\frac{2\pi r}{f\lambda}} \right)^2 \quad (2.10)$$

Die Analyse von Gleichung 2.10 zeigt zum einen eine Wellenlängenabhängigkeit, zum anderen aber auch die Existenz eines Hauptmaximums der Intensität um das Zentrum des Fokus mit periodisch, radial auftretenden Nebenmaxima, welche in der Amplitude allerdings stetig abnehmen. Eine solche Verteilung wird als AIRY-Scheibchen bezeichnet. Als Auflösung wird nun der Abstand definiert, bei dem zwei nebeneinander liegende Punktobjekte nach Beleuchtung durch die PSF und anschließender Abbildung gerade noch voneinander getrennt werden können. Es gibt zwei etablierte Kriterien für die Auflösung: das RAYLEIGH- und das ABBE-Auflösungskriterium. Unterschiede der Kriterien liegen in der Betrachtung nach Art der Lichtquelle bzw. Lichtemission. In beiden Fällen hängt die Auflösung von der numerischen Apertur $NA = n \cdot \sin \alpha$, aber auch von der Wellenlänge λ der verwendete Lichtquelle ab. Der Brechungsindex des umgebenden Mediums ist n , der halbe Öffnungswinkel des über die Fokussierung aufgespannten Kegels ist α . Für inkohärente Beleuchtung bzw. inkohärent strahlende Objekte wird das Auflösungskriterium nach RAYLEIGH verwendet. Das Kriterium nach RAYLEIGH besagt, dass zwei Objekte im Abstand d dann aufgelöst werden können, wenn das Maximum des AIRY-Scheibchens des ersten Objekts mit der ersten Nullstelle des AIRY-Scheibchens des zweiten Objekts übereinander liegen. Aufgrund der Betrachtung inkohärent strahlender Quellen eignet sich dieses Kriterium für die Fluoreszenzmikroskopie. Der auflösbare Abstand d beträgt in lateraler Richtung nach RAYLEIGH:

$$d = 0,61 \frac{\lambda}{NA} \quad (2.11)$$

Das Auflösungskriterium nach ABBE betrachtet kohärentes Licht zur Berechnung des Abstandes d zweier Objekte, welcher gerade noch aufgelöst werden kann. ABBE nimmt als Objekt ein periodisches Gitter und betrachtet das am Gitter gebeugte Licht [15]. Aus der

Frage, wie weit die Gitterlinien auseinander liegen dürfen und dennoch getrennt wahrgenommen werden können, ergibt sich die maximale Auflösung. Entscheidend ist dabei, dass für die Abbildung mindestens die 0. und die 1.-Beugungsordnung durch das Objektiv eingefangen und abgebildet werden. Andernfalls ist nach ABBE kein Informationsgehalt in der abgebildeten Lichtintensität enthalten. Formal ergibt sich der Abstand d nach ABBE bei schräger Beleuchtung zu:

$$d = \frac{\lambda}{2NA} \quad (2.12)$$

Für das erste Minimum des AIRY-Scheibchens in axialer Richtung findet sich ein Abstand vom Zentrum des Fokus von:

$$d_z = \frac{2\lambda}{NA^2} \quad (2.13)$$

Gegenüber der lateralen Ausdehnung einer PSF geht für die Betrachtung der axialen Auflösung die NA quadratisch ein. Der Wert nach Gleichung 2.13 kann als Tiefenschärfe des optischen Systems verstanden werden.

In der laser-basierten Fluoreszenz-Mikroskopie bietet das Auflösungskriterium nach RAYLEIGH einen guten Anhaltspunkt, um bei definierter Wellenlänge die erzielbare Auflösung abschätzen zu können. Aber auch das Kriterium nach ABBE wird häufig verwendet, falls nur die Art der Beleuchtung berücksichtigt wird. Die Untersuchungen ERNST ABBE'S zeigen, dass aufgrund der Wellennatur des Lichts und der damit einhergehenden Beugung, die Auflösung nach Gleichung 2.12 in jedem Fall begrenzt ist. Diese Auflösungsgrenze stellte lange eine fundamentale, nicht zu überschreitende Grenze dar.

Eine Methode diese physikalische Limitierung der Auflösung zu überwinden, liegt in der von STEFAN HELL im Jahre 1994 beschriebenen STED-Mikroskopie [18]. Bei STED wird mittels stimulierter Emission die Fluoreszenz in den Randbereichen eines angeregten Volumens gezielt ausgeschaltet, wodurch die effektive Punktspreizfunktion der Anregung eingeschnürt wird. Es wird also der Bereich verkleinert, indem die Wahrscheinlichkeit für die Detektion eines Photons ausreichend hoch ist, was einer Einschnürung des Akzeptanzwinkels der Detektion gleichkommt. Das Prinzip der 2P-STED-Mikroskopie ist in Abbildung 2.4 dargestellt. Abbildung 2.4(a) zeigt eine schematische Darstellung des Jablonski-Diagramms für die bei STED relevanten energetischen Übergänge. In Rot ist die 2P-Anregung durch Absorption zweier Photonen gezeigt. Das Molekül geht aus dem Grundzustand S_0 in den angeregten vibronischen Zustand des oberen Niveaus S_1 über. Nach einem kurzen strahlungslosen Übergang aus einem vibronisch angeregten Zustand in das S_1 -Niveau, gibt es zwei Möglichkeiten für das Molekül, in den Grundzustand zurückzukehren. Ohne eingestrahlt STED-Laser wird das Molekül mittels spontaner Emission eines Photons in einen vibronischen Zustand des Grundzustandes S_0 übergehen (blau) und nachfolgend über einen weiteren strahlungslosen Übergang vollständig in den elektronischen Grundzustand zerfallen. Wie lange das Fluoreszenzmolekül im elektronisch angeregten Zustand verweilt, hängt von der statistischen Fluoreszenzlebensdauer ab.

Wird jedoch der STED-Laser mit passender Wellenlänge eingestrahlt, kann das Molekül

in den Grundzustand gezielt abgeregt werden (orange). Dadurch wird ein Photon, welches die gleichen Eigenschaften wie das eingestrahlte Photon aufweist, über stimulierte Emission ausgesendet. Es findet also eine Unterdrückung der Fluoreszenz (spontane Emission), durch den STED-Laser statt. Der Prozess aus An- und Abregung innerhalb eines Zyklus entspricht einem gezielten „An- und Ausschalten“ der Fluoreszenzmoleküle. In der STED-Mikroskopie sind somit die fundamentalen Wechselwirkungen zwischen Licht und Materie nach den Strahlungsgesetzen Einsteins [56] vertreten: Die Absorption sowie die spontane und stimulierte Emission. Die Wahrscheinlichkeit mit der diese Prozesse stattfinden, ist charakteristisch für jedes Fluorophor und hängt wesentlich von der Wellenlänge ab. In Fluoreszenzspektren, welche das Absorptions- und Emissionsspektrum eines Fluorophors enthält, spiegeln sich die wellenlängenabhängigen Absorptions- und Emissionswahrscheinlichkeiten wieder. Daraus ergeben sich nach den Anforderungen für 2P-STED die Auswahlkriterien der Fluorophore. In Abbildung 2.4(b) ist das Fluoreszenzspektrum eines für 2P-STED verwendeten Fluorophors schematisch dargestellt. Der Fluorophor bzw. die Anregungswellenlänge sollte so gewählt sein, dass der Fluorophor bei der virtuellen 2P-Anregungswellenlänge eine möglichst hohe Absorption aufweist. Die STED-Laserwellenlänge liegt dagegen am spektral langwelligen Ende. Bei dieser Wellenlänge muss der Fluorophor noch eine ausreichend hohe Emission aufweisen, damit der induzierte Übergang stattfinden kann. Die Emission des Fluorophors wird bis maximal zur STED-Laserwellenlänge detektiert. Mittels optischer Filter werden die Laserwellenlängen geblockt und das Emissionslicht von der Anregung getrennt. Hier zeigt sich auch ein großer Vorteil der nichtlinearen Mikroskopie, da die Laserwellenlängen spektral stark rotverschoben zur Emission sind. Damit findet eine gute Trennung zur Fluoreszenzemission statt. Somit kann aber auch ein großer Emissionsbereich des Fluorophors gemessen werden und die Photonenausbeute deutlich erhöht werden. Um die Auflösungsverbesserung zu erzielen, wird der STED-Laser mittels einer speziellen Phasenmaske zum Beispiel zu einem Donutförmigen Intensitätsprofil geformt. Dieser wird mit dem Fokus der Anregung überlagert (Abb. 2.4(c)). Aufgrund der stimulierten Emission in den Randbereichen verbleibt somit ein kleineres Fluoreszenzvolumen, welches unterhalb der Beugungsgrenze liegt. Es gibt unterschiedliche Ansätze, um die Intensitätsprofile, welche zu einer Auflösungsverbesserung führen, zu erzeugen. Eine einfache Variante sind Phasenmasken [57], um die laterale bzw. axiale Auflösungssteigerung zu erzielen. Ebenso hat sich der Einsatz von doppelbrechenden Materialien für die Phasenmodulation bewährt [58]. In dieser Arbeit werden Phasenmasken basierend auf isotropen Materialien verwendet und im folgenden Unterkapitel näher erläutert. Wird die Qualität der STED-Intensitätsverteilung außer Acht gelassen, resultiert die Auflösungsverbesserung bei STED ausschließlich aus den gezielt induzierten, energetischen Übergängen des Fluorophors.

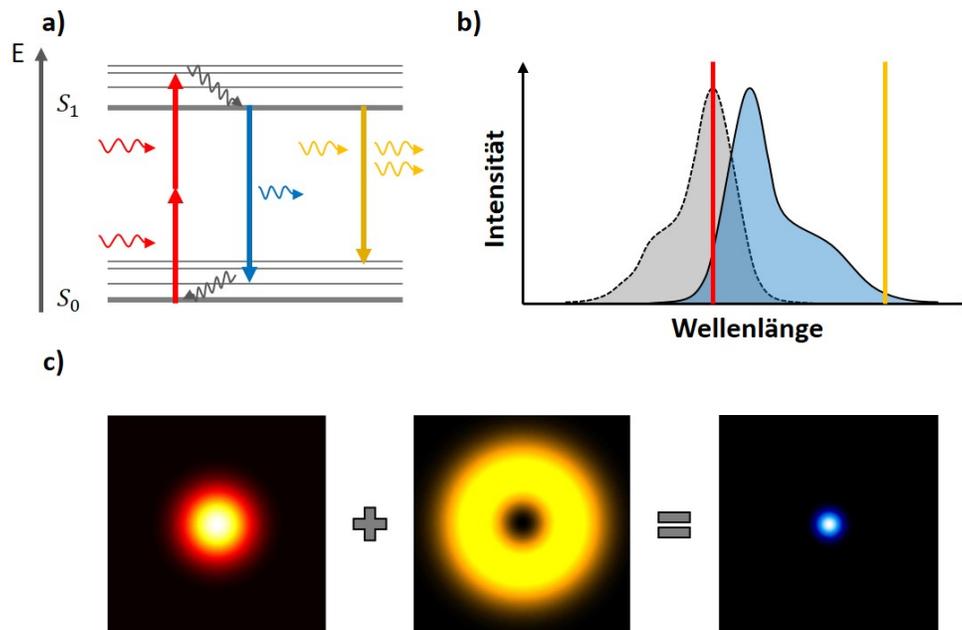


Abbildung 2.4: Prinzip der 2P-STED-Mikroskopie. a) Vereinfachtes Jablonski-Diagramm der 2P-STED-Mikroskopie. Nach erfolgter 2P-Anregung findet die Abregung der Fluoreszenzmoleküle entweder mittels spontaner Emission (blau) oder durch stimulierte Emission (orange) statt. b) Schematische Darstellung eines Fluoreszenzspektrums: Die virtuelle Anregung (rot) der 2P-Absorption liegt im Absorptionsbereich des Fluorophors (grau), die STED-Laserwellenlänge liegt am roten Rand des Spektrums. Der Fluorophor kann im gesamten Emissionsbereich fluoreszieren (blau). c) Geometrische Darstellung der Punktspreizfunktionen im Fokus der 2P-Anregung (rot), des donut-förmigen Abregungslasers (orange) und der resultierenden, effektiven PSF (blau).

2.3.2 Phasenmodulation

Zentraler Bestandteil der STED-Mikroskopie ist die Formung des für die Abregung verwendeten Intensitätsprofils. Hierzu werden Phasenmasken unterschiedlichster Art verwendet. Die Wahl der Phasenmaske wird durch die angestrebte Auflösungsverbesserung, lateral oder axial, sowie von der Art Strahlführung festgelegt. Mit doppelbrechenden Materialien kann bei geschickter Segmentierung verschiedener Wellenplatten, die Phase einer Wellenfront anisotrop derart moduliert werden, dass sich ein für STED geeignetes Intensitätsprofil ergibt. Ein zweiter, für die Anregung verwendeter Laser anderer Wellenlänge, wird nicht moduliert. Das hat den Vorteil, dass beide Laser durch die gleiche Maske propagieren können. Werden vorab die beiden Laserstrahlen beispielsweise mit Hilfe eines Lichtwellenleiters überlagert, führt dies zu einer geometrisch intrinsischen Überlagerung des Anregungs- und des STED-Lasers [58]. Auf diese Art der Masken wird hier aber nicht weiter eingegangen, da sie in dieser Arbeit keine Relevanz besitzen. Eine etwas einfacher herzustellende und gängigere Variante sind Phasenmasken, welche die Phase der einfallenden Wellenfront

des STED-Lasers mittels ortsabhängiger optischer Laufzeitunterschiede modulieren. Solche Phasenmasken können durch Ätzung oder mittels Elektronenstrahlolithographie [59,60] mit Gläsern als Substrat hergestellt werden. Neben statischen Phasenmasken kann ein elektronisch steuerbarer räumlicher Lichtmodulator [61] verwendet werden, welcher eine hohe Flexibilität bietet. Aufgrund der hohen Flexibilität und der elektronischen Steuerung, wird in dieser Arbeit ein SLM verwendet. In Abschnitt 3.2.3 werden die Funktionsweise des SLM sowie die Anwendung in der STED-Mikroskopie erläutert.

Im Wesentlichen gibt es bei STED zwei unterschiedliche Masken: Eine Maske für die laterale und eine Maske für die axiale Auflösungsverbesserung [62]. Soll eine 3D-Auflösungsverbesserung erzielt werden, müssen zwei Teilstrahlen mit den jeweiligen Masken moduliert und im Mikroskop am Ort des Fokus überlagert werden. Für die laterale Auflösungssteigerung wird die sog. Vortex-Phasenmaske verwendet. Diese Phasenmaske erzeugt ein donutförmiges Intensitätsprofil in der Fokusebene. Das Phasenprofil ist in Abbildung 2.5(a) dargestellt. Die Phase $\Delta\Gamma$ der einfallenden Wellenfront wird azimuthal von 0 bis 2π verzögert, die Phase entlang der radialen Richtung ist aber jeweils konstant. Dies führt dazu, dass im Zentrum des Laserstrahls die jeweils gegenüberliegenden Teilwellenfronten eine Phasendifferenz von π aufweisen. Bei Fokussierung zeigt sich, dass die im Zentrum überlagernden Teilwellenfronten mittels destruktiver Interferenz ausgelöscht werden und somit das donutförmige Intensitätsprofil erzeugen. Wird ein STED-Laser mit Wellenlänge λ verwendet, muss die Differenz der optischen Wege von 0 bis λ betragen. Somit liegen aufgrund der Geometrie der Phasenmaske Teilwellenfronten mit Phasenverzug entsprechend $\lambda/2$ jeweils gegenüber. Die destruktive Interferenz wird bei einem Verzug von $\lambda/2$ hervorgerufen und führt damit zu einem Intensitätsminimum im Zentrum des Fokus. Die Phasenmaske kann entweder über ein azimuthal variierende Dicke hergestellt werden oder durch Variation des Brechungsindex n . Ein Laserstrahl, welcher mit einer Vortex-Phase moduliert ist, kann auch als Laguerre-Gauss-Mode LG_{01} mit einem Bahndrehimpuls verstanden werden [63,64]. Der Bahndrehimpuls resultiert dabei aus der als Helix verlaufenden Phasenfront.

Um eine axiale Auflösungsverbesserung zu erzielen, wird eine π -Phasenmaske verwendet. Diese ist aus zwei Segmenten aufgebaut, wobei ein innerer Bereich auf eine einfallende Wellenfront einen π -Phasenverzug induziert (Abb. 2.5(b)). Der äußere Bereich hingegen bringt keinen zusätzlichen Phasenverzug auf die Wellenfront auf. Somit ergibt sich eine Differenz zwischen innerem und äußerem Bereich von π . Bei Fokussierung des Laserstrahls führt dieser π -Versatz zu einer destruktiven Interferenz im Zentrum des Fokus, wohingegen sich vor und nach dem Zentrum in axialer Richtung zwei Intensitätsmaxima ausbilden. Bei Überlagerung dieses Intensitätsprofils mit der Punktspreizfunktion der Anregung, ergibt sich eine Einschnürung der Fluoreszenz entlang der Lichtausbreitungsrichtung. Während bei der Vortex-Phasenmaske das Verhältnis von Laserstrahldurchmesser zu Phasenmaske unkritisch ist, muss bei der π -Phasenmaske ein auf die Intensität bezogenes 1:1 Flächenverhältnis vorliegen. Dies bedeutet, dass unter der Annahme eines rechteckförmigen Strahlprofils der äußere Radius das $\sqrt{2}$ -fache des Inneren betragen muss. Nur wenn die Intensitätsanteile mit der jeweiligen Phase im Fokus gleich sind, bildet sich ein sauberes

Intensitätsprofil entlang der axialen Richtung aus. Die exakte Ausrichtung der Phasenmas-

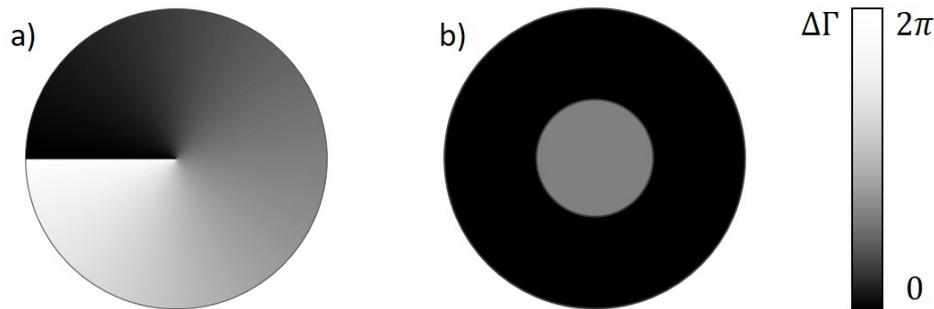


Abbildung 2.5: Schematische Darstellung einer Vortex (a) und einer π -Phasenmaske (b) für die STED-Mikroskopie. a) Die Vortex-Phasenmaske verzögert die Phase zirkular von 0 bis 2π . b) Die π -Phasenmaske ist in zwei Segmente unterteilt: Der innere Teil induziert gegenüber dem äußeren einen π -Phasenschub.

ken zum einfallenden Laserstrahl, in Bezug auf die Apertur des Objektivs, ist sehr kritisch für die Qualität des Donuts bzw. der axialen Intensitätsverteilung [65]. Eine präzise Justage der Masken ist maßgeblich für die erzielbare Auflösung. Ebenso gibt es eine starke Abhängigkeit zwischen der Polarisation des fokussierten elektrischen Feldes und der Homogenität, bzw. des Kontrasts der entsprechenden Intensitätsverteilungen für die laterale bzw. axiale Auflösungsverbesserung [66]. Mit Hilfe numerischer Simulation können die Feldverteilungen und damit die Intensitätsprofile im Fokus bei Verwendung von Objektiven mit hoher numerischer Apertur berechnet und je nach optischem System ggf. optimiert und Einflüsse untersucht werden. So lässt sich eine verlässliche Aussage über Flächenverhältnisse der π -Phasenmaske bei bestimmten Laserstrahlprofilen treffen. Ebenso lassen sich damit nichtlineare Anregungsprozesse, wie sie in dieser Arbeit verwendet werden, berechnen.

2.4 Theorie zur Fokussierung eines Lasers bei hoher numerischer Apertur

Die Entwicklung der Zweifarben-Zweiphotonen STED-Mikroskopie erfordert ein umfassendes Verständnis der Intensitätsverteilung fokussierter Laserstrahlen unterschiedlicher Wellenlänge. Insbesondere, wenn die Auflösung eines abbildenden Systems im Vordergrund steht, ist die genaue Kenntnis der Einflussparameter und ihre Auswirkung von hohem Interesse. Eine verlässliche Aussage mit der Möglichkeit der flexiblen Variation der Einflussparameter, kann über eine numerische Simulation der elektrischen Feldverteilung und nachfolgender Berechnung der Intensitätsverteilung im Fokus ermittelt werden. Auf diese Art können sowohl Polarisation, ortsabhängige Phase der einfallenden Wellenfront, verschiedene geometrische Anordnungen als auch Wellenfrontdeformationen bei verschiedenen Wellenlängen variiert und untersucht werden. Die numerische Betrachtung bringt somit große Vorteile gegenüber der sonst experimentell sehr aufwendigen Untersuchung

dieser Abhängigkeiten. Üblicherweise werden in der supraauflösenden Mikroskopie Objektive mit hohen numerischen Aperturen verwendet. Daher muss eine Depolarisation entlang der Ausbreitungsrichtung des fokussierten Laserstrahls berücksichtigt werden. Um die Abhängigkeit des Polarisationszustandes sowie die Depolarisation mit einzubeziehen, wird ein vektorieller Ansatz zur Berechnung der räumlichen Feldverteilung im Fokus nach Wolf und Richards [53, 67] gewählt. Analytische Methoden würden hier keine realitätsnahe Ergebnisse liefern. Ebenso ist es mit dieser Methode möglich, eine beliebige Phasenmodulation zu simulieren und auch Phasenmasken wie sie in Abschnitt 2.3.2 erläutert werden, zu berechnen.

Der Herleitung nach [53, 67, 68] folgend, berechnet sich die elektromagnetische Feldverteilung $\vec{E}(r, \theta, \phi)$ im Fokus in Abhängigkeit des Azimuthalwinkels ϕ und des Polarwinkels θ nach Gleichung 2.14. Da für die hier untersuchte Wechselwirkung zwischen Licht und Materie nur das elektrische Feld von Interesse ist, wird das magnetische Feld bei dieser Betrachtung nicht berücksichtigt. Allerdings kann der Ansatz für das magnetische Feld entsprechend verwendet werden. Die Berechnung des elektrischen Feldes erfolgt hierbei aufgrund der kreisrunden Apertur in Zylinderkoordinaten. Nach dem Huygens-Fresnel'schen Prinzip ist jeder Punkt innerhalb einer Apertur, Zentrum einer neuen, einzelnen Kugelwellen. In der Herleitung von Wolf und Richards wird dieser Ansatz derart angenähert, dass jeder, innerhalb der Apertur liegende Punkt mit der Koordinate \vec{r} , den Ausgangspunkt einer sekundären, ebenen Welle mit ebener Wellenfront darstellt. Die ebenen Teilwellenfronten werden über einen Wellenvektor \vec{k} mit den Komponenten $\vec{k} = (k_x, k_y, k_z)$ beschrieben. Ein Punkt P im Bereich des Fokus ergibt sich schließlich aus vektorieller Superposition aller komplexwertigen Teilwellenfronten. Die Herleitung nach Wolf und Richards kann als eine Verallgemeinerung der von Debye 1907 beschriebenen Feldverteilung gebeugter, skalarer Kugelwellen im Fokus verstanden werden [69]. Um die Theorie auf die STED-Mikroskopie zu erweitern, wird die zusätzliche Phase $\exp(i\Delta\Gamma(\theta, \phi))$ eingeführt, welche eine extern eingebrachte Phasenmodulation, beispielsweise mittels einer Phasenmaske (s. Abschnitt 2.4.2) beschreibt.

$$\vec{E}(r, \theta, \phi) = \begin{pmatrix} E_x \\ E_y \\ E_z \end{pmatrix} = -\frac{if}{\lambda} \int_{\theta} \int_{\phi} A(\theta, \phi) \vec{P}(\theta, \phi) e^{i(\vec{k} \circ \vec{r} + \Delta\Gamma(\theta, \phi))} \sin \theta d\phi d\theta \quad (2.14)$$

Ein besonderes Merkmal des Ausdrucks 2.14 besteht darin, dass mit dieser Berechnung eine hohe Genauigkeit für große Winkel, also große numerische Aperturen, vorliegt. Aufgrund der Annahme sekundärer ebener Wellenfronten anstelle von Kugelwellen, ist die Berechnung der Feldverteilung im Nahfeld nicht anwendbar und liefert hierfür keine akkuraten Ergebnisse. Bedingung für Gleichung 2.14 ist, dass der Durchmesser der Apertur sowie der Abstand der Apertur zum betrachteten Punkt P , deutlich größer als die eingestrahelte Wellenlänge λ sein muss. Die ortsabhängige Amplitude sowie mögliche Wellenfrontdeformationen aufgrund von Aberrationen werden mit $A(\theta, \phi)$ ausgedrückt. Der Polarisationszustand bzw. die Änderung des Polarisationszustandes durch die Fokussierung wird über $\vec{P}(\theta, \phi)$ beschrieben. Damit kann die elektrische Feldverteilung im Fernfeldbereich für beliebige Situation berechnet werden. Abbildung 2.6 zeigt die Definition der Variablen für

2.4 Theorie zur Fokussierung eines Lasers bei hoher numerischer Apertur 21

die Berechnung nach Gleichung 2.14. Die ortsabhängige Amplitude, gegeben durch $A(\theta, \phi)$, wird nach Gleichung 2.15 berechnet:

$$A(\theta, \phi) = A_0 e^{-\left(\gamma \frac{\sin \theta}{\sin \alpha}\right)^2} \sqrt{\cos \theta} A_{Ab}(\theta, \phi) \quad (2.15)$$

A_0 ist die maximale Amplitude des elektrischen Feldes, γ ist das Verhältnis aus $1/e^2$ -

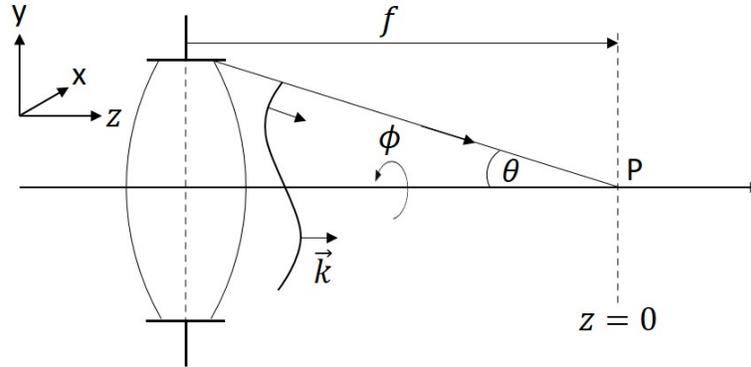


Abbildung 2.6: Definition der Variablen zur Berechnung der Feldverteilung im Fokus eines Objektivs mit hoher numerischer Apertur.

Strahldurchmesser w_0 und Aperturöffnung a_0 ($\gamma = w_0/a_0$). Der Apodisationsfaktor $\sqrt{\cos \theta}$ beschreibt den Amplitudenverlauf entlang des Polarwinkels θ und spiegelt die Unterdrückung von Nebenmaxima des fokussierten Gauss-förmigen Laserstrahls wieder. Der maximale Öffnungswinkel des Kegels des fokussierten Laserstrahls ist mit α gegeben und berechnet sich über die numerische Apertur NA und dem Brechungsindex n nach $\alpha = \arcsin NA/n$. Aberrationen werden über die Funktion $A_{ab}(\theta, \phi)$ angegeben. Dieser Anteil führt zu einer Wellenfrontdeformation der einfallenden, ebenen Welle. Aberrationen sind gerade in der supraauflösenden Mikroskopie unbedingt zu vermeiden bzw. zu kompensieren, da bereits kleine Beiträge die maximal erzielbare Auflösung stark verschlechtern können. Bei STED müssen zudem nicht nur die Aberrationen des Anregungslasers betrachtet werden, sondern auch die des STED-Lasers. Die Homogenität und der Kontrast der STED-Intensitätsprofile (vgl. Abschnitt 2.3.2) sind sehr empfindlich auf Aberrationen und führen je nach Art der Aberration gegebenenfalls zu nicht brauchbaren Punktspreizfunktionen. Unerwünschte Wellenfrontdeformationen können durch nicht absolut plan verlaufende Spiegelflächen entstehen. Werden Spiegel zu fest entlang einer Achse eingespannt, kann dies zu einer Wölbung des Spiegels über die Achse führen und das wiederum zu einem Astigmatismus. Ebenso ist die exakte Kollimation und Ausrichtung des Lasers entscheidend, um sphärische Aberration oder eine Verkippung der Wellenfront zu vermeiden. Eine verkippete Wellenfront führt zu einem räumlichen Versatz im Fokus, entsprechend einer schiefen Einkopplung in die rückwärtige Apertur des Objektivs. Auch ist in der STED-Mikroskopie wichtig, Spiegel mit einem möglichst dicken Substrat zu verwenden. Damit wird eine höhere Planheit über die gesamte Fläche sowie eine höhere Stabilität gegenüber thermische Einflüsse und Erschütterung erzielt, was die Voraussetzung der Reduktion bzw. Vermeidung unerwünschter

Deformationen der STED-Laserwellenfront darstellt.

Eine gute Darstellung über häufig vorkommenden Aberrationen und deren Auswirkung auf die STED-Intensitätsprofile findet sich in [70]. Hier werden sphärische Aberration, Koma und Astigmatismus für eine Vortex-Phase und eine π -Phase untersucht. In der vorliegenden Arbeit wird für die Berechnung der Aberrationen auf die Wellenfrontdeformation nach Zernike zurückgegriffen [71]. Über die Berechnung der Zernike-Polynome kann so die Abweichung von einer ideal planaren Wellenfront beschrieben werden. Die mathematische Modellierung der Wellenfront nach Zernike bietet sich aufgrund der Orthogonalität der Polynome über den Einheitskreis an. Die Polynome setzen sich aus den voneinander unabhängigen radialen Komponente $R_n^m(r)$ und den Winkelkomponenten $\cos(m\phi)$ bzw. $\sin(m\phi)$, zusammen. Die Ordnung der Aberration ist über n und m gegeben. Damit ist eine eindeutige Beschreibung der Wellenfront in Bezug auf eine Referenzwelle möglich. Wird das Polynom nach Gleichung 2.16 für die jeweilige Art der Aberration berechnet und als zusätzlicher Phasenterm aufgefasst, können typischerweise auftretende Aberrationen in der Simulation berücksichtigt werden. Gleichung 2.16 ergibt sich für gerade Polynome aus $Z_n^m(r, \phi) = R_n^m(r) \cos(m\phi)$ und ist dann ungleich Null, wenn $(n - m)$ gerade ist.

$$Z_n^m(r, \phi) = \sum_{l=0}^{\frac{n-m}{2}} \frac{(-1)^l (n-l)!}{l! \left(\frac{n+m}{2} - l\right)! \left(\frac{n-m}{2} - l\right)!} r^{n-2l} \cos(m\phi) \quad (2.16)$$

Abbildung 2.7 zeigt die Wellenfrontdeformation nach Zernike (Gl. 2.16) für eine Verkippung der Wellenfront (Tilt, Z_1^1), eine Defokussierung (Defokus, Z_2^0), für Koma (Z_3^1) und für den Astigmatismus (Z_3^2) in 3D- (links) und zweidimensionaler (2D)-Darstellung (rechts). Die Wellenfrontdeformation kann als ortsabhängige Verzögerung der Phase bzw. der Teilwellenfronten verstanden werden und kann daher gegenüber einer ebenen Referenzwelle positiv oder negativ verschoben sein. Damit berechnet sich die allgemeine Aberrationsfunktion zu:

$$A_{ab}(\theta, \phi) = e^{-iA_{ab,0}R_n^m(r) \cos(m\phi)} \quad (2.17)$$

Die Stärke der Aberration ist über einen Skalierungsfaktor $A_{ab,0}$ gegeben. In dieser Arbeit werden in Abschnitt 3.5.1 und 4.1.3 der Astigmatismus sowie der Tilt näher betrachtet. Aus Berechnung des Zernike-Polynoms für den Tilt Z_1^1 ergibt sich die Wellenfrontdeformation der Aberration $A_{ab,tilt}(\theta, \phi)$ zu:

$$A_{Ab,tilt}(\theta, \phi) = e^{-iA_{tilt} \left(\frac{\sin \theta}{\sin \alpha}\right) \cos \phi} \quad (2.18)$$

mit einem Skalierungsfaktor, A_{tilt} , welcher die Stärke der Verkippung in Radiant beschreibt. Der Astigmatismus berechnet sich zu:

$$A_{Ab,asti}(\theta, \phi) = e^{-iA_{asti} \left(\frac{\sin \theta}{\sin \alpha}\right)^2 \cos(2\phi)} \quad (2.19)$$

mit einem Skalierungsfaktor A_{asti} . Liegt keine Wellenfrontdeformation vor, sind die Skalierungsfaktoren null und es gilt $A_{ab}(\theta, \phi) = 1$.

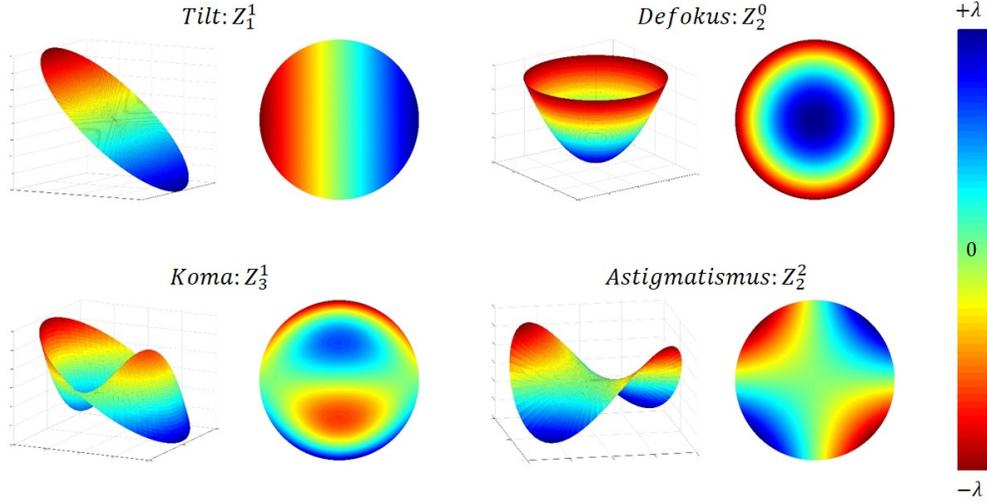


Abbildung 2.7: Räumliche Darstellung häufig auftretender Wellenfrontdeformationen des fokussierten Laserstrahls, beschrieben über Zernike-Polynome: Z_1^1 : Tilt, Z_2^0 Defokus, Z_3^1 Koma, Z_2^2 Astigmatismus. Links: 3D-Darstellung, rechts: 2D-Darstellung.

Der Wellenvektor \vec{k} in Gleichung 2.14 berechnet sich als Produkt aus der Wellenzahl $k = (2\pi n)/\lambda$ und dem Einheitswellenvektor in Kugelkoordinaten \hat{k} folgendermaßen:

$$\vec{k} = k \cdot \hat{k} = \frac{2\pi}{\lambda} \cdot \begin{pmatrix} \sin \theta \cos \phi \\ \sin \theta \sin \phi \\ \cos \theta \end{pmatrix} \quad (2.20)$$

Mit dem Koordinatenvektor $\vec{r} = (x, y, z)$ resultiert das Skalarprodukt $\vec{k} \circ \vec{r}$ schließlich zu:

$$\vec{k} \circ \vec{r} = k (x \sin \theta \cos \phi + y \sin \theta \sin \phi + z \cos \theta) \quad (2.21)$$

Dieser Ausdruck beschreibt die Phasenlage der einfallenden und fokussierten Wellenfront für jeden Punkt im Bereich des Fokus. Nun muss noch der Polarisationszustand des einfallenden elektrischen Feldes berücksichtigt werden. Bei Systemen mit niedriger numerischer Apertur kann, bei paraxialer Betrachtung, die elektrische Feldkomponenten entlang der axialen Richtung (z -Koordinate), vernachlässigt werden. Bei hohen NA's hingegen ist die Depolarisation nicht mehr zu vernachlässigen. Im folgenden Abschnitt wird der Polarisationsvektor $\vec{P}(\theta, \phi)$ für lineare und zirkulare Polarisation ausführlich beschreiben.

2.4.1 Lineare und zirkulare Polarisation

Um eine möglichst umfassende und exakte Berechnung der elektrischen Feldverteilung im Fokus bei Objektiven mit hoher NA zu ermöglichen, ist die Betrachtung des Polarisationszustandes des elektrischen Feldes unerlässlich. Es zeigt sich gerade bei der STED-

Mikroskopie, dass die Polarisierung ein sehr kritischer Parameter für die Qualität der STED-Intensitätsprofile (s. Kap. 2.3.2) darstellt [66]. Prinzipiell kann mit der Theorie nach Gleichung 2.14 jede Feldverteilung mit beliebiger einfallender Polarisierung berechnet werden. Dies wird dadurch erzielt, dass die einfallende Polarisierung, beschrieben durch den Jones-Vektor \vec{J} , mit einer Polarisationsänderungsmatrix $\mathbf{P}(\theta, \phi)$ multipliziert wird. Die Änderungsmatrix ergibt sich aus:

$$\mathbf{P}(\theta, \phi) = \mathbf{R}^{-1}(\phi) \cdot \mathbf{C}(\theta) \cdot \mathbf{R}(\phi) \quad (2.22)$$

Jede Polarisierung kann als Superposition aus zwei orthogonal linear polarisierten Teilwellen verstanden werden. Für die Berechnung wird das Koordinatensystem der einfallenden Teilwelle vor Anwendung der Depolarisationsmatrix $\mathbf{C}(\theta)$ so gedreht, dass die x -Achse der Änderungsmatrix mit der betrachteten Teilkomponente des elektrischen Feldes parallel ist. Hierzu wird die Rotationsmatrix $\mathbf{R}(\phi)$ auf den Vektor \vec{J} angewendet. Nach Anwendung von $\mathbf{C}(\theta)$ wird das Koordinatensystem wieder in die Ausgangslage zurückgedreht. Die Rotationsmatrix ist gegeben durch:

$$\mathbf{R}(\phi) = \begin{pmatrix} \cos \phi & \sin \phi & 0 \\ -\sin \phi & \cos \phi & 0 \\ 0 & 0 & 1 \end{pmatrix} \quad (2.23)$$

Dieser Vorgang ist in Abbildung 2.8 schematisch dargestellt. Die Teilkomponente des elektrischen Feldes tritt durch die Apertur und erfährt eine Verkippung in der xz -Ebene. Daraus resultieren neue Teilkomponenten P_x und P_z , welche von θ abhängen. Die neuen Teilkomponenten für xx , xz , zx und zz ergeben sich nach den in Abbildung 2.8 gezeigten geometrischen Überlegungen und führen zur Änderung der Polarisierung entsprechend Gleichung 2.24:

$$\mathbf{C}(\theta) = \begin{pmatrix} \cos \theta & 0 & \sin \theta \\ 0 & 1 & 0 \\ -\sin \theta & 0 & \cos \theta \end{pmatrix} \quad (2.24)$$

Aufgrund der Anwendung der Rotationsmatrizen liegt keine Änderung in y -Richtung vor. Die entsprechenden Komponenten in $\mathbf{C}(\theta)$ sind null (xy , yx , yz , zy) oder 1 (yy). Für die Polarisationsmatrix $\mathbf{P}(\theta, \phi)$ folgt nach Gleichung 2.22 schließlich unter Anwendung von 2.23 und 2.24:

$$\mathbf{P}(\theta, \phi) = \begin{pmatrix} \cos \phi & -\sin \phi & 0 \\ \sin \phi & \cos \phi & 0 \\ 0 & 0 & 1 \end{pmatrix} \cdot \begin{pmatrix} \cos \theta & 0 & \sin \theta \\ 0 & 1 & 0 \\ -\sin \theta & 0 & \cos \theta \end{pmatrix} \cdot \begin{pmatrix} \cos \phi & \sin \phi & 0 \\ -\sin \phi & \cos \phi & 0 \\ 0 & 0 & 1 \end{pmatrix} \quad (2.25)$$

Wird Gleichung 2.25 berechnet, ergibt sich die vollständige Polarisationsänderungsmatrix $\mathbf{P}(\theta, \phi)$ in Abhängigkeit des Polarwinkels θ und des Azimutalwinkels ϕ zu:

$$\mathbf{P}(\theta, \phi) = \begin{pmatrix} \cos^2 \phi \cos \theta + \sin^2 \phi & \cos \phi \sin \phi (\cos \theta - 1) & \cos \phi \sin \theta \\ \cos \phi \sin \phi (\cos \theta - 1) & \sin^2 \phi \cos \theta + \cos^2 \phi & \sin \phi \sin \theta \\ -\sin \theta \cos \phi & -\sin \theta \sin \phi & \cos \theta \end{pmatrix} \quad (2.26)$$

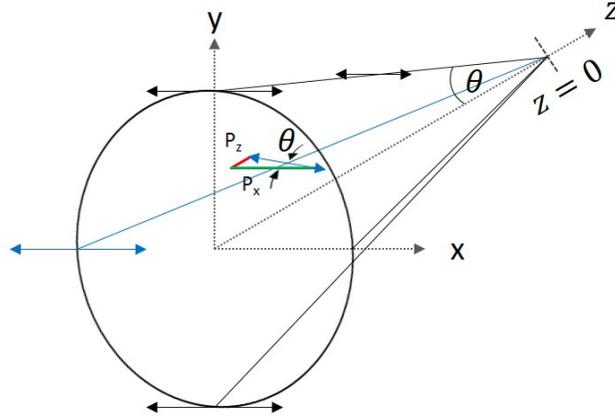


Abbildung 2.8: Schematische Darstellung der Polarisationsänderung bei Fokussierung mit hoher numerischer Apertur. Die Transformationsmatrix bezieht sich auf eine einfallende Polarisation in x -Richtung (horizontal). Die Verwendung von Rotationsmatrizen erlaubt die Berechnung der Polarisationsänderung aller Richtungen. In Rot und Grün sind die Komponenten der Polarisation nach Fokussierung in x - und z -Richtung dargestellt. Ein in x -Richtung polarisiertes elektrisches Feld wird bei Fokussierung in z -Richtung verkippt. Die Änderung wird über die neuen Komponenten $P_{xx}(= \cos \theta)$ sowie $P_{xz}(= \sin \theta)$ beschrieben. Aufgrund der Symmetrie gilt entsprechend $P_{zx}(= -\sin \theta)$ sowie $P_{zz}(= \cos \theta)$. In Relation zur y -Achse gibt es im Falle einer reinen x -Polarisation keine Änderung. Somit sind gilt $P_{xy} = P_{yx} = P_{yz} = P_{zy} = 0$ und $P_{yy} = 1$.

Diese Matrix kann nun mit einem Jones-Vektor \vec{J} , welcher die einfallende Polarisation beschreibt, entsprechend Gleichung 2.27 multipliziert werden und beschreibt somit die in Gleichung 2.14 einfließende Polarisationsänderung $\vec{P}(\theta, \phi)$.

$$\vec{P}(\theta, \phi) = \mathbf{P}(\theta, \phi) \cdot \vec{J} \quad (2.27)$$

Typischerweise handelt es sich bei der Emission von Laserstrahlung um linear polarisiertes Licht. Dabei wird je nach Laser entweder horizontal oder vertikal polarisiertes Licht emittiert. Für die Mikroskopie wird neben einem linearen auch ein zirkularer Polarisationszustand häufig eingesetzt. Ebenso ist gerade in der STED-Mikroskopie je nach Phasenmaske zwingend eine zirkulare Polarisation zu verwenden. Im Experiment kann die Polarisation ausgehend von einer linearen Polarisation mittels doppelbrechender Wellenplatten eingestellt werden. Wie bereits erwähnt, kann das elektrische Feld in zwei orthogonal orientierte Teilkomponenten aufgespalten werden. Durch Multiplikation einer komplexen Phase in einer der Komponenten, kann jede beliebige Polarisation dargestellt werden. Eine elegante Methode diesen Umstand als Vektor auszudrücken, liegt daher in der Verwendung der Jones-Vektoren. Bei zirkular polarisiertem Licht handelt es sich um zwei linear polarisierte Wellen, welche einen Phasenverzug von $+\pi/2$ für linkszirkular polarisiertes (LCP) und $-\pi/2$ für rechtszirkular polarisiertes (RCP) Licht aufweisen. Damit ergibt sich der

Jones-Vektor für zirkular polarisiertes Licht zu:

$$\vec{J}_{LCP,RCP} = \begin{pmatrix} 1 \\ \pm i \\ 0 \end{pmatrix} \quad (2.28)$$

Wird der entsprechende Jones-Vektor in Gleichung 2.27 unter Berücksichtigung von Gleichung 2.26 eingesetzt, beträgt die Polarisationsänderung $\vec{P}(\theta, \phi)$ zu:

$$\vec{P}_{LCP,RCP}(\theta, \phi) = \begin{pmatrix} \cos^2 \phi \cos \theta + \sin^2 \phi \pm i (\cos \phi \sin \phi (\cos \theta - 1)) \\ \cos \phi \sin \phi (\cos \theta - 1) \pm i (\sin^2 \phi \cos \theta + \cos^2 \phi) \\ - \sin \theta (\cos \phi \pm i \sin \phi) \end{pmatrix} \quad (2.29)$$

Der Jones-Vektor für in x -Richtung (horizontal) polarisiertes Licht, lautet:

$$\vec{J}_{LHP} = \begin{pmatrix} 1 \\ 0 \\ 0 \end{pmatrix} \quad (2.30)$$

Damit berechnet sich die Polarisationsänderung $\vec{P}_{LHP}(\theta, \phi)$ für diesen Fall zu:

$$\vec{P}_{LHP}(\theta, \phi) = \begin{pmatrix} \cos^2 \phi \cos \theta + \sin^2 \phi \\ \cos \phi \sin \phi (\cos \theta - 1) \\ - \sin \theta \cos \phi \end{pmatrix} \quad (2.31)$$

Entsprechend ist der Jones-Vektor für in y -Richtung (vertikal) polarisiertes Licht definiert als:

$$\vec{J}_{LVP} = \begin{pmatrix} 0 \\ 1 \\ 0 \end{pmatrix} \quad (2.32)$$

Daraus resultiert die Polarisationsänderung $\vec{P}_{LVP}(\theta, \phi)$:

$$\vec{P}_{LVP}(\theta, \phi) = \begin{pmatrix} \cos \phi \sin \phi (\cos \theta - 1) \\ \sin^2 \phi \cos \theta + \cos^2 \phi \\ - \sin \theta \cos \phi \end{pmatrix} \quad (2.33)$$

Je nach zu berechnenden Polarisationszustand, wird der entsprechende Ausdruck in Gleichung 2.14 eingesetzt. Im Anhang A sind die vollständigen Ausdrücke in Abhängigkeit der oben dargestellten Polarisationszustände aufgeführt. Aus Berechnung des Zweifach-Integrals (Gl. 2.14) ergeben sich die jeweiligen Feldkomponenten für das elektrische Feld in Bezug auf die Raumkoordinaten. Letztlich muss aus den komplexwertigen Feldkomponenten noch die Intensität berechnet werden. In dem folgenden Unterkapitel 2.4.2 wird die Berechnung der nichtlinearen Anregungs-PSF sowie die PSF der STED-Intensitätsprofile gezeigt.

2.4.2 Punktspreizfunktion (PSF) der nichtlinearen STED-Mikroskopie

Im vorangestellten Unterkapitel wird die Theorie zu Berechnung der elektrischen Feldverteilung über die Raumkoordinaten x , y und z und die Einflussparameter ausführlich erläutert. Zur Berechnung der PSF's für die STED-Mikroskopie muss nun noch der zusätzliche Phasenterm $\exp(i\Delta\Gamma(\theta, \phi))$, welcher in Gleichung 2.14 zu finden ist, eingeführt werden. Mittels der zusätzlichen Phase $\Delta\Gamma(\theta, \phi)$ können Phasenmasken, wie sie in Abschnitt 2.3.2 beschrieben sind, modelliert werden. Die Vortex-Phasenmaske zeichnet sich dadurch aus, dass die Phase der einfallenden Wellenfront azimuthal von 0 bis 2π verzögert wird. Ausgedrückt durch den Azimuthalwinkel ϕ ergibt sich damit für die Vortex-Phase die Phasenverzögerung zu:

$$\Delta\Gamma(\theta, \phi) = \phi \quad (2.34)$$

Entsprechend resultiert daraus ein Phasenterm von $\exp(i\phi)$.

Die π -Phasenmaske, welche in der STED-Mikroskopie für die axiale Auflösungsverbesserung verwendet wird, muss hingegen mittels einer Fallunterscheidung modelliert werden. Wie bereits in Abschnitt 2.3.2 dargelegt, besteht die π -Phasenmaske aus zwei Segmenten: Ein innerer Bereich induziert einen π -Phasenschub und ein äußerer Bereich prägt keine effektive Phasenmodulation auf. Daraus ergibt sich folgender Ausdruck für $\Delta\Gamma(\theta, \phi)$:

$$\Delta\Gamma(\theta, \phi) = \begin{cases} \pi & \theta \leq \alpha_\pi \\ 0 & \text{sonst} \end{cases} \quad (2.35)$$

Die Fläche für den π -Phasenschub ist über den Grenzwinkel α_π definiert. Der Grenzwinkel ergibt sich aus der Bedingung, dass das Intensitätsverhältnis über beide Teilflächen gleich eins ist. Wird angenommen, dass ein die rückwärtige Apertur überstrahlendes, rechteckförmiges Strahlprofil in das Mikroskop-Objektiv eingekoppelt wird, müsste das Flächenverhältnis der π -Phasenmaske 1 : 1 betragen. Dies bedeutet, dass der äußere Radius (r_a) um das $\sqrt{2}$ -fache größer als der innere Radius (r_i) sein muss (vgl. Abbildung 2.5). Nimmt man dagegen an, dass der eingekoppelte Strahldurchmesser des Gaußstrahls in Bezug auf die $1/e^2$ -Intensität mit dem Durchmesser der Apertur übereinstimmt, muss der innere Radius das 0.392-fache des äußeren Radius bzw. des Durchmessers der rückwärtigen Apertur betragen. Eine solches Einkopplungsverhältnis bedeutet $\gamma = 1$ (Gleichung 2.14). Der Winkel, innerhalb dessen der π -Phasenschub auftritt, lässt sich in Abhängigkeit des Faktors v_π berechnen als $\alpha_\pi = \arcsin(v_\pi \sin \alpha)$. v_π spiegelt dabei die je nach Einkopplung notwendigen Flächenverhältnisse wieder und variiert zwischen 0 und 1.

Unter Berücksichtigung aller Einflüsse auf die Feldverteilung im Fokus, wie Phasenmodulation, Aberration oder Polarisierung, muss letztlich noch die Intensität berechnet werden. Da es sich bei den Feldkomponenten um komplexe Zahlen handelt, welche die Amplitude und die Phase des Feldes beinhalten, wird zur Berechnung der Intensität der Betrag der jeweiligen Feldkomponenten gebildet. Für die Intensität bei einer Wellenlänge λ gilt dann

$I(\lambda) = E^*E$, woraus sich Gleichung 2.36 ergibt:

$$I(\lambda) = |E_x|^2 + |E_y|^2 + |E_z|^2 \quad (2.36)$$

Dieser Ausdruck entspricht der Intensitätsverteilung im Fall einer linearen Anregung bzw. Absorption. Um aus dieser PSF die Intensitätsverteilung im Fall einer 2P-Anregung zu erhalten, also einer nichtlinearen Absorption, muss Gleichung 2.36 noch quadriert werden [29]:

$$I_{2P} = I(\lambda)^2 \quad (2.37)$$

Für den Fall einer nichtlinearen Anregung mit zwei unterschiedlichen Wellenlängen λ_1 und λ_2 , wie dies bei der 2C2P-Anregung gegeben ist, werden die Intensitätsverteilungen für die jeweiligen Punktspreizfunktionen miteinander multipliziert:

$$I_{2C2P} = I(\lambda_1) \cdot I(\lambda_2) \quad (2.38)$$

Gleichung 2.38 gilt allerdings nur, wenn beide eingestrahlenen elektrischen Felder einen gleichermaßen orientierten Polarisationszustand aufweisen. Um die nichtlineare Interaktion der komplexen elektrischen Felder unterschiedlicher Wellenlänge für jeden Polarisationszustand korrekt abzubilden, muss die PSF der 2C2P-Anregung jedoch folgendermaßen berechnet werden:

$$I_{2C2P} = (|E_{x,1} + E_{x,2}|^2 + |E_{y,1} + E_{y,2}|^2 + |E_{z,1} + E_{z,2}|^2)^2 \quad (2.39)$$

Hierbei werden die elektrischen Felder der jeweiligen Wellenlängen für jede Raumkoordinate addiert. Somit können auch Interferenzeffekte, welche aus dem relativen Phasenversatz zwischen den elektrischen Feldern resultieren, abgebildet werden. Das elektrische Feld der Überlagerung wird komponentenweise quadriert und ergibt die Intensität. Die Nichtlinearität der Anregung wird durch erneutes Quadrieren (vgl. Gleichung 2.37) der Summe über die Teilkomponenten berücksichtigt. Nur mit dem Ausdruck 2.39 können folglich polarisationsabhängige Interferenz- bzw. Überlagerungseffekte im Fokus für die Zweifarben-Zweiphotonen-Absorption korrekt berechnet werden.

Mit diesem Modell ist es nun möglich, die Intensitätsverteilungen sowohl für die nichtlineare Anregung als auch für den STED-Prozess zu berechnen. Dies erlaubt eine eingehende Analyse der Polarisationsabhängigkeit, der erzielbaren, maximalen Auflösung im Falle der 2C2P-Anregung, sowie der Einflüsse etwaiger Aberrationen. Ebenso kann eine Aussage über die Gestaltung und nachfolgende Funktion verschiedenster Phasenmasken getroffen werden, ohne diese unter sonst großem experimentellen Aufwand charakterisieren zu müssen. Mit Hilfe des numerischen Modells sind zudem Optimierungen in der Bildgebung möglich. In den bisherigen theoretischen Kapiteln wurden räumliche Eigenschaften ausführlich diskutiert. Neben der rein räumlichen Abhängigkeit des STED-Prozesses, gibt es allerdings auch einen signifikanten Einfluss der Zeitabhängigkeit. Sowohl die nichtlineare Anregung als auch die stimulierte Abregung unterliegen molekülspezifischen Zeitkonstanten, so dass in Abhängigkeit der verwendeten Laserparameter eine mehr oder weniger effiziente superauflösende Bildgebung möglich ist. Im nachfolgenden Abschnitt wird die Zeitdynamik des STED-Prozesses anhand eines Modells von Rategleichungen eingehend beschrieben und diskutiert.

2.5 Zeitdynamik des STED-Prozesses

Die effiziente Unterdrückung der spontanen Emission in Randbereichen eines angeregten Fluoreszenzvolumens, ist in der STED-Mikroskopie entscheidend für die Ausprägung der Auflösungsverbesserung. Bei Verwendung gepulster Lasersysteme sind die genaue zeitliche Synchronisation des Anregungs- und Abregungspulses sowie der zeitliche Abstand zwischen An- und Abregung äußerst kritisch. Ist die zeitliche Synchronisation nicht exakt oder weichen die Repetitionsraten beider Lasersysteme voneinander ab, liegt eine Modulation der stimulierten Abregung vor. Gemittelt über mehrere Pulse führt dies zu einer ineffizienten stimulierten Abregung und damit nur zu einer geringeren oder überhaupt keiner Auflösungsverbesserung. Neben den zeitlichen Eigenschaften des Lasers, wie Pulsdauer oder Repetitionsrate, fließt in die Effizienzbetrachtung des STED-Prozesses auch die Photodynamik des Fluorophors mit ein. Unter Berücksichtigung des Systems aus Laser und Fluoreszenzfarbstoff, ergibt sich auch der zeitliche Abstand, welcher zwischen Anregungs- und Abregungspuls vorliegen soll. Aus der Kenntnis der Moleküldynamik kann ein Optimum für den zeitlichen Abstand gefunden werden, so dass eine möglichst geringe Pulsenergie des STED-Lasers aufgebracht werden muss, um dennoch eine maximale stimulierte Abregung zu erzielen. Aus Vermessung der Kinetik der Fluoreszenz in Abhängigkeit des zeitlichen Versatzes zwischen der Laserpulse, können zudem molekülspezifische Parameter, wie der Absorptionswirkungsquerschnitt oder die Fluoreszenzlebensdauer, bestimmt werden. Die energetische Übergangsdynamik ist ein komplexes Zusammenspiel aus den Prozessen der Absorption, spontaner und stimulierter Emission sowie strahlungsloser Übergänge, in Abhängigkeit der zeitlichen Eigenschaften der Laser. Eine geschlossen-analytische Lösung zur Berechnung der Dynamik ist daher nicht möglich. Um derartige Prozesse zu berechnen, bietet sich die Verwendung eines Systems aus Ratengleichungen an, welches mit gekoppelten Differentialgleichungen mathematisch modelliert wird. Für die STED-Mikroskopie verwendete Ratengleichungssysteme finden sich unter anderem in [31], wobei in dieser Arbeit auf eine eigene Darstellung mit Erweiterung auf die 2C2P-Anregung sowie der 2P-Direktanregung durch den STED-Laser zurückgegriffen wird.

Die für die STED-Effizienz relevanten Übergänge sind schematisch an einem Jablonski-Diagramm in Abbildung 2.9 gezeigt. Neben dem Anregungsprozess, ausgehend von einer 2P-Absorption zweier Photonen mit der Energie hc/λ , sind die strahlungslosen, vibronischen Übergänge, die Fluoreszenz, die stimulierte Emission sowie Anregungen durch den STED-Laser selbst gezeigt. Für die Modellierung werden die möglichen energetischen Übergänge des Fluoreszenzmoleküls in sechs unterschiedliche Niveaus aufgeteilt. Der Grundzustand, in diesem keinerlei elektronischer Anregung aufgrund von Lichtabsorption vorliegt, wird als S_0 bezeichnet. Der erste angeregte Zustand ist mit S_1 gekennzeichnet, beliebig höhere angeregte Zustände sind mit S_n benannt. Die vibronischen Niveaus sind für den angeregten Zustand mit S_1^{vib} , für das durch den STED-Prozess adressierte Niveau mit $S_{0,2}^{vib}$ und das durch die Fluoreszenz bevölkerte Niveau mit $S_{0,F1}^{vib}$ bezeichnet.

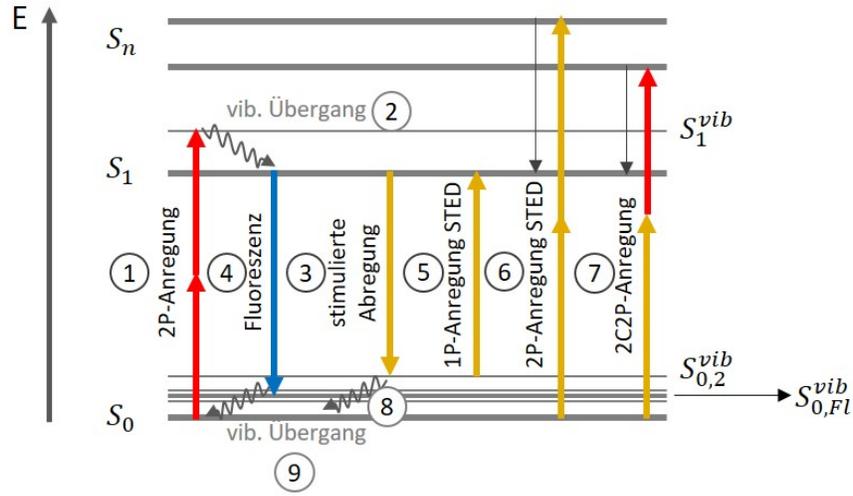


Abbildung 2.9: Jablonski-Diagramm der möglichen energetischen Übergänge bei STED. Jeder Übergang wird durch einen Term in den Ratengleichungen modelliert. (1) 2P-Anregung mit dem Anregungslaser. (2) Vibronischer Übergang des angeregten Zustands. (3) Stimulierte Abregung mit dem STED-Laser. (4) Spontane Emission (Fluoreszenz). (5) 1P-Wiederanregung mit dem STED-Laser aus dem vibronischen Zustand des Grundzustandes. (6) 2P-Direktanregung mit dem STED-Laser. (7) 2C2P-Anregung. (8) Vibronischer Übergang des Grundzustandes der stimuliert abgeregten Zustände. (9) Vibronischer Übergang des Grundzustandes der fluoreszierten Zustände.

In dem hier dargestellten Modell sind Effekte des Photobleichens, also die photochemische Zerstörung des Fluoreszenzmoleküls, vernachlässigt, da diese das Modell je nach Art des Bleichens deutlich verkomplizieren würden und ggf. nur geringfügig Mehrwert liefern. Je nach Wahl der Probe und der Präparation, kann das Photobleichen für dieses spezifische System sehr gering gehalten werden, so dass die Vernachlässigung solcher Effekte zulässig ist. Dennoch lässt sich dieses Modell derart erweitern, dass die verschiedenen photochemischen Prozesse miteinbezogen werden können [72, 73]. Das in Abbildung 2.9 dargestellte Modell lässt sich als Ratengleichungsmodell mit den gekoppelten Differentialgleichungen 2.40 bis 2.44 mathematisch ausdrücken.

Im ersten Schritt wird das obere vibronische Niveau S_1^{vib} durch 2P-Anregung mit dem Anregungslaser bevölkert (Gl. 2.40, Abb. 2.9 (1)). Die Rate mit der die Bevölkung stattfindet, ist durch die Photonenflussdichte und dem Wirkungsquerschnitt über $k_{exc}^{2P} = I_{\Phi,1}^2(t) \sigma_{2P}^{\lambda 1}$ gegeben. Hierbei geht die Photonenflussdichte quadratisch ein, da es sich um eine 2P-Absorption handelt. Die zeitliche Änderung der Zustände im S_1^{vib} -Niveau hängt vom vibronischen Zerfall (2) in den elektronisch angeregten Zustand S_1 ab und geht mit der Rate k_1^{vib} ein. Die Zeitkonstante τ_1^{vib} für diesen Übergang liegt in der Größenordnung um einige Pikosekunden [45, 46]. Die Rate hingegen berechnet sich mittels $k_1^{vib} = 1/\tau_1^{vib}$. Die Änderung der Zustände pro Zeitintervall hängt von der Anzahl vorhandener Zustände N_1^{vib} im

oberen vibronischen Niveau ab. Je mehr Zustände vorhanden sind, desto größer ist die Änderung dN_1^{vib}/dt .

$$S_1^{vib} : \frac{dN_1^{vib}}{dt} = \underbrace{+N_0 I_{\Phi,1}^2(t) \sigma_{2P}^{\lambda 1}}_{(1)} \underbrace{-N_1^{vib} k_1^{vib}}_{(2)} \quad (2.40)$$

$$S_1 : \frac{dN_1}{dt} = \underbrace{+N_1^{vib} k_1^{vib}}_{(2)} \underbrace{-N_1 I_{\Phi,2}(t - \Delta\tau) \sigma_{1P}^{\lambda 2}}_{(3)} \underbrace{-N_1 k_{Fl}}_{(4)} \underbrace{+N_{0,2}^{vib} I_{\Phi,2}(t - \Delta\tau) \sigma_{1P}^{\lambda 2}}_{(5)} \\ + \underbrace{+N_0 I_{\Phi,2}^2(t - \Delta\tau) \sigma_{2P}^{\lambda 2}}_{(6)} \underbrace{+N_1 I_{\Phi}(t) I_{\Phi,2}(t - \Delta\tau) \sigma_{2P}^{\lambda 2C2P}}_{(7)} \quad (2.41)$$

$$S_{0,2}^{vib} : \frac{dN_{0,2}^{vib}}{dt} = \underbrace{+N_1 I_{\Phi,2}(t - \Delta\tau) \sigma_{1P}^{\lambda 2}}_{(3)} \underbrace{-N_{0,2}^{vib} I_{\Phi,2}(t - \Delta\tau) \sigma_{1P}^{\lambda 2}}_{(5)} \underbrace{-N_{0,2}^{vib} k_0^{vib}}_{(8)} \quad (2.42)$$

$$S_{0,Fl}^{vib} : \frac{dN_{0,Fl}^{vib}}{dt} = \underbrace{+N_1 k_{Fl}}_{(4)} \underbrace{-N_{0,Fl} k_0^{vib}}_{(8)} \quad (2.43)$$

$$S_0 : \frac{dN_0}{dt} = \underbrace{-N_0 I_{\Phi,1}^2(t) \sigma_{2P}^{\lambda 1}}_{(1)} \underbrace{+N_{0,2}^{vib} k_0^{vib}}_{(8)} \underbrace{-N_0 I_{\Phi,2}^2(t - \Delta\tau) \sigma_{2P}^{\lambda 2}}_{(6)} \\ - \underbrace{N_1 I_{\Phi,1}(t) I_{\Phi,2}(t - \Delta\tau) \sigma_{2P}^{\lambda 2C2P}}_{(7)} \underbrace{+N_{0,Fl} k_0^{vib}}_{(9)} \quad (2.44)$$

Da es sich in diesem Modell um eine Bilanzierung handelt, können keine Zustände das System verlassen. Negative Einträge in einer der Gleichungen müssen sich als positive Einträge in einer der anderen Gleichungen wiederfinden. Aus dieser Überlegung ergibt sich, dass die Übergangsrate der Zustände über den vibronischen Zerfall als positiver Eintrag in Gleichung 2.41 eingehen und somit das Niveau S_1 bevölkern. Die Änderung in S_1 ist weiterhin gegeben durch die stimulierte Emission (3) mit der Rate $k_{STED} = I_{\Phi,2}(t - \Delta\tau) \sigma_{1P}^{\lambda 2}$, welche durch die Einstrahlung des STED-Lasers stattfindet. $\Delta\tau$ ist hierbei der Zeitversatz des STED-Lasers zur Anregung. Die spontane Emission (4) beschreibt die Fluoreszenz und findet mit der Rate k_{Fl} statt. Die Zeitkonstante, aus dieser sich die Fluoreszenzrate nach $k_{Fl} = 1/\tau_{Fl}$ berechnen lässt, ist die für jedes Fluoreszenzmolekül charakteristische Fluoreszenzlebensdauer. Die Fluoreszenzlebensdauer bzw. die Übergangsrate der spontanen Emission gibt hierbei die Wahrscheinlichkeit an, nach dem ein bestimmter Anteil eines Ensembles elektronisch angeregter Zustände über spontane Emission zerfallen ist. Über viele Anregungs- und Emissionszyklen betrachtet, resultiert in Abhängigkeit der Zeit ein exponentieller Abfall der Fluoreszenz. Die charakteristische Zeit τ_{Fl} bezieht sich auf die Zeit, bei der die Fluoreszenzintensität auf das $1/e$ -fache der maximalen Intensität abgefallen ist. Für organische Fluorophore beträgt die Fluoreszenzlebensdauer einige ns.

Auch wenn die Fluoreszenzlebensdauer molekulspezifisch ist, muss beachtet werden, dass diese vom umgebenden Medium abhängig ist und sich unter anderem in Abhängigkeit des

pH-Werts ändern kann [47]. Die Beiträge (3) und (4) gehen negativ in die Bilanz für S_1 ein. Insbesondere wenn ein gepulster STED-Laser verwendet wird, muss noch eine mögliche Wiederanregung (5) und eine mögliche direkte 2P-Anregung (6) durch den STED-Laser berücksichtigt werden. Mit den Übergangsraten $I_{\Phi,2}(t-\Delta\tau) \sigma_{1P}^{\lambda_2^2}$ sowie $I_{\Phi,2}^2(t-\Delta\tau) \sigma_{2P}^{\lambda_2^2}$ wird hierfür Rechnung getragen. Bei einer direkten 2P-Anregung durch den STED-Laser, geht die Photonenflussdichte ebenfalls quadratisch in eine Direktanregung ein. Ebenso ist prinzipiell eine Zweifarben-Zweiphotonen-Anregung möglich (7). Das wird über das Produkt aus Photonenflussdichte des Anregungs- und des STED-Lasers abgebildet. Die Übergangsrate für den 2C2P-Prozess berechnet sich nach $k_{2C2P} = I_{\Phi,1}(t) I_{\Phi,2}(t-\Delta\tau) \sigma_{2P}^{\lambda_2^2}$. Wie bereits anhand von Gleichung 2.8 diskutiert, findet diese Anregung nur statt, falls Anregungs- und STED-Laser zeitlich überlappen.

Der stimulierte Übergang (3) aus Gleichung 2.41 findet sich als positiven Eintrag in dem vibronischen Zustand $S_{0,2}^{vib}$ des Grundzustands wieder. Dieser Zustand wird nur durch die stimulierte Emission mit der Wellenlänge λ_2 , also die des STED-Lasers, adressiert. Als negative Einträge sind hier die Wiederanregung durch den STED-Laser (5) sowie der vibronische Zerfall in den Grundzustand S_0 mit der Rate k_0^{vib} (8) zu finden. Die Rate des vibronischen Übergangs berechnet sich mit der Lebensdauer τ_0^{vib} durch $k_0^{vib} = 1/\tau_0^{vib}$ und weist Lebensdauern im ps-Bereich auf. Die spontane Emission aus Gleichung 2.41 geht in diesem Modell in den vibronischen Zustand $S_{0,Fl}^{vib}$ über. Damit wird berücksichtigt, dass bis auf den stimulierten Übergang alle weiteren strahlungsbehafteten Übergänge aus dem angeregten Zustand in Niveaus des Grundzustands als Fluoreszenz gezählt werden. Die Zustände des vibronischen Niveaus zerfallen nachfolgend mit der Rate k_0^{vib} (9) und gehen somit negativ in die Bilanz ein. Letztlich zerfallen die vibronischen Zustände in den elektronischen Grundzustand S_0 . Diese sind in Gleichung 2.44 die entsprechend positiven Einträge. Negativ dagegen schlagen die 2P-Anregung mit dem Anregungslaser (1) sowie die direkte 2P-Anregung mit dem STED-Laser (6) zu buche.

Die Fluoreszenzübergänge sind prinzipiell in einen spektral breiten Bereich, entsprechend einem Bereich verschiedener vibronischer Banden möglich, so dass sich ein spektral breitbandiges Emissionsspektrum ergibt. Die Energiedifferenzen aus den strahlungslosen Übergängen führen zu einer Verschiebung des Emissionsspektrums gegenüber der Anregung in den roten Spektralbereich. Die Fluoreszenz über einen Laserzyklus, also zwischen zwei Laserpulsen mit dem Abstand $T = 1/f_{Rep}$, ergibt sich aus dem Zeit-Integral über den Fluoreszenzterm (4) in Gleichung 2.41:

$$N_{Fl} = \int_0^T N_1(t) \cdot k_{Fl} dt \quad (2.45)$$

Wird nun der STED-Laser mit $\Delta\tau$ gegenüber der Anregung verzögert, führt das zu einer Unterdrückung der Fluoreszenz. Die Simulation in Abhängigkeit von $\Delta\tau$ und Integration über die Fluoreszenz entsprechend Gleichung 2.45, ergibt die Zeitdynamik des STED-Prozesses.

2.6 Auflösung der STED-Mikroskopie

Wie bereits in Abschnitt 2.3.1 beschrieben ist, resultiert die Auflösungsverbesserung bei STED aus der Einschnürung der effektiven Anregungs-PSF. Die Auflösung hängt damit wesentlich von der Effizienz der Unterdrückung der spontanen Emission in dem Randbereich der Anregungs-PSF ab. Die Unterdrückung resultiert aus einer Bilanz zwischen stimulierter Emission und Effekten, welche dem gezielten Ausschalten der Fluoreszenz entgegenwirken. Mögliche Prozesse hierfür sind im vorangestellten Unterkapitel beschrieben. Ein Ansatz ist es, die maximal zu erzielende Auflösung in der STED-Mikroskopie über das Ratengleichungsmodell (s. Abb. 2.9) herzuleiten. Entscheidend ist hierbei die Übergangsrate der stimulierten Emission, welche durch den STED-Laser hervorgerufen wird (vgl. (3) in Gl. 2.41). Es wird von der Übergangsrate mittels spontaner und stimulierter Emission wie folgt ausgegangen:

$$\frac{dN_1}{dt} = -N_1(t) (I_{\Phi,2}(t) \sigma_{1P}^{\lambda_2} + k_{Fl}) \quad (2.46)$$

Die Differentialgleichung lässt sich mittels Trennung der Variablen lösen. Mit der Anfangswertbedingung $N(t=0) = N_{1,0}$ ergibt sich:

$$\int_{N_{1,0}}^N \frac{dN}{N_1(t)} = - \int_{t=0}^t (I_{\Phi,2}(t) \sigma_{1P}^{\lambda_2} + k_{Fl}) dt \quad (2.47)$$

Mit der Intensität des STED-Lasers I_{STED} und $I_{\Phi,2}(t) = I_{STED} \lambda/(hc)$ folgt:

$$N(t) = N_{1,0} e^{-(I_{STED} \lambda/(hc) \sigma_{1P}^{\lambda_2} + k_{Fl}) t} \quad (2.48)$$

Die stimulierte Emission kann nur in Anwesenheit des STED-Pulses mit der Pulsbreite τ_P stattfinden, so dass gilt $t = \tau_P$. Nun kann ein Unterdrückungsfaktor η , welcher die stimulierte Emission im Verhältnis zur spontanen Emission beschreibt, berechnet werden. Es gilt $\eta_{STED} = N(\tau_P, I_{STED})/N(\tau_P, I_{STED} = 0)$, wobei $N(\tau_P, I_{STED} = 0) = e^{-k_{Fl}\tau_P}$ dem Fluoreszenzterm der spontanen Emission entspricht. Für η folgt demnach:

$$\eta_{STED} = e^{-I_{STED} \lambda/(hc) \sigma_{1P}^{\lambda_2} \tau_P} \quad (2.49)$$

Es zeigt sich, dass für die Unterdrückung nur der durch den STED-Laser induzierte Übergang verantwortlich ist. Aus Gleichung 2.49 kann nun eine für den Fluorophor spezifische Sättigungsintensität I_{Sat} definiert werden, bei der die Hälfte aller angeregten Fluoreszenzmoleküle stimuliert abgeregt ($I_{Fl}/I_{FL,0} = 1/2$) werden.

$$\eta_{STED} = \frac{1}{2} = e^{-I_{Sat} \lambda/(hc) \sigma_{1P}^{\lambda_2} \tau_P} \quad (2.50)$$

$$I_{Sat} = \frac{hc \ln 2}{\lambda \sigma_{1P}^{\lambda_2} \tau_P} \quad (2.51)$$

Wird Gleichung 2.51 nach $(\lambda \sigma_{1P}^{\lambda_2} \tau_P)/(hc)$ umgestellt und in Gleichung 2.49 eingesetzt, ergibt sich der Unterdrückungsfaktor η zu [74]:

$$\eta_{STED} = e^{-\ln 2 (I_{STED}/I_{Sat})} \quad (2.52)$$

Um aus der Unterdrückung der Fluoreszenz nun die Auflösungsverbesserung zu erhalten, wird die räumliche Intensitätsverteilung im Fokus des STED-Lasers betrachtet. Wird eine Vortex-Phase oder eine π -Phase für die laterale bzw. axiale Auflösungsverbesserung angewendet, kann der Intensitätsverlauf im Zentrum des fokussierten STED-Lasers entlang der x - bzw. z -Achse als Parabel folgendermaßen beschrieben werden [25]:

$$I_{STED}(x) = I_{STED,0} 4a^2 x^2 \quad (2.53)$$

$$I_{STED}(z) = I_{STED,0} 4b^2 z^2 \quad (2.54)$$

Die Parameter a bzw. b geben die Flankensteilheit der Intensitätsverteilung an und $I_{STED,0}$ ist das Maximum der eingestrahnten STED-Laserintensität. Im Zentrum der Intensitätsverteilung gilt $I_{STED}(x, z = 0) = 0$. Wird Gleichung 2.53 in 2.52 eingesetzt, resultiert der ortsabhängige Unterdrückungsfaktor $\eta_{STED}(x)$:

$$\eta_{STED}(x) = e^{-4 \ln 2 a^2 (I_{STED,0}/I_{Sat}) x^2} \quad (2.55)$$

Gleiches gilt für die axiale Betrachtung:

$$\eta_{STED}(z) = e^{-4 \ln 2 b^2 (I_{STED,0}/I_{Sat}) z^2} \quad (2.56)$$

Durch Multiplikation der konfokalen Punktspreizfunktion $h_c(x)$ mit dem Unterdrückungsfaktor $\eta_{STED}(x)$ folgt die effektive Punktspreizfunktion $h_{eff}(x) = h_c(x) \eta_{STED}(x)$ [25]:

$$h_{eff}(x) = e^{-4 \ln 2 x^2/d_c^2} e^{-4 \ln 2 a^2 (I_{STED,0}/I_{Sat}) x^2} = e^{-4 \ln 2 (d_c^{-2} + a^2 (I_{STED,0}/I_{Sat})) x^2} \quad (2.57)$$

Die Halbwertsbreite dieser Gauss-Funktion definiert die maximal zu erzielende Auflösung d in Abhängigkeit der STED-Laserintensität und der Flankensteilheit a des Abregungsprofils.

$$d = \frac{d_c}{\sqrt{1 + d_c^2 a^2 \frac{I_{STED,0}}{I_{Sat}}}} \quad (2.58)$$

Gleichung 2.58 ist zu entnehmen, dass ohne STED-Laser ($I_{STED,0} = 0$) die konfokale Auflösung $d = d_c$ erzielt wird. Zudem zeigt sich, dass die Auflösung prinzipiell nicht begrenzt ist, da mit zunehmender Intensität des STED-Lasers der Nenner unendlich groß und somit der Abstand d zweier Objekte, welcher noch auflösbar ist, unendlich klein werden kann. Dies ist in der Praxis jedoch aufgrund von Photobleichen oder thermischer Zerstörung der Probe limitiert. Das Linienprofil der effektiven Punktspreizfunktion bei STED (Gleichung 2.58) entspricht einem Lorentzprofil und weist steilere Flanken als ein Gauss-förmiges Profil auf.

Nach obiger Herleitung zeigt sich, dass die Auflösung wesentlich von der Unterdrückung der Fluoreszenz in den äußeren Randbereichen abhängt. Zur Berechnung wird von dem Verhältnis der Übergangsraten bei Einstrahlung des STED-Lasers gegenüber der Übergangsrate ohne Einstrahlung des STED-Lasers ausgegangen. Für diese Betrachtung wurde allerdings vernachlässigt, dass eine Wiederanregung bzw. direkte 2P-Anregung durch den

STED-Laser die Zustände im S1-Niveau bevölkert bzw. erneut bevölkern kann. Dieser Anteil wirkt sich entgegengesetzt zur Unterdrückung aus, so dass daraus eine Minimierung der effektiven Auflösungsverbesserung resultieren kann.

Wie in 2.5 beschrieben ist, wirken die Anteile (5) und (6) in Gleichung 2.41 der Depopulation durch den STED-Laser entgegen. Allerdings kann aufgrund der hohen Übergangsrate des vibronischen Zerfalls mit k_0^{vib} im unteren vibronischen Niveau $S_{0,2}^{vib}$, der Anteil (5) für diese Betrachtung vernachlässigt werden. Einen wesentlich höheren Einfluss hat dagegen die direkte 2P-Anregung durch den STED-Laser (6). Die 2C2P-Anregung (Abb. 2.9(7)) kann in dieser Betrachtung ebenfalls vernachlässigt werden, da diese stark von dem Zeitversatz $\Delta\tau$ abhängt, welcher so eingestellt werden kann, dass der Ausdruck (7) verschwindet. Die 2P-Direktanregung ergibt sich nach:

$$\frac{dN_1}{dt} = +N_0 I_{\Phi,2}^2(t) \sigma_{2P}^2 \quad (2.59)$$

Wird angenommen, dass im nicht-gesättigten Fall immer ausreichend Fluoreszenzmoleküle für die Anregung zur Verfügung stehen, ist N_0 konstant. Damit wirkt die 2P-Anregung durch den STED-Laser der stimulierten Abregung während der Pulsdauer τ_P mit dem Betrag μ entgegen:

$$\mu = \frac{\sigma_{2P}^{\lambda^2} \bar{P}^2 \lambda^2}{(\tau_P f_{Rep}^2 (hc)^2) A} \quad (2.60)$$

Gleichung 2.60 berechnet analog zu Gl. 2.3 die Anzahl angeregter Moleküle durch einen Puls. Die Pulsdauer τ_P geht reziprok in die Verminderung ein, so dass sich daraus unmittelbar die Anforderung an die Pulsdauer ergibt. Je länger die Pulsdauer ist, desto geringer ist die Verminderung der STED-Effizienz aufgrund einer 2P-Anregung durch den STED-Laser. Weiterhin kann die STED-Laser induzierte 2P-Anregung durch Wahl einer möglichst geringen, aber für die stimulierte Abregung noch ausreichenden Pulsenergie klein gehalten werden. Es existiert ein Optimum für die Pulsdauer und -energie in Abhängigkeit des Fluoreszenzfarbstoffs. Die Wahl eines Fluorophors, welcher einen möglichst geringen 2P-Absorptionswirkungsquerschnitt $\sigma_{2P}^{\lambda^2}$ aufweist, reduziert eine direkte 2P-Anregung weiter. In der vorliegenden Arbeit wird sich der Umstand einer nichtlinearen Anregung mit Hilfe des STED-Lasers zunutze gemacht, wobei der Fluorophor entsprechend zur virtuellen 2C2P-Anregungswellenlänge λ_{2C2P} gewählt ist, so dass ein möglichst hoher Absorptionswirkungsquerschnitt bei der Anregungswellenlänge vorliegt. Damit kann eine effiziente nichtlineare Anregung erfolgen. Im Gegensatz dazu ist der STED-Farbstoff so gewählt, dass ein möglichst geringer 2P-Absorptionswirkungsquerschnitt für die STED-Wellenlänge vorliegt, um eine Verminderung der STED-Effizienz zu vermeiden und eine möglichst hohe Auflösung zu erzielen. Die verwendeten Farbstoffe sowie deren spektrale Eigenschaften werden in Abschnitt 3.4.1 eingehend beschrieben.

Kapitel 3

Entwicklung des Zweifarbigen-Zweiphotonen STED-Mikroskops

Die 2C2P-STED-Mikroskopie basiert auf dem Einsatz und der Kombination verschiedener gepulster Lasersysteme. Diese neuartige Kombination und die Anwendung in der STED-Mikroskopie stellen einige Anforderungen an den optischen Aufbau und die elektronische Ansteuerung. In diesem Kapitel werden das Prinzip sowie die Entwicklung der 2C2P-STED-Mikroskopie beschrieben und es wird ausführlich auf den optischen Strahlengang, die verwendeten Lasersysteme sowie die elektronischen Komponenten eingegangen. Gerade in der STED-Mikroskopie ist die Verwendung der richtigen Fluoreszenzfarbstoffe und der richtigen Probensystemen eine entscheidende Komponente, um von der vollen Leistungsfähigkeit dieser Mikroskopiemethode zu profitieren. Aus diesem Grund werden die Anforderungen an die Farbstoffe für 2C2P-STED sowie die zur Bildgebung und zur Charakterisierung des Systems verwendeten Proben ausführlich erläutert. Die nichtlinearen Phänomene, welche in den vorangegangenen theoretischen Kapiteln beschrieben sind, werden zudem in dieser Arbeit für die räumliche und zeitliche Überlagerung beider Laser eingesetzt. Das Vorgehen hierzu findet sich ebenfalls in diesem Kapitel.

3.1 Prinzip

Der Prozess der nichtlinearen Zweifarbigen-Zweiphotonen-Anregung findet nur dann statt, wenn beide für die Anregung verwendeten Laser räumlich überlappen und zeitgleich auf die Probe treffen. Dieser Umstand wird in der 2C2P-STED-Mikroskopie ausgenutzt, um eine intrinsische Korrelation eines Bildes mit beugungsbegrenzter Auflösung sowie eines mit einer Auflösung unterhalb der Beugungsbegrenze zu erzeugen. Die beugungsbegrenzte Bildgebung wird mittels 2C2P realisiert, wohingegen die supraaufgelöste Bildgebung über 2P-STED stattfindet. Es werden zwei Lasersysteme mit Emissionswellenlängen im NIR-Bereich verwendet mit der Besonderheit, dass beide Laser in den jeweiligen Bildgebungs-

prozess eingebunden sind. Üblicherweise werden für die nichtlineare Anregung, aufgrund der Abhängigkeit der Anregungseffizienz von der Pulsdauer (s. Gleichung 2.3), Ultrakurzpulslaser verwendet. In dem in dieser Arbeit präsentierten Ansatz wird dagegen für die nichtlineare Anregung eine Laserkombination mit Pulsdauern im fs- sowie ps-Bereich, verwendet. Des Weiteren ist der verwendete STED-Laser in der Lage, elektronisch schaltbar, zwei unterschiedliche Pulsdauern zu emittieren. Das 2C2P-STED Prinzip ist in Abbildung 3.1 schematisch dargestellt. Die 2C2P-Anregung (Abb. 3.1(a)) resultiert aus der simultanen Absorption je eines Photons von Laser 1 mit der Wellenlänge λ_1 und eines Photons des STED-Lasers (Laser 2) mit der Wellenlänge λ_2 . Der STED-Laser befindet sich hierzu in einem Kurzpulsmodus, wobei Pulse mit einer Pulsdauer von ca. 41 ps emittiert werden. Die Anregungspulse von Laser 1 und Laser 2 treffen innerhalb ihrer Pulsdauer zeitgleich auf die Probe. Das Fluoreszenzmolekül gibt nachfolgend der Anregung und dem vibronischen Übergang in das S_1 -Niveau ein Photon mittels spontaner Emission ab. Das Fluoreszenzphoton ist gegenüber der virtuellen Anregungswellenlänge λ_{2C2P} (vgl. Gl. 2.6) rotverschoben und bildet die Grundlage für die Bildgebung mit beugungsbegrenzter Auflösung. Der verwendete Fluoreszenzfarbstoff hat dabei die Eigenschaft, dass das Absorptionsmaximum bei der virtuellen Anregungswellenlänge liegt.

In einem zweiten Schritt werden nun einige Änderungen an dem STED-Laser elektronisch vorgenommen, um das System für die 2P-STED-Bildgebung (Abb. 3.1(b)) vorzubereiten: Zum einen wird die Pulsdauer des STED-Lasers zeitlich in die Breite gezogen, und er emittiert nun Pulse mit einer Pulsdauer von ca. 538 ps. Zum anderen wird der STED-Laserpuls gegenüber der Anregung zeitlich verzögert. Das Umschalten in den Langpulsmodus und das Verzögern sind notwendig, um ein bestmögliches Abregungsverhalten des Fluoreszenzmoleküls zu erzielen. In Abschnitt 4.3 wird die optimale Verzögerung bei gegebenen Laserparametern diskutiert. Für die Verbesserung der zum Beispiel lateralen Auflösung ist als letzter Schritt die Modulation der STED-Laserwellenfront mit einer Vortex-Phase (vgl. Abschnitt 2.3.2) notwendig, welche mit einem räumlichen Lichtmodulator durchgeführt wird. Nach erfolgter Änderung der Laserparameter, kann eine Substruktur mit Superauflösung abgebildet werden. Der für STED verwendete Fluoreszenzfarbstoff hat die Eigenschaft, dass er mittels 2P-Anregung bei λ_1 angeregt, aber auch mit dem STED-Laser bei λ_2 stimuliert abgeregt werden kann.

Ein besonderes Merkmal dieser Methode liegt darin, dass die für die Bildgebung relevanten Komponenten elektronisch gesteuert werden können. Daher müssen keinerlei mechanische Änderungen am optischen Aufbau zur Durchführung des Wechsels vorgenommen werden. So findet das Umschalten zwischen Kurz- und Langpulsmodus elektronisch im Laser statt, die zeitliche Verzögerung wird über ein elektronisches Verzögerungsmodul realisiert und die Phase der STED-Laserwellenfront mittels SLM moduliert. Ausgehend von einer räumlichen Vorjustage der beiden Laser, bleibt diese somit zwischen dem Umschalten erhalten. Die am Computer stattfindende Überlagerung beider Bilder aus 3.1(a) und (b) ergibt das korrelative Bild. Als Ergebnis liefert die Überlagerung Informationen unterhalb der Beugungsgrenze einer Substruktur sowie deren räumliche Anordnung in Relation zu einer Gegenfärbung. Die räumliche Korrelation ist aufgrund des 2C2P-Prozesses sichergestellt, da diese Anregung nur bei räumlichem Überlapp stattfindet. Damit gibt es auch eine direkte

Kontrolle über die Qualität der Überlagerung beider Laser, da die Justage auf maximales Fluoreszenzsignal auch die beste räumliche Überlagerung beider Anregungspulse bedeutet.

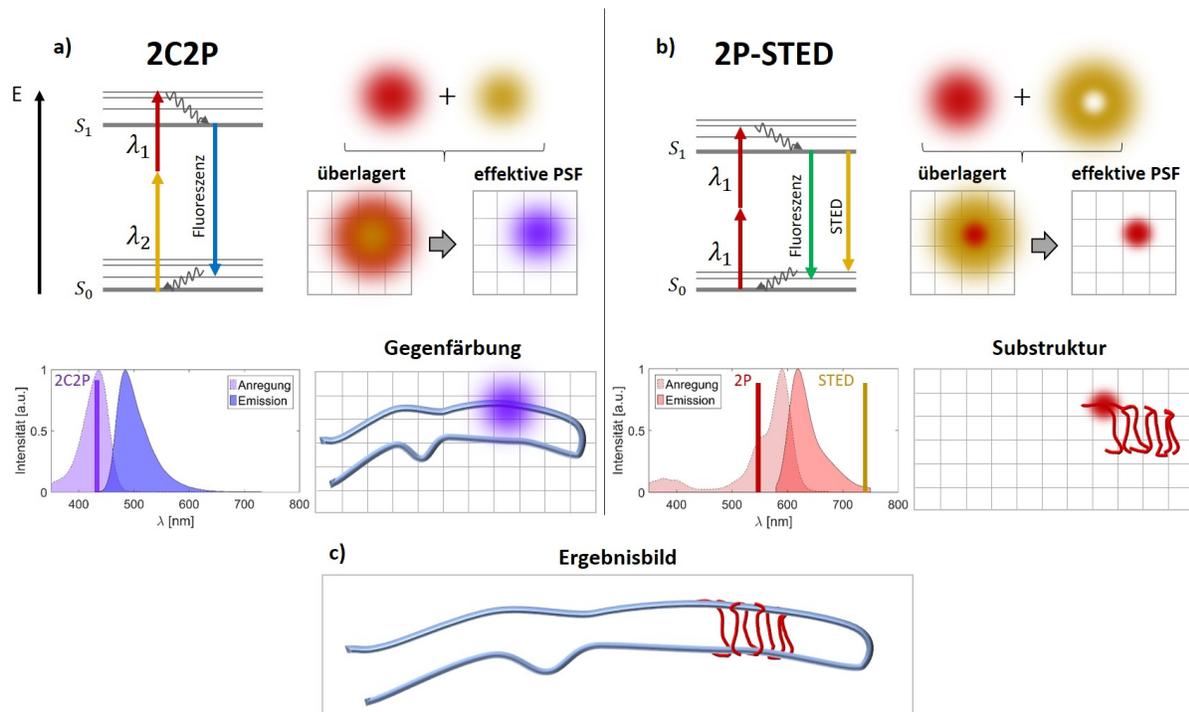


Abbildung 3.1: Das Prinzip der 2C2P-STED-Mikroskopie sieht zwei verschiedene Bildgebungsmodi unter Verwendung zweier Lasersysteme vor. Dabei werden Bilddaten sowohl mit konfokaler Auflösung als auch mit einer Auflösung unterhalb der Beugungsgrenze erzeugt. a) Die 2C2P-Bildgebung findet über die Anregung durch Anregungs- und STED-Laser mit jeweils beugungsbegrenzten PSF's statt. Daraus ergibt sich ein effektives Anregungsvolumen mit beugungsbegrenzter Auflösung. Der Fluoreszenzfarbstoff ist so gewählt, dass die Anregung effizient stattfindet. Eine Komponente wird mit diesem Farbstoff als Gegenfärbung markiert. b) Eine Substruktur wird mittels 2P-STED über 2P-Anregung durch den fs-Laser und stimulierte Abregung mit dem STED-Laser supraaufgelöst dargestellt. Dazu wird der STED-Laser zum Beispiel mit einer Vortex-Phase moduliert. Der Farbstoff ist so gewählt, dass eine 2P-Anregung mit λ_1 und eine Abregung mit λ_2 möglich ist. c) Die Überlagerung beider Bilder aus (a) und (b) zeigt die Organisation der Substruktur in Relation zur Gegenfärbung mit Auflösung unterhalb der Beugungsgrenze.

3.2 Optischer Aufbau

3.2.1 Lasersysteme

Der optische Aufbau des 2C2P-STED-Mikroskops besteht im Wesentlichen aus zwei verschiedenen Lasersystemen, einem optischen Strahlengang, einem Mikroskopaufbau sowie verschiedenen elektronisch steuerbaren Elementen. Ein besonderes Augenmerk liegt dabei auf den Lasersystemen, da diese einige Anforderungen für 2C2P-STED erfüllen müssen. Die Lasereigenschaften müssen so gewählt sein, dass sowohl eine 2P- als auch eine 2C2P-Anregung, sowie die STED-Bildgebung möglich sind. Die Lasersysteme müssen aufeinander synchronisiert werden können, und der zeitliche Abstand zwischen den Pulsen muss elektronisch einstellbar sein. Insbesondere für die nichtlineare Anregung zeigt sich, dass die Wahrscheinlichkeit der simultanen Absorption mehrerer Photonen durch das Fluoreszenzmolekül reziprok mit der Pulsdauer einhergeht. Daraus leitet sich die Anforderung ab, für die nichtlineare Anregung möglichst kurze Laserpulse zu verwenden. In dieser Arbeit wird wahlweise die Probe über den Laserstrahl oder der Laserstrahl mittels eines Spiegelscanners über die Probe gerastert. Da ein sehr schneller Spiegelscanner verwendet wird, muss auch die Repetitionsrate entsprechend hoch sein, um genügend Pulse auf ein Pixel einzustrahlen und ausreichend Signal zu erhalten. Bei STED ist die Verwendung eines schnellen Spiegelscanners von Vorteil, da ein geringeres Photobleichen bei geringeren Pixel-Verweilzeiten zu erwarten ist. Die verwendeten Wellenlängen liegen im NIR-Bereich, da sich dieser Spektralbereich aufgrund der geringen Streuung und Absorption biologischer und wasserhaltiger Materialien auszeichnet [75, 76], Laser mit dieser Wellenlänge aber auch kommerziell gut erhältlich sind. Ebenso eignen sich bei Verwendung dieser Wellenlängen kommerziell erhältliche Fluoreszenzfarbstoffe prinzipiell gut für die nichtlineare Anregung und für STED. Eine Untersuchung der nichtlinearen Anregung an einem gewählten Farbstoff findet sich in Abschnitt 4.4.

In dieser Arbeit wird eine Kombination aus Ultrakurzpuls- und Pikosekundenlaser verwendet. Der Ultrakurzpulslaser ist ein fs-Faserlaser der Firma Toptica Photonics AG mit Modellbezeichnung Dichro bioMP. Dieser Laser wird sowohl für die 2C2P-Anregung als auch für die 2P-Anregung bei 2P-STED verwendet. Die Emissionswellenlänge liegt bei $\lambda_1 = 1034$ nm mit einer spektralen Bandbreite von $\Delta\lambda_1 = \pm 14$ nm. Die Pulsdauer unmittelbar nach dem Laser beträgt 95 fs bei einer Repetitionsrate von $f_{Rep,1} = 79,78$ MHz. Die mittlere Leistung beträgt $\overline{P}_1 = 250$ mW. Der Laser besitzt eine interne Photodiode, wobei ein Teil des Laserstrahls zu dieser Photodiode ausgekoppelt wird. Das Spannungssignal dient über einen BNC-Anschluss als Synchronisationssignal für das zweite Lasersystem. Erzeugt werden die 1034 nm Pulse ausgehend von einem Erbium (Er)-dotierten Faserlaser, welcher in der ersten Stufe Strahlung bei 1550 nm emittiert. In einer nachfolgend angebrachten hoch-nichtlinearen Faser (HNLf) wird mittels nichtlinearer Prozesse, wie Raman-induziertem Frequenzschub ein sog. Supercontinuum erzeugt, welches von ca. 1000 – 2000 nm reicht. Das Kontinuum wird in einer weiteren Stufe in einer gepumpten Ytterbium (Yb)-dotierten Faser verstärkt, wodurch sich eine Laserwellenlänge von

1034 nm ausbildet. Neben einem Ultrakurzpulslaser wird als zweites Lasersystem sowohl für die 2C2P- als auch die STED-Bildgebung, ein Laser der Firma OneFive bzw. NKT Photonics verwendet, welcher in der Pulsdauer schaltbar ist. Bei diesem System handelt es sich um einen modifizierten Laser des Modells Katana HP. Die Laserwellenlänge liegt bei $\lambda_2 = 775$ nm mit einer spektralen Bandbreite von $\Delta\lambda_2 = \pm 0,122$ nm. Aufgrund der Architektur des Lasers ist dieser in einem Bereich von 18 bis 82 MHz schaltbar und kann somit über das Synchronisationssignal des Faserlasers getriggert werden. Die Pulsdauer beträgt im Kurzpulsmodus laut Spezifikation $\tau_{2,SP} = 41$ ps mit einer mittleren Ausgangsleistung von $\overline{P}_{2,SP} = 211$ mW, im Langpulsmodus beträgt die Pulsdauer $\tau_{2,LP} = 538$ ps mit einer mittleren maximalen Leistung $\overline{P}_{2,LP} = 3,65$ Watt. Das Prinzip des Pikosekunden-Lasers basiert auf einem faserverstärkten Diodenlaser, wobei durch Ein- und Ausschalten der Diode die Emission des Lasers gesteuert wird. Ein von der Diode erzeugter Puls wird in einer Er-dotierten und zusätzlich gepumpten Faser nachverstärkt. Der Ausgangslaserpuls wird über eine Faser zu dem Laserkopf geführt und anschließend über eine Frequenzverdopplung am Kristall, ausgehend von 1550 nm, auf $\lambda_2 = 775$ nm konvertiert. Da aus dem Laserkopf neben der Frequenzverdopplung aufgrund der hohen Laserleistung auch eine Frequenzverdreifung stattfindet und ggf. auch die Fundamentalwellenlänge emittiert wird, ist die Verwendung eines schmalbandigen Bandpasses notwendig, um nur 775 nm zu erhalten. Die Verwendung optischer Filter wird im nachfolgenden Unterkapitel ausführlich beschrieben.

In Tabelle 3.1 sind die Laserparameter beider Lasersysteme tabellarisch gegenübergestellt. Beide Laser emittieren linear polarisiertes Licht. Aufgrund der vorliegenden Technologie ist

Tabelle 3.1: Spezifikationen der verwendeten Lasersysteme (KP: Kurzpuls-Modus, LP: Langpuls-Modus).

	fs-Laser	STED-Laser	
Hersteller	Toptica Photonics	OneFive (NKT)	
Zentralwellenlänge λ	1034 nm	774, 544 nm	
Spektrale Bandbreite $\Delta\lambda$	± 14 nm	$\pm 0,122$ nm	
Pulsdauer Δt	< 100 fs	KP: 41 ps	LP: 538 ps
Mittlere Leistung \overline{P}	250 mW	KP: 211 mW	LP: 3,65 W
Repetitionsrate f_{Rep}	79,78 MHz	18 – 82 MHz - beliebig triggerbar	

es möglich, die Laser voll elektronisch zu steuern und zu synchronisieren. Der STED-Laser wird über eine RS232-Schnittstelle angesteuert. Hierbei kann über ein eigens geschriebenes LabView-Programm (s. Abschnitt 3.3.2), die Emission des Lasers kontrolliert werden. Zusätzlich kann die Pulsdauer sowie die Leistung der emittierten Laserstrahlung elektronisch gesteuert werden. Das von dem Faserlaser ausgehende Triggersignal wird über ein BNC-

Kabel zum Laser geführt und dient als Synchronisationssignal. Wird der Laser auf dieses externe Triggersignal konfiguriert, ist die Repetitionsrate bei Emission identisch zu der des Faserlasers.

3.2.2 Mikroskop und Strahlengang

Der optische Aufbau der 2C2P-STED-Mikroskopie, wie er in dieser Arbeit verwendet wird, ist in Abbildung 3.2 schematisch dargestellt. Die beiden Lasersysteme, **fs-Laser** und **STED-Laser** bilden den Ausgangspunkt des optischen Aufbaus. Der Laserstrahl des fs-Lasers erfährt nur wenig Anpassungen, da dieser in der Pulsdauer und räumlichen Phase unverändert bleibt. Eine Anpassung des Strahldurchmessers wird mittels eines variablen und für den NIR-Bereich optimierten Teleskops (**T1**) (Edmund Optics) aufgeweitet und über Spiegel (**M**) zum dichroitischen Strahlteiler (**D1**) geführt. Eine in den Strahlengang eingebrachte $\lambda/2$ -Wellenplatte (**HWP**) (460-4208, Eksma Optics) dient zur Anpassung der Polarisierung. In Kombination mit einer achromatischen $\lambda/4$ -Wellenplatte (**QWP**) (AQWP10M-980, Thorlabs) kann auf diese Weise eine beliebige Polarisierung eingestellt werden. Der Strahlteiler (**D1**) ist so ausgelegt, dass 1034 nm reflektiert werden, wohingegen die Wellenlänge des zweiten Lasers mit 775 nm transmittiert wird. Eine detaillierte Übersicht der verwendeten dichroitischen Strahlteiler und Filter findet sich in Tabelle 3.3. Der Aufbau erlaubt zwei unterschiedliche Anregungsstrahlengänge (**E1**) und (**E2**) in Richtung Mikroskop. Der Anregungsstrahlengang (**E1**) wird für die Bildgebung mittels Resonant-Galvo-Spiegelscanner (**RGS**) verwendet. Der Resonanz-Galvo-Scanner (Thorlabs) besteht aus zwei Spiegeln, wobei einer der beiden Spiegel in Resonanz betrieben wird. Die Frequenz auf dieser schnellen Achse beträgt ca. 8 kHz. Damit ist eine sehr schnelle Abtastung entlang einer Achse möglich. Die zweite, langsamere Achse, kann diese Linie dann entlang der zweiten senkrecht angeordneten Raumkoordinate verstellen. Mit dieser Methode wird der Laserstrahl sehr schnell über das Bild gerastet. Die maximale Bildrate beträgt je nach Bildfeldgröße und Pixelgröße bis zu 30 Bilder pro Sekunde. Eine Übersicht über die Eigenschaften des RGS findet sich in Tabelle 3.2. Um den optischen Pfad über den Spiegelscanner zu verwenden, wird der Klappspiegel (**MF**) aus dem Strahlengang herausgenommen. Zudem werden der Strahlteiler und Filter (**D2**) bzw. (**FR2**) aus dem Strahlengang entfernt und der Spiegel (**MR**) so orientiert, dass er von rechts einfallendes Laserlicht nach oben reflektiert. Folglich laufen die Laserstrahlen über den RGS und werden durch das achromatische Linsensystem bestehend aus der Scanlinse (**LS**) und Tubulinse (**LT**) aufgeweitet. Die Anordnung von (**LS**) ist in Bezug auf den Scanner (**RGS**) telezentrisch. Die Abstände beider Linsen sind so gewählt, dass der Mittelpunkt zwischen den beiden Scannerspiegeln auf die rückwärtige Apertur des Objektivs (**OL**) (CFI Apochromat, Nikon) abgebildet wird. Das bedeutet, dass ein Punkt zwischen den Spiegeln des RGS auf die Eintrittspupille des Objektivs abgebildet wird. Dadurch wird erreicht, dass immer der volle Strahldurchmesser unabhängig von der Spiegelauslenkung in das Objektiv eingekoppelt wird und somit über das gesamte Bildfeld eine homogene Ausleuchtung besteht. Das Teleskop vergrößert die einfallenden Laserstrahlen um das 5-Fache. Dies ist notwendig, damit eine vollständige Ausleuchtung der rückwärtigen Apertur gegeben ist. Bevor

die Laserstrahlen auf das Objektiv treffen, durchlaufen sie den dichroitischen Strahlteiler (**D3**), wobei beide Laserstrahlen transmittiert werden. Den Laserwellenlängen gegenüber kurzwelliges Licht wird am dichroitischen Strahlteiler reflektiert. Das Objektiv ist ein 100-fach Ölimmersions-Objektiv mit der NA 1,49. Das Objektiv ist in einem Bereich von 435 bis 1064 nm chromatisch korrigiert und bietet einen Korrekturring, um etwaige Fokusanpassungen in Abhängigkeit der Probe bzw. des verwendeten Deckglases durchführen zu können. Das durch die Anregung erzeugte Fluoreszenzlicht wird von dem Objektiv gesam-

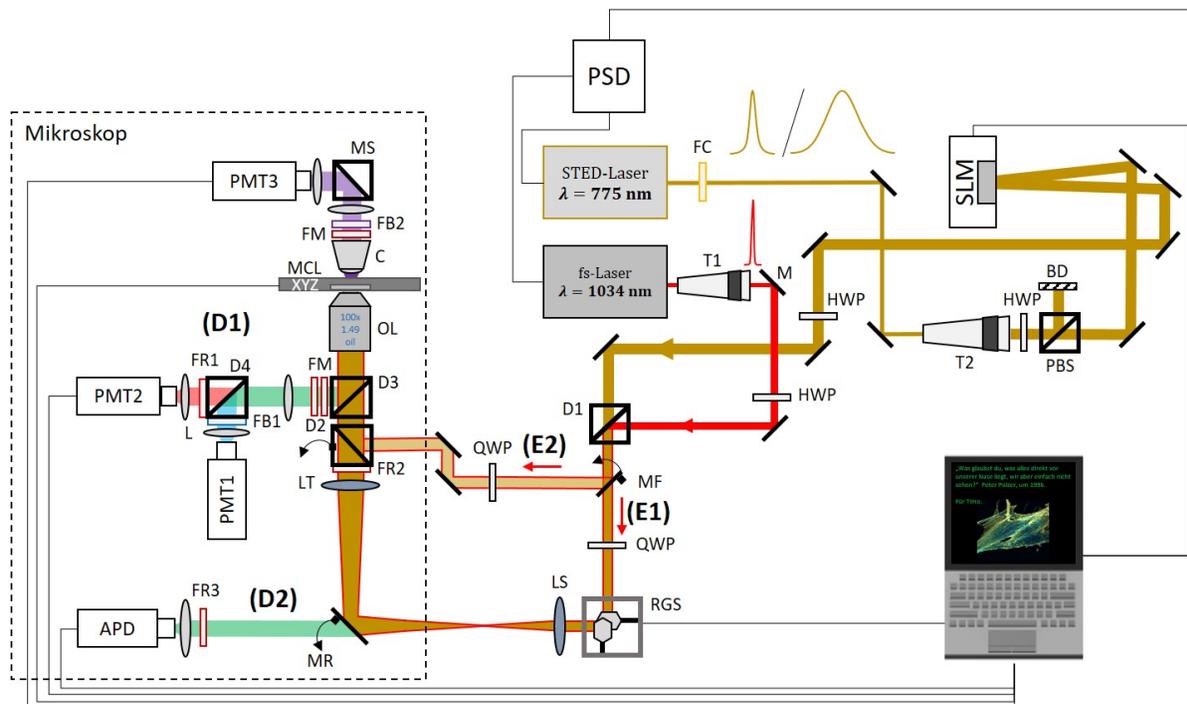


Abbildung 3.2: Schematische Darstellung des optischen Setups bestehend aus zwei verschiedenen Strahlengängen E1 und E2 mit den Lasern „STED-Laser“ und „fs-Laser“. E1: Einkopplung über den Resonanz-Galvo-Scanner (RGS). E2: Einkopplung für das Proben-Scanning mit dem XYZ Piezo-Scanner (MCL). T1/2: Variable Teleskope; M: Spiegel; MF: Klappspiegel; MR: Rotationsspiegel; MS: Spiegel mit Schieber; HWP: $\lambda/2$ -Wellenplatte; QWP: $\lambda/4$ -Wellenplatte; PBS: Polarisations-Strahlteiler; SLM: Räumlicher Lichtmodulator; PSD: ps-Verzögerungsmodul; FC: Clean-Up-Filter für $\lambda = 775$ nm; FM: Multiphotonen-Filter; FR1/2/3: Fluoreszenzfilter Rot; FB1: Fluoreszenzfilter Blau; FB2: SHG/SFG-Filter; D1: Dichroitischer Spiegel für Laser-Überlagerung; D2: Dichroitischer Rotationsspiegel für Probenscanning; D3: Dichroitischer Spiegel für Multiphotonen-Anregung; D4: Dichroitischer Spiegel für Fluoreszenz; PMT1/2/3: Photomultiplier Tubes; APD: Avalanche Photodiode; LS: Scanlinse; LT: Tubuslinse; L: Linse; OL: Objektiv; C: Kondensor. D1 und D2: unabhängige Detektionsstrahlengänge.

melt und nun an (**D3**) reflektiert. Zwei Multiphotonenfilter (**FM**) blocken das Laserlicht, über einen weiteren dichroitischen Strahlteiler (**D4**) wird das Fluoreszenzlicht in einen

blauen und einen roten Spektralbereich aufgeteilt. Der Bandpass (**FB1**) säubert das Fluoreszenzlicht weiter und lässt nur die gewünschten blauen Spektralanteile zum Detektor (**PMT1**) passieren, wohingegen der Bandpass (**FR1**) aus dem Fluoreszenzlicht nur einen definierten roten Spektralanteil zum Detektor (**PMT2**) durchlässt. Bei den Detektoren (**PMT1**) und (**PMT2**) handelt es sich um hochsensitive Photonenverstärker (*Photomultiplier Tubes*, engl.) der Firma Hamamatsu Photonics. Das Auftreffen eines Photons auf einer aus InGaAsP bestehenden Multialkali-Kathode löst ein Elektron aus. Dieses Elektron wird über Dynoden weiter verstärkt, so dass am Ende der Verstärkerkaskade eine Gesamtverstärkung um das bis zu 10^7 -fache möglich ist. Die PMTs sind in einem Spektralbereich von 185 bis 900 nm empfindlich, die höchste Sensitivität liegt bei 450 nm. Der Pegel des analogen Ausgangssignals korreliert mit der Anzahl der auftreffenden Photonen und gibt damit die Fluoreszenzintensität wieder. Dieses Signal kann für jedes Pixel in einen Grauwert zur Bilddarstellung umgewandelt werden. Die Detektoren sind möglichst in einer sog. „non-descanned“-Konfiguration nahe am Objektiv angeordnet. Dies bedeutet, dass das Emissionslicht nicht erneut über den Spiegelscanner geführt wird. Je nach Scannerposition wird der Strahl unterschiedlich stark abgelenkt und trifft im Grenzfall nicht die aktive Fläche des Detektors. Um das zu vermeiden, befinden sich Linsen unmittelbar vor den Detektoren und fokussieren das Licht auf die aktive Fläche. Die Anordnung ermöglicht eine relativ kurze Distanz zwischen Objektiv und Detektor, so dass dies in Kombination mit der großen Detektorfläche ((3,7 x 13) mm) abgebildet, was zu einer hohen Photonenausbeute und einem guten Signal-zu-Rauschverhältnis führt. Bei der Erweiterung des Mikroskopstativs (Ti2E, Nikon) mit den Detektoren, handelt es sich um einen Eigenbau. Mittels 3D-Druckverfahren konnte eine entsprechende Halterung für Filter, dichroitische Spiegel, Linsen und Detektoren gefertigt werden. Dieser Detektionsstrahlengang wird als (**D1**) bezeichnet. Eine weitere Option der Detektion befindet sich in Vorwärtsrichtung. Das in der Probe erzeugte Licht wird durch einen Kondensator (**C**) gesammelt, durch den Multiphotonenfilter (**FM**) vom Anregungslicht getrennt und mit dem Bandpass (**FB2**) spektral selektiert. Eine Linse fokussiert das Licht auf einen weiteren Detektor (**PMT3**). Dieser Detektor ist auch in einer „non-descanned“-Konfiguration angeordnet, wobei die Adaption ebenfalls durch einen Eigenbau mit Hilfe des 3D-Drucks durchgeführt ist. Dieser Detektionspfad wird zur Charakterisierung des STED-Lasers im Kurzpulsmodus verwendet (s. Abschnitt 4.4). Das Nikon-Stativ erlaubt auch die Bildgebung mit konventionellen mikroskopischen Methoden, wie der Phasenkontrast- oder Dunkelfeldmikroskopie.

Der STED-Laser wird spektral mit dem Bandpass-Filter (**FC**) auf die Wellenlänge 775 nm gereinigt und über Spiegel zum variablen und für den NIR-Bereich optimierten Teleskop (**T2**) (Edmund Optics) geführt. Der Strahl wird von ca. 1 mm auf ca. 3 mm aufgeweitet und durchläuft anschließend eine $\lambda/2$ -Wellenplatte (**HWP**) (460-4220, Eksma Optics) und einen Polarisationsstrahlteiler (**PBS**) (PBS102, Thorlabs). Weitere Spiegel lenken den Laserstrahl auf den räumlichen Lichtmodulator (**SLM**) (Modell X131138-02, Hamamatsu Photonics). Der SLM dient zur Modulation der räumlichen Phase des STED-Lasers. Die Funktion wird in Abschnitt 3.2.3 erläutert. Für die beste Performance des SLMs ist eine horizontale Polarisation des Lasers notwendig. Dazu dient der vorangestellte Pola-

risationsstrahlteiler mit einer Transmissionsrichtung für horizontal polarisiertes Licht. In Kombination mit der HWP besteht durch Drehung der Polarisation die Möglichkeit, die Leistung manuell präzise einzustellen, falls dies notwendig sein sollte. Nach dem SLM befindet sich eine weitere HWP in Strahlengang des STED-Lasers, um wie auch bei dem fs-Laser in Kombination einer $\lambda/4$ -Wellenplatte (**QWP**), die Polarisation beliebig einstellen zu können. Da für STED eine zirkulare Polarisation je nach Phasenmodulation zwingend notwendig ist, kann über diese Anordnung eine saubere Polarisation realisiert werden, auch wenn ggf. nachfolgende optische Elemente eine Depolarisation hervorrufen. Eine Depolarisierung kann damit präkompensiert werden. Der STED-Laserstrahl wird über den dichroitischen Strahlteiler (**D1**) mit dem fs-Laserstrahl überlagert und läuft im Falle des Weges über (**E1**), den gleichen optischen Weg wie oben beschrieben.

Alternativ zum Strahlengang (**E1**), welcher über den RGS führt, besteht die Möglichkeit, beide Laserstrahlen über den Strahlengang (**E2**) zu führen. Dieser Strahlengang wird für das Proben-Scanning verwendet und setzt daher einen nicht abgelenkten Laserstrahl voraus. Proben-Scanning kommt in dieser Arbeit u. a. zur Vermessung von PSFs zum Einsatz. Für das Proben-Scanning wird ein XYZ-Nanopositioniersystem (Nano-LPS) der Firma Mad City Labs Inc. verwendet. Dieser Piezotisch bietet einen maximalen Verfahreweg von $(300 \times 300 \times 300) \mu\text{m}^3$ mit einer minimalen Schrittweite von 0,6 nm. Aufgrund der hohen Präzision hinsichtlich der Schrittweite eignet sich das Positioniersystem ideal für die Vermessung von Punktspreizfunktionen oder zum Abtasten kleiner Bereiche mit hoher Auflösung. Ebenso sind mit diesem System höhere, definierte Integrationszeiten während der Bildgebung möglich, da der Nano-LPS mit beliebig einstellbarer Verweilzeit je Pixel positioniert werden kann. Die Scangeschwindigkeit des Resonanz-Galvo-Scanners kann aufgrund des Scannerprinzips auf der schnellen Achse nicht geändert werden. Ein Nachteil bei der Verwendung des XYZ-Scanners ist allerdings die wesentlich langsamere Bildaufnahme. Die Eigenschaften beider Scanner sind in Tabelle 3.2 zusammengefasst.

Tabelle 3.2: Für die Bildabtastung verwendete Scanner-Systeme.

	Laser-Scanner	Proben-Scanner
Typ	Resonanz-Galvo-Scanner	Piezo-Scanner
Hersteller	Thorlabs	MCL
Achsen	XY	XYZ
Rate	X: 8 kHz, Y: 500 Hz	XYZ: 1 kHz
Auflösung	XY: 2 nm, Z: 100 nm (Nikon)	XYZ: 0,6 nm

Aufgrund des hier vorgestellten optischen Aufbaus ist es allerdings möglich, zwischen den verschiedenen Modalitäten mit nur geringen Änderungen zu wechseln, um so die Vorteile

für die jeweilige Anwendung zu nutzen. Da über (**E2**) kein weiteres Teleskop im Strahlengang ist, wird der Strahldurchmesser mit Hilfe der variablen Teleskope entsprechend angepasst. Der Klappspiegel (**MF**) wird für (**E2**) in den Strahlengang geschwenkt und lenkt die Laserstrahlen über die hintere Öffnung des Mikroskopstativs. Der dichroitische Strahlteiler (**D2**) wird elektronisch in den Strahlengang geschwenkt und reflektiert die auftreffende Laserstrahlung in Richtung des Objektivs.

Tabelle 3.3: Übersicht der verwendeten Filter im optischen Setup. Alle aufgeführten Filter und Strahlteiler (ST) werden von AHF Analysetechnik bezogen.

Filter	Bezeichnung	Typ	Transmission (T) / Reflexion (R)
FC	F37-775	Bandpass	T: 700 nm – 799 nm
D1	F38-825	Dichroit. ST	T: 565 – 800 nm / R: 850 – 1650 nm
D2	F38-749	Dichroit. ST	T: 400 – 730 nm / R: 770 – 1100 nm
D3	F76-735	Dichroit. ST	T: 750 – 1600 nm / R: 350 – 720 nm
D4	F38-562	Dichroit. ST	T: 569 – 950 nm / R: 350 – 555 nm
FM	F39-745	Kurzpass	T: 392 – 725 nm
FR1	F76-594	Bandpass	T: 610 – 900 nm
FR2	F37-697	Bandpass	T: 668 – 726 nm
FR3	F39-653	Bandpass	T: 575 – 725 nm
FB1	F37-584	Bandpass	T: 468 – 552 nm
FB2	F34-450A	Bandpass	T: 425 – 470 nm

Die Verwendung des Nanopositioniersystems ist mit dem Detektionsstrahlengang (**D2**) verbunden, wobei eine Avalanche-Photodiode (**APD**) (CountT, Laser Components) zum Einsatz kommt. Das Auftreffen eines Photons auf den aktiven Bereich mit Durchmesser $d = 100 \mu\text{m}$ löst ein Elektron-Loch-Paar in dem Halbleitermaterial aus. Das Elektron wird über eine angelegte Spannung in Richtung der Elektrode beschleunigt und löst über den Weg weitere Elektronen heraus. Jedes ausgelöste Elektron löst wiederum Elektronen aus, so dass eine lawinenartige Elektronenvervielfachung stattfindet. Der spektral sensitive Bereich dieser APD liegt zwischen 440 nm bis 1000 nm. Als Ausgangssignal sendet die APD TTL-Pulse aus. Die Anzahl der Pulse steht dabei mit der Anzahl der auftreffenden Photonen in Beziehung. Mit dieser Methode sind auch zeitaufgelöste Messungen möglich, da jeder Puls einem Absorptionsereignis zugeordnet werden kann. Damit das Fluoreszenzlicht zur APD gelangt, wird vor der Messung der dichroitische Strahlteiler (**D3**) entfernt. Dieser Strahlteiler befindet sich in einem Schiebersystem, so dass er einfach aus dem Strahlengang geschoben wird. Diese Konstruktion ist ebenfalls mittels additiver Fertigung herge-

stellt worden. Das Fluoreszenzlicht durchläuft dann den Strahlteiler (**D2**) und den Filter (**FR2**). Die Tubuslinse (**LT**) fokussiert das Licht in Richtung APD. Der Spiegel (**MR**) ist so in den Strahlengang eingebracht, dass das Licht nach links abgelenkt wird. Ein weiterer Filter (**FR3**) unterdrückt nicht erwünschte spektrale Anteile. Eine Linse fokussiert das Fluoreszenzlicht auf die aktive Fläche der APD.

Sämtliche Komponenten innerhalb eines Strahlengangs werden elektronisch gesteuert, so dass die Bildaufnahme automatisch ablaufen kann. Die elektrischen Signale der Detektoren (PMT1, PMT2, PMT3, APD) sind mit einem Controller bzw. mit einer National Instruments Karte (6323, National Instruments) verbunden und werden am Computer in Echtzeit ausgewertet. Der Spiegelscanner sowie das Nanopositioniersystem werden ebenfalls über einen Controller gesteuert, wobei der XYZ-Piezotisch mit einem eigenen LabView-Programm angesteuert und kontrolliert wird.

Die beiden Anregungs- bzw. Detektionsstrahlengänge (**E1, D1**) und (**E2, D2**) werden für unterschiedliche Experimente innerhalb dieser Arbeit verwendet. Während **E1D1** für die Bildgebung an biologischen Proben eingesetzt wird, werden über **E2D2** Punktspreizfunktionen und experimentelle Phasenmodulationen des STED-Lasers gemessen. Die Anforderungen an die spektralen Eigenschaften sind daher unterschiedlich. In Abbildung 3.3(a) sind die Transmissionsspektren der auf dieser Strahlengängen eingebrachten dichroitischen Strahlteiler und Filter gezeigt.

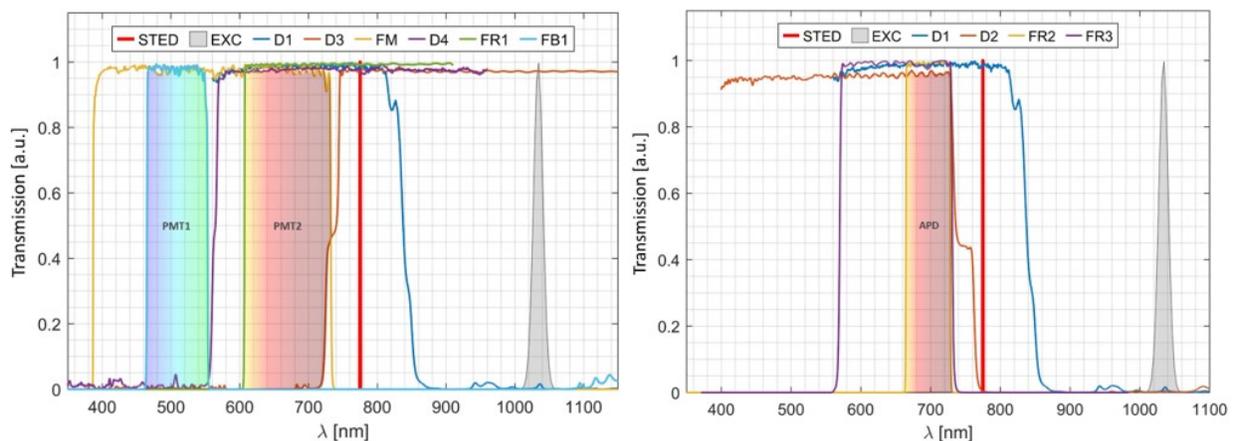


Abbildung 3.3: a) Transmissionsspektrum der verwendeten dichroitischen Strahlteiler und Filter für den Laser-Scanning Strahlengang über E1/D1. Die spektralen Detektionsbereiche der Kanäle für PMT1 (blau) und PMT2 (rot) sind farblich markiert. Der fs-Laser (grau) und der STED-Laser (rot) sind ebenfalls eingezeichnet. b) Transmissionsspektrum der verwendeten dichroitischen Strahlteiler und Filter für den Proben-Scanning Strahlengang über E2/D2. Der spektrale Detektionsbereich des APD-Kanals ist farblich markiert.

Ebenso sind die Laserwellenlängen des breitbandigen fs-Lasers λ_1 (grau) und des schmalbandigen STED-Lasers mit λ_2 (rot) eingezeichnet. Die spektralen Detektionsbereiche sind

für den Blaukanal (PMT1) sowie für den Rotkanal (PMT2) farblich markiert. Der Blaukanal ist für einen spektralen Bereich von 465 nm bis 555 nm empfindlich, der Rotkanal in einem Bereich von 606 nm bis 725 nm. Mehrere Filter blockieren die Laserwellenlängen, so dass kein unerwünschtes Streulicht zu den Detektoren gelangt. Der große spektrale Abstand zwischen blauem und rotem Kanal vermindert spektralen „Crosstalk“, also das Detektieren von blau-fluoreszierendem Licht im roten Kanal. Damit kann ein sehr gutes Signal-zu-Rausch-Verhältnis im roten Kanal erzielt werden. Bei dem alternativen Strahlengang über **E2D2** gibt es nur einen spektralen Kanal für die Detektion. Dieser ist in Abbildung 3.3(b) schematisch gezeigt. Die Kombination der Filter führt zu einem spektralen Fenster von 660 nm bis 725 nm. Damit ist dieser Kanal für rot-fluoreszierende Farbstoffe vorgesehen.

Für die Pulszeitverzögerung des STED-Lasers wird ein elektronischer Pulsverzögerer (**PSD**) (PSD, MPD) verwendet. Das Prinzip des PSD ist in Abbildung 3.4 schematisch dargestellt. Der PSD ist in der Lage, eintreffende Signal beliebiger Form der Synchronisationsquelle

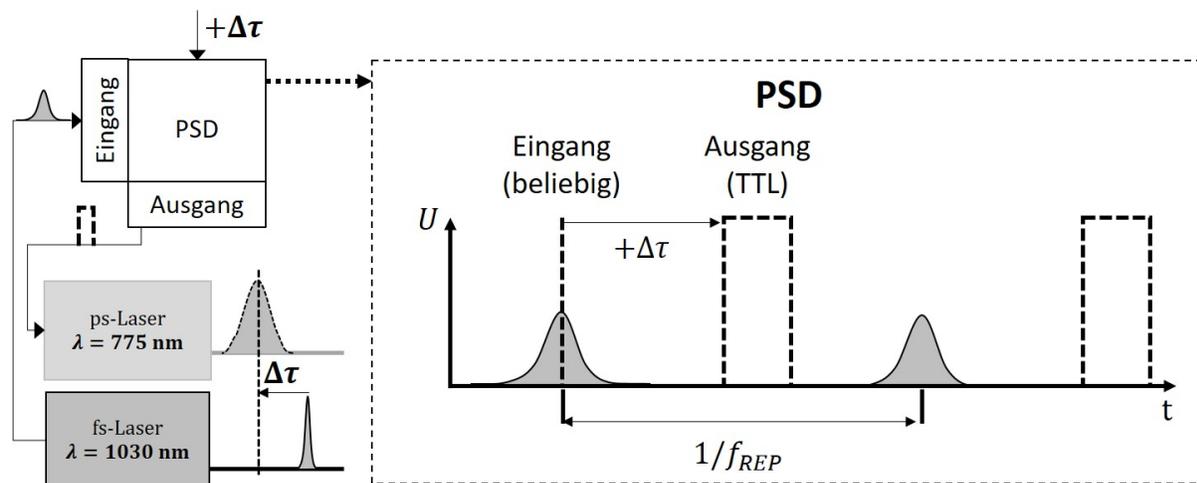


Abbildung 3.4: Schematische Darstellung der Funktion des PSD. Ein beliebiges Eingangssignal dient als Synchronisationssignal. In diesem Aufbau wird ein Photodiodensignal des fs-Lasers verwendet. Der PSD verzögert das Eingangssignal um einen in 10 ps-Schritten frei einstellbaren Wert im Bereich 0 ns bis 50 ns und erzeugt einen um $\Delta\tau$ verschobenen TTL-Puls als Ausgangssignal. Dieses Signal dient als Triggersignal für den STED-Laser. Die Emission eines STED-Pulses ist somit gegenüber dem Anregungspuls um $\Delta\tau$ verschoben.

in einem Bereich von 0 bis 50 ns mit einer Zeitaufösung von 10 ps zu verzögern. Nachfolgend wird mit der eingestellten Verzögerung ein TTL-Puls ausgegeben. In der Praxis ist die Verzögerung von maximal 12,5 ns notwendig, da der Pulsabstand zweier Laserpulse aufgrund der Repetitionsrate von ca. 80 MHz entsprechend 12,5 ns beträgt. Wird das Photodiodensignal (vgl. Abschnitt 3.2.1) des fs-Lasers als Eingangssignal verwendet, kann die zeitverzögerte Emission des STED-Lasers gezielt gesteuert werden. Ein im Rahmen dieser Arbeit programmiertes LabView-Programm erlaubt die automatisierte Zeitverzögerung

$\Delta\tau$ je nach Bildgebungsmodus. Der Zeitversatz, der SLM und das Mikroskopstativ, werden ebenfalls elektronisch gesteuert, so dass die gesamte Bildgebung automatisiert stattfinden kann.

3.2.3 Räumlicher Lichtmodulator

Der räumliche Lichtmodulator stellt eine wesentliche Komponente innerhalb des 2C2P-STED-Mikroskops dar. Da sämtliche Änderungen der Laserparameter rein elektronisch erfolgen, bleibt die Überlagerung der Laserstrahlen konstant, sofern entsprechende Phasenmasken auf den SLM dargestellt werden. Insbesondere müssen bei der Verwendung des SLM zum Wechsel der Modulation einer Wellenfront, keine optomechanischen Komponenten in den Strahlengang ein- oder ausgebracht werden. Der SLM ist prinzipiell wie ein Display aufgebaut. Einzelne Segmenten (Pixel) aus Flüssigkristallen werden separat elektronisch angesteuert. Die Flüssigkristalle richten sich bei Anlegen einer Spannung entlang des elektrischen Feldes aus. Um dies pixelweise durchführen zu können, ist jedes Segment mit zwei Elektroden, je eine auf der Vorderseite und eine auf der Rückseite des Displays, ausgestattet. Die vordere Elektrode besteht dabei aus dem optisch transparenten und elektrisch leitfähigen Material Indiumzinnoxid (ITO). Die Rückseite dagegen, kann mit einer metallischen, hoch reflektierenden Elektrode versehen werden. Der hier verwendete SLM, Modell X131138-02 der Firma Hamamatsu Photonics, hat eine Pixelauflösung von 1272×1024 Pixel² mit einer Pixelabmessung von $12,5 \mu\text{m}$. In Abbildung 3.5 ist die Funktionsweise der Lichtmodulation durch den SLM schematisch dargestellt. Die Laserstrahlung trifft auf das Display und tritt durch die optisch transparenten Segmente aus Flüssigkristallen hindurch. Auf der Rückseite des SLM befindet sich eine hoch reflektierende dichroitische Spiegelschicht, welche auf einen Wellenlängenbereich von (800 ± 50) nm optimiert ist. Die Ausrichtung der Flüssigkristalle ist entlang der xz -Ebene. Ein Kraftgradient sorgt dafür, dass im inaktiven Zustand die Flüssigkristalle entlang der x -Richtung ausgerichtet sind. Wird durch Anlegen einer Spannung ein elektrisches Feld entlang der z -Richtung erzeugt, richten sich die Flüssigkristalle, je nach Höhe der Spannung, mehr oder weniger stark entlang der z -Richtung aus. Ein auf den SLM eingestrahlt elektromagnetisches und horizontal polarisiertes Feld, tritt nun durch die Segmente und wird im Nullzustand mit einem Brechungsindex n verzögert. Der optische Weg beträgt gegenüber der Wegstrecke in Luft (d_{geom}) um $d_{opt} = n d_{geom}$. Liegt auf jedem Pixel die gleiche Spannung an, findet über die Wellenfront hinweg keine effektive Verzögerung statt, so dass die Phasenmodulation relativ gesehen 0 rad beträgt (Abb. 3.5). Um zu verstehen, wie die Phasenmodulation zu Stande kommt, ist es wichtig zu wissen, dass die Flüssigkristalle eine doppelbrechende Eigenschaft mit den ordentlichen und außerordentlichen Brechungsindizes n_o und n_{ao} aufweisen. Das bedeutet, dass je nach Orientierung der Polarisation in Relation zur Ausrichtung des Brechungsindexellipsoids des Flüssigkristalls, der effektive Brechnungsindex variiert (vgl. Abb. 3.5(b)). Wird eine Spannung an das Pixel angelegt, dreht sich aufgrund der Ausrichtung des Flüssigkristalls das Brechungsindexellipsoid um die vertikale (y) Achse. Die eingestrahelte horizontal polarisierte Welle erfährt nun einen anderen effektiven Brechungsindex. Das Besondere hier ist, dass durch die Orientierung der

Kristalle in der xz -Ebene keine Polarisationsänderung stattfindet, sondern lediglich eine optische Wegverzögerung und damit eine Phasenverzögerung innerhalb eines Pixels. Die resultierende Gesamtverzögerung ergibt sich aus Brechungsindexänderung Δn multipliziert mit Dicke des Flüssigkristalls. Diese kann je nach Wellenlänge zwischen 0 und 2π liegen. Wenn die Modulation für jedes Pixel unabhängig angesteuert wird, werden die Teilwellenfronten relativ zueinander verzögert und erzeugen so ein Phasenprofil.

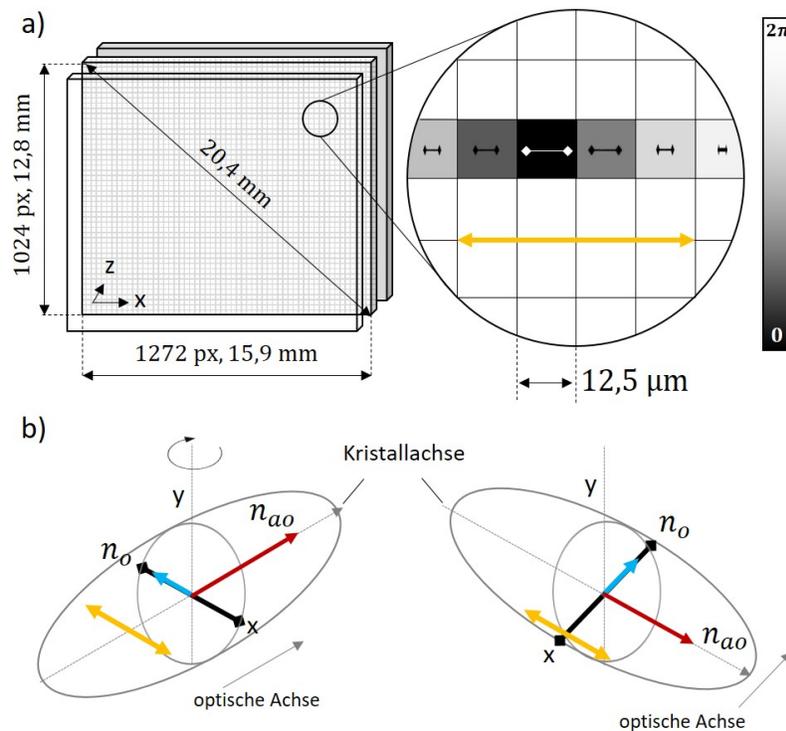


Abbildung 3.5: Schematische Darstellung der Funktion des SLM. a) Der SLM besteht aus drei Schichten: Einer transparenten Elektrode aus ITO (Front), Segmente mit Flüssigkristallen (Mitte), dielektrisch beschichtete Elektrode (Rückseite). Der SLM besitzt 1272×1024 Pixel² und hat eine diagonale Länge von 20,4 mm. Jedes Pixel hat eine Größe von $12,5 \mu\text{m}$ und besteht aus Flüssigkristallen, welche in der xz -Ebene orientiert sind. Das Anlegen einer Spannung führt zur Drehung der Flüssigkristalle in der xz -Ebene. Die angelegte Spannung korreliert mit dem Phasenverzug (Grauwert) des einfallenden, horizontal polarisierten elektromagnetischen Feldes (orange). b) Indexellipsoid für einen optisch positiven Flüssigkristall. Bei Anlegen der Spannung dreht sich der Ellipsoid um die vertikale Achse (y). n_o ist der ordentliche und n_{ao} der außerordentliche Brechungsindex. Die Kristallorientierung links führt zu keinem zusätzlichen Phasenverzug, während rechts die Phase um 2π verzögert wird.

Das Anlegen der Spannung an ein Pixel wird über eine Software, zum Beispiel über ein LabView-Programm gesteuert, indem ein Graustufenbild mit Grauwerten zwischen 0 und 255 auf den SLM eingespeist wird. Der SLM fungiert dabei als zweites Display, wobei die SLM Steuereinheit über eine VGA-Schnittstelle mit dem Computer verbunden ist. Dieses Graustufenbild wird in ein Spannungssignal übersetzt und führt zu einer dem Grauwert entsprechenden Phasenmodulation bzw. Verzögerung. Ein Grauwert von 0 entspricht einer Phasenmodulation von 0 rad, ein Grauwert von 255 einer Verzögerung von 2π .

Die Möglichkeit, die Phase einer Wellenfront ortsabhängig beliebig zu ändern, stellt gerade in der Mikroskopie ein vielseitiges und äußerst vorteilhaftes Werkzeug dar. So ist es mit dem Ansatz der adaptiven Optik möglich Wellenfrontfehler zu korrigieren [71]. Es können Hologramme erzeugt werden [77], der Laserstrahl kann gezielt abgelenkt [78, 79] und es können Phasenprofile für die STED-Mikroskopie erzeugt werden. Im Rahmen der Charakterisierung des SLM wird die Funktion und vor allem die Multifunktionalität des SLMs an verschiedenen Beispielen getestet. Um ein Hologramm zu erzeugen, wird aus einem Bild mittels einem inversen FOURIER-Transformations-Algorithmus (IFT) ein holographisches Phasenprofil erzeugt, das sog. Computer generierte Hologramm (CGH, *Computer Generated Hologram*, engl.) [80]. Dieses Phasenprofil wird als Graustufenbild auf den SLM dargestellt, was zu einer Modulation der einfallenden Wellenfront führt. Wird die modulierte Wellenfront mit einer Linse auf einer Kamera abgebildet, ergibt sich das Ausgangsbild als Intensitätsverteilung. Die Abbildung entspricht hierbei einer Rücktransformation der modulierten Wellenfront und erzeugt somit das Bild. Die Anwendung des SLM für die Erzeugung eines Hologramms ist in Abbildung 3.6 mit eigener Messung gezeigt.

Neben der holographischen Anwendung besteht aber auch die Möglichkeit, eine Strahlablenkung des einfallenden Laserstrahls durchzuführen. Hierzu wird ein Phasengitter auf den SLM dargestellt. Die auf den SLM auftreffende Laserstrahlung wird am Gitter gebeugt und spaltet sich in die verschiedenen Beugungsordnungen auf. Durch Anwendung eines Blazegitters kann dafür gesorgt werden, dass möglichst viel Intensität in der -1 . Beugungsordnung liegt, wohingegen möglichst wenig Intensität in den anderen Ordnungen liegt. Dies wird dadurch erzielt, indem das Gitter mit dem Gitterabstand d_G , zwischen den sich periodisch wiederholenden Strukturen, einen ansteigenden Laufzeitunterschied von 0 bis 2π auf die einfallende Wellenfront induziert. Ein Laufzeitunterschied ist gleichzusetzen mit einer Verkippung reflektierender Elemente in Sägezahnform, wie dies bei sog. *Blazegittern* der Fall ist. Damit kann erreicht werden, dass die Reflexion mit der Beugung bei einer Ordnung zusammenfallen und dort die maximale Beugungseffizienz erzielt wird. Auf diese Art reflektierte und gebeugte Laserstrahlung weist ordnungsabhängige Beugungswinkel β_B nach folgender Berechnung auf:

$$m\lambda = 2d_G \sin \beta_B \quad (3.1)$$

Die Beugungsordnung ist durch m gegeben. Der Beugungswinkel berechnet sich folglich nach:

$$\beta_B = \arcsin \frac{m\lambda}{2d_G} \quad (3.2)$$

Für die Umsetzung eines Blazegitters am SLM wird ein Graustufenbild am Computer, zum

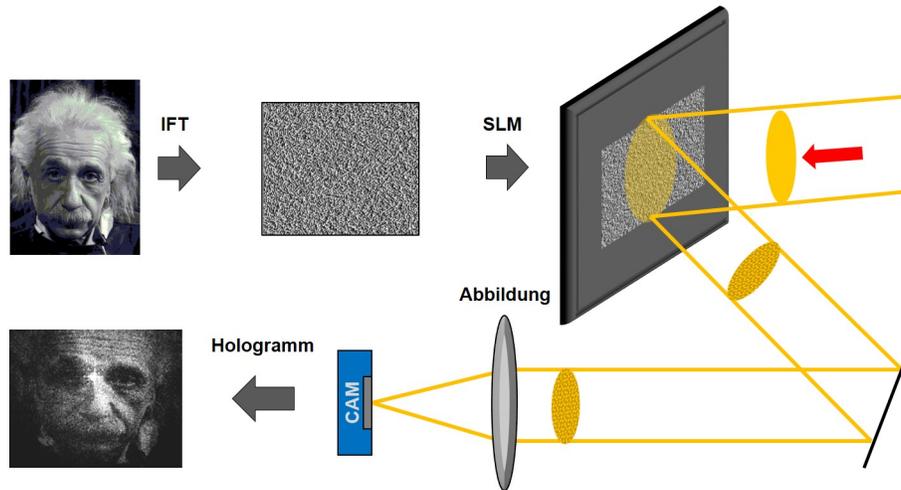


Abbildung 3.6: Mit dem SLM können beliebige Phasenmodulationen vorgenommen und damit auch Hologramme erzeugt werden. Zur Erzeugung eines Computer generierten Hologramms (CGH) wird ein Graustufen-Bild mittels eines Algorithmus (IFT) in ein Graustufen-Bild zur Phasenmodulation umgewandelt, welches auf den SLM dargestellt wird. Die einfallende Wellenfront wird dem Muster entsprechend moduliert. Nach Rücktransformation mittels Linse und Abbildung auf einer Kamera (CAM), ergibt sich das Ausgangsbild als Intensitätsverteilung.

Beispiel mit einem Matlab (The Mathworks) Programm, erzeugt, welche eine sägezahnförmige Struktur mit Graustufen von 0 ($\hat{=}$ 0 rad) bis 255 ($\hat{=}$ 2π rad) aufweist. Die Anzahl der Linien auf die Breite des Bildes ergibt die Gitterkonstante $1/d_G$. In Abbildung 3.7 sind verschiedene Gitter mit verschiedenen Gitterkonstanten und den zugehörigen Beugungsbildern gezeigt. Die oberste Reihe zeigt als Referenz einen homogenen Grauwert von 127, wodurch keine Beugung stattfindet und entspricht der 0. Ordnung. Nachfolgend sind drei verschiedene Gitter mit unterschiedlichen Gitterkonstanten gezeigt. Die höchste Intensität liegt in der -1 . Beugungsordnung. Je kleiner der Gitterabstand d_G ist, desto größer ist der Beugungswinkel β_B . An diesem Beispiel werden für das erste Gitter ein Beugungswinkel gegenüber der 0.-Ordnung von $-0,244^\circ$, für das zweite Gitter ein Winkel von $-0,212^\circ$ und für das dritte Gitter ein Winkel von $-0,010^\circ$ erzielt. Bei der Verwendung eines Gitters ist sichergestellt, dass gebeugtes Licht auch tatsächlich von dem SLM moduliert wird. In Abhängigkeit der Qualität des SLM kann somit eine höhere Performance erzielt werden, da moduliertes Licht von nicht-moduliertem, nur reflektiertem Licht, getrennt werden kann. Weitere Phasenmasken können additiv überlagert werden und erfahren so in Kombination neben der eigentlichen Phasenmodulation auch die Ablenkung durch das Gitter. Ein solcher Ansatz wird zum Beispiel in der STED-Mikroskopie mit Vortex- und π -Phasenmasken angewendet [78]. Im nachfolgenden Unterkapitel wird beschrieben, wie die Phasenmasken für die STED-Mikroskopie zur Anwendung mit einem SLM berechnet wird.

Generell bietet der SLM sehr viele Möglichkeiten, um Wellenfrontmodulationen beliebiger Art durchzuführen. Wie in Abschnitt 3.5.1 dargestellt, können auch Wellenfrontdeformationen durch Überlagerung einer Kompensationsphase korrigiert werden. Dies erlaubt in der STED-Mikroskopie die Erzeugung möglichst idealer Intensitätsprofile, welche für die laterale oder axiale Auflösungsverbesserung verwendet wird.

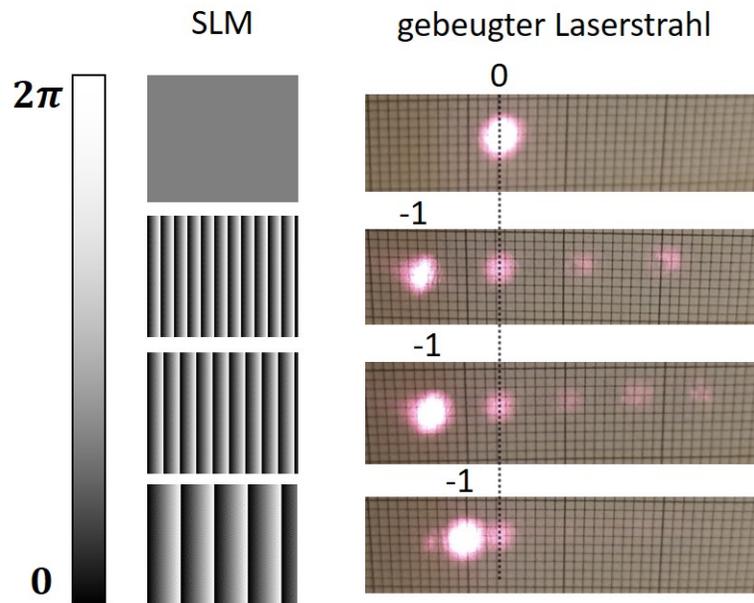


Abbildung 3.7: Beugung am Gitter durch Phasenmodulation am SLM für verschiedene Gitterkonstanten. Die Gitter sind als Blazegitter ausgeführt und variieren den Phasenversatz von 0 bis 2π . Ein Kästchen entspricht 1 mm.

3.2.4 Phasenmasken

In der STED-Mikroskopie werden überwiegend zweierlei Phasenmasken eingesetzt: Die Vortex- und die π -Phasenmaske. Die Funktionsweise dieser Phasenmasken ist in Abschnitt 2.3.2 erläutert. Die Vortex-Phasenmaske wird für die laterale Auflösungsverbesserung eingesetzt. Kommerziell erhältlich sind solche Phasenmasken zum Beispiel aus Glas, wobei mittels Elektronenstrahlolithographie eine Brechungsindexänderung im Glas mit dem helixförmigen Verlauf des Vortices eingebracht wird. Diese Masken sind typischerweise für den Einsatz in Transmission vorgesehen. Die Stufenhöhe bzw. die Stärke der Brechungsindexänderung ist auf eine Wellenlänge optimiert und funktioniert nur für diese Wellenlänge ausreichend gut. Soll eine andere Wellenlänge verwendet werden, muss auch eine andere Maske eingesetzt werden. Mit dem SLM hingegen kann elektronisch eine unterschiedlich starke Phasenänderung eingestellt werden, so dass eine Bandbreite von verschiedenen Wellenlängen eingesetzt werden kann. In dieser Arbeit wird ein SLM verwendet, welcher im Bereich von 750 bis 850 nm eingesetzt werden kann. Ein weiterer Unterschied liegt darin,

dass der SLM in Reflexion arbeitet. Um die Phasenmodulation eines Vortices zu erzeugen, wird ein Graustufenbild berechnet. Der Vortex kann mittels der Umkehrfunktion des Tangens auf dem geschlossenen Intervall $[-\frac{\pi}{2}, \frac{\pi}{2}]$ unter Berücksichtigung der Quadrantenregel folgendermaßen berechnet werden:

$$\Delta\Gamma_{Vortex}(x, y) = \arctan \frac{y}{x} + \begin{cases} 0, & \text{wenn } x \wedge y \geq 0 \\ \pi, & \text{wenn } x \wedge y < 0 \vee x < 0 \wedge y > 0 \\ 2\pi, & \text{wenn } x > 0 \wedge y < 0 \end{cases} \quad (3.3)$$

Um das Graustufenbild zu erhalten, wird der berechnete Winkel auf 2π normiert und mit einem maximalen Grauwert von 255 multipliziert (Gleichung 3.4). So ergibt sich eine Vortex-Phasenmaske, welche auf dem SLM dargestellt werden kann. Eine Darstellung dieser Maske ist in Abbildung 3.8(a) gezeigt.

$$\Delta\Gamma_{Vortex,GW}(x, y) = \frac{\Delta\Gamma_{Vortex}(x, y)}{2\pi} \cdot 255 \quad (3.4)$$

Für die axiale Auflösungsverbesserung werden π -Phasenmasken verwendet. Die π -Phasenmaske besteht aus zwei kreisförmigen Segmenten. Dabei weist ein innerer gegenüber einem äußeren Bereich einen π -Phasensprung auf. Solche Phasenmasken können zum Beispiel durch Ätzen von Gläsern sehr einfach hergestellt werden. Dabei wird mit einer Säure, zum Beispiel Flusssäure, so viel Material abgetragen, bis ein π -Phasensprung vorliegt. In Wellenlängen ausgedrückt, entspricht dies einem Sprung von $\lambda/2$, allerdings unter Berücksichtigung des Brechungsindex des Glases bzw. Materials. Auch hier gilt, dass solche Phasenmasken für jeweils eine Wellenlänge verwendet werden können. Ein weiterer sehr kritischer Parameter ist das Flächenverhältnis von Laserstrahl und π -Phasensprung. Das Intensitätsverhältnis zwischen der verzögerten und nicht-verzögerten Teilwellenfronten muss gleich sein, damit eine destruktive Interferenz im Fokus stattfindet. Bei festem Durchmesser der π -Phasenmaske kann zum Beispiel über Anpassung des Laserstrahldurchmessers die richtige Größe gewählt werden. Wird der Laserstrahldurchmesser allerdings verändert, kann die π -Maske nicht mehr eingesetzt werden. Der SLM bietet auch hier eine deutlich höhere Flexibilität, da die Phasenmasken mittels Graustufenbilder elektronisch generiert werden. Somit kann der Radius des Bereichs mit π -Sprung einfach angepasst werden. Die π -Phasenmaske berechnet sich mittels einer Fallunterscheidung nach:

$$\Delta\Gamma_{\pi}(x, y) = \begin{cases} \pi & \text{für } \sqrt{x^2 + y^2} \leq r_i \\ 0 & \text{für } \sqrt{x^2 + y^2} > r_i \end{cases} \quad (3.5)$$

Der Radius ist gegeben durch $r = \sqrt{x^2 + y^2}$ mit den Pixelkoordinaten des SLM (x, y) . Das Graustufenbild berechnet sich mittels Normierung auf 2π und Multiplikation mit einem maximalen Grauwert von 255 zu:

$$\Delta\Gamma_{\pi,GW}(x, y) = \frac{\Delta\Gamma_{\pi}(x, y)}{2\pi} \cdot 255 \quad (3.6)$$

Wird also ein π -Phasensprung erzeugt, beträgt nach Gleichung 3.6 der Grauwert des inneren Bereichs gerundet 127. Abbildung 3.8(b) zeigt die π -Phasenmaske in 3D Darstellung.

Der Phasensprung kann räumlich als Zylinder verstanden werden. Aufgrund der einfachen Erzeugung der Phasenmasken können Anpassungen sowohl im Durchmesser als auch in der Phase durch Skalieren der Grauwerte vorgenommen werden. Zur Phasenmodulation

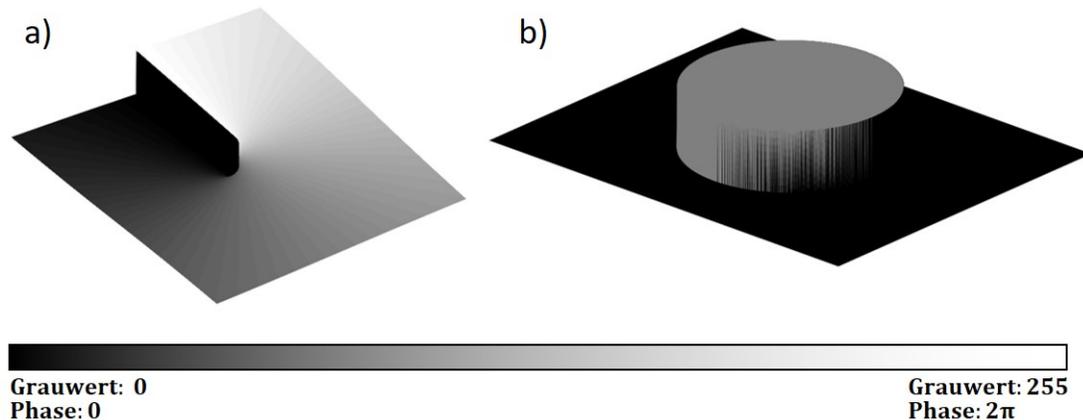


Abbildung 3.8: a) Die berechnete Vortex-Phasenmaske wird auf den SLM dargestellt und induziert einen Phasenverzug von 0 bis 2π , entsprechend einer Grauwertänderung von 0 bis 255. b) Die π -Phasenmaske weist zwei Bereiche auf: Kein Phasenverzug im äußeren Bereich (Grauwert 0), π -Phasenverzug im inneren Bereich (Grauwert 127).

des STED-Lasers trifft der Laserstrahl zentrisch auf den Modulationsbereich des SLM. Der Laserstrahl hat einen Durchmesser von $d_{SL} = 3$ mm. Unter Berücksichtigung der Pixelbreite von $12,5$ μm werden somit 240 Pixel sowohl in x - als auch y -Richtung vollständig überstrahlt. Für die Modulation ist die Verwendung von 240 Pixel ausreichend. Die Auflösung des SLM von 80mm^{-1} ist dagegen notwendig, wenn ein Laserstrahldurchmesser von wenigen Millimetern verwendet werden soll. Ist die Auflösung des SLM geringer, ist die Modulation bei gleichem Laserstrahldurchmesser unzureichend und es treten Beugungseffekte an der 2D-Gitterstruktur aufgrund der Pixel stärker auf.

Der rein elektronische Ansatz bei Verwendung eines SLM erlaubt nicht nur die Nutzung vieler Freiheitsgrade, sondern auch die Automatisierung der Phasenmodulation sowie die Integration in ein vollautomatisiertes Mikroskop. Im nächsten Unterkapitel wird der Ablauf der Bildaufnahme erläutert, wie sie bei 2C2P-STED stattfindet.

3.3 Software und Bildgebung

Bei 2C2P-STED (vgl. 3.1) werden zwei verschiedenen Bildgebungsmodi, die 2C2P-Anregung sowie 2P-STED-Mikroskopie, angewendet. Der Wechsel zwischen beiden Modi sowie die Bildaufnahme ist in dem hier vorgestellten Ansatz vollständig elektronisch gesteuert. Dies hat zum einen den Vorteil, dass keine optomechanischen Änderungen im Strahlengang während des Wechsels zwischen den verschiedenen Methoden stattfinden muss, zum ande-

ren, dass eine automatisierte Bildaufnahme möglich ist. Ein selbstgeschriebenes LabView-Programm steuert die verschiedenen Komponenten wie die zeitliche Synchronisation, die Laserparameter und die Phasenmodulation am SLM.

3.3.1 Ablauf Bildaufnahme

Der experimentelle Ablauf sieht in einem vorbereitenden Schritt die räumliche und zeitliche Überlagerung beider Laserstrahlen vor. Die Methoden zur Justage der Laserstrahlen sind in Abschnitt 3.5 vorgestellt. Nach erfolgter Justage ist das System einsatzbereit für die Bildaufnahme nach dem Prinzip von 2C2P-STED (vgl. Abschnitt 3.1). Abbildung 3.9 zeigt die Ablaufsteuerung der Bildaufnahme. Nach Start der Prozedur wird zuerst das 2C2P-Bild mit beugungsbegrenzter Auflösung erzeugt (1). Dazu wird der STED-Laser in den Kurzpulsmodus geschaltet und emittiert damit Pulse mit einer Pulsdauer von 41 ps. Die relative Zeitdifferenz zwischen den Pulsen des fs-Lasers und des STED-Lasers wird mit Hilfe des Pikosekundenverzögerers auf $\Delta\tau = 0$ ps gestellt. Der SLM moduliert die gesamte Wellenfront entsprechend eines homogenen Grauwerts, wodurch keine effektive Phasenmodulation stattfindet. Der fokussierte STED-Laser weist im Fokus eine homogene und beugungsbegrenzte Intensitätsverteilung auf. Der aus diesen Einstellungen resultierende zeitliche und räumliche Überlapp der Pulse führt zur 2C2P-Anregung des Farbstoffs der Gegenfärbung. Mit dieser Konfiguration wird ein Bild aufgenommen. In einem zweiten Schritt wird das

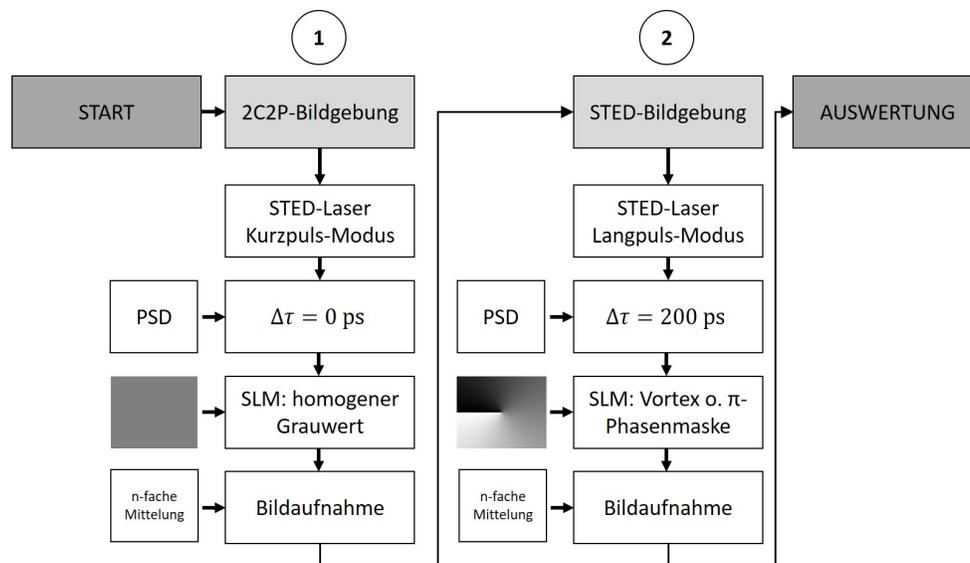


Abbildung 3.9: Ablauf der 2C2P-STED Bildaufnahme. Nach Start des Programms wird ein 2C2P-Bild (1) mit konfokaler Auflösung und den entsprechenden SLM- und PSD-Konfigurationen aufgenommen. Anschließend wird automatisch auf den STED-Modus (2) umgeschaltet und ein supraaufgelöstes Bild aufgenommen. Die Bilddaten werden zur Auswertung abgespeichert.

System automatisch für die 2P-STED-Bildgebung konfiguriert (2). Zu diesem Zweck wird

der STED-Laser in den Langpulsmodus geschaltet und emittiert Pulse von 538 ps. Es wird eine Zeitverzögerung von ca. $\Delta\tau = 200$ ps zwischen Anregungspuls und STED-Puls eingestellt. Welcher Wert genau eingestellt werden muss, hängt von der Pulsdauer und der optimalen stimulierten Abregung in Abhängigkeit des Zeitversatzes ab. Dies variiert je nach Fluoreszenzfarbstoff und Probensystem. Ein numerisches Modell für die Berechnung der optimalen Zeit ist in Abschnitt 2.5 gegeben. Entsprechende Ergebnisse werden in Abschnitt 4.3 diskutiert. Im Falle einer lateralen Auflösungsverbesserung wird auf den SLM eine Vortex-Phasenmaske dargestellt, was zu einem Donut-förmigen Intensitätsprofil im Fokus führt. Die Überlagerung mit der beugungsbegrenzten Intensitätsverteilung des fs-Lasers, ergibt mittels stimulierter Emission das supraaufgelöste Bild einer zweiten, mit Fluoreszenzfarbstoff markierten Substruktur. Anschließend werden die Bilder aus (1) und (2) überlagert und liefern die Ergebnisse der Organisation der Substruktur in Relation zur Gegenfärbung. Da beide Laser in beide Bildgebungsprozesse involviert sind und der erste Prozess nur dann stattfindet, wenn beide Laser räumlich (und zeitlich) überlappen, besteht eine intrinsische Korrelation der Bilder zueinander. Wie die Pulse für den jeweiligen Modus zeitlich zueinander angeordnet sind und welche Phase für den STED-Laser angewendet wird, ist in Abbildung 3.10 für die 2C2P-Bildgebung (a) und 2P-STED (b) dargestellt. Ein großer Vorteil der Methode liegt auch darin, dass die Aufnahme-prozedur um beispielsweise STED in axialer Richtung erweitert werden kann. Hierzu müsste die Phasenmaske auf dem SLM von einer Vortex in eine π -Maske geändert werden. Die Kaskade wird um einen weiteren Schritt erweitert. Nachfolgend findet eine erneute Bildaufnahme mit der neuen Phasenmaske statt.

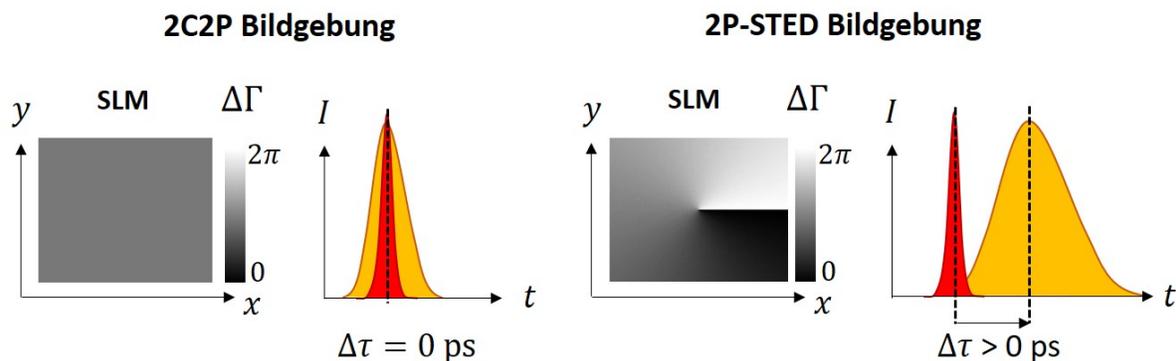


Abbildung 3.10: Während der Prozedur der Bildaufnahme werden die Laserparameter zwischen den einzelnen Modi geändert. Für 2C2P wird der STED-Laser in einen Kurzpulsmodus geschaltet und zeitlich und räumlich mit dem fs-Laser überlagert, die Phasenmodulation des STED-Lasers ist homogen. Damit findet eine 2C2P-Anregung statt. Für 2P-STED wird der STED-Laser in einen Langpulsmodus geschaltet und gegenüber dem fs-Laser zeitlich verzögert. Die Phase wird für die laterale Auflösungsverbesserung mit einem Vortex moduliert. Anschließend wird eine STED-Aufnahme erzeugt.

3.3.2 LabView-Programm zur automatisierten Bildaufnahme

Die Bildaufnahme in 2C2P-STED wird über ein selbst geschriebenes LabView-Programm durchgeführt, welcher entsprechend der in Abbildung 3.9 gezeigten Ablaufsteuerung automatisiert die Laser- und SLM-Parameter ändert. Der Resonanz-Galvo-Scanner wird über das Programm getriggert und startet damit die Bildgebung in dem jeweiligen Aufnahme-modus. Neben der Bildgebung über den Laser-Scanner ist auch die direkte Bildgebung über den Piezoscanner möglich. Dieser wird überwiegend zur Charakterisierung der PSFs verwendet, dient aber auch zur axialen Bildgebung. Die Programmoberfläche (s. Abbildung 3.11) zeigt zum einen die aktuellen Zählraten der APD an, zum anderen aber auch das durch die Scanbewegung aufgenommene mikroskopische Bild.



Abbildung 3.11: LabView-Programmoberfläche zur automatisierten Bildaufnahme. Die Software erlaubt die volle Kontrolle des Experiments mit Steuerung der Laser, der dargestellten Phasen sowie den Pulszeitversatz zwischen Anregungs- und STED-Laserpuls. Ebenso wird die Bildgebung über den Resonanz-Galvo-Scanner getriggert, aber auch das Nanopositioniersystem gesteuert.

Die TTL-Pulse der APD werden über die integrierten Zähler einer NI-Karte Typ 6323 (National Instruments) in Kombination mit einer BNC-Anschlussbox Typ 2110 (Natio-

nal Instruments) aufgenommen. Der Pixeltrigger des Nanopositioniersystems wird über einen integrierten Zähler aufgenommen und die Zählrate der APD entsprechend der Pixel segmentiert. Triggersignale für den Laser-Scanner werden ebenfalls von dieser BNC-Anschlussbox über einen analogen Ausgang ausgegeben. Der Piezoscanner erlaubt eine Positionierung in einem Bereich bis zu 300 μm über alle drei Raumrichtungen. Damit ist eine präzise Positionierung direkt über die Programmoberfläche möglich. Über serielle Schnittstellen werden der Pikosekunden-Laser und das Verzögerungsmodul gesteuert. Der SLM ist mittels einer VGA-Schnittstelle als zweites Display in das System eingebunden und wird über eine entsprechende Bildsteuerung in LabView angesprochen. Die Einbindung des SLM in LabView erlaubt zudem die schnelle Berechnung von Kompensationsphasen oder Variation der Durchmesser bei einer π -Phasenmaske. Damit bietet dieser Ansatz eine flexible und schnelle Umsetzung für die STED-Mikroskopie. Die im Rahmen dieser Arbeit programmierte LabView-Steuerung und -oberfläche erlauben die volle Kontrolle über das Experiment und sind so gestaltet, dass sie einfach mit weiteren Methoden wie beispielsweise FLIM (*Fluorescence Life-Time Imaging Microscopy*, engl.) erweitert werden können.

3.4 Probensysteme

Sowohl die Wahl als auch die richtige Präparation der Probensysteme stellen in der STED-Mikroskopie kritische Parameter für die maximal erzielbare Auflösung dar. Letztlich kann die Auflösung nur so gut werden, wie es die Präparation zulässt. Für ein hohes Signal-zu-Rausch-Verhältnis, eine für die Bildqualität entscheidende Größe, hängt wesentlich mit der Photostabilität auch mit einer möglichst hintergrundfreien Färbeprozedur zusammen. Die Photostabilität gibt an, wie viele Anregungszyklen der Fluorophor vor dessen photochemischer Zerstörung durchführen kann. Die Anzahl detektierter Fluoreszenzphotonen sollte mindestens ein bis zwei Größenordnungen über der Dunkelzählrate bzw. einem Hintergrundsignal liegen. Die hintergrundfreie Färbung ist entscheidend für die spezifische Färbung und einen hohen Kontrast. Je nach biologischem Probensystem existieren unterschiedliche Ansätze, wie eine Färbung durchzuführen ist. So kann zwischen einer Lebendfärbung oder einer Färbung im fixierten Zustand gewählt werden. Eine gute Übersicht über Methoden der Probenpräparation für die STED-Mikroskopie findet sich in [81]. Generell muss berücksichtigt werden, dass die Methode der Fixierung Einflüsse auf die Präparation, beispielsweise auf die Strukturhaltung der Probe, haben kann [14]. Geeignete Protokolle können teilweise nur mit einem hohen experimentellen Aufwand für ein bestimmtes System erarbeitet werden. Hierfür müssen unter anderem Fluoreszenzfarbstoffe, Methoden der Fixierung, Vorgehen zur Aufreinigung der Probe sowie Inkubationszeiten variiert werden, um das bestmögliche Ergebnis zu erzielen. Dieses Vorgehen der Optimierung stellt einen unbedingt notwendigen Schritt für jedes Probensystem dar. In den nachfolgenden Unterkapiteln wird eine Übersicht über die in dieser Arbeit verwendeten Probensysteme und Fluoreszenzfarbstoffe gegeben.

3.4.1 Fluoreszenzfarbstoffe für biologisches System

Es gibt eine Vielzahl unterschiedlicher Fluorophore für die unterschiedlichsten Anwendungen. In dieser Arbeit werden überwiegend drei Fluoreszenzfarbstoffe für die nichtlineare Anregung sowie für STED verwendet und näher vorgestellt. In Anhang B findet sich eine Übersicht über weitere, untersuchte Fluoreszenzfarbstoffe mit einer einfachen Klassifizierung hinsichtlich ihrer Eignung für die jeweilige Bildgebungsmethode. Grundsätzlich muss anhand der Spektren analysiert werden, inwieweit der jeweilige Fluorophor für die nichtlineare Anregung bei gegebenen Wellenlängen geeignet ist und ob STED mit diesem Farbstoff möglich ist. Soll der Farbstoff für die 2C2P-Anregung verwendet werden, muss eine ausreichend hohe Absorptionswahrscheinlichkeit bei der virtuellen 2C2P-Anregungswellenlänge (vgl. Gl. 2.6) vorliegen. Die gleiche Überlegung gilt für die 2P-Anregung mit der virtuellen Anregungswellenlänge für die 2P-Absorption, welche in etwa bei der halben Laserwellenlänge ($\lambda_{2P} = \lambda/2$) liegt. Allerdings muss berücksichtigt werden, dass das tatsächliche Anregungsmaximum je nach Fluorophor von dieser Überschlagsrechnung abweichen kann und teilweise gegenüber der 1P-Anregung ein blauverschobenes Anregungsspektrum zeigt [82, 83]. In der Literatur gibt es zwar einige Studien hinsichtlich 2P-Absorptionswirkungsquerschnitten, so dass mittlerweile einige Daten über die wellenlängenabhängige 2P-Absorption gängiger Fluorophore vorliegen [82, 84, 85], allerdings sind viele Fluorophore noch nicht untersucht. Daher müssen gegebenenfalls erste Abschätzungen über die Eignung zur nichtlinearen Anregung oftmals aufgrund der 1P-Fluoreszenzspektren stattfinden. Eine weitere Randbedingung im Falle der nichtlinearen Anregung liegt darin, dass bei Mehrfachfärbungen und Verwendung mehrerer Laserwellenlängen die unterschiedlichen Fluorophore über die jeweiligen Laser oder deren Kombination gezielt angeregt werden können. Dies bedeutet, dass im Idealfall ein Laser oder ausschließlich die Kombination aus beiden, je einen Farbstoff zur Fluoreszenz anregt, jedoch nicht einen zweiten. Nur unter dieser Voraussetzung kann eine kontrastreiche Bildaufnahme mit anschließender aussagekräftiger Analyse erfolgen.

Wird der Fluorophor für STED verwendet, besteht eine zwingende Bedingung darin, dass das Emissionsspektrum des Fluorophors noch eine Emission bei der STED-Laserwellenlänge aufweist. Nur dann existiert der energetische Übergang aus dem angeregten elektronischen Zustand in einen vibronischen Zustand des Grundniveaus. Der Übergang entspricht der STED-Laserwellenlänge. Um eine mögliche Direktanregung durch den STED-Laser zu vermeiden, ist der Farbstoff so gewählt, dass die STED-Laserwellenlänge am roten Ende des Emissionsspektrum liegt. Bei Mehrfachfärbung ist es zudem sinnvoll, spektral möglichst stark separierte Fluorophore zu verwenden, damit die spektralen Detektionsbereiche groß gehalten werden können, und Crosstalk vermieden wird.

Die in dieser Arbeit verwendeten Laserwellenlängen sind $\lambda_1 = 1034$ nm und $\lambda_2 = 775$ nm. Daraus ergibt sich eine virtuelle 2C2P-Anregungswellenlänge von $\lambda_{2C2P} = 443$ nm. Die 2P-Anregungswellenlänge liegt bei Verwendung von λ_1 liegt in etwa bei $\lambda_{2P} = 517$ nm. Aufgrund der Absorptions- und Emissionseigenschaften fällt die Wahl, unter Berücksichtigung der oben beschriebener Parameter und Randbedingungen, auf den Fluorophoren

ATTO425 (AttoTEC) sowie **AlexaFluor594** (ThermoFisher). Die Anregungsspektren (Exc) sowie die Emissionsspektren (Em) sind für beide Farbstoffe in Abbildung 3.12 gezeigt. Ebenso sind die virtuellen Anregungsbereiche der 2C2P- und der 2P-Anregung farblich markiert. Der STED-Laser selbst ist ebenfalls eingezeichnet. Wie aus Abb. 3.12 zu entnehmen ist, liegt der Anregungsbereich aus der 2C2P-Anregung mit 443 nm in unmittelbarer Nähe zum Absorptionsmaximum des blau fluoreszierenden Fluorophors ATTO425. Die 2P-Anregungswellenlänge mit 517 nm liegt dagegen außerhalb des ATTO425 Absorptionsbereichs, wodurch keine Anregung stattfinden kann. Der fs-Laser weist allerdings einen spektralen Überlapp mit dem Absorptionsspektrum des AlexaFluor594 auf, so dass hier eine Anregung wahrscheinlich ist. Das rot fluoreszierende Fluorophor AlexaFluor594 zeigt eine ausreichende Emission bei 775 nm und kann für STED verwendet werden. Aus den Spektren ist zu entnehmen, dass eine sehr gute 2C2P-Anregung des ATTO425 zu erwarten ist, wohingegen AlexaFluor594 mittels 2P-Anregung angeregt wird und für STED eingesetzt werden kann. Die gute spektrale Trennung beider Fluorophore führt unter Berücksichtigung der spektralen Detektionsbereiche des optischen Aufbaus (vgl. Abb. 3.3(a)) zu keinem oder nur sehr geringen Crosstalk, so dass eine kontrastreiche Bildgebung möglich ist. Diese Fluoreszenzfarbstoffe werden für die Bildgebung von biologischen Systemen ein-

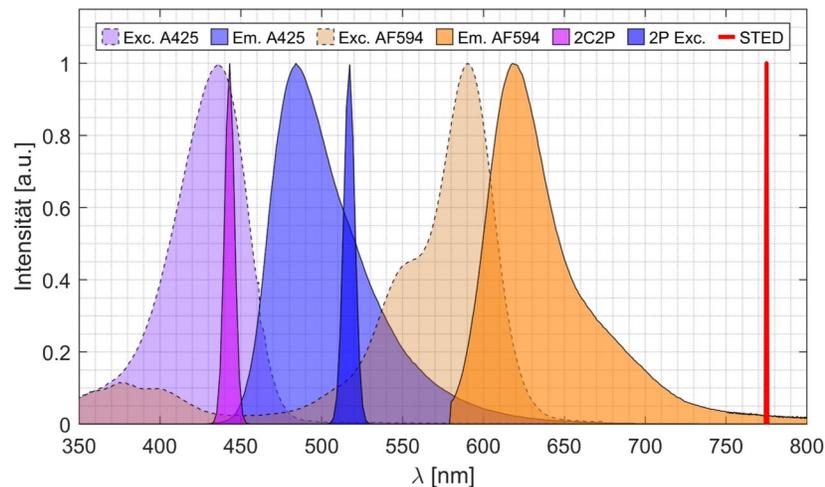


Abbildung 3.12: Anregungs (Exc.)- und Emissionsspektren (Em.) der verwendeten Fluoreszenzfarbstoffe ATTO425 (A425) und AlexaFluor594 (AF594). Der virtuelle 2C2P-Anregungsbereich ($\lambda_{2C2P} = 443$ nm), die 2P-Anregung (2P Exc.) ($\lambda_{2P} = 517$ nm) sowie die STED-Wellenlänge ($\lambda_{STED} = 775$ nm) sind eingezeichnet. Spektrale Daten von [86].

gesetzt. In dieser Arbeit werden mittels 2C2P-STED der Pilus Typ-1 von *Streptococcus pneumoniae* (*S. pneumoniae*) TIGR4 untersucht. Die Färbemethode basiert auf der als Immunofluoreszenz bekannten Antikörper-Färbung. Der Organismus sowie die Probenpräparation sind in Abschnitt 3.4.4 beschrieben.

3.4.2 Referenzprobe zur Laserstrahljustage und Charakterisierung

Die direkte 2P-Anregung durch beide Laser bei gleichzeitiger Eignung für STED, kann sich aber auch zu Nutze gemacht werden. In dieser Arbeit wird mit Hilfe eines geeigneten Fluorophors die räumliche und zeitliche Überlagerung von Anregungs- und STED-Laser, sowie die Modulation der für STED verwendeten Intensitätsprofile eingestellt und überprüft. Für diese Anwendung eine Anregung mittels direkter 2P-Absorption durch den STED-Laser, aber auch durch den fs-Laser angeregt werden können. Hierfür wird der Fluorophor „Crimson“ (ThermoFisher) verwendet. Die virtuelle 2P-Anregungswellenlänge beträgt für den STED-Laser ausgehend von 775 nm in etwa 387,5 nm. Für den fs-Laser beträgt die 2P-Anregungswellenlänge, wie oben bereits beschrieben, 517 nm. Auch eine ausreichende Emission bei der STED-Wellenlänge muss gegeben sein. Das Absorptions- und Emissionsspektrum von Crimson ist in Abbildung 3.13 mit den eingezeichneten virtuellen Anregungswellenlängen und der STED-Laserwellenlänge gezeigt. Viele rot fluoreszierende Farbstoffe zeigen neben dem Hauptabsorptionsbereich noch einen Nebenabsorptionsbereich, welcher gegenüber der Hauptanregung im blauverschobenen Spektralbereich liegt. Eine solche Absorption könnte mit der Anregung in einen höheren Zustand S_n zusammenhängen. In Abb. 3.13 ist zu sehen, dass die 2P-Anregung durch den STED-Laser in diesem Nebenabsorptionsbereich liegt und somit bei genügend hoher Laserintensität in der Lage ist, dieses Fluorophor zur Fluoreszenz anzuregen. Die 2P-Anregungswellenlänge des fs-Lasers liegt in dem Bereich der Hauptabsorption und kann ebenfalls zur Anregung beitragen. Crimson zeigt eine starke Emission bei der STED-Wellenlänge, womit eine hohe Übergangswahrscheinlichkeit bei Einstrahlung des STED-Lasers gegeben ist. Dieser Farbstoff kann somit für die räumliche und zeitliche Justage der Laser eingesetzt werden, da eine direkte Bildgebung mit jedem der Laser, aber auch die Kombination hinsichtlich STED möglich ist. Für die Referenzprobe wird neben den bekannten spektralen Eigenschaften auch eine räumlich definierte Probe gefordert. Da gegenüber der beugungsbegrenzten Bildgebung eine Auflösungsverbesserung erzielt werden soll, bieten sich Objekte an, welche kleiner sind als das beugungsbegrenzte Fokalvolumen. Eine sehr gute Referenzprobe stellen Kügelchen (*Beads*, engl.) dar, welche im Durchmesser einige 10 nm bis wenige 100 nm betragen. Beads haben den Vorteil, dass sie aufgrund der Kugelform isotrope Eigenschaften aufweisen und somit ideal für die Charakterisierung des Fokalvolumens in alle drei Raumrichtungen geeignet sind. In dieser Arbeit werden mit Carboxylat oberflächenmodifizierte Nanobeads mit einem nominellen Durchmesser von $d_B = 200$ nm verwendet. Diese Beads sind über die Oberflächenmodifikation mit Crimson markiert (F8806, ThermoFisher). Die Nanobeads werden als hochkonzentrierte Lösung geliefert und erfordern eine weitere Verdünnung, damit sie sich als Testobjekte eignen. Idealerweise zeigt das mikroskopische Bild eine einzelne Schicht von Kügelchen, welche an manchen Stellen dichter, an anderen Stellen weniger dicht, zusammen liegen. Einzelne Beads eignen sich, um die PSF der jeweiligen Laser direkt zu vermessen. Bereiche mit dichten Kugelpackungen erlauben eine Quantifizierung der Auflösung, da nur bei ausreichend hoher Auflösung die Bereiche zwischen den Kügelchen aufgelöst werden können. Monolayer bzw. das Vorkommen isolierter Beads, können durch die richtige Konzentration erzielt werden. Ausgehend von einem Massenanteil $w_0 = 2 \cdot 10^{-2}$

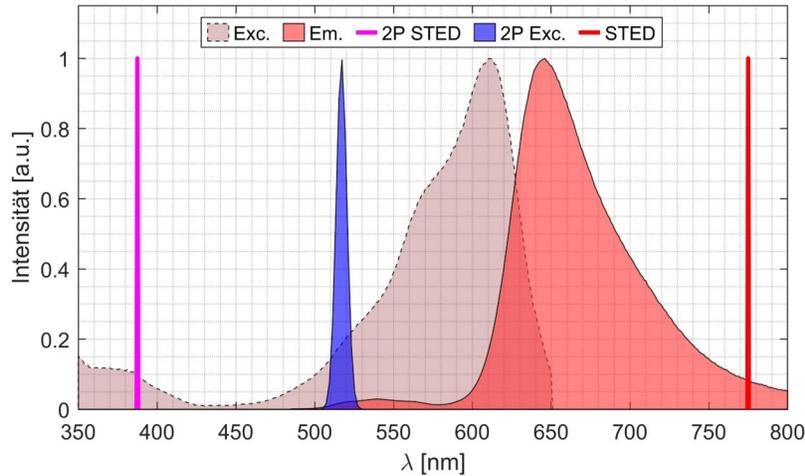


Abbildung 3.13: Anregungs (Exc.)- und Emissionsspektrum (Em.) des Fluoreszenzfarbstoffs Crimson, welcher für die räumliche und zeitliche Justage verwendet wird. Dieser Farbstoff wird mittels 2P-Anregung durch den STED-Laser angeregt (2P-STED, $\lambda_{STED,2P} = 387,5$ nm) sowie mit (2P Exc.) $\lambda_{2P} = 517$ nm und mit dem STED-Laser bei $\lambda_{STED} = 775$ nm stimuliert abgeregt.

der Ausgangslösung, zeigte eine Verdünnungsreihe mit entsprechender Präparation, dass eine Verdünnung der Lösung auf einen Massenanteil $w_C = 2 \cdot 10^{-6}$ die besten Ergebnisse liefert. Um diesen Massenanteil einzustellen, werden 1,0 μ l Konzentrat mit 9,999 ml zweifach destilliertem Wasser verdünnt. Nachfolgend wird die Lösung für ca. 8 min in ein Ultraschallbad gegeben. Von dieser Lösung werden 8 μ l entnommen und auf ein gereinigtes Präzisionsdeckgläschen (0107032, Marienfeld) pipettiert und anschließend bei geringer Wärmezufuhr über die Unterseite des Deckgläschens getrocknet. Das Deckgläschen hat eine Dicke von (170 ± 5) μ m und ist für die supraauflösende Mikroskopie geeignet. Auf einen Objektträger (Menzel, ThermoFisher) wird ein Tropfen des auf Glykol basierenden Einbettmediums ProLong Diamond (ThermoFisher) aufgebracht. Das Deckgläschen mit den Beads wird auf diesen Tropfen aufgebracht. Da sich das Einbettmedium anfangs noch im flüssigen Zustand befindet, verteilt es sich gleichmäßig über das Deckgläschen und umschließt die Beads. Nach ca. 24 Stunden ist das Polymer vollständig ausgehärtet. Dieses Einbettmedium hat zweierlei Aufgaben: Zum einen besitzt das Einbettmedium im ausgehärteten Zustand einen dem Deckglas angepassten Brechungsindex. Dadurch werden Wellenfrontdeformationen vermieden, wie diese ansonsten bei dem Übergang zwischen Glas und Luft auftreten würden. Zum anderen schützt das Einbettmedium gegen Photobleichen, da kein Sauerstoff in der Umgebung ist und Photobleichen häufig mit dem Auftreten von Sauerstoffradikalen zusammenhängt [14,87]. Nach dem Aushärten ist die Probe über einen langen Zeitraum stabil. Für die Bildgebung wird die Probe in den Probenhalter am Mikroskop eingebracht. Auf die Frontlinse wird ein Tropfen Immersionsöl mit Brechungsindex $n_{oil} = 1.518$ (Olympus) aufgebracht und in Kontakt zum Deckgläschen gebracht. Damit ist das System einsatzbereit für die Bildgebung.

3.4.3 Probe zur nichtlinearen Summenfrequenz-Anregung

Die Entwicklung der 2C2P-STED-Mikroskopie setzt eine genaue Charakterisierung des verwendeten STED-Lasers im Kurzpulsmodus voraus. Dies ist ein notwendiger Schritt, da üblicherweise zwei Laser mit ähnlicher Pulsdauer im Femtosekunden- bis niedrigen Pikosekundenbereich für die 2C2P-Anregung verwendet werden [88]. In dieser Arbeit wird allerdings eine neuartige Kombination aus Femtosekunden-Faserlaser sowie Pikosekunden-Diodenlaser für die nichtlineare Anregung eingesetzt, wobei die Pulsdauern bis zu drei Größenordnungen voneinander abweichen. Die Kenntnis über die zeitliche Pulsform des STED-Lasers und den Zeitpunkt der besten Anregung, ist daher entscheidend für eine effiziente nichtlineare Anregung. Die Emission des STED-Lasers ist auf den fs-Laser synchronisiert, wodurch aufeinanderfolgende Pulse beider Laser emittiert werden. Allerdings besteht zu Beginn ein unbekannter zeitlicher Abstand (Offset) zwischen der Emission des getriggerten STED-Lasers. Mit der Charakterisierung der nichtlinearen Anregung lässt sich auf einfache Weise der zeitliche Offset bestimmen. Dieser Offset ist statisch und verändert sich nicht, solange die optischen Wege oder die Signalwege der elektrischen Signale beibehalten werden. Sind der zeitliche Abstand sowie der Zeitpunkt der maximalen Anregung bekannt, können für die 2C2P-Anregung die Laserpulse mit dem oben beschriebenen LabView-Programm automatisch auf die entsprechenden Parameter für die zeitliche Synchronisierung über das Verzögerungsmodul angepasst werden. Um die nichtlineare Anregung zu charakterisieren, bietet sich prinzipiell die Vermessung einer zeitlichen Kreuzkorrelation zwischen dem Anregungspuls sowie dem Puls des STED-Lasers an. Hierzu wird der STED-Laser mit dem elektronischen Verzögerungsmodul schrittweise gegenüber dem Referenzpuls des fs-Lasers in 10 ps-Schritten verzögert und jeweils ein mikroskopisches Bild einer Probe aufgenommen. Der Intensitätsverlauf in Abhängigkeit der Zeitverzögerung entspricht dem Kreuzkorrelationssignal. Das Kreuzkorrelationssignal für einen Laserzyklus der Periodendauer T ergibt sich nach folgender Beziehung:

$$I_{Signal} = \int_0^T I_1(t) I_2(t - \Delta\tau) dt \quad (3.7)$$

Als Probe könnte eine mit Fluoreszenzfarbstoff markierte Struktur verwendet werden. Allerdings besteht für quantitative Auswertungen bei Fluoreszenzproben das Problem, dass diese über die Dauer der Messung mittels Photobleichen in der Signalintensität abnehmen. Des Weiteren besteht die Möglichkeit, dass die Fluorophore nach Anregung einen sog. „Intersystem Crossing“ (ISC), also einen elektronischen Übergang in einen Triplett-Zustand, vollziehen und damit mit wesentlich längeren Zeitkonstanten Strahlung emittieren [14, 87]. Für die Charakterisierung des STED-Lasers wird daher die Summenfrequenz-Anregung (*Sum Frequency Generation*, engl.) verwendet. Mit dieser Methode können zum Beispiel kristalline Strukturen als Probe eingesetzt werden, welche gegenüber Fluoreszenzfarbstoffen wesentlich photostabiler sind und in der Regel kein Photobleichen aufweisen. Ein weiterer Vorteil ist, dass aufgrund der Natur der SFG eine direkte Frequenzverdoppelung ohne einen STOKES-Shift stattfindet, da keine echte elektronische Anregung induziert wird, sondern eine Anregung in ein sog. virtuelles Niveau [89]. Das bedeutet, dass bei einer nichtlinearen

Anregung das entstehende Signal direkt bei λ_{2C2P} gemessen werden kann. Experimentell wird zu diesem Zweck der in Abbildung 3.2 gezeigte Detektor in Vorwärtsrichtung verwendet. Nicht jede Substanz ist für SFG geeignet. Die Polarisierbarkeit eines Moleküls ist, unter Berücksichtigung nichtlinearer Effekte in Abhängigkeit des elektrischen Feldes E , durch die folgende Taylorreihen-Entwicklung gegeben:

$$P(E) = \epsilon_0(\chi^{(1)}E + \chi^{(2)}E^2 + \chi^{(3)}E^3 + \dots) \quad (3.8)$$

ϵ_0 ist die elektrische Feldkonstante, χ beschreibt die Suszeptibilität der jeweiligen Ordnung und stellt eine materialspezifische Konstante dar. Der erste Term dieser Reihenentwicklung gibt die lineare Optik wieder. Mit zunehmenden Feldstärken nimmt die Wahrscheinlichkeit für eine nichtlineare Interaktion des Materials mit dem elektrischen Feld zu. Voraussetzung ist jedoch, dass die Suszeptibilität höherer Ordnung nicht verschwindet. Die nichtlineare Polarisation kann als eine anharmonische Oszillation des Moleküls verstanden werden. Aus einer Symmetrieüberlegung ergibt sich, dass der für SFG verantwortliche Term $\chi^{(2)}E^2$ nur dann nicht verschwindet, wenn es sich um nicht-zentrosymmetrische Materialien handelt [89]. Im Falle von Materialien mit einer Inversionssymmetrie sind alle Komponenten des Tensors $\chi^{(2)}$ null. Eine nichtlineare SFG ist somit nicht möglich.

Ein Material mit einer stark ausgeprägten Suszeptibilität $\chi^{(2)}$ ist Eisen(III)-Iodat mit der chemischen Summenformel $\text{Fe}(\text{IO}_3)_3$ [90]. Eine Abschätzung des Betrags der Suszeptibilität für dieses Material, kann über die Gitterkonstante d_a der kristallinen Struktur nach [91] berechnet werden:

$$\chi^{(2)} = \frac{2\pi^2\epsilon_0 d_a^2}{e} \quad (3.9)$$

Die Elementarladung ist mit e gegeben. Die Gitterkonstante beträgt für dieses Material $d_a = 0,95$ nm. Damit beträgt $\chi^{(2)} = 985 \cdot 10^{-12}$ m V⁻¹. Dieser Wert stellt einen für SFG aktive Moleküle sehr großen Wert dar. Generell ist bei nichtlinearen Effekten wie der Frequenzverdopplung auf eine Winkelabhängigkeit bzgl. der Orientierung der Kristallachse sowie dem einfallenden elektrischen Feld zu achten. Da es sich hier aber um ein Pulver aus Mikrokristallen handelt, ist das Material isotrop verteilt und weist Kristallorientierungen in alle Richtungen auf. Auf diese Art kann das Signal von ausreichend vielen Kristallen erzeugt werden. Ein weiterer Punkt liegt in der spektralen Abhängigkeit des Materials. In dieser Arbeit wird gezeigt, dass die Kombination aus den hier verwendeten Lasern innerhalb des spektralen Akzeptanzbereichs des Materials liegt und eine effiziente Anregung möglich ist. Die Verwendung einer pulverförmigen Probe gegenüber eines fest orientierten Kristalls, vereinfacht deren Einsatz für SFG deutlich.

Für die Präparation der Probe wird eine geringe Menge des kristallinen Pulvers auf ein Präzisionsdeckgläschen aufgebracht, welches auf einen Objektträger fixiert wird. Anschließend werden die Randbereiche des Deckgläschens mit Nagellack versiegelt. Da keine flüchtigen oder biologischen Materialien in dieser Probe verwendet werden, ist diese langzeitstabil und dient als Referenzprobe, um das Mikroskopsystem zu charakterisieren bzw. überprü-

fen. Für die Bildgebung wird die Probe in den Probenhalter unmittelbar über dem Objektiv aufgebracht. Das Vorgehen ist analog zu dem der Fluoreszenzproben.

3.4.4 *Streptococcus pneumoniae* TIGR4

In dieser Arbeit werden die Vorteile der Fluoreszenzmikroskopie und der supraauflösenden Mikroskopie über einen korrelativen Ansatz mittels nichtlinearer Anregung zusammengeführt. Um diese Methode zu demonstrieren und zu charakterisieren, wird ein Stamm des Gram-positiven Bakteriums *Streptococcus pneumoniae* TIGR4 untersucht. Im Speziellen werden die haarähnlichen und um die Zelle lokalisierten [38–40] Substrukturen Pilus Typ-1 untersucht. Zudem werden mit der Anwendung von 2C2P-STED neue Erkenntnisse des Pilus gewonnen, welche zur Strukturaufklärung dienen. *S. pneumoniae* gilt als ein Haupterreger für Lungenentzündungen und verursacht jährlich mehr als 500.000 Todesfälle unter nicht-HIV-infizierter Kinder unter 5 Jahren [92].

Pili sind Protein-basierte Oberflächenstrukturen und stellen einen Virulenzfaktor dar, wonach sie zur Adhäsion am Wirtsgewebe dienen und somit eine Infektion fördern [93]. Sie sind daher in der biomedizinischen- und in der Impfstoffforschung von großer Bedeutung. Der Gesamtorganismus des Bakteriums ist nur etwa 1 μm groß, wohingegen die Pili c.a. 6 nm im Durchmesser und eine Länge von bis zu 1,5 μm aufweisen [94]. Aufgrund dieser Dimension der Strukturen ist eine supraauflösende Analyse unerlässlich. Die Pili bestehen aus einem Komplex dreier verschiedener Proteine: RrgA, RrgB und RrgC. RrgA dient dabei als Adhäsionsprotein zwischen Bakterium und einer umgebenden Matrix. Das als Ankerprotein bezeichnete RrgC, stellt die Verbindung zwischen Pilus und der aus Peptidoglycan bestehenden Zellwand her. Die Aneinanderreihung mehrerer RrgB-Proteine bildet das Grundgerüst eines einzelnen Pilus. In dieser Arbeit wird mittels 2C2P-STED die Organisation der Pili, basierend auf Färbung der Protein-Untereinheit RrgB, gegenüber dem Zellkörper untersucht. Eine schematische Darstellung der Anordnung der Pili sowie des Aufbaus der Pili ist in Abbildung 3.14(a) bzw. (b) gezeigt. Die Gegenfärbung bietet das Zytoplasma der Zelle, welches mit ATTO425 gefärbt wird. Die Pili dagegen sind die Substruktur, welche mit Superauflösung untersucht werden und sind daher mit dem für STED geeigneten Fluorophor AlexaFluor594 markiert. Dazu wird eine hochspezifische Antikörper-Färbung verwendet. Bei dieser wird eine Kopplung durch einen auf das RrgB-Protein spezifischen primären Antikörper, und einem auf den primären Antikörper spezifischen, sekundären Antikörper, hergestellt. Der sekundäre Antikörper wiederum ist mit dem Fluorophor AlexaFluor594 gekoppelt. Mit dieser Methode besteht eine spezifische Färbung des Proteins durch den für STED verwendeten Fluoreszenzfarbstoff.

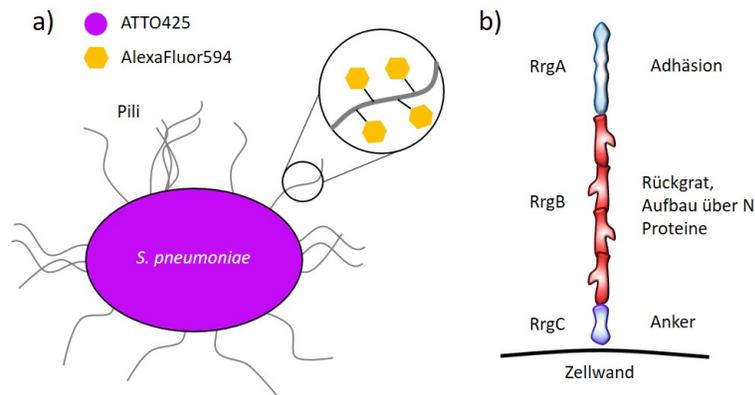


Abbildung 3.14: a) Die haarähnlichen Pili Typ-1 sind um die Zelle angeordnet und bilden Adhäsionspunkte für eine mögliche Infektion eines Wirts. Das Zytoplasma der Bakterien ist mit dem Farbstoff ATTO425 markiert. b) Ein einzelner Pilus ist aus dem Adhäsionsprotein RrgA, mehreren (N-fach) vorliegenden RrgB-Proteinen sowie einem Ankerprotein RrgC aufgebaut [94]. RrgB wird mit einem für das Protein spezifischen primären Antikörper in Kombination mit einem sekundären Antikörper markiert, an dem der Fluoreszenzfarbstoff AlexaFluor594 gebunden ist. Abbildung (b) in Anlehnung an [94].

Das Vorgehen der Präparation erfolgt wie in [95] beschrieben und wird in Zusammenarbeit mit Herrn Stefan Ness in einem S2-Labor für *Protein Biochemistry & Cellular Microbiology* der Hochschule München durchgeführt. Der Wildtyp des *Streptococcus pneumoniae* TIGR4 wird auf mit Blut ausgestrichenen Agar-Platten für weniger als 12 Stunden bei 37°C in einem Kerzenglas kultiviert. Im Kerzenglas wird mittels Anzünden einer Kerze und verschließen des Glases durch Verbrennung der Luftsauerstoff reduziert und damit die Konzentration von CO₂ erhöht. Dies ermöglicht ein besseres Wachstum der *S. pneumoniae*. Nachfolgend werden 5 ml Todd-Hewitt Medium (CarlRoth), versetzt mit 0,5% Hefeextrakt (THYE) mit einem Abstrich der Blutplatten geimpft. Ausgehend von einer optischen Dichte (OD) von 0,01 wachsen die Kulturen bei 37°C in Ruhelage zu einer Phase mit OD 0,1 - 0,2. Die Kulturen werden dann mit 15% Glycerol versetzt und bei -80°C für die Lagerung eingefroren. Für die Färbung werden 50 µl der Kultur nach Zugabe von 1 ml THYE für weitere drei Stunden in Ruhelage bei 37°C kultiviert. Die Suspension wird anschließend bei 3.200 g für 5 min und bei 4°C zentrifugiert und drei mal in je 1 ml Phosphat-gepufferter Salzlösung (PBS) gewaschen. Der Überstand wird jeweils abgenommen. Die aufgereinigten Zellen werden in 1 ml PBS gelöst und mit 3% Para-Formaldehyd fixiert. Anschließend findet nach oben beschriebener Prozedur ein weiterer Waschdurchgang mit PBS statt. Die Zellen werden ein weiteres Mal in 1 ml gelöst und mit einem Anti-Pilus Typ 1 Antikörper (α -RrgB) 1:500 Hasen-Serum für 45 min in Ruhelage und bei 37°C inkubiert. Anschließend erfolgen drei weitere Waschschrte nach obigem Vorgehen. Die Färbung findet schließlich durch Zugabe des Sekundärantikörpers statt. Dieser ist gegen Hase spezifisch und ist konjugiert mit AlexaFluor594 (ThermoFisher). Das Verhältnis der Zugabe beträgt 1 : 250.

Die Inkubation findet ohne Schütteln bei 37° für 45 min statt. Nach drei weiteren Waschschrritten mit PBS wird durch Zugabe von 10 μ l freien Farbstoffs ATTO425-meleamid (AttoTEC) die Gegenfärbung durchgeführt. Die Inkubation erfolgt für 30 min. Nach drei Waschdurchgängen und Lösung in 1 ml PBS, werden an mehreren Stellen je 2 μ l der Zellen auf ein 170 μ m Präzisionsdeckglas aufgebracht und an Luft für ca. 15 min getrocknet. Auf einem Objektträger wird ein Tropfen ProLong Diamond aufgebracht und das Deckglas samt der Zellen auf diesen Tropfen aufgebracht. Nach 24 Stunden ist das Einbettmedium ausgehärtet und bereit für die Bildgebung, welche zeitnah durchgeführt wird.

3.5 Justage der Laserstrahlen

In der STED-Mikroskopie hängt die Auflösung entscheidend von der Qualität der Laserstrahlüberlagerung sowie der Qualität des Intensitätsprofils des fokussierten STED-Lasers ab. Ebenso ist gerade für STED der zeitliche Abstand zwischen Anregungs- und Abregungspuls ein wesentlicher Parameter, welcher je nach optischen System und der verwendeten Laser variieren kann. In diesem Kapitel werden Methoden vorgestellt, welche zur räumlichen und zeitlichen Überlagerung der Laserstrahlen sowohl bei Verwendung des Laser-Scanners, aber auch des Proben-Scanners herangezogen werden. Ebenso werden Einflüsse wie Wellenfrontdeformationen auf die Qualität des Abregungsprofils sowie die Kompensation durch den SLM dargestellt.

3.5.1 Räumliche Überlagerung und Wellenfrontkorrektur der Laser

Eine Methode, um den STED-Laser räumlich auf die Anregungs-PSF zu justieren, besteht in der Verwendung von Goldnanopartikeln [96]. Dabei wird das über Oberflächen-Plasmonen-Resonanz (SPR, *Surface Plasmonic Resonance*, engl.) an den Goldpartikeln gestreute Licht der eingestrahlten Wellenlängen direkt detektiert. Da das spektrale Maximum der Rückstreuung proportional zur Größe der Nanopartikel ist, eignet sich diese Methode besonders bei Anregungswellenlängen im sichtbaren Bereich und der linearen Mikroskopie. Die maximale Rückstreuung findet zum Beispiel bei Partikeln mit einem Durchmesser von 100 nm bei ca. 550 nm statt. Bei Verwendung von Wellenlängen im NIR-Bereich wären entweder die Partikel sehr groß, so dass sie zur Charakterisierung der PSF ungeeignet wären. Ein 2P-Anregungsprozess mit SPR führt aufgrund der hohen notwendigen Intensitäten schnell zur Zerstörung der Nanopartikel. Des Weiteren müsste der optische Aufbau so gestaltet sein, dass ein Teil der Intensität des rückgestreuten Lichts von einem zur Scannerposition synchronisierten Detektor erfasst wird, was zu einem komplexeren optischen Aufbau führen würde. Aus diesen Gründen wird die räumliche Überlagerung fluoreszenzbasiert durchgeführt. Der nichtlineare Ansatz zeigt hier eine weitere Stärke: Die Justage erfolgt über eine 2P-Direktanregung mit den verwendeten Lasern. Dies hat den Vorteil, dass der optische Aufbau so verwendet wird, wie er später auch für die tatsächliche Bildgebung eingesetzt wird. Zum Zweck der Überlagerung wird der Fluoreszenzfarbstoff „Crimson“

(s. Abschnitt 3.4.1) in Kombination mit 200 nm Beads verwendet. Crimson eignet sich zur direkten 2P-Anregung sowohl mit dem 1034 nm fs-Laser als auch mit dem 775 nm STED-Laser, letzterer wird hierfür im Kurzpulsmodus betrieben. Dieser Vorgang ist schematisch anhand des Jablonski-Diagramms in Abbildung 3.15 gezeigt. Sollte ein Winkelversatz zwischen Anregungs- und STED-Laser bestehen, zeigt sich ein räumlicher Versatz in der Fokalebene des Objektivs. Zuerst wird eine visuelle Überlagerung beider Laserstrahlen im Freistrahl mittels zweier Blenden im Strahlengang vorgenommen. Anschließend werden die Crimson Beads unter Verwendung des Laser-Scanners mikroskopisch mit dem 2P-fs-Laser abgebildet. Der STED-Laser ist mit einer Vortex-Phase am SLM moduliert. Mathematisch gesehen ist die Bildgebung eine Faltung des Anregungsprofils mit dem Objekt. Ist das Objekt kleiner als die PSF, kann die Donut-förmige Intensitätsverteilung direkt abgebildet werden. Um die Überlagerung beider Laser durch Direktanregung zu überprüfen und einzustellen, wird je ein Bild aufgenommen, wobei immer nur ein Laser aktiv ist. Die Überlagerung der zwei generierten Bilder, zeigt die Lokalisation der beiden Fokalvolumina. Neben der räumlichen Überlagerung ist auch die Homogenität des Donut-förmigen Abre-

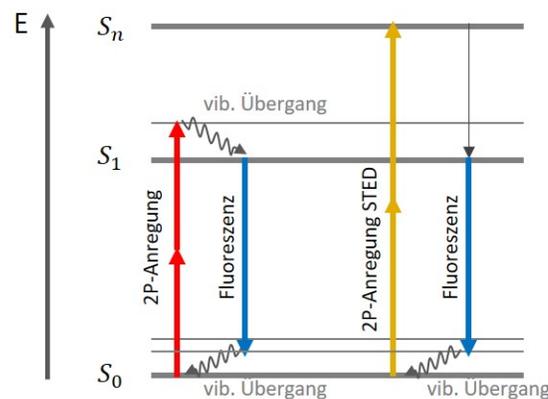


Abbildung 3.15: Vereinfachte Darstellung des Jablonski-Diagramms für die direkte 2P-Anregung durch den fs-Laser sowie durch den STED-Laser. Die 2P-Absorption durch den jeweiligen Laser führt zur Fluoreszenz und dient damit zur Überlagerung des Anregungsprofils und des Donut-förmigen STED-Profiles.

gungsprofils äußert kritisch für die erzielbare Auflösung. Diese hängt zum Beispiel von der Polarisation des STED-Lasers aber auch von eventuell vorliegenden Wellenfrontdeformationen ab. Um ein möglichst homogenes Donut-förmiges Intensitätsprofil zu erzeugen, wird der STED-Fokus mittels direkter 2P-Anregung von Crimson Nanobeads mikroskopisch dargestellt. Besteht eine Deformation der STED-Laserwellenfront, könnten sich Inhomogenitäten im Fokus ausbilden. Eine unerwünschte Deformation kann zum Beispiel durch eine gebogene, nicht vollständig planare Spiegelfläche im optischen Aufbau entstehen. Der Laserstrahl durchläuft eine Vielzahl optischer Elemente oder wird an ihnen reflektiert. Eine einfache Methode etwaige Wellenfrontfehler zu kompensieren, besteht in der Überlagerung der Vortex-Phase mit einer Kompensationsphase, welche den akkumulierten Wellenfrontfehlern

kompensiert. Experimentell wird Kompensationsphase entsprechend der auftretenden Aberration additiv mit der Vortex-Phase am SLM überlagert. Dies erfolgt durch pixelweise Addition des Graustufen-Bildes der Vortice-Phase mit einer ortsabhängigen Phasenkorrektur. Die Überlagerung ergibt dann die kompensierte Vortex-Phase. Zur Bilderzeugung der Kompensationsphase wird nach Addition bei einem Grauwert 255 hinaus wieder von 0 begonnen. Das bedeutet, dass ein Phasenverzug von mehr als 2π nach der additiven Überlagerung wieder mit einem Phasenverzug von 0 beginnt. Dieses Vorgehen ist in Abbildung 3.16 am Beispiel einer astigmatischen Wellenfrontdeformation dargestellt. Die Stärke der Kompensation kann zum Beispiel über den Radius des entsprechenden Wellenfrontfehlers oder der maximalen Amplitude, also den maximalen Phasenverzug, eingestellt werden. Um die richtige Phase zu finden, wird ein mikroskopisches Bild des STED-Intensitätsprofils aufgenommen. Nachfolgend wird aufgrund des Bildes eine Wellenfrontdeformation entsprechend der Zernike-Polynome (vgl. Abschnitt 2.4) geschätzt und eine Kompensationsphase auf den SLM dargestellt. Tritt eine Verbesserung ein, wird die Phase belassen, andernfalls findet eine weitere Iteration statt.

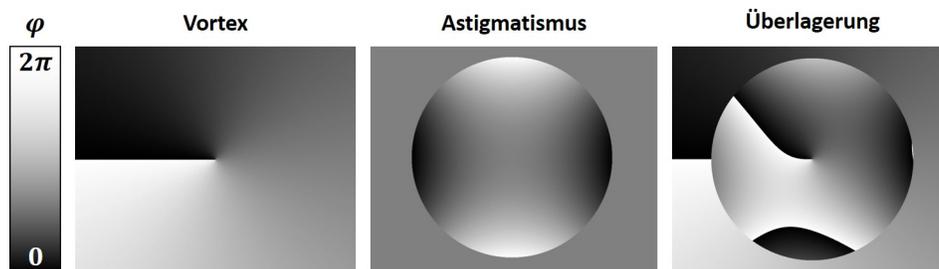


Abbildung 3.16: Graustufenbilder zur Phasenmodulation durch den SLM. Ein Grauwert von 0 (schwarz) entspricht einer Phasenmodulation von 0 rad, ein Grauwert von 255 (weiß) entspricht einer Phasenmodulation von 2π rad. Für STED wird ein Vortex verwendet. Zur Wellenfrontkorrektur kann zudem das Phasenprofil zum Beispiel eines Astigmatismus angewendet werden. Die Kompensation entsteht durch Überlagerung des Vortices mit dem astigmatischen Phasenprofil und wird als überlagertes Bild auf dem SLM dargestellt.

3.5.2 Zeitliche Überlagerung

Der STED-Prozess unterliegt aufgrund der unterschiedlichen Zeitkonstanten einer für jeden Fluorophor spezifischen Zeitdynamik. Ebenso findet die stimulierte Abregung je nach verwendeten Lasersystem, bei einem bestimmten Zeitversatz $\Delta\tau$ zwischen Anregungs- und Abregungspuls mehr oder weniger effizient statt. Für die zeitliche Synchronisation beider Pulse wird ein elektronischer Zeitverzögerer verwendet, welcher das vom fs-Laser bereitgestellte Triggersignal um frei einstellbaren Wert verzögert. Die maximale Zeitauflösung beträgt 10 ps. Dies ist ausreichend, da der STED-Laser im Langpulsmodus eine Pulsbreite von $\Delta\tau_{P,2} = 538$ ps besitzt. Wird das optische System neu aufgebaut, muss zuerst der

zeitliche Offset, welcher sich durch die Laserelektronik oder die Kabellänge der Verbindungskabel ergibt, herausgefunden werden. Dazu wird eine schnelle Photodiode (DET10A, Thorlabs) verwendet. Diese Photodiode hat eine Anstiegszeit von 1 ns und ist damit in Relation zum Pulsabstand zweier Anregungs-Laserpulse von 12,5 ns schnell genug. Ein Teilstrahl des fs-Lasers trifft auf eine weitere Photodiode und bildet das Referenzsignal für folgende Messung: Der fs-Laserstrahl und der STED-Laserstrahl treffen abwechselnd auf die Messdiode, wobei die jeweiligen Zeitpunkte in Relation zum Referenzsignal gemessen werden. Die Differenz der Auftreffzeitpunkte ergibt den zeitlichen Abstand beider Pulse zueinander. Mit Hilfe des Verzögerungsmoduls wird ein Wert eingestellt, so dass die Pulse nun zeitgleich auf die Photodiode treffen. Damit ist eine grobe zeitliche Abstimmung erfolgt. Zur exakten Abstimmung und zur Identifikation des Optimums der zeitlichen Abregung, wird eine Messung im Mikroskop vorgenommen.

Die Photodynamik des STED-Prozesses wird in Abhängigkeit des Zeitversatzes zwischen beiden Pulsen gemessen. Dazu wird eine über die gesamte Wellenfront neutrale Phasenmodulation des STED-Lasers am SLM durchgeführt, so dass auch der STED-Laser nach Fokussierung ein homogenes, beugungsbegrenztes Intensitätsprofil aufweist. Sind der Anregungs- und der STED-Lasers räumlich und zeitlich überlagert, induziert der STED-Laser eine stimulierte Abregung des gesamten Fokalvolumens. Die in Bezug auf den Pulsabstand gemessene Fluoreszenzintensität ergibt die Zeitabhängigkeit zwischen An- und Abregung. In Abbildung 3.17 ist das Vorgehen schematisch dargestellt. Läuft der STED-

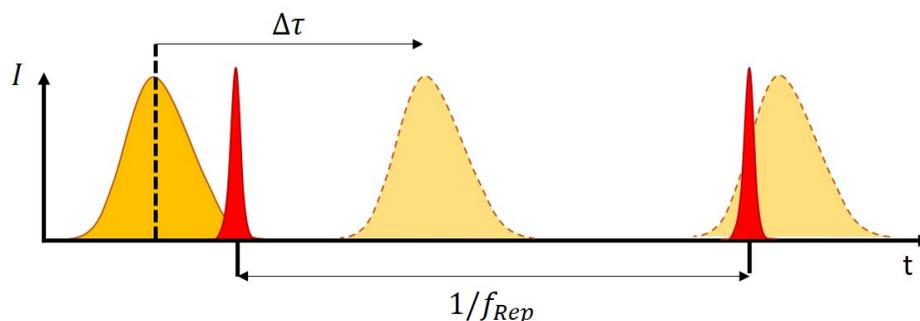


Abbildung 3.17: Prinzip der zeitliche Überlagerung des Anregungs-Laserpulses (rot) mit dem STED-Laserpuls. Der STED-Laserpuls (orange) wird elektronisch zeitlich gegenüber dem Anregungs-Laserpuls des fs-Lasers verschoben und das Fluoreszenzsignal eines geeigneten Fluorophors aufgenommen.

Puls der Anregung vor, gibt es keine bzw. kaum stimulierte Abregung. Trifft der STED-Puls unmittelbar nach der Anregung auf die Probe, beginnt die stimulierte Abregung einzutreten. Ab einem bestimmten Pulsabstand ist die stimulierte Abregung maximal. Mit weiter zunehmendem Pulsabstand beginnt die stimulierte Abregung wieder abzunehmen. Der zeitliche Pulsabstand wird in 50 ps-Schritten variiert, wobei nach jeder Änderung ein mikroskopisches Bild der Beads aufgenommen wird. Nach einer Periode

$T = 1/f_{Rep} = 1/(79,78 \text{ MHz}) = 12,53 \text{ ns}$ beginnt der Prozess von vorne. Die Fluoreszenzintensität wird anschließend in einem Bereich mit Beads anhand der Bilder über die jeweiligen Zeitschritte ausgewertet und liefert den zeitabhängigen Verlauf der spontanen Fluoreszenz. Mit der Kenntnis des Pulsabstandes $\Delta\tau$ für die optimale Abregung kann die Leistung des STED-Lasers auf ein Minimum reduziert werden.

Die hier erläuterten Methoden der räumlichen und zeitlichen Überlagerung sowie die Anpassung der Wellenfront des STED-Lasers erlauben möglichst ideale Bedingungen für die STED-Bildgebung. Sie sind allerdings auch notwendige Voraussetzungen, um eine möglichst hohe Auflösungsverbesserung zu erzielen. Während die räumliche Überlagerung einmal täglich vor Messbeginn überprüft werden muss, ist die zeitliche Überlagerung über einen längeren Zeitraum stabil.

Kapitel 4

Ergebnisse und Diskussion

Der neue nichtlineare Ansatz für die STED-Mikroskopie erfordert die Untersuchung sowohl der Anregungs- und Abregungsprozesse als auch der Anwendung an biologischen Fragestellungen. In diesem Kapitel sind die Ergebnisse der numerischen Simulationen sowie der experimentellen Charakterisierung gezeigt. Hierzu werden die räumlichen Intensitätsverteilungen der 2C2P-Anregung und von 2P-STED sowie die Abhängigkeit der Polarisierung auf die jeweiligen Punktspreizfunktionen analysiert. Bei 2C2P-STED besteht ein großer Vorteil darin, dass aufgrund der 2C2P-Anregung eine intrinsische Korrelation zwischen einer Gegenfärbung sowie einer Substruktur besteht. Die Lokalisationspräzision der nichtlinearen Anregung wird in diesem Kapitel über das effektive Anregungsvolumen simuliert und bewertet. Für die räumliche und zeitliche Überlagerung der Laser sowie zur Wellenfrontkorrektur werden die entwickelten Justagemethoden angewendet und auf deren Resultate hin untersucht. Die Dynamik des STED-Prozesses wird experimentell und numerisch analysiert. Aus dem Verlauf der Fluoreszenzintensität in Abhängigkeit des zeitlichen Abstandes zwischen fs- und STED-Laserpuls wird ein Optimum für die stimulierte Abregung gefunden. Es wird gezeigt, dass mit dem im Abschnitt 2.5 beschriebenen Ratengleichungsmodell aus den Messdaten molekülspezifische Parameter des Fluorophors bestimmt werden können. Ein wesentlicher Bestandteil von 2C2P-STED liegt darin, dass nur die Kombination beider Laser eine 2C2P-Anregung induziert. Daher wird eine ausführliche experimentelle Untersuchung der nichtlinearen Anregung an Referenz- und Fluoreszenzproben durchgeführt. Schließlich wird die Methode der 2C2P-STED-Mikroskopie an *Streptococcus pneumoniae* TIGR4 Pilus Typ-1 angewendet.

4.1 Numerische Simulationen

Die Möglichkeit der numerischen Simulation erlaubt eine schnelle Analyse komplexer Sachverhalte ohne aufwendige Experimente durchführen zu müssen. In der nichtlinearen, aber auch in der STED-Mikroskopie gibt es viele Einflussparameter, welche eine direkte Auswirkung auf die Qualität und Aussagekraft der Bildgebung haben. So hängt die Homogenität der Intensitätsprofile der nichtlinearen Anregung, aber auch der Abregung, wesentlich von

der Polarisierung der einfallenden Laserstrahlen ab. Aufgrund der Wellenlängenabhängigkeit der Auflösung korreliert die Wahl der kombinierten Wellenlängen für 2C2P unmittelbar mit der maximal zu erzielenden Auflösung bezüglich der Gegenfärbung. Nachfolgend wird der Einfluss des Polarisationszustandes auf die nichtlineare Anregung mittels numerischer Simulation analysiert. Die Lokalisationspräzision der 2C2P-Anregung wird durch Berechnung einer gezielten räumlichen Abweichung beider Laser zueinander charakterisiert.

4.1.1 Polarisationsabhängigkeit der nichtlinearen Anregung

Wird in der STED-Mikroskopie eine Phasenmaske für die Erzeugung des Abregungsprofils verwendet, ist die exakte Kontrolle der Polarisation eine notwendige Voraussetzung, um eine für STED geeignete Intensitätsverteilung zu erzielen. Es zeigt sich, dass im Falle der Vortex-Phasenmaske eine zirkulare Polarisation des STED-Lasers vor Eintritt in das Objektiv erzeugt werden muss, da sonst kein Intensitätsminimum im Zentrum der donutförmigen Intensitätsverteilung vorliegt und auch die Intensität im Ring nicht homogen verteilt ist. Eine gute Übersicht über die Auswirkung zirkularer und linearer Polarisation auf eine Vortex- und eine π -Phasenmodulation findet sich in [66]. Aufgrund dieser Ergebnisse wird bei der Abregung mit dem STED-Laser in dieser Arbeit eine zirkulare Polarisation verwendet. Diese wird über die im optischen Aufbau befindliche Kombination der $\lambda/2$ - und $\lambda/4$ -Wellenplatte so eingestellt, dass eine ideale donutförmige Intensitätsverteilung vorliegt. Die Kombination beider Wellenplatten erlaubt die Einstellung einer beliebigen Polarisation und dient vor allem dazu, mögliche Depolarisationen an dichroitischen Spiegeln oder Linsen zu kompensieren. In der 2C2P-Anregung hingegen interagieren zwei unterschiedliche Laserpulse direkt miteinander. Daher werden die resultierenden Intensitätsverteilungen der fokussierten Laser und die Interaktion beider Laser für verschiedene Polarisationszustände untersucht. Hierzu werden mit dem in Abschnitt 2.4 beschriebenen Modell die Feldverteilungen der fokussierten Laserstrahlung mit Variation der Polarisationszustände der jeweiligen Laser berechnet. Hierzu wird zwischen links- und rechtszirkular polarisiertes Licht (LCP bzw. RCP) sowie linear horizontal und linear vertikal polarisiertes Licht (LHP, LVP) variiert und die Polarisierungen teilweise gekreuzt. Aus den resultierenden Feldern werden die Intensitätsverteilungen für die jeweilige Wellenlänge berechnet. Die effektive Intensitätsverteilung der 2C2P-Anregung ergibt sich nach Gleichung 2.39. Mit dieser Methode der 2C2P-Berechnung werden die Phasenlage der jeweiligen Felder und damit mögliche Interferenzeffekte miteinbezogen. Generell muss aber noch darauf geachtet werden, dass für die Effizienz auch die Orientierung des molekularen Übergangsdipolmoments eine Rolle spielt. Diese kann hier vernachlässigt werden, da nur die resultierende Punktspreizfunktion von Interesse ist. Soll die Analyse für eine bestimmte molekulare Orientierung erfolgen, muss diese berücksichtigt werden. In der Arbeit von Artigas et al. [97], ist die Molekülorientierung in Bezug auf die einfallende Polarisation entscheidend. Es zeigt sich, dass die Anregung mittels anisotroper Polarisation von in einer Richtung ausgerichteten Fluorophoren einen Kontrast unterhalb der Beugungsgrenze ermöglicht. Dieser Zusammenhang wurde von dem Verfasser der vorliegenden Arbeit erstmals beobachtet und konnte auch in eigenen Experimenten an neuronalen Strukturen des Fadenwurms *Caenorhabditis ele-*

gans erstmals gezeigt werden. Die oben beschriebenen und alle nachfolgenden Simulationen werden mit den in Tabelle 4.1 aufgeführten Simulationsparametern durchgeführt. Die verwendeten Simulationsparameter entsprechen der im optischen Aufbau verwendeten Laser, Optiken oder Komponenten. Die Ergebnisse beziehen sich daher auf das in dieser Arbeit verwendete System. Die erste Berechnung der Intensitätsverteilung erfolgt unter Annahme, dass beide Laser gleichermaßen linkszirkular polarisiert sind. Die Ergebnisse der Intensitätsverteilung für die Laser mit λ_1 sowie für λ_2 sind in Abbildung 4.1 unter LCP/LCP gezeigt. Im jeweiligen Fokusbild sind links oben die relativ zu verstehenden, aber untereinander vergleichbaren maximalen Intensitäten für beide Foki gezeigt. Die maximalen Intensitäten ergeben sich aus den jeweiligen resultierenden Amplituden der elektrischen Felder. Die Darstellung ist auf die maximale Intensität zur besseren Sichtbarkeit normiert. In der rechten Spalte ist das Ergebnis für die 2C2P-Anregung nach Gleichung 2.39 gezeigt. Die volle Halbwertsbreite (FWHM, *Full Width at Half Maximum*, engl.) für 1034 nm ist $\text{FWHM} = 377$ nm. Zu beachten ist, dass dieser Wert für eine 1P-Anregung gilt. Für die 2P-Anregung muss die Intensitätsverteilung entsprechend Gleichung 2.37 quadriert werden, wodurch sich eine Breite von $\text{FWHM} = 274$ nm ergibt. Für Laser 2 mit $\lambda_2 = 775$ nm ergibt sich eine 1P-Intensitätsverteilung von $\text{FWHM} = 283$ nm und im Falle einer 2P-Anregung $\text{FWHM} = 205$ nm. Beide Foki zeigen eine homogene, azimuthal isotrope Intensitätsverteilung. Die maximalen Intensitäten liegen in der gleichen Größenordnung. Der kleinere Fokussdurchmesser für λ_2 ergibt sich aus der Wellenlängenabhängigkeit der maximalen Fokussierbarkeit.

Tabelle 4.1: Übersicht der verwendeten Simulationsparameter für die Berechnung der Intensitätsverteilung der 2C2P-Anregung und 2P-STED.

Bezeichnung	Symbol	Wert
Wellenlänge fs-Laser	λ_1	1034 nm
Wellenlänge STED-Laser	λ_2	775 nm
Objektivausleuchtung	γ	0,5
Brennweite Objektiv	f	2 mm
Numerische Apertur	NA	1.49
Brechungsindex (Material)	n	1.5175
Winkel maximaler Fokussierung	α	79.07°

Die 2C2P-Anregung ergibt sich durch Superposition der jeweiligen 1P-Feldverteilung unter Berücksichtigung der ortsabhängigen Phasenlage. Die resultierende PSF zeigt eine ebenso zirkulare und homogene Intensitätsverteilung. Die maximale Intensität liegt aufgrund der nichtlinearen Anregung weit über der 1P-Foki von Laser 1 oder 2. Dies spricht für eine

effiziente Anregungsgeometrie. Ebenso ist die Eignung für die hochauflösende Mikroskopie aufgrund der isotropen Ausprägung der PSF gegeben. Werden zwei fokussierte Laserstrahlen der unterschiedlichen Wellenlänge mit antizyklischer Polarisierung, also Laser 1 linkszirkular und Laser 2 rechtszirkular polarisiert, im Fokus überlagert (LCP/RCP in Abb. 4.1), findet gegenüber gleichphasigem Polarisationszustand eine geringere Anregung statt. Dies ist an der maximale Intensität von $6,53 \cdot 10^{15}$ zu erkennen. Gegenüber LCP/LCP liegt die maximale Amplitude um ca. das 4-Fache darunter. Ebenso zeigt sich ein anisotropes Anregungsvolumen mit einer entlang der y -Achse elongierten Intensitätsverteilung. Das resultiert daher, dass die Superposition zweier antizyklisch zirkular polarisierter Wellen einer linear polarisierten Welle entspricht, in diesem Fall vergleichbar mit einer vertikal polarisierten Welle. Die Verteilung weist eine räumliche Ausdehnung entlang der x -Richtung von $\text{FWHM} = 211$ nm und in der y -Richtung von $\text{FWHM} = 243$ nm auf. Damit ist entlang der langen Achse eine 1,15-fach größere Halbwertsbreite gegeben. Die FWHM ist im Falle der antizyklischen Überlagerung entlang der x -Richtung nur unwesentlich kleiner gegenüber der phasengleichen Überlagerung ($\text{FWHM}_{LCP} = 215$ nm und $\text{FWHM}_{LCP/RCP,x} = 211$ nm).

In Abbildung 4.1 LVP sind die elektrischen Felder als linear vertikal polarisiert modelliert (vgl. Gleichung 2.33). Die Punktspreizfunktion im Falle vertikal polarisierten Lichts zeigt für die jeweiligen Wellenlängen eine in y -Richtung elongierte Intensitätsverteilung. Die berechnete 2C2P-PSF ist demzufolge ebenfalls eine in vertikaler Richtung elongierte Intensitätsverteilung. Die maximale Amplitude bei 2C2P liegt um 8 Größenordnungen über der jeweiligen 1P-PSF. Dies zeigt eine konstruktive Anregung innerhalb des für 2C2P resultierenden Anregungsvolumens. Werden beide Anregungslaser mit gekreuzter Polarisierung überlagert, entsprechend der Kombination von linear horizontal und linear vertikal polarisierter elektrischer Felder (Abb. 4.1 LHP/LVP), entsteht nach dem Prinzip der Superposition eine unter 45° orientierte und elliptische Intensitätsverteilung. Die Anregungseffizienz liegt in der Größenordnung für gleichermaßen linear polarisiertes Licht, allerdings um ca. das 4-fache darunter. Dies liegt im Falle LHP/LVP daran, dass nur die jeweiligen Teilkomponenten E_x bzw. E_y miteinander interagieren können und somit zur Anregung beitragen. Die Projektion der elektrischen Felder auf 45° ergibt eine Amplitude, welche gegenüber dem linearen Fall um $\sqrt{2}$ geringer ist. Die Berechnung der 2C2P-Anregung durch Quadrierung des elektrischen Feldes sowie einer weiteren Quadrierung der resultierenden Intensität, ergibt damit eine Reduktion um das 4-fache. Anhand dieser Berechnungen zeigt sich, dass für die 2C2P-Anregung die Kombination zweier gleichermaßen zirkular polarisierter Laser entscheidend ist. Dies führt sowohl zu einer effizienten, aber auch zu einer isotropen 2C2P-Anregung. Bei gleichphasiger, zirkularer Anregung mit diesen Wellenlängen tritt eine konstruktive Verstärkung des Feldes auf. Die Halbwertsbreiten der linearen Überlagerungen sind nahezu identisch wie für die Kombination aus antizyklischer Anregung (LCP/RCP). Wie bereits in [97] für eine Wellenlänge demonstriert, kann das Konzept der Bildgebung mit einem Kontrast unterhalb der Beugungsgrenze auf die 2C2P-Anregung, unter Berücksichtigung der in Abbildung 4.1 gezeigten Ergebnisse erweitert werden.

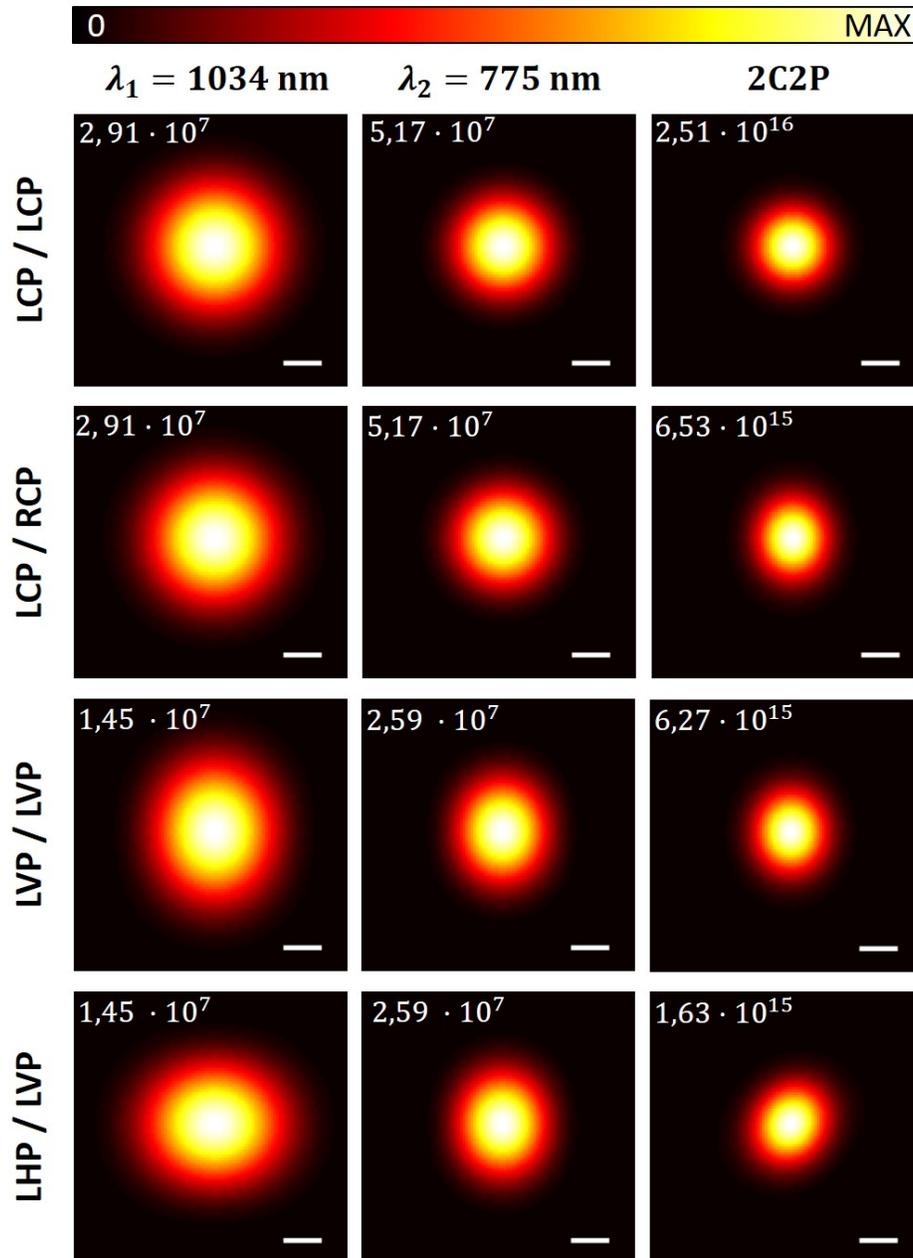


Abbildung 4.1: Normierte laterale (XY-Ebene) Intensitätsverteilungen der fokussierten Laserstrahlung für 1034 nm, 775 nm sowie für die resultierende 2C2P-Anregung in Abhängigkeit der Polarisation des jeweiligen elektrischen Feldes. LCP: Linkszirkular polarisiert, RCP: Rechtszirkular polarisiert, LVP: Linear vertikal polarisiert, LHP: Linear horizontal polarisiert. Die jeweils maximale, relative Intensität ist in den Fokusbildern links oben gezeigt. Skalierung: 140 nm.

Hierzu reicht es aus, nur die Polarisation eines der beiden Laser zu drehen und die Polarisation des anderen bestehen zu lassen. Die relative Intensitätsänderung liefert die gewünschten Informationen. Eine gezielte Depolarisation kann in der STED-Mikroskopie ausgenutzt werden. Ein linearer Polarisationszustand einer Vortex-modulierten Wellenfront führt zum Zusammenbruch des Donut-förmigen Intensitätsprofils und gleicht einer konventionellen PSF. Dieses Profil wird für eine zweite, vollständige Abregung verwendet. Damit kann durch vollständige Unterdrückung des Fluoreszenzsignals eine nahezu untergrundfreie Bildgebung erzielt werden [98]. Die genaue Kenntnis über den Laserpolarisationszustand sowie die Analyse über die Auswirkung auf die PSF ist entscheidend für eine effiziente Anregung sowie für die Bewertung der Bilder. Mit diesen hier gewonnenen Resultaten sowie der hier vorgestellten Methode sind detaillierte Analysen mit Variation verschiedener Freiheitsgrade möglich.

4.1.2 Zweifarben-Zweiphotonen STED-Mikroskopie

Wie im vorangegangenen Abschnitt gezeigt, ist eine zirkulare Polarisation gleicher Orientierung beider Laser Voraussetzung für eine effiziente und isotrope 2C2P-Anregung. Ebenso ist die zirkulare Polarisation für den mit einer Vortex-phasenmodulierten Wellenfront wichtig, um eine möglichst gutes Donut-förmiges Intensitätsprofil zu erhalten. In 2C2P-STED wird eine mikroskopische Aufnahme beugungsbegrenzter Auflösung mit einer supraauflösten Aufnahme mittels nichtlinearen Anregung korreliert. Eine entscheidende Frage ist, welche Auflösungen mit den unterschiedlichen Methoden erzielt werden können. Hierzu werden die Intensitätsprofile sowohl für die 2C2P-Anregung als auch für 2P-STED berechnet. Dabei wird für die 2C2P-Anregung eine linkszirkulare Polarisation beider Laser entsprechend Abbildung 4.1 LCP/LCP angenommen. Für 2P-STED wird der zusätzliche Phasenterm $\Delta\Gamma(\theta, \phi)$ in Gleichung 2.14 der Vortex-Phase (vgl. Abschnitt 2.4.2) mit $\Delta\Gamma(\theta, \phi) = \phi$ eingebracht. Dies führt zu einem Donut-förmigen Intensitätsprofil im Fokus. In Abbildung 4.2 sind die effektiven Intensitätsverteilungen für die laterale x, y -Ebene des Fokus dargestellt. Die Auflösung für eine 2C2P-Anregung beträgt unter Berücksichtigung der in Tabelle 4.1 aufgeführten Parameter $\text{FWHM} = 215$ nm. In 2P-STED muss zuerst die 2P-Anregungs-PSF betrachtet werden. Diese ergibt sich aus Quadrierung der korrespondierenden 1P-Intensitätsverteilung für 1034 nm. Die Halbwertsbreite beträgt in diesem Fall 274 nm (Abb. 4.2 2P-STED). Da die PSF bei 2P-STED durch stimulierte Emission des Bereichs zirkular um das Zentrum der 2P-Anregungs-PSF erzeugt wird, ist die resultierende PSF schmaler gegenüber der ursprünglichen Anregung. Wie stark die Einschnürung ist, hängt von der STED-Laserleistung gegenüber der Anregung ab. Daher kann keine allgemeine Aussage über die resultierende PSF getroffen werden. Das Donut-förmige Profil zeigt eine Halbwertsbreite bezüglich der äußeren Flanken von 682 nm. Aus geometrischer Sicht wird mit dieser Methode eine Auflösung von mindestens 150 nm erreicht, sie ist aber prinzipiell nicht limitiert [57]. Um dies zu verdeutlichen, ist die effektive PSF in 2P-STED für verschiedene STED-Laserleistungen 2-, 4-, 8- und 16-fach gegenüber der 2P-Anregung berechnet. Die resultierenden Halbwertsbreiten betragen $\text{FWHM} = 107$ nm, 76 nm, 54 nm und 38 nm. Dieser Verlauf folgt der für STED definierten Auflösung in Abhängigkeit der

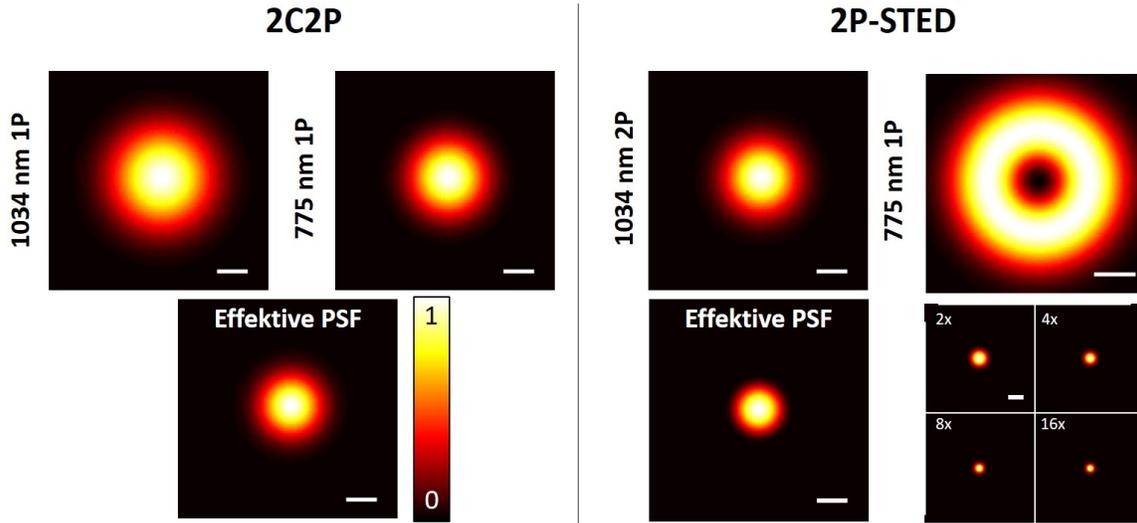


Abbildung 4.2: Simulierte Punktspreizfunktionen für die 2C2P-Anregung (links) und für 2P-STED (rechts). Mit der effektiven PSF wird mit 2C2P eine Auflösung von ca. 215 nm erzielt. Bei 2P-STED wird das 2P-Anregungsprofil bei 1034 nm (FWHM = 274 nm) mit dem Donut-förmigen STED-Profil der Wellenlänge 775 nm überlagert. Der Donut zeigt in Bezug auf die äußeren Flanken eine Breite von FWHM = 682 nm. Die Auflösung bei STED skaliert mit der STED-Laserleistung. Die effektive PSF ist für 2-, 4-, 8- und 16-Fach gesteigerte STED-Leistungen gegenüber der normierten Intensität (775 nm 1P) gezeigt. Skalierung: 140 nm.

STED-Laserintensität im Fokus nach [25]:

$$d = \frac{\lambda}{2NA\sqrt{1 + \left(\frac{I_{STED}}{I_{Sat}}\right)}} \quad (4.1)$$

Die Sättigungsintensität I_{Sat} ist entsprechend Gleichung 2.50 definiert. Aus dieser Gleichung ergibt sich auch, dass die Auflösung mit zunehmender STED-Intensität I_{STED} prinzipiell unendlich groß werden kann und damit sehr kleine Abstände d zweier Objekte aufgelöst werden können. Dies ist in der Praxis jedoch nicht realisierbar. Gerade in biologischen Anwendungen sind Limitierungen aufgrund von Photobleichen oder lichtinduzierter Zerstörung gegeben. Jedoch wurden an Stickstoff-Fehlstellen in Diamantstrukturen Auflösungen von 5.8 nm gezeigt [26]. In biologischen Proben ist eine Auflösung von mehr als 50 nm zu erreichen, was allerdings von der Beschaffenheit der Probe aber auch von den verwendeten Lasern und der Fluorophore abhängt.

Aus den Simulationen ergibt sich, dass eine Auflösungskombination in 2C2P-STED im Bereich von 215 nm und sub-150 nm erreicht werden kann. Dies stellt für viele Anwendungen in der biomedizinischen Forschung eine sehr gute Kombination an Bildgebungsmethoden dar, um in der Virus- oder Proteinforschung eingesetzt werden zu können.

4.1.3 Lokalisationspräzision der nichtlinearen Anregung

Die 2C2P-Anregung findet nur statt, wenn beide Laserfoki übereinanderliegen. Eine mögliche fehlerhafte oder mangelhafte Überlagerung des fs-Laser mit dem STED-Laser zeigt sich in einer sofortigen Signaldegeneration der Gegenfärbung. Damit ist sichergestellt, dass nur im Falle einer ausreichend guten räumlichen Überlagerung der beiden Laser eine Anregung stattfindet. Dies vereinfacht zum einen die Laser-Justage, verbessert aber auch die räumliche Korrelation der Ergebnisse. Um zu untersuchen, wie sich das effektive Anregungsvolumen bei 2C2P im Falle einer fehlerhaften Überlagerung verhält, wird das Anregungsvolumen mit einer schrittweise, gezielt eingebrachten, räumlichen Abweichung des 1034 nm und 775 nm-Lasers simuliert.

Eine Methode, den gezielten Ortsversatz zu simulieren besteht in der Verwendung von Gleichung 2.14 unter Berücksichtigung einer Wellenfrontdeformation $A_{ab}(\theta, \phi)$. Eine Verkippung der einfallenden Wellenfront führt zu einem Ortsversatz in der Fokusebene. Wird also für die Aberration eine Verkippung, i.e. ein Tilt, angenommen, kann über Variation der Stärke der Verkippung $A_{tilt}(\theta, \phi)$ ein unterschiedlich starker Ortsversatz im Fokus eingebracht werden. Der Ausdruck hierfür ist in Gleichung 2.18 gegeben. Die Stärke der Verkippung beträgt in dieser Simulation zwischen $-\pi$ und π . Abbildung 4.3(a) zeigt die Intensitätsprofile für den fokussierten 1034 nm-Laser, welcher für die Berechnung konstant im Zentrum gehalten wird. Die fokussierte 775 nm Intensitätsverteilung (orange) zeigt einen unterschiedlichen Versatz entlang der x -Achse. Dies ist in Abb. 4.3(a) exemplarisch für drei verschiedene Situationen dargestellt. Links besteht nur ein geringer Überlapp zwischen beiden Lasern. Die resultierende Anregung berechnet sich nach Gleichung 2.39. Daraus folgt nur eine schwache Anregung, wie sich in der Kurvenschar der Linienprofile entlang der x -Achse (Abb. 4.3(b)) zeigt. Wird der Überlapp mit zunehmender Verschiebung des 775 nm-Fokus größer, nimmt auch die 2C2P-Anregung zu, bis sie mit bestmöglichem Überlapp maximal wird. Bewegt sich der Fokus weiter entlang in die positive x -Richtung, nimmt die 2C2P-Anregung aufgrund der Symmetrie in gleichem Maße zum vorherigen Anstieg ab. Die Auswertung der Maxima der Linienprofile für jeden Versatz ergibt einen Gauss-förmigen Verlauf mit der Halbwertsbreite $\text{FWHM} = 276$ nm (Abbildung 4.3(c)).

Die Differenz der gesamten Breite gegenüber der Halbwertsbreite des perfekten Überlapps mit $\text{FWHM} = 215$ nm beträgt 61 nm. Damit ergibt sich aus der Simulation, dass die Überlagerung beider Laser für die 2C2P-Anregung in jedem Fall in einem Bereich von $\pm 30,5$ nm gegenüber des perfekten Überlapps liegt, da sonst kein Signal mehr zu detektieren wäre. Eine besondere Erkenntnis aus diesen Simulationen liegt darin, dass der maximale Bereich der 2C2P-Anregung immer von dem Donut-förmigen Intensitätsprofil, mit der Breite 682 nm, überdeckt wird. Das bedeutet, dass auch bei nicht perfektem Überlapp die STED-Bildgebung um die resultierende 2C2P-Anregungs-PSF zentriert ist und keine Verschlechterung der Auflösung zu erwarten ist. Damit ist die Methode für korrelative- bzw. Kolokalisationsmessungen ausgezeichnet geeignet.

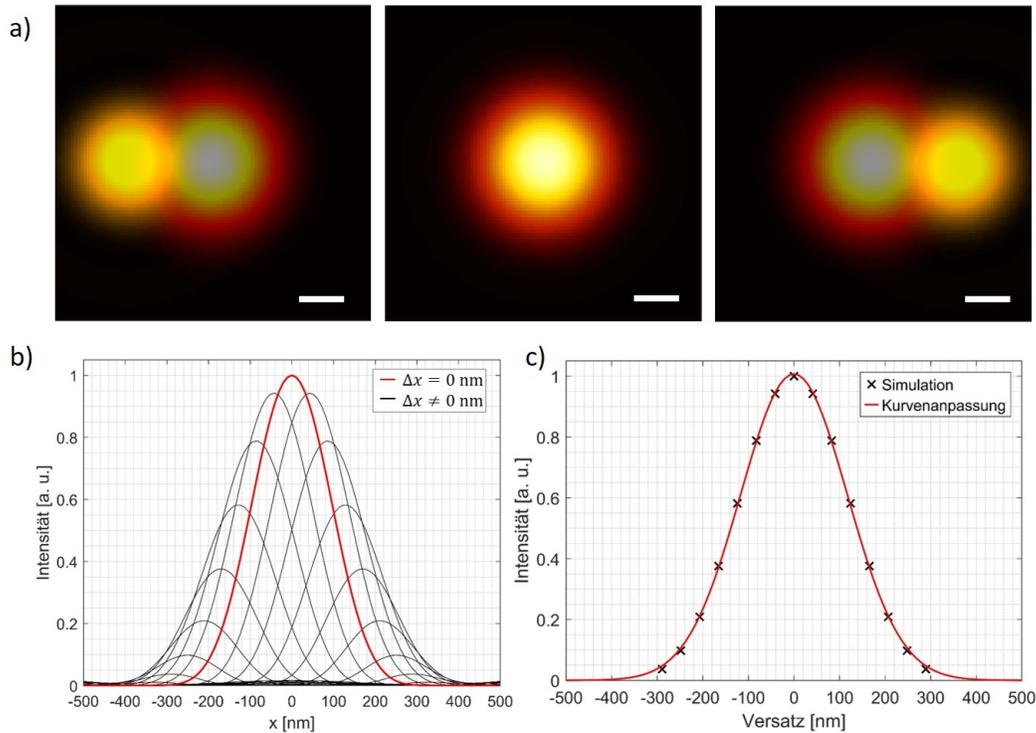


Abbildung 4.3: Ein Fokusversatz des fs-Lasers und des STED-Lasers wirkt sich auf die Effizienz und die räumliche Lokalisation der 2C2P-Anregung aus. a) Eine Verkippung der Wellenfront führt zu einem Versatz des 775 nm-Fokus (orange) in Relation zum 1034 nm-Fokus (rot). Der STED-Fokus wird über den Bereich entlang der x -Achse variiert und die effektive PSF mittels Multiplikation beider Fokalvolumina berechnet. b) Das Linienprofil entlang der x -Achse für den jeweiligen Versatz zeigt das effektive Anregungsprofil. Die Intensität nimmt mit größerem Versatz ab. Das örtliche Maximum der Anregung variiert ebenfalls entlang des Versatzes. In Rot ist die 2C2P-Anregung für maximalen Überlapp gezeigt, wobei $\text{FWHM} = 215$ nm. c) Die jeweiligen Maxima aus (b) geben den Ort der Anregung wieder. Die Gesamtbreite beträgt $\text{FWHM} = 276$ nm. Skalierung a): 140 nm.

Eine ebenso interessante Tatsache zeigt sich, wenn die jeweiligen Halbwertsbreiten in Abhängigkeit des radialen Fokusversatzes betrachtet werden. So nimmt die resultierende FWHM mit zunehmendem Versatz ab. Dies ist in Abbildung 4.4 gezeigt. Bei perfektem Überlapp beträgt die FWHM 215 nm. Bei einem maximalen Versatz von ca. 250 nm beträgt die FWHM ca. 170 nm. Allerdings muss in Kauf genommen werden, dass die Intensität der Anregung entsprechend abfällt (vgl. Abbildung 4.3(c)). Je nach Anwendung bietet diese Erkenntnis aber eine Möglichkeit, auch die 2C2P-Anregung in der Auflösung zu steigern. Über den SLM kann ein gezielter Fokusversatz eingestellt werden, wodurch eine höhere Auflösung erzielt werden kann.

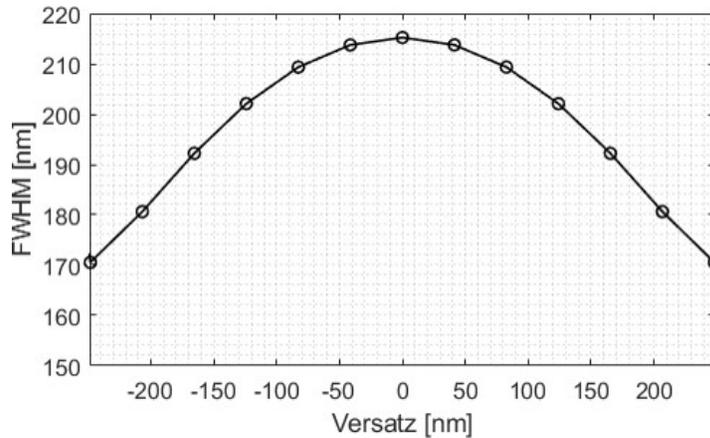


Abbildung 4.4: Der Fokusversatz bei der 2C2P-Anregung führt zu einer Reduktion der Anregungs-Halbwertsbreite und beträgt bei minimalem Überlapp ca. $\text{FWHM} = 170$ nm. Das entspricht gegenüber dem perfekten Überlapp mit $\text{FWHM} = 215$ nm einer Auflösungssteigerung um das 1,26-fache.

4.2 Zweiphotonen-STED an Nanobeads

In 2C2P-STED wird die nichtlineare 2C2P-Anregung mit 2P-STED kombiniert. In diesem Unterkapitel werden die Ergebnisse hinsichtlich Überlagerung und zeitlicher Charakterisierung der verwendeten Laserkombination für STED gezeigt und diskutiert. Wie in Abschnitt 3.5 beschrieben, wird eine direkte 2P-Anregung mittels fs- und STED-Laser für die fluoreszenzbasierte Überlagerung beider Laserstrahlen verwendet, aber auch zur Kompensation von evtl. vorliegenden Wellenfrontdeformationen des STED-Lasers. In einem ersten Schritt wird die räumliche Überlagerung beider Laser sichergestellt, wobei der STED-Laser mit einer Vortex-Phase über den SLM moduliert wird. Dies führt zu einer Donut-förmigen Intensitätsverteilung im Fokus. In Abbildung 4.5(b) ist zu sehen, dass der STED-Laser gegenüber der Anregungs-PSF leicht versetzt ist. In diesem Fall wird der Laser-Scanner entsprechend dem Strahlengang (**E1D1** in Abb. 3.2) verwendet. Durch Änderung des Einfallswinkels des STED-Lasers, kann diese Differenz kompensiert werden, so dass Anregungs-PSF und

Donut-förmiges Intensitätsprofil perfekt überlagern (Abb. 4.5(c)). Mit dieser Darstellung lässt sich auch unmittelbar erkennen, wie die Auflösungsverbesserung bei STED zu Stande kommt, da im Randbereich des 2P-Anregungsvolumens mit dem 1034 nm-Laser, im Falle von STED, die Fluoreszenz durch den Donut-förmigen STED-Laser stimuliert abgeregt wird. Somit bleibt nur der kleinere Bereich in der Mitte des Donuts für die Fluoreszenz übrig. In diesem Beispiel zeigen die Bilder im Falle der Anregungs-PSF eine 40-fach gemittelte und für die STED-PSF eine 120-fach gemittelte Aufnahme. Die 2P-Anregung durch den STED-Laser ist aufgrund der Absorptionseigenschaften des Fluorophors gering, reicht allerdings aus, um eine quantitativ hochwertige Überlagerung beider Fokalvolumen zu erzielen. Mit dieser Methode können auch mögliche Wellenfrontdeformationen bzw. Inhomogenitäten im STED-Fokalvolumen erkannt werden, um sie nachfolgend mit dem SLM zu kompensieren. Das Signal-zu-Rausch-Verhältnis (SNR) berechnet sich nach:

$$\text{SNR} = \frac{I_{max}}{I_{Rauschen}}, \quad (4.2)$$

wobei I_{max} der maximalen Signalintensität entspricht und $I_{Rauschen}$ der Intensität des Untergrunds. Während das SNR für die 2P-Anregung durch den fs-Laser $\text{SNR} = 16$ beträgt, gilt für die 2P-Anregung durch den STED-Laser $\text{SNR} \approx 10$. Die Bildaufnahme dauert unter Annahme einer Bildwiederholrate von 7 Bildern pro Sekunde für die fs-Anregung ca. 5,7 s und für die Anregung mit dem STED-Laser 17,1 s. Diese Zeiten sind gegenüber Proben-Scanning als sehr schnell zu werten. Die Ergebnisse zeigen, dass die Methode damit sehr gut geeignet ist, um die Laserstrahlen räumlich zu überlagern, auch aufgrund der Tatsache, dass keinerlei Modifikationen am optischen Aufbau durchgeführt werden müssen. Sämtliche Anregungs- und Detektionsstrahlengänge sind identisch sowohl für die Justage als auch für die eigentliche Bildgebung. Wie in Abbildung 4.5(b) angedeutet, ist die Intensitätsver-

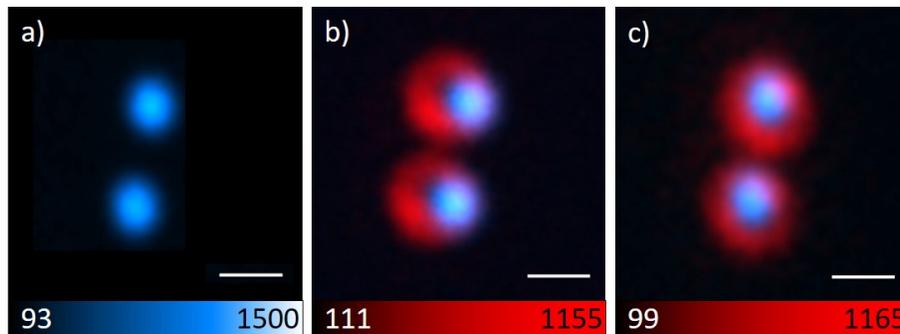


Abbildung 4.5: Räumliche Überlagerung zwischen Anregung und Abregung, wobei 200 nm Beads durch beide Laser direkt über 2P-Anregung abgebildet werden. a) 2P-Anregung mit 1034 nm. b) Überlagerung der Anregung mit Donut-förmigen Intensitätsprofil des 775 nm-Lasers bei schlechter Justage. c) Überlagerung der Anregung mit Donut-förmigen Intensitätsprofil des 775 nm-Lasers bei guter Justage. Skalierung a)-c): 500 nm.

teilung des Donut-förmigen Intensitätsprofils des STED-Lasers nicht vollständig homogen.

Dies kann auf unerwünschte Wellenfrontdeformationen der STED-Laserwellenfront zurückzuführen sein. Um eine homogene Intensitätsverteilung zu erzielen, kann wie in Abschnitt 3.5.1 beschrieben, eine Kompensationsphase auf den SLM projiziert werden.

Abbildung 4.6(a) zeigt das Donut-förmige Profil resultierend aus einer Vortex-Phasenmodulation. Es ist zu erkennen, dass ein Großteil der Intensität asymmetrisch im rechten Bereich der ringförmigen Intensitätsverteilung liegt. Das Intensitätsminimum, welches sich idealerweise im Zentrum des Rings befindet, ist nach links verschoben. Wird eine Kompensationsphase entsprechend dem Graustufen-Bild, wie in Abbildung 4.6(b) gezeigt, auf den SLM projiziert, formt sich eine homogen verteilte Intensität und bildet einen gleichmäßigen Ring aus. Das Intensitätsminimum bildet nun das Zentrum der PSF. Über die Skalierung der Kompensationsphase bestehen mehrere Freiheitsgrade, um diverse vorliegende Wellenfrontfehler zu kompensieren. Wird, wie in diesem Beispiel gezeigt, eine dem Astigmatismus entsprechende Kompensationsphase addiert, besteht die Möglichkeit sowohl den Radius, die Orientierung als auch den maximalen Phasenschub zu variieren. Im Experiment kann auf diese Weise mit wenigen Messungen und Variation dieser drei Parameter eine optimale Kompensationsphase gefunden werden. Mit der Methode der direkten 2P-Anregung besteht eine unmittelbare Rückmeldung über die Homogenität der STED-PSF. Die Kompensation

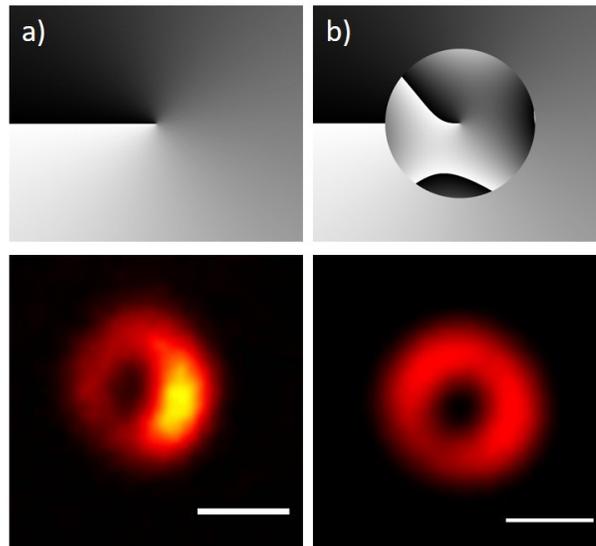


Abbildung 4.6: Einfluss der Wellenfrontkompensation auf die Intensitätsverteilung des Donuts. a) Mittels 2P-Anregung abgebildete 200 nm Fluoreszenzbeads mit einer Vortex-Phase auf dem SLM. Zu sehen ist eine inhomogene Intensitätsverteilung. b) Kompensiertes Phasenbild durch Überlagerung eines Vortex mit einem astigmatischen Phasenprofil. Die Intensitätsverteilung des fokussierten Lasers ist nun homogen (unten). Skalierung a) - b): 500 nm.

von Wellenfrontdeformationen bzw. Abweichungen in der Strahlüberlagerung können bei Verwendung eines SLMs automatisiert werden, wie dies in [79] gezeigt wird. Dabei wird

eine automatisierte Rückkopplung zwischen Phase auf dem SLM und resultierendem Bild verwendet, wonach in iterativen Schritten eine Optimierung stattfindet.

Ist die räumliche Justage abgeschlossen, wird eine zeitliche Justage vorgenommen. Das findet wie in Abschnitt 3.5.2 beschrieben, statt. Da für diese Messung beide Fokalvolumina eine homogene Intensitätsverteilung aufweisen, wird bei räumlicher Überlagerung und passendem Pulsabstand $\Delta\tau$ eine vollständige stimulierte Abregung der Fluoreszenz induziert. Der STED-Laser wird im Langpulsmodus betrieben. Abbildung 4.12 zeigt den Verlauf der gemessenen Fluoreszenzintensität gemittelt über drei Messungen. Für die Bildaufnahme sind je 20 Bilder gemittelt worden. Bei einer Bildrate von 7 Bildern pro Sekunde ergibt sich eine Messzeit pro Zeitschritt von ca. 3 s. Im unteren Teil der Abbildung sind die Bilder eines einzelnen Beads für verschiedene Pulsabstände zu sehen. Der Verlauf der Fluoreszenzintensität ist im oberen Graphen über zwei Perioden gezeigt, so dass nach 12,5 ns die stimulierte Abregung erneut stattfindet. Insgesamt sind hier 475 Zeitschritte mit einer Gesamtmessdauer von 23,75 min erfasst. Da es sich bei den Beads um Objekte mit einem Durchmesser von 200 nm handelt, würde ein Verschieben des Fokus während der Messdauer die Messung verfälschen. Daher ist während der Messung ein Autofokussystem als Driftkorrektur des Nikons-Stativs aktiv, welches den Fokus in der Position der Äquatorialebene der Beads hält. Dazu wird eine Hilfslaserdiode mit der Wellenlänge $\lambda = 820$ nm auf die Grenzfläche zwischen Deckglas und Probe fokussiert. Der Brechungsindexsprung führt zu einer Fresnel'schen Reflexion. Das reflektierte Licht der Hilfslaserdiode wird anschließend über eine Photodiode detektiert. Das Signal erreicht einen Maximalwert, wenn der Fokus der Hilfslaserdiode exakt an der Grenzfläche zwischen Deckglas und Medium der Probe liegt. Über eine Regelschleife wird nun durch kontinuierlicher Anpassung des Abstands zwischen Probe und Objektiv das Signal auf dem Maximalwert gehalten, wodurch der Laserfokus relativ zum Objekt konstant bleibt.

Der Verlauf der Fluoreszenzintensität zeigt anfangs keine stimulierte Emission, da der STED-Laser der Anregung voraus läuft. Da noch keine Fluoreszenzmoleküle durch den fs-Laser angeregt sind, kann auch zum Zeitpunkt des Auftreffens des STED-Lasers keine stimulierte Abregung stattfinden. Mit zunehmenden zeitlichen Versatz $\Delta\tau$ besteht ein zunehmender zeitlicher Überlapp des STED-Laser mit dem fs-Laser. Aus diesem Grund beginnt die stimulierte Abregung einzusetzen. Daraus ergibt sich eine steile Flanke der Abnahme der spontanen Fluoreszenz bis zu einem Minimum. Die Flanke erstreckt sich über 750 ps und ist damit etwas länger als die Pulsdauer des STED-Lasers. Dies spricht dafür, dass das Optimum der stimulierten Abregung mit einem gewissen Abstand zur Anregung, welcher größer als die Pulsdauer $\tau_{P,2}$ ist, stattfindet. Dies könnte an vibronischen Übergängen des angeregten Zustands liegen, welche Zeitkonstanten im ps-Bereich aufweisen. Der Anregungspuls spielt für diese Dynamik nur eine untergeordnete Rolle, da aufgrund der Pulsdauer von ca. 100 fs diese gegenüber den Zeitkonstanten als instantan angenommen werden kann. Es zeigt sich aber auch, dass keine vollständige Abregung stattfindet und auch bei maximaler stimulierter Emission noch eine Restfluoreszenz übrig bleibt. Das könnte mit einer Wiederanregung durch den STED-Laser zusammenhängen. Mit weiter

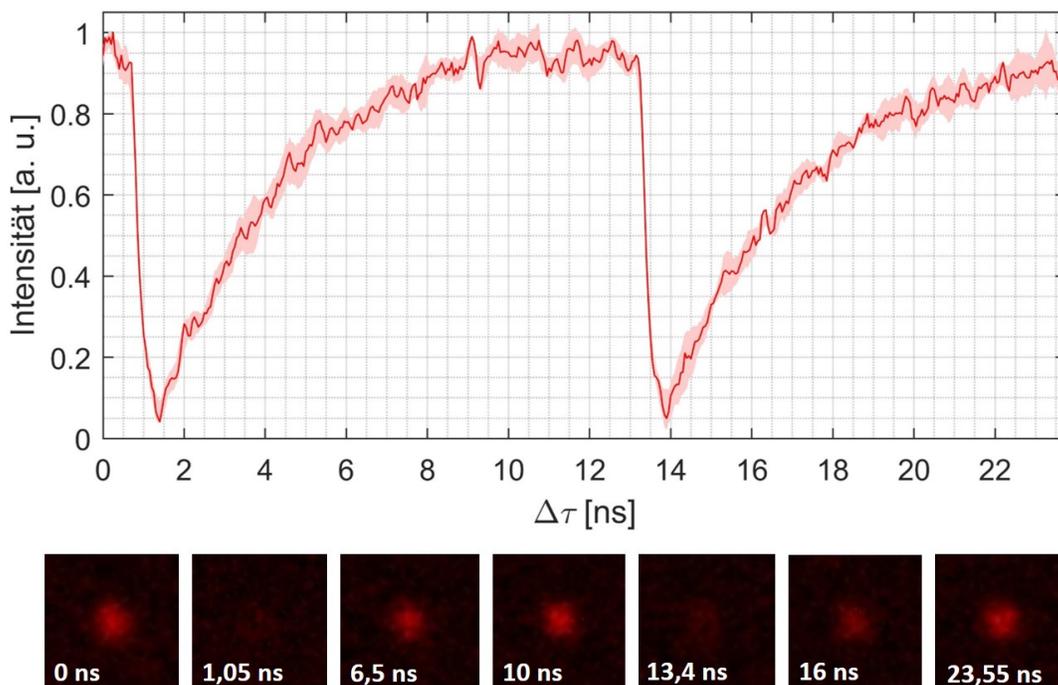


Abbildung 4.7: Zeitliche Überlagerung des fs-Laserpulses mit dem STED-Laserpuls über zwei Perioden. Unten: Mikroskopische Aufnahmen eines Fluoreszenzbeads für verschiedene Pulsabstände $\Delta\tau$.

zunehmenden zeitlichen Pulsabstand ist die Fluoreszenz stärker ausgeprägt. Hier schlägt die spontane Emission zu Buche, da das Fluoreszenzmolekül mehr Zeit für den spontanen Zerfall in den elektronischen Grundzustand hat, bevor der STED-Laserpuls auftritt und das Molekül mittels stimulierter Emission gezielt abregt. Die Steigung dieses Verlaufs hängt mit der Fluoreszenzlebensdauer des Moleküls zusammen, wie in Abschnitt 4.3 näher diskutiert wird. Beträgt der Pulsabstand $\Delta\tau$ ein Vielfaches der Fluoreszenzlebensdauer, findet nach ca. $\Delta\tau = 12$ ns fast keine stimulierte Emission mehr statt. Der Fluorophor hat den Übergang aus dem angeregten in den Grundzustand ausschließlich mittels spontaner Emission vollführt. Nachfolgend findet erneut eine Anregung durch den fs-Laser statt, und der Prozess beginnt von vorne. Eine weitere Erkenntnis liegt darin, dass keine Notwendigkeit einer exakten Pulsfolge besteht. Das bedeutet, dass solange die Laserpulse synchron auf die Probe auftreffen, beliebig getriggerte Pulse miteinander interagieren können. Läge eine starke Pulsfluktuation aufgrund einer variierenden Repetitionsrate vor, müsste jeder Triggerpuls mit exakt dem nachfolgend ausgelösten STED-Laserpuls überlagert werden. Aus dieser Messung kann für diesen optischen Aufbau, bestehend aus den verschiedenen Lasersystemen sowie in Abhängigkeit der Fluoreszenzlebensdauer, ein optimaler Pulsabstand $\Delta\tau$ für eine möglichst effiziente Abregung gewählt werden. Ebenso können aus solchen Messungen molekülspezifische Parameter, wie Zeitkonstanten, extrahiert werden. Eine entsprechende Analyse wird in Abschnitt 4.3 mit Hilfe des in Abschnitt 2.5 beschriebenen

Ratengleichungsmodells, durchgeführt.

Nach erfolgter räumlicher und zeitlicher Überlagerung der Laser findet die supraaufgelöste Bildgebung mittels 2P-STED an Crimson Beads statt. Hierfür eignet sich die Verwendung des Laser-Scanners ebenso wie die Verwendung des Nanopositioniersystems mittels Proben-Scanning. In Abbildung 4.8 sind mikroskopische Aufnahmen der 200 nm Beads in beugungsbegrenzter Auflösung mittels 2P-Anregung bei 1034 nm (TPEF) gezeigt. Auf der rechten Seite sind STED-Aufnahmen des gleichen Bildausschnitts dargestellt. Eine vergrößerte Darstellung von nahe beieinanderliegenden Beads zeigen in der Gegenüberstellung die deutlich höhere Auflösung. Während in der beugungsbegrenzten Bildgebung die Beads nicht voneinander getrennt werden können, ist das im STED-Bild der Fall. Das in Abb. 4.8 links oben gezeigte Linienprofil wird über drei Beads für die reine 2P-Anregung sowie für das 2P-STED Bild ausgewertet und zeigt eine Auflösungsverbesserung von ca. 50%. Wird die Objektgröße selbst berücksichtigt, ergibt sich eine effektive PSF bei STED von ca. 91 nm. Die Bilder sind 60-fach gemittelt, so dass für die Bildaufnahme eine Zeit von ca. 8,6 s benötigt wird. Wird das Nanopositioniersystem für die Bildaufnahme verwendet, stellt sich die räumliche Überlagerung beider Laserstrahlen einfacher dar, da die Laserstrahlen zur Bildgebung nicht abgelenkt werden, die Probe dagegen über die Laserfoki gerastert wird. Das Vorgehen für die räumliche und zeitliche Überlagerung hingegen ist identisch zur Verwendung des Resonanz-Galvo-Scanners. Die Pixelgröße beträgt in den hier gezeigten Messungen 25,13 nm für sowohl die x , y - als auch die z -Richtung. Der motorisierte Probenstisch des in dieser Arbeit verwendeten Nikon-Stativs erlaubt eine Schrittweite von ca. 100 nm. Für axiale Messungen stellt das eine nicht ausreichende Schrittweite dar, weshalb der Piezotisch verwendet wird. Aufgrund der geringeren Scangeschwindigkeit ist die Dauer der Bildaufnahme gegenüber dem Laserscanner wesentlich größer. Daraus ergibt sich aber auch der Vorteil, dass eine längere Integrationszeit je Bildpunkt eingestellt werden kann. Aufnahmen, wie sie in Abbildung 4.8 gezeigt sind, benötigen ca. 2 min. Es hat sich gezeigt, dass für Vermessungen von PSFs oder für Messungen mit nur geringem Signal der Piezotisch geeignet ist. Für biologische Proben mit einer größeren Dimension bzw. für großvolumige 3D-Aufnahmen, wie sie mit dem hier vorgestellten System in [48] gezeigt sind, ist der Laserscanner besser geeignet. In Abbildung 4.9 sind die 2P sowie die STED-Aufnahmen an der Crimson-Probe gezeigt. Aufgrund der hohen Integrationszeit je Pixel von ca. 200 μ s wird die 2P-Direktanregung auch durch den STED-Laser trotz des Langpulsmodus deutlich. Dies ist in Abb. 4.9 unter „2P (λ_2)“ gezeigt. Da für die laterale Auflösungsverbesserung eine Vortex-Phase auf den SLM dargestellt wird, zeigt sich im Fokus ein Donut-förmiges Anregungsprofil. Durch Subtraktion des Signals der direkten 2P-Anregung durch den STED-Laser, wird die Auflösung noch weiter erhöht („STED korrigiert“). Es ist zu erkennen, dass im STED-Bild die Beads klar voneinander getrennt werden können, wohingegen im 2P-Anregungsbild mit beugungsbegrenzter Auflösung nur verschwommene größere Bereiche erkannt werden können. Bei Verwendung einer π -Phasenmaske kann eine axiale Auflösungsverbesserung nach gleichem Prinzip erzielt werden, wobei die STED-PSF eine Hantelform in z -Richtung mit je einem Intensitätsmaximum über- und unterhalb des Fokus' aufweist. Um ein mikroskopisches Bild in axialer Richtung aufzunehmen, wird

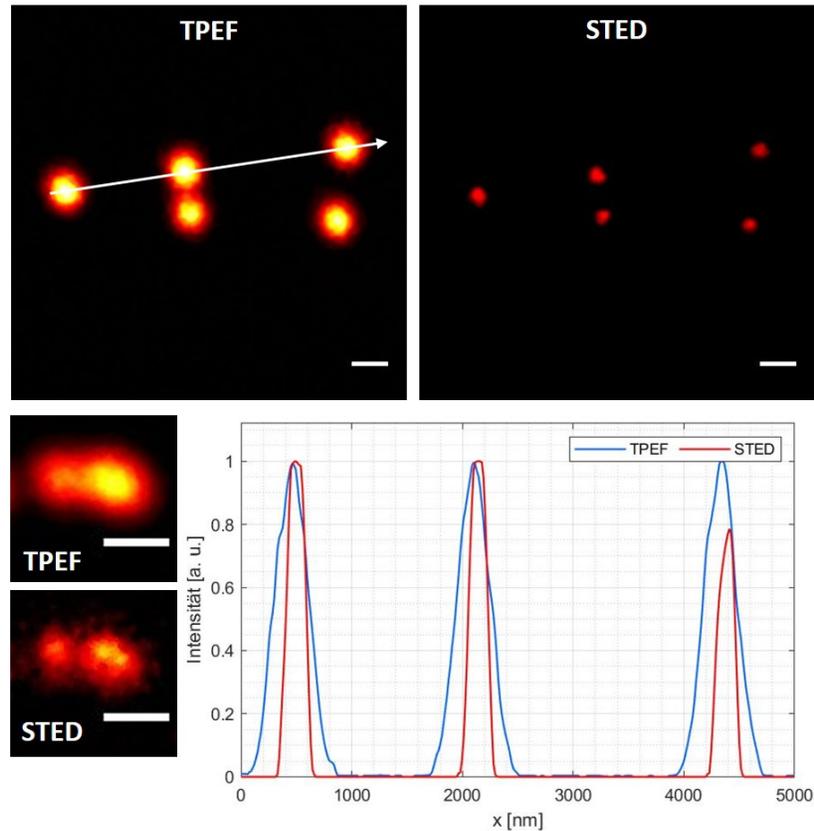


Abbildung 4.8: STED-Kontrollmessung nach erfolgter Laserstrahljustage mit 200 nm Crimson Beads. Die gesteigert Auflösung zeigt sich im Vergleich der 2P-Anregung mit 1034 nm (TPEF) gegenüber der STED-Aufnahme. Mit STED können nahe beieinander liegende Objekte getrennt werden (links unten). Das im TPEF-Bild gezeigte und ausgewertete Linienprofil über drei Beads ist rechts unten gezeigt und gibt die höhere Auflösung wieder. Skalierung: 500 nm.

das Nanopositioniersystem für eine Scanbewegung entlang der lateralen x -Richtung sowie einer Bewegung entlang der axialen z -Richtung konfiguriert. Während die Bewegung in x -Richtung sehr schnell stattfindet und die Pixelverweilzeit definiert, findet eine Bewegung in z -Richtung erst nach erfolgtem Linienscan statt. In Abbildung 4.10(a) sind mikroskopische Aufnahmen der Crimson Beads, entlang der axialen Richtung gezeigt, wobei drei Beads zu sehen sind. Die Pixelgröße beträgt sowohl in x - als auch in z -Richtung 25, 13 nm. Die durch den fs-Laser erzeugte 2P-Aufnahme (TPEF) zeigt das beugungsbegrenzte Fokolvolumen und die charakteristische elliptische Form der Intensitätsverteilung. Wird der STED-Laser mit einer π -Phasenmodulation und der richtigen zeitlichen Konfiguration hinzu geschaltet, verbessert sich die Auflösung entlang der axialen Richtung wesentlich. Die effektive PSF zeigt zudem eine annähernd kugelförmige Intensitätsverteilung und stellt damit eine isotrope PSF dar. Dies ist gerade für 3D-Aufnahmen äußerst wünschenswert, da die gemess-

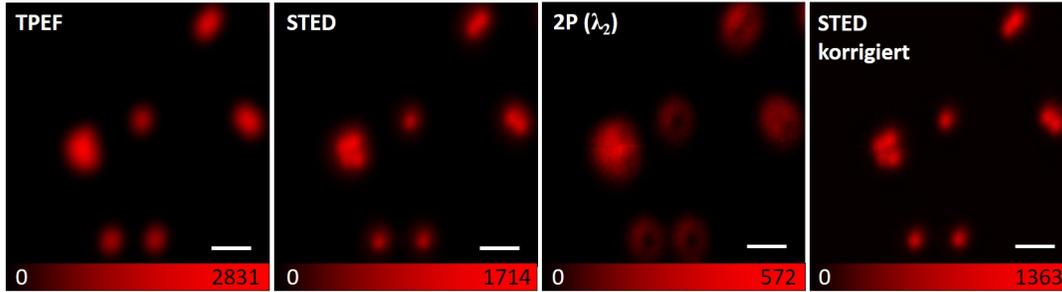


Abbildung 4.9: STED-Kontrollmessung nach erfolgter Laserstrahljustage für laterale Auflösungsverbesserung mit 200 nm Crimson Beads. TPEF: 2P-Anregung mit $\lambda_1 = 1034$ nm; STED: STED-Bild (Rohdaten); 2P (λ_2): 2P-Anregung mit $\lambda_2 = 775$ nm und Vortex-Phase; STED korrigiert: STED-Bild nach Abzug des durch den STED-Laser verursachten Hintergrundsignals. Die jeweiligen Zählraten sind unterhalb der Bilder mit Farbskalierung gezeigt. Skalierung: 500 nm.

senen Daten durch die Faltung mit in der beugungsbegrenzten Bildgebung vorliegenden elliptischen Form nicht asymmetrisch verzerrt werden. Die 2P-Direktanregung durch den STED-Laser ist ebenfalls gezeigt („2P (λ_2)“) und stellt die PSF des π -phasenmodulierten STED-Lasers dar. Das mit diesem Hintergrund korrigierte STED-Bild („STED korrigiert“) zeigt aufgrund der geringen Zählrate der STED-Direktanregung nur einen unwesentlichen Unterschied zum STED-Bild. In Abbildung 4.10(b) ist das Intensitätsprofil entlang der Linie in z -Richtung über das mittlere Bead gezeigt (oben) und entlang der x -Richtung über alle drei Beads (unten). Gerade in z -Richtung wird eine ausgeprägte Auflösungsverbesserung deutlich. Gegenüber der beugungsbegrenzten 2P-Anregung verbessert sich die Auflösung von $\text{FWHM}_{z,2P} = 805$ nm mit STED auf $\text{FWHM}_{z,STED} = 404$ nm. Dies entspricht einer Auflösungsverbesserung um ca. das Zweifache. In x -Richtung wird eine Auflösungssteigerung von ca. 40 nm erzielt, von $\text{FWHM}_{x,2P} \approx 400$ nm auf $\text{FWHM}_{x,STED} \approx 360$ nm. In Abb. 4.10 zeigt sich ein großer Vorteil der nichtlinearen Mikroskopie. Aufgrund der quadratischen Abhängigkeit der PSF von der eingestrahnten Intensität werden üblicherweise auftretende Nebenmaxima der PSF unterdrückt. Für STED bedeutet dies, dass eine nahezu homogene kugelförmige effektive PSF erzielt wird.

Die hier vorgestellte Methode der direkten 2P-Anregung durch den STED-Laser in Kombination mit einer supraaufgelösten Bildgebung der Crimson Beads eignet sich besonders, um das richtige Flächenverhältnis der π -Phasenmaske zu finden (vgl. 2.3.2). Das Flächenverhältnis ist ein besonders kritischer Parameter für die Qualität der axialen Hantelstruktur, da ein nicht passendes Verhältnis zu keinem Intensitätsminimum im Zentrum der STED-PSF führt, sondern lediglich zu einer Einschnürung im Zentrum des Fokus'. Die Einschnürung, welche sich bei $z = 0$ nm ergibt ist kleiner, als es das theoretisch erzielbare beugungsbegrenzte Fokalkvolumen erwarten lässt. Durch Überlagerung des Bereichs im Zentrum der PSF mit einer zweiten Wellenlänge, kann über einen multiplikativen Anregungsmecha-

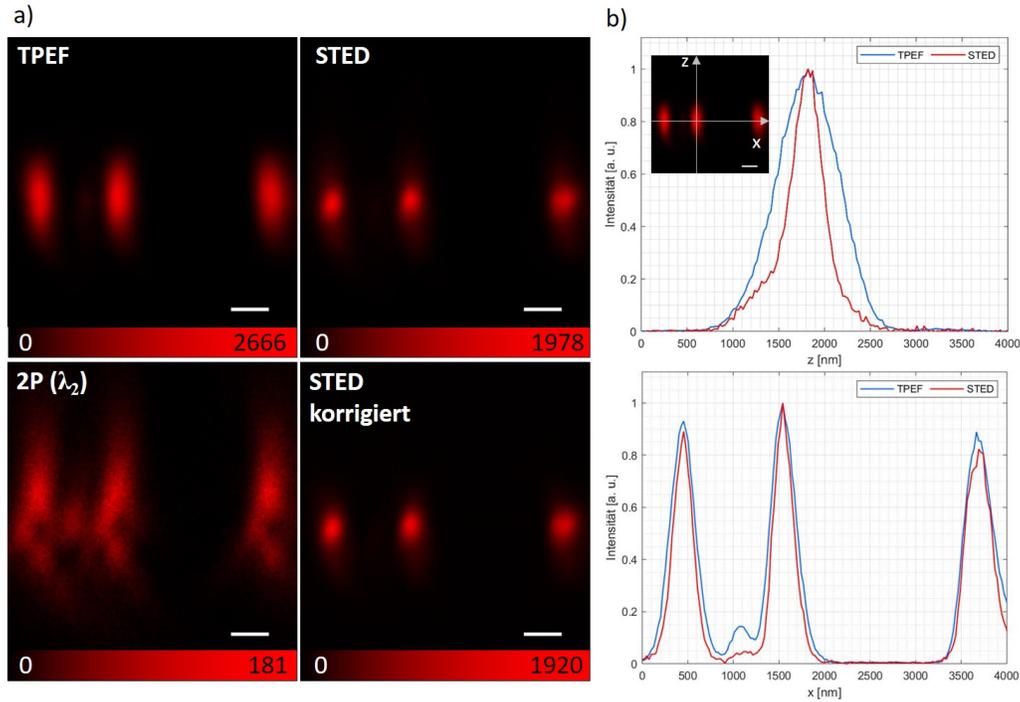


Abbildung 4.10: STED-Kontrollmessung nach erfolgter Laserstrahljustage für axiale Auflösungsverbesserung mit 200 nm Crimson Beads. a) TPEF: 2P-Anregung mit $\lambda_1 = 1034$ nm; STED: STED-Bild (Rohdaten); 2P (λ_2): 2P-Anregung mit $\lambda_2 = 775$ nm und Vortex-Phase; STED korrigiert: STED-Bild nach Abzug des durch den STED-Laser verursachten Hintergrundsignals. b) Intensitätsprofil entlang der z -Achse (oben). Die Auflösung verbessert sich um einen Faktor 2 von $\text{FWHM}_{z,2P} = 805$ nm auf $\text{FWHM}_{z,STED} = 404$ nm. Intensitätsprofil entlang der x -Achse (unten). Die Auflösung verbessert sich um einen Faktor von ca. 1,11. Skalierung: 500 nm für beide Achsen.

nismus eine effektive PSF unterhalb der Beugungsgrenze erzeugt werden. Dies ist unter anderem bei der kohärenten anti-Stokes Raman Streuungs-Mikroskopie (CARS, *Coherent Anti-Stokes Raman Scattering*, engl.) bereits gezeigt worden [99,100], lässt sich aber auch auf die Zweifarben-Zweiphotonen-Mikroskopie anwenden. Eine solche Auflösungsverbesserung kann mit den in dieser Arbeit verwendeten Wellenlängen bis zu 150 nm betragen, wohlgemerkt, ohne den Einsatz von STED. Die mit dieser Methode erzielbare Auflösung ist bereits für viele Fragestellungen in der biomedizinischen Forschung ausreichend und bietet vor allem Möglichkeiten in der klinischen Anwendung und verdient daher eine weitere Untersuchung.

4.3 Zeitdynamik des STED-Prozesses

Anhand der im vorangegangenen Abschnitt gezeigten Ergebnisse lässt sich erkennen, dass die Fluoreszenz bzw. der STED-Prozess einer Zeitdynamik unterliegt. Diese Dynamik hängt zum einen von den Pulsauern sowie den Repetitionsraten der verwendeten Laser, zum anderen vom Fluorophor ab. Wie in Kapitel 2 und Abschnitt 2.5 dargestellt, kann die Dynamik mit einem Ratengleichungsmodell mittels numerischer Methoden berechnet werden. Zur Lösung der gekoppelten Differentialgleichungen 2.40 bis 2.44 wird Matlab mit dem ODE45-Solver verwendet, welcher auf dem Runge-Kutta-Verfahren basiert [101]. Die Simulation wird unter Variation des zeitlichen Pulsabstandes $\Delta\tau$ zwischen fs- und STED-Laserpuls durchgeführt. Die jeweiligen resultierenden Fluoreszenzphotonen werden gezählt und aufsummiert (vgl. Gleichung 2.45). Entsprechend der in Abschnitt 4.7 gezeigten Messung wird $\Delta\tau$ in 50 ps-Schritten variiert. Die in der Simulation betrachteten Wellenlängen sind identisch zu den im Experiment verwendeten. Folglich beträgt die 2P-Anregungswellenlänge $\lambda_1 = 1034$ nm und die STED-Wellenlänge $\lambda_2 = 775$ nm. Die 2P-Absorptionswirkungsquerschnitte sind für die 2P-Anregung mit λ_1 , λ_2 sowie für die 2C2P-Anregung mit λ_{2C2P} für Crimson gewählt und aus [84] entnommen. Die vibronischen Zerfallszeiten für den angeregten und für den Grundzustand sind gegenüber der Fluoreszenzlebensdauer sehr kurz, so dass hier typischerweise Werte zwischen 0,1 und 10 ps gewählt werden [18, 47, 102]. In dieser Simulation ist für beide Niveaus ein Wert von 1 ps gewählt. Der STED-Wirkungsquerschnitt $\sigma_{1P}^{\lambda_2}$ gibt die Übergangswahrscheinlichkeit für die stimulierte Emission an. Dieser beschreibt damit wesentlich die Effizienz der stimulierten Abregung und liegt typischerweise in der Größenordnung um 10^{-21} m² und dient als Startwert für die Simulation. Dieser Wert wird in mehreren Iterationen variiert, um eine bestmögliche Anpassung an die experimentellen Daten zu erzielen. Die Fluoreszenzlebensdauer liegt für organische Fluoreszenzfarbstoffe im ns-Bereich und beträgt für Crimson Nanobeads ca. 3,8 ns [103]. Die mittleren Leistungen \bar{P} des fs-Lasers und des STED-Lasers sind am Ort der Probe mit einem speziellen Leistungsmesskopf gemessen und betragen $\bar{P}_1 = 20$ mW sowie $\bar{P}_2 = 17$ mW. Die verwendeten Simulationsparameter sind in Tabelle 4.2 zusammengefasst.

Die Anwendung der oben beschriebenen Simulationsparameter in Kombination mit dem in Kapitel 2.5 beschriebenen Modell, erlaubt die Simulation der Fluoreszenzintensität in Abhängigkeit des Pulsabstandes $\Delta\tau$. Der Vergleich des simulierten Verlaufs mit den in Abschnitt 4.7 gezeigten experimentellen Daten ist in Abbildung 4.11 dargestellt. Die Simulationsdaten sind in Blau gekennzeichnet, während die experimentellen Daten in Rot gezeigt sind. Der 1P-STED-Wirkungsquerschnitt $\sigma_{1P}^{\lambda_2}$ ist dabei ausgehend von $1 \cdot 10^{-21}$ m² in iterativen Schritten so gewählt, dass eine möglichst gute Anpassung der beiden Kurven zueinander vorliegt. Wie sich in den experimentellen Daten bereits zeigt, findet anfänglich keine stimulierte Abregung statt, da der STED-Laserpuls der Anregung voraus läuft. Mit zunehmender Verzögerung beginnt die Fluoreszenz aufgrund einer zunehmenden stimulierten Abregung rasch abzufallen, bis ein Minimum der Fluoreszenz erreicht ist. Dieser Punkt stellt ein Optimum für die stimulierte Abregung dar, so dass diese Zeitverzögerung $\Delta\tau$ für die Bildgebung eingesetzt wird. Eine weiter zunehmende Verzögerung des STED-Lasers er-

Tabelle 4.2: Übersicht der verwendeten Simulationsparameter für die Berechnung der Zeitdynamik des STED-Prozesses.

Bezeichnung	Symbol	Wert	Quelle
Wellenlänge fs-Laser	λ_1	1034 nm	Hersteller
Wellenlänge STED-Laser	λ_2	775 nm	Hersteller
2P-Wirkungsquerschnitt 1034 nm	$\sigma_{2P}^{\lambda_1}$	$10 \cdot 10^{-50} \text{ m}^4 \text{ s}$	[84]
2P-Wirkungsquerschnitt 775 nm	$\sigma_{2P}^{\lambda_2}$	$220 \cdot 10^{-50} \text{ m}^4 \text{ s}$	[84]
2C2P-Wirkungsquerschnitt 886 nm	$\sigma_{2P}^{\lambda_2 C2P}$	$0,01 \cdot 10^{-50} \text{ m}^4 \text{ s}$	nach [84]
STED-Wirkungsquerschnitt 775 nm	$\sigma_{1P}^{\lambda_2}$	$0,25 \cdot 10^{-21} \text{ m}^2$	Simulation
Fluoreszenzlebensdauer	τ_{Fl}	3,8 ns	[103]
Vibronische Zerfallszeit S_1	k_1^{vib}	1 ps	nach [18, 47, 102]
Vibronische Zerfallszeit S_0	k_0^{vib}	1 ps	nach [18, 47, 102]
Mittlere Leistung fs-Laser	\bar{P}_1	20 mW	gemessen
Mittlere Leistung STED-Laser	\bar{P}_2	17 mW	gemessen

möglicht die spontane Emission und führt zu einem Anstieg der Fluoreszenz, bis schließlich betragsmäßig die Ausgangsfluoreszenz wieder erreicht wird. Nach ca. 12,5 ns trifft erneut ein Anregungspuls auf die Probe, so dass der Prozess von vorne beginnt. Ein Vorteil der Simulation ist, dass zu jedem beliebigen Zeitschritt eine detaillierte Analyse der Besetzung der einzelnen Niveaus vorgenommen werden kann. Die Simulation erlaubt darüber hinaus auch eine Analyse über die Auswirkungen der einzelnen Parameter auf die STED-Effizienz. In Abbildung 4.12 sind die Intensitätsverläufe in Abhängigkeit des Pulsabstandes $\Delta\tau$ für die Variation des STED-Wirkungsquerschnitts (a), der Fluoreszenzlebensdauer (b) und der mittleren STED-Laserleistung (c) gezeigt. Die jeweils anderen Parameter sind entsprechend Tabelle 4.2 gewählt und werden nicht verändert. Einen großen Einfluss bei einer bestimmten STED-Laserleistung hat der STED-Wirkungsquerschnitt. Es zeigt sich, dass sowohl die Steilheit der Abnahme der Fluoreszenz, aber auch die maximal zu erreichende stimulierte Abregung stark vom Wirkungsquerschnitt abhängt. Während bei $\sigma_{1P}^{\lambda_2} = 0,01 \cdot 10^{-21} \text{ m}^2$ nahezu keine stimulierte Abregung stattfindet, wird bei $\sigma_{1P}^{\lambda_2} = 0,50 \cdot 10^{-21} \text{ m}^2$ eine fast vollständige stimulierte Abregung erzielt. Ein möglichst großer STED-Wirkungsquerschnitt erlaubt die Reduktion der notwendigen STED-Laserleistung mit dennoch effizienter Abregung. Dies ist von Vorteil, da mit geringer STED-Laserleistung der Energieeintrag gering gehalten wird, wodurch eine möglichst probenschonende Bildgebung möglich ist. Eine direkte nichtlineare Anregung durch den STED-Laser ist bei geringen Leistungen unwahrscheinlich. Allerdings nimmt mit steigender STED-Laserleistung die Wahrscheinlichkeit ei-

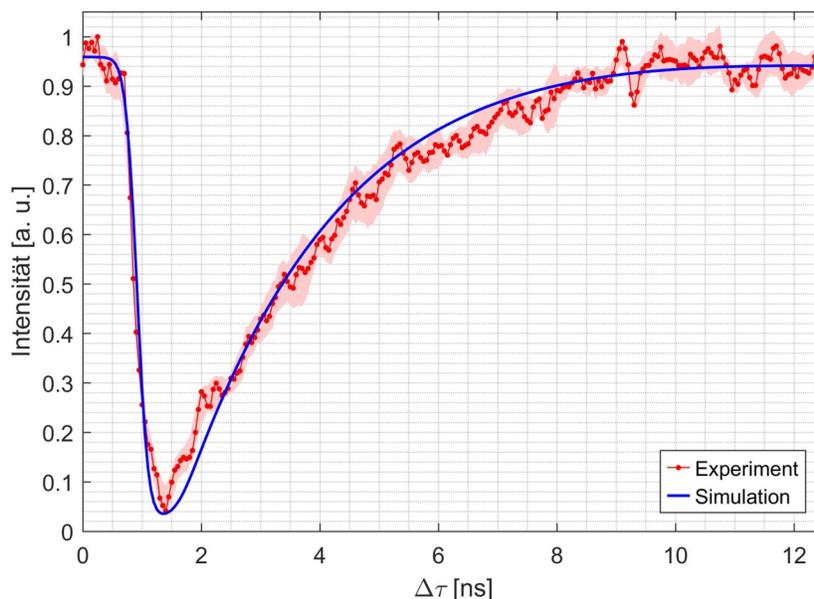


Abbildung 4.11: Simulation des zeitlichen Intensitätsverlaufs der Fluoreszenz in Abhängigkeit des gegenüber der Anregung verzögerten STED-Pulses (blau, durchgezogene Linie) und Vergleich mit den experimentellen Daten (rot, punktiert).

ner direkten 2P-Anregung zu. Das vermindert die effektive stimulierte Abregung. Trotz der Anforderung eines möglichst hohen STED-Wirkungsquerschnitts, kann die STED-Wellenlänge in Relation zu einem bestimmten Fluorophor nicht beliebig entsprechend einem hohen Wirkungsquerschnitt gewählt werden. Das liegt vor allem daran, dass die Wellenlänge in Richtung Emissionsmaximum verschoben werden muss und somit der detektierbare Emissionsbereich verkleinert wird. Ebenso steigt die Wahrscheinlichkeit einer direkten 1P-Anregung durch den STED-Laser. Es gibt also ein Optimum für die STED-Wellenlänge in Bezug auf ein Fluorophor. Der Verlauf der Fluoreszenz reagiert sehr empfindlich auf die Variation des STED-Wirkungsquerschnitts, somit kann der STED-Wirkungsquerschnitt mit Hilfe der Simulation und dem Vergleich mit experimentellen Daten bestimmt werden solange die restlichen Parameter bekannt sind. Die Variation der Fluoreszenzlebensdauer dagegen zeigt keine Auswirkung auf die maximal erzielbare stimulierte Abregung (s. Abb. 4.12(b)). Dies liegt daran, dass die Übergangswahrscheinlichkeit der stimulierten Emission unabhängig von der Fluoreszenzlebensdauer ist. Bei allen simulierten Lebensdauern zwischen $\tau_{Fl} = 1,5$ ns bis $4,5$ ns, wird nahezu die maximale stimulierte Abregung entsprechend Abbildung 4.11 erreicht. Auch die Flanke zu Beginn der stimulierten Abregung ist für alle τ_{Fl} identisch. Jedoch zeigen sich Unterschiede mit zunehmenden Pulsversatz, wobei gerade kurze Lebensdauern betragsmäßig schneller zur Ausgangsfluoreszenz zurückkehren. Dies ist zu erwarten, da die Fluoreszenzlebensdauer dem Wert entspricht, bei der 63,2 % aller angeregten Zustände mittels spontaner Emission in den Grundzustand zurückgekehrt sind. Je kürzer also diese Zeit ist, desto höher ist die Übergangswahrscheinlichkeit aus dem

elektronisch angeregten Zustand in den Grundzustand. Ist die STED-Pulsverzögerung größer als die Fluoreszenzlebensdauer, sind bereits ein Großteil der angeregten Zustände über spontane Emission in den Grundzustand zerfallen, noch bevor der STED-Laser auf die Probe auftrifft. Somit beeinflusst der STED-Laser bei großen zeitlichen Verzögerungen die spontane Emission nur geringfügig. Die Variation der STED-Laserleistung ist in Abbildung 4.12(c) gezeigt. Wird überhaupt keine STED-Laserleistung ($P_2 = 0$ mW) auf die Probe eingestrahlt, findet trivialerweise keinerlei stimulierte Abregung statt. Die spontane Emission ist für alle Pulsabstände $\Delta\tau$ gleich. Wird die mittlere STED-Laserleistung erhöht, zeigt sich ein schneller Abfall der Fluoreszenz mittels stimulierte Abregung. Der Verlauf ist für kleine Leistungen identisch zur Variation des STED-Wirkungsquerschnitts, da nach Gleichung 2.41(3) die Rate der stimulierten Abregung proportional zum Wirkungsquerschnitt und zur STED-Laserleistung ist. Wird die Leistung allerdings weiter erhöht, nimmt die Wahrscheinlichkeit einer direkten 2P-Anregung durch den STED-Laser zu. Die quadratische Abhängigkeit der 2P-Übergangsrate von der Photonenflussdichte wird gerade bei großen STED-Laserleistungen der stimulierten Abregung entgegenwirken. Dadurch ist die maximal zu erzielende Abregung limitiert. In einem Bereich hoher stimulierter Abregung, also geringer spontaner Emission bei ca. $\Delta\tau = 1,3$ ns, sind immer größere Sprünge der Laserleistung notwendig, um eine noch höhere stimulierte Abregung zu erzielen. Dieser nichtlineare Zusammenhang zeigt ein von der Übergangswahrscheinlichkeit abhängiges Sättigungsverhalten, ist aber auch ein Indiz zur stimulierten Emission konkurrierender Prozesse.

Wird das jeweilige Minimum für die verschiedenen Laserleistungen ausgewertet, zeigt sich der zu erwartende nichtlineare Verlauf (Abb. 4.12(d)). Mit zunehmender STED-Laserleistung nimmt zum einen die Übergangsrate der direkten 2P-Anregung durch den STED-Laser zu, zum anderen nimmt aber auch die Übergangswahrscheinlichkeit einer Wiederanregung durch den STED-Laser (s. Gleichung 2.42 Term (5)) zu. Beide Prozesse wirken der stimulierten Abregung entgegen (vgl. Abschnitt 2.5 und Abschnitt 2.6). Zeitlich betrachtet induziert der STED-Laser eine Anregung, welche gegenüber der fs-Laser Anregung um $\Delta\tau = 1,3$ ns verschoben ist. Mit zunehmender STED-Laserleistung wird dieser Betrag größer. Damit liegt ein zweiter, zeitabhängiger Prozess der spontanen Emission vor, welcher der stimulierten Emission in Abhängigkeit der STED-Laserleistung überlagert ist. Aus dieser Überlegung kann der Verlauf der spontanen Emissionen über eine biexponentielle Anpassung angenähert werden:

$$I = Ae^{-\frac{P_{STED}}{a_1}} + Be^{-\frac{P_{STED}}{b_1}} \quad (4.3)$$

Für eine Anpassung an die simulierten Daten ergeben sich die Koeffizienten von $A = 0.932$, $a_1 = 3,85$ mW, $B = 0,068$ und $b_1 = 22,22$ mW. Der Parameter a_1 spiegelt die Sättigungsleistung wieder und gibt an, in welchem Maße die stimulierte Abregung bei Erhöhung der STED-Laserleistung eintritt. Je höher dieser Wert ist, desto flacher wird der Verlauf der stimulierten Abregung über die STED-Laserleistung. Anhand von b_1 ist zu erkennen, dass zur stimulierten Abregung konkurrierende Prozesse in diesem Beispiel ab einer Leistung

von über 20 mW signifikant beitragen. Aus obiger Überlegung ergibt sich also, dass die stimulierte Abregung durch Erhöhung der Laserleistung nicht beliebig weit gesteigert werden kann. Daraus resultiert die Anforderung an den Fluorophor, einen möglichst geringen 2P-Absorptionswirkungsquerschnitt bei der STED-Wellenlänge $\sigma_{2P}^{\lambda_2}$ sowie eine möglichst hohe Übergangsraten $k_{0,2}^{vib}$ des vibronischen Grundniveaus aufzuweisen.

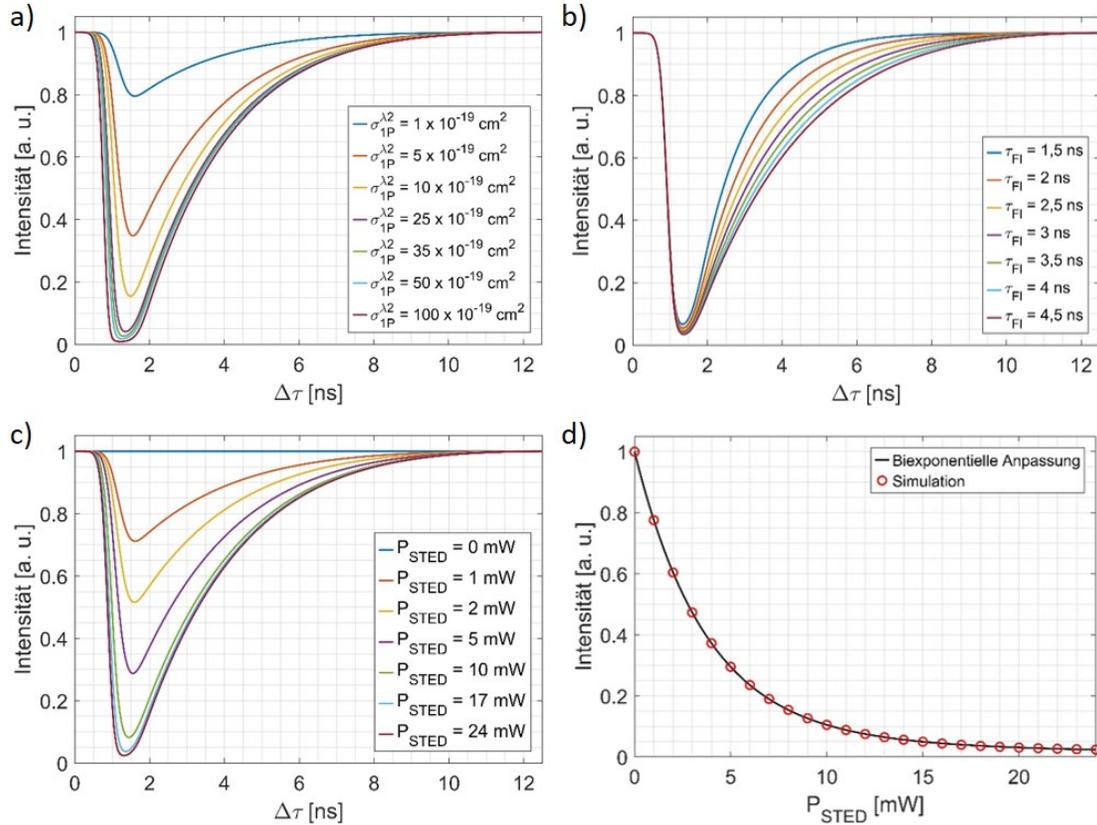


Abbildung 4.12: Simulation des Verlaufs der Fluoreszenzintensität in Abhängigkeit der Zeitverzögerung des STED-Lasers gegenüber der Anregung. Neben den variierten Parametern sind alle anderen Parameter entsprechend Tabelle 4.2 gewählt. a) Variation des STED-Wirkungsquerschnitts $\sigma_{1P}^{\lambda_2}$. b) Variation der Fluoreszenzlebensdauer τ_{Fl} . c) Änderung der Leistung des STED-Lasers P_{STED} . d) Verlauf der maximal erzielten stimulierte Abregung in Abhängigkeit der STED-Laserleistung mit biexponentieller Anpassung der Simulationsdaten.

Die Ergebnisse in diesem Kapitel zeigen die Zeitabhängigkeit und den Einfluss wichtiger Parameter auf die STED-Effizienz. Ebenso dient diese Untersuchung dazu, das Verständnis für die Fluoreszenzfarbstoffe zu erhöhen. Das Modell erlaubt eine schnelle Berechnung des optimalen Abregungszeitpunkts, um eine möglichst hohe STED-Effizienz zu erzielen. Werden andere Laserparameter verwendet, kann der Verlauf der Fluoreszenzintensität mittels numerischer Methoden vorausgesagt werden. Die Kombination aus Messung und Simula-

tion erlaubt weiter die Extraktion molekulspezifischer Kenngrößen, welche sonst nur mit hohem experimentellen Aufwand gewonnen werden können.

4.4 Charakterisierung der nichtlinearen Anregung

4.4.1 Summenfrequenz-Anregung mit $\text{Fe}(\text{IO}_3)_3$

In dieser Arbeit wird eine neuartige Laserkombination bestehend aus einem Ultrakurzpuls-Faserlaser sowie einem faserverstärkten Diodenlaser mit Pulsdauern im Pikosekunden-Bereich verwendet. Die 2C2P-Anregung basiert auf einer räumlichen und zeitlichen Überlagerung beider Laserpulse. Für die Verwendung dieser Laserkombination ist die Charakterisierung der nichtlinearen Anregung unerlässlich. Die experimentelle Untersuchung dient einerseits dazu, den Diodenlaser im Kurzpulsmodus zu charakterisieren und andererseits dazu den relativen Zeitversatz zwischen beiden Pulsen zu finden, welcher zur besten Anregung führt. Um eine direkte nichtlineare Anregung zu erzielen und die Messung beeinträchtigende Effekte, wie Photobleichen, zu vermeiden, wird für diese Untersuchung eine Methode basierend auf SFG verwendet (s. Abschnitt 3.4.3). Die Probe beinhaltet das kristalline Pulver $\text{Fe}(\text{IO}_3)_3$ und wird zur Summenfrequenz-Erzeugung verwendet, wodurch das emittierte Signal in einem definierten, schmalbandigen spektralen Bereich detektiert wird. Das zeitliche Kreuzkorrelationssignal mit Variation des Pulsabstandes zwischen fs-Laser und STED-Laser im Kurzpulsmodus gibt direkt den zeitlichen Pulsverlauf des Diodenlasers wieder. Der fs-Laser hat eine Pulsdauer von ca. 100 fs. Nach Durchlaufen der Mikroskopoptiken wird der Puls auf ca. 130 fs zeitlich verbreitert. Dies liegt an der Gruppen-Geschwindigkeits-Dispersion (GDD) der Optiken von ca. 3035 fs^2 [104]. Die Pulsbreite τ_{KK} des Korrelationssignals, ergibt sich aus den Pulsbreiten des fs-Lasers τ_1 und des Pikosekundenlasers τ_2 entsprechend:

$$\tau_{KK} = \sqrt{\tau_1^2 + \tau_2^2} \quad (4.4)$$

Da die Pulsdauer des fs-Lasers gegenüber der Pulsdauer des STED-Lasers im Kurzpulsmodus viel kleiner ist, ist ihr Beitrag dieser zur gemessenen Pulsdauer τ_{KK} zu vernachlässigen. In Abbildung 4.13(a) sind exemplarisch mikroskopische Aufnahmen von $\text{Fe}(\text{IO}_3)_3$ -Kristallen für unterschiedliche Pulsabstände gezeigt. Überlappen die Pulse zeitlich nicht, findet keine Summenfrequenz-Anregung statt, und es wird kein Signal detektiert. Mit zunehmenden Überlapp steigt die Signalintensität an bis sie ein Maximum erreicht. Wird der Pulsabstand weiter vergrößert, nimmt die Signalintensität wieder ab. In Abbildung 4.13(b) ist der detaillierte Intensitätsverlauf in Abhängigkeit des Pulsabstandes $\Delta\tau$ für den Bereich in Abb. 4.13(a), Bild 3, weißes Rechteck, gezeigt. Die Zeitschritte betragen 10 ps. Der Zeitpunkt der maximalen Anregung wird als „Zeit-Null“ definiert. Die Einstellungen des Pikosekundenverzögerers für die Zeit-Null werden abgespeichert und finden bei der späteren Bildgebung Anwendung. Die Intensitätswerte bzgl. der mikroskopischen Aufnahmen aus Abb. 4.13(a) sind mit 1 bis 5 gekennzeichnet. Der Puls des Diodenlasers

besteht aus einem Hauptpeak sowie einer breiten Schulter. Die Anpassung einer Gauss-Kurve an den Hauptpeak (innere Abbildung in Abb. 4.13(b)), zeigt eine Halbwertsbreite von $\tau_{P,2} = 41$ ps. Dies entspricht der spezifizierten Pulsdauer. Die breite Schulter hingegen zeigt eine zeitliche Pulsbreite von mehr als 100 ps. Da für die 2C2P-Anregung nur eine Interaktion beider Pulse bei zeitlichem Überlapp besteht wird der Kurzpuls laser zeitlich so verzögert, dass fs- und STED-Kurzpuls für die maximale Anregung überlappen. Aufgrund der zeitlichen Pulsform des Diodenlasers, fällt die Intensität nachfolgend der Anregung innerhalb von 30 ps auf 0 ab. Das mittlere Signal-zu-Rausch Verhältnis beträgt im Falle maximaler Anregung $\text{SNR} > 20$ und zeigt damit, dass nur die Kombination beider Laser zu einer Anregung führt. Die Pulsspitzenleistung \hat{P}_1 des fs-Lasers beträgt für diese Messung 900 W. Der Pikosekundenlaser hat eine Pulsspitzenleistung von $\hat{P}_2 = 11$ W, bezogen auf die gemessene Pulsbreite $\Delta\tau_2 = 41$ ps. Ein Vorteil bei der Verwendung der hier vorgestell-

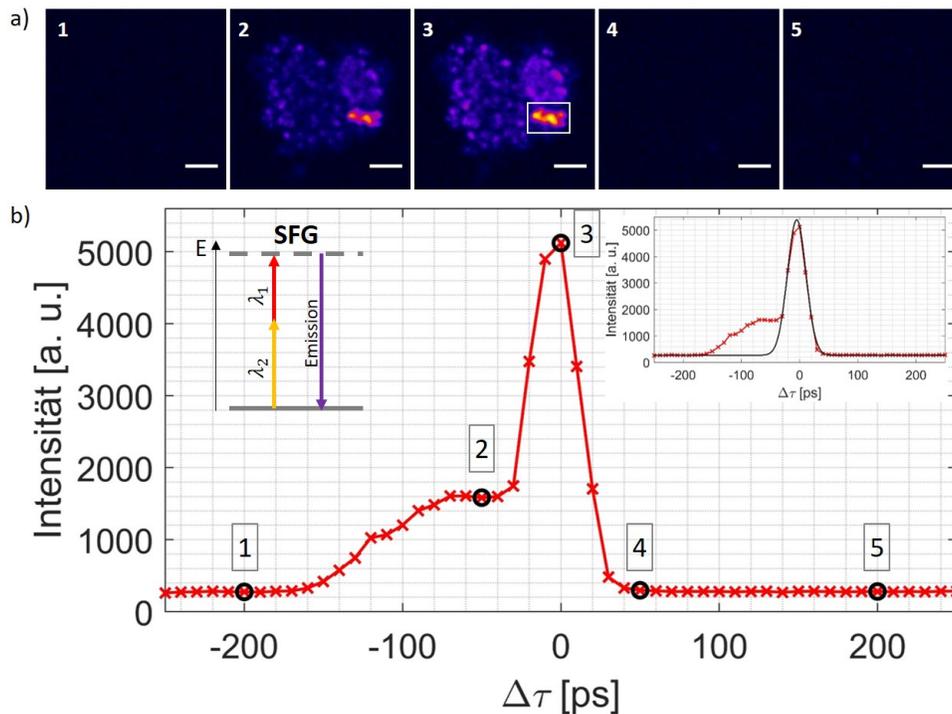


Abbildung 4.13: Charakterisierung der nichtlinearen Anregung mittels SFG zur Vermessung des STED-Laserspulses im Kurzpulsmodus. a) Mikroskopische SFG-Aufnahmen in Abhängigkeit des zeitlichen Pulsabstandes $\Delta\tau$ zwischen den beiden Laserpulsen. Skalierung: 2 μm . b) Mittleres Kreuzkorrelationssignal der ROI (weißes Rechteck in (a)). Die Zahlen markieren den zeitlichen Pulsabstand entsprechend der Aufnahmen in a). Die innere Abbildung zeigt eine Gauss-Kurvenanpassung an den Hauptpeak. Die Halbwertsbreite beträgt 41 ps. Abbildung nach [95].

ten Kombination, ist die Robustheit gegenüber zeitlichen Schwankungen. So hat ein Jitter des Femtosekundenlasers in Relation zum Pikosekundenlasers kaum Auswirkungen auf die

Signalintensität. Zudem kann aufgrund der spezifischen Anregung des SFG-Prozesses die Signalintensität über die Leistung des fs-Lasers skaliert werden.

4.4.2 Nichtlineare Fluoreszenz-Anregung

Eine untergrundfreie Bildgebung mittels 2C2P setzt die Anregung aus nur der Kombination beider Laserpulse voraus. Dabei soll also weder eine direkte 2P-Anregung durch den fs-Laser noch durch den STED-Laser des für die 2C2P-Anregung verwendeten Fluoreszenzfarbstoffs (ATTO425) auftreten. Diese Bedingung ist eine notwendige Voraussetzung für eine hohe Lokalisationspräzision. Daher wird untersucht, ob in der fluoreszenzbasierten Bildgebung eine untergrundfreie Anregung der Gegenfärbung (vgl. Abschnitt 3.4.1) möglich ist. Der energetische Übergang für diese Bedingung ist schematisch im Jablonski-Diagramm in Abbildung 4.14 gezeigt. Aufgrund der spektral breiten Absorptionsbanden

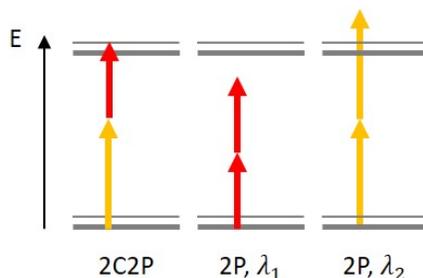


Abbildung 4.14: Für eine spezifische, untergrundfreie Anregung mittels 2C2P darf nur die Kombination aus $\lambda_1 = 1034$ nm und $\lambda_2 = 775$ nm zur Anregung führen. Die Übergangswahrscheinlichkeit für eine direkte 2P-Anregung durch entweder λ_1 oder λ_2 sollte möglichst klein bzw. null sein.

der 2P-Absorption ist eine direkte Anregung nicht ausgeschlossen und wird daher an dem biologischen Zielsystem *S. pneumoniae* TIGR4 untersucht. Abbildung 4.15(a) zeigt eine Kette dreier Pneumokokken im Phasenkontrastbild, die 2C2P-Fluoreszenzaufnahme ist in (b) gezeigt. Das mittlere Signal-zu-Rausch-Verhältnis beträgt in Bezug auf das maximale Signal mindestens $\text{SNR} = 15$ für die 2C2P-Anregung. Für die Auswertung des Untergrunds wird die Intensität über der in Abb. 4.15(b) gezeigten Linie für die drei unterschiedlichen Anregungen ausgewertet. Dazu wird einmal die Kombination beider Laser eingestrahlt, einmal nur λ_1 , und einmal nur λ_2 , wobei jeweils ein Fluoreszenzbild bei gleichen Laser- und Aufnahmeparametern generiert wird.

Die Auswertung (Abbildung 4.15(e)) ergibt, dass eine direkte 2P-Anregung zu einer maximalen Zählrate von weniger als 700 für λ_1 und zu einer maximalen Zählrate von ca. 950 für λ_2 führt. Die maximale Zählrate für die 2C2P-Anregung hingegen liegt über 8600. Gegenüber der 2C2P-Anregung stellt dies für λ_1 eine 12-fache Überhöhung und für λ_2 eine

9-fache Überhöhung des Signals dar und ermöglicht damit einen ausreichend hohen Kontrast für die 2C2P-Bildgebung. Die mittlere Leistung der Laser ist konstant für alle Messungen. Die Signalüberhöhung resultiert ausschließlich aus der Zweifarben-Zweiphotonen-Anregung. Die gute Anregung ergibt sich aus der Übereinstimmung der virtuellen 2C2P-Anregungswellenlänge mit dem Absorptionsmaximum des ATTO425. Eine wichtige Erkenntnis liegt aber auch darin, dass nur eine schwache direkte 2P-Anregung mit einer der beiden Wellenlängen stattfindet. Damit ist dieser Farbstoff sehr gut geeignet, um in dieser Wellenlängen- bzw. Pulsdauer-Kombination als Gegenfärbung eingesetzt zu werden. Die Arbeiten von beispielsweise Mahou [36] oder Stringari [37] nutzen diesen Effekt an Fluoreszenzproteinen aus, um mit wenigen Lasersystemen viele verschiedene Farbstoffe anzuregen oder auch mittels nichtlinearer Prozesse spezifische Signale erzeugen zu können. Der in der vorliegenden Arbeit verwendete ATTO425 stellt in Kombinationen mit diesen gängigen Laserwellenlängen eine gute Wahlmöglichkeit für den Einsatz eines im blauen Spektralbereich fluoreszierenden Farbstoffs dar. Im nachfolgenden Kapitel werden die bis-

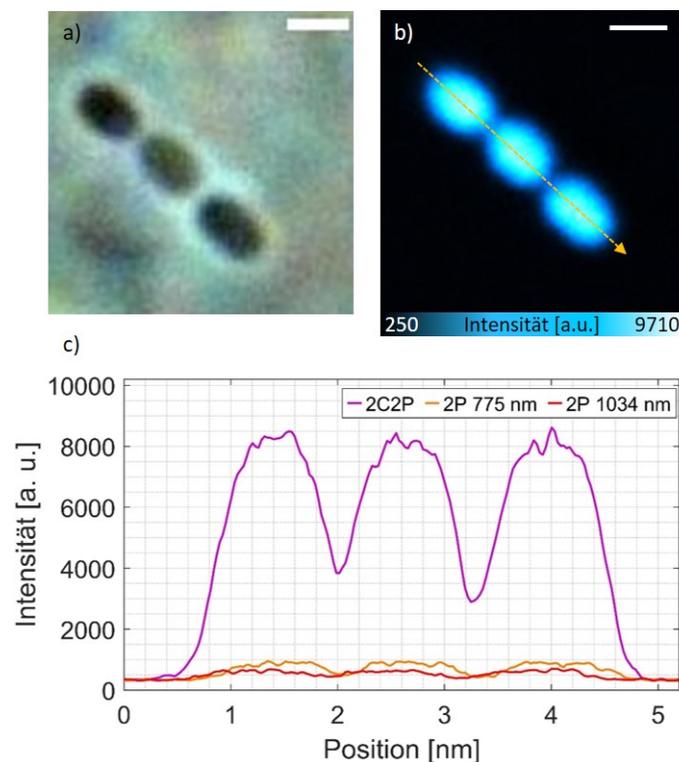


Abbildung 4.15: Charakterisierung der Anregung mittels 2C2P, 2P-Anregung bei 1034 nm und 775 nm. a) Phasenkontrastbild. b) 2C2P-Aufnahme der mit ATTO425 markierten Bakterien. c) 2P-Aufnahme mit $\lambda_1 = 1034$ fs der mit AlexaFluor594 markierten RrgB-Komponenten. d) Schematische Darstellung des Jablonski-Diagramm mit Darstellung des 2C2P-Übergangs und der nicht gewünschten aber evtl. vorliegenden 2P Übergänge mit $\lambda_1 = 1034$ nm und $\lambda_2 = 775$ nm. e) Intensitätsprofil für die drei möglichen Übergänge über die in (b) gezeigte Linie für den Blaukanal. Skalierung a) - c) 1 μm . Abbildung nach [95].

her gewonnenen Erkenntnisse zusammengefasst und an *Streptococcus pneumoniae* TIGR4 Pilus Typ-1 angewendet, um supraauflösende Bilder der Substruktur zu generieren und die Organisation der Pili gegenüber der Bakterien darzustellen.

4.5 Zweifarben-Zweiphotonen STED-Mikroskopie von *Streptococcus pneumoniae* Pilus Typ-1

In diesem Abschnitt wird 2C2P-STED unter Berücksichtigung der bisherigen Ergebnisse an *Streptococcus pneumoniae* TIGR4 Pilus Typ-1 und spezifischer Färbung der Pili mittels Immunofluoreszenz angewendet. Die Pili sind aus den drei Proteinen RrgA, RrgB und RrgC aufgebaut (s. Abschnitt 3.4.4). Die RrgB-Komponenten sind dabei mit dem für STED geeigneten Fluoreszenzfarbstoff AlexaFluor594 markiert. Wie auch bei den vorherigen Experimenten mit *S. pneumoniae* ist das Zytoplasma der Bakterien mit ATTO425 markiert und bildet die Gegenfärbung.

Das Vorgehen der Bildgebung findet mit einer voll automatisierten Prozedur nach dem in Abschnitt 3.1 beschriebenen Prinzip statt. Zuerst wird mit den Laserparametern für die 2C2P-Bildgebung eine beugungsbegrenzte mikroskopische Aufnahme erzeugt, wobei mittels 2C2P sowohl Strukturen der Gegenfärbung (ATTO425), als auch über 2P-Anregung mit AlexaFluor594 markierte Strukturen abgebildet werden. In Abbildung 4.16(a.1) sind über TPEF die mit AlexaFluor594 markierten RrgB-Komponenten mit beugungsbegrenzter Auflösung gezeigt. Die Bakterien sind mittels 2C2P (a.2) dargestellt. RrgB-Komponenten bilden den Aufbau des Pilus. Die Färbemethode ist spezifisch gegenüber dem Strukturprotein des Pilus RrgB. Allerdings besteht die Möglichkeit, dass lediglich RrgB-Komponenten und keine vollständig ausgebildeten Pili vorliegen, was bei der Bewertung der Aufnahmen berücksichtigt werden muss. In diesem ersten Schritt liegt bereits ein vollständig beugungsbegrenztes Bild mit einer präzisen Lokalisation der Strukturen zueinander vor. Dies ist auch aufgrund der zeitlichen Pulsform des KurzpulsLasers mit $\lambda_2 = 775$ nm gegeben: Die maximale 2C2P-Anregung findet bei einem zeitlichen Pulsversatz zwischen fs-Laser (λ_1) und STED-Laser im Kurzpulsmodus statt, wobei die Intensität des Pikosekundenpulses bereits nach 20 ps auf weniger als die Hälfte abgefallen ist und somit keine stimulierte Emission des angeregten AlexaFluor594 induziert. Damit können die Signale beider Fluoreszenzfarbstoffe zeitgleich mit einem hohen Signal-zu-Rausch-Verhältnis detektiert werden. Die Zählraten liegen für die TPEF-Bildgebung über 3600 und für die 2C2P-Aufnahme um ca. 1600. Für diese Aufnahmen wird der Resonanz-Galvo-Scanner mit einer Bildrate von 7,4 Bildern pro Sekunde verwendet. Die Bilder sind über 60 Aufnahmen gemittelt, wodurch die Aufnahmezeit 8,1 s beträgt.

In einem zweiten Schritt wird das System automatisch für die 2P-STED-Bildgebung durch Änderung der zeitlichen Laserparameter des STED-Lasers sowie der Phasenmodulation mit einer Vortex-Phase konfiguriert. Anschließend findet eine Bildaufnahme im STED-Modus

statt. Das resultierende supraaufgelöste Bild ist in Abbildung 4.16(a.3) gezeigt. In dieser Bildgebung entsteht nur Fluoreszenzsignal von AlexaFluor594, da aufgrund der zeitlichen Differenz von fs- und STED-Laser sowie der längeren Pulsdauer des STED-Lasers keine 2C2P-Anregung stattfindet. Die Aufnahmezeit beträgt ebenfalls ca. 8,1 s entsprechend einer 60-fachen Mittelung. Der STED-Laser selbst induziert eine geringe Autofluoreszenz in dem zur Stabilisierung verwendeten Einbettmediums ProLong Diamond. Da der spektrale Detektionskanal im roten Spektralbereich relativ groß ist, kann diese Autofluoreszenz gemessen werden. Allerdings enthält dieses Signal keinerlei Information und bildet keine Strukturen ab. Die Signalintensität des Untergrunds beträgt im Mittel 284 bei den für STED verwendeten Laserparametern und ist damit wesentlich kleiner als das eigentliche Signal. Um dennoch die Bildqualität zu erhöhen, wird dieses Signal pixelweise von dem resultierenden STED-Bild abgezogen. Die maximale Zählrate im STED-Bild beträgt 1392 und ist damit geringer gegenüber der TPEF-Aufnahme. Dies ist zu erwarten, da die effektive Anregungs-PSF wesentlich kleiner gegenüber der beugungsbegrenzten PSF ist, und somit weniger Photonen je Pixel detektiert werden. Der fs-Laser hat in beiden Bildgebungsmodi (2C2P und 2P-STED) eine Pulsenergie an der rückwärtigen Apertur des Objektivs von 375 pJ. Der STED-Laser hat im Kurzpulsmodus für die 2C2P-Anregung eine Pulsenergie von 500 pJ und für die STED-Bildgebung im Langpulsmodus 400 pJ.

Die Überlagerung von Abb. 4.16(a.1) und (a.2) liefert das beugungsbegrenzte Bild und stellt die Organisation bzw. Lokalisierung der RrgB-Komponenten gegenüber den Bakterien dar (Abb. 4.16(b)). Die Überlagerung von (a.2) mit (a.3) ergibt die finale 2C2P-STED-Aufnahme und zeigt die Lokalisation der Pilistrukturen in Superauflösung. Speziell aus dieser Aufnahme lässt sich erkennen, dass die Pili vornehmlich an den Polen bzw. in der Äquatorialebene der Bakterien auftreten. Gegenüber der beugungsbegrenzten Auflösung zeigen sich zudem Unterbrechungen bzw. klar voneinander getrennte Strukturen. Die Äquatorialebene entspricht der späteren Zellteilungsebene, dem Teilungsseptum. Somit könnte je nach Wachstumszustand der Bakterien ein Einfluss der Kapsel auf die Piliorganisation bestehen. In Abbildung 4.16(c) ist oben eine vergrößerte Aufnahme des mittleren Bakteriums mit den abgebildeten Pili gezeigt. Neben den Signalmaxima an den Rändern im Bereich der Äquatorialebene der Zelle zeigt sich eine nahezu homogen geschlossene Piliverteilung. Das Signalmaximum an den Rändern könnte dadurch entstehen, dass umlaufende Pilistrukturen aufgrund der axial elongierten PSF des fokussierten Lasers mehr Fluoreszenz in diesem Volumen angeregt wird. Hier würde sich für weitere Untersuchungen anbieten, 3D STED-Aufnahmen mittels einer π -Phasenmaske durchzuführen. In Abb. 4.16(b) unten, ist ebenfalls das mittlere Bakterium mitsamt der Pilistruktur gezeigt. Hier sind klar getrennte Strukturen und Muster zu erkennen, wie sie mit beugungsbegrenzter Auflösung unmöglich zu erkennen sind. In Abbildung 4.16(d) sind Linienprofile für die in (c) durch Pfeile markierte Linien für sowohl die TPEF-Aufnahme als auch für die 2P-STED-Aufnahme ausgewertet. Aus dem Intensitätsverlauf der Linienprofile zeigen die STED-Daten, dass Details der Pili mit einem Abstand von 70 nm deutlich getrennt werden können.

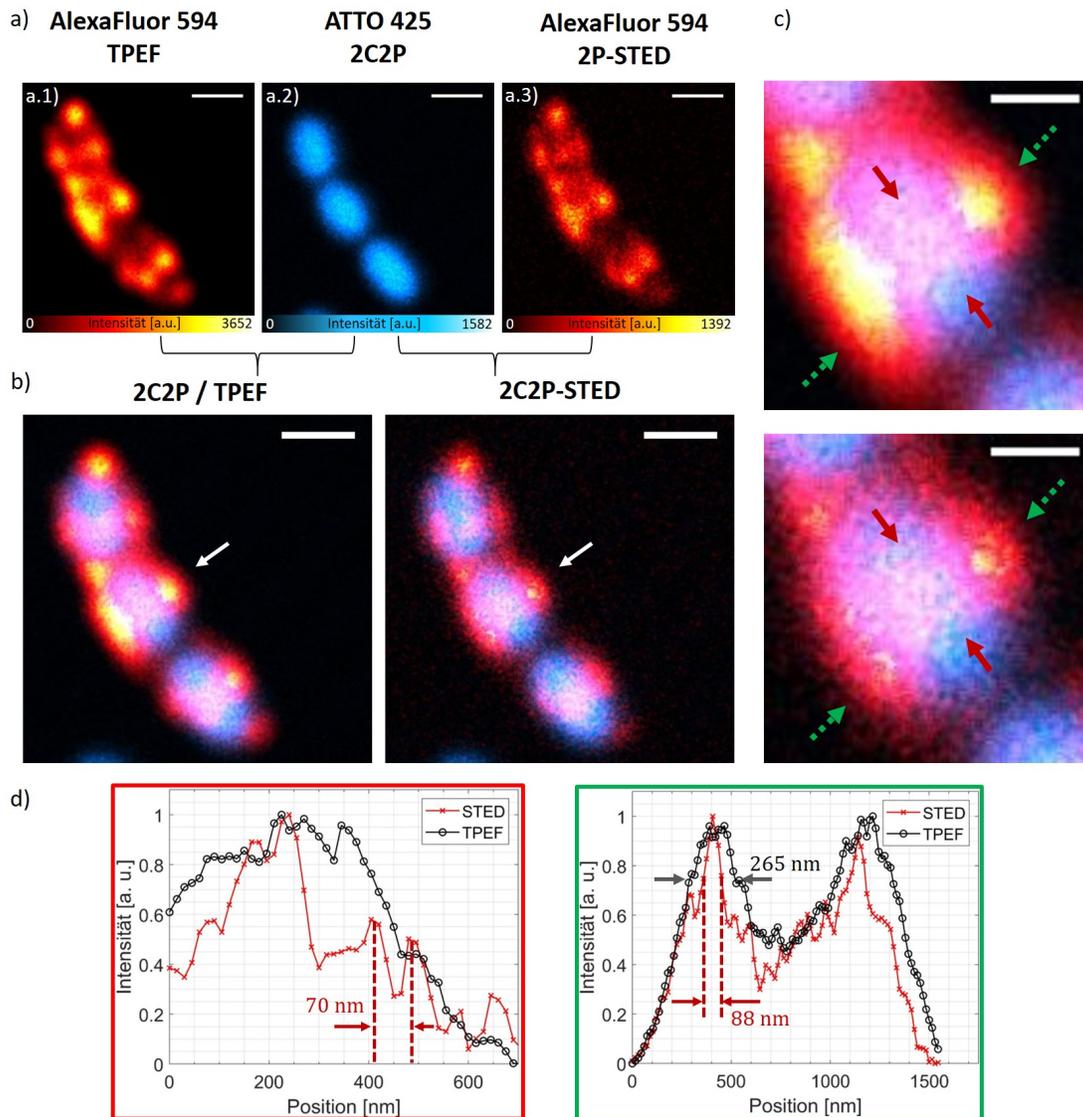


Abbildung 4.16: 2C2P-STED Bildgebung an *S. pneumoniae*. a.1) 2P-Anregung (TPEF) der mit AlexaFluor594 (Rot) markierten RrgB-Komponenten des Pilus Typ-1. a.2) 2C2P-Aufnahme der mit ATTO425 (Cyan) markierten Zellen. a.3) 2P-STED-Aufnahme der RrgB-Komponenten. Die Farbskalierungen mit Intensitätswerten sind unterhalb der Bilder dargestellt. b) Überlagerung der 2C2P und der TPEF Aufnahme ergibt die Organisation der RrgB-Komponenten in TPEF Auflösung. 2C2P-STED zeigt die Organisation der RrgB-Komponenten bzgl. der Gegenfärbung in Superauflösung. Die Pilikomponenten sind vorwiegend an den Polen bzw. an äquatorialen Regionen lokalisiert. c) Die vergrößerte Aufnahme der mittleren Zelle aus (b) zeigt mit 2C2P-STED, dass an der Äquatorialebene eine klare Trennung der Pilikomponenten vorliegt. d) Intensitätsprofile entlang einer Linie markiert durch die Pfeile in (c) der TPEF und der 2P-STED-Aufnahme zeigt deutlich die Auflösungssteigerung. Komponenten mit einem Abstand von ca. 70 nm können getrennt werden. Peaks verschmälern sich von ca. 265 nm auf ca. 88 nm. Skalierung a) und b) 1 μm ; c) 500 nm. Abbildung nach [95].

Die Auflösung des Systems beträgt damit in Kombination mit dieser biologischen Probe und den verwendeten Leistungsparametern mindestens 70 nm. Die Auswertung des Intensitätsprofils entlang der Äquatorialebene zeigt, dass Bereiche einer hohen Dichte von RrgB-Komponenten in 2P-STED eine detailliertere Eingrenzung zulassen. Dies wird an den schmälere Peaks sichtbar. Bei TPEF beträgt die Peakbreite 265 nm. Dieser Wert deckt sich sehr gut mit der in Abschnitt 4.1 simulierten, maximal zu erzielenden Auflösung bei Verwendung von 1034 nm und den in Abschnitt 3.2 beschriebenen optischen Aufbau. Bei STED reduziert sich der Peak in der Halbwertsbreite auf 88 nm und liegt damit deutlich unterhalb der Beugungsgrenze.

Die Verteilung der Pili, wie sie mit 2C2P-STED visualisiert werden konnten, ist detailliert in Abbildung 4.17 gezeigt. Das Übersichtsbild der supraaufgelösten, mit der Gegenfärbung überlagerten Aufnahme ist in Abbildung 4.17(a) gezeigt. Die ROI ist in vergrößerter Darstellung in Abb. 4.17 gezeigt. In weiß sind die durch STED zu erkennenden Substrukturen mit der mikroskopischen Aufnahme überlagert. Zur Gegenüberstellung ist die beugungsbegrenzte TPEF-Aufnahme (Abb. 4.17) gezeigt. Wie bereits erwähnt deuten diese Daten an, dass die Lokalisation der Pili möglicherweise von dem Teilungsseptum bzw. der Kapsel beeinflusst wird. Ein Vergleich mit einer REM-Aufnahme von *S. pneumoniae* aus [105] stützt diese Vermutung. Diese zeigt eine Grabenstruktur der Kapsel, welche in etwa die Dimension der in Abbildung 4.17(b) gezeigten Anordnung der Pili, aufweist. Der gemessene Abstand zwischen beiden Linien beträgt ca. 240 nm. Allerdings sind weitere Experimente nötig, um eine verlässliche Aussage über den Grund dieser speziellen Anordnung treffen zu können. Eine Methode könnte darin bestehen, die Bakterien in unterschiedlichen Wachstumsstadien mit einer gezielten Färbung eines Kapselproteins vorzunehmen.

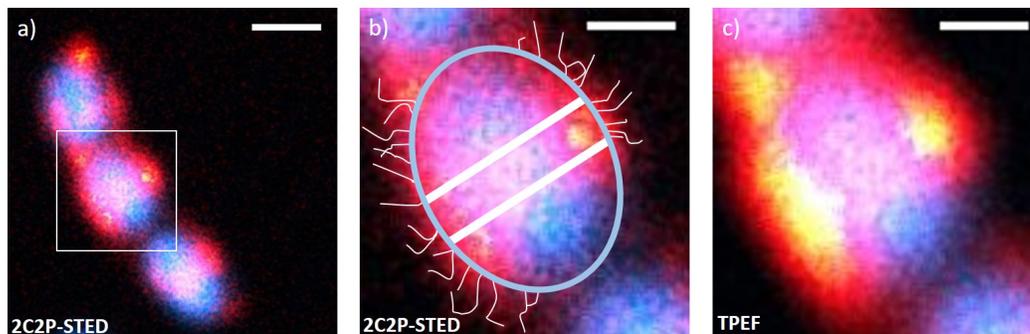


Abbildung 4.17: Vergleich der Lokalisation der Pili auf der Zelloberfläche mit 2C2P-STED. a) 2C2P-STED Übersichtsaufnahme. b) ROI aus (a). In weiß sind die die Pilistrukturen schematisch mit der mikroskopischen Aufnahme überlagert. An der Äquatorialebene zeigt sich eine grabenartige Anordnung (weiße Linien) mit einem Abstand von 240 nm. An den Randbereichen der Zelle zeigen sich einzelne, haarähnliche und von der Zelle abstehende Strukturen. c) TPEF-Aufnahme der gleichen ROI aus (a). Hier sind keinerlei Substrukturen zu erkennen. Skalierung a) 1 µm; b) und c) 500 nm. Daten aus [95].

Aus der Kollokalisierung zwischen Kapsel und RrgB-Komponenten könnten weitere Informationen gewonnen werden. Die hier gezeigten Ergebnisse motivieren eine solche Messreihe, wobei 2C2P-STED aufgrund der hohen Lokalisationspräzision kombiniert mit der hohen optischen Auflösung eine geeignete Methode darstellt. In der 2C2P-STED-Aufnahme zeigen sich in den Randbereichen der Bakterien haarähnliche von der Zelle abstehende Strukturen, welche möglicherweise einzelne Pili darstellen.

Zusammenfassung

Die Methode erzielt eine sehr hohe Auflösung mit einer sehr hohen Lokalisationspräzision. Um die Auflösung weiter zu steigern bzw. die Sensitivität des Systems weiter zu erhöhen, würde sich die Erweiterung der Methode um eine zeitaufgelöste Detektion, wie sie in „Gated-STED“ Anwendung findet, anbieten. Der hier vorgestellte Ansatz von 2C2P-STED ist voll elektronisch gesteuert. Damit ist eine Einbindung zeitkorrelierter Messmethoden einfach umzusetzen. Die hier verwendete Färbemethode der Immunofluoreszenz zeigt mit dem verwendeten Präparationsprotokoll eine hohe Photostabilität, so dass 60 Bilder ohne signifikante Einbußen in der Fluoreszenzintensität aufgenommen werden können. Die Untersuchungen im Rahmen dieser Arbeit haben ergeben, dass trotz der zweifachen Bildgebung, unter Verwendung beider Lasersystem und der nichtlinearen Anregung nur wenig Photobleichen auftritt. Der STED-Laser ist zweimal in die Bildgebung involviert. Daher könnte vermutet werden, dass die Anregung durch den STED-Laser zu einem erhöhten Photobleichen des STED-Farbstoffs führt. Häufig tritt Photobleichen auf, wenn die Moleküle bereits im angeregten Zustand vorliegen und nachfolgend der STED-Laserpuls auftritt [106, 107]. Da aber aufgrund der zeitlichen Geometrie des STED-Lasers im Kurzpulsmodus nur eine signifikante Interaktion des STED-Lasers und dem AlexaFluor594 in den ersten 10 ps stattfindet, ist kaum zusätzliches Photobleichen zu beobachten. Wie bei der Untersuchung der Zeitdynamik des STED-Prozesses diskutiert, beträgt der vibronische Zerfall der angeregten Zustände nach der Anregung bis zu 100 ps, so dass eine Einstrahlung des Lasers mit 775 nm in dieser Zeit noch wenig Auswirkungen hat.

In beide Bildgebungsprozesse sind beide Lasersysteme involviert, wobei zwischen den einzelnen Modi nur die Laserparameter gewechselt, jedoch nicht der optische Strahlengang verändert wird. Dies führt zu einer intrinsischen Korrelation beider Bilder zueinander, da sowohl die 2C2P-Anregung der Gegenfärbung als auch die effektive PSF bei STED um den Laserfokus des fs-Lasers zentriert sind. Mit einer einfachen räumlichen Justage der beiden Laser kann auf diese Art eine physikalische Korrelation zwischen den Bildern sichergestellt werden. Ebenso bietet diese Methode die Möglichkeit, mit zwei oder mehr Farbstoffen markierte Strukturen u. a. mit Superauflösung zu untersuchen. Dies reduziert die Komplexität gegenüber einer linearen 1P-Anregung, bei welcher je nach Farbstoffkombination mindestens drei Lasersystem verwendet werden müssen. Die Anwendung des SLM erlaubt zudem das Wechseln der Phasenmodulation des STED-Lasers mit einer π -Phasenmaske und macht damit eine axiale Auflösungsverbesserung möglich. Mit diesem Ansatz kann auf die Verwendung eines weiteren Laserstrahls verzichtet werden.

Kapitel 5

Ausblick

In dieser Arbeit wurde eine neue nichtlineare STED-Mikroskopie-Methode entwickelt, welche basierend auf der Zweifarben-Zweiphotonen-Anregung eine beugungsbegrenzte mikroskopische Aufnahme mit einer superaufgelösten Aufnahme räumlich korreliert. 2C2P-STED basiert auf einer nichtlinearen Anregung mittels der nicht-entarteten Zweiphotonen-Absorption (2C2P) eines ersten Fluoreszenzfarbstoffs sowie einer 2P-STED-Bildgebung eines zweiten Fluoreszenzfarbstoffs. Um ein grundlegendes Verständnis biologischer Systeme zu erhalten, ist die strukturelle und funktionelle Untersuchung dieser Systeme auf der Nanometerskala unerlässlich. Oftmals ist aber auch die Lokalisation einer Substruktur gegenüber einer anderen Struktur von Interesse, um die Auswirkung dieser Komponente in einem komplexen Organismus nachvollziehen zu können. Aus diesem Grund eignet sich die Anwendung korrelativer Methoden für die Untersuchung einer Vielzahl von Fragestellungen. Gerade in der Virus- oder Bakterienforschung besitzen korrelative Methoden ein hohes Anwendungspotential und tragen wesentlich zum Erkenntnisgewinn bei.

Die Methode wurde mit der Verwendung von nur zwei Lasersystemen technisch umgesetzt und etabliert. Dabei sind beide Laser sowohl in die 2C2P-Anregung als auch in die STED-Bildgebung involviert. Es finden keinerlei Änderungen am optischen Strahlengang während des Wechsels zwischen den Methoden statt, wodurch beide Bilder zueinander referenziert sind. Zum Zweck von 2C2P-STED wurden die technischen Ansätze mit Entwicklung eines voll elektronisch gesteuerten Mikroskops erarbeitet und mit einem optischen Freistrahlaufbau implementiert. Mit einem selbst geschriebenen Programm können die Bildaufnahme, aber auch die für die Bildgebung notwendigen Änderungen der Laserparameter, gesteuert werden. Ein SLM dient zur Phasenmodulation, welcher für die beiden Bildgebungsmodi verwendet werden. Es konnte die effiziente nichtlineare Anregung durch die spezielle Laserkombination aus fs- und Pikosekundenlaser gezeigt werden. Aufgrund der besonderen Eigenschaften der jeweiligen nichtlinearen Prozesse steckt in der Kombination dieser Lasersysteme ein großes Potential für die multimodale, aber auch multispektrale Bildgebung. So besteht neben der rein spektralen Trennung beider Lasersysteme auch die Möglichkeit, durch zeitliche Modulation weitere Prozesse, wie die Summenfrequenz-Anregung, in die Bildgebung zu implementieren. In der STED-Mikroskopie stellen die exakte räumliche und

zeitliche Überlagerung der verwendeten Laserpulse kritische Parameter dar. Mittels 2C2P besteht eine direkte Rückkopplung der Qualität räumlicher und zeitlicher Überlagerung, da im Falle mangelnder Überlagerung kein Signal erzeugt wird. Dies führt dazu, dass der Überlagerungsprozess einfacher gestaltet werden kann, wenn auf das 2C2P-Konzept zurückgegriffen wird. Der nichtlineare Ansatz wurde sowohl in der vorliegenden Arbeit durch numerische Simulation als auch durch Experimente ausführlich charakterisiert.

Es zeigt sich, dass mit 2C2P-STED eine Präzision der Lokalisation von $\pm 30,5$ nm ermöglicht werden kann. Mit den Bildgebungsmodi selbst kann im Fall der 2C2P-Anregung eine Auflösung von 215 nm erzielt werden, und mittels 2P-STED eine Auflösung von 70 nm. Dies wurde neben einer numerischen Berechnung auch experimentell an dem Grampositiven Bakterium *Streptococcus pneumoniae* TIGR4 Pilus Typ-1 gezeigt. Aufgrund der Strukturgröße der Pili [94] und den Bakterien selbst, zeigt sich unter Berücksichtigung der Leistungsfähigkeit von 2C2P-STED, dass die Methode außerordentlich gut geeignet ist, um eine Analyse der Lokalisation der Pili auf der Bakterienoberfläche durchzuführen. Die vorliegenden Ergebnisse motivieren eine weiterführende Untersuchung der Piliorganisation in verschiedenen Wachstumsstadien sowie unter Variation der Gegenfärbung. Ebenso können neue Färbekonzepte der Pili angewendet werden, welche nicht auf Immunofluoreszenz basieren, sondern auf Protein-basierter spezifischer Markierung der RrgB-Komponenten. Diese hätte den Vorteil, dass auch lebende Bakterien untersucht werden können. Ebenso kann das relativ große Konstrukt einer Primär/Sekundär-Antikörper-Färbung gegen Färbemethoden mit wesentlich kleineren, molekularen Konstrukten bei dennoch hoher Spezifität, ersetzt werden. Die Eignung solcher Markierungen gegenüber 2C2P-STED kann in weiteren Arbeiten untersucht werden. Der nichtlineare Ansatz und die Verwendung von Wellenlängen im NIR-Bereich erlauben zudem die Bildgebung in stark streuendem Gewebe [29]. Es wäre also denkbar, diese Methode auch für die Bildgebung in Gewebe mit einer Dicke von mehreren 10 μm bis 100 μm einzusetzen. Auch wäre die Methode für den Einsatz der mikroskopischen Bildgebung synaptischer Strukturen in lebenden Mausmodellen geeignet [108].

Die hier vorgestellten Verfahren und numerischen Methoden erlauben eine Erweiterung von 2C2P-STED hinsichtlich einer Kombination mit anderen etablierten Verfahren, wie der zeitaufgelösten Methode „Gated-STED“ [109] oder polarisations-sensitiven Ansätzen [97]. Die Methode kann auch dahingehend verbessert werden, indem die Bildgebung anstelle zweier aufeinanderfolgender Aufnahme auf einen Aufnahmeprozess reduziert wird. Hierzu müsste eine zeitabhängige Pulsformung erfolgen, welche über die Pulsdauer des STED-Lasers selbst stattfindet. Dies erfordert neue Konzepte der Phasenmaske, welche neben einer effektiven Phasenmodulation entsprechend der in STED eingesetzten Vortex- oder π -Phasenmaske, auch einen Zeitversatz zwischen zwei Teilwellenfronten induzieren. Dieser Zeitversatz muss so groß sein, dass die Überlagerung einer vorlaufenden, nicht-modulierten Teilwellenfront mit einem fs-Laser zur 2C2P-Anregung führt. Der fs-Laser hingegen, führt dem Prinzip von 2C2P-STED folgend, zu einer direkten Anregung des zweiten Farbstoffs. Nach dem durch die Phasenmaske eingebrachten Zeitversatz formt sich der STED-

Laserspuls zu einem für STED typischerweise eingesetzten Abregungsprofil um. Da der STED-Laserpuls zeitlich wesentlich länger als der fs-Lasers ist, wird mittels stimulierter Emission der zweite Farbstoff stimuliert abgeregt und eine Superauflösung erzeugt. Alternativ zur Entwicklung einer solchen speziellen Phasenmaske kann die Umsetzung direkt durch ein Lasersystem mit den notwendigen Parametern realisiert werden.

Diese Arbeit trägt wesentlich dazu bei, das Verständnis für die nichtlineare Mikroskopie und ihren Einsatz in den biomedizinischen Grundlagenforschung weiterzuentwickeln. Neben den vorgestellten und charakterisierten Methoden zur räumlichen und zeitlichen Überlagerung der Lasersysteme, ist die Anwendung eines räumlichen Lichtmodulators innerhalb dieser Methode ausführlich dargelegt. Die besonderen Erkenntnisse aus den numerischen Berechnungen und der experimentellen Untersuchung hinsichtlich Auflösung und Präzision der Kolokalisation bilden ein gutes Entscheidungskriterium, welche Methode für welche Fragestellung verwendet werden kann. Diese Arbeit vereinigt die nichtlineare Zweifarben-Zweiphotonen-Anregung mit der STED-Mikroskopie und stellt Konzepte dar, wie die weitere Entwicklung fortgeführt werden kann, aber auch welche Einsatzgebiete mit dieser Methode adressiert werden können.

Anhang A

Integrale zur Berechnung der Punktspreizfunktionen

Die Simulation der Punktspreizfunktionen erfolgt über die in Abschnitt 2.4 beschriebenen Theorie zur Fokussierung von Laserstrahlung mit hoher numerischer Apertur. Um die Auswirkung verschiedener Polarisationszustände auf die nichtlineare Anregung zu untersuchen, werden die elektrischen Felder im Bereich des Fokus für die Polarisationszustände LCP, RCP, LHP und LVP berechnet. Die vollständigen Integrale sind im Folgenden dargestellt. Die Phase $\exp(i\Delta\Gamma)$ beschreibt die Phasenmodulation für STED. Im Falle der lateralen Auflösungsverbesserung (Vortex) ist $\Delta\Gamma = \phi$ und für eine axiale Auflösungsverbesserung $\Delta\Gamma = \pi$ bzw. $\Delta\Gamma = 0$ (vgl. Abschnitt 2.3.2). Für ein aberrationsfreies optisches System gilt $A_{ab}(\theta, \phi) = 1$, andernfalls ist $A_{ab}(\theta, \phi) = e^{iA_{ab,0}R_n^m(r) \cos(m\phi)}$ entsprechend Gleichung 2.17 für die jeweilige Aberration gegeben.

Linkszirkularer Polarisationszustand

$$\begin{aligned} \vec{E}(r, \theta, \phi) = & \begin{pmatrix} E_x \\ E_y \\ E_z \end{pmatrix} = \\ & -\frac{if}{\lambda} \int_0^\alpha \int_0^{2\pi} A_0 A_{ab}(\theta, \phi) e^{-(\gamma \frac{\sin\theta}{\sin\alpha})^2} \sqrt{\cos\theta} e^{ik(x \sin\theta \cos\phi + y \sin\theta \sin\phi + z \cos\theta)} \\ & \cdot \begin{pmatrix} \cos^2\phi \cos\theta + \sin^2\phi + i(\cos\phi \sin\phi(\cos\theta - 1)) \\ \cos\phi \sin\phi(\cos\theta - 1) + i(\sin^2\phi \cos\theta + \cos^2\phi) \\ -\sin\theta(\cos\phi + i \sin\phi) \end{pmatrix} e^{i\Delta\Gamma(\theta, \phi)} \sin\theta d\phi d\theta \end{aligned} \tag{A.1}$$

Rechtszirkularer Polarisationszustand

$$\begin{aligned}
\vec{E}(r, \theta, \phi) &= \begin{pmatrix} E_x \\ E_y \\ E_z \end{pmatrix} = \\
&= -\frac{if}{\lambda} \int_0^\alpha \int_0^{2\pi} A_0 A_{ab}(\theta, \phi) e^{-\left(\gamma \frac{\sin \theta}{\sin \alpha}\right)^2 \sqrt{\cos \theta}} e^{ik(x \sin \theta \cos \phi + y \sin \theta \sin \phi + z \cos \theta)} \cdot \\
&\cdot \begin{pmatrix} \cos^2 \phi \cos \theta + \sin^2 \phi - i(\cos \phi \sin \phi (\cos \theta - 1)) \\ \cos \phi \sin \phi (\cos \theta - 1) - i(\sin^2 \phi \cos \theta + \cos^2 \phi) \\ -\sin \theta (\cos \phi - i \sin \phi) \end{pmatrix} e^{i\Delta\Gamma(\theta, \phi)} \sin \theta d\phi d\theta
\end{aligned} \tag{A.2}$$

Linear horizontaler Polarisationszustand

$$\begin{aligned}
\vec{E}(r, \theta, \phi) &= \begin{pmatrix} E_x \\ E_y \\ E_z \end{pmatrix} = \\
&= -\frac{if}{\lambda} \int_0^\alpha \int_0^{2\pi} A_0 A_{ab}(\theta, \phi) e^{-\left(\gamma \frac{\sin \theta}{\sin \alpha}\right)^2 \sqrt{\cos \theta}} e^{ik(x \sin \theta \cos \phi + y \sin \theta \sin \phi + z \cos \theta)} \cdot \\
&\cdot \begin{pmatrix} \cos^2 \phi \cos \theta + \sin^2 \phi \\ \cos \phi \sin \phi (\cos \theta - 1) \\ -\sin \theta \cos \phi \end{pmatrix} e^{i\Delta\Gamma(\theta, \phi)} \sin \theta d\phi d\theta
\end{aligned} \tag{A.3}$$

Linear vertikaler Polarisationszustand

$$\begin{aligned}
 \vec{E}(r, \theta, \phi) &= \begin{pmatrix} E_x \\ E_y \\ E_z \end{pmatrix} = \\
 &= -\frac{if}{\lambda} \int_0^\alpha \int_0^{2\pi} A_0 A_{ab}(\theta, \phi) e^{-(\gamma \frac{\sin \theta}{\sin \alpha})^2} \sqrt{\cos \theta} e^{ik(x \sin \theta \cos \phi + y \sin \theta \sin \phi + z \cos \theta)} \cdot \\
 &\cdot \begin{pmatrix} \cos \phi \sin \phi (\cos \theta - 1) \\ \sin^2 \phi \cos \theta + \cos^2 \phi \\ -\sin \theta \cos \phi \end{pmatrix} e^{i\Delta\Gamma(\theta, \phi)} \sin \theta d\phi d\theta
 \end{aligned} \tag{A.4}$$

Wichtige Aberrationsfunktionen

Die wichtigsten Aberrationsfunktionen basierend auf den Zernike-Polynomen $Z_n^m(r, \phi)$ sind nachfolgenden dargestellt:

$$\text{Tilt} \quad Z_1^1 : A_{Ab,tilt}(\theta, \phi) = e^{-iA_{tilt} \left(\frac{\sin \theta}{\sin \alpha} \right) \cos \phi} \tag{A.5}$$

$$\text{Defokus} \quad Z_0^2 : A_{Ab,df}(\theta, \phi) = e^{-iA_{df} \left(2 \left(\frac{\sin \theta}{\sin \alpha} \right)^2 - 1 \right)} \tag{A.6}$$

$$\text{Koma} \quad Z_3^1 : A_{Ab,koma}(\theta, \phi) = e^{-iA_{koma} \left(3 \left(\frac{\sin \theta}{\sin \alpha} \right)^3 - 2 \left(\frac{\sin \theta}{\sin \alpha} \right) \right) \cos \phi} \tag{A.7}$$

$$\text{Astigmatismus} \quad Z_3^1 : A_{Ab,asti}(\theta, \phi) = e^{-iA_{asti} \left(\frac{\sin \theta}{\sin \alpha} \right)^2 \cos(2\phi)} \tag{A.8}$$

Anhang B

Fluoreszenzfarbstoffe

Die Eignung gängiger Fluorophore für die nichtlineare Anregung bzw. STED hängt im Wesentlichen von der verwendeten Wellenlängenkombination der Laser ab. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde eine Vielzahl unterschiedlicher Fluorophore getestet. Aus diesen Untersuchungen kann ein übersichtliches Schema abgeleitet werden, welche Fluorophore für die 2P- und 2C2P-Anregung sowie STED geeignet sind.

Die Bewertung findet hierbei bei gleichen oder ähnlichen Laserparametern, Integrationszeiten und Einstellung der Detektorverstärkung statt. Ebenso wurden die Fluorophore an biologischen Systemen oder an Nanopartikeln unter Variation der Probenpräparation getestet. Gemittelt über die Ergebnisse, findet eine qualitative Einordnung der Fluorophore für entweder die 2P-Anregung durch $\lambda_1 = 1034$ nm, $\lambda_2 = 775$ nm der Zweifarben-Zweiphotonen-Anregung mit der direkten virtuellen Wellenlänge $\lambda_{2C2P,1P} = 886$ nm aber auch für STED bei $\lambda_{STED} = 775$ nm statt. Um eine von der Pulsdauer unabhängige Aussage treffen zu können, wurde für die 2C2P-Anregung ein zum 1034 nm-Laser synchronisierter 780 nm-Laser mit Pulsdauern von ebenfalls 100 fs verwendet. Hierzu wird ein Teil der Strahlung aus dem Erbium Oszillator (vgl. Abschnitt 3.2.1) mit 1560 nm über eine Frequenzverdopplung an einem Kristall auf 780 nm verdoppelt. Die Einordnung der Fluoreszenzfarbstoffe ist graphisch in Abbildung B.1 gezeigt. Die Einordnung einer speziellen Form der Anregung findet als Vergleich gegenüber den jeweils anderen statt. Hierbei bedeutet Grün eine sehr Effiziente Anregung, Orange entspricht einer mittleren Anregung und Rot bedeutet nur einer sehr schwache bzw. keine Anregung mit vergleichbaren Laserparametern. Die Bewertung der 2C2P-Anregung findet gegenüber der jeweils separaten Anregung, durch einen der beiden Laser, statt, wobei nur die Signalüberhöhung bei zeitlichem Überlapp entscheidend ist. Für die Experimente wird also das Signal bei Auftreffen eines jeden einzelnen Lasers, aber auch in der Kombination beider Laser allerdings mit zeitlichem Versatz, gemessen. Anschließend wird ein zeitlicher perfekter zeitlicher Überlapp eingestellt und das 2C2P-Signal gemessen. Die gezeigte Übersicht dient für eine schnelle Übersicht und soll als ein qualitatives Entscheidungskriterium fungieren. Letztlich muss das jeweilige Fluorophor immer direkt an der gewünschten Probe in Kombination mit dem verwendeten optischen System getestet werden.

Farbstoff	Exc 1P [nm]	Exc 2P [nm]	Em [nm]	Exc 1034 nm	Exc 780 nm	2C2P	STED @ 775 nm
DAPI	360	700	460	schwach	stark	schwach	nein
Atto 425	437		485	schwach	schwach	stark	nein
Atto 465	452		507	schwach	schwach	stark	nein
Alexa Fluor 488	499	760, 960	521	schwach	schwach	mittel	nein
GFP	488	660, 924	509	schwach	schwach	stark	nein
LysoTracker Yellow HCK-123	480		560	mittel	mittel	mittel	nein
Point Source Yellow-Green	504		515	mittel-schwach	stark	stark	nein
Atto 565	565		587	stark	mittel	nein	schwach
Propidium Iodid	535		617	stark	schwach	schwach	schwach
Di-8-ANEPPS	470	940	633	stark	schwach	mittel	ja
Abberior Star 520 xp	520		630	stark	mittel	stark	ja
Crimson	590	900	607	stark	stark	mittel	ja
Alexa Fluor 594	602		625	stark	schwach	schwach	ja
Abberior Star 635 P	635		660	mittel	stark	mittel	ja
Atto 647N	648		668	mittel-schwach	mittel	mittel	ja
PromoFluor 680	691		710	schwach	mittel	mittel	ja
SpiroChrome SIR	665	845	685	schwach	mittel	mittel	ja

Abbildung B.1: Übersicht über nichtlineare Anregung für eine 2P-Anregung durch $\lambda_1 = 1034$ nm, $\lambda_2 = 775$ nm der Zweifarben-Zweiphotonen-Anregung mit der virtuellen Wellenlänge $\lambda_{2C2P} = 886$ nm aber auch für STED bei $\lambda_{STED} = 775$ nm als qualitatives Entscheidungskriterium.

Aus der in Abbildung B.1 gezeigten Untersuchung geht hervor, dass Fluorophore mit Absorptionsmaxima im blauen Spektralbereich eine geringe Anregung mittels direkter 2P-Anregung mit einer der beiden Wellenlängen aufweisen. Liegt das Anregungsmaximum im ultravioletten Spektralbereich, ist allerdings eine direkte 2P-Anregung mit 780 nm möglich, wie dies am Beispiel von DAPI zu sehen ist. Die beste direkte Anregung durch 1034 nm findet von rotfluoreszierenden Farbstoffen statt. Dies liegt daran, dass die virtuelle 2P-Anregungswellenlänge in diesem Fall bei ca. 517 nm und somit innerhalb des Absorptionsbereich der meisten rotfluoreszierenden Farbstoffe liegt. Eine Anregung mit 780 nm dieser rotfluoreszierenden Farbstoffe ist dagegen nicht so effizient, es sei denn, die Fluorophore weisen ein zweites lokales Absorptionsmaximum um den Bereich der virtuellen 2P-Anregungswellenlänge von 390 nm auf. Farbstoffe, deren Emission im NIR-Bereich liegt, lassen sich nur schlecht mit 1034 nm Anregung, zeigen aber eine mittelstarke Anregung mit 780 nm. Die 2C2P-Anregung ist generell von Fluorophoren im blaufluoreszierenden Spektrum sehr stark ausgeprägt. Mit diesen Fluoreszenzfarbstoffen ist auch eine untergrundfreie Anregung möglich, da wie bereits oben beschrieben, keine direkte 2P-Anregung durch die

involvierten Laser stattfindet. Je röter das Absorptionsmaximum des Fluoreszenzfarbstoffs, desto schwächer zeigt sich die 2C2P-Anregung. Die Eignung für STED ergibt sich aus der Emission im roten Spektralbereich der jeweiligen Fluorophore. So eignen sich blafluoreszierende Fluorophore nicht für STED mit 775 nm, rotfluoreszierende Fluorophore mit einem Absorptionsbereich ab 520 nm dagegen zunehmend. Der Bezug der Eignung für STED zum Absorptionsmaximum hängt auch von der Größe des STOKES-Shifts ab.

Anhang C

Liste der Publikationen

C.1 Veröffentlichungen in Fachzeitschriften

- [P1] D. Artigas, D. Merino, **C. Polzer**, and P. Loza-Alvarez, „Sub-diffraction discrimination with polarization-resolved two-photon excited fluorescence microscopy“, *Optica* 4, 911-918, (2017)
- [P2] M. Mohseni, **C. Polzer**, and T. Hellerer, „Resolution of spectral focusing in coherent Raman imaging“, *Opt. Express* 26, 10230-10241 (2018)
- [P3] S. Kiderlen, **C. Polzer**, J. O. Rädler, D. Docheva, H. Clausen-Schaumann, S. Sudhop, „Age Related Changes in Cell Stiffness of Tendon Stem/Progenitor Cells and a Rejuvenating Effect of ROCK-Inhibition“, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, (2019), 509 (3), pp. 633-854
- [P4] **C. Polzer**, S. Ness, M. Mohseni, T. Kellerer, M. Hilleringmann, J. Rädler, T. Hellerer, „Correlative two-color two-photon excitation STED microscopy“, *Biomed. Opt. Express* 10(9), 4516-4530 (2019)
- [P5] A. Zach, M. Mohseni, **C. Polzer**, J. W. Nicholson, T. Hellerer, „All-fiber widely tunable ultrafast laser source for multimodal imaging in nonlinear microscopy“, *Opt. Letters* 44, 5218-5221 (2019)
- [M1] S. Ness, **C. Polzer**, T. Hellerer, M. Hilleringmann, „Catcher-tag modified pneumococcal pilus subunits as novel strategy for optimized analysis of pilus cell surface biology“, (2019), in Vorbereitung

C.2 Patente und Patentanmeldungen

- [E1] H. Stepp, J. Herms, G. Kniebühler, A. Rühm, G. Hennig, **C. Polzer**, D. Brucker, „Verfahren und Vorrichtung zur Abstandsüberwachung zwischen einer Sonde und einem fluoreszierenden Objekt.“, DE 102013104959 B4, 14.05.2012

- [E2] T. Hellerer, **C. Polzer**, „Pulse Shaping for Stimulated Emission Depletion Microscopy“, Europäisches Patent, 25.01.2019, anhängig
- [E3] **C. Polzer**, T. Hellerer, „Two-Color Confocal Colocalization Microscopy“, Europäisches Patent, 25.01.2019, anhängig

C.3 Konferenzartikel

- [K1] N. Markwardt, A. v. Berg, S. Fiedler, M. Goetz, N. Haj-Hosseini, **C. Polzer**, H. Stepp, P. Zelenkov, A. Rühm, „Optical spectroscopy for stereotactic biopsy of brain tumors“, Proc. SPIE 9542, Medical Laser Applications and Laser-Tissue Interactions VII, 954208 (2015)
- [K2] T. Hellerer, **C. Polzer**, A. Friedenauer, I. Greisberger, B. Wolfring, C. Skrobol, „920 nm fiber laser delivering 100 fs pulses for nonlinear microscopy“, Proc. SPIE 10882, Multiphoton Microscopy in the Biomedical Sciences XIX, (2019)
- [K3] **C. Polzer**, S. Ness, M. Mohseni, M. Hilleringmann, J. Rädler, T. Hellerer, „Nanometer-scale colocalization microscopy of Streptococcus pneumoniae filaments“, Proc. SPIE 10882, Multiphoton Microscopy in the Biomedical Sciences XIX, (2019)

C.4 Artikel

- [A1] T. Hellerer, **C. Polzer**, M. Mohseni, „Nonlinear Microscopy Moves Into the Operating Room“, Biophotonics (2016)

Literaturverzeichnis

- [1] S. Bolte and F. P. Cordelières. A guided tour into subcellular colocalization analysis in light microscopy. *Journal of Microscopy*, 224(3):213–232, 2006.
- [2] Jeffrey Caplan, Marc Niethammer, Russell M. Taylor, and Kirk J. Czymmek. The Power of Correlative Microscopy: Multi-modal, Multi-scale, Multi-dimensional. *Current opinion in structural biology*, 21(5):686–693, October 2011.
- [3] Toshio Ando, Satya Prathyusha Bhamidimarri, Niklas Brending, H Colin-York, Lucy Collinson, Niels De Jonge, P J de Pablo, Elke Debroye, Christian Eggeling, Christian Franck, Marco Fritzsche, Hans Gerritsen, Ben N G Giepmans, Kay Grunewald, Johan Hofkens, Jacob P Hoogenboom, Kris P F Janssen, Rainer Kaufmann, Judith Klumpermann, Nyoman Kurniawan, Jana Kusch, Nalan Liv, Viha Parekh, Diana B Peckys, Florian Rehfeldt, David C Reutens, Maarten B J Roeffaers, Tim Salditt, Iwan A T Schaap, Ulrich S Schwarz, Paul Verkade, Michael W Vogel, Richard Wagner, Mathias Winterhalter, Haifeng Yuan, and Giovanni Zifarelli. The 2018 correlative microscopy techniques roadmap. *Journal of Physics D: Applied Physics*, 51(44):443001, November 2018.
- [4] G. W. A. Dick, S. F. Kitchen, and A. J. Haddow. Zika virus (I). Isolations and serological specificity. *Transactions of the royal society of tropical medicine and hygiene*, 46(5):509–520, 1952.
- [5] WHO. WHO statement on the first meeting of the International Health Regulations (2005) (IHR 2005) Emergency Committee on Zika virus and observed increase in neurological disorders and neonatal malformations, 2015.
- [6] Jernej Mlakar, Misa Korva, Nataša Tul, Mara Popović, Mateja Poljšak-Prijatelj, Jerica Mraz, Marko Kolenc, Katarina Resman Rus, Tina Vesnaver Vipotnik, and Vesna Fabjan Vodusek. Zika virus associated with microcephaly. *New England Journal of Medicine*, 374(10):951–958, 2016.
- [7] Lavinia Schuler-Faccini. Possible association between Zika virus infection and microcephaly—Brazil, 2015. *MMWR. Morbidity and mortality weekly report*, 65, 2016.
- [8] Simon Cauchemez, Marianne Besnard, Priscillia Bompard, Timothée Dub, Prisca Guillemette-Artur, Dominique Eyrolle-Guignot, Henrik Salje, Maria D. Van Kerkho-

- ve, Véronique Abadie, and Catherine Garel. Association between Zika virus and microcephaly in French Polynesia, 2013–15: a retrospective study. *The Lancet*, 387(10033):2125–2132, 2016.
- [9] Mirko Cortese, Sarah Goellner, Eliana Gisela Acosta, Christopher John Neufeldt, Olga Oleksiuk, Marko Lampe, Uta Haselmann, Charlotta Funaya, Nicole Schieber, and Paolo Ronchi. Ultrastructural characterization of Zika virus replication factories. *Cell reports*, 18(9):2113–2123, 2017.
- [10] Ernst Ruska. The development of the electron microscope and of electron microscopy. *Reviews of modern physics*, 59(3):627, 1987.
- [11] David B. Williams and C. Barry Carter. The transmission electron microscope. In *Transmission electron microscopy*, pages 3–17. Springer, 1996.
- [12] Jacques Dubochet, Marc Adrian, Jiin-Ju Chang, Jean-Claude Homo, Jean Lepault, Alasdair W. McDowell, and Patrick Schultz. Cryo-electron microscopy of vitrified specimens. *Quarterly reviews of biophysics*, 21(2):129–228, 1988.
- [13] Marvin Minsky. Memoir on inventing the confocal scanning microscope. *Scanning*, 10(4):128–138, 1988.
- [14] James Pawley. *Handbook of biological confocal microscopy*. Springer Science & Business Media, 2010.
- [15] Ernst Abbe. Beiträge zur Theorie des Mikroskops und der mikroskopischen Wahrnehmung. *Archiv für mikroskopische Anatomie*, 9(1):413–418, 1873.
- [16] Michael J. Rust, Mark Bates, and Xiaowei Zhuang. Sub-diffraction-limit imaging by stochastic optical reconstruction microscopy (STORM). *Nature methods*, 3(10):793, 2006.
- [17] Eric Betzig, George H. Patterson, Rachid Sougrat, O. Wolf Lindwasser, Scott Olenych, Juan S. Bonifacino, Michael W. Davidson, Jennifer Lippincott-Schwartz, and Harald F. Hess. Imaging intracellular fluorescent proteins at nanometer resolution. *Science*, 313(5793):1642–1645, 2006.
- [18] Stefan W. Hell and Jan Wichmann. Breaking the diffraction resolution limit by stimulated emission: stimulated-emission-depletion fluorescence microscopy. *Optics letters*, 19(11):780–782, 1994.
- [19] The Nobel Prize in Chemistry 2014.
- [20] Gael Moneron, Rebecca Medda, Birka Hein, Arnold Giske, Volker Westphal, and Stefan W. Hell. Fast STED microscopy with continuous wave fiber lasers. *Optics express*, 18(2):1302–1309, 2010.

- [21] Volker Westphal, Silvio O. Rizzoli, Marcel A. Lauterbach, Dirk Kamin, Reinhard Jahn, and Stefan W. Hell. Video-rate far-field optical nanoscopy dissects synaptic vesicle movement. *Science*, 320(5873):246–249, 2008.
- [22] U. Valentin Nägerl, Katrin I. Willig, Birka Hein, Stefan W. Hell, and Tobias Bonhoeffer. Live-cell imaging of dendritic spines by STED microscopy. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 105(48):18982–18987, 2008.
- [23] Jörn Heine, Christian A. Wurm, Jan Keller-Findeisen, Andreas Schönle, Benjamin Harke, Matthias Reuss, Franziska R. Winter, and Gerald Donnert. Three dimensional live-cell STED microscopy at increased depth using a water immersion objective. *Review of Scientific Instruments*, 89(5):053701, May 2018.
- [24] Stefan W Hell. Toward fluorescence nanoscopy. *Nature Biotechnology*, 21(11):1347–1355, November 2003.
- [25] Benjamin Harke, Jan Keller, Chaitanya K. Ullal, Volker Westphal, Andreas Schönle, and Stefan W. Hell. Resolution scaling in STED microscopy. *Optics express*, 16(6):4154–4162, 2008.
- [26] Eva Rittweger, Kyu Young Han, Scott E. Irvine, Christian Eggeling, and Stefan W. Hell. STED microscopy reveals crystal colour centres with nanometric resolution. *Nature Photonics*, 3(3):144–147, March 2009.
- [27] Maria Göppert-Mayer. Über Elementarakte mit zwei Quantensprüngen. *Annalen der Physik*, 401(3):273–294, 1931.
- [28] Winfried Denk, James H. Strickler, and Watt W. Webb. Two-photon laser scanning fluorescence microscopy. *Science*, 248(4951):73–76, 1990.
- [29] Fritjof Helmchen and Winfried Denk. Deep tissue two-photon microscopy. *Nature methods*, 2(12):932, 2005.
- [30] Philipp Bethge, Ronan Chéreau, Elena Avignone, Giovanni Marsicano, and U. Valentin Nägerl. Two-photon excitation STED microscopy in two colors in acute brain slices. *Biophysical journal*, 104(4):778–785, 2013.
- [31] Teodora Scheul, Ciro D’Amico, Irène Wang, and Jean-Claude Vial. Two-photon excitation and stimulated emission depletion by a single wavelength. *Optics Express*, 19(19):18036–18048, September 2011.
- [32] Paolo Bianchini, Benjamin Harke, Silvia Galiani, Giuseppe Vicidomini, and Alberto Diaspro. Single-wavelength two-photon excitation–stimulated emission depletion (SW2pe-STED) superresolution imaging. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109(17):6390–6393, 2012.

- [33] Joseph R. Lakowicz, Ignacy Gryczynski, Henryk Malak, and Zygmunt Gryczynski. Two-color two-photon excitation of fluorescence. *Photochemistry and photobiology*, 64(4):632–635, 1996.
- [34] Stefan Quentmeier, Stefan Denicke, Jan-Eric Ehlers, Raluca A. Niesner, and Karl-Heinz Gericke. Two-color two-photon excitation using femtosecond laser pulses. *The Journal of Physical Chemistry B*, 112(18):5768–5773, 2008.
- [35] S. Quentmeier, S. Denicke, and K.-H. Gericke. Two-color two-photon fluorescence laser scanning microscopy. *Journal of fluorescence*, 19(6):1037, 2009.
- [36] Pierre Mahou, Maxwell Zimmerley, Karine Loulier, Katherine S. Matho, Guillaume Labroille, Xavier Morin, Willy Supatto, Jean Livet, Delphine Débarre, and Emmanuel Beaurepaire. Multicolor two-photon tissue imaging by wavelength mixing. *Nature methods*, 9(8):815, 2012.
- [37] Chiara Stringari, Lamiae Abdeladim, Guy Malkinson, Pierre Mahou, Xavier Solinas, Isabelle Lamarre, Sébastien Brizion, Jean-Baptiste Galey, Willy Supatto, Renaud Legouis, Ana-Maria Pena, and Emmanuel Beaurepaire. Multicolor two-photon imaging of endogenous fluorophores in living tissues by wavelength mixing. *Scientific Reports*, 7(1), December 2017.
- [38] S. J. Hultgren. Bacterial adhesins and their assembly. *Escherichia coli and Salmonella typhimurium*, pages 2730–2756, 1996.
- [39] John L. Telford, Michèle A. Barocchi, Immaculada Margarit, Rino Rappuoli, and Guido Grandi. Pili in gram-positive pathogens. *Nature Reviews Microbiology*, 4(7):509, 2006.
- [40] Stefan Fälker, Aaron L. Nelson, Eva Morfeldt, Kristina Jonas, Kjell Hultenby, Johannes Ries, Öjar Melefors, Staffan Normark, and Birgitta Henriques-Normark. Sortase-mediated assembly and surface topology of adhesive pneumococcal pili. *Molecular microbiology*, 70(3):595–607, 2008.
- [41] J. P. Hermann and J. Ducuing. Absolute Measurement of Two-Photon Cross Sections. *Physical Review A*, 5(6):2557–2568, June 1972.
- [42] T. H. Maiman. Stimulated Optical Radiation in Ruby. *Nature*, 187(4736):493, August 1960.
- [43] P. A. Franken, A. E. Hill, C. W. Peters, and G. Weinreich. Generation of Optical Harmonics. *Physical Review Letters*, 7(4):118–119, August 1961.
- [44] W. Kaiser and C. G. B. Garrett. Two-Photon Excitation in CaF₂. *Physical Review Letters*, 7(6):229–231, September 1961.
- [45] Graham Fleming. Chemical applications of ultrafast spectroscopy. 1986.

- [46] Thomas Elsaesser and Wolfgang Kaiser. Vibrational and vibronic relaxation of large polyatomic molecules in liquids. *Annual review of physical chemistry*, 42(1):83–107, 1991.
- [47] Joseph R. Lakowicz. *Principles of fluorescence spectroscopy*. Springer Science & Business Media, 2013.
- [48] Stefanie Kiderlen, Christoph Polzer, Joachim O. Rädler, Denitsa Docheva, Hauke Clausen-Schaumann, and Stefanie Sudhop. Age related changes in cell stiffness of tendon stem/progenitor cells and a rejuvenating effect of ROCK-inhibition. *Biochemical and biophysical research communications*, 509(3):839–844, 2019.
- [49] Helmut J. Koester, Dagmar Baur, Rainer Uhl, and Stefan W. Hell. Ca²⁺ fluorescence imaging with pico- and femtosecond two-photon excitation: signal and photodamage. *Biophysical journal*, 77(4):2226–2236, 1999.
- [50] Alexander Hopt and Erwin Neher. Highly Nonlinear Photodamage in Two-Photon Fluorescence Microscopy. *Biophysical Journal*, 80(4):2029–2036, April 2001.
- [51] Winfried Denk and Karel Svoboda. Photon Upmanship: Why Multiphoton Imaging Is More than a Gimmick. *Neuron*, 18(3):351–357, March 1997.
- [52] Sanaz Sadegh, Mu-Han Yang, Christopher G. L. Ferri, Martin Thunemann, Payam A. Saisan, Anna Devor, and Yeshaiah Fainman. Measurement of the relative non-degenerate two-photon absorption cross-section for fluorescence microscopy. *Optics Express*, 27(6):8335, March 2019.
- [53] Emil Wolf. Electromagnetic diffraction in optical systems-I. An integral representation of the image field. *Proc. R. Soc. Lond. A*, 253(1274):349–357, 1959.
- [54] Ulrike Endesfelder. Super-Resolution Microscopy. A Practical Guide. Von Udo J. Birk. *Angewandte Chemie*, 130(27):8067–8067, 2018.
- [55] Joseph R. Lakowicz, editor. *Topics in Fluorescence Spectroscopy: Nonlinear and Two-Photon-Induced Fluorescence*. Topics in Fluorescence Spectroscopy. Springer US, 2002.
- [56] Albert Einstein. Zur quantentheorie der strahlung. *Phys. Z.*, 18:121–128, 1917.
- [57] Stefan W. Hell. Toward fluorescence nanoscopy. *Nature Biotechnology*, 21(11):1347–1355, November 2003.
- [58] Matthias Reuss, Johann Engelhardt, and Stefan W. Hell. Birefringent device converts a standard scanning microscope into a STED microscope that also maps molecular orientation. *Optics express*, 18(2):1049–1058, 2010.

- [59] M. Massari, G. Ruffato, M. Gintoli, F. Ricci, and F. Romanato. Fabrication and characterization of high-quality spiral phase plates for optical applications. *Applied Optics*, 54(13):4077, May 2015.
- [60] Jun-ichi Hotta, Hiroshi Uji-i, and Johan Hofkens. The fabrication of a thin, circular polymer film based phase shaper for generating doughnut modes. *Optics Express*, 14(13):6273, 2006.
- [61] K. I. Willig, J. Keller, M. Bossi, and S. W. Hell. STED microscopy resolves nanoparticle assemblies. *New Journal of Physics*, 8(6):106, 2006.
- [62] Jan Keller, Andreas Schönle, and Stefan W. Hell. Efficient fluorescence inhibition patterns for RESOLFT microscopy. *Optics Express*, 15(6):3361, 2007.
- [63] David L. Andrews and Mohamed Babiker. *The angular momentum of light*. Cambridge University Press, 2012.
- [64] Alison M. Yao and Miles J. Padgett. Orbital angular momentum: origins, behavior and applications. *Advances in Optics and Photonics*, 3(2):161–204, 2011.
- [65] Brian R. Patton, Daniel Burke, Robert Vrees, and Martin J. Booth. Is phase-mask alignment aberrating your STED microscope? *Methods and applications in fluorescence*, 3(2):024002, 2015.
- [66] Xiang Hao, Cuifang Kuang, Tingting Wang, and Xu Liu. Effects of polarization on the de-excitation dark focal spot in STED microscopy. *Journal of Optics*, 12(11):115707, November 2010.
- [67] B. Richards and E. Wolf. Electromagnetic diffraction in optical systems, II. Structure of the image field in an aplanatic system. *Proc. R. Soc. Lond. A*, 253(1274):358–379, 1959.
- [68] Lars Egil Helseth. Focusing of atoms with strongly confined light potentials. *Optics communications*, 212(4-6):343–352, 2002.
- [69] P. Debye. Das Verhalten von Lichtwellen in der Nähe eines Brennpunktes oder einer Brennlinie. *Annalen der Physik*, 335(14):755–776, January 1909.
- [70] Suhui Deng, Li Liu, Ya Cheng, Ruxin Li, and Zhizhan Xu. Effects of primary aberrations on the fluorescence depletion patterns of STED microscopy. *Optics express*, 18(2):1657–1666, 2010.
- [71] Gordon D. Love. Wave-front correction and production of Zernike modes with a liquid-crystal spatial light modulator. *Applied Optics*, 36(7):1517–1524, March 1997.
- [72] Loling Song, E. J. Hennink, I. Ted Young, and Hans J. Tanke. Photobleaching kinetics of fluorescein in quantitative fluorescence microscopy. *Biophysical journal*, 68(6):2588–2600, 1995.

- [73] Andrzej Molski. Statistics of the bleaching number and the bleaching time in single-molecule fluorescence spectroscopy. *The Journal of Chemical Physics*, 114(3):1142–1147, 2001.
- [74] M Dyba, J Keller, and S W Hell. Phase filter enhanced STED-4pi fluorescence microscopy: theory and experiment. *New Journal of Physics*, 7:134–134, May 2005.
- [75] William M. Irvine and James B. Pollack. Infrared optical properties of water and ice spheres. *Icarus*, 8(1-3):324–360, 1968.
- [76] Peter T C So, Chen Y Dong, Barry R Masters, and Keith M Berland. Two-Photon Excitation Fluorescence Microscopy. page 42, 2000.
- [77] C. Slinger, C. Cameron, and M. Stanley. Computer-generated holography as a generic display technology. *Computer*, 38(8):46–53, August 2005.
- [78] Travis J. Gould, Daniel Burke, Joerg Bewersdorf, and Martin J. Booth. Adaptive optics enables 3d STED microscopy in aberrating specimens. *Optics Express*, 20(19):20998, September 2012.
- [79] Travis J. Gould, Emil B. Kromann, Daniel Burke, Martin J. Booth, and Joerg Bewersdorf. Auto-aligning stimulated emission depletion microscope using adaptive optics. *Optics Letters*, 38(11):1860, June 2013.
- [80] Kyoji Matsushima. Computer-generated holograms for three-dimensional surface objects with shade and texture. *Applied optics*, 44(22):4607–4614, 2005.
- [81] Christian A. Wurm, Daniel Neumann, Roman Schmidt, Alexander Egner, and Stefan Jakobs. Sample preparation for STED microscopy. *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)*, 591:185–199, 2010.
- [82] Chris Xu and Watt W. Webb. Measurement of two-photon excitation cross sections of molecular fluorophores with data from 690 to 1050 nm. *JOSA B*, 13(3):481–491, 1996.
- [83] Stefan W. Hell, Martin Booth, Stefan Wilms, Christoph M. Schnetter, Achim K. Kirsch, Donna J. Arndt-Jovin, and Thomas M. Jovin. Two-photon near-and far-field fluorescence microscopy with continuous-wave excitation. *Optics letters*, 23(15):1238–1240, 1998.
- [84] Mikhail Drobizhev, Nikolay S. Makarov, Shane E. Tillo, Thomas E. Hughes, and Aleksander Rebane. Two-photon absorption properties of fluorescent proteins. *Nature Methods*, 8(5):393–399, May 2011.
- [85] Mary Grace M. Velasco, Edward S. Allgeyer, Peng Yuan, Jaime Grutzendler, and Joerg Bewersdorf. Absolute two-photon excitation spectra of red and far-red fluorescent probes. *Optics letters*, 40(21):4915–4918, 2015.

- [86] Spectra at UA, 2019.
- [87] Alberto Diaspro, Giuseppe Chirico, Cesare Usai, Paola Ramoino, and Jurek Dobrucki. Photobleaching. In *Handbook of biological confocal microscopy*, pages 690–702. Springer, 2006.
- [88] Pierre Mahou, Maxwell Zimmerley, Karine Loulier, Katherine S. Matho, Guillaume Labroille, Xavier Morin, Willy Supatto, Jean Livet, Delphine Débarre, and Emmanuel Beaurepaire. Multicolor two-photon tissue imaging by wavelength mixing. *Nature methods*, 9(8):815, 2012.
- [89] Robert W. Boyd. *Nonlinear optics*. Elsevier, 2003.
- [90] L. Bonacina, Y. Mugnier, F. Courvoisier, R. Le Dantec, J. Extermann, Y. Lambert, V. Boutou, C. Galez, and J.-P. Wolf. Polar Fe(IO₃)₃ nanocrystals as local probes for nonlinear microscopy. *Applied Physics B*, 87(3):399–403, May 2007.
- [91] Robert W. Boyd. Order-of-magnitude estimates of the nonlinear optical susceptibility. *Journal of Modern Optics*, 46(3):367–378, March 1999.
- [92] Publication WHO. Pneumococcal vaccines WHO position paper-2012-recommendations. *Vaccine*, 30(32):4717, 2012.
- [93] M. A. Barocchi, J. Ries, X. Zogaj, C. Hemsley, Barbara Albiger, A. Kanth, S. Dahlberg, J. Fernebro, M. Moschioni, and V. Massignani. A pneumococcal pilus influences virulence and host inflammatory responses. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 103(8):2857–2862, 2006.
- [94] Markus Hilleringmann, Philippe Ringler, Shirley A. Müller, Gabriella De Angelis, Rino Rappuoli, Ilaria Ferlenghi, and Andreas Engel. Molecular architecture of *Streptococcus pneumoniae* TIGR4 pili. *The EMBO journal*, 28(24):3921–3930, 2009.
- [95] Christoph Polzer, Stefan Ness, Mojtaba Mohseni, Thomas Kellerer, Markus Hilleringmann, Joachim Rädler, and Thomas Hellerer. Correlative two-color two-photon (2c2p) excitation STED microscopy. *Biomedical Optics Express*, 10(9):4516, September 2019.
- [96] E. Hebisch, E. Wagner, V. Westphal, J. J. Sieber, and S. E. Lehnart. A protocol for registration and correction of multicolour STED superresolution images. *Journal of Microscopy*, 267(2):160–175, 2017.
- [97] David Artigas, David Merino, Christoph Polzer, and Pablo Loza-Alvarez. Sub-diffraction discrimination with polarization-resolved two-photon excited fluorescence microscopy. *Optica*, 4(8):911–918, August 2017.

- [98] Jong-Chan Lee, Ye Ma, Kyu Young Han, and Taekjip Ha. Accurate Background Subtraction in STED Nanoscopy by Polarization Switching. *ACS Photonics*, 6(7):1789–1797, July 2019.
- [99] Jian Lin, Wei Zheng, and Zhiwei Huang. High-resolution stimulated Raman scattering microscopy by focal-field modulation. In *Multiphoton Microscopy in the Biomedical Sciences XVI*, volume 9712, page 971220. International Society for Optics and Photonics, 2016.
- [100] Li Gong, Jian Lin, Chenglong Hao, Wei Zheng, Steve Qing Yang Wu, Jinghua Teng, Cheng-Wei Qiu, and Zhiwei Huang. Supercritical focusing coherent anti-Stokes Raman scattering microscopy for high-resolution vibrational imaging. *Optics Letters*, 43(22):5615–5618, November 2018.
- [101] John R. Dormand and Peter J. Prince. A family of embedded Runge-Kutta formulae. *Journal of computational and applied mathematics*, 6(1):19–26, 1980.
- [102] Thomas A. Klar, Egbert Engel, and Stefan W. Hell. Breaking Abbe’s diffraction resolution limit in fluorescence microscopy with stimulated emission depletion beams of various shapes. *Physical Review E*, 64(6), November 2001.
- [103] Po-Yen Lin, Yi-Cheng Lin, Chia-Seng Chang, and Fu-Jen Kao. Fluorescence Lifetime Imaging Microscopy with Subdiffraction-Limited Resolution. *Japanese Journal of Applied Physics*, 52:8004, February 2013.
- [104] Mojtaba Mohseni, Christoph Polzer, and Thomas Hellerer. Resolution of spectral focusing in coherent Raman imaging. *Optics express*, 26(8):10230–10241, 2018.
- [105] Anuj Pathak, Jan Bergstrand, Vicky Sender, Laura Spelmink, Marie-Stephanie Aschtgen, Sandra Muschiol, Jerker Widengren, and Birgitta Henriques-Normark. Factor H binding proteins protect division septa on encapsulated *Streptococcus pneumoniae* against complement C3b deposition and amplification. *Nature Communications*, 9(1):3398, August 2018.
- [106] Ioannis Polyzos, Georgios Tsigaridas, Mihalis Fakis, V Giannetas, and P Persephonis. Three-photon induced photobleaching in a three-dimensional memory material. *Optics letters*, 30:2654–6, November 2005.
- [107] S. Kalies, K. Kuetemeyer, and A. Heisterkamp. Mechanisms of high-order photobleaching and its relationship to intracellular ablation. *Biomedical Optics Express*, 2(4):805–816, March 2011.
- [108] Katrin I. Willig, Silvio O. Rizzoli, Volker Westphal, Reinhard Jahn, and Stefan W. Hell. STED microscopy reveals that synaptotagmin remains clustered after synaptic vesicle exocytosis. *Nature*, 440(7086):935–939, April 2006.

- [109] Giuseppe Vicidomini, Gael Moneron, Kyu Y Han, Volker Westphal, Haisen Ta, Matthias Reuss, Johann Engelhardt, Christian Eggeling, and Stefan W Hell. Sharper low-power STED nanoscopy by time gating. *Nature Methods*, 8(7):571–573, July 2011.

Danksagung

Die Herausforderung des Laboraufbaus sowie meiner Forschung haben mich mit einigen Kooperationspartnern und Unterstützern zusammengebracht, welchen ich hiermit danken möchte.

Ein besonderer Dank gilt **Prof. Thomas Hellerer** für die gute, freundschaftliche Zusammenarbeit, die Unterstützung, den Diskussionen und vor allem für die Freiheit und das Vertrauen, meine Ideen verwirklichen zu können.

Ebenso gilt ein besonderer Dank **Prof. Joachim Rädler** für die universitäre Betreuung meiner Doktorarbeit, für die hilfreichen Ratschläge, die Möglichkeit der Teilnahme an den Lehrstuhl-Winterschools und das entgegengebrachte Vertrauen.

Ich möchte mich auch bei meinem langjährigen Kollegen **Mojtaba**, insbesondere für seine Fertigkeiten der Feinmechanik sowie meinem ehemaligen Studenten und Nachfolger **Thomas**, nicht zuletzt für seine 3D-Druck Fähigkeiten und den Gitarrenunterricht, bedanken!

Ein besonderer Dank gilt „meinen Biologen“ **Steffie** und **Stefan** für die fabelhafte Zusammenarbeit und ihren unermüdlichen Einsatz bei der Probenherstellung. Ohne euch wären meine mikroskopischen Aufnahmen nur halb so spannend gewesen! Danke an all meine Studenten für eure Arbeit, wobei ich **Jens**, **Matthias** (auch für unseren gemeinsamen langjährigen Weg), **Tillmann**, **Christoph**, **Toni** und **Wolfgang** hervorheben möchte.

Ein großer Dank gilt auch der Forschungsförderung der Hochschule München, **Dr. Jürgen Meier** und seinem Team, dem Kooperationsverbund **BayWISS** sowie dem **BMBF** für ihre finanzielle Unterstützung. Ein weiterer Dank gilt **Prof. Markus Hilleringmann** sowie dem Team des CANTER um **Prof. Hauke Clausen-Schaumann** und **Dr. Stefanie Sudhop: Tanja, Basti, Lutz** und **Conny**. **Prof. Matthias Rebhan** möchte ich für die gute und spannende Zusammenarbeit zur Herstellung von Phasenmasken mittels Nanolithographie danken. Vielen Dank auch an **Prof. Annika Enejder** für die Möglichkeit meines inspirierenden Forschungsaufenthalts an der Stanford University und **Prof. Ralf Jungmann** und **Florian Schüder** für die Herstellung von DNA-Origami-Proben zu Beginn meines Projekts. Danke auch an den Lehrstuhl Rädler, insbesondere **Ricarda**, **Tobias**, **Christoph** und **Alexandra**, welche mich in den Lehrstuhl im Rahmen der Winterschools in Antholz und Maria Alm, aber auch den feierlichen Veranstaltungen mit eingebunden haben.

Der größte Dank gilt meinen Eltern **Maria** und **Peter**, welche mich immer ermuntert haben – mit Ruhe und Gelassenheit - über den Tellerrand hinaus zu blicken. Ihr habt damit vieles überhaupt erst ermöglicht! Danke auch an meine Geschwister **Petra** und **Basti** und meinen Sohn **Timo** für euren Rückhalt und dafür, dass ihr da seid. **Salina**, danke für unsere gemeinsame Zeit und Deine Unterstützung.