

# Höchstaufgelöste optische Nanoskopie und Fluktuationsspektroskopie zur Untersuchung biophysikalischer Prozesse

Zur Erlangung des akademischen Grades eines  
**DOKTORS DER NATURWISSENSCHAFTEN (Dr. rer. nat.)**  
von der KIT-Fakultät für Physik des  
Karlsruher Instituts für Technologie (KIT)  
genehmigte

**DISSERTATION**

von

M. Sc. Benedikt Josef Prunsche

aus Ingolstadt

Erstgutachter: Prof. Dr. G. Ulrich Nienhaus  
Zweitgutachter: Prof. Dr. Martin Wegener  
Betreuender Mitarbeiter: Dr. Peng Gao

Tag der mündlichen Prüfung: 11.5.2018



# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung</b>	<b>1</b>
<b>2</b>	<b>Theoretische Grundlagen</b>	<b>3</b>
2.1	Grundlagen der Fluoreszenz - Methoden zur Markierung relevanter Entitäten	3
2.1.1	Was ist Fluoreszenz?	3
2.1.2	Fluoreszente Farbstoffe und ihre Verwendung als Marker in biophysikalischen Experimenten	8
2.2	Von der Lupe zur höchst aufgelösten optischen Nanoskopie	11
2.2.1	Von der Optik in der Antike zur Verwendung einfacher Mikroskope	11
2.2.2	Das zusammengesetzte Lichtmikroskop	13
2.2.3	Epifluoreszenzmikroskopie und Konfokalmikroskopie	14
2.2.4	STED-Mikroskopie	19
2.3	Fluoreszenzkorrelationsspektroskopie	21
2.3.1	Klassische Fluoreszenzkorrelationsspektroskopie in 3D	21
2.3.2	FCS in zwei Dimensionen: Linien-Raster-FCS	23
2.3.3	Kreuzkorrelation: Intrinsische Kalibration und Analyse von Bindung	25
2.4	Die Wechselwirkung zwischen Liganden und Rezeptoren	26
2.4.1	Messung von Bindungsaffinitäten über die Bestimmung von Konzentrationen	26
2.4.2	Messung der Bindungsaffinitäten über Bestimmung der Reaktionskinetik	27
<b>3</b>	<b>Methoden für höchst aufgelöste Fluoreszenzmikroskopie bei minimalem Hintergrund</b>	<b>29</b>
3.1	Das STED-Mikroskop	29
3.1.1	Aufbau des STED-Mikroskops	29
3.1.2	Erzeugung geeigneter Intensitätsverteilungen durch Phasenmasken	32
3.1.3	Zeitliche und räumliche Justage	34
3.1.4	Adaptive Optiken	35
3.1.5	Auflösung und resultierende Punktspreizfunktionen (PSF) des STED-Mikroskops	38
3.1.6	Vorbereitung des Mikroskops zur Verwendung mit lebenden Zellen	41
3.2	Hintergrundminimierung durch Stimulated Emission Double Depletion (STEDD)	42
3.2.1	Ursprüngliche Motivation zur Entwicklung der STEDD-Mikroskopie	43
3.2.2	Signal und Hintergrund in der STED-Mikroskopie	43
3.2.3	Experimentelle Realisierung der STEDD-Mikroskopie	44
3.2.4	Simulationen zur Hintergrundreduktion	46

<b>4</b>	<b>Höchstaufgelöste Mikroskopie</b>	<b>49</b>
4.1	In vivo STED-Mikroskopie mit Hilfe fluoreszenter Proteine	49
4.2	Anwendung der STEDD-Mikroskopie zur Verminderung des Hintergrunds in der Bildgebung	53
4.2.1	STEDD-Mikroskopie in zwei Dimensionen	53
4.2.2	STEDD-Mikroskopie mit STED-Wellenlängen näher am Emissionsmaximum	55
4.2.3	STEDD-Mikroskopie in drei Dimensionen	57
<b>5</b>	<b>Methoden zur Untersuchung von Dynamiken in biologischen Membranen</b>	<b>63</b>
5.1	Ausgangspunkt: laterale Linien-Raster-FCS	63
5.2	Axiales Linienrastern	66
5.2.1	Die 'tunable acoustic gradient index of refraction' (TAG)-Linse	66
5.2.2	Rückfaltung	67
5.3	Pulsed interleaved Excitation (PIE) zur Verbesserung der IsFCS	68
5.4	Bleichkorrektur und Berechnung der Dissoziationskonstante	71
5.5	Software zur Auswertung der IsFCS	73
<b>6</b>	<b>Experimentelle Anwendung der Fluoreszenzkorrelationspektroskopie</b>	<b>77</b>
6.1	Axiales Linienrastern zur Untersuchung biophysikalischer Prozesse	77
6.1.1	Die Vorteile axialer gegenüber lateraler IsFCS	77
6.1.2	Messung der Bindungsaffinität von DKK1 und LRP6 durch IsFCS	82
6.1.3	Messung der Bindungsaffinität von DKK1 und LRP6 durch die Bestimmung der Bindungskinetik	85
6.2	Höchstaufgelöste FCS in zwei und drei Dimensionen	88
6.2.1	STED-FCS in 3D	88
6.2.2	STEDD-FCS in 3D	91
6.2.3	STED-IsFCS in 2D	94
<b>7</b>	<b>Zusammenfassung und Ausblick</b>	<b>97</b>
<b>A</b>	<b>Anhang</b>	<b>109</b>
A.1	Einlesen von TCSPC-Daten in MATLAB	109
A.2	Aufteilen der Photonen nach ihrer Ankunftszeit am Detektor	112
A.3	Erzeugung des Pseudobildes	113
<b>B</b>	<b>Publikationsliste</b>	<b>117</b>
<b>C</b>	<b>Betreute Abschlussarbeiten</b>	<b>119</b>
<b>D</b>	<b>Danksagungen</b>	<b>121</b>

# 1 Einleitung

Die Biophysik als interdisziplinäre Wissenschaft zwischen Biologie, Chemie, Physik und Informatik ist eine essenzielle Disziplin beim Versuch, die Vorgänge des Lebens auf molekularer Ebene zu entschlüsseln. Eine Hauptaufgabe der Biophysik ist dabei, die passenden Methoden und Geräte zu entwickeln, die es erlauben, Prozesse in lebenden Organismen zu entdecken, zu beschreiben und zu quantifizieren. Die Lichtmikroskopie, eine wichtige Methode zur nichtinvasiven Beobachtung lebender Organismen, hat dabei besonders durch die Entwicklung der Fluoreszenzmikroskopie sowie die Entdeckung und Verwendung fluoreszenter Proteine in den letzten Jahren eine immer größere Bedeutung in den Lebenswissenschaften erfahren. Das fundamentale Auflösungslimit, das durch Ernst Abbe 1873 beschrieben wurde, verhindert jedoch eine Beobachtung von Vorgängen, die auf Größenskalen unterhalb der halben Wellenlänge des zur Beobachtung genutzten Lichts (typischerweise  $0,2\ \mu\text{m}$  bis  $0,3\ \mu\text{m}$ ) stattfinden. Dies entspricht gerade dem Durchmesser eines Bakteriums oder auch der Größe eines Zellorganells. Proteine, die für nahezu alle Funktionen in lebenden Organismen verantwortlich sind und daher oft auch als Bausteine des Lebens bezeichnet werden, sind jedoch zwei Größenordnungen kleiner als das fundamentale Auflösungslimit und lassen sich daher nur schwer in Aktion beobachten. Zwar gab es bereits seit der ersten Hälfte des letzten Jahrhunderts Techniken, wie z.B. die Elektronenmikroskopie, die wesentlich bessere Auflösungen boten, diese konnten aber den Bedarf nach einer Methode für *in vivo* Untersuchungen mit Auflösungen im Nanoregime nicht decken. Ein Durchbruch gelang erstmals Stefan Hell mit der Entwicklung der STED-Mikroskopie um die Jahrtausendwende sowie ein paar Jahre später auch Eric Betzig durch die Entwicklung der Lokalisationsmikroskopie. Beide Techniken sind dabei in der Lage, das von Abbe postulierte fundamentale Auflösungslimit deutlich zu unterschreiten und ebneten damit den Weg von der Mikroskopie zur Nanoskopie. Die Bedeutung dieser Entwicklung für die Lebenswissenschaften wird durch die Verleihung des Nobelpreises an Stefan Hell, Eric Betzig und William Moerner 2014 unterstrichen. Nach nur zwei Jahrzehnten ist das Potential dieser Techniken bei weitem noch nicht ausgeschöpft. Diese Arbeit befasst sich mit der STED-Mikroskopie und den Möglichkeiten, diese Mikroskopiemethode zum einen weiter zu verbessern und zum anderen ihr Potential, einen Blick in die Nano-Maschinerie des Lebens werfen zu können, auch erfolgreich auf andere verwandte Methoden zu übertragen. Die erreichten Verbesserungen beziehen sich dabei hauptsächlich auf den in der STED-Mikroskopie inhärenten Hintergrund, der sich vor allem bei der höchstauflösenden Mikroskopie von dichten dreidimensionalen Strukturen sowie der Kombination von Fluoreszenzkorrelationsspektroskopie und STED-Mikroskopie als störend erweist. Des Weiteren wird eine neue Methode vorgestellt, die die Fluoreszenzkorrelationsspektroskopie in biologischen Membranen verbessert und vor allem dazu entwickelt wurde, die Interaktionen zwischen membranständigen Rezeptoren und Liganden zu quantifizieren.

## **Gliederung der Arbeit**

Zunächst erfolgt in **Kapitel 2** eine kurze Einführung in die theoretischen Grundlagen, die für das Verständnis der Arbeit essenziell sind. Neben der Diskussion der Fluoreszenz erfolgt eine detaillierte Betrachtung der Lichtmikroskopie sowie der Fluoreszenzkorrelationsspektroskopie (FCS) und ihren verschiedenen Ausprägungen. Die theoretischen Vorüberlegungen werden anschließend mit einem kurzen Abschnitt über die Wechselwirkungen zwischen Rezeptoren und Liganden und deren Quantifizierung abgeschlossen.

In **Kapitel 3** erfolgt zunächst eine Darstellung des optischen Aufbaus des verwendeten STED-Mikroskops sowie der wichtigsten Aspekte, die bei der Konstruktion, Justage und Verwendung des Mikroskops beachtet werden müssen. Im zweiten Abschnitt dieses Kapitels wird die neu entwickelte Methode der *Stimulated Emission Double Depletion* (STEDD) Mikroskopie vorgestellt, die eine im Wesentlichen hintergrundfreie STED-Mikroskopie ermöglicht. Das Potential der STED- und STEDD-Mikroskopie bei der Untersuchung lebender Zellen in zwei und drei Dimensionen wird anschließend in **Kapitel 4** demonstriert.

Im zweiten Teil der Arbeit erfolgt eine Einführung in die Methodik der Linienraster-Fluoreszenzkorrelationsspektroskopie (lsFCS) in **Kapitel 5**. Hier wird die neu entwickelte Methode der axialen lsFCS vorgestellt sowie diskutiert, welche Probleme bei der Quantifizierung von Rezeptor-Liganden-Interaktionen auftreten können und wie diese zu lösen sind. In der ersten Hälfte von **Kapitel 6** werden neben den Vorteilen der axialen lsFCS gegenüber den bisherigen Techniken auch die Anwendung der axialen lsFCS an einer biophysikalischen Problemstellung demonstriert. Zum Abschluss des Hauptteils werden die Möglichkeiten und Herausforderungen der Kombination von STED und FCS gezeigt. Abschließend wird demonstriert, wie mit Hilfe der STEDD-Methode eine erfolgreiche Kombination von höchstaufgelöster Mikroskopie und Fluoreszenzkorrelationsspektroskopie erfolgen kann.

## 2 Theoretische Grundlagen

### 2.1 Grundlagen der Fluoreszenz - Methoden zur Markierung relevanter Entitäten

Ist tagsüber der Himmel klar und blau, so ist nach Sonnenuntergang deutlich der Sternenhimmel zu erkennen. Sterne stehen jedoch den ganzen Tag am Himmel - nur der Kontrast ist tagsüber zu gering, um sie zu erkennen. Etwas Ähnliches ist in der Mikroskopie zu beobachten. In der klassischen Lichtmikroskopie kann man lediglich Strukturen erkennen, die durch Absorption einen deutlichen Kontrast zum Hintergrund erzeugen. Dies ist z.B. besonders für die stark absorbierenden Zellwände von pflanzlichen Zellen oder auch den Zellkern gut möglich. Viele Strukturen der Zelle, die auch von großem Interesse sind, bleiben auf Grund eines fehlenden Kontrastes - ähnlich zu Sternen tagsüber - nahezu komplett verborgen. In der Mitte des 20. Jahrhunderts sorgten Frits Zernike durch die Entdeckung der Phasenkontrast-Mikroskopie und Georges Nomarski durch die Entwicklung der Differentialinterferenzkontrast-Mikroskopie für eine deutliche Verbesserung der Lichtmikroskopie, da nun der Phasenversatz des Lichtes bei Durchgang durch verschiedene Strukturen für eine deutlich verbesserte Kontrasterzeugung genutzt wurde [1, 2]. Eine weitere Methode zur Erlangung von spezifischem Kontrast ist die histologische Färbung von Präparaten, wie sie seit Mitte des 19. Jahrhunderts durchgeführt wird [3]. Hierbei werden verschiedene Gewebestrukturen mit entsprechenden Farbstoffen histochemisch gebunden und erlangen so eine wellenlängenabhängige Absorption, die in mikroskopischen Aufnahmen zu einer Einfärbung führt. Die in dieser Arbeit verwendete Methode der Fluoreszenzmikroskopie und die daraus folgende Verwendung fluoreszenter Farbstoffe hat sich in den letzten Jahren als populärste Art der Kontrasterzeugung in den Lebenswissenschaften etabliert. Einer der Hauptvorteile bei der Verwendung fluoreszenter Marker gegenüber anderen Methoden ist die Rotverschiebung des Emissionslichts bezüglich des Anregungslichts (siehe 2.1.1). Dies ermöglicht eine einfache spektrale Aufspaltung zwischen Anregungslicht und zu detektierendem Signal und erlaubt so ein extrem hohes Kontrastverhältnis. Die Verwendung verschiedenster fluoreszenter Marker und passender Markierungstechniken (siehe 2.1.2) erlaubt eine unübertroffenen spezifische Bindung der Fluorophore an die zu untersuchenden Entitäten wie z.B. Proteine oder DNA. Dies ermöglicht eine gezielte Darstellung sowohl *in vitro* als auch *in vivo*, wobei verschiedene Fluorophore gleichzeitig zum Einsatz kommen können (siehe 2.1.2), um so mehrere Entitäten zu beobachten und z.B. deren Wechselwirkung quantifizieren zu können.

#### 2.1.1 Was ist Fluoreszenz?

Fluoreszenz ist neben Phosphoreszenz eine Art der Lumineszenz, d.h., spontane Abstrahlung von Licht, die durch elektronische Übergänge in Materialien hervorgerufen wird [4]. Erstmals beobachtet wurde die Fluoreszenz 1845 durch Sir John Herschel [5]. Eine sehr instruktive Darstellung der zugrunde liegenden physikalischen Vorgänge erfolgte 1916 durch Albert Einstein [6].

Betrachten wir zunächst ein quantenmechanisches Zwei-Niveau-System mit den Niveaus  $Z_i$  und  $Z_j$  und den Energien  $E_j > E_i$ . Der Übergang von  $Z_j$  nach  $Z_i$  kann nun unter Aussendung von Strahlungsenergie  $E_j - E_i = h\nu$  erfolgen, wobei  $\nu$  die Frequenz der Strahlung ist. Die Wahrscheinlichkeit für diesen Übergang ist gegeben durch

$$dW = A_j^i dt. \quad (2.1)$$

Dabei ist  $A_j^i$  eine noch näher zu bestimmende charakteristische Konstante für den gegebenen Übergang. Im Falle eingestrahelter Intensität kann ebenso ein Übergang von  $Z_i$  nach  $Z_j$  erfolgen. Die Wahrscheinlichkeit für diesen Übergang ist neben einer Konstante  $B_i^j$  auch von der Strahlungsdichte an der Übergangsfrequenz  $\rho$  abhängig:

$$dW = B_i^j \rho dt. \quad (2.2)$$

Analog zum Übergang von  $Z_i$  nach  $Z_j$  kann auch ein Übergang von  $Z_j$  nach  $Z_i$  unter Einwirkung eines Strahlungsfeldes stattfinden. Hierfür gilt analog zu Gleichung 2.2:

$$dW = B_j^i \rho dt. \quad (2.3)$$

Setzt man nun ein thermodynamisches Gleichgewicht voraus, so ist offensichtlich, dass die Zahl der Übergänge von  $Z_j$  nach  $Z_i$  gerade der Zahl der Übergänge von  $Z_i$  nach  $Z_j$  entsprechen muss, um im Mittel einen stabilen Zustand zu erreichen. Es gilt demnach:

$$n_i B_i^j \rho = n_j (B_j^i \rho + A_j^i). \quad (2.4)$$

$n_j$  und  $n_i$  beschreiben hierbei die Besetzungszahlen der Zustände  $Z_j$  und  $Z_i$ . Setzt man für die Besetzung der beiden Zustände nun die Boltzmann-Statistik voraus, so ergibt sich aus Gleichung 2.4:

$$B_i^j \rho e^{-\frac{E_i}{k_B T}} = (B_j^i \rho + A_j^i) e^{-\frac{E_j}{k_B T}}. \quad (2.5)$$

Da diese Gleichung für alle Temperaturen  $T$  gültig sein muss, folgt aus einer Grenzwertabschätzung für  $T \rightarrow \infty$  und damit  $\rho \rightarrow \infty$  direkt:

$$B_i^j = B_j^i. \quad (2.6)$$

Stellt man nun Gleichung 2.5 nach  $\rho$  um, kann man einen Koeffizientenvergleich mit dem Planckschen Strahlungsgesetz durchführen:

$$\rho = \frac{\frac{A_j^i}{B_j^i}}{e^{\frac{E_j - E_i}{k_B T}} - 1}. \quad (2.7)$$

Es folgt:

$$\frac{A_j^i}{B_j^i} = \frac{8\pi h \nu^3}{c^3}. \quad (2.8)$$

Mit Hilfe exakter quantenmechanischer Berechnungen kann ferner gezeigt werden [7]:

$$B_j^i = \frac{2\pi^3}{3\epsilon_0 h^2} |M_j^i|^2. \quad (2.9)$$



Wobei das Übergangsdipolmoment  $M_j^i$  gegeben ist durch:

$$M_j^i = e \int \Psi_j^* \hat{r} \Psi_i d^3 \vec{r}.$$

Hier bezeichnet  $\Psi$  die Wellenfunktion, die den quantenmechanischen Zustand des Systems beschreibt, und  $\hat{r}$  den Ortsoperator. Heutzutage sind die Prozesse, die Einstein zu dieser Zeit beschrieben hat, als **Absorption** (Übergang von  $Z_i$  nach  $Z_j$  unter Einwirkung von elektromagnetischer Strahlung), **stimulierte Emission** (der Umkehrprozess der Absorption) sowie als **spontane Emission** (die spontane Emission von Strahlung bei einem Übergang von  $Z_j$  nach  $Z_i$  ohne Einwirkung eines äußeren Strahlungsfeldes) bekannt.<sup>1</sup>

### Franck-Condon-Prinzip

Betrachtet man Moleküle, die Photonen absorbieren, so kommt es neben elektronischen Anregungen auch zu Vibrations- und Rotationsanregungen. Auf Grund der großen Massendifferenz bewegen sich Elektronen wesentlich schneller als die deutlich schwereren Atomkerne. Dies führt dazu, dass für die Bewegung der Elektronen die Atomkerne als quasi stationär angesehen werden können. Nach Born-Oppenheimer [8] kann die Gesamtwellenfunktion des Moleküls daher in eine Wellenfunktion der Elektronen  $\varphi$  und eine Wellenfunktion der Kerne  $\phi$  aufgespalten werden:

$$\Psi(\vec{r}, \vec{R}) = \varphi(\vec{r}, \vec{R}) \phi(\vec{R}) \quad (2.10)$$

Hier bezeichnet  $\vec{r}$  den Ort des Elektrons und  $\vec{R}$  die Kernkoordinate. Das Übergangsdipolmoment beim Übergang vom Zustand  $i$  zum Zustand  $j$ , kann, in guter Näherung, in zwei Integrale aufgespalten werden:

$$\langle \Psi_j | e \vec{r} | \Psi_i \rangle = -e \int \varphi_j^*(\vec{r}) \vec{r} \varphi_i(\vec{r}) d^3 \vec{r} \int \phi_j^*(\vec{R}) \phi_i(\vec{R}) d^3 \vec{R} \quad (2.11)$$

Das zweite Integral in Gleichung 2.11 wird dabei als Franck-Condon-Integral bezeichnet und beschreibt die Wahrscheinlichkeit für den Übergang zwischen zwei Zuständen in Abhängigkeit der Kernkoordinaten [7]. Da sich üblicherweise der Kernabstand nach elektronischer Anregung verändert ist der Franck-Condon-Faktor [9], also der Überlapp der Kernwellenfunktionen und damit die Übergangswahrscheinlichkeit, dann am größten, wenn der Übergang von vibronischen Grundniveaus in vibronisch angeregte Niveaus erfolgt. Dies ist in Abbildung 2.1 noch einmal detailliert dargestellt.

### Jablonski Diagramm

Das von Sir John Herschel entdeckte Phänomen der Fluoreszenz ist nach heutigem Verständnis die spontane Emission von Licht nach dem Übergang von einem angeregten Singulettzustand  $S_1$  in den Grundzustand  $S_0$ . Betrachtet man ein Ensemble angeregter Fluorophore im Zustand  $S_1$ , so ergibt sich durch

<sup>1</sup> Aus der obigen Herleitung lassen sich interessante Schlussfolgerungen ziehen. Zum einen besagt Gleichung 2.6, dass die Wahrscheinlichkeiten für Absorption und stimulierte Emission gleich sind. Daraus lässt sich direkt schließen, dass mit einem Zwei-Niveau-System keine Besetzungsinversion erreicht werden und somit auch kein Laser gebaut werden kann. Gleichung 2.8 zeigt nach kurzer Rechnung, dass die spontane Emission im sichtbaren Spektrum unter üblichen Anregungsintensitäten die stimulierte Emission vollkommen dominiert.

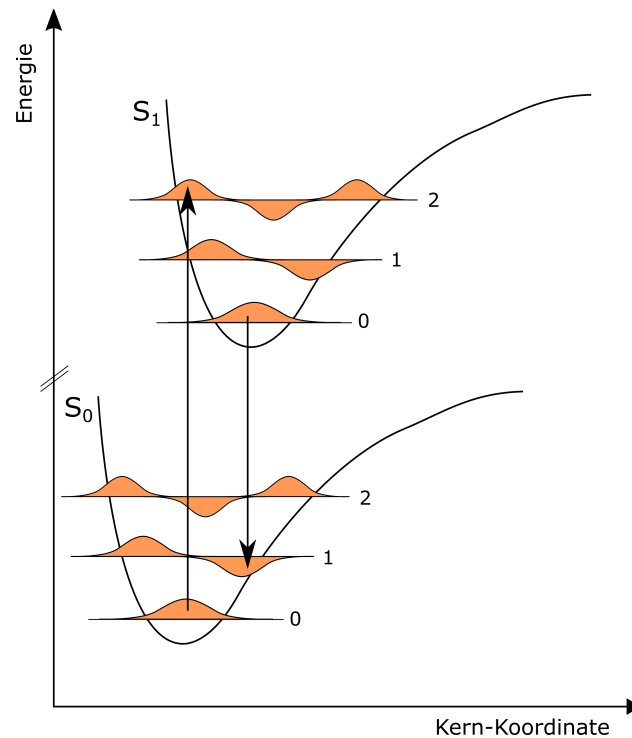


Abbildung 2.1: Energie in Abhängigkeit der Kern-Koordinate für einen elektronischen Grund- und den dazugehörigen Anregungszustand. In Orange ist die Wellenfunktion, die den quantenmechanischen Zustand des Valenzelektrons beschreibt, eingezeichnet. Da die Elektronen sich quasi instantan im Vergleich zu den Kernen bewegen, sind die Übergänge immer senkrecht. Das Franck-Condon-Prinzip besagt nun, dass die Übergänge dann am wahrscheinlichsten sind, wenn der Überlapp zwischen den Kernwellenfunktionen am größten ist (siehe Gleichung 2.1). Dies ist, da sich der Kernabstand bei elektronischer Anregung üblicherweise verändert, der Fall, wenn der Übergang von einem vibronischen Grund- in einen Anregungszustand erfolgt.

Lösung der Differentialgleichung 2.1 ein exponentieller Zerfall der angeregten Spezies in den Grundzustand  $S_0$ :

$$N_1(t) = N_1(0) \exp(-A_m^n t) = N_1(0) \exp(-t/\tau_{\text{Fl}}), \quad (2.12)$$

mit der Anzahl angeregter Fluorophore im Zustand  $S_1$  in Abhängigkeit der Zeit  $N_1(t)$  sowie der charakteristischen Fluoreszenzlebenszeit  $\tau_{\text{Fl}} = \frac{1}{A_m^n}$ , die typischerweise im Bereich von  $10^{-7}$  s bis  $10^{-10}$  s liegt [4]. Neben der Fluoreszenz durch spontane Emission gibt es noch weitere Abregungskanäle, die typischerweise in einem so genannten Jablonski-Diagramm (siehe Abbildung 2.2), benannt nach Alexander Jablonski, dargestellt werden [10]. Neben der strahlungslosen Relaxation durch innere Umwandlung (IC, *internal conversion*) kann durch sogenanntes *inter system crossing* (ISC) ein strahlungsloser Übergang von einem angeregten Singulett in einen angeregten Triplett-Zustand erfolgen. Die Abregung dieses Triplett-Zustands unter Aussendung eines Photons, Phosphoreszenz genannt, ist stark unterdrückt und daher sehr unwahrscheinlich. Dies erklärt die sehr großen Lebensdauer dieses Zustands ( $10^{-6}$  s bis 1 s [2]).

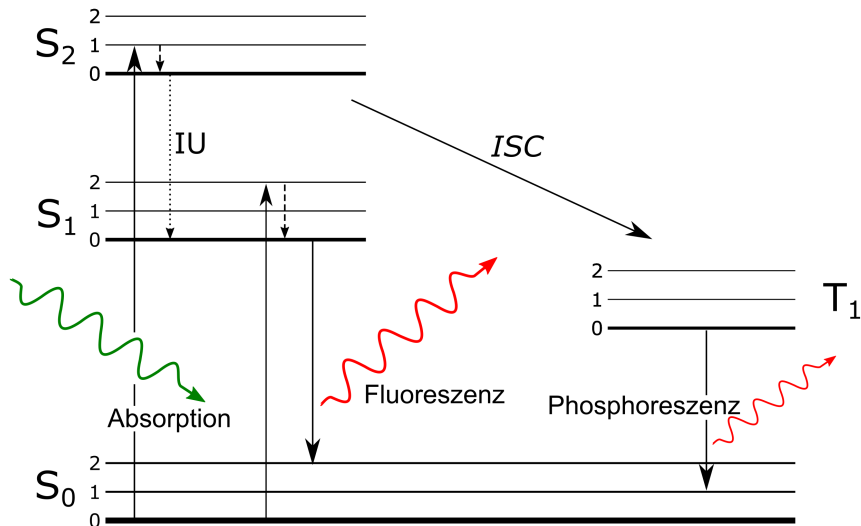


Abbildung 2.2: Jablonski Diagramm zur Darstellung der relevanten photophysikalischen Vorgänge in einem fluoreszenten Molekül: Absorption, Fluoreszenz, Phosphoreszenz, vibronische Abregung, innere Umwandlung (IC, von engl. *internal conversion*) sowie *inter system crossing* (ISC).

### Stokes-Shift

Eine weitere wichtige Entdeckung zur Fluoreszenz gelang 1852 Sir George Stokes [11]: Er stellte fest, dass die emittierten Photonen rotverschoben gegenüber den zuvor absorbierten Photonen sind - dieses Phänomen wird heutzutage als Stokes-Shift bezeichnet. Der Stokes-Shift kann dabei durch zwei dominante Effekte erklärt werden. Liegt ein Fluorophor in einem polaren Lösungsmittel, wie z.B. Wasser vor, orientieren sich die Lösungsmittelmoleküle anhand der elektronischen Struktur des Fluorophors in einen Zustand minimaler Energie. Bei Anregung des Fluorophors ändert sich dessen elektronische Struktur und die Ausrichtung der Lösungsmittelmoleküle entspricht nicht mehr dem Zustand minimaler Energie, sondern einem energetisch ungünstigen angeregten Zustand ( $S_1^*$ ). Nach kurzer Zeit erfolgt eine Umorientierung der Lösungsmittelmoleküle und der angeregte Zustand wird energetisch günstiger ( $S_1$ ). Bei der Abregung in den Grundzustand tritt abermals der gleiche Effekt auf, somit ist auch der Grundzustand zunächst energetisch ungünstig ( $S_0^*$ ), bis sich die Lösungsmittelmoleküle wieder an die veränderte elektronische Struktur der Fluorophore angepasst haben ( $S_0$ ). Dies führt dazu, dass die Zustände bei der Anregung energetisch weiter auseinander liegen als bei der Abregung und das emittierte Photon somit rotverschoben gegenüber dem anfangs absorbierten Photon ist. Dieser Vorgang ist in Abbildung 2.3 dargestellt.

Ein zweiter Effekt liegt in der Erzeugung von Phononen nach einem elektronischen Übergang. Nach dem Franck-Condon-Prinzip befindet sich ein Fluorophor nach einem elektronischen Übergang mit großer Wahrscheinlichkeit in einem vibronisch angeregten Zustand. Da die vibronische Abregung deutlich schneller erfolgt als die elektronische Abregung durch Fluoreszenz, relaxiert der Fluorophor in den vibronischen Grundzustand, bevor Fluoreszenz emittiert wird. Dem System wird durch die Erzeugung von Phononen Energie entzogen. Deshalb haben die emittierten Photonen weniger Energie als die absorbierten und sind somit abermals rotverschoben. In der Fluoreszenzmikroskopie erlaubt der Stokes-Shift eine

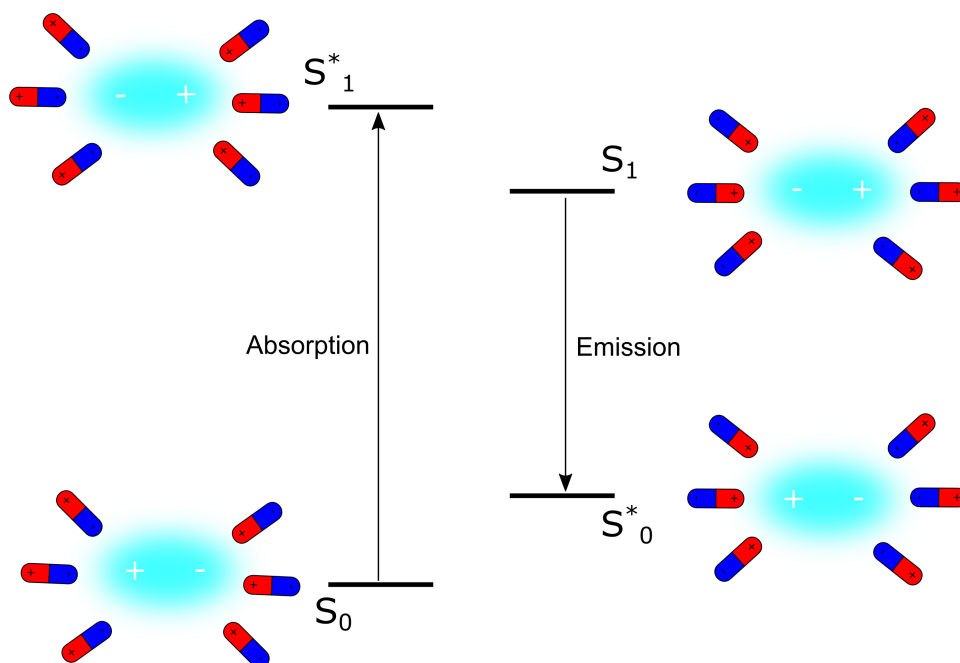


Abbildung 2.3: Darstellung des lösungsmittelabhängigen Stokes-Shift. Durch polare Lösungsmittel erfolgen Anregung und Abregung zunächst in energetisch höhere Zustände, bis sich die polaren Moleküle des Lösungsmittels an die veränderte elektronische Struktur angepasst haben (nach [12]).

chromatische Trennung von Anregungs- und Emissionslicht und somit deutlich bessere Kontraste, als sie durch andere Kontrastverfahren möglich wären [2].

### 2.1.2 Fluoreszente Farbstoffe und ihre Verwendung als Marker in biophysikalischen Experimenten

Heutzutage haben sich im wesentlichen drei verschiedene Arten von Fluorophoren in der biophysikalischen Forschung durchgesetzt: **organische Farbstoffe**, **Quantenpunkte** und **fluoreszente Proteine**, die unterschiedliche Vor- und Nachteile aufweisen und somit je nach Experiment passend ausgewählt werden müssen. Für die Wahl der passenden Fluorophore sind neben den photophysikalischen Eigenschaften, wie sie in Tabelle 2.1 aufgelistet sind, auch ihre physikochemischen Eigenschaften, die ihr Verhalten in biologischen Präparaten sowie die verschiedenen Möglichkeiten der Markierung bestimmen, von großer Bedeutung [2].

#### Organische Farbstoffe

Organische Farbstoffe haben sich seit der Entdeckung von Fluorescein durch Adolf Baeyer 1871 [13] in der biophysikalischen und biochemischen Forschung weitgehend durchgesetzt [4]. Sie sind typischerweise sehr kleine, planare Moleküle mit konjugierten  $\pi$ -Elektronen Systemen, die eine starke Delokalisierung der Elektronen zur Folge haben. Dies führt zur typischerweise hohen molekularen Helligkeit der

Tabelle 2.1: Wichtige photophysikalische Eigenschaften zum Vergleich verschiedener Fluorophore.

Anregungsspektrum	Spektrum, das die Wahrscheinlichkeit angibt, den Fluorophor anzuregen. Gerade bei der Anregung durch Laser, wie sie in der Fluoreszenzmikroskopie üblich ist, muss eine passende Laserlinie vorhanden sein, um die Farbstoffe effektiv anregen zu können.
Emissionsspektrum	Spektrum der emittierten Fluoreszenz nach Anregung bei einer bestimmten Wellenlänge. Ausschlaggebend für die Wahl der Detektionsfilter und u. U. auch der Detektoren.
Extinktionskoeffizient	Maßzahl für die Wahrscheinlichkeit, dass ein Fluorophor Photonen bei einer bestimmten Wellenlänge absorbiert.
Quanteneffizienz	Verhältnis von emittierten zu absorbierten Photonen.
Molekulare Helligkeit	Produkt aus Quanteneffizienz und Extinktionskoeffizient und somit ein vergleichbares Maß für die Helligkeit eines Farbstoffes bei gleichbleibenden Anregungsbedingungen.
Photostabilität	Gibt an, nach wie vielen Anregungszyklen ein Fluorophor gebleicht wird, das heißt nicht mehr fluoreszent ist.

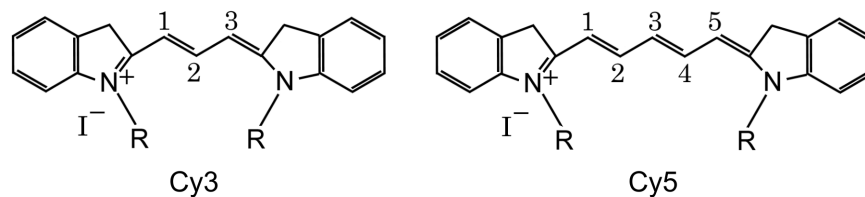


Abbildung 2.4: Chemische Struktur der Cyanin-Farbstoffe Cy3 und Cy5. Es ist eine deutliche Verlängerung des  $\pi$ -Elektronen Systems zu erkennen - analog steigt das Emissionsmaximum von etwa 560 nm bei Cy3 auf etwa 670 nm bei Cy5 [14].

Farbstoffe. Betrachtet man die delokalisierten Elektronensysteme näherungsweise als Potentialtopf, so ist ersichtlich, dass größere delokalisierte Elektronensysteme zu geringeren Energiedifferenzen zwischen den Energieniveaus führen - dies sollte also eine Rotverschiebung der Spektren bei größeren Elektronensystemen zur Folge haben. Dieses Verhalten ist besonders deutlich bei den Cyanin-Farbstoffen Cy3 und Cy5 zu erkennen (siehe Abbildung 2.4). Die Vorteile von organischen Farbstoffen liegen zum einen in ihrer großen Vielzahl in allen Bereichen des sichtbaren Spektrums [15], sowie zum anderen in den günstigen photophysikalischen Eigenschaften (molekulare Helligkeit, Photostabilität). Sie eignen sich daher besonders für die Verwendung in der STED-Mikroskopie (siehe Abschnitt 2.2.4) [16, 17]. Um organische Farbstoffe als Marker in der Biophysik zu verwenden, müssen diese spezifisch an Proteine und andere Biomoleküle gebunden werden. Eine häufig gewählte Methode ist hierbei die Immunmarkierung: Die Verwendung von primären Antikörpern (gegen bestimmte Proteine) und mit organischen Farbstoffen versehenen sekundären Antikörpern erlaubt eine hoch spezifische Markierung. Soll diese Methode zur fluoreszenten Einfärbung in Zellen verwendet werden, entstehen jedoch zwei Probleme: Zum einen kann die Ausdehnung der relativ großen Antikörper zu Veränderungen der zu untersuchenden Struktu-

ren führen, zum anderen können Antikörper und Farbstoffe kaum durch die Zellmembran diffundieren - die Zellen müssen also fixiert werden [18, 19]. Eine weitere Möglichkeit ist die Verwendung von sogenannten Tags, genetisch in Biomoleküle kodierte Anker, die dann an speziell funktionalisierte Farbstoffe binden können. Hier ist die Auswahl an organischen Farbstoffen jedoch stark eingeschränkt, da sie membranpermeabel sein müssen, um eine Fixierung der Zellen zu vermeiden [20].

### Quantenpunkte

Quantenpunkte sind bezüglich ihrer optischen Eigenschaften organischen Farbstoffen deutlich überlegen, da sie wesentlich höhere molekulare Helligkeiten und neben einem sehr breiten Absorptionsspektrum relativ schmale Emissionsbanden aufweisen [2]. Dies ermöglicht die Verwendung verschiedener Quantenpunkte mit nur einer Anregungsquelle und damit eine einfache Möglichkeit, mehrfarbige Fluoreszenzmikroskopie durchzuführen. Quantenpunkte bestehen aus einem Halbleiter-Kern mit einem Durchmesser von 2 nm bis 20 nm. Über die Kerngröße lassen sich dabei die optischen Eigenschaften, v.a. das Emissionsspektrum, der Quantenpunkte verändern. Der Kern wird dann mit Hilfe einer Hülle aus einem zweiten Halbleiter mit deutlich größerer Bandlücke passiviert, d.h. die Elektronen im Kern werden, ähnlich wie in einem quantenmechanischen Potentialtopf, eingefangen [21]. Werden Kern- und Hüllmaterial korrekt gewählt, erreichen Quantenpunkte eine um Größenordnungen bessere Photostabilität als gewöhnliche organische Fluorophore. Sie eignen sich daher besonders gut für Anwendungen, bei denen hohe Photostabilität gewährleistet sein muss, wie z.B. Langzeitmessungen oder 3D-Mikroskopie, die durch Aufnahme vieler einzelner Schnittbilder realisiert wird [22]. Ähnlich zu organischen Farbstoffen lassen sich Quantenpunkte z.B. mit Hilfe von Immunmarkierung gut zur Einfärbung fixierter Zellen verwenden, die Verwendung mit lebenden Zellen ist jedoch vor allem auf Grund der Cytotoxizität der verwendeten Halbleiter herausfordernd [23, 24]. Neben Halbleiterquantenpunkten werden in der Literatur auch oft metallische Nanopartikel, z.B. aus Gold [25] oder Stickstoff-Fehlstellen-Zentren (auch NV-Zentrum von *nitrogen vacancy*) [26], als vielversprechende Fluorophore genannt. Letztere konnten mit Hilfe von STED-Mikroskopie mit einer Auflösung von lediglich 10 nm abgebildet werden [27].

### Fluoreszente Proteine

Die Geschichte der fluoreszenten Proteine als Marker für biologische Untersuchungen beginnt 1962 mit der Entdeckung, Extraktion und Aufreinigung von *green fluorescent protein* (GFP) aus der Qualle *Aequorea victoria* durch Osamu Shimomura [28]. Die Struktur eines typischen fluoreszenten Proteins (abgekürzt FP, hier mRuby, ein FP mit Emissionsmaximum im Roten [29]) ist in Abbildung 2.5 dargestellt. Der eigentliche Chromophor besteht nur aus drei Aminosäuren (im Falle von mRuby z.B. Methionin, Tyrosin und Glycin), die durch ein  $\beta$ -Fass teilweise von der Umgebung abgeschirmt werden. Die Bedeutung fluoreszenter Proteine und im Speziellen des GFP für die Lebenswissenschaften wurde durch die Verleihung des Nobelpreises in Chemie 2008 an Osamu Shimomura, Martin Chalfie und Roger Tsien (für die Entdeckung und Weiterentwicklung von GFP) abermals unterstrichen. Will man ein spezielles Protein markieren, kann man den entsprechenden genetischen Code um die Sequenz des fluoreszenten Proteins erweitern. Nach der Expression entsteht so ein Fusionsprotein, das neben seiner normalen Struktur einen zusätzlichen, sich spontan bildenden, Fluorophor aufweist [31]. Dies erlaubt eine extrem

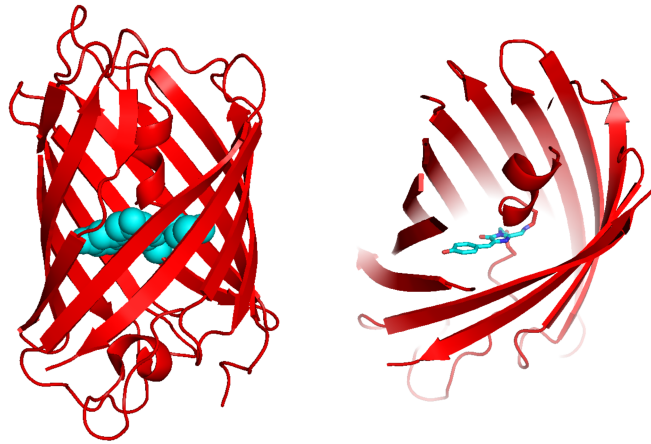


Abbildung 2.5: Kristallstruktur von mRuby: links komplettes Protein mit  $\beta$ -Fass, rechts ist der Chromophor aus Methionin, Tyrosin und Glycin hervorgehoben [30].

spezifische und wenig invasive Markierung in lebenden Zellen und Organismen. In Bezug auf die photophysikalischen Eigenschaften, insbesondere die molekulare Helligkeit und die Photostabilität, können fluoreszente Proteine jedoch noch nicht mit organischen Farbstoffen oder gar Quantenpunkten konkurrieren [2].

## 2.2 Von der Lupe zur höchst aufgelösten optischen Nanoskopie

Um eine Einordnung der Fortschritte auf dem Gebiet der optischen Nanoskopie der letzten Jahre zu ermöglichen, soll zunächst auf die historische Entwicklung und Funktionsweise optischer Instrumente eingegangen werden. Anschließend werden verschiedene Arten der beugungsbegrenzten Fluoreszenzmikroskopie erläutert. Zum Abschluss erfolgt eine detaillierte Betrachtung der *stimulated emission depletion microscopy* (STED-Mikroskopie).

### 2.2.1 Von der Optik in der Antike zur Verwendung einfacher Mikroskope

Bereits im antiken Griechenland arbeiteten Philosophen an der Beschreibung optischer Phänomene. Platon (427-347 v. Chr.) beschrieb bereits die Brechung von Licht beim Übergang von einem optisch dichteren in ein optisch dünneres Medium anhand des scheinbaren Abknickens eines Ruders nach dem Eintauchen in Wasser [32]. Euklid (um 300 v. Chr.), der als Begründer der geometrischen Optik gilt, schilderte in seinen Werken den Zusammenhang zwischen dem Sehwinkel und der scheinbaren Größe eines Objektes. Der römische Gelehrte Seneca (4 v. Chr. - 65 n. Chr.) beobachtete, dass Buchstaben größer erscheinen, wenn man sie durch ein mit Wasser gefülltes, gewölbtes Glasgefäß beobachtet [33]. Trotz dieser Erkenntnisse und der Tatsache, dass bereits einfache Brennläser zum Beispiel für die Entzündung ritueller Feuer verwendet wurden, dauerte es bis ins 13. Jahrhundert, bis sich die Verwendung von geschliffenen Steinen (aus Bergkristall oder Beryll) sowie geschliffener Gläser als Lese- und Sehhilfen durchsetzte [32]. Weitere 300 Jahre später, um das Jahr 1600, begann die Zeit der wissenschaftlichen Entdeckungen mit Hilfe optischer Instrumente wie Teles- und Mikroskopen. Auch wenn der Erfinder des Mikroskops nicht abschließend ermittelt werden kann [34], so ist im Jahre 1621 Cornelius Drebbel als

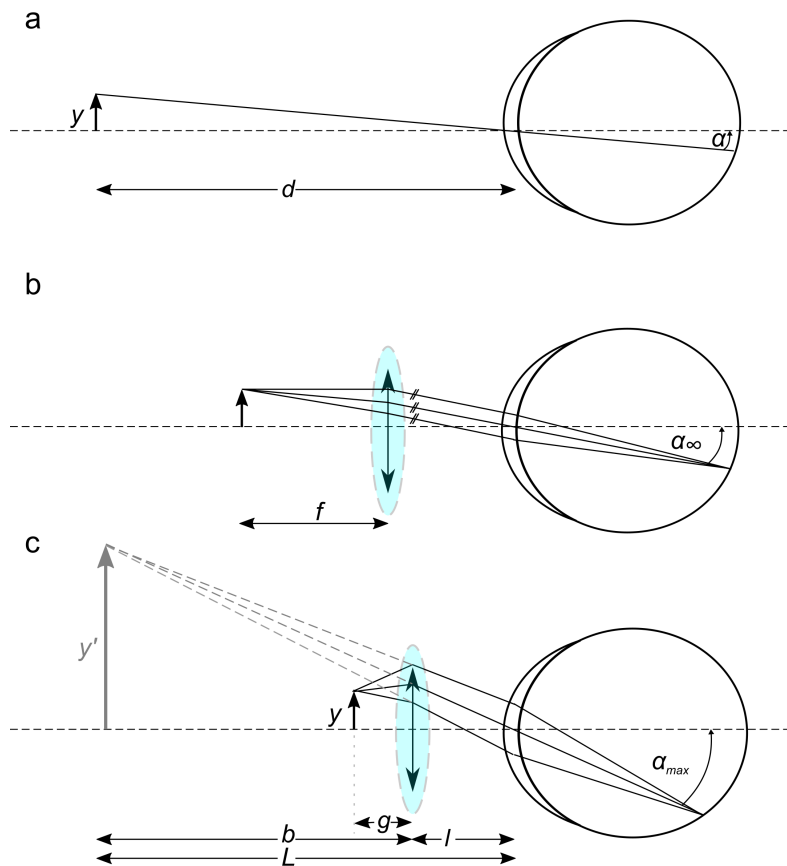


Abbildung 2.6: Funktionsweise einer Lupe. a) Maximale Vergrößerung eines Objektes ohne Hilfsmittel, d.h., das Objekt ist im Nahpunkt des Auges. b) Vergrößerung eines Objektes mit Hilfe einer Sammellinse. Das Objekt steht hier im Brennpunkt der Linse und erlaubt so eine entspannte Beobachtung, da das Bild im Unendlichen liegt und das Auge so nicht akkomodieren muss. c) Maximale Vergrößerung eines Objektes mit Hilfe einer Lupe. Die Lupe wird hier maximal nah an das Auge herangeführt. Eine größtmögliche Akkommodation des Auges erlaubt, das Objekt so zu platzieren, dass das virtuelle Bild im Nahpunkt des Auges liegt [35].

einer der ersten Benutzer eines Mikroskops schriftlich erwähnt. Man unterschied im Allgemeinen zwischen *einfachen Mikroskopen*, also Mikroskopen, die aus lediglich einer Linse bestanden und heutzutage zumeist als Lupe bezeichnet werden, sowie *zusammengesetzten Mikroskopen*, also Systemen aus zwei oder mehr Linsen, die im Aufbau bereits stark den heutzutage immer noch verwendeten Lichtmikroskopen gleichen [35]. Trotz der Tatsache, dass einfache Mikroskope sehr umständlich zu benutzen waren (Objekt und Mikroskop mussten sehr nahe an das Auge herangeführt werden), waren die erreichten Auflösungen bis ins 19. Jahrhundert denen von zusammengesetzten Mikroskopen deutlich überlegen [33]. Die Funktionsweise dieser einfachen Mikroskope ist in Abbildung 2.6 dargestellt.

Die erreichte Vergrößerung  $M$  ist hierbei als Quotient von optischem Einfallswinkel  $\alpha'$  unter Verwendung des Instruments zu Einfallswinkel  $\alpha$  bei einfacher Beobachtung durch das Auge definiert. Mit Hilfe von Trigonometrie und unter Verwendung der paraxialen Optik folgt daraus direkt:

$$M = \frac{\alpha'}{\alpha} = \frac{y'd}{yL}. \quad (2.13)$$



Hier ist  $y$  die Größe des tatsächlichen Objekts,  $y'$  die Größe des virtuellen Bildes des Objekts,  $d$  der minimale Abstand des Objekts zum Auge sowie  $L$  der Abstand des virtuellen Bildes zum Auge. Des Weiteren gilt bei der Abbildung durch eine einfache Linse  $\frac{y'}{y} = \frac{b}{g}$  mit den Bild- bzw. Gegenstandsweiten  $b, g$  und damit unter Verwendung der Linsengleichung (Abbildung mit Hilfe einer Linse der Brennweite  $f$ ):

$$M = -\frac{bd}{gL} = \left(1 - \frac{b}{f}\right) \frac{d}{L} = \left(1 + \frac{L-l}{f}\right) \frac{d}{L}. \quad (2.14)$$

Es können nun zwei wichtige Fälle unterschieden werden. Wie in Abbildung 2.6 b) gezeigt, kann das zu beobachtende Objekt in den Brennpunkt der Lupe gebracht werden (d.h.  $b = f$ ). Hierbei sind die Strahlen hinter der Lupe parallel und das Auge kann somit in einem beliebigen Abstand und entspannt ein vergrößertes Bild betrachten. Für  $M$  gilt dabei nach Gleichung 2.14:

$$M = \frac{\alpha_\infty}{\alpha} = \frac{d}{f}, \quad (2.15)$$

mit dem Winkel  $\alpha_\infty$  als Winkel, unter dem das Licht in das Auge fällt, wenn die Lupe ins unendliche abbildet. Um eine maximale Vergrößerung zu erzielen, muss die Lupe möglichst nahe an das Auge herangebracht werden. Dann gilt  $l \approx 0$  und somit  $M = d \left(\frac{1}{L} + \frac{1}{f}\right)$ .  $M$  wird also umso größer, je kleiner  $L$  wird. Das Auge erlaubt scharfes Sehen jedoch maximal bis zu einem Abstand  $d$ . Daher gilt:

$$M = \frac{\alpha_{\max}}{\alpha} = \frac{d}{f} + 1. \quad (2.16)$$

## 2.2.2 Das zusammengesetzte Lichtmikroskop

Wie bereits im vorhergehenden Abschnitt erwähnt, waren die erreichbaren Auflösungen von einfachen Mikroskopen denen von zusammengesetzten Mikroskopen lange Zeit deutlich überlegen. Dies begründete sich vor allem in der zu dieser Zeit noch üblichen minderwertigen Qualität der Optiken. Dies führte dazu, dass die Verwendung jeder weiteren Linse auf Grund von v.a. sphärischer (sphärische Linsen fokussieren nur parallele Strahlen nahe um die Mitte der Linse auf genau einen Punkt, für weiter am Rand einfallende Strahlen besitzt die Linse andere Brennweiten) und chromatischer (auf Grund von Dispersion sind die Brennweiten je nach Wellenlänge des Lichts unterschiedlich) Aberration eine enorme Verschlechterungen der Abbildungseigenschaften mit sich brachte. Ein zusammengesetztes Mikroskop besteht dabei aus mindestens zwei Linsen: der objektseitigen Linse (Objektiv), die ein stark vergrößertes Zwischenbild erzeugt, und der augenseitigen Linse (Okular), die dieses Zwischenbild abermals stark vergrößert und analog zur Verwendung einer Lupe in das Auge abbildet. Diese Konstruktion, die in Abbildung 2.7 dargestellt ist, erlaubt durch dieses zweistufige Design zum einen deutlich höhere Vergrößerungen (es gilt:  $M_{\text{ges}} = M_{\text{Objektiv}} \cdot M_{\text{Okular}}$ ), ein wesentlich größeres Sichtfeld und einen deutlich größeren und damit ergonomischeren Abstand zwischen Auge und zu beobachtendem Objekt. Trotz der schlechteren Auflösung verwendeten Naturforscher des 17. Jahrhunderts, wie z.B. Robert Hooke in seiner wegweisenden *Micrographia* [36], auch diese deutlich einfacher zu verwendenden zusammengesetzten Mikroskope. Durch die Entdeckung neuer Glassorten im 17. Jahrhundert, wie z.B. Flintglas, konnten im 18. Jahrhundert erste achromatische Linsen hergestellt werden. Die Zusammensetzung von

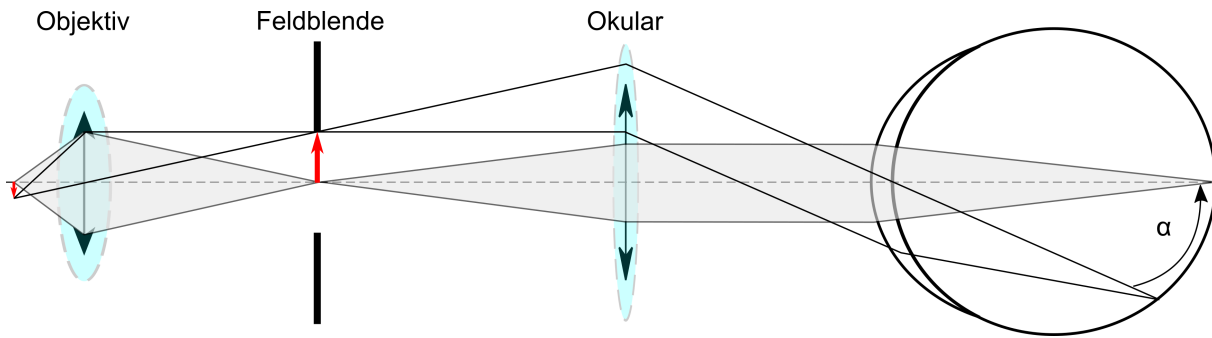


Abbildung 2.7: Funktionsprinzip eines zusammengesetzten Mikroskops. Das Objektiv erzeugt ein vergrößertes und gedrehtes Zwischenbild des Objektes am Ort der Feldblende. Dieses wird dann mit Hilfe des Okulars vergrößert in das Auge abgebildet. Die Gesamtvergrößerung besteht hierbei aus dem Produkt der Vergrößerung des Objektivs und der Vergrößerung des Okulars.

Gläsern mit unterschiedlichen Dispersionseigenschaften (typischerweise klassisches Kron- und Flintglas) zu einer einzigen Linse erlaubte eine Korrektur der chromatischen Aberration und verbesserte damit die Abbildungseigenschaften von Optiken wesentlich [32]. Eine weitere Verbesserung erfolgte durch die zunehmende Einführung der Serienproduktion vor allem durch Carl Zeiss in Jena (heute Carl Zeiss AG) sowie Carl Kellner in Wetzlar (heute Leica). Den größten Einfluss hatte jedoch die zunehmende Begründung der Objektivherstellung auf wissenschaftlichen Berechnungen, v.a. durch Ernst Abbe bei Carl Zeiss. Neben vielen technischen Errungenschaften, wie z.B. dem Abbeschen Kondensator oder der Entwicklung von Apochromaten (eine Weiterentwicklung von achromatischen Linsen), ist vor allem sein Beitrag zur Theorie der Bildentstehung im Mikroskop hervorzuheben [37]. In dieser Abhandlung beschäftigte sich Ernst Abbe mit der Bedeutung von Beugung für die maximal erreichbare Auflösung eines Mikroskops und begründete damit das bekannt gewordene Abbe-Limit:

$$d = \frac{\lambda}{2n \sin \alpha} = \frac{\lambda}{2NA}. \quad (2.17)$$

Hier bezeichnet  $d$  den minimalen Abstand unter dem zwei Objekte noch als getrennt wahrgenommen werden können,  $\lambda$  die Wellenlänge des Lichts und  $n \sin \alpha$  das Produkt aus Brechungsindex des Immersionsmediums  $n$  und dem Sinus des halben Winkels, unter dem das Objektiv gerade noch Licht auf sammeln kann,  $\alpha$  das oftmals auch als numerische Apertur  $NA$  bezeichnet wird. Dies bedeutet, dass auch bei perfekten Optiken die Wellennatur des Lichtes die maximale erreichbare Auflösung auf ca. die Hälfte der Wellenlänge reduziert. Ernst Abbe hatte damit eine fundamentale Begrenzung der Auflösung postuliert, die bis zum Ende des 20. Jahrhunderts nicht unterschritten werden konnte (siehe 2.2.4).

### 2.2.3 Epifluoreszenzmikroskopie und Konfokalmikroskopie

Die Vorteile von enormer Spezifität und hohem Kontrast bei der Einfärbung von Präparaten mit fluoreszenten Markern sorgte bereits Ende der 1980er Jahre dafür, dass sich die Fluoreszenzmikroskopie in der biologischen Forschung weitgehend durchsetzte [38]. Die einfachste Art der Fluoreszenzmikroskopie ist dabei die Epifluoreszenzmikroskopie, die eine Erweiterung der einfachen Lichtmikroskopie darstellt. Typischerweise wird hierbei aus dem breiten Spektrum einer Weißlichtquelle mit Hilfe eines passenden

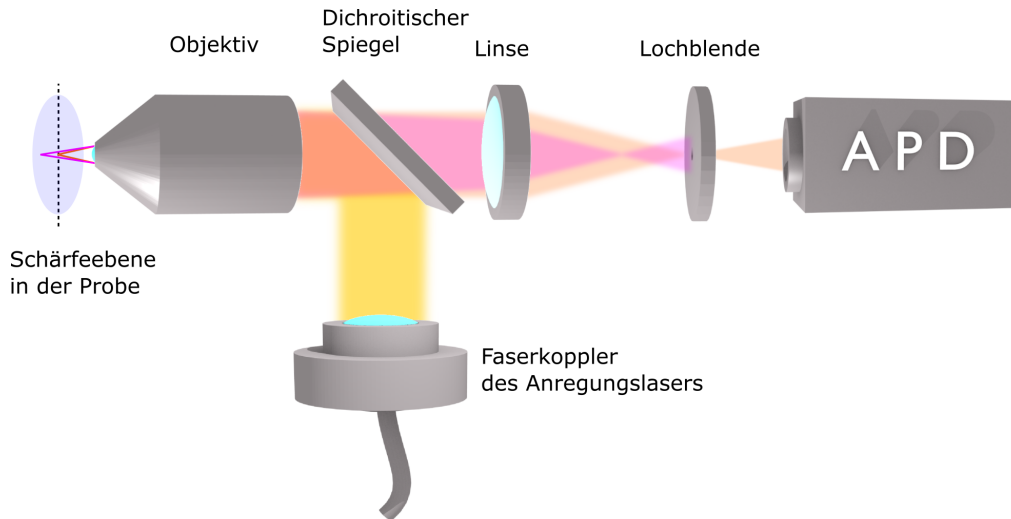


Abbildung 2.8: Funktionsprinzip eines Konfokalmikroskops. Der Anregungslaser wird über einen dichroitischen Spiegel mit Hilfe des Objektivs in die Probe fokussiert und regt dort Fluorophore an. Fluoreszenz aus der Schärfeebene in der Probe (hier orange dargestellt) wird vom Objektiv aufgesammelt und passiert den Strahlteiler. Eine Linse fokussiert das Licht auf eine Lochblende, die Fluoreszenz kann die Lochblende passieren und wird anschließend von einem Detektor (z.B. einer APD (Lawinendiode, von engl. *avalanche photo diode*)) detektiert. Fluoreszenz, die oberhalb (unterhalb) der Schärfeebene emittiert wird und hier pink dargestellt ist, wird nach Durchgang durch den Strahlteiler von der Linse nicht auf die Lochblende fokussiert. Der Fokus liegt vor (hinter) der Lochblende und somit kann nur ein sehr kleiner Teil des Lichts die Blende passieren und wird detektiert. Dies führt zu einer starken Unterdrückung des Fluoreszenzsignals, das nicht aus der Schärfeebene der Probe stammt.

Farbfiltern der zur Absorptionscharakteristik des Fluorophors passende Teil des Spektrums ausgewählt und anschließend zur Beleuchtung des Präparats verwendet. Durch einen dichroitischen Spiegel, der auf das Emissionsspektrum des Fluorophors abgestimmt ist, kann anschließend das Anregungslicht vom Emissionslicht getrennt werden, bevor es detektiert wird. Bei einer sehr starken Einfärbung der Probe kann das Bild anschließend mit Hilfe eines Okulars beobachtet werden, üblicher ist jedoch die Verwendung von hochsensitiven EMCCD- oder sCMOS-Kameras.

Die Überlagerung von Fluoreszenzlicht aus der Fokusebene mit Licht von außerhalb verhindert die Verwendung eines Epifluoreszenzmikroskops zur Aufnahme von 3D-Bildern. Eine Lösung hierfür präsentierte 1961 Marvin Minsky mit der Entwicklung des Konfokalmikroskops [39]. Bei dieser Art der Fluoreszenzmikroskopie wird das Anregungslicht auf die Probe fokussiert und anschließend wird entweder der Fokus über die Probe gerastert (mit Hilfe eines Strahlscanners) oder die Probe relativ zum Anregungsfokus verschoben (mit Hilfe eines Rastertisches). Das vom Objektiv aufgesammelte Fluoreszenzlicht wird danach, bevor es auf den Detektor trifft, noch einmal mit Hilfe einer Linse in eine Lochblende fokussiert. Diese Lochblende ist dabei konfokal zum Anregungsfokus. Dies hat zur Folge, dass Licht, das nicht aus der Fokusebene stammt, auch nicht auf die Lochblende fokussiert wird und somit zu großen Teilen die Blende nicht passieren kann. Das bedeutet, dass das Signal, das von Fluorophoren außerhalb der Fokusebene stammt, auch nur zu geringen Teilen detektiert wird. Dieses Prinzip ist in Abbildung 2.8 dargestellt. Mit Hilfe dieser Technik ist es also möglich, wesentlich kontrastreichere Schichtaufnahmen von 3D-Strukturen zu erzeugen [38]. Des Weiteren ist die Auflösung im Vergleich zu einem Epifluores-

zenzmikroskop verbessert. Dies soll im Folgenden näher erläutert werden.

### Die Auflösung des Konfokalmikroskops

Um die Auflösung des Konfokalmikroskops zu berechnen, soll zunächst die Größe des fokussierten Laserstrahls nach dem Objektiv mit Hilfe skalarer Beugungstheorie berechnet werden. Ausgehend vom Huygens-Fresnel-Prinzip, das besagt, dass jeder Punkt einer Wellenfront als Ausgangspunkt einer neuen sekundären Kugelwelle angesehen werden kann und dass die Interferenz zwischen diesen Sekundärwellen Beugungseffekte beschreibt, formulierte Kirchhoff das so genannte Fresnel-Kirchhoff Beugungsintegral [40]:

$$U(P) = -\frac{Ai}{2\lambda} \iint_{\mathcal{A}} \frac{e^{ik(r+s)}}{rs} [\cos(n,r) - \cos(n,s)] dS. \quad (2.18)$$

Dieses Integral erlaubt die Berechnung der elektrischen Feldstärke  $U$  einer monochromatischen sphärischen Welle mit Amplitude  $A$  vom Ausgangspunkt  $P_0$  am Beobachtungspunkt  $P$  bei Durchgang durch eine beliebige Blende unter der Annahme, dass die Abstände zwischen  $P$  bzw.  $P_0$  und der Blende  $s$  bzw.  $r$  deutlich größer als die Wellenlänge sind. Vereinfacht man das Problem nun weiter und geht davon aus, dass die Blende gegenüber dem Abstand zwischen Quelle und Blende klein ist und außerdem der Beobachtungsschirm weit entfernt ist, so erhält man die bekannte Fraunhofer-Beugung:

$$U(p,q) = C \iint G(\xi, \eta) e^{-ik(p\xi + q\eta)} d\xi d\eta. \quad (2.19)$$

Hierbei beschreibt  $C$  eine von  $P$  und  $P_0$  abhängige Konstante,  $\xi$  und  $\eta$  sind kartesische Koordinaten eines Punktes in der Blende,  $G(\xi, \eta)$  ist die Blendenfunktion und  $p$  und  $q$  beschreiben die Differenz des Richtungskosinus zwischen  $P$  und  $P_0$  für x- ( $p$ ) und y-Richtung ( $q$ ). In dieser Darstellung ist offensichtlich, dass in der Fraunhofer-Beugung das entstehende Beugungsbild gerade der Fourier-Transformierten der Blendenfunktion entspricht. Eine Transformation in Polar-Koordinaten erlaubt nun eine einfache Berechnung des Beugungsbildes einer kreisrunden Blende. Es gilt für die beobachtete Intensität  $I$  am Punkt  $P$ :

$$I(P) \propto |U(P)|^2 = \left[ \frac{2J_1(ka \sin(\theta))}{ka \sin(\theta)} \right]^2 I_0, \quad (2.20)$$

mit  $k = \frac{2\pi}{\lambda}$ ,  $a$  als Radius der Blende,  $\theta$  als Winkel, unter dem der Punkt  $P$  zur optischen Achse steht, und  $J_1(x)$  als Besselfunktion erster Ordnung (siehe Abbildung 2.9). Diesen Zusammenhang (Gleichung 2.20) bezeichnet man nach ihrem Entdecker George Biddell Airy oft als Airy-Funktion [41]. Ein empirisches Limit für die Auflösung von zwei sich nebeneinander befindenden Strukturen postulierte Rayleigh [42]: Zwei Punkte sind genau dann optisch getrennt wahrnehmbar, wenn das Beugungsmaximum des einen maximal in das erste Beugungsminimum des zweiten fällt (siehe Abbildung 2.9). Die erste Nullstelle von Gleichung 2.20 befindet sich gerade bei  $ka \sin(\theta) = 1.22\pi$ . Daraus ergibt sich:

$$\frac{1.22\lambda}{2a} = \sin(\theta) = \frac{d_{\min}}{L} \quad (2.21)$$

mit  $L$  als Abstand zwischen dem Mittelpunkt der Blende und dem Beobachtungspunkt. Beachtet man die für die Fraunhofer-Beugung getroffenen Bedingungen und nimmt an, dass die kreisrunde Blende

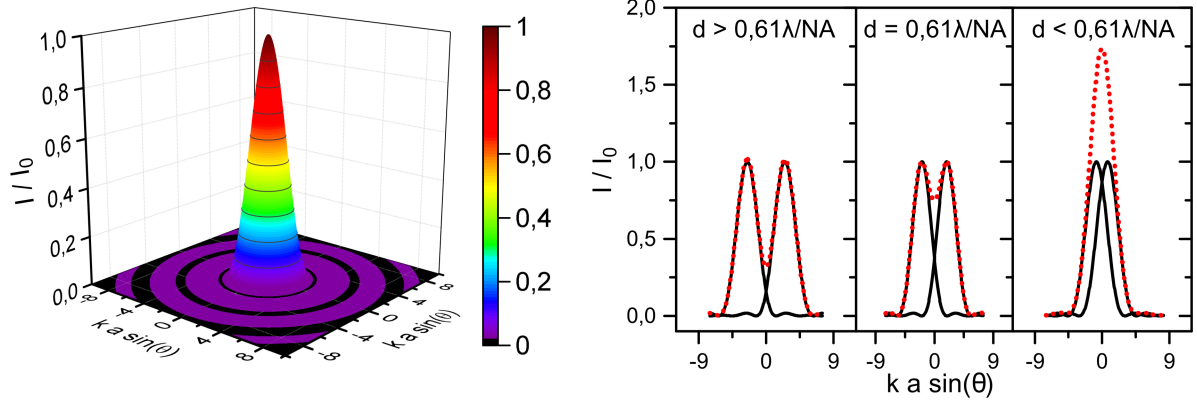


Abbildung 2.9: Links: Abbildung der Airy-Funktion, wie in Gleichung 2.20 beschrieben, die die Intensitätsverteilung nach Beugung an einer kreisrunden Blende beschreibt. Rechts: Darstellung des Rayleigh-Limits. Die schwarzen Linien zeigen die durch Beugung verwaschene Intensitätsverteilung von Punktquellen, die gestrichelte rote Linie gibt die Summe der Intensität der beiden Punktquellen an. Zwei Punkte, die noch gut auflösbar sind ( $d > 0.61\lambda/NA$ ), zwei Punkte, die gerade noch auflösbar sind ( $d = 0.61\lambda/NA$ ) und zwei Punkte, die nicht mehr getrennt wahrgenommen werden können ( $d < 0.61\lambda/NA$ ).

gerade einer Linse mit der Brennweite  $f$  entspricht, deren Fokalebene auf dem Beobachtungsschirm liegt, so gilt  $L \approx f$ . Damit ergibt sich die nach Airy und Rayleigh bekannte Bedingung für die Auflösung eines optischen Instruments:

$$d_{\min} = \frac{1.22\lambda f}{2a} = \frac{1.22\lambda}{2NA}. \quad (2.22)$$

Im direkten Umkehrschluss kann ein punktförmiges Objekt auf Grund einer endlichen Apertur des Mikroskops nicht als Punkt abgebildet werden, es entsteht ein aufgeweitetes Bild des Punktes, das durch die Airy-Funktion beschrieben und als Punktspreizfunktion (PSF) bezeichnet wird. Die laterale Halbwertsbreite  $HWB_{\text{lateral}}$  dieser PSF wird oftmals auch als ein Auflösungskriterium angesehen [43]. Es gilt:

$$HWB_{\text{lateral}} = \frac{0.51\lambda}{NA}. \quad (2.23)$$

Analog zur Berechnung der Beugungsmuster in der Fokusebene, kann mit Hilfe der skalaren Beugungstheorie auch die 3D-Intensitätsverteilung in der Nähe der Fokusebene berechnet werden [40]. Auf Grund des großen Umfangs der Rechnung soll hier nur das Ergebnis diskutiert werden. Es gilt:

$$U(u, v) = \int_0^1 P(\rho) J_0(v\rho) e^{-\frac{1}{2}iu\rho^2} \rho d\rho, \quad (2.24)$$

mit den optischen Koordinaten  $u = kz \sin^2 \alpha$  und  $v = kr \sin \alpha$ . Eine Auswertung des Integrals ergibt für die Intensität in der Fokusebene gerade die uns bekannte Airy-Funktion, für die Intensität entlang der optischen Achse gilt

$$I(u, 0) = \frac{4}{u^2} (2 - 2\cos(0.5u)) I_0 = \left( \frac{\sin u/4}{u/4} \right)^2 I_0 \quad (2.25)$$

und demnach für die axiale Halbwertsbreite

$$\text{HWB}_{\text{axial}} = 1.77 \frac{\lambda}{\text{NA}^2}. \quad (2.26)$$

In der Praxis werden bei der Konfokalmikroskopie Fluorophore in der Probe angeregt und anschließend detektiert. Die räumliche Anregungswahrscheinlichkeit hängt von der Intensitätsverteilung in der Probe ab und ist somit durch die PSF gegeben. Für den Fall einer unendlich großen Blende ist die Detektionswahrscheinlichkeit isotrop und die gesamte PSF ist allein durch die Anregung gegeben. Die oben stehenden Berechnungen beschreiben also die Auflösung eines Konfokalmikroskops für den Fall einer unendlich großen Blende. Verkleinert man die konfokale Lochblende, so ist die Detektionswahrscheinlichkeit nicht mehr isotrop, die resultierende PSF ist dann gerade das Produkt aus ortsabhängiger Anregungs- und Detektionswahrscheinlichkeit [44]. Mathematisch formuliert gilt nach [45, 46]:

$$I = |U(u, v)|^2 (|U(u, v)|^2 * D). \quad (2.27)$$

Die detektierte Intensität von einer fluoreszenten Punktquelle ist also gerade die Multiplikation der PSF der Punktquelle mit der Faltung zwischen der PSF einer Punktquelle und der Blendenfunktion der Konfokalblende  $D$ . Für den Fall einer infinitesimal kleinen Blende wird die Blendenfunktion zu einer Delta-Distribution und es ergibt sich:

$$I_{D \rightarrow 0} = |U(u, v)|^4. \quad (2.28)$$

Daraus lassen sich die Grenzwerte der Halbwertsbreiten für eine punktförmige Konfokalblende berechnen:

$$\text{HWB}_{\text{lateral}}^{D \rightarrow 0} = \frac{0.37\lambda}{\text{NA}}, \text{ sowie} \quad (2.29)$$

$$\text{HWB}_{\text{axial}}^{D \rightarrow 0} = \frac{1.28\lambda}{\text{NA}^2}. \quad (2.30)$$

Diese Gleichungen gelten für den theoretischen Fall einer infinitesimal kleinen Lochblende. Dies hätte jedoch auch zur Folge, dass infinitesimal wenig Licht durch den Detektor aufgesammelt werden könnte, und ist daher in der Praxis nicht relevant. Üblicher ist es, den Durchmesser der Lochblende so zu wählen, dass er gerade dem Durchmesser des ersten Minimums der PSF des Anregungslasers in der Probe entspricht. Dieser Durchmesser wird häufig als Airy-Einheit (AE) bezeichnet. Dies hat zwar kaum laterale Auflösungsverbesserung zur Folge, sorgt aber weiterhin für eine deutliche Verbesserung der axialen Auflösung. Des Weiteren können bei dieser Konfiguration 86,5% des vom Objektiv aufgesammelten Lichtes auf den Detektor gelangen, um somit neben guter Auflösung auch ein sinnvolles Signal-zu-Rausch Verhältnis zu erhalten. Sämtliche bisher gezeigten Berechnungen gelten dabei unter Verwendung paraxialer Näherungen und damit für Objektive mit einer geringen NA. In der Praxis werden in der Konfokalmikroskopie Immersionsobjektive mit numerischen Aperturen  $>1$  verwendet. Die durch skalare Beugungstheorie gewonnenen Informationen über die PSF gelten dann nur noch näherungsweise [47]. Präzise Aussagen über die vorliegenden PSFs lassen sich somit nur noch mit Hilfe vektorieller Beugungstheorie treffen, wie sie durch Richards und Wolf in den 50er Jahren entwickelt wurde [48]. Das so genannte Debye-Wolf-Integral kann dann numerisch oder mit Hilfe von 3D-FFT näherungsweise gelöst werden

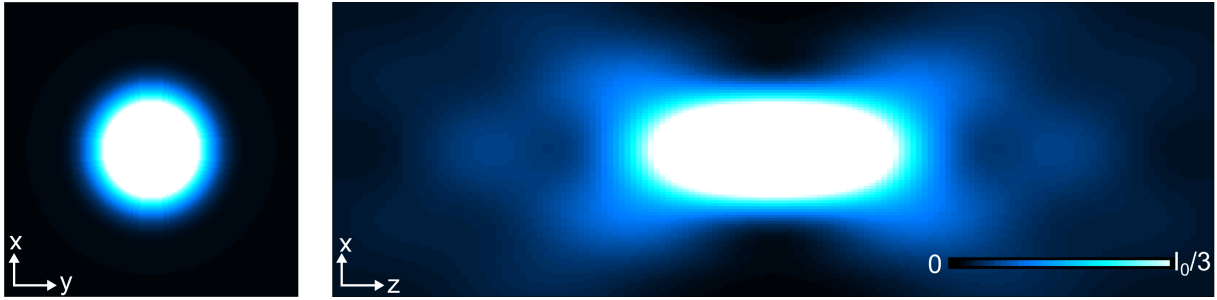


Abbildung 2.10: Simulation des Beugungsbildes des Anregungslasers nach Fokussierung durch ein Objektiv mit hoher numerischer Apertur. Die Simulation erfolgte nach [50].

[49]. In Abbildung 2.10 ist beispielhaft das Beugungsbild eines Laserstrahls dargestellt, der mit Hilfe eines Objektivs mit hoher numerischer Apertur fokussiert wurde.

### 2.2.4 STED-Mikroskopie

Auch wenn moderne Konfokalmikroskope eine Auflösungsverbesserung gegenüber klassischen Epifluoreszenzmikroskopen erreichen können, so ist die erreichte Auflösung immer noch fundamental durch Beugung begrenzt. Um diese Auflösung deutlich zu unterschreiten, wurden im Laufe des 20. Jahrhunderts verschiedene Techniken wie Rasterkraft-, Rastertunnel- oder Elektronenmikroskopie entwickelt, die sich aber nur sehr bedingt für spezifische *in vivo* Untersuchungen eignen [51, 52, 53]. Eine völlig neuartige Idee postulierten Stefan Hell und Jan Wichmann 1994 [54]. Anstatt alle Fluorophore, die in einem beugungsbegrenzten Bereich angeregt wurden, zu detektieren, verwendeten sie einen zweiten Laser, der mit Hilfe stimulierter Emission bestimmte Bereiche des zuvor angeregten Volumens wieder abregte, bevor Photonen durch spontane Emission der Fluorophore in relevantem Maß emittiert werden konnten. Eine erste experimentelle Realisierung dieser STED-Mikroskopie genannten Technik erfolgte 1999 [55]. Der zur Abregung der Fluorophore verwendete Laser (oft Abregungs- oder STED-Laser) ist dabei im Vergleich zum Emissionsmaximum der Fluorophore deutlich rotverschoben. Dies hat zwei Gründe. Zum einen ist die stimulierte Emission bei moderaten Strahlungsleistungen deutlich unterdrückt gegenüber der spontanen Emission (siehe Kapitel 2.1.1), daher muss der STED-Laser eine um Größenordnungen höhere Leistungsdichte als der Anregungslaser aufweisen, um so die stimulierte Emission zum dominanten Prozess zu machen. Eine Anregung der Fluorophore durch den STED-Laser würde eine Auflösungsverbesserung jedoch verhindern. Somit muss die Wellenlänge des Lasers möglichst weit vom Absorptionsspektrum gewählt werden, um eine Wiederanregung stark zu unterdrücken. Zum anderen kann durch eine deutliche Rotverschiebung des Abregungslasers im Vergleich zum Emissionsmaximum des Fluorophors eine chromatische Auftrennung zwischen durch stimulierte und spontane Emission erzeugten Photonen stattfinden.<sup>2</sup>

Zusätzlich wurden in der STED-Mikroskopie Phasenmasken zur Erzeugung von symmetrischen Intensitätsverteilungen (siehe Kapitel 3.1.2) mit zentralen Minima (meist auf Grund ihrer Torus-Form auch als STED-Donut bezeichnet) verwendet. Diese verbesserten die Anwendbarkeit der STED-Mikroskopie deutlich [56].

<sup>2</sup> Die Detektion der stimulierten Emission ist auf Grund des Impulses der Photonen, der dem Impuls der stimulierenden Photonen entspricht, zusätzlich räumlich unterdrückt.

### Die Auflösung des STED-Mikroskops - das erweiterte Abbe-Limit

Im Folgenden soll die erreichbare Auflösung eines STED-Mikroskops anhand der Arbeiten von Hell, Westphal und Harke [57, 58, 16] näher beleuchtet werden. Gegeben sei ein Ensemble aus Fluorophoren im angeregten Zustand 1, die sich sowohl durch Fluoreszenz (Rate  $k_{\text{Fluo}}$ ) als auch durch stimulierte Emission (Rate  $k_{\text{STED}}$ ) in den Grundzustand 0 abregen. Die Anregung der Fluorophore ist zum Zeitpunkt  $t = 0$  bereits erfolgt. Für die Intensität des STED-Lasers gilt:

$$I_{\text{STED}}(t) = \begin{cases} I_{\text{STED}}, & 0 \leq t \leq \tau \\ 0, & t > \tau \end{cases} \quad (2.31)$$

Es gilt nach Gleichung 2.12 für die Anzahl der Fluorophore im angeregten Zustand:

$$N_1(t) = e^{-(k_{\text{Fluo}} + k_{\text{STED}})t}. \quad (2.32)$$

Für die STED-Rate gilt:

$$k_{\text{STED}} = I_{\text{STED}}\sigma, \quad (2.33)$$

mit dem Wirkungsquerschnitt für stimulierte Emission  $\sigma$ . Der Unterdrückungsfaktor  $\eta$  der spontanen Emission durch STED, also das Verhältnis von Fluorophoren im angeregten Zustand im Vergleich zum Grundzustand mit und ohne STED-Strahl ist gegeben als:

$$\eta(I_{\text{STED}}) = \frac{N_1(t, I_{\text{STED}})}{N_1(t, I_{\text{STED}} = 0)} = e^{-\sigma\tau I_{\text{STED}}} = e^{-\ln(2) \cdot I_{\text{STED}}/I_{\text{Sat}}}. \quad (2.34)$$

$I_{\text{Sat}}$  gibt dabei die sogenannte Sättigungsintensität an, bei der genau die Hälfte aller Fluorophore abgeregt wurde. Betrachtet man die Ortsabhängigkeit der STED-Intensität, so ergibt sich für den Bereich um das zentrale Minimum bei  $x = 0$  in guter Näherung eine Parabelform:

$$I_{\text{STED}}(x) \approx 4I_{\text{STED}}a^2x^2. \quad (2.35)$$

Hierbei ist  $a$  ein Maß für die Steilheit der Flanken der Parabel. Durch Einsetzen in Gleichung 2.34 erhält man:

$$\eta(x) = e^{-\ln(2)4a^2x^2I_{\text{STED}}/I_{\text{Sat}}}. \quad (2.36)$$

Die effektive PSF in  $x$ -Richtung nach Einwirkung des STED-Strahls ist also gerade die PSF der Anregung gewichtet mit dem ortsabhängigen Unterdrückungsfaktor:

$$\text{PSF}_{\text{STED}}(x) = \text{PSF}_{\text{Conf}}(x) \cdot \eta(x) = e^{-4\ln(2)x^2/d_c^2} \cdot e^{-4\ln(2)a^2x^2I_{\text{STED}}/I_{\text{Sat}}} = e^{-4\ln(2)(d_c^{-2} + a^2I_{\text{STED}}/I_{\text{Sat}})x^2}. \quad (2.37)$$



Beschreibt man die PSF der Anregung dabei in guter Näherung als Gauß-Funktion mit der Halbwertsbreite  $d_c$ , so ergibt sich für die effektive PSF des STED-Mikroskops nach Abregung ebenfalls eine Gauß-Verteilung mit der Halbwertsbreite:

$$d_{\text{STED}} = \frac{d_c}{\sqrt{1 + d_c^2 a^2 \frac{I_{\text{STED}}}{I_{\text{sat}}}}}. \quad (2.38)$$

Diese Rechnung gilt allgemein für die laterale Ausdehnung der PSF des STED-Mikroskops. Bei geeigneter Wahl der Phasenmaske ist sie jedoch auch für die erreichbare axiale Auflösungsverbesserung gültig [16]. Aus Gleichung 2.38 ist direkt ersichtlich, dass die Auflösung des STED-Mikroskops nicht mehr durch Beugung, sondern durch die Intensität des STED-Lasers beschränkt ist. Des Weiteren ist die genaue Form der Intensitätsverteilung des STED-Lasers, die im Parameter  $a$  steckt, ausschlaggebend für die Effizienz der Einschränkung der PSF durch den STED-Laser. Die Photostabilität der Farbstoffe, die Wechselwirkung des STED-Lasers mit der zu untersuchenden Probe und ein nicht verschwindendes Minimum der STED-Intensität im Zentrum des STED-Donuts setzen Grenzen für die anwendbare Laserleistung. Dies limitiert letztendlich zusammen mit der nicht verschwindenden Größe der Fluorophore auch die erreichbaren Auflösungen. Es ist zu erwähnen, dass auch aufwändige numerische Berechnungen der resultierenden PSF eines STED-Mikroskops mit Hilfe vektorieller Beugungstheorie bestätigen, dass der zuvor gefundene Zusammenhang auch bei Verwendung von Immersionsobjektiven mit hoher numerischer Apertur bestand hat [59].

## 2.3 Fluoreszenzkorrelationsspektroskopie

Mit der Entwicklung der Fluoreszenzkorrelationsspektroskopie (FCS von engl. *fluorescence correlation spectroscopy*) 1972 [60] schufen Madge, Elson und Webb eine mächtige Methode zur Charakterisierung von Prozessen auf molekularer Ebene, die zu einer Fluktuation des Fluoreszenzsignals führen. Hierzu gehören Diffusion der Fluorophore, lokale Konzentrationen und deren thermodynamisch bedingte Fluktuation sowie Ratenkoeffizienten, z.B. von chemischen Reaktionen [61]. Die FCS hat sich seit ihrer Erfindung als ein weit verarbeitetes Werkzeug in vielen Bereichen der Lebenswissenschaften etabliert. Dabei kam es zu vielen speziellen Ausprägungen, die explizit auf Forschungsfragen zugeschnitten waren, wie z.B. zwei-Fokus-FCS, Linienraster-FCS und zwei-Farb-FCS, auf die in den folgenden Kapiteln detaillierter eingegangen werden soll [62].

### 2.3.1 Klassische Fluoreszenzkorrelationsspektroskopie in 3D

Die FCS basiert auf dem Prinzip, das Fluoreszenzsignal einer Probe, das mit hoher Zeitauflösung aufgenommen wurde, einer Autokorrelationsanalyse zu unterziehen und somit die Selbstähnlichkeit des Signals zu bestimmen. Diese Analyse erlaubt, die Prozesse, die zu einer Fluktuation der Fluoreszenz führen, zeitlich zu charakterisieren. Ein typischer Fall ist zum Beispiel, dass die Fluktuation des Fluoreszenzsignals durch das Diffundieren von Teilchen in ein oder aus einem Beobachtungsvolumen hervorgerufen wird. Ist ein Teilchen also im Beobachtungsvolumen aufgetaucht, so wird es sich nach sehr kurzen Zeiten mit großer Wahrscheinlichkeit noch im Beobachtungsvolumen befinden und die Selbst-

ähnlichkeit des Fluoreszenzsignals wird hoch sein. Zu sehr großen Zeiten ist die Wahrscheinlichkeit, dass sich das Teilchen immer noch im Beobachtungsvolumen befindet, ebenso wie die Selbstähnlichkeit des Signals, praktisch null. Der zeitliche Verlauf der Selbstähnlichkeit des Signals ist also direkt an den Diffusionsprozess der Teilchen geknüpft und erlaubt es dadurch, z.B. die Diffusionsgeschwindigkeit zu berechnen.

Nimmt man an, dass die Anzahl fluoreszenter Moleküle  $N$  in einem gewissen Beobachtungsvolumen poissonverteilt ist, so ergibt sich für das quadratische Mittel der Fluktuation der Teilchenanzahl:

$$\frac{\sqrt{\langle (\delta N)^2 \rangle}}{\langle N \rangle} = \frac{1}{\sqrt{\langle N \rangle}}. \quad (2.39)$$

Daraus folgt direkt, dass eine zu große Teilchenanzahl im Beobachtungsvolumen die Verwendung der FCS unmöglich macht, da die relative Fluktuation, also das für die FCS verwendete Signal, immer geringer wird und daher im Messrauschen untergeht. Die Strategie ist deshalb, sowohl das Beobachtungsvolumen durch die Verwendung eines Konfokalmikroskops möglichst klein zu halten (typischerweise gilt  $V \approx 1$  fl) als auch die Konzentration der Fluorophore so gering zu halten, dass sich im Mittel etwa 0.1 bis 1000 Teilchen im Konfokalvolumen befinden (d.h.  $1 \mu\text{mol} > C > 1 \text{nmol}$ ). Die untere Grenze der Teilchenzahl ergibt sich dabei durch das Hintergrundsignal, das das Fluoreszenzsignal nicht überwiegen sollte [61]. Betrachtet man die Fluktuation des Fluoreszenzsignals über die Zeit, so ergibt sich:

$$\delta F(t) = F(t) - \langle F(t) \rangle = \kappa \int I(x, y, z) \cdot \delta(\sigma \cdot \gamma \cdot C(x, y, z, t)) dV. \quad (2.40)$$

Dabei ist  $\kappa$  die Detektionseffizienz,  $I(x, y, z)$  das konfokale Beobachtungsvolumen in kartesischen Koordinaten (d.h. die am Detektor ankommende Intensität unter Beachtung der konfokalen Lochblende, siehe Gleichung 2.27), und  $\delta$  die Fluktuation von Absorptionskoeffizient  $\sigma$ , Quanteneffizienz  $\gamma$  und lokaler Konzentration  $C$  der einzelnen Fluorophore. Unter korrekten Versuchsbedingungen kann das konfokale Beobachtungsvolumen mit Hilfe einer 3D-Gauss-Funktion angenähert werden [63]:

$$I(x, y, z) = \cdot e^{-\frac{x^2+y^2}{r_0^2}} e^{-\frac{z^2}{z_0^2}}, \quad (2.41)$$

wobei  $r_0$  bzw.  $z_0$  die radiale bzw. axiale Ausdehnung ist, bei der die Intensität auf  $1/e^2$  abgefallen ist. Unter Verwendung der molekularen Helligkeit  $\eta = I_0 \kappa \gamma \sigma$  ergibt sich dann für die Fluktuation des Fluoreszenzsignals:

$$\delta F(t) = \int I(x, y, z) \delta(\eta C(x, y, z, t)) dV. \quad (2.42)$$

Durch Einsetzen in die Definition der normalisierten Autokorrelation  $G(\tau)$ , die die Selbstähnlichkeit des Signals zum Zeitpunkt  $t$  mit dem Signal zum Zeitpunkt  $t + \tau$  angibt, ergibt unter der Annahme, dass die molekulare Helligkeit über die Zeit konstant ist (d.h.  $\delta \eta = 0$ ):

$$G(\tau) = \frac{\langle \delta F(t) \cdot \delta F(t + \tau) \rangle}{\langle F(t) \rangle^2} = \frac{\iint I(x, y, z) I(x', y', z') \langle \delta C(x, y, z, 0) \delta C(x', y', z', \tau) \rangle dV dV'}{(\langle C \rangle \int I(x, y, z) dV)^2}. \quad (2.43)$$

Unter Voraussetzung freier 3D-Diffusion der Fluorophore ergibt sich dann nach kurzer Rechnung:

$$G(\tau) = \frac{1}{\langle N \rangle} \cdot \frac{1}{\left(1 + \frac{\tau}{\tau_D}\right)} \cdot \frac{1}{\sqrt{1 + \left(\frac{r_0}{z_0}\right)^2 \cdot \frac{\tau}{\tau_D}}}. \quad (2.44)$$

Hierbei ist  $\tau_D = \frac{r_0^2}{4D}$  die charakteristische Diffusionszeit und  $D$  der Diffusionskoeffizient. Diese Formel für freie 3D-Diffusion kann einfach an die gemessenen Daten angepasst werden, um die gewünschten Parameter zu erhalten. Die Konzentration der Fluorophore kann dann über den Zusammenhang

$$G(0) = \frac{1}{\langle N \rangle} = \frac{1}{V_{eff} \cdot \langle C \rangle} = \frac{1}{(\pi^{\frac{3}{2}} r_0^2 z_0) \cdot \langle C \rangle} \quad (2.45)$$

bestimmt werden. Da das effektive Beobachtungsvolumen meist unbekannt ist, muss dieses zuvor mit Hilfe einer Referenzprobe bekannter Konzentration oder mit bekannten Diffusionseigenschaften bestimmt werden. Eine elegantere Lösung dieses Problems bietet dabei die sogenannte zwei-Fokus Fluoreszenzkorrelationsspektroskopie [64] (siehe Kapitel 2.3.3), die eine intrinsische Kalibration der Ausdehnung des Beobachtungsvolumens erlaubt. Es bleibt zu erwähnen, dass die zuvor getroffene Annahme, dass die molekulare Helligkeit der einzelnen Fluorophore zeitlich konstant bleibt, nicht allgemein gültig ist. Zum Beispiel können durch den temporären Übergang von Fluorophoren in einen Dunkelzustand (z.B. einen Triplett-Zustand) diese zeitweise keine Photonen emittieren und zeigen somit ein zeitlich charakteristisches Verhalten, das sich in der Struktur der Korrelationskurve widerspiegelt. Die zeitliche Variation der molekularen Helligkeit ist jedoch durch komplexere Anpassungsmodelle an die Korrelationskurve kein notwendiges Hindernis für die Messung von Konzentrationen oder Diffusionseigenschaften. Das typische Aussehen einer Korrelationskurve und ihre Veränderung unter Veränderung der Konzentration bzw. Diffusionsgeschwindigkeit ist in Abbildung 2.11 dargestellt.

### 2.3.2 FCS in zwei Dimensionen: Linien-Raster-FCS

Membranproteine spielen eine fundamentale Rolle in der Zellbiologie, vor allem als Transportkanäle für Ionen durch die Zellmembran, als chemische Katalysatoren sowie als Transmembranrezeptoren, die einen integralen Bestandteil der Signaltransduktion darstellen [65, 66, 67]. In der biophysikalischen Forschung sind dabei oft lokale Konzentrationen, Diffusionseigenschaften und Rezeptor-Liganden Interaktionen dieser Transmembranproteine von großem Interesse. Sollen diese Größen mit Hilfe von Korrelationsspektroskopie quantifiziert werden, ist eine Markierung mit passenden Fluorophoren nötig. Des Weiteren ist zu beachten, dass durch die geringe Dicke von ca. 10 nm bis 20 nm der Doppellipidschicht die Transmembranproteine auf eine Diffusion in 2D beschränkt sind. Betrachtet man die Modellfunktion für die Autokorrelation für den Fall der Diffusion in zwei Dimensionen, so ergibt sich analog zum Vorgehen im vorherigen Abschnitt

$$G(\tau) = \frac{1}{\langle N \rangle} \cdot \frac{1}{\left(1 + \frac{\tau}{\tau_D}\right)}, \quad (2.46)$$

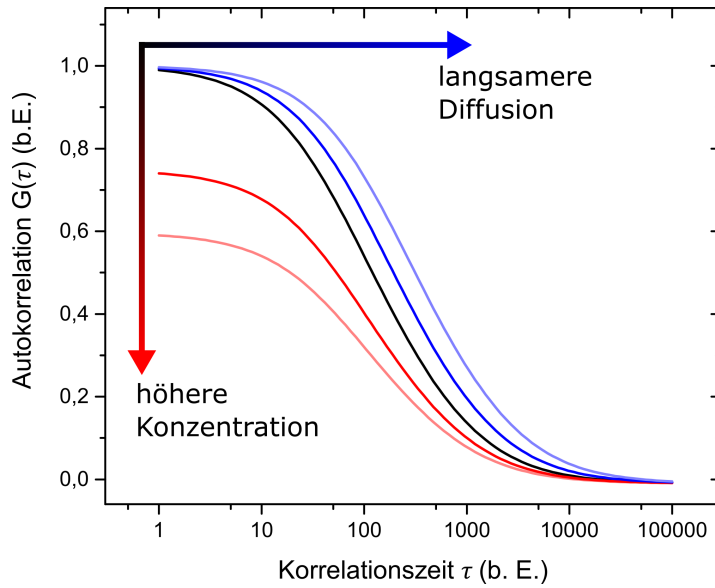


Abbildung 2.11: Beispielhafte Korrelationskurve freier 3D-Diffusion. Eine Erhöhung der Konzentration führt zu einer Verringerung der Korrelationsamplitude. Eine Verlangsamung der Diffusion verschiebt die Kurve nach rechts zu höheren Korrelationszeiten.

falls die Membran in der x-y-Ebene liegt, bzw.

$$G(\tau) = \frac{1}{\langle N \rangle} \cdot \frac{1}{\sqrt{1 + \frac{\tau}{\tau_D}}} \cdot \frac{1}{\sqrt{1 + \left(\frac{r_0}{z_0}\right)^2 \cdot \frac{\tau}{\tau_D}}}, \quad (2.47)$$

für den Fall, dass sich die Membran in der x-z oder y-z Ebene aufspannt. Im Gegensatz zur Untersuchung der Diffusion in einem homogenen Medium in 3D birgt die Fluoreszenzkorrelationsspektroskopie in 2D einige Schwierigkeiten. Zum einen ist das effektive Beobachtungsvolumen durch den Schnitt der konfokalen PSF mit der Membran bestimmt. Eine Fluktuation der Membran hat somit eine ständige Veränderung der Größe und Form des effektiven Beobachtungsvolumens zur Folge und verhindert dadurch exakte Messungen der gesuchten Parameter. Zum anderen ist die Diffusion in Membranen um Größenordnungen langsamer als die freie Diffusion in drei Dimensionen. Um jedoch auch bei hohen Korrelationszeiten ausreichend Statistik zu generieren, sind damit auch die erforderlichen Messzeiten deutlich erhöht. Für diese um ein Vielfaches längeren Messzeiten ist jedoch auch das Problem des Photobleichens um ein Vielfaches stärker ausgeprägt. Eine Möglichkeit, diese Probleme zu umgehen, bietet dabei die Fluoreszenzkorrelationsspektroskopie durch Linienrastern (lsFCS, von engl. *line scanning FCS*) [68]. Bei dieser Weiterentwicklung der Raster-FCS (sFCS, von engl. *scanning FCS*) [69] wird der Laserstrahl wiederkehrend senkrecht über die Membran bewegt. Um das Fluoreszenzsignal über die Zeit zu erhalten, das später für die Autokorrelation verwendet wird, verwendet man ausschließlich die Zeitpunkte, in denen der Laserfokus gerade die Membran passiert. Dadurch können zum einen Fluktuationen der Membranposition ausgeglichen werden und zum anderen wird die Zeit, in der Fluorophore in der Membran tatsächlich angeregt werden, im Vergleich zur gesamten Messzeit deutlich verringert. Die minimalen Zeiten, zu denen die Autokorrelation berechnet werden kann, sind jetzt nicht mehr durch die Detektionsgeschwindigkeit, sondern durch die Rasterfrequenz des Laserstrahls gegeben. Das Ras-

tern ist im Allgemeinen zwar deutlich langsamer, jedoch wird durch die auch vergleichsweise langsame Diffusion keine zu hohe Zeitaufösung benötigt. Diese Technik ist eng mit der sogenannten Raster-Bild-Korrelationsspektroskopie (RICS, engl. von *raster image correlation spectroscopy*) verwandt. Hierbei wird ein gesamter Bildausschnitt wiederholt abgerastert, um anschließend räumliche und zeitliche Korrelationen auf verschiedenen Skalen (z.B. von Pixel zu Pixel, von Linie zu Linie oder von Bild zu Bild) zu berechnen und somit die Diffusion in einem gesamten Bildausschnitt bestimmen zu können [70]. Sowohl sFCS als auch RICS konnten auf Membranen bereits mit STED kombiniert werden, um deutlich höhere räumliche Auflösungen bei der Diffusionsanalyse zu erreichen [71, 72].

### 2.3.3 Kreuzkorrelation: Intrinsische Kalibration und Analyse von Bindung

Neben der Autokorrelationsanalyse, die die Ähnlichkeit eines Signals mit sich selbst offenbart, kann eine Kreuzkorrelationsanalyse Aufschluss über gemeinsame Merkmale von zwei verschiedenen Signalen liefern. Hierbei kann das getrennte Signal aus zwei benachbarten Beobachtungsvolumina kreuzkorreliert werden [64]. Diffundieren Fluorophore von einem ersten Volumen (A) in ein zweites Volumen (B), so enthält die Kreuzkorrelationskurve ein Maximum zu Korrelationszeiten, die genau der Zeit entspricht, die Teilchen im Mittel benötigen um vom Zentrum von A zum Zentrum von B zu diffundieren. Ist der Abstand der beiden Volumina bekannt, so kann mit Hilfe dieser Kreuzkorrelationskurve und den beiden jeweiligen Autokorrelationskurven eine exakte Bestimmung der Größe der Beobachtungsvolumina erreicht werden.

Neben der Messung von Diffusionseigenschaften und lokalen Konzentrationen ist in der Biophysik die Quantifizierung von Interaktionen zwischen Reaktionspartnern (z.B. die Wechselwirkungen zwischen Proteinen) eine wichtige Forschungsfrage [73]. Eine Möglichkeit, eine Bindung nachzuweisen, wäre, die Verschiebung im gemessenen Diffusionskoeffizienten zu messen, die sich ergibt, da der gebundene Komplex größer ist und somit langsamer diffundiert. Nach der Stokes-Einstein-Gleichung [74] gilt für den Diffusionskoeffizienten eines Teilchens

$$D = \frac{k_B T}{6\pi\eta r}, \quad (2.48)$$

mit der Boltzmann-Konstante  $k_B$ , der Temperatur  $T$ , der Viskosität  $\eta$  sowie dem Teilchenradius  $r$ . Der Diffusionskoeffizient ist also nur einfach reziprok vom Radius des diffundierenden Teilchens abhängig und damit in guter Näherung nur von der dritten Wurzel des Volumens. Es gilt:

$$D \approx \frac{1}{\sqrt[3]{V}}. \quad (2.49)$$

Die Veränderung im gemessenen Diffusionskoeffizienten ist also nur sehr gering, so lange die zusätzlich bindende Entität nicht deutlich größer ist als die fluoreszent markierte Spezies [75, 76]. Noch problematischer wird diese Art der Bindungsmessung in Membranen. Nach Saffman und Delbrück [77] ist der Diffusionskoeffizient im Falle der Diffusion in Membranen nur logarithmisch vom Radius der diffundierenden Teilchen abhängig und damit nahezu unmöglich zu messen. Eine bessere Strategie, diese Interaktionen zu messen, ist, beide Reaktionspartner mit unterschiedlichen Fluorophoren zu markieren, um sie so spektral getrennt beobachten zu können. Dann kann die Diffusion von Ligand und Rezeptor

getrennt beobachtet werden. Binden die beiden aneinander, so werden sie gemeinsam durch das Beobachtungsvolumen diffundieren und die Fluktuation der beiden spektral aufgetrennten Intensitätssignale wird sich angleichen. Die Kreuzkorrelation der beiden Signale wird nicht verschwinden und ist dann ein gutes Maß für die Anzahl gebundener Komplexe im Vergleich zu den einzeln vorliegenden Entitäten. Dieses Konzept der so genannten zwei-Farb Kreuzkorrelation (2c FCS, engl. für *two-color FCS*) wurde erstmals von Rigler und Eigen 1994 vorgeschlagen [78] und 1997 durch Schwille et al. umgesetzt [79]. Für die Kreuzkorrelation zwischen zwei Spezies G und R, die den Komplex GR bilden können gilt:

$$G_x(\tau) = \frac{C_{GR}}{V_{\text{eff}}(C_G + C_{GR})(C_R + C_{GR})} \cdot \frac{1}{1 + \frac{\tau}{\tau_{D_x}}} \cdot \sqrt{\frac{1}{1 + S^2 \frac{\tau}{\tau_{D_x}}}}. \quad (2.50)$$

Hierbei bezeichnet  $\tau_{D_x}$  die charakteristische Diffusionszeit des Komplexes GR und  $S = r_0/z_0$  das Aspektverhältnis des Beobachtungsvolumens. Die Amplitude der Kreuzkorrelation ist also direkt proportional zur Konzentration des Komplexes GR. Für das Verhältnis zwischen Produkt und Edukt gilt [80]:

$$\frac{C_{RG}}{C_i + C_{RG}} = \frac{G_x(0)}{G_j(0)}, \quad (2.51)$$

mit  $i = G, R$  und  $j = R, G$ . Die Technik beruht dabei auf den Annahmen, dass die beiden Spektren der Fluorophore vollständig getrennt werden können und die Beobachtungsvolumina vollständig überlappen. Sind diese Bedingungen nicht erfüllt, wird der Zusammenhang zwischen Komplexkonzentration  $C_{RG}$  und Kreuzkorrelationsamplitude  $G_x(0)$  verzerrt und muss entsprechend korrigiert werden.

## 2.4 Die Wechselwirkung zwischen Liganden und Rezeptoren

Die Wechselwirkung zwischen Rezeptoren und Liganden ist ein essenzieller Bestandteil der Biochemie, die die Funktionstüchtigkeit zellulärer Prozesse und damit das Leben ganzer Organismen erlaubt. Hierunter fällt zum Beispiel die Regulierung von Hormonen, Neurotransmittern und anderen Botenstoffen [81, 82]. Vor allem in der Signaltransduktion, also der Kommunikation zwischen Zellen eines Organismus, ist die Ausschüttung von entsprechenden Liganden und die anschließende Bindung und damit Detektion an Rezeptoren von größter Bedeutung [83]. Da typische Signalwege oftmals eine Vielzahl an beteiligten Liganden und Rezeptoren beinhalten und eine Fehlfunktion einer Komponente schwere Folgen für den Organismus haben kann, ist eine quantitative Bestimmung der einzelnen Bindungsaffinitäten sowohl für das generelle Verständnis des Signalweges als auch für die Entwicklung geeigneter Pharmazeutika von größtem Interesse.

### 2.4.1 Messung von Bindungsaffinitäten über die Bestimmung von Konzentrationen

Im Allgemeinen kann die Wechselwirkung zwischen Rezeptoren und Liganden mit Hilfe einer Gleichgewichtsreaktion beschrieben werden:



mit den ungebundenen Rezeptoren (R), Liganden (L) und den gebundenen Komplexen (RL).  $k_{\text{on}}$  und  $k_{\text{off}}$  beschreiben die Assoziations- bzw. Dissoziationsrate des Liganden bei der Bindung an den Rezeptor. Die Ratengleichung für diese Reaktion lautet:

$$\frac{d[\text{RL}]}{dt} = k_{\text{on}} \cdot [\text{R}][\text{L}] - k_{\text{off}} \cdot [\text{RL}], \quad (2.53)$$

wobei eckige Klammern die Konzentration der jeweiligen Spezies bezeichnen. Sobald sich nach einiger Zeit ein Gleichgewicht eingestellt hat, gilt:

$$k_{\text{on}} \cdot [\text{R}][\text{L}] = k_{\text{off}} \cdot [\text{RL}] \quad (2.54)$$

und es kann die Dissoziationskonstante  $K_d$  bestimmt werden:

$$K_d = \frac{k_{\text{off}}}{k_{\text{on}}} = \frac{[\text{R}][\text{L}]}{[\text{RL}]} \quad (2.55)$$

Die Dissoziationskonstante ist dabei ein Maß für die inverse Bindungsaffinität des Liganden gegenüber dem Rezeptor und gibt die Konzentration des Liganden an, bei der genau 50% der Rezeptoren eine Bindung mit einem Liganden eingehen. Sind sowohl Ligand als auch Rezeptor mit unterschiedlichen, spektral gut trennbaren, Fluorophoren markiert, so können 2c FCS Messungen eingesetzt werden, um die Bindungsaffinität zu bestimmen. Nach Gleichung 2.51 kann durch den Quotienten aus der Autokorrelationsamplitude des Liganden-Kanals und der Kreuzkorrelation unter zusätzlicher Kenntnis der Konzentration der freien Liganden direkt die Dissoziationskonstante bestimmt werden. Es gilt:

$$K_d = \left( \frac{G_{\text{Ligand}}(0)}{G_x(0)} - 1 \right) \cdot [L]. \quad (2.56)$$

Die Messung der Konzentration der freien Liganden kann oftmals mit Hilfe einfacher FCS durchgeführt werden. Um eine exakte Bestimmung der  $K_d$  zu ermöglichen, müssen unter realen Bedingungen Effekte wie spektrales Übersprechen, Hintergrund Signal, Überlapp der verschiedenen Beobachtungsvolumina sowie die tatsächlichen Markierungseffizienzen betrachtet werden.

#### 2.4.2 Messung der Bindungsaffinitäten über Bestimmung der Reaktionskinetik

Die Bestimmung der Bindungsaffinitäten kann neben der direkten Messung von Konzentrationen auch über die Bestimmung der Reaktionskinetik geschehen. Hierfür kann z.B. mit Hilfe von Fluoreszenzmikroskopie der zeitliche Verlauf der Bindung eines Liganden an einen Rezeptor beobachtet werden. Diese Daten müssen anschließend mit einer passenden Funktion angepasst werden. Zunächst muss hierfür die Ratengleichung gelöst werden:

$$\frac{d[\text{RL}]}{dt} = k_{\text{on}} \cdot [\text{R}][\text{L}] - k_{\text{off}} \cdot [\text{RL}]. \quad (2.57)$$

Da im Allgemeinen sowohl die Konzentration der Liganden, Rezeptoren und Komplexe abhängig von der Zeit sind, ist diese Gleichung nur mit Hilfe einiger Annahmen analytisch lösbar. In einem typischen

Bindungsexperiment wird im Vergleich zur Anzahl der Rezeptoren eine sehr große Anzahl Liganden eingesetzt. Dies hat zur Folge, dass die Konzentration der Liganden sich über die Zeit in guter Näherung nicht ändert. Für die Gesamtanzahl der Rezeptoren gilt:

$$[\mathbf{R}]_0 = [\mathbf{R}] + [\mathbf{RL}]. \quad (2.58)$$

Damit lässt sich Gleichung 2.57 umformen zu:

$$\frac{d[\mathbf{RL}]}{dt} = k_{\text{on}} \cdot [\mathbf{R}]_0 [\mathbf{L}] - (k_{\text{on}} [\mathbf{L}] + k_{\text{off}}) \cdot [\mathbf{RL}]. \quad (2.59)$$

Diese inhomogene Differentialgleichung lässt sich einfach lösen und es folgt:

$$[\mathbf{RL}](t) = - \frac{e^{-t(k_{\text{on}}[\mathbf{L}] + k_{\text{off}})} e^{-C(k_{\text{on}}[\mathbf{L}] + k_{\text{off}})} - k_{\text{on}}[\mathbf{L}][\mathbf{R}]_0}{k_{\text{on}}[\mathbf{L}] + k_{\text{off}}}. \quad (2.60)$$

Bei einem typischen Experiment zur Messung der Assoziationsrate wird die Messung gestartet, sobald der Ligand der Probe hinzugefügt wird. Daraus folgt für die Konzentration des Komplexes:  $[\mathbf{RL}](0) = 0$ . Diese Randbedingung kann verwendet werden, um die Konstante C zu bestimmen. Es folgt:

$$[\mathbf{RL}](t) = - \frac{(e^{-t(k_{\text{on}}[\mathbf{L}] + k_{\text{off}})} - 1) k_{\text{on}}[\mathbf{L}][\mathbf{R}]_0}{k_{\text{on}}[\mathbf{L}] + k_{\text{off}}} = \sigma \left( 1 - e^{-t \cdot k_{\text{onapp}}} \right). \quad (2.61)$$

Um die Bindungsaffinität zu messen, muss zusätzlich noch die Dissoziationsrate gemessen werden. Hierfür wird aus einem System, das sich im Gleichgewicht befindet, der freie Ligand entfernt. Anschließend kann die Dissoziation des Liganden beobachtet werden. Für  $[\mathbf{L}] = 0$  vereinfacht sich Gleichung 2.60 zu:

$$[\mathbf{RL}](t) = \frac{e^{-k_{\text{off}}(t+C)}}{k_{\text{off}}}. \quad (2.62)$$

Mit der Ersetzung  $[\mathbf{RL}](0) = [\mathbf{RL}]_0$  ergibt sich dann:

$$[\mathbf{RL}](t) = [\mathbf{RL}]_0 \cdot e^{-k_{\text{off}} t}. \quad (2.63)$$

Passt man also die gemessenen Kurven für die Assoziations- bzw. Dissoziationskinetik mit Hilfe der Gleichungen 2.61 und 2.63 an, kann aus dem zeitlichen Verlauf der Exponentialfunktion direkt auf die Bindungsaffinität geschlossen werden. Es gilt:

$$K_d = \frac{k_{\text{off}}}{k_{\text{on}}} = \frac{k_{\text{off}}}{k_{\text{onapp}} - k_{\text{off}}} \cdot [\mathbf{L}]. \quad (2.64)$$



## 3 Methoden für höchstauflösende Fluoreszenzmikroskopie bei minimalem Hintergrund

In diesem Kapitel wird zunächst der Aufbau und die Funktionsweise des verwendeten STED-Mikroskops erläutert und anschließend die Verbesserung der erreichbaren Auflösung an entsprechenden Testproben ermittelt. Im zweiten Abschnitt wird die Weiterentwicklung der STED-Mikroskopie, die zu einem deutlich reduzierten Hintergrund besonders bei der Verwendung an dreidimensionalen Proben führt, detailliert dargestellt. Beide Bestandteile sind ein substantieller Teil der hier vorgestellten Arbeit.

### 3.1 Das STED-Mikroskop

Im Folgenden werden der Aufbau des verwendeten Mikroskops sowie die Grundprinzipien der Justage und die Vorteile der Verwendung von adaptiven Optiken aufgezeigt. Anschließend werden die mit der STED-Methode erreichbaren räumlichen Auflösungen quantifiziert und die Vorbereitung des Mikroskops auf die Arbeit mit lebenden Zellen beschrieben.

#### 3.1.1 Aufbau des STED-Mikroskops

In Abbildung 3.1 ist der Aufbau des STED-Mikroskops gezeigt, der im Folgenden detailliert erläutert wird. Der ursprüngliche Aufbau des Fluoreszenzmikroskops basiert dabei auf den Arbeiten von Dr. Per Niklas Hedde [72, 85] und wurde in den letzten Jahren stetig weiterentwickelt [86]. Zur Anregung verschiedenster Fluorophore stehen mehrere Laserwellenlängen zur Verfügung. Ein gepulster 640nm Diodenlaser (LDH-P-C-640B, PicoQuant, Berlin), ein gepulster 561 nm Diodenlaser (PDL 561, Aberri-or Instruments GmbH, Göttingen) und ein gepulster 470nm Diodenlaser (LDH-P-C-470B, PicoQuant) mit Pulsbreiten im Bereich von 100ps werden mit Hilfe passender dichroitischer Spiegel in eine Monomodenfaser (MMF) eingekoppelt, um ein optimales Strahlprofil zu garantieren. Anschließend werden die verschiedenen Laserlinien mit Hilfe eines WDM (von engl. *wavelength division multiplexer*) (RGB50HA, Thorlabs INC, Newton, NJ, USA) wieder aufgetrennt, um eine unabhängige Justage von Position und Defokus mit Hilfe von Spiegeln und Teleskopen zu erlauben. Dies ist notwendig, um etwaige chromatische Aberrationen der Strahlen nach dem Objektiv vollständig korrigieren zu können. Die Strahlen werden anschließend durch zwei dichroitische Langpass-Spiegel (LP) (575 nm longpass filter #64-627, Edmund Optics, Barrington, NJ, USA sowie zt 532 RDC, AHF Analysentechnik, Tübingen) wieder vereint. Mit Hilfe eines *quad band* dichroitischen Spiegels (zt 405/473/561/640 RPC, AHF Analysentechnik AG), also eines dichroitischen Spiegels, der vier Reflexionsbanden besitzt, wird das Laserlicht durch ein  $\lambda/4$ -Plättchen (AQWP05M-600, Thorlabs) in den Strahlscanner (Yanus V, Till Photonics, Gräfelfing) reflektiert. Das Verzögerungsplättchen ( $\lambda/4$ ) sorgt dabei dafür, dass die lineare Polarisierung der Anregungslaser in zirkuläre Polarisierung umgewandelt wird, um somit Polarisationsabhängigkeiten

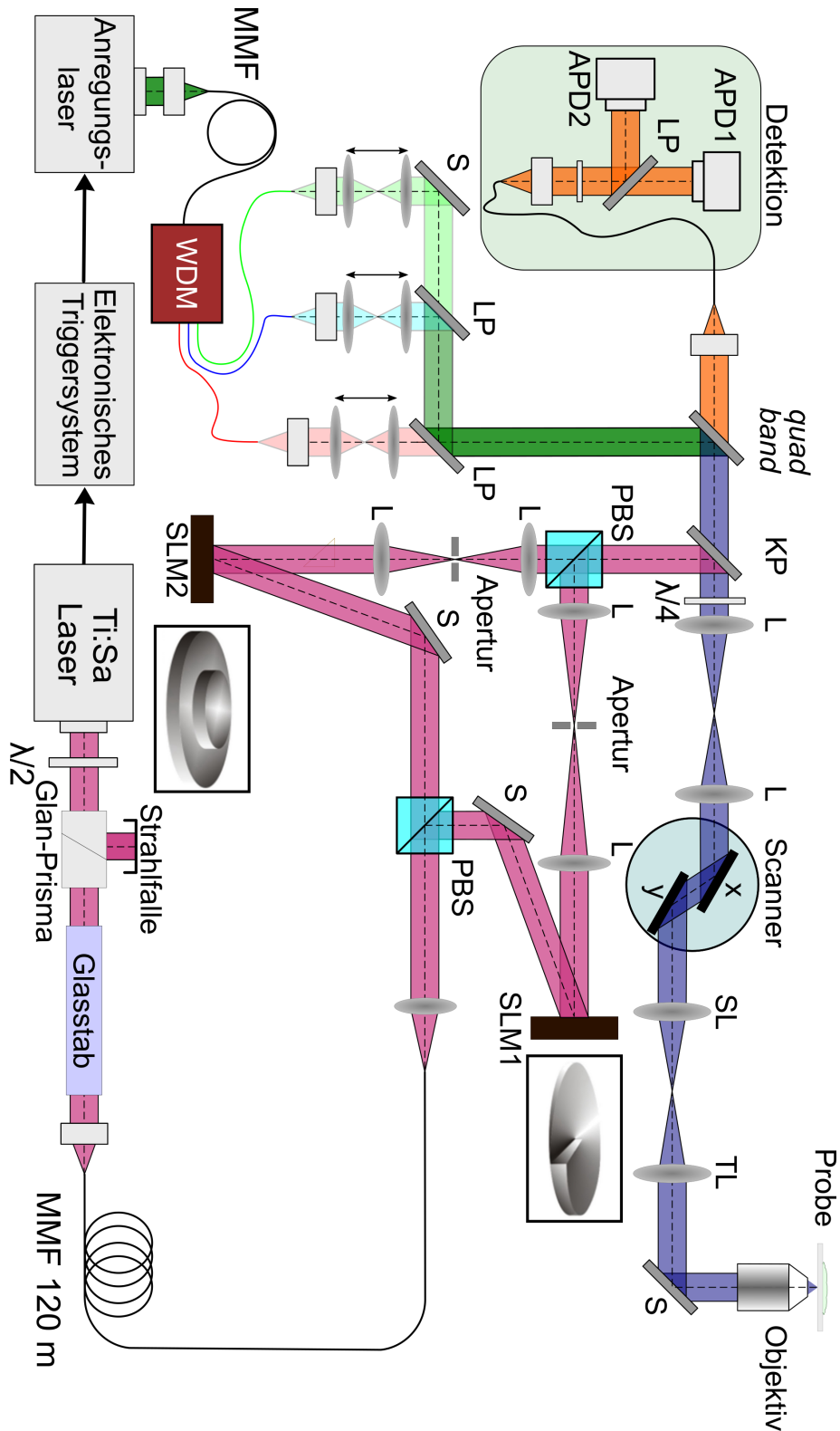


Abbildung 3.1: Aufbau des STED-Mikroskops wie im Text beschrieben und eingeteilt in die vier Bereiche Anregung (grün), STED (pink), Detektion (orange) und gemeinsamer Strahlengang mit Probe (blau). MMF, Monomodenfaser; WDM, *wavelength division multiplexer*; S, Spiegel; LP, dichroitischer Langpassfilter; KP, dichroitischer Kurzpassfilter;  $\lambda/4$  und  $\lambda/2$ , entsprechende Verzögerungsplatten; L, achromatische Linse; SL, Scan-Linse; TL, Tubuslinse; PBS, polarisationsabhängiger Strahlteiler; SLM, *spatial light modulator*; APD, *avalanche photo diode* (modifiziert aus [84]).

bei der Anregung von Fluorophoren zu vermeiden und ein zentrales Minimum des STED-Strahls bei der Verwendung einer Vortexphase zu ermöglichen (siehe Abschnitt 3.1.2) [87, 88]. Der Strahlscanner nutzt zwei Spiegel (jeweils für die X- und Y-Achse) mit Galvanometerantrieb, die mit Hilfe konvexer Spiegel aufeinander abgebildet werden. Diese Art des Strahlrasterns hat zwar hohe Anforderungen an die Abbildungseigenschaften, gilt jedoch als optisch perfekt [89] und erlaubt somit ein gleichmäßig ausgeleuchtetes Bild über ein großes Sichtfeld. Mit Hilfe der Scanlinse (SL) und der Tubuslinse (TL) werden die Galvo-Spiegel in die Rückapertur des Objektivs abgebildet. Die Justage dieser Abbildung ist besonders kritisch, da der Strahl beim Rastern ansonsten von der Rückapertur wandert und zu einer inhomogenen Ausleuchtung des Bildes führt. Die Tubuslinse ist Bestandteil der inversen Mikroskop-Plattform (DMi8, Leica, Wetzlar), über deren rechten Kameraport der Anregungslaser über ein Prisma durch die Tubuslinse zum Objektiv gelangt. Der Objektivrevolver kann bis zu sechs verschiedene Objektive aufnehmen. Standardmäßig werden hier ein Wasserimmersionsobjektiv (HCX PL APO CS 63x / 1.2, Leica) und ein Ölimmersionsobjektiv (HCX PL APO CS 100x / 1.46, Leica) abhängig vom Anwendungszweck verwendet. Mit Hilfe eines Piezoaktors (Nano-F100, Mad City Labs, Madison, WI, USA) kann ein Objektiv mit einer Auflösung von 0,2 nm in axialer Richtung verschoben werden und ermöglicht so die Aufnahme von 3D-Schichtbildern. Nach Anregung der Fluorophore wird die emittierte Fluoreszenz durch die Objektive eingesammelt und nach Durchgang durch den Strahlscanner am *quad band* transmittiert. Mit Hilfe einer achromatischen Linse wird das Fluoreszenzsignal anschließend in eine Multimodenfaser eingekoppelt, die als konfokale Lochblende fungiert. Anschließend kann das Fluoreszenzsignal mit verschiedenen dichroitischen Spiegeln spektral getrennt werden, und dieses wird dann nach Durchgang durch einen passenden Bandpassfilter mit Hilfe von Lawinenphotodioden (APD, von engl. *avalanche photo diode*) ( $\tau$ -SPAD-50, PicoQuant und COUNT-T100, Laser Components GmbH, Olching) detektiert. Die von den APDs erzeugten Pulse können anschließend mit Hilfe eines DAQ-Gerätes (NI-6229, National Instruments, Austin, TX, USA) einfach am Computer gezählt werden. Des Weiteren steht ein TCSPC-System (von engl. *time correlated single photon counting*) (SPC-150, Becker & Hickl GmbH, Berlin) zur Verfügung, um die Ankunftszeiten der einzelnen Photonen auch mit einer Genauigkeit von wenigen Pikosekunden<sup>1</sup> zu bestimmen.

Zur Abregung der Fluorophore dient ein 80 MHz modengekoppelter Titan:Saphir-Laser (Mai Tai HP, Newport Spectra-Physics, Darmstadt) mit einer Pulsbreite  $< 100$  fs. Die Emissionswellenlänge des Ti:Sa-Lasers kann in einem Bereich von 690 nm – 1040 nm festgelegt und somit für verschiedene Fluorophore optimiert werden. Ein drehbares  $\lambda/2$ -Plättchen in Kombination mit einem Glan-Laser-Prisma und einer Strahlfalle kann dazu genutzt werden, die Leistung des Ti:Sa-Lasers zu reduzieren. Mit Hilfe eines 80 cm langen Stabes aus Schwerflintglas und einer 120 m langen polarisationserhaltenden Monomodenfaser (PMJ-A3HPC, OZ Optics, Ottawa, Canada) wird der Puls anschließend auf ca. 300 ps aufgeweitet, um vergleichbare Pulsbreiten zu den Anregungslasern zu erreichen und somit eine optimale Abregung der Fluorophore zu garantieren. Des Weiteren werden so nicht-lineare optische Effekte, wie z.B. zwei-Photonen-Anregung von Fluorophoren, verhindert. Nach der Faser wird der Strahl mit Hilfe eines polarisationsabhängigen Strahlteilers (PBS, von engl. *polarizing beam splitter*) (PBS203, Thorlabs) aufgespalten und in zwei Teilstrahlen mit orthogonaler Polarisation aufgeteilt. Beide Teilstrahlen werden

<sup>1</sup> Dies ist die Genauigkeit der Elektronik. Zumeist ist aber die Antwortfunktion der Detektoren das limitierende Element bei der Genauigkeit der Bestimmung der Ankunftszeit.

anschließend unabhängig voneinander mit Hilfe eines räumlichen Modulators für Licht (SLM, von engl. *spatial light modulator*) (Leto, Holoeye, Berlin) in ihrer Phase moduliert (siehe Abschnitt 3.1.4) und mit Hilfe eines zweiten PBS wieder vereint. Ein optischer Kurzpassfilter, der sich zwischen dem *quad band* und dem Strahlscanner befindet, wird anschließend dazu verwendet, den STED-Strahl mit dem Anregungsstrahl zu überlappen. Dieser Kurzpassfilter ist transparent für alle Anregungswellenlängen und die emittierte Fluoreszenz.

### 3.1.2 Erzeugung geeigneter Intensitätsverteilungen durch Phasenmasken

Die Erzeugung von geeigneten Intensitätsverteilungen des Abregungsstrahls in der Fokusebene des Objektivs und damit in der zu untersuchenden Probe ist einer der kritischsten Aspekte in der STED-Mikroskopie. Die generelle räumliche Intensitätsverteilung des STED-Strahls gibt hierbei vor, ob und in welcher Raumachse eine Auflösungsverbesserung erzielt werden kann. Die Steilheit der Flanken des Minimums sind ein entscheidender Parameter für den Zusammenhang zwischen erreichbarer Auflösung und benötigter Leistung des Abregungsstrahls, wie in Gleichung 2.38 dargestellt wurde. Die Qualität der erreichbaren STED-Bilder hängt im Wesentlichen von der Amplitude des zentralen Minimums ab. Da die STED-Intensität im Maximum der Intensitätsverteilung einem Vielfachen der Sättigungsintensität entspricht, genügt auch schon eine sehr geringe relative Intensität im zentralen Minimum, um das Signal um Größenordnungen abzuschwächen und die Aufnahme von STED-Bildern mit ausreichendem Signal-zu-Rausch Verhältnis zu verhindern. In dieser Arbeit wird die Wellenfront des Strahls moduliert, um im Fokus mit Hilfe von Interferenz die entsprechenden Intensitätsverteilungen zu erzeugen. Die Modulation der Wellenfront kann zum einen mit Hilfe von Phasenplatten erfolgen, also unterschiedlich dicken, transparenten Platten, die durch ihre geometrische Form den Strahl an bestimmten Stellen verzögern und ihm so eine entsprechende Wellenfront aufprägen. Eine weitere Möglichkeit ist die Verwendung eines SLM, der mit Hilfe unterschiedlich ausgerichteter doppelbrechender Kristalle eine entsprechende Phasenmodulation erreichen kann. In dieser Arbeit wurden ausschließlich Zylinder- und Vortexphasen zur Erzeugung der benötigten Intensitätsverteilungen, wie sie in Abbildung 3.2 dargestellt sind, verwendet. Die resultierende Intensitätsverteilung der Vortexphase (Abbildung 3.2 b)) eignet sich dabei zur Einschränkung des Konfokalkolumens in lateraler Richtung, die Modulation mit einer Zylinderphase erzeugt eine Intensitätsverteilung, die lediglich eine schwache Einschränkung in lateraler Richtung bietet, sich dafür aber besonders für die Auflösungsverbesserung in axialer Richtung eignet. Neben weiteren verschiedenen Phasenmasken, die je nach Einsatzgebiet von Vorteil sein können [90], kann zum Beispiel auch die Modulation der Polarisierung des Strahls zur Erzeugung geeigneter Intensitätsverteilungen verwendet werden [91].

In der Praxis ist zu beachten, dass die Polarisierung des phasenmodulierten Strahls zur Erzeugung des lateralen Donuts mit Hilfe der Vortexphase zirkular sein muss. Des Weiteren ist für die Qualität des zentralen Minimums wichtig, dass die Polarisierung dieselbe Helizität aufzuweisen hat wie die Vortexphase selbst [92]. Die zentralen Minima in den STED-Donuts entstehen durch Interferenz. Bei der Vortexphase interferieren gegenüberliegende Teile des Strahls gerade so, dass sie sich im Zentrum des Fokus auslöschten. Außerhalb der optischen Achse ist die Phasenbeziehung nicht mehr passend und es entsteht ein heller Ring. Für die Entstehung eines möglichst tiefen Minimums ist es also nötig, dass der Strahl auch

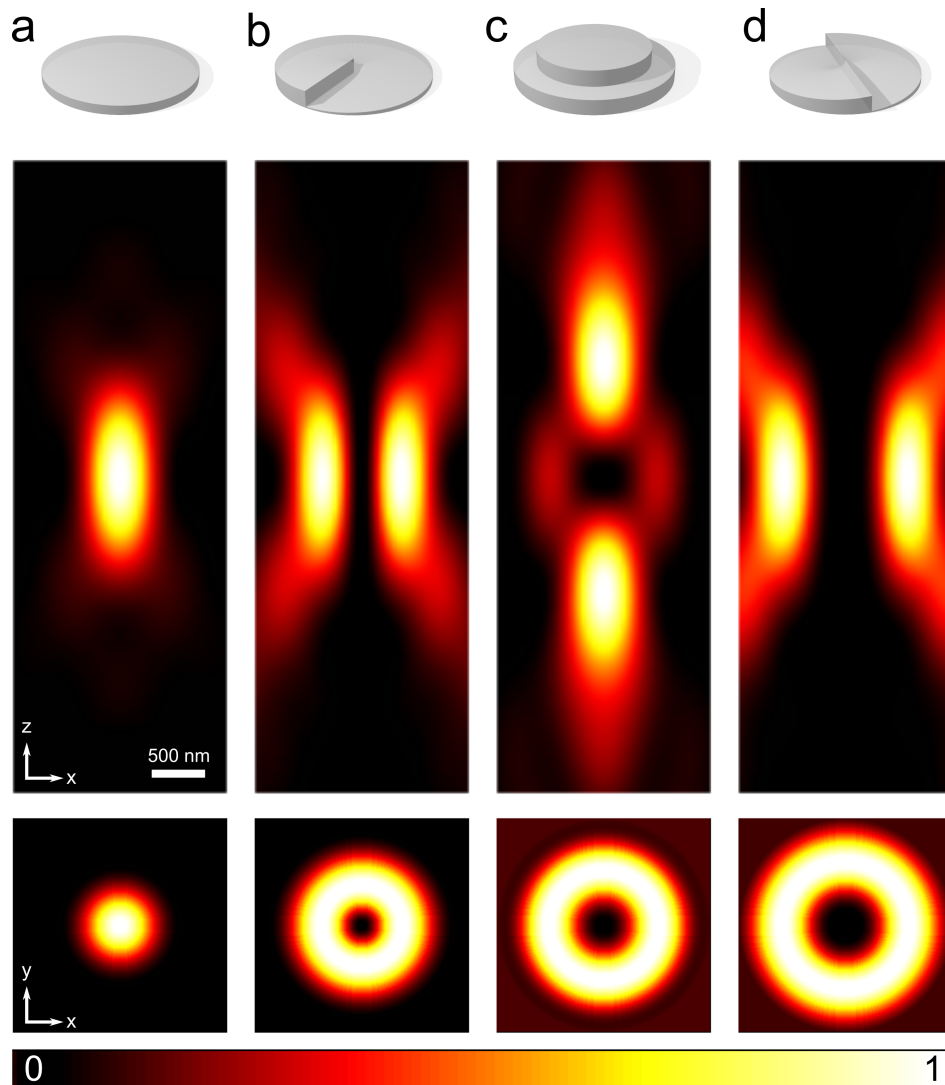


Abbildung 3.2: Darstellung verschiedener Phasenmasken mit entsprechenden simulierten Intensitätsverteilungen im Fokus nach Durchgang durch ein Objektiv mit hoher numerischer Apertur: a) keine Phasenmodulation, b) Phasenmodulation durch eine Vortexphase. Die Intensitätsverteilung eignet sich zur Auflösungsverbesserung in lateraler Richtung. c) Phasenmodulation durch eine Zylinderphase. Der resultierende Fokus des STED-Strahls wird zumeist zur Einschränkung des Konfokalvolumens in axialer Richtung verwendet. d) Phasenmodulation durch eine Vortexphase zweiter Ordnung. Der Farbskalierungsbalken zeigt die normierte Intensität von 0 (schwarz) bis 1 (weiß). Berechnungen erfolgten mit Hilfe von MATLAB nach [50].

beim Strahlrastern nicht auf der Rückapertur des Objektivs wandert. Deshalb ist die korrekte Abbildung der Scan-Spiegel in die Rückapertur des Objektivs, die durch eine exakte Justage der Scan-Linse und der Position des Strahlscanners erreicht wird, in einem STED-Mikroskop besonders kritisch. Des Weiteren sind jegliche Aberrationen, die keine radiale Symmetrie aufweisen, kritisch für das erreichbare Signal-zu-Rausch Verhältnis [93]. Bei der Zylinderphase interferieren der äußere und der innere Bereich des Strahls gerade in der Fokusebene und in der Nähe der optischen Achse, da sie dort überlappen. Außerhalb der Fokalebene ist diese Bedingung nicht erfüllt und es ergibt sich die gezeigte Intensitätsverteilung aus Abbildung 3.2 c). Der im Vergleich zur Vortexphase vergrößerte Donut in der Fokusebene entsteht, da der innere Bereich der Phasenmaske eine geringere effektive numerische Apertur bei der Fokussierung des Objektivs aufweist. Damit ist die auf Grund von Beugung resultierende PSF größer als die, die durch Fokussierung des Lichts aus dem äußeren Bereich der Phasenmaske entsteht. Bei der Justage der Zylinderphase ist darauf zu achten, dass die Intensitäten von äußerem und innerem Bereich der Zylinderphase so angepasst werden, dass sich die Intensitäten im Fokus gerade auslöschen können. Gerade hier bietet sich die Verwendung adaptiver Optiken an, da so die jeweiligen Größen der unterschiedlichen Bereiche der Phasenmaske einfach angepasst werden können. Um eine dreidimensionale Auflösungsverbesserung zu erhalten, können zwei STED-Strahlen kombiniert werden, um so die Vorteile der Vortexphase (laterale Auflösungsverbesserung) und der Zylinderphase (axiale Auflösungsverbesserung) zu kombinieren.

### 3.1.3 Zeitliche und räumliche Justage

Eine besondere Herausforderung beim Aufbau und Betrieb eines STED-Mikroskops sind die Anforderungen an die präzise räumliche Justage und Stabilität des Laserstrahls. Besonders wenn für die dreidimensionale STED-Mikroskopie zwei STED-Strahlen im Fokus überlappt werden müssen, muss darauf geachtet werden, dass sich die beiden Minima in lateraler Richtung sehr präzise überschneiden. Andernfalls füllt sich das zentrale Minimum und das erreichbare Signal-zu-Rausch Verhältnis macht die Aufnahme brauchbarer Bilder unmöglich. Ähnlich verhält es sich mit der Justage von Anregungs- und STED-Strahl zueinander, wenn eine lateral symmetrische effektive PSF erreicht werden soll. Die Verwendung von hochqualitativen Optomechaniken ist daher eine Grundvoraussetzung für ein funktionierendes STED-Mikroskop. Die Verwendung von Polarisationsmodulation, die nur auf den STED-Strahl aber nicht auf den Anregungsstrahl wirkt [91, 94], oder der Einsatz von Phasenplatten, deren Dispersions-eigenschaften so gewählt werden, dass diese nur für den STED-Strahl eine Phasenmodulation bewirken, aber die Wellenfront des Anregungslasers nicht verändern [95], soll den Bau und die Benutzung von STED-Mikroskopen in Zukunft vereinfachen.

Neben der räumlichen Justage der STED- und Anregungslaser ist auch die zeitliche Justage der Pulse erforderlich. Hierbei sollte darauf geachtet werden, dass der STED-Puls genau dann auf die Probe trifft, wenn die maximale Anzahl an Fluorophoren angeregt ist. Eine einfache zeitliche Justage der Pulse zueinander ermöglicht dabei eine speziell angefertigte Verzögerungselektronik. Hierzu werden wahlweise die 80 MHz oder 40 MHz Trigger-Signale des Ti:Sa-Lasers passend verstärkt und mit Hilfe eines integrierten Schaltkreises (SY89295U, Micrel, Chandler, AZ, USA) zwischen 3,2 ns und 14,8 ns in 10 ps Schritten verzögert, bevor sie an die entsprechenden Anregungslaser weitergeleitet werden. Eine einfache Einstel-

lung der Verzögerung kann hierbei mit Hilfe eines Mikrocontrollers vorgenommen werden. Somit kann eine Fluoreszenzprobe (z.B. Fluorophore in wässriger Lösung) herangezogen werden, um verschiedene Einstellungen des Zeitversatzes bei konstanter STED- und Anregungsleistung so zu optimieren, dass die spontan emittierte Fluoreszenz minimal wird.

### 3.1.4 Adaptive Optiken

Unter adaptiven Optiken versteht man optische Elemente, die einem Laserstrahl eine beliebige Wellenfront aufprägen können. Hierzu verwendet man meistens verformbare (oft segmentierte) Spiegel oder, wie auch in dieser Arbeit, Bauteile auf Flüssigkristallbasis. Diese oft als LCoS (von engl. *liquid crystal on silicon*) bezeichneten Optiken bestehen aus einer Flüssigkristallschicht, die auf eine verspiegelte Siliziumoberfläche aufgebracht ist. Auf der anderen Seite, auf der das Licht einfällt, befindet sich eine transparente Elektrode, die mit einer Antirefektionsschicht versehen ist. Legt man zwischen der Siliziumschicht und der transparenten Elektrode eine Spannung an, so kann die Ausrichtung der Flüssigkristalle beeinflusst werden. Durch die doppelbrechende Eigenschaft der Kristalle ergibt sich somit ein einstellbarer Phasenversatz nach zweimaligem Durchgang durch die Flüssigkristallschicht. Die angelegte Spannung wird dabei über ein 8 bit Graustufenbild sowie eine zuvor angelegte Kalibrationstabelle definiert. Die Verwendung von adaptiven Optiken, deren Ursprung in der Astronomie liegt [96] und die dort erfolgreich zur Kompensation atmosphärischer Störungen eingesetzt werden [97], bietet in der STED-Mikroskopie verschiedene Vorteile. Zunächst erlauben sie eine flexible Verwendung und Anpassung der Phasenmasken für die Erzeugung der STED-Foki. So können Art, Position und auch Geometrie der Phasenmaske einfach digital eingestellt werden. Dies ist besonders wichtig zur Optimierung des zentralen Minimums bei der Zylinderphasenplatte. Hierfür ist es zunächst nötig, den Zusammenhang zwischen Graustufen und Phase so zu kalibrieren, dass die Graustufen 0 bis 255 linear in einen Phasenversatz von 0 bis  $2\pi$  übertragen werden. Dies muss für jede zu verwendende Wellenlänge einzeln geschehen. Ein Strahl, der mittig auf den SLM fällt, wird mit Hilfe einer Linse auf eine CCD-Kamera fokussiert. Durch kontinuierliches Verändern des Grauwertes einer Hälfte des SLM entstehen zwei Teilstrahlen, die interferieren. Die durch Interferenz resultierende Intensität kann in Abhängigkeit des eingestellten Grauwertes gemessen werden, um so den Phasenversatz zu berechnen. Diese Informationen können anschließend verwendet werden, um die Kalibrationstabelle so anzupassen, dass sich der Phasenversatz linear von 0 bis  $2\pi$  über das gesamte Spektrum an Grauwerten auf dem SLM verhält (siehe Abbildung 3.3).

Die entsprechenden Phasenmasken, die zur Erzeugung der gewollten Intensitätsverteilungen genutzt werden sollen, müssen anschließend noch mit einem Blazegitter überlagert werden. Dies sorgt dafür, dass der modulierte Strahl zu großen Teilen in die erste Ordnung gebeugt wird, um ihn so von unmodulierten Reflexionen an der Vorderseite des SLM, die das zentrale Minimum des STED-Strahls nach dem Objektiv auffüllen würden, abzuspalten [99]. Des Weiteren ist eine Abbildung des SLM in die Rückapertur des Objektivs mit Hilfe von Teleskopen notwendig, da durch Beugung an den einzelnen Pixeln des SLM die Phase nach und nach verwaschen wird und somit keine optimalen Interferenzeigenschaften mehr aufweist. Das Resultat ist auch hier eine suboptimale Intensitätsverteilung im Fokus und ein Auffüllen des zentralen Minimums. In Abbildung 3.4 sind beispielhaft die Vortex- und Zylinderphasenmaske dargestellt, wie sie auf dem SLM angezeigt werden, um die entsprechenden STED-Donuts zu erzeugen.

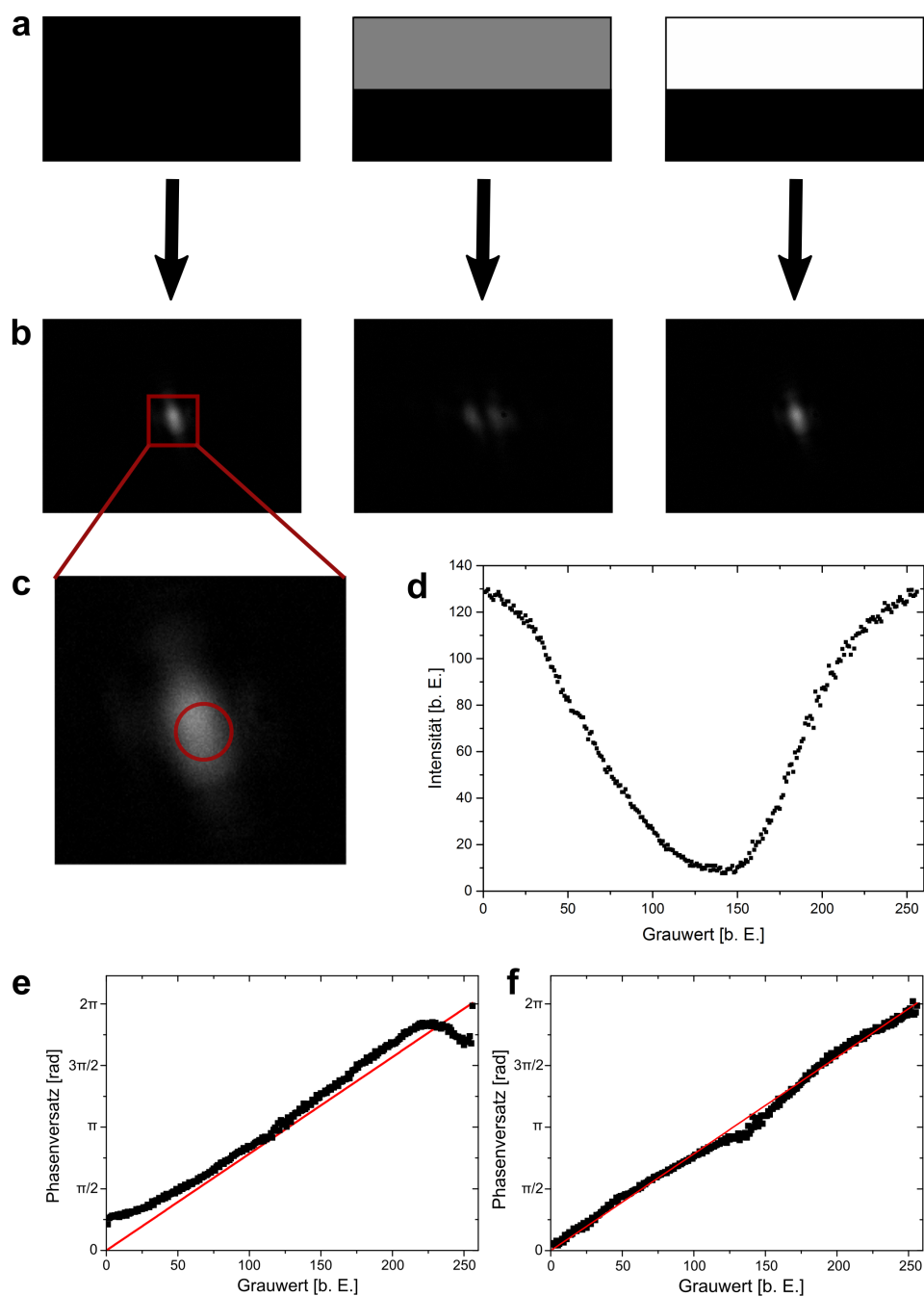


Abbildung 3.3: Prinzip der Kalibration des Phasenversatzes der SLMs. a) Der SLM wird in zwei Hälften geteilt, eine Hälfte zeigt konstant einen Grauwert von 0 und die andere Hälfte wird kontinuierlich von 0 bis 255 verschoben. b) Durch Fokussierung eines Laserstrahls, der mittig auf den SLM trifft, kann mit Hilfe einer Kamera die resultierende Intensität der beiden Teilstrahlen nach Interferenz gemessen werden. c) Nahaufnahme des relevanten Bereichs auf der Kamera. Der rote Kreis beschreibt die Stelle, über die die Intensität summiert wird. d) Gemessene Intensität in Abhängigkeit des Grauwertes auf der oberen Hälfte des SLM. Wenn der Grauwert gerade einem Phasenversatz von  $\pi$  entspricht, ist ein deutliches Minimum zu erkennen e) Berechnete Phase in Abhängigkeit des Grauwerts. f) Nach Anpassung der Kalibrationstabelle durch die Messwerte aus e) ist der Zusammenhang zwischen Phase und Grauwert auf dem SLM linear (nach [98]).



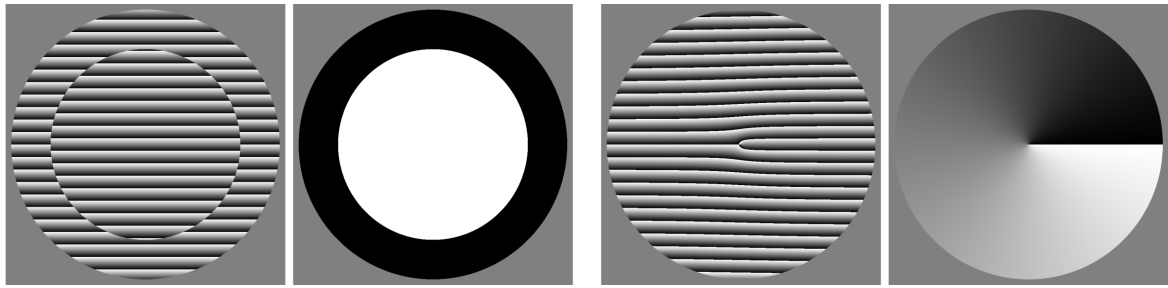


Abbildung 3.4: Phasenmasken zur Erzeugung der STED-Donuts mit Hilfe eines SLM. Links: Zylinderphase mit und ohne überlagertem Blazegitter. Rechts: Vortexphase mit und ohne überlagertem Blazegitter.

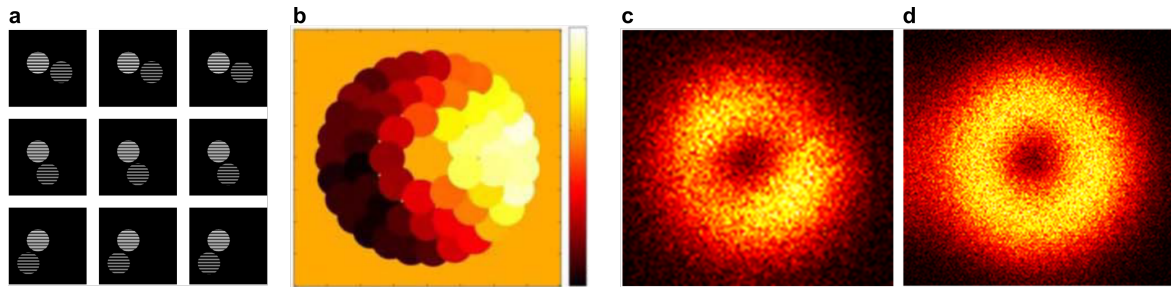


Abbildung 3.5: Prinzip der Aberrationskompensation: a) Phasemessung an drei verschiedenen Teilbereichen (Zeilen) mit jeweils drei verschiedenen Phasen-Offsets (Spalten) b) Mit Hilfe der Phasenschiebermethode gemessene Phase über die komplette Eintrittspupille. Farbskalierung zwischen 0 (schwarz) und  $0,8\pi$  (weiß) Phasenversatz. c,d) Abbildungen der resultierenden Intensitätsverteilung der STED-Strahls nach Modulation mit Hilfe der Vortexphase. Hierfür wurde die Reflexion an Goldkugelchen gemessen (siehe Abschnitt 3.1.5). c) STED-Donut vor der Anwendung der Aberrationskompensation. d) STED-Donut nach der Kompensation der Abbildungsfehler. Eine deutliche Verbesserung der Donut-Symmetrie ist zu erkennen (Teile der Abbildung modifiziert aus [84]).

Des Weiteren ermöglicht die Verwendung von adaptiven Optiken in der Mikroskopie, ähnlich zur Verwendung in der Astronomie, die Kompensation von Aberrationen, die gerade für die Symmetrie und das zentrale Minimum des STED-Fokus von großer Bedeutung sind [100]. Um die statischen Aberrationen des gesamten Aufbaus zu kompensieren, müssen diese zunächst gemessen werden. Eine Möglichkeit, die Wellenfront direkt zu messen, ist die Verwendung eines Wellenfrontsensors (z.B. eines Shack-Hartmann-Sensors). Steht ein solcher Sensor nicht zur Verfügung, kann die Wellenfront auch indirekt gemessen werden. Typischerweise wird die Eintrittspupille hierfür in mehrere Segmente zerlegt (oft als *pupil segmentation* bezeichnet) und anschließend kann die Wellenfront über Bildanalyse [101] oder interferometrische Methoden [102] bestimmt werden. In dieser Arbeit wird ein Phasenschieberverfahren verwendet [84]: Die Eintrittspupille wird in 54 kleine, teilweise überlappende runde Segmente zerlegt. Mit Hilfe einer Linse wird das Licht aus einem äußeren Segment und dem Referenzsegment im Zentrum der Pupille auf eine CCD-Kamera fokussiert. Dort interferieren die beiden Teilstrahlen und die resultierende Intensität kann gemessen werden. Die Phase des äußeren Segments wird jeweils um  $0$ ,  $\pi/2$  und  $\pi$  verschoben, um die relative Phase zwischen äußerem Segment und Referenzsegment berechnen zu können. Diese Phasemessung kann nun für alle äußeren Segmente wiederholt werden, um somit die komplette Wellenfront zu erhalten. Mit Hilfe der Anpassung eines zweidimensionalen Polynoms 6. Ordnung kann die Phase über die komplette Eintrittspupille angenähert werden. Diese gemessene Wellenfront kann an-

schließlich von der auf dem SLM zur Erzeugung des STED-Donuts angezeigten Phasenmaske abgezogen werden, um die Qualität des STED-Donuts deutlich zu verbessern. Dieser Vorgang ist in Abbildung 3.5 dargestellt. Neben der Korrektur der statischen Aberration des optischen Aufbaus ist die adaptive Anpassung der Wellenfront zur Kompensation der durch Proben induzierten Aberration eine weitere Möglichkeit, adaptive Optiken in der Mikroskopie gewinnbringend einzusetzen. Dies erlaubt STED-Mikroskopie tief im Gewebe oder in vergleichbaren Proben mit inhomogenen optischen Eigenschaften [99].

### 3.1.5 Auflösung und resultierende Punktspreads (PSF) des STED-Mikroskops

Um die Justage des Mikroskops zu ermöglichen und dessen Qualität zu quantifizieren, sollen zunächst der Anregungs- und die STED-Foki vermessen werden. Dies geschieht mit Hilfe von kleinen Goldkugeln, deren Reflexion detektiert werden kann [103]. Hierbei ist darauf zu achten, dass die Goldkugeln klein gegenüber der zu erwartenden Halbwertsbreite der PSF sind, um sie in guter Näherung als punktförmig zu betrachten. Die an Goldkugeln gemessenen PSF sind in Abbildung 3.6 dargestellt. Die gezeigten Daten wurden im Rahmen einer studentischen Abschlussarbeit von Jan Otto Wolff aufgenommen. Das exakte Überlappen der einzelnen PSF ist eine typische und regelmäßig durchzuführende Justageaufgabe bei der Verwendung eines STED-Mikroskops. Da für die STED-Mikroskopie lediglich die Intensitätsverteilung des STED-Lasers in der Probe relevant ist, der Detektionspfad jedoch auf die Wellenlängen der Fluoreszenz optimiert ist, kommt es bei der direkten Messung der PSF des STED-Lasers zu Verzerrungen der gemessenen PSF durch chromatische Aberrationen bei der Fokussierung auf die konfokale Lochblende. Dies ist besonders in der Asymmetrie des axialen Profils des STED-Fokus in Abbildung 3.6 zu erkennen. Die Arbeit mit Goldkugeln kann also lediglich zur Justage und groben Vermessung der Foki beitragen. Um die tatsächlich erreichbare Auflösung zu vermessen, wird eine fluoreszente Probe benötigt. Hierfür werden Polystyrolkugeln, die mit fluoreszente Farbstoff gefüllt sind, (DRB, von engl. *dark red beads*) verwendet, um die effektive PSF des STED-Mikroskops zu vermessen [16]. Die Ergebnisse sind in Abbildung 3.7 dargestellt. Hierfür wurde das laterale bzw. axiale Profil von 13 DRB mit Hilfe einer Normalverteilung angepasst. Dabei wurde die Größe der DRB bei der Bestimmung der Auflösung berücksichtigt. Für die Auflösung des Mikroskops  $d$  gilt:

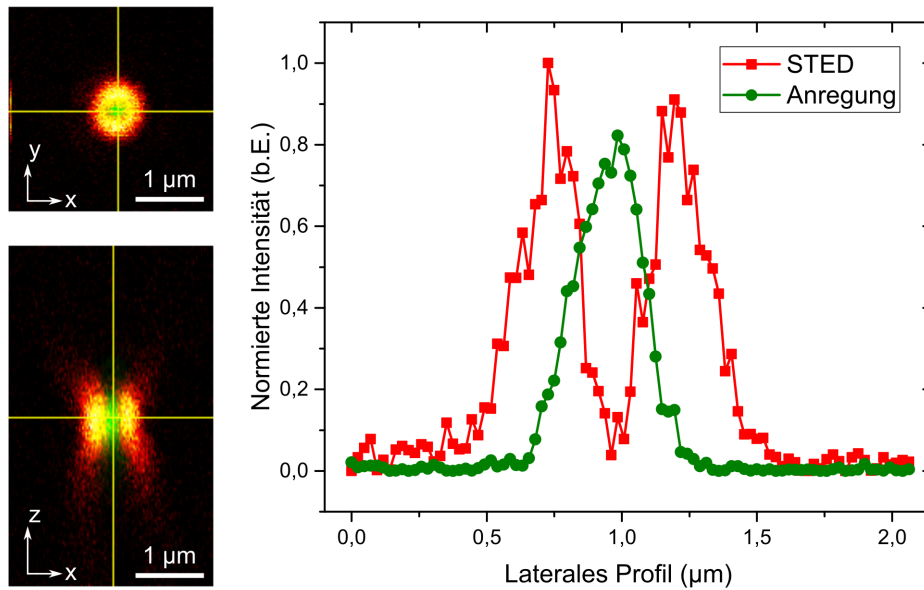
$$d = \sqrt{d_{\text{gemessen}}^2 - d_{\text{DRB}}^2}. \quad (3.1)$$

Bei der maximal verfügbaren STED-Leistung konnten die laterale Ausdehnung mit Hilfe der Vortexphase auf  $(71 \pm 23)$  nm und die axiale Ausdehnung mit Hilfe der Zylinderphase auf  $(215 \pm 26)$  nm reduziert werden. Die Zylinderphase führt zwar auch zu einer Verminderung der Ausdehnung der PSF in lateraler Richtung, diese ist jedoch nicht vergleichbar mit der Einschränkung durch die Vortexphase.

#### Probenpräparation zur Vermessung der Auflösung

1. Ein Glasplättchen (Deckgläser #1, Menzel-Gläser, Braunschweig) wird mit Hilfe von deionisiertem Wasser und Ethanol gereinigt und anschließend mit Hilfe eines Bunsenbrenners abgeflammt, um fluoreszente Verunreinigungen zu zerstören und eine hydrophile Oberfläche zu erzeugen [104].

## Vortexphase zur lateralen Auflösungsverbesserung



## Zylinderphase zur axialen Auflösungsverbesserung

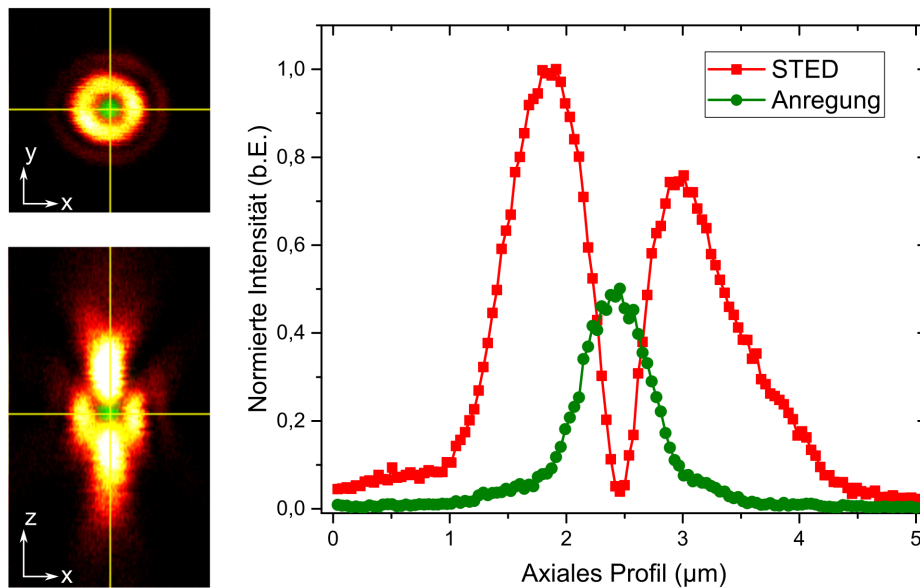


Abbildung 3.6: Darstellung der Justage und Vermessung der verschiedenen PSFs in einem STED-Mikroskop. Mit Hilfe der Reflexion an Goldkugeln wurde sowohl die PSF des Anregungslasers (grün) als auch die PSF des STED-Lasers (rot) nach Durchgang durch die Vortex- bzw. Zylinderphasenplatte gemessen. Die Bilder haben eine Größe von  $3\ \mu\text{m} \times 3\ \mu\text{m} \times 5\ \mu\text{m}$  und wurden mit einer Rasterung von  $128 \times 128 \times 128$  Voxel aufgenommen. Die Wellenlänge des Anregungslasers lag bei 640 nm, die des STED-Lasers bei 780 nm.

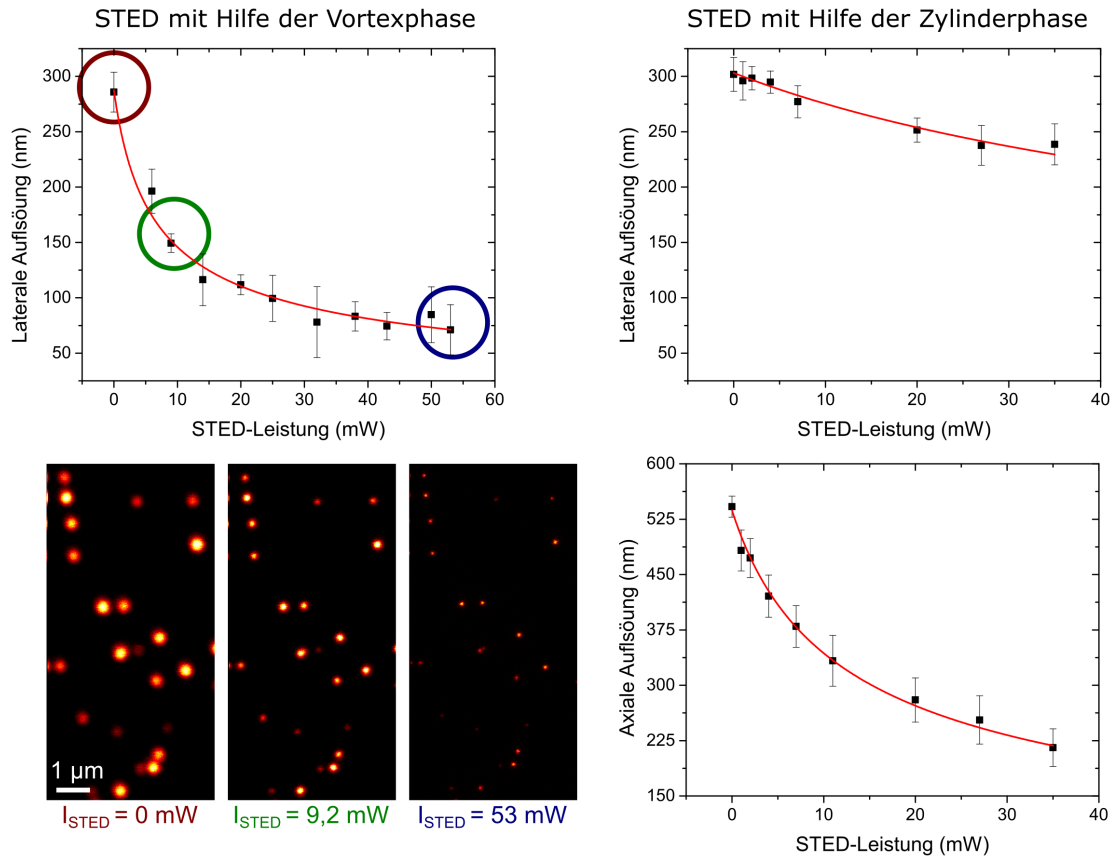


Abbildung 3.7: Verhalten der erreichbaren lateralen und axialen Auflösung in Abhängigkeit der eingesetzten STED-Leistung. Die Anregung erfolgte mit  $20 \mu\text{W}$  bei  $640 \text{ nm}$ , die Abregung bei  $780 \text{ nm}$ . Für jede STED-Leistung wurden quadratische Bilder von auf einer Glasoberfläche immobilisierten fluoreszenten Polystyrolkugeln mit  $40 \text{ nm}$  Durchmesser aufgenommen. Links laterale Auflösungsverbesserung durch die Vortex-Phase. Die Kantenlänge der, mit einer Rasterung von  $700 \times 700$  Pixel aufgenommenen, Bilder beträgt  $10 \mu\text{m}$ . Anschließend wurde das Profil von 13 Kugeln mit Hilfe einer Normalverteilung angepasst. Die so erhaltene durchschnittliche Halbwertsbreite sowie die Standardabweichung des Mittelwerts wurden im Diagramm aufgezeichnet. Die rote Kurve ist eine Anpassung mit Hilfe von Gleichung 2.38 an die gemessenen Daten und zeigt eine gute Übereinstimmung der Messwerte mit der Theorie. Unten links sieht man drei beispielhafte Bilder von DRB für verschiedene STED-Leistungen. Rechts: Auflösungsverbesserung durch die Zylinderphase in lateraler und axialer Richtung. Es wurden dreidimensionale Bilder mit  $10 \mu\text{m} \times 10 \mu\text{m} \times 4 \mu\text{m}$  und  $256 \times 256 \times 64$  Voxel aufgenommen. Die Bestimmung der Auflösung und die Anpassung der Modellfunktion erfolgte wie zuvor beschrieben.

2. Anschließend wird ein Tropfen Poly-L-Lysin (PLL, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) auf die vorbereitete Glasoberfläche gegeben. Nach 30min Inkubation wird die übrige PLL-Lösung mit Hilfe von deionisiertem Wasser abgespült.
3. Daraufhin werden entweder fluoreszente Polystyrolkugeln (FluoSpheres dark red fluorescent 0,04µm, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), die zuvor im Verhältnis 1:10<sup>4</sup> mit Wasser verdünnt wurden, oder Goldkugeln (GB, von engl. *gold beads*) (Gold nanoparticles 80nm, BBI Solutions, Cardiff, UK) für weitere 30min inkubiert. Anschließend wird die übrige Lösung abermals mit deionisiertem Wasser abgespült.
4. Abschließend wird die Probe in Mowiol eingebettet [105]. Dadurch gibt es zum einen keinen Brechungsindexsprung an der Oberfläche der Probe und somit keine Reflexionen und zusätzliche Aberrationen. Zum anderen versiegelt es die Probe, so dass sie mehrere Wochen bei 8°C gelagert werden kann.

### 3.1.6 Vorbereitung des Mikroskops zur Verwendung mit lebenden Zellen

Um eine Routinearbeit mit lebenden Zellen zu ermöglichen, wurde das STED-Mikroskop mit einem kommerziellen Mikroskopkörper (DMI8, Leica) ausgestattet. Dieser bietet diverse Vorteile gegenüber dem alten Aufbau [85]. Eine LED-Durchlichtbeleuchtung zusammen mit einem Kondensator und einem Okular kann zur direkten Beobachtung der Probe mit Hilfe einfacher Lichtmikroskopie verwendet werden. Unabhängig von fluoreszenter Markierung kann so die Probe sowohl lokalisiert als auch großflächig betrachtet werden. Dies ist besonders hilfreich, um den Zustand lebender Zellen zu überwachen.

Mit Hilfe zweier Kameraports können Strahlen in das Objektiv ein- und ausgekoppelt werden, wenn sie die Tubuslinse passieren sollen. Ein Kameraport wird dabei für die Konfokal- und STED-Mikroskopie verwendet, an den anderen Kameraport wurde eine EMCCD Kamera (iXon 887, Andor Technology, Belfast, UK) mit Hilfe eines individuell gefertigten Halters angebaut. Mit Hilfe der Kamera können Durchlichtaufnahmen und somit der Zustand von z.B. lebenden Zellen dokumentiert werden. In einer zweiten Ebene stehen zwei weitere Ein- bzw. Ausgänge zur Verfügung, die ohne Durchgang durch die Tubuslinse direkt zum Objektiv führen. Einer dieser Eingänge wird dabei mit Hilfe einer Halogen-Quelle und einer Kombination aus dichroitischen Spiegeln und Bandpassfiltern zur Epifluoreszenzmikroskopie verwendet. Der andere steht für zukünftige Erweiterungen des Mikroskops zur Verfügung. Somit steht neben der STED- und Konfokal- auch Epifluoreszenzmikroskopie zur Verfügung, die besonders geeignet ist, um die Probe großflächig zu betrachten und so einen Gesamteindruck zu gewinnen. Ein motorisierter Fokus sowie ein Scan-Tisch erlauben zum einen angenehmes und schnelles Arbeiten, da die Probenposition und der Fokus direkt am PC oder mit Hilfe einer Fernbedienung verändert werden können. Zum anderen können so verschiedene Stellen in der Probe mit hoher Genauigkeit wiederholt und automatisiert angesteuert werden, was bei Langzeitexperimenten von großem Nutzen sein kann.

Da Experimente an lebenden Zellen eine stabile Temperatur von 37°C sowie eine CO<sub>2</sub>-Konzentration von 5% erfordern, wurde ein spezieller Inkubator für das Mikroskop entwickelt.

Die CO<sub>2</sub>-Atmosphäre kann mit Hilfe eines selbstgebauten Gasmischers eingestellt werden. Hierbei wird der Durchfluss von CO<sub>2</sub> und gefilterter Druckluft und dem Gesamtgemisch mit Hilfe von Nadelventi-

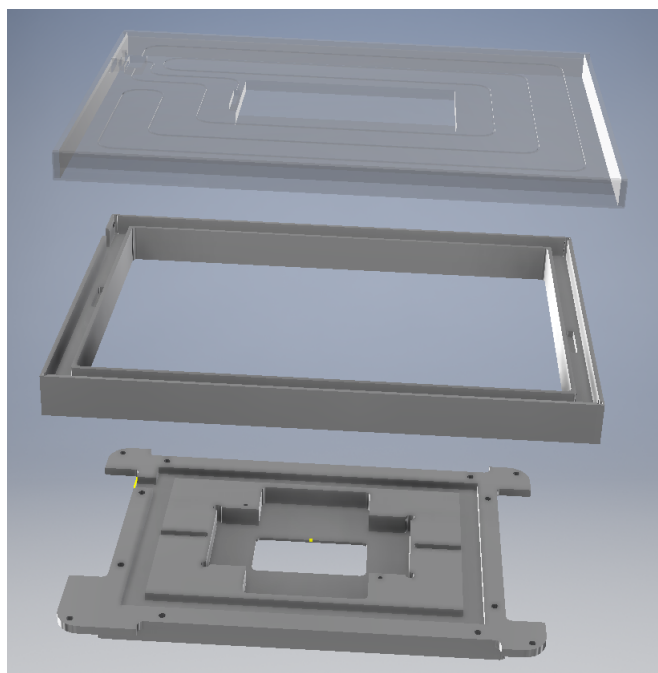


Abbildung 3.8: 3D gerenderte Darstellung des mit Hilfe von Inventor (AutoDesk, San Rafael, CA, USA) konstruierten Inkubators für die Mikroskopie an lebenden Zellen. Unten: Einsatz in den Scan-Tisch mit Halterung für die Probe (mittig) und Nut für die Heizwiderstände (außen) gefertigt aus Edelstahl. Mitte: Rahmenbauteil aus Aluminium mit breiter Nut für Heizwiderstände in die auch das CO<sub>2</sub>-Gemisch geleitet wird. Dies sorgt dafür, dass das einströmende Gasgemisch vorgeheizt wird, bevor es über den inneren Rand langsam in die Probenkammer übertreten kann. Oben: Transparenter Deckel aus PMMA, in den eine feine Nut für einen Heizdraht eingelassen ist. In der Mitte befindet sich ein dünnes klares Fenster, um Durchlichtmikroskopie zu ermöglichen.

len eingestellt und mit Rotametern gemessen, so dass die gewünschte CO<sub>2</sub>-Konzentration erreicht wird. Ein optischer CO<sub>2</sub>-Sensor (GM111, Vaisala, Vantaa, Finnland) misst die CO<sub>2</sub>-Konzentration, bevor das Gasgemisch in die Probenkammer geleitet wird, und warnt bei Über- bzw. Unterschreiten einstellbarer Grenzwerte. Um eine möglichst stabile Temperatur, auch nach mehrmaligem Öffnen und Schließen der Probenkammer zu gewährleisten, wurden vier verschiedene Heizzonen integriert. Heizwiderstände befinden sich dabei sowohl in einer Manschette um das Objektiv, in der Bodenplatte, im Rahmen und in der Deckelplatte in Form von Heizdrähten. Die Temperaturregelung wird dabei von vier PID-Reglern (UR484802, Wachendorff, Geisenheim) gewährleistet. Zwei weitere Temperatursensoren überwachen die Außentemperatur im Labor sowie die Temperatur in direkter Umgebung der Probe. Mit Hilfe eines Mikrocontrollers werden Temperaturen und CO<sub>2</sub>-Konzentration aufgezeichnet und können zusätzlich in Echtzeit über eine serielle Schnittstelle ausgelesen werden.

### 3.2 Hintergrundminimierung durch Stimulated Emission Double Depletion (STEDD)

In diesem Abschnitt wird eine Weiterentwicklung der STED-Mikroskopie, die **STEDD-Mikroskopie** (Stimulated Emission Double Depletion), beschrieben. Die im Folgenden ausführlich dargestellte Arbeit entstand in enger Zusammenarbeit mit Dr. Peng Gao und ist in einer komprimierten Version bereits

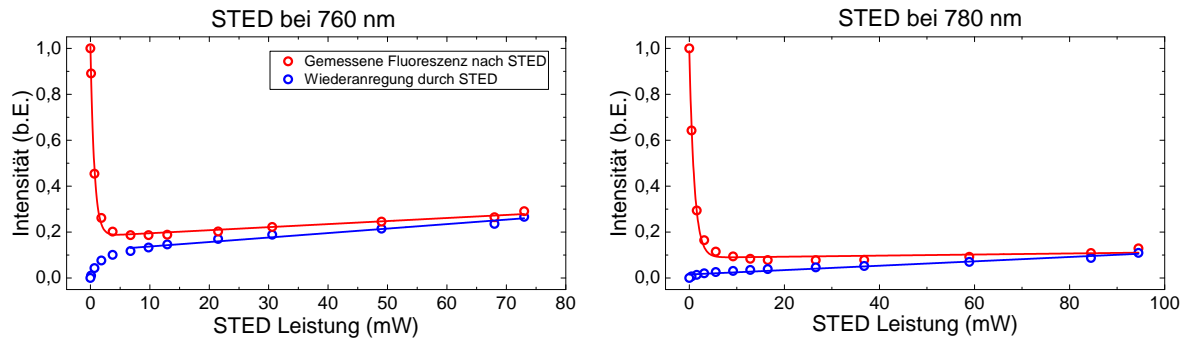


Abbildung 3.9: Messung der Sättigungsintensität  $I_{\text{Sat}}$  des STED-Lasers an DRB, die auf einer Glasoberfläche immobilisiert wurden. Die Probe wurde bei  $2\mu\text{W}$  mit dem gepulsten  $640\text{nm}$  Laser angeregt. Anschließend wurde ein nicht phasenmodulierter STED-Strahl verwendet, um die Fluoreszenz wieder abzuregen. Die Detektion erfolgte in einem Zeitfenster von  $0,75\text{ns}$  nach dem Eintreffen des STED-Pulses, um eine Detektion von spontan emittierten Photonen, die aufgrund von suboptimaler zeitlicher Justage nicht abgeregt wurden, zu vermeiden. Die roten Datenpunkte zeigen die gemessene Intensität nach Anregung mit  $640\text{nm}$  und Abregung bei  $760\text{nm}$  (links) bzw.  $780\text{nm}$  (rechts). Die blaue Kurve zeigt die gemessene Intensität ohne Anregung (modifiziert aus [84]).

veröffentlicht [84]. Die Entwicklung dieser Methode und ihre Anwendung in der Bildgebung und der Fluoreszenzkorrelationsspektroskopie, die in den weiteren Kapiteln beschrieben wird, ist ein wesentlicher Bestandteil der hier vorgelegten Arbeit.

### 3.2.1 Ursprüngliche Motivation zur Entwicklung der STEDD-Mikroskopie

Fluoreszenzkorrelationsspektroskopie ist eine weitverbreitete Technik zur Untersuchung von Diffusionseigenschaften fluoreszent gefärbter Entitäten in biologischen Proben (siehe Abschnitt 2.3) [106]. Um in endlicher Messzeit die gesuchten Parameter in ausreichender Genauigkeit bestimmen zu können, müssen sehr geringe Konzentrationen untersucht werden, um somit die relativen Fluktuationen aufgrund von Diffusion messbar gegenüber dem Hintergrund zu machen [107]. Die Kombination von STED-Mikroskopie zur Verringerung der effektiven PSF und FCS hat sich besonders bei der Untersuchung in Membranen als sehr vielversprechend erwiesen [71, 72, 108]. Die Umsetzung in drei Dimensionen zeigte jedoch zunächst nur mäßigen Erfolg [109]. Neben der Diffusionszeit, die deutlich reduziert werden konnte, wurde jedoch auch, entgegen jeder Erwartung, die Amplitude der Korrelationskurve reduziert. Die Autoren argumentierten, dass durch die deutliche Verkleinerung des effektiven Beobachtungsvolumens der Hintergrund relativ zum Signal auch deutlich anstieg. Die ursprüngliche Motivation für die folgenden Ergebnisse war, diese künstliche Verringerung der Korrelationsamplitude bei STED-FCS in drei Dimensionen zu umgehen. Es konnte jedoch gezeigt werden, dass eine Kombination von mehreren STED-Strahlen und eine Optimierung der Phasenmasken nicht ausreichte (siehe Abschnitt 6.2) und der bei den Messungen vorliegende Hintergrund immer noch als größtes Problem anzusehen war.

### 3.2.2 Signal und Hintergrund in der STED-Mikroskopie

Bei der Messung der Sättigungsintensität des STED-Lasers wird der Einfluss des Hintergrundsignals in der STED-Mikroskopie besonders deutlich. Eine beispielhafte Messung ist in Abbildung 3.9 dargestellt. Die gemessene Fluoreszenz von DRB nach Anregung und anschließender Abregung sollte aufgetragen

über die verwendete STED-Leistung streng monoton fallen. Nach Gleichung 2.34 sollte für die gemessene Fluoreszenzintensität  $I$  gelten:

$$I = I_0 \cdot \eta(I_{\text{STED}}) = I_0 \cdot \exp^{-\ln(2) \cdot I_{\text{STED}}/I_{\text{Sat}}} \quad (3.2)$$

Um die offensichtliche Diskrepanz zwischen dem erwarteten Zusammenhang und den tatsächlichen Messdaten zu erklären, wurde zunächst die resultierende Fluoreszenz ohne Anregung gemessen - also die Fluoreszenz nach Anregung durch den STED-Laser. Dies ist in Abbildung 3.9 in Blau aufgetragen. Die Wiederanregung durch den STED-Laser beschreibt also einen wesentlichen Teil der gemessenen Fluoreszenz vor allem bei hohen STED-Leistungen. Umso weiter dabei der STED-Laser zum Emissionsmaximum hin verschoben ist, desto prominenter wird die Wiederanregung. Bei der Wahl der STED-Wellenlänge ist also ein Kompromiss aus Wiederanregungswahrscheinlichkeit und Abregungseffizienz zu erzielen. Um eine Bestimmung der Sättigungsintensität zu ermöglichen, wurde daher die gemessene Kurve mit einem neuen Modell angepasst:

$$I = I_0 \cdot \exp^{-\ln(2) \cdot I_{\text{STED}}/I_{\text{Sat}}} + \alpha_{\text{WA}} I_{\text{STED}} + I_{\text{offset}} \quad (3.3)$$

Neben der zu erwartenden streng monotonen Abregung des Fluoreszenzsignals werden also auch die Wiederanregung (mit dem Skalierungsparameter  $\alpha_{\text{WA}}$ ) sowie ein konstanter Offset berücksichtigt. Daraus ergeben sich für die gemessenen Sättigungsintensitäten:  $I_{\text{Sat}}(760 \text{ nm}) = (0,46 \pm 0,02) \text{ mW}$  sowie  $I_{\text{Sat}}(780 \text{ nm}) = (0,73 \pm 0,04) \text{ mW}$ . In diesem Beispiel ist die Wiederanregung zwar ein eminenter Teil des Hintergrundsignals, jedoch zeigt die Lücke zwischen gemessener Fluoreszenz und gemessener Wiederanregung vor allem bei niedrigen STED-Leistungen, dass es eine zweite Quelle für das gemessene Hintergrundsignal geben muss: die unvollständige Abregung von Fluorophoren. Für diese unvollständige Abregung kann es diverse Gründe geben: zeitlicher Jitter bei der Synchronisation der Laserpulse, unvollständiger Überlapp zwischen Anregungs- und Abregungs-Fokus, Umorientierung der molekularen Dipole zwischen Ankunft der Anregungs- und Abregungspulse sowie unzureichende Abregungsleistung. Diese erweist sich gerade in der Peripherie des STED-Fokus als Hauptproblem bei der STED-Mikroskopie von dichten dreidimensionalen Proben [109]. Die Herausforderung besteht also darin, das auftretende Hintergrundsignal von dem tatsächlich gewünschten Signal abzuspalten.

### 3.2.3 Experimentelle Realisierung der STEDD-Mikroskopie

Die Idee der STEDD-Mikroskopie, die in Abbildung 3.10 dargestellt ist, besteht darin, den reinen Hintergrund getrennt von der Mischung aus Hintergrund und Signal zu messen. Hierzu wird der bestehende Aufbau für 3D-STED-Mikroskopie, der zur Erzeugung des 3D-Donuts bereits aus zwei unterschiedlich phasenmodulierten STED-Strahlen besteht, um einen dritten STED-Strahl erweitert. Dieser dritte STED-Strahl wird nicht phasenmoduliert und hat daher kein zentrales Minimum im Fokus. Er regt daher im Gegensatz zum 3D-STED-Donut auch die Fluorophore ab, die das eigentlich gewünschte Fluoreszenzsignal emittieren. Somit wird das Signal vollständig ausgeschaltet, und es wird ausschließlich der Hintergrund detektiert. Die Intensität des unmodulierten STED-Strahls wird dabei so gewählt, dass die Wahrscheinlichkeit für die Abregung im Zentrum des Fokus hoch ist, jedoch kein zusätzlicher Hintergrund durch



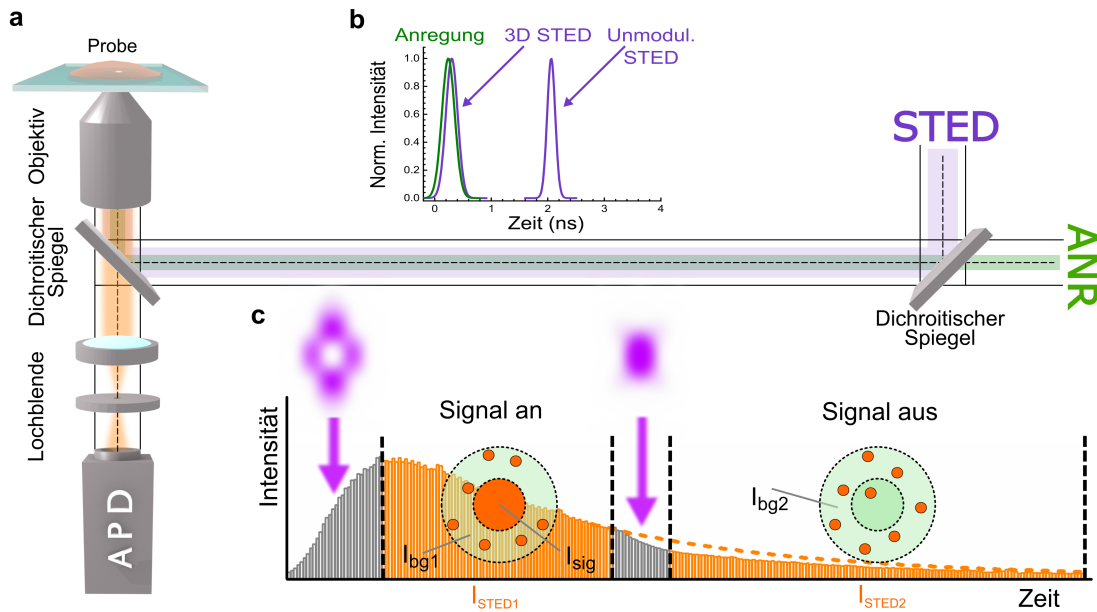


Abbildung 3.10: Funktionsprinzip der STEDD-Mikroskopie: a) Schematische und stark vereinfachte Darstellung des STEDD-Aufbaus. b) Pulsfolge des STEDD-Mikroskops. Kurz nach dem Anregungspuls folgt der 3D-STED Donut, der mit Hilfe zweier Phasenmasken erzeugt wird und zu einer deutlichen Verkleinerung der effektiven PSF in drei Dimensionen führt. Nach einiger Zeit trifft ein zweiter, unmodulierter STED-Strahl auf die Probe und regt somit auch die restlichen, im Fokus befindlichen, Fluorophore ab. c) Resultierendes Fluoreszenzsignal, aufgetragen als Histogramm über die Ankunftszeit der Photonen relativ zum Anregungspuls. Anfangs erfolgt die Abregung mit Hilfe des 3D-STED Donuts. Im orange gezeigten Bereich wird nun  $I_{STED1}$  detektiert, dies entspricht dem eigentlich gewünschten Signal  $I_{sig}$  inklusive des ungewollten Hintergrunds  $I_{bg1}$ . Nach einiger Zeit trifft der zweite, unmodulierte STED-Strahl auf die Probe und regt die im Fokus verbliebenen Fluorophore ab. Dadurch wird das Signal ausgeschaltet und im zweiten orangefarbenen Bereich wird lediglich das Hintergrundsignal  $I_{STED2}$  detektiert. Subtrahiert man  $I_{STED2}$  von  $I_{STED1}$  unter Berücksichtigung eines Skalierungsfaktors  $\gamma$ , so kann man das reine Signal ohne Hintergrund extrahieren (Teile modifiziert aus [84]).

Wiederanregung der Fluorophore entsteht (dies ist der Fall für das ca. Zwei- bis Vierfache der Sättigungsintensität). Für ein völlig statisches System könnte dies anhand zweier getrennter Messungen geschehen. Um die Technik aber auch für dynamische Systeme, wie z.B. lebende Zellen oder diffundierende Fluorophore (und damit für FCS), anwendbar zu machen, werden die beiden STED-Strahlen (STED1 für den 3D-STED-Donut und STED2 für den unmodulierten STED-Strahl) auf der Größenordnung der Fluoreszenzlebensdauer zeitversetzt. Wird die Fluoreszenz mit einem TCSPC-System detektiert, so können die gemessenen Fluorophore anschließend über ihre Ankunftszeit dem jeweiligen Detektionsfenster zugeordnet werden (siehe Abbildung 3.10 c). Die Detektionsfenster sind dabei so gewählt, dass die Fluorophore nur zwischen STED1- und STED2-Puls bzw. nach dem STED2 Puls registriert werden. Photonen, die während der Wechselwirkung der beiden STED-Pulse mit den Fluorophoren emittiert werden, werden nicht detektiert. Das tatsächliche, hintergrundfreie Signal kann einfach berechnet werden, wenn der Gewichtungsfaktor  $\gamma$  bekannt ist:

$$I_{Signal} = I_{STED1} - \gamma \cdot I_{STED2}. \quad (3.4)$$

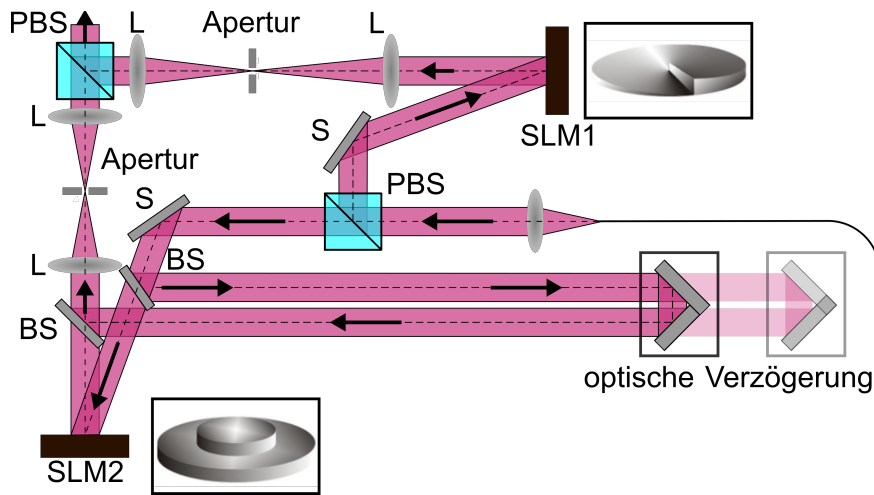


Abbildung 3.11: Anpassung des STED-Mikroskops aus Abbildung 3.1 zur Verwendung im STEDD-Betrieb. Ein zusätzlicher, dritter, STED-Strahl wird mit Hilfe zweier Strahlteiler abgespalten und anschließend wieder mit dem Ursprungsstrahl überlappt. Verschiebbare Spiegel erlauben eine einstellbare optische Verzögerung dieses Strahls (modifiziert aus [84]).

Dieser Gewichtungsfaktor kann dabei auf zwei Arten bestimmt werden. Eine Messung der Zerfallskurve der Fluoreszenz ohne Verwendung des STED2-Pulses erlaubt mit genauer Kenntnis der Pulsankunftszeiten eine exakte Bestimmung der in den jeweiligen Zeitbereichen emittierten Fluoreszenz:  $I_{Em1}$  und  $I_{Em2}$ . Der Gammafaktor ergibt sich dann zu

$$\gamma = \frac{I_{Em1}}{I_{Em2}}. \quad (3.5)$$

Um diese zusätzliche Kalibration zu vermeiden, kann der Gewichtungsfaktor auch über eine Analyse der aufgenommenen STEDD-Bilder bestimmt werden. Hierzu wird mit Hilfe einer Fouriertransformation das Bild in den Frequenzraum übertragen. Da das gewünschte STED-Signal, im Vergleich zum Hintergrund, zu hohen Raumfrequenzen führt und bei der korrekten Wahl des Gammafaktors dieses Signal im Vergleich zum Hintergrund maximiert wird, kann der Gammafaktor so gewählt werden, dass hohe Raumfrequenzen maximal werden [110]. Um die STEDD-Mikroskopie experimentell zu realisieren, muss ein zusätzlicher unmodulierter STED-Strahl mit einer einstellbaren Verzögerung auf der Größenordnung der Lebenszeit verschiedener Fluorophore (also im Bereich von ca. 1 ns bis 4 ns) in den bestehenden Aufbau (siehe Abbildung 3.1) integriert werden.

Die Anpassungen an das ursprüngliche STED-Mikroskop sind in Abbildung 3.11 dargestellt. Zwei Strahlteiler und zwei verschiebbare Spiegel zur Anpassung der Pulsverzögerung genügen, um einen bestehenden STED-Aufbau mit TCSPC-System für die STEDD-Mikroskopie umzurüsten.

### 3.2.4 Simulationen zur Hintergrundreduktion

Um das tatsächliche Potential der STEDD-Mikroskopie zu evaluieren, wurden Simulationen der Leistungsfähigkeit dieser Methode durch Dr. Peng Gao durchgeführt [84]. Die Simulation der Intensitätsverteilungen der verschiedenen Laser erfolgt analog zu Abbildung 3.6. Die Raten für Absorption der Anregungs- und STED-Laser und der stimulierten Emission wurden als linear in der einfallenden Laserintensität angenommen; Polarisierungseffekte werden hierbei nicht beachtet. Die numerischen Werte für

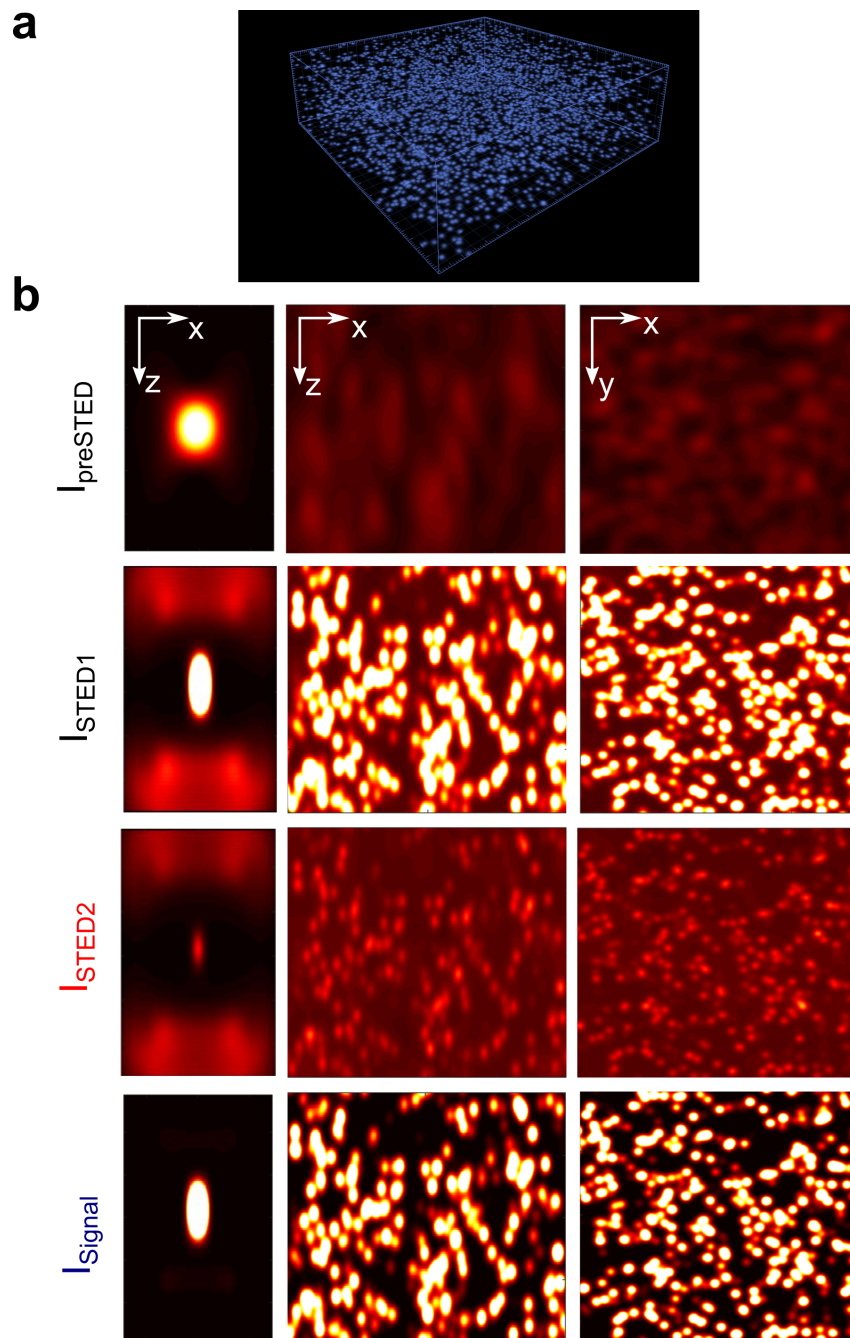


Abbildung 3.12: Simulation der STEDD-Mikroskopie. a) 1280 in einem Probenvolumen verteilte fluoreszente Kugeln, die als dicht gepackte drei dimensionale Testprobe fungieren. b) Darstellung der Simulationsergebnisse. Linke Spalte: Effektive PSFs vor dem Eintreffen des STED1-Pulses (dies entspricht normaler Konfokalmikroskopie)  $I_{\text{preSTED}}$ , zwischen STED1- und STED2-Puls  $I_{\text{STED1}}$  (dies entspricht tgSTED [111]), nach dem STED2-Puls  $I_{\text{STED2}}$  (dies ist die Messung des Hintergrundes) und die resultierende PSF nach korrekter gewichteter Subtraktion des Hintergrundes  $I_{\text{Signal}}$ . Die mittlere und rechte Spalte zeigen jeweils zugehörige x-z- und x-y-Schnitte durch die Probe (modifiziert aus [84]).

die Wirkungsquerschnitte des Farbstoffs sind der Literatur entnommen [112, 113]. Die verschiedenen Pulse werden als gaussförmig in der Zeit angenommen und den tatsächlichen experimentellen Bedingungen bezüglich Pulsdauer, Pulsfolge, Wiederholrate und Intensität angepasst. Um die Simulation von 3D-Strukturen zu ermöglichen, werden anschließend 1280 sphärische Fluorophore mit einem Durchmesser von 40 nm zufällig in einem kubischen Volumen von  $4\mu\text{m}$  Kantenlänge verteilt. Die sich daraus ergebenden Aufnahmen, die mit einer Rasterung von  $512 \times 512 \times 128$  Pixel simuliert werden, sind in Abbildung 3.12 dargestellt. Es ist klar zu erkennen, dass ein großer Mehrwehrt bezüglich der Hintergrundminimierung durch STEDD-Mikroskopie in tatsächlichen Experimenten zu erwarten ist.

## 4 Höchstaufgelöste Mikroskopie

Im folgenden Abschnitt werden an verschiedenen Anwendungsbeispielen die Möglichkeiten der STED- und STEDD-Mikroskopie in der Aufnahme von höchstaufgelösten Fluoreszenzbildern gezeigt. Zunächst soll die Anwendbarkeit der STED-Mikroskopie an lebenden Zellen, die mit Hilfe fluoreszenter Proteine eingefärbt wurden, demonstriert werden. Anschließend werden die Vorteile der STEDD-Mikroskopie gegenüber der klassischen STED-Mikroskopie an zwei- und dreidimensionalen Proben aufgezeigt.

### 4.1 In vivo STED-Mikroskopie mit Hilfe fluoreszenter Proteine

Einer der größten Vorteile der Fluoreszenzmikroskopie gegenüber anderen Mikroskopiemethoden ist die Möglichkeit, lebende Proben zu untersuchen. Dies gilt natürlich auch für die höchstaufgelöste STED-Mikroskopie, die im vorherigen Abschnitt nur an fluoreszenten Polystyrolkugeln demonstriert wurde. Gerade diese verspricht einen besonders spannenden Einblick in biophysikalische Prozesse, wenn sie *in vivo* durchgeführt wird. Die einfachste und spezifischste Art, lebende Proben einzufärben, ist die Verwendung fluoreszenter Proteine (siehe Abschnitt 2.1.2). Gerade in den letzten Jahren wurde unter großem Aufwand sowohl das Spektrum der fluoreszenten Proteine der GFP-Familie mit Hilfe der Gentechnologie so vergrößert, dass es sich fast über den gesamten sichtbaren Spektralbereich erstreckt, als auch die Anwendbarkeit der verschiedenen FPs zur Untersuchung unterschiedlichster Proteine verbessert [114, 115, 116, 117].

Für die Anwendung in der Bildgebung sind Fluorophore mit Absorptions- und Emissionsmaxima im tiefroten Bereich von großem Vorteil. Die zur Anregung verwendeten Laser wechselwirken dann kaum mit den Proben und die Phototoxizität ist im Allgemeinen sehr niedrig. Des Weiteren ist die Streuung stark wellenlängenabhängig ( $\propto \frac{1}{\lambda^4}$ ) und daher für größere Wellenlängen enorm unterdrückt. Auch die Autofluoreszenz, die typischerweise im grünen und gelben Spektralbereich liegt, lässt sich dann durch spektrales Filtern vollkommen vom gewollten Fluoreszenzsignal trennen. Insbesondere STED-Mikroskope arbeiten oft mit einer Kombination aus Anregung bei 640 nm und Abregung im Bereich um 780 nm, da im Bereich dieser Wellenlänge der leistungsstarke STED-Strahl kaum mit typischen biologischen Proben wechselwirkt. Die Entwicklung von tiefroten FPs erweist sich jedoch als schwierig, da diese insbesondere im Bereich der photophysikalischen Eigenschaften dem klassischen GFP deutlich untergeordnet sind [118]. Mit mGarnet, einer Weiterentwicklung von mRuby [29], konnte Anika Hense im Rahmen Ihrer Dissertation [119] ein fluoreszentes Protein entwickeln, das auf Grund seiner spektralen Eigenschaften das grundsätzliche Potential hat, als Fluorophor für die STED-Mikroskopie verwendet zu werden [86]. In Abbildung 4.1 sind die Absorptions- und Emissionsspektren von mGarnet gezeigt. Trotz des Emissionsmaximums bei 598 nm ist die Anregung bei 640 nm (markiert durch den roten Pfeil) immer noch effizient genug. Das Emissionsspektrum passt hervorragend zu den typischerweise verwendeten Fluoreszenzfiltern. Das hier eingezeichnete Detektionsfenster des  $(676 \pm 18)$  nm Bandpass-Filters ist jedoch

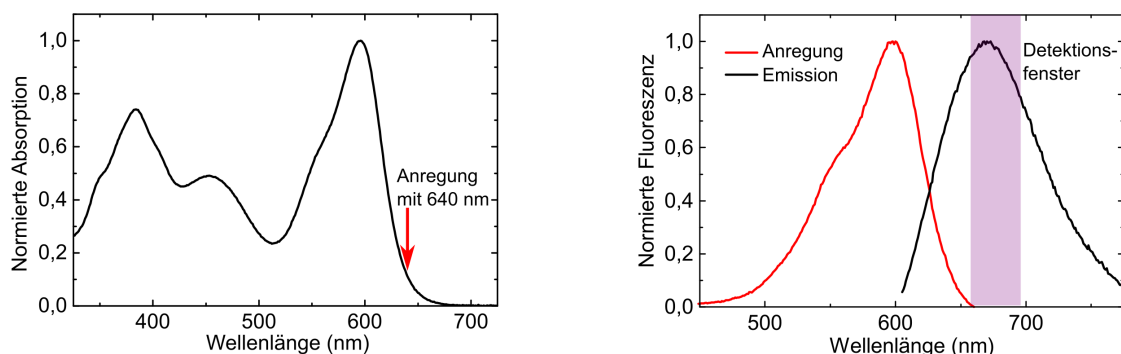


Abbildung 4.1: Absorptions-, Anregungs- und Emissionsspektrum von mGarnet. Links: Absorptionsspektrum bei pH 7,4. Der typischerweise für die STED-Mikroskopie verwendete Anregungslaser bei 640 nm ist mit einem roten Pfeil im Spektrum eingezeichnet. Rechts: Anregungs- und Emissionsspektrum bei  $\lambda_{Em} = 670$  nm bzw.  $\lambda_{Anr} = 598$  nm. Das typischerweise in der STED-Mikroskopie von tiefroten Fluorophoren verwendete Detektionsfenster ist farbig markiert (modifiziert aus [86]).

nicht optimal gewählt, da zum Zeitpunkt der Experimente kein passenderer Fluoreszenzfilter zur Verfügung stand. Durch die Verwendung eines Langpassfilters ab 650 nm und die zusätzliche Unterdrückung des Anregungslasers mit Hilfe eines Notch-Filters kann das Detektionsfenster in Zukunft noch in den roten Spektralbereich erweitert werden, um so die Signalausbeute zu optimieren.

Um die Eignung von mGarnet als Fluorophor für die STED-Mikroskopie experimentell zu bestätigen, wurden Mikrotubuli lebende Cos7-Zellen [120] mit Hilfe des Fusionsproteins aus RITA (*RBP-J interacting and tubulin associated protein* [121]) und mGarnet eingefärbt. Die Kultivierung und Transfektion der in den folgenden Abschnitten verwendeten Zellen erfolgte dabei in Zusammenarbeit mit Anika Henze. Mikrotubuli bilden zusammen mit Aktin und Intermediärfilamenten das Cytoskelett eukaryotischer Zellen. Ein Mikrotubulus besteht dabei aus 13 Protofilamenten, die jeweils wieder aus Dimeren der globulären Proteine  $\alpha$ - und  $\beta$ -Tubulin bestehen. Neben der Rolle beim Transport von Organellen in der Zelle [122, 123] sind Mikrotubuli auch wesentlich an der Bildung des Spindelapparates und der Trennung der Chromatiden während der Zellteilung beteiligt [124]. Durch die präzise Kenntnis des Aufbaus der Tubuli ist auch deren Durchmesser von 24 nm exakt bekannt. Hierdurch eignen sich eingefärbte Mikrotubuli auch hervorragend zur Bewertung der Leistungsfähigkeit verschiedener Mikroskope. In Abbildung 4.2 ist das STED- und Konfokal-Bild der mit mGarnet-RITA transfizierten Cos7-Zellen gezeigt. Die Struktur der Mikrotubuli ist klar zu erkennen und der Schnitt durch einen Tubulus, der in Abbildung 4.2 b) und c) gezeigt ist, offenbart die durch die STED-Mikroskopie erreichte deutliche Auflösungsverbesserung. Betrachtet man die Ausdehnung eines Tubulus und die zusätzliche Vergrößerung durch die Einfärbung mit mGarnet-RITA, so ist die tatsächliche Auflösung des STED-Mikroskops um einen Faktor 5 höher als die erreichbare Auflösung mit Hilfe der Konfokalmikroskopie in derselben Probe.

Gerade die Aufnahme von Zeitserien oder hochaufgelösten 3D-Bildern ist bei der Untersuchung lebender Zellen besonders interessant. Diese Arten von Aufnahmen sind jedoch besonders herausfordernd, da mit der großen Anzahl an Anregungs-Abregungs-Zyklen eine starke Photobelastung der Fluorophore einhergeht. Um die Eignung von mGarnet als Fluorophor für diese Aufnahmen zu untersuchen, soll zunächst das Bleichverhalten von mGarnet quantifiziert werden.

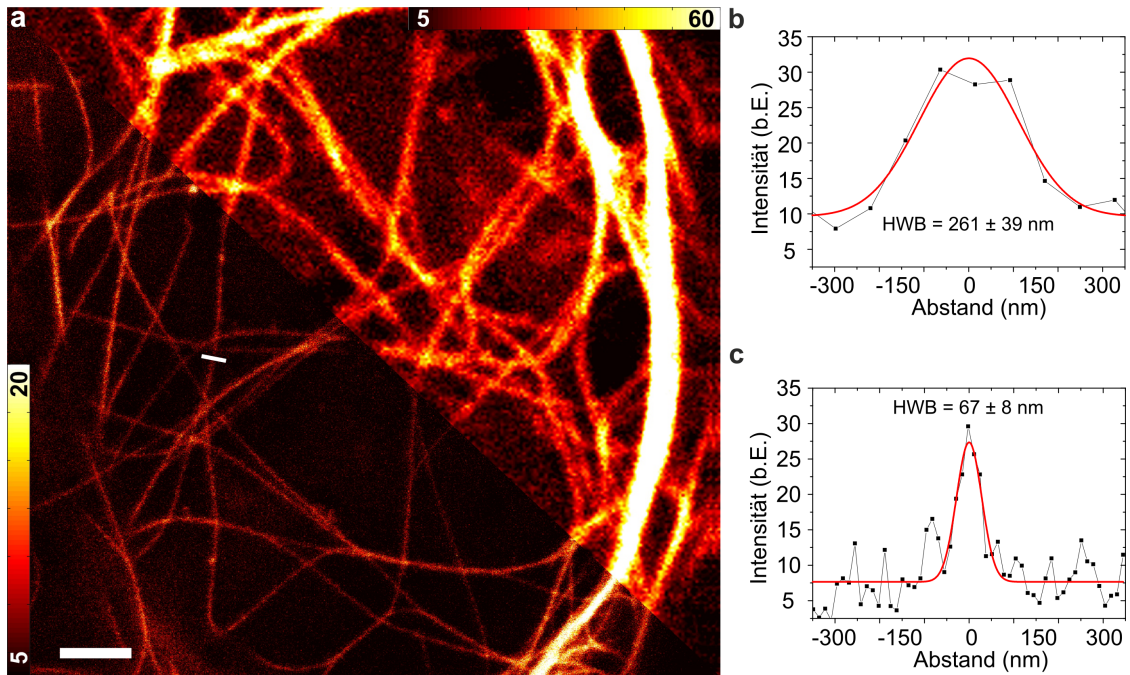


Abbildung 4.2: Konfokal- und STED-Mikroskopie von mit mGarnet-RITA transfizierten Cos7-Zellen. a) Zusammengesetztes Konfokal- (oben rechts) und STED-Bild (unten links) desselben Ausschnitts einer Cos7-Zelle. Die Anregung erfolgte bei 640nm mit einer Leistung von  $6,1 \mu\text{W}$ , für die Abregung bei 780nm wurde der Strahl mit Hilfe der Vortex-Phase moduliert und traf mit einer Leistung von 56mW auf die Probe. Die Pixelgröße betrug 20nm für das STED-Bild und 80nm für das Konfokalbild, die Pixelverweildauer war in beiden Fällen  $40 \mu\text{s}$ . Der Skalierungsbalken hat eine Länge von  $2 \mu\text{m}$ . Die Zahlen in den Farbskalierungsbalken geben die Anzahl detektierter Photonen pro Pixel an. b),c) Schnitte durch einen Tubulus für die Konfokalaufnahme (b) und das STED-Bild (c). Die roten Kurven sind mit Hilfe einer Normalverteilung an die Messdaten angepasst, um die Halbwertsbreiten zu bestimmen (modifiziert aus [86]).

Hierfür wurde das Aktinskelett lebender Cos7-Zellen mit Hilfe von LifeAct [125] fusioniert mit mGarnet (LifeAct-mGarnet) eingefärbt. LifeAct ist ein Peptid, das direkt an F-Aktin bindet und so, fusioniert mit einem FP, die Beobachtung von Aktinstrukturen ermöglicht. Wie bereits erwähnt, ist Aktin ein Teil des Cytoskeletts der Zelle und sowohl für Strukturgebung als auch die Bewegung von Zellen sowie z.B. die Kontraktion ganzer Muskelstränge mitverantwortlich [124]. Gerade die Beobachtung der Aktinstrukturen in höchster Auflösung und über längere Zeiten hinweg könnte einen Einblick in viele, immer noch vorherrschende, Unklarheiten über die Rolle Aktins in der Funktionsweise lebender Zellen bieten [126]. Filopodien, auch Scheinfüßchen genannt, sind Ausstülpungen eukaryotischer Zellen, die eine große Rolle bei der Bewegung, aber auch dem Stoffwechsel oder der Signalgebung zwischen Zellen spielen [127, 128, 129].

Um die Bleichstabilität von mGarnet zu messen, wurden kleine Ausschnitte eines Filopodiums in schneller Abfolge wiederholt aufgenommen. Die Filopodien eigneten sich besonders für diese Messung, da sie außerhalb der Zelle und nah an der Oberfläche praktisch ohne Hintergrund aufgenommen werden können. Dies ist in Abbildung 4.3 gezeigt. In einer Zeit von nur 20s konnten so 200 Bilder derselben Stelle aufgenommen werden. Eine Auswertung der resultierenden Intensität der Bilder ist in Abbildung 4.3 unten gezeigt. Bemerkenswert ist, dass selbst bei hohen STED-Leistungen die resultierende Intensität

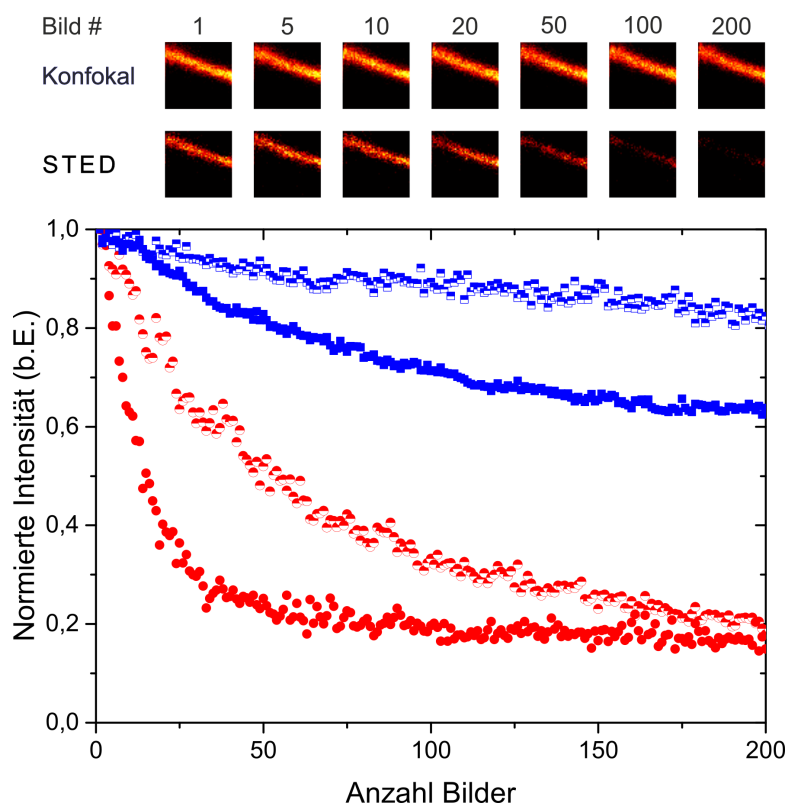


Abbildung 4.3: Aufnahmen von Filopodien einer mit LifeAct-mGarnet markierten Cos7-Zelle. 200 ( $2\mu\text{m} \times 2\mu\text{m}$ , Pixelverweildauer  $40\mu\text{s}$ , Pixelgröße  $40\text{nm}$ ) Bilder wurden sowohl im Konfokal- als auch STED-Modus in schneller Abfolge aufgenommen. Oben: Sieben ausgewählte Bilder aus der Zeitserie zeigen, dass bis zu 20 STED-Bilder ohne großen Signalverlust aufgenommen werden können. Die Anregungsleistung bei  $640\text{nm}$  beträgt  $6,1\mu\text{W}$ , die STED-Leistung beträgt  $28,8\text{mW}$ . Unten: Normierte und hintergrundbereinigte Intensität der Konfokal- (blau) und STED-Bilder (rot). Halb gefüllte Symbole: Leistung wie zuvor. Volle Symbole: Anregungsleistung  $27\mu\text{W}$  (blau) bzw. STED-Leistung  $56\text{mW}$  (rot) (modifiziert aus [86]).

bei einem Wert von ca. 20% sättigt. Dies legt nahe, dass bei diesem Wert der kontinuierliche Austausch von gebundenem und gebleichtem LifeAct-mGarnet mit frischem ungebundenen LifeAct-mGarnet einen weiteren Abfall der Intensität verhindert.

Diese Messungen zeigen, dass auch bei hohen Anregungs- und STED-Leistungen bis zu 20 Bilder aufgenommen werden können, bevor das Signal aufgrund des Photobleichens zu gering wird. Um die Aufnahme von Zeitserien zu demonstrieren und des Weiteren zu zeigen, dass die Zellen lebendig und in guter Verfassung sind, werden anschließend STED-Bilder von mit LifeAct-mGarnet transfizierten Cos7-Zellen aufgenommen. Hierzu werden über eine halbe Stunde hinweg Bilder im Abstand von 3 min aufgenommen. In Abbildung 4.4 sind ausgewählte Bilder dieser Serie gezeigt. Die weißen Pfeile markieren Stellen, an denen die Veränderung der Aktinstruktur über die Zeit besonders markant ist. Im Rahmen dieser Untersuchungen konnte also gezeigt werden, dass sich mGarnet als Marker für die Anwendung in der höchstauflösenden Fluoreszenzmikroskopie eignet. Neben ausgezeichneten Auflösungsverbesserungen erlaubt die für ein FP herausragende Bleichstabilität auch die Aufnahme von Zeitserien mit Hilfe der STED-Mikroskopie.



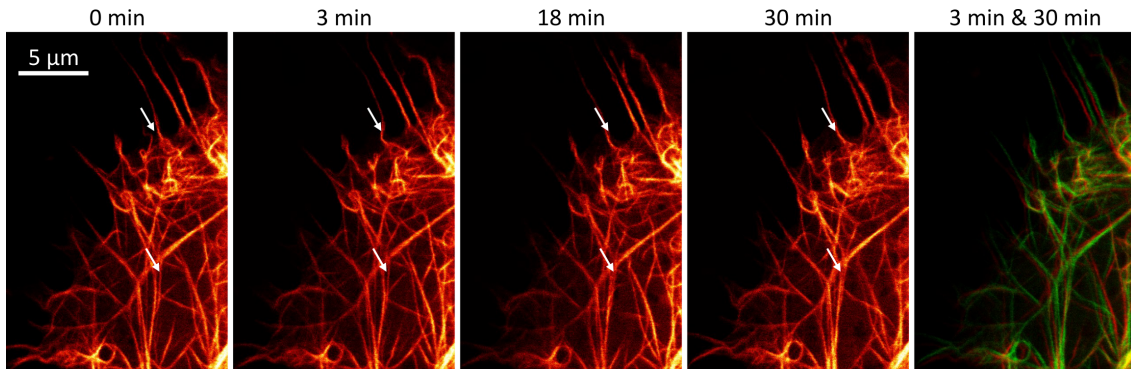


Abbildung 4.4: STED-Mikroskopie von LifeAct-mGarnet transfizierten Cos7-Zellen. Aufnahme von 11 Bildern im Abstand von jeweils drei Minuten. Die Größe der Bilder beträgt  $18\mu\text{m} \times 28\mu\text{m}$ , die Pixelgröße beträgt  $20\text{nm}$ , die Pixelverweildauer  $40\mu\text{s}$ . Die Anregung erfolgte bei  $640\text{nm}$  die Abregung bei  $780\text{nm}$ . Der STED-Strahl wurde zur lateralen Auflösungsverbesserung mit einer Vortex-Phase moduliert und traf mit einer Leistung von  $56\text{mW}$  auf die Probe. Die Überlagerung des Bildes nach 3 Minuten (rot) und nach 30 Minuten (grün) zeigt die Dynamik des Aktinskeletts der lebenden Zelle (modifiziert aus [86]).

### Zellkultur und Transfektion

Cos7-Zellen (Sigma-Aldrich, St. Louis MO, USA) wurden in *Dulbecco's Modified Eagle's Medium* (DMEM), das mit  $10\%$  *fetal bovine serum* (FBS) und Antibiotika ( $60\mu\text{g ml}^{-1}$  Penicillin und  $100\text{ng ml}^{-1}$  Streptomycin, beide von Invitrogen, Carlsbad, Kanada) versetzt wurde, bei  $37^\circ\text{C}$  und  $5\%$   $\text{CO}_2$  kultiviert. 24h nach der Aussaat in *8-well Lab-Tek II chambered cover glass* (Thermo Fischer Scientific, Waltham, USA) wurden die Zellen mit  $3\mu\text{g}$  DNA mit Hilfe von Lipofectamine® (Invitrogen) transfiziert. Anschließend wurden die Zellen mindestens weitere 24h inkubiert, bevor Konfokal- und STED-Bilder aufgenommen wurden.

## 4.2 Anwendung der STEDD-Mikroskopie zur Verminderung des Hintergrunds in der Bildgebung

Im folgenden Abschnitt sollen die Vorteile der STEDD-Mikroskopie in verschiedenen Anwendungsszenarien dargestellt werden. Neben der Mikroskopie künstlicher und zellulärer Strukturen in zwei und drei Dimensionen wird ebenso die Möglichkeit erläutert, STEDD-Mikroskopie mit einem weniger rot verschobenen Strahl und damit bei niedriger Laserleistung aber gleicher Auflösung zu betreiben. Die Aufnahme und Analyse der in diesem Abschnitt gezeigten Daten (mit Ausnahme der Daten aus Abbildung 4.6) erfolgte in enger Zusammenarbeit mit Dr. Peng Gao.

### 4.2.1 STEDD-Mikroskopie in zwei Dimensionen

#### Aufnahme fluoreszenter Polystyrolkugeln

Um den aus Theorie und Simulation zu erwartenden Effekt der Hintergrundminimierung (siehe Abschnitt 3.2) experimentell zu verifizieren, wurden zunächst fluoreszente Polystyrolkugeln, die auf einer Glasoberfläche immobilisiert wurden, untersucht (Protokoll zur Präparation siehe Abschnitt 3.1.5). Die Anregung erfolgte bei  $640\text{nm}$  mit einer Leistung von  $0,85\mu\text{W}$  in der Probenebene. Der Ti:Sa-Laser emittierte

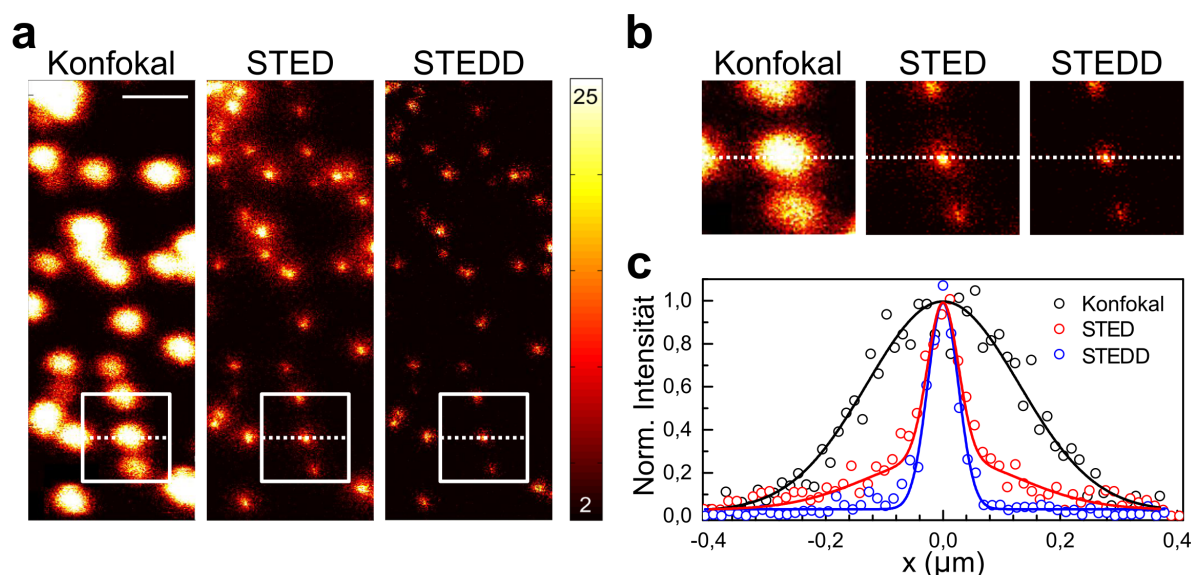


Abbildung 4.5: Vergleich von Konfokal-, STED- und STEDD-Mikroskopie an fluoreszenten Polystyrolkugeln. a) Darstellung der Konfokal-, STED- und STEDD-Aufnahmen. Der Skalierungsbalken hat eine Größe von  $1\ \mu\text{m}$ , die Farbskalierung zeigt 2 bis 25 Photonen pro Pixel. b) Großaufnahme des Bereichs der in a) mit einem weißen Quadrat markiert wurde. c) Schnitt durch die in b) gezeigten Kugeln entlang der weißen gestrichelten Linie. Die durch Hintergrund erzeugten Strukturen neben dem eigentlichen Maximum, die im STED-Bild deutlich zu erkennen sind, sind im STEDD-Bild verschwunden (modifiziert aus [84]).

bei einer Wellenlänge von  $760\text{nm}$  und einer Leistung von  $28\text{mW}$ , wobei  $90\%$  der Leistung im STED1- und  $10\%$  im um  $1,5\text{ns}$  verschobenen STED2-Puls die Probe erreichten. Die Probe wurde anschließend mit einer Pixelgröße von  $14\text{nm}$  und einer Pixelverweildauer von  $40\ \mu\text{s}$  abgerastert. Die resultierenden Bilder sind in Abbildung 4.5 dargestellt. In Abbildung 4.5 c) sind Schnitte durch ein Polystyrolkugeln aufgezeigt. Zeigen STED- und STEDD-Bilder hier ein ähnlich schmales Maximum im Zentrum, das eine deutliche Auflösungsverbesserung gegenüber der Konfokalmikroskopie bestätigt, so kann die Breite im STED-Bild nur mit einer Kombination aus zwei Normalverteilungen (eine für das Signal, eine für den Hintergrund) angepasst werden. Dies ist für das Konfokalbild und das STEDD-Bild mit deutlich weniger Hintergrund nicht nötig. Die gemessenen Halbwertsbreiten der Fluoreszenzkugeln betragen  $(306 \pm 12)\text{nm}$  für die Konfokalmikroskopie und  $(62 \pm 2)\text{nm}$  für die STEDD-Mikroskopie.

#### Aufnahme lebender Zellen

Um das tatsächliche Potential der STEDD-Mikroskopie offenzulegen, wurden anschließend lebende Cos7-Zellen, deren Tubulin-Struktur mit Hilfe von RITA-mGarnet (siehe 4.1) eingefärbt wurde, untersucht. Fluoreszente Proteine und im Speziellen FPs im tiefroten Spektrum sind deutlich dunklere und weniger bleichstabile Fluorophore als vergleichbare organische Farbstoffe [118]. Des Weiteren ist die Fluoreszenzlebenszeit von mGarnet, deren Messung in Abbildung 4.6 gezeigt ist, mit  $\tau = (0,82 \pm 0,01)\text{ns}$  deutlich geringer als die Fluoreszenzlebenszeit vergleichbarer organischer Farbstoffe. Dies hat zur Folge, dass durch die Aufteilung des Fluoreszenzsignals in Detektionsfenster und die Vernachlässigung der Photonen, die während der Wechselwirkung der Fluorophore mit den jeweiligen STED-Strahlen detektiert werden, relativ gesehen weniger Signalphotonen aufgenommen werden können.

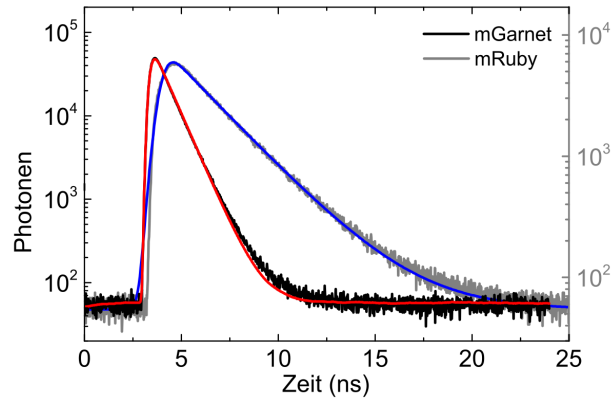


Abbildung 4.6: Messung von Fluoreszenzzerfallskurven von mGarnet und mRuby nach Anregung mit gepulsten Lasern. Die Lebenszeiten von mGarnet ( $\tau_{\text{mGarnet}} = (0,82 \pm 0,01) \text{ ns}$ ) und mRuby ( $\tau_{\text{mRuby}} = (2,6 \pm 0,1) \text{ ns}$ ) wurden mit Hilfe der Anpassung von Modellen für exponentiellen Zerfall an die Messdaten bestimmt. Die deutlich verringerte Lebenszeit ist typisch für fluoreszente Proteine aus dem tiefroten Spektrum und ist vermutlich in der, mit der Vergrößerung des delokalisierten Elektronensystems einhergehenden, reduzierten Stabilität des Chromophors begründet [86].

Trotz dieser Schwierigkeiten kann die STEDD-Mikroskopie auch an Proben, die mit fluoreszenten Proteinen eingefärbt wurden, erfolgreich durchgeführt werden. In Abbildung 4.7 sind zum Vergleich Konfokal-, STED- und STEDD-Aufnahmen von Mikrotubuli gezeigt. Die Auflösungsverbesserung, die mit Hilfe der STED-Mikroskopie erreicht werden konnte, ist offensichtlich, dennoch ist der Hintergrund im STED-Bild nicht zu vernachlässigen. Das STEDD-Bild besitzt einen deutlich reduzierten Hintergrund, die Struktur der Mikrotubuli ist klar zu erkennen. Besonders offensichtlich ist die Verringerung des Hintergrundes an den Schnitten entlang der in Abbildung 4.7 a) mit Hilfe einer weißen, gestrichelten Linie angezeigten Stelle in Abbildung 4.7 c) zu erkennen. Abermals ist eine Anpassung an die STED-Daten auf Grund des prominenten Hintergrundes nur mit Hilfe zweier Normalverteilungen möglich. Der minimale Hintergrund des STEDD-Bildes ermöglicht eine Anpassung mit nur einer Gauss-Funktion. Eine Mittelung aus zehn Querschnitten durch Mikrotubuli ergibt Halbwertsbreiten von  $d_{\text{Konfokal}} = (300 \pm 50) \text{ nm}$  für das Konfokalbild und  $d_{\text{STEDD}} = (74 \pm 16) \text{ nm}$  für das STEDD-Bild. Es ist also eine deutliche Auflösungsverbesserung und ein - im Vergleich zur STED-Mikroskopie - deutlich reduzierter Hintergrund trotz der Verwendung vergleichsweise schlechter Fluorophore für die Aufnahme der STEDD-Bilder zu erkennen. Die Transfektion der Zellen erfolgte wie in Abschnitt 4.1 beschrieben.

#### 4.2.2 STEDD-Mikroskopie mit STED-Wellenlängen näher am Emissionsmaximum

Bei der Wahl der Wellenlänge des STED Lasers muss man grundsätzlich zwischen dem Wirkungsquerschnitt für stimulierte Emission, der umso größer ist, je näher die Wellenlänge des STED-Lasers am Emissionsmaximum des Farbstoffs liegt, sowie der Wahrscheinlichkeit, die Farbstoffe mit Hilfe des STED-Lasers ungewollt anzuregen, abwägen. Diese ungewollte Anregung, auch Wiederanregung genannt, ist ein Teil des Hintergrundes in der STED-Mikroskopie und kann prinzipiell mit Hilfe der STEDD-Mikroskopie gemessen und dadurch vom Signal getrennt werden. Dies ermöglicht eine Verwendung weniger rotverschobener STED-Wellenlängen und macht dadurch die Abregung effizienter, da die Sättigungsintensität deutlich sinkt (siehe Abschnitt 3.2.2 sowie Abbildung 3.9). Man kann also

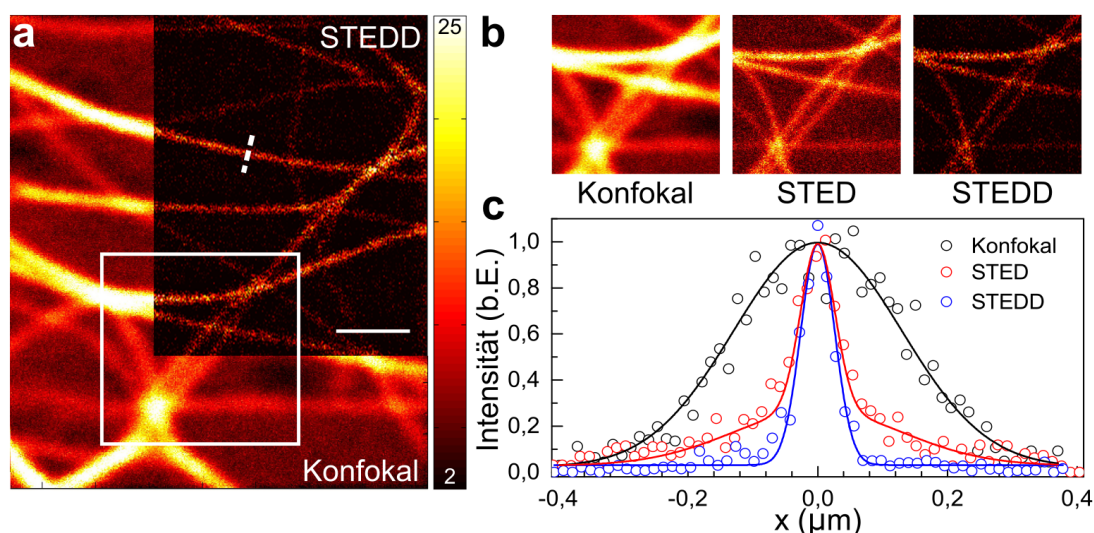


Abbildung 4.7: Vergleich von Konfokal-, STED- und STEDD-Mikroskopie an lebenden Cos7-Zellen, die mit RITA-mGarnet transfiziert wurden. a) Gemischte Abbildung von Konfokal- und STEDD-Mikroskopie der Tubulin-Struktur der Zelle. Die Pixelgröße entspricht 14 nm, die Pixelverweildauer liegt bei 100 µs, die Anregung bei 640 nm erfolgt mit 4,6 µW die Abregung bei 760 nm erfolgt mit 28 mW, wobei 90 % für den 3D-Donut und 10 % für den um 0,65 ns verzögerten STED2-Strahl verwendet wurden. Die Zahlen im Farbskalierungsbalken entsprechen gezählten Photonen. Der Skalierungsbalken hat eine Länge von 1 µm. b) Nahaufnahmen der in a) mit einem weißen Quadrat markierten Stelle. Der deutlich reduzierte Hintergrund in der STEDD-Mikroskopie ist offensichtlich. c) Schnitte entlang der weißen, gestrichelten Linie in a). Die Auflösungsverbesserung ( $d_{\text{Konfokal}} = (297 \pm 13)$  nm für das Konfokalbild und  $d_{\text{STEDD}} = (74 \pm 4)$  nm für das STEDD-Bild) ist evident. Der Hintergrund in der STED-Mikroskopie erfordert eine Anpassung der Schnittkurven mit zwei Normalverteilungen - dies ist für die Konfokal- und STEDD-Mikroskopie nicht nötig (modifiziert aus [84]).

bei gleicher Leistung größere Auflösungsverbesserungen bzw. bei gleicher Auflösung geringere STED-Leistungen verwenden. Dies kann sich insbesondere bei der Verwendung wenig bleichstabiler Fluorophore als großer Vorteil erweisen.

In Abbildung 4.8 ist die STED- und STEDD-Mikroskopie von fluoreszenten Polystyrolkugeln bei verschiedenen STED-Wellenlängen gezeigt. Die klassische STED-Mikroskopie zeigt dabei ein Optimum in der Wahl der STED-Wellenlänge. Wählt man diese zu niedrig, so dominiert der durch Wiederanregung entstandene Halo um die Kügelchen. Bei sehr hohen STED-Wellenlängen wird die Abregung immer unwahrscheinlicher und die effektive Auflösung sinkt. In der STEDD-Mikroskopie zeigt sich ein völlig anderes Bild: Dadurch, dass sich die Wiederanregung komplett vom Signal trennen lässt, ist die erreichbare Auflösung für niedrige STEDD-Wellenlängen am größten und steigt kontinuierlich bei höheren STED-Wellenlängen und damit auch größeren Sättigungsleistungen an. Dies ist in Abbildung 4.8 rechts gezeigt.

In der Literatur sind bis dato einige Arbeiten zu finden, die sich, ähnlich wie STEDD, mit der Reduzierung des Hintergrundes durch Wiederanregung beschäftigen. Die Verwendung von *time gating*, also die Aufnahme von Signalphotonen nur in gewissen Zeiträumen, hilft v.a. bei der Verwendung von Dauerstrichlasern zur Abregung der Fluorophore: Das gewünschte Signal wird dann nur kurz nach dem Eintreffen des Anregungspulses aufgesammelt - und der meiste durch den STED-Laser erzeugte Hinter-

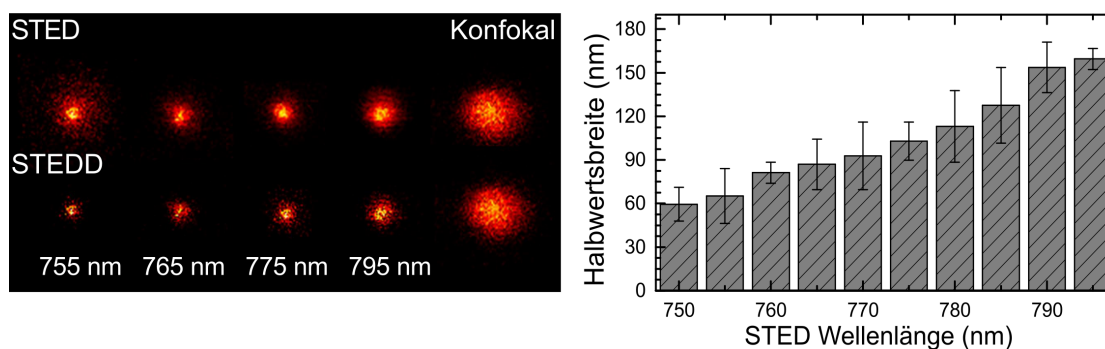


Abbildung 4.8: STED- und STEDD-Mikroskopie bei verschiedenen Abregungswellenlängen. In der STED-Mikroskopie muss die richtige Balance zwischen effektiver Abregung bei niedrigen Wellenlängen und niedrigem Hintergrund durch Wiederanregung bei hohen Wellenlängen gefunden werden. Durch die effiziente Verminderung des Hintergrundes funktioniert die STEDD-Mikroskopie am besten bei niedrigen STED-Wellenlängen. Auf der rechten Seite ist die gemessene durchschnittliche Halbwertsbreite von 8 fluoreszenten Polystyrolkugeln (der Fehlerbalken entspricht der Standardabweichung) über die verwendete Abregungswellenlänge aufgetragen. Die Abregungsleistung betrug 25 mW, die restlichen Parameter sind analog zu den Messungen in Abschnitt 4.2.1 gewählt, die Probenvorbereitung ist in Abschnitt 3.1.5 beschrieben (modifiziert aus [84]).

grund kann vom eigentlichen Signal diskriminiert werden [111]. Des Weiteren kann in einem zweiten Detektionsfenster so auch der reine Hintergrund durch Wiederanregung gemessen werden, um ihn anschließend vom gemessenen Signal abzuziehen [112, 130]. Weitere Arbeiten beinhalten die Verwendung von Lock-In-Verstärkern [131] oder auch die Aufnahme von getrennten Bildern mit und ohne vorherige Anregung, die anschließend voneinander abgezogen werden können [132].

Allen diesen Arbeiten ist gemein, dass sie sich ausschließlich mit der Identifikation und Reduktion von durch Wiederanregung erzeugtem Hintergrund beschäftigen. Um die Vorteile der STEDD-Mikroskopie zu demonstrieren, ist in Abbildung 4.9 der Vergleich zwischen STEDD-Mikroskopie und der separaten Messung und anschließenden Subtraktion des durch Wiederanregung entstandenen Hintergrunds gezeigt. Es ist offensichtlich, dass die STEDD-Mikroskopie zu deutlich besseren Ergebnissen führt, da sie zum einen nicht darauf angewiesen ist, über mehrere Bilder hinweg eine völlig statische Probe vorzufinden, sie funktioniert also auch bei lebenden und dynamischen Proben. Des Weiteren reduziert die STEDD-Mikroskopie nicht nur den entstandenen Hintergrund durch Wiederanregung, sondern auch durch unvollständige Abregung und ist somit unabhängig von der eigentlichen Art des Hintergrundes.

### 4.2.3 STEDD-Mikroskopie in drei Dimensionen

Die Vorteile der STEDD-Mikroskopie werden also vor allem dann offensichtlich, wenn der Hintergrund nicht durch Wiederanregung, sondern andere Anteile dominiert wird. Dies ist insbesondere dann der Fall, wenn eng beieinander liegende dreidimensionale Strukturen untersucht werden sollen. Durch die geringe Intensität in den Außenbereichen des STED-Fokus ist vor allem dann die unvollständige Abregung als Hauptproblem anzusehen. Um dies zu demonstrieren, wurden zunächst, analog zum Vorgehen in den vorherigen Abschnitten, Polystyrolkugeln als dreidimensionale Struktur präpariert und anschließend auch das dicht gepackte Cytoskelett von Zellen in drei Dimensionen untersucht.

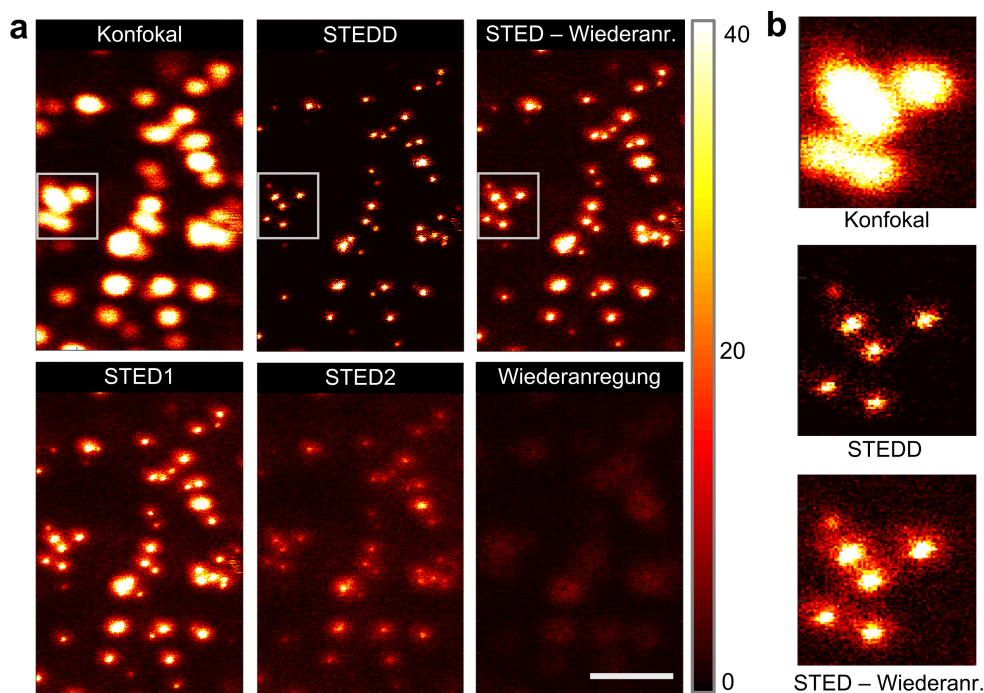


Abbildung 4.9: Aufnahme von fluoreszenten Polystyrolkugeln in verschiedenen Modi: Konfokal, STEDD sowie STED mit abgezogener Wiederanregung. Zum besseren Vergleich sind auch die entstehenden Bilder zwischen STED1- und STED2-Puls, also das Bild, das sowohl Signal als auch Hintergrund enthält und hier mit STED1 bezeichnet wird, das entstehende Bild nach Abregung des Signals durch den unmodulierten STED-Strahl, hier der mit STED2 bezeichnete gemessene Hintergrund, sowie das ausschließlich mit dem STED-Strahl aufgenommene Bild, das die Wiederanregung zeigt, dargestellt. Die Messung erfolgte dabei bei einer Abregungswellenlänge von 780 nm und ansonsten mit identischen Parametern zu den Aufnahmen aus Abschnitt 4.2.1. Die Länge des Skalierungsbalkens beträgt 2 µm, der Farbskalierungsbalken beschreibt die Anzahl detektierter Photonen pro Pixel.

### 3D-STEDD Aufnahmen von fluoreszenten Polystyrolkugeln

In Abbildung 4.10 ist die Aufnahme von fluoreszenten Polystyrolkugeln in drei Dimensionen gezeigt. Hierfür wurde mit Hilfe von Agarose (Agarose low gelling temperature, Sigma-Aldrich) ein 3% Agarosegel hergestellt, in das anschließend die Polystyrolkugeln gemischt wurden. Hierdurch erhält man eine Probe, in der die Kugeln nicht nur auf der Oberfläche, sondern im gesamten Volumen verteilt und fixiert sind. Anschließend wurde ein Volumen von  $5,6\mu\text{m} \times 5,6\mu\text{m} \times 4\mu\text{m}$  mit Hilfe von 76 einzelnen Bildern, die jeweils eine Auflösung von  $128 \times 128$  Pixel besaßen, aufgenommen. In Abbildung 4.10 a) ist das gesamte untersuchte Volumen mit den sich darin befindenden fluoreszenten Kugeln einmal für die Konfokalmikroskopie und einmal für die STEDD-Mikroskopie dargestellt. In b) ist die Projektion eines Teilvolumens von  $2,5\mu\text{m} \times 2,5\mu\text{m} \times 3\mu\text{m}$  auf die  $x$ - $z$ -Ebene gezeigt. Der deutlich reduzierte Hintergrund in der STEDD-Mikroskopie im Vergleich zur klassischen STED-Mikroskopie (identisch zu STED1) ist in drei Dimensionen wesentlich offensichtlicher als für die Mikroskopie in 2D. Dies wird auch durch die lateralen (Abbildung 4.10c) ) und axialen Profile (Abbildung 4.10d) ) eines einzelnen Kugels deutlich. Die entlang der Profile gemessene Auflösung beträgt  $(114 \pm 7)$  nm  $[(300 \pm 11)$  nm] lateral und  $(327 \pm 18)$  nm  $[(756 \pm 51)$  nm] axial für das STEDD- bzw. Konfokalbild.

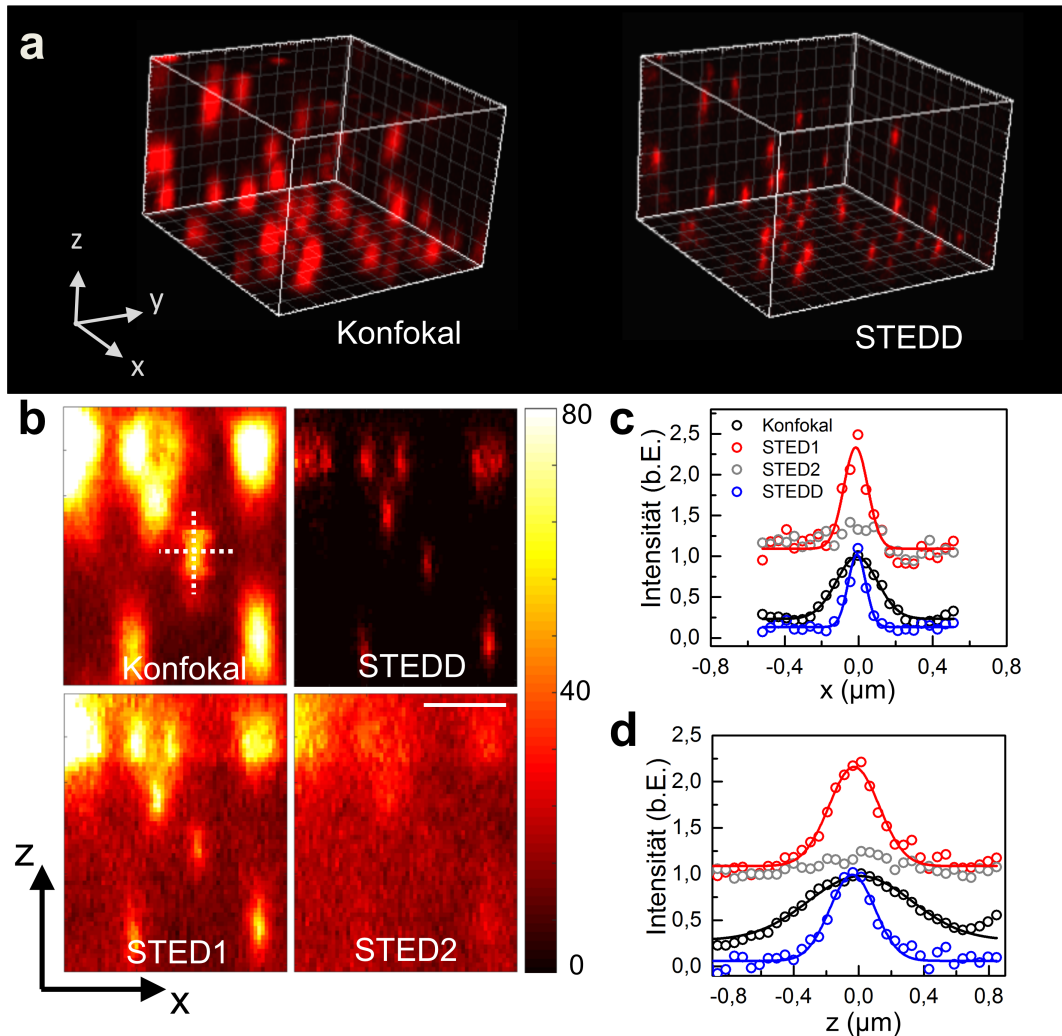


Abbildung 4.10: 3D Aufnahmen von fluoreszenten Polystyrolkugeln mit Hilfe von Konfokal- und STEDD-Mikroskopie. Anregung bei 640nm, die STED-Wellenlänge betrug 780nm und die eingesetzten 28mW wurden zu 65% für die Vortexphase, zu 25% für die Zylinderphase und zu 10% für den STED2-Strahl verwendet. Ein Bereich von  $5,6\mu\text{m} \times 5,6\mu\text{m} \times 4\mu\text{m}$  wurde in  $128 \times 128 \times 76$  Voxel zerlegt und mit einer Pixelverweildauer von  $40\mu\text{s}$  aufgenommen. a) Darstellung der 3D-Bilder für den Fall der Konfokalmikroskopie (links) und die STEDD-Mikroskopie (rechts). Die Länge des Skalierungsbalkens beträgt  $2\mu\text{m}$ . b) Projektionen eines Untervolumens von  $2,5\mu\text{m} \times 2,5\mu\text{m} \times 3\mu\text{m}$  auf die x-z-Ebene. Die getrennte Darstellung der Konfokal- und STEDD-Mikroskopie sowie der einzeln gemessenen Anteile des zusammengesetzten STEDD-Bilds offenbart die Effizienz der Hintergrundmessung und -reduktion durch den Einsatz eines zweiten unmodulierten STED-Pulses. c), d) Laterale- (c) und axiale-Profile (d) durch das in b) markierte Kugeln. Die Intensitäten wurden dabei (ausgenommen die Daten des Konfokalbildes) auf das Maximum des STEDD-Bildes normiert (modifiziert aus [84]).

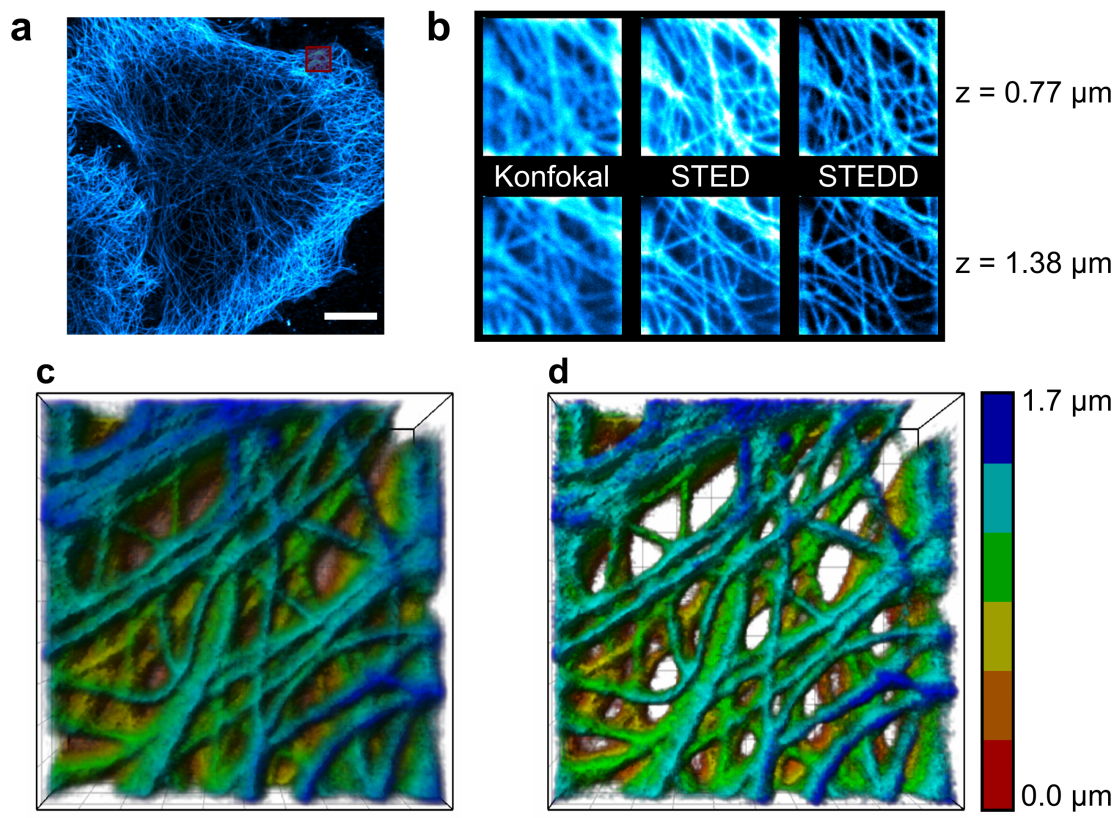


Abbildung 4.11: Aufnahmen von HeLa-Zellen, deren Mikrotubuli mit Hilfe von Atto 647N fluoreszent markiert wurden. Anregung bei 640nm mit  $2\mu\text{W}$  bei der Konfokalmikroskopie und  $3,5\mu\text{W}$  bei der STED(D)-Mikroskopie. Die STED-Wellenlänge betrug 780nm und die eingesetzten 28 mW wurden zu 65 % für die Vortexphase, zu 25 % für die Zylinderphase und zu 10 % für den STED2-Strahl verwendet. Die Pixelverweildauer betrug  $40\mu\text{s}$ . a) Konfokalbild der gesamten Zelle, in dem der mit Hilfe der 3D-Mikroskopie untersuchte Bereich mit einem roten Quadrat markiert ist. Der Skalierungsbalken hat eine Länge von  $5\mu\text{m}$ . b) Anschließend wurde ein Volumen von  $5\mu\text{m} \times 5\mu\text{m} \times 1,7\mu\text{m}$  mit einer Auflösung von  $128 \times 128 \times 46$  Voxel mit Hilfe der verschiedenen Mikroskopietechniken aufgenommen. Hier sind Projektionen auf die x-y-Ebene über jeweils  $\pm 4$  Voxel um die angegebene axiale Position gezeigt. c), d) Volumengerenderte Darstellung der Tubulinstruktur. Es wurde eine untere Anzeigeschwelle von 15 % gewählt. Die Farbcodierung beschreibt die axiale Position der Strukturen (acht Bilder pro Farbe, für blau nur sechs Bilder). Die Länge des Skalierungsbalkens beträgt  $1\mu\text{m}$  (modifiziert aus [84]).

### 3D-STEDD Aufnahmen des Cytoskeletts der Zelle

Ihr wahres Potential kann die STEDD-Mikroskopie vor allem bei der Untersuchung dichter dreidimensionaler Strukturen entfalten. Ein Szenario, das vor allem bei der Untersuchung bestimmter Strukturen in Zellen, wie dem Cytoskelett, oder der Mikroskopie von Gewebe häufig auftritt. Um dies zu demonstrieren, wurden Mikrotubuli von HeLa-Zellen [133] mit Hilfe von ATTO 647N (ATTO-TEC GmbH, Siegen) angefärbt. HeLa-Zellen sind, im Gegensatz zu Cos7-Zellen, höher und weniger flach ausgebreitet und weisen daher im Allgemeinen mehr Struktur in axialer Richtung auf.

Die Resultate der Konfokal-, STED- und STEDD-Mikroskopie dieser Strukturen sind in Abbildung 4.11 dargestellt. Der kleine Ausschnitt des Cytoskeletts einer HeLa-Zelle, der im Übersichtsbild (Abbildung 4.11a) mit einem roten Quadrat markiert wurde, wurde in einem Volumen von  $5\mu\text{m} \times 5\mu\text{m} \times 1,7\mu\text{m}$



mit einer Auflösung von  $128 \times 128 \times 46$  Voxel aufgenommen. In Abbildung 4.11 b) sind Projektionen auf die x-y-Ebene über jeweils vier Bilder über und unterhalb des angegebenen Zentrums gezeigt. Der Vergleich zeigt die deutliche Auflösungsverbesserung durch die STED-Methoden, die jedoch im Falle der klassischen STED-Mikroskopie unter starkem Hintergrund zu leiden hat. Die feinsten Details sind hier nur im STEDD-Bild zu erkennen. In Abbildung 4.11 c),d) ist ein Volumen-Rendering der gemessenen Tubulinstruktur für STED- (c) und STEDD-Mikroskopie (d) gezeigt. Dieses wurde mit Hilfe der Software Imaris (Bitplane, Zürich, Schweiz) berechnet. Hierbei wurden nur Pixelintensitäten zwischen 15% und 100% der Maximalintensität zum Rendern verwendet, da sich ansonsten die komplette Struktur in Abbildung 4.11 c) auffüllen würde. Die axiale Position der Mikrotubuli ist dabei mit Hilfe von sechs Farben codiert. Eine Berechnung des Signal-zu-Hintergrund Verhältnisses, also der durchschnittlichen Intensität im Zentrum eines Mikrotubus und dem Raum zwischen den Mikrotubuli, ergibt für das STED-Bild  $3,5 \pm 0,6$  und für das STEDD-Bild  $21,8 \pm 2,5$ . Diese Verbesserung um einen Faktor von über 6 ist auch deutlich in den dargestellten Bildern zu erkennen.

### Probenpräparation

HeLa-Zellen (LGC Standards, Wesel) wurden in *Dulbecco's Modified Eagle's Medium* (DMEM), das mit 10% *fetal bovine serum* (FBS) und Antibiotika ( $60 \mu\text{g ml}^{-1}$  Penicillin und  $100 \text{ng ml}^{-1}$  Streptomycin, beide von Invitrogen) versetzt wurde, bei  $37^\circ\text{C}$  und 5%  $\text{CO}_2$  kultiviert. 24h nach der Aussaat in *8-well Lab-Tek II chambered cover glass* (Thermo Fischer Scientific) wurden die Zellen mit Hilfe von primären monoklonalen anti- $\beta$ -tubulin Antikörpern aus Mäusen (T52001-100UL, Sigma-Aldrich) und sekundären anti-Maus-IgG-Atto647N Antikörpern aus Ziegen (50185-1ML-F, Sigma-Aldrich) nach publizierten Protokollen [18] immunomarkiert.



## 5 Methoden zur Untersuchung von Dynamiken in biologischen Membranen

Ausgangspunkt dieser Arbeit waren die Vorarbeiten von Rene Dörlich [134] zum Thema Zwei-Farben-Zwei-Fokus-Linien-Raster-Fluoreszenzkorrelationsspektroskopie (2c2f lsFCS, von engl. *dual-color dual-focus linescanning FCS*), die im Folgenden kurz erläutert werden. Anschließend wurde dieser Ansatz durch die Verwendung eines neuen Rasterschemas in Bezug auf die Zeitauflösung stark verbessert. Der Einsatz von gepulsten Lasern erlaubt zum einen die Messung von zwei-Farb-Korrelationen ohne spektrales Übersprechen und zum anderen eine intrinsische Kalibration des Überlapps der verschiedenen Konfokalvolumina. Nachfolgend wird erläutert, wie eine Korrektur etwaigen Photobleichens erfolgen muss, um die gemessenen Autokorrelationskurven nicht zu verfälschen. Des Weiteren wird darauf eingegangen, wie die Bindungsaffinität zwischen Rezeptoren und Liganden besonders robust und effizient bestimmt werden kann. Abschließend wird die hierfür nötige und selbst programmierte Software kurz vorgestellt.

### 5.1 Ausgangspunkt: laterale Linien-Raster-FCS

René Dörlich nutzte in seiner Arbeit die bereits bekannten Techniken der Linienraster-FCS, der zwei-Fokus-FCS und der zwei-Farb-FCCS und kombinierte sie zu einer einzigen integrierten Messung. Hierfür verwendete er das in Abschnitt 3.1.1 beschriebene Mikroskop. Anstelle von gepulsten Lasern kamen Dauerstrichlaser zum Einsatz, die mit Hilfe eines akustooptischen Modulators in ihrer Intensität moduliert werden konnten.

Das grundsätzliche Vorgehen bei der Durchführung der lsFCS ist in Abbildung 5.1 dargestellt. Ein Laser wird mit hoher Frequenz und über die gesamte Messzeit hinweg senkrecht durch eine sich in der y-z-Ebene aufspannende Membran gerastert (Abbildung 5.1 a)). Aus den so gewonnenen Daten kann ein x-t-Pseudobild (Abbildung 5.1 b)) generiert werden. Um die natürlichen Fluktuationen der Membran über die Messdauer hinweg zu kompensieren, wird die Position der Membran bestimmt und anschließend begradigt (Abbildung 5.1 c) und d)). Die hierfür verwendeten Algorithmen sind in Abschnitt 5.5 erläutert. Die begradigte Membran wird daraufhin mit Hilfe einer Normalverteilung angepasst, um deren Breite zu bestimmen. Anschließend werden pro Zeile  $\pm 2,5\sigma$  Pixel (dieser Wert optimiert das Verhältnis zwischen eingesammeltem Signal und unnötigem Hintergrund [135]) aufsummiert, um den Intensitätsverlauf zu generieren (Abbildung 5.1 e)). Dieser kann genutzt werden, um die Autokorrelation zu berechnen (Abbildung 5.1 f)).

Dieses Prinzip kann einfach erweitert werden. Zunächst wurden zwei Linien durch die Membran gerastert, die um einen bekannten Abstand zueinander versetzt waren. Anschließend wurde die Laserlinie gewechselt (z.B. von grün auf rot) und dieselben beiden Linien wurden mit geänderter Anregung abgerastert. Dieser Algorithmus wurde dann über die gesamte Messzeit wiederholt. Die so gewonnenen

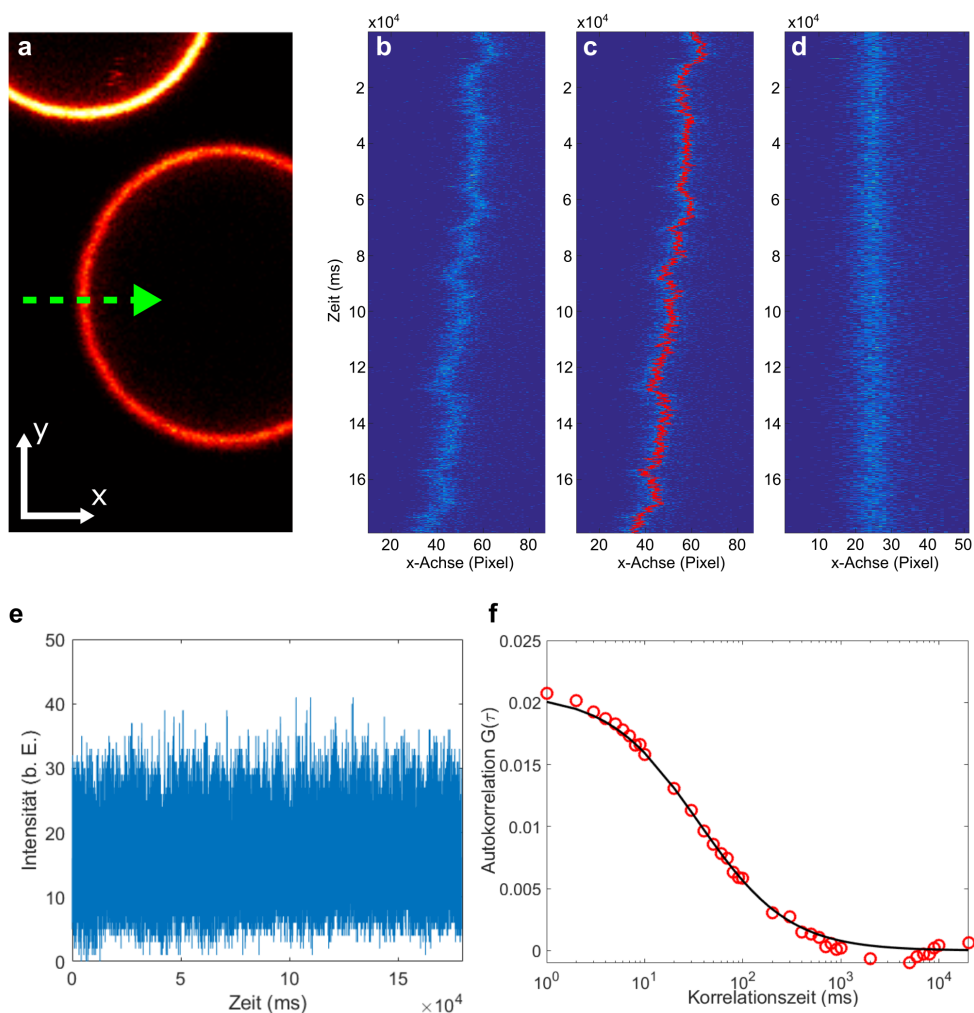


Abbildung 5.1: Grundprinzip der IsFCS. a) Konfokalbild eines *GUV* (*giant unilamellar vesicle*) aus 67% SM (Sphingomyelin, Sigma-Aldrich) und 33% Cholesterin (Sigma-Aldrich) der mit Hilfe von Atto647N-DOPE (Atto-Tec) eingefärbt wurde. b) Gemessenes x-t-Pseudobild. c) Pseudobild aus b) mit berechneter Membranposition in Rot. d) Begradigte Membran anhand der gefundenen Daten aus c). e) Berechneter Intensitätsverlauf durch Aufsummieren der Pixel der Membran in jeder Zeile. f) Berechnete Autokorrelationsfunktion aus dem Intensitätsverlauf in e). Die Daten wurden mit Hilfe der Modellfunktion für Diffusion in 2D (y-z-Ebene, siehe Gleichung 2.47) angepasst.

vier Intensitätsverläufe (grün1, grün2, rot1, rot2) können anschließend mit sich selbst oder einem der anderen Intensitätsverläufe korreliert werden. So erhält man insgesamt 16 verschiedene Korrelationskurven. Diese wurden anschließend mit Hilfe globaler Funktionsanpassung ausgewertet und es konnten neben Auto- und Zwei-Farb-Kreuzkorrelationen zur Bestimmung der einzelnen Konzentrationen sowie der Konzentration der ggf. gemeinsam diffundierenden Spezies auch Zwei-Fokus-Kreuzkorrelationen und Zwei-Farb-zwei-Fokus-Kreuzkorrelationen zur intrinsischen Kalibration der Größe der Konfokaltolumina berechnet werden.

#### **Präparation von *Giant Unilamellar Vesicles* (GUVs)**

Die Herstellung von GUVs ist ausführlich in der Literatur beschrieben [136] und wird im Folgenden kurz zusammengefasst.

1. Eine selbst hergestellte zylinderförmige und verschließbare Teflonkammer ist mit zwei parallelen Platindrähten so versehen, dass diese zum einen in der Kammer von Flüssigkeit umschlossen werden und andererseits außerhalb der Kammer an einen Funktionsgenerator angeschlossen werden können. Zu Beginn der Probenpräparation werden die Platindrähte zunächst mit Wasser, Ethanol und Chloroform gereinigt.
2. Die für das jeweilige Experiment gewünschten Lipide werden mit einer Konzentration von  $1 \text{ mg ml}^{-1}$  in Chloroform gelöst. Um eine passende Markierung mit Fluorophoren für FCS-Experimente zu erreichen, wird anschließend der gewünschte Fluorophor mit einem Anteil von  $0,005 \text{ mol } \%$  der Lipidmischung zugegeben. Diese fertigen Lipidmischungen können anschließend bei  $-20^\circ\text{C}$  gelagert werden. Dabei ist darauf zu achten, die Mischungen vor der Verwendung gut zu vortexen, um Lipide, die sich im Behälter abgelagert haben, wieder in Lösung zu bringen.
3. Anschließend werden  $3 \mu\text{l}$  der Lipidmischung mit Hilfe einer Spritze auf die Platindrähte gegeben. Die Drähte sollten anschließend für mindestens 2 h im Vakuum aufbewahrt werden, um sicherzustellen, dass das gesamte Lösungsmittel abgedampft ist.
4. Die Kammer mit den Platindrähten wird daraufhin mit einer  $100 \text{ mM}$  Saccharose-Lösung (Sigma-Aldrich), die auf  $60^\circ\text{C}$  vorgewärmt wurde, gefüllt.
5. Die verschlossene Teflonkammer wird anschließend in einem auf  $60^\circ\text{C}$  vorgeheizten Heizblock platziert und die Drähte werden von einem Funktionsgenerator (HM8150, Hameg, Mainhausen) für 90 min mit einer Wechselspannung ( $2 \text{ V}$  und  $10 \text{ Hz}$ ) versorgt, damit sich die Doppellipidmembranen bilden können.
6. Im Anschluss wird die Frequenz der Wechselspannung für mindestens 15 min auf  $2 \text{ Hz}$  reduziert, damit sich die gebildeten GUVs von den Platindrähten lösen.
7. Eine Probenkammer (Nunc Lab-Tek II Chamber Slide, ThermoFisher) wird für 30 min mit einer  $2 \text{ mg ml}^{-1}$  BSA-Lösung (Bovine Serum Albumin, Sigma-Aldrich) inkubiert, um die Oberfläche zu passivieren. Nach zweimaligem Spülen der Kammer mit deionisiertem Wasser wird diese anschließend mit einer  $100 \text{ mM}$  Glukose-Lösung (Sigma-Aldrich) gefüllt, die ebenfalls auf  $60^\circ\text{C}$  vorgeheizt wurde.

8. Abschließend können die fertigen GUVs aus der Teflonkammer vorsichtig in die Probenkammer gegeben werden. Da Saccharose eine größere molare Masse aufweist als Glukose, werden die GUVs nach einigen Minuten zu Boden sinken.

## 5.2 Axiales Linienrastern

Erlaubt die oben beschriebene Methode eine Vielzahl an wertvollen Informationen mit nur einer einzigen Messung zu extrahieren, so birgt sie doch ein wesentliches Problem. Um eine konstante Rastergeschwindigkeit in der Mitte des Beobachtungsfeldes, also im optimalen Fall an der Stelle, an der sich die Membran befindet, zu garantieren, kann eine Linienfrequenz von 1 kHz nicht überschritten werden. Da vier verschiedene Linien wiederholt gerastert werden, ist also die minimale Zeit, bei der eine Autokorrelation berechnet werden kann, gerade das Vierfache der Liniendauer und damit mit 4 ms eher groß. Dies kann sich je nach Zusammensetzung der Membran und Größe der diffundierenden Elemente bereits als zu langsam erweisen [137, 138, 68]. Anstatt den Strahl relativ langsam mit Hilfe des Strahlscanners durch die Membran zu rastern, wird im Folgenden die Möglichkeit vorgestellt, mit Hilfe einer TAG-Linse (von engl. *tunable acoustic gradient*) die Fokusebene des Strahls hinter dem Objektiv mit großer Geschwindigkeit zu verändern und so Membranen, die sich in der x-y-Ebene aufspannen, orthogonal zu rastern. Die Entwicklung der Methode des axialen Linienrasterns erfolgte in Zusammenarbeit mit Dr. Peng Gao.

### 5.2.1 Die 'tunable acoustic gradient index of refraction' (TAG)-Linse

Um das Konzept der TAG-Linse zu verstehen, soll zunächst kurz auf das zugrunde liegende Konzept von so genannten GRIN-Linsen (von engl. *gradient index*) eingegangen werden. Um einen Lichtstrahl mit Hilfe einer Linse zu fokussieren, verwendet man ein Material mit konstantem Brechungsindex, das in seiner Dicke so verändert wird, dass Licht im Mittelpunkt des Strahls einen größeren Phasenversatz erfährt als Licht weiter am Rand des Strahls. Der Wellenfront des Strahls wird also gerade das Negativ der Linse aufgeprägt. Da die Ausbreitungsrichtung des Lichts immer gerade senkrecht auf der Wellenfront steht, führt dies bei einer konvexen Linse zu einer Fokussierung des Strahls. Anstatt nun die Geometrie der Optik bei konstantem Brechungsindex zu verändern, kann alternativ auch bei einer einfachen Geometrie (also z.B. einem Quader) der Brechungsindex des Materials, z.B. durch Bestrahlung [139], so verändert werden, dass eine analoge Wellenfront wie beim Durchgang durch eine konvexe Linse entsteht. Diese Idee der so genannten 'gradient index'-Optik entstand bereits am Anfang des 20. Jahrhunderts [140] und hat auf Grund deutlich verbesserter Herstellungsverfahren, z.B. durch *direct laser writing* [141, 142], in den letzten Jahrzehnten an Praxisrelevanz gewonnen [143, 144]. Die TAG-Linse fokussiert Licht auch über einen veränderbaren Gradienten im Brechungsindex. Dieser Gradient ist jedoch nicht fix, sondern kann verändert werden. Diese Veränderung basiert darauf, dass in eine Flüssigkeit periodische Dichteschwankungen durch eine stehende Schallwelle induziert werden. Diese Dichteschwankungen führen direkt zu einer Änderung des Brechungsindexgradienten und ermöglichen so eine veränderliche Fokusslänge der TAG-Linse [145]. Platziert man die Linse also z.B. vor dem Strahlscanner des STED-Mikroskops aus Abschnitt 3.1.1, so kommt es zu einer periodischen Änderung der Fokalebene hinter dem Objektiv [146, 147]. Die TAG-Linse wird hierzu mit einer modellspezifischen Resonanzfrequenz von ca. 140 kHz betrieben. Mit Hilfe des Synchronisationssignals der TAG-Linse können detektierte Photonen anschlie-

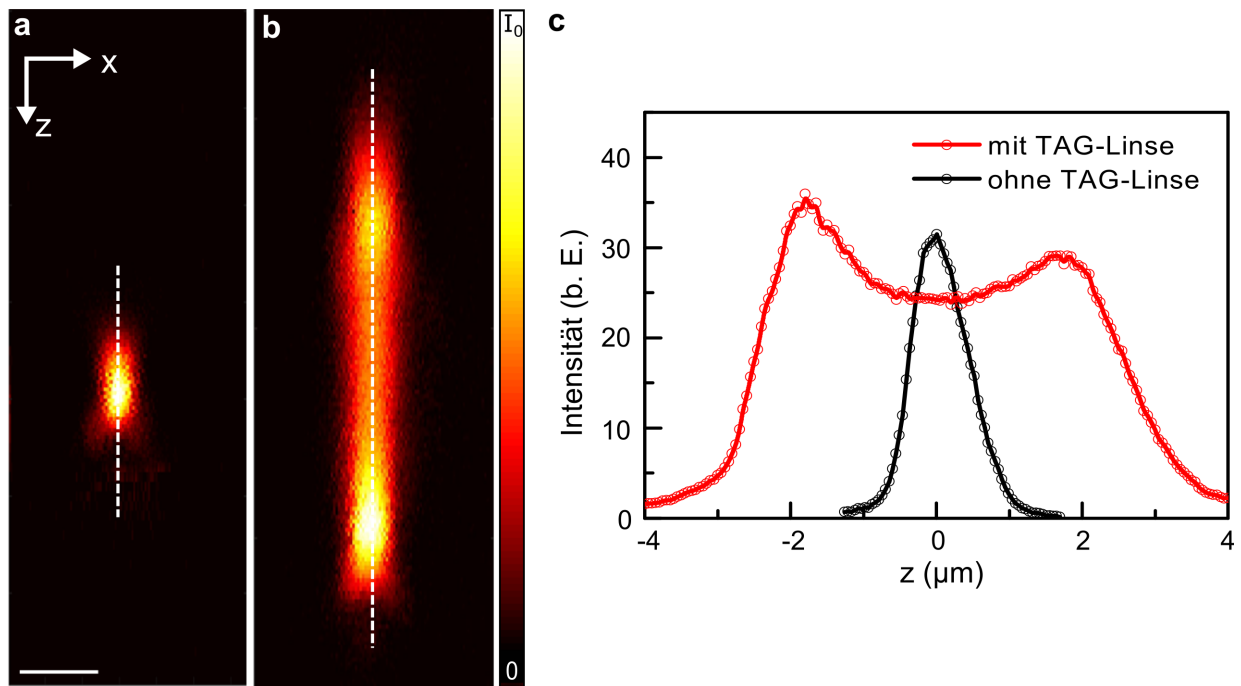


Abbildung 5.2: Gemessene PSF des 640nm Lasers mit Hilfe der Reflexion an Goldkugelchen. a) x-z-Schnitt der 3D PSF des Lasers ohne aktivierte TAG-Linse. b) x-z-Schnitt der 3D PSF des Lasers mit aktivierter TAG-Linse in resonanter Schwingung. c) Axiale Profile durch Integration von  $300\text{ nm} \times 300\text{ nm}$  im Zentrum des Fokus für die beiden Fälle aus a) und b). Die Goldkugelchen wurden in ein 3%-Agarose-Gel gemischt, um eine dreidimensionale Verteilung zu erreichen. Das untersuchte Goldkugelchen befand sich dabei  $30\text{ }\mu\text{m}$  in der Probe. Die Größe des untersuchten Volumens beträgt  $3\text{ }\mu\text{m} \times 3\text{ }\mu\text{m} \times 12\text{ }\mu\text{m}$ , der Skalierungsbalken hat eine Länge von  $1\text{ }\mu\text{m}$ .

ßend der jeweiligen Fokalebene hinter dem Objektiv zugeordnet werden. Die hierfür nötige Rückfaltung ist im Folgenden Abschnitt ausführlich beschrieben.

### 5.2.2 Rückfaltung

Um die Verschiebung der Fokalebene durch die TAG-Linse zu quantifizieren, wurde zunächst die resultierende und über die Periode der TAG-Linse gemittelte PSF des 640nm Laser untersucht. Hierfür wurde, analog zum Vorgehen in Abschnitt 3.1.5, die Reflexion an kleinen Goldkugelchen aufgenommen. Die Ergebnisse sind in Abbildung 5.2 dargestellt.

Aus dieser Messung können einige Schlussfolgerungen gezogen werden. Zum einen ist der Fokus mit Hilfe der TAG-Linse auf eine Länge von ca.  $6\text{ }\mu\text{m}$  verlängert. Zum anderen ist aus dem Intensitätsprofil offensichtlich, dass sich der Fokus nicht in konstanter Geschwindigkeit durch die Probe bewegt, sondern an den Umkehrpunkten wesentlich länger verharrt. Dies wird anhand der axialen Intensitätsverteilung, die eine zeitliche Mittelung der Fokusbewegung durch die Probe darstellt, deutlich. Um ein axiales Linienrastern zu ermöglichen und die Ankunftszeiten der Photonen exakt einer axialen Position des Fokus zuordnen zu können, ist eine Kalibration dieser nichtlinearen Bewegung nötig. Hierfür wurde das axiale Profil der Reflexion an einem Glasplättchen bei eingeschalteter TAG-Linse aufgenommen. Mit Hilfe des Synchronisationssignals der TAG-Linse und der TCSPC-Elektronik kann die Periode der TAG-Linse mit den Photonenankunftszeiten gleichzeitig aufgenommen werden. Dies erlaubt eine Auftragung der

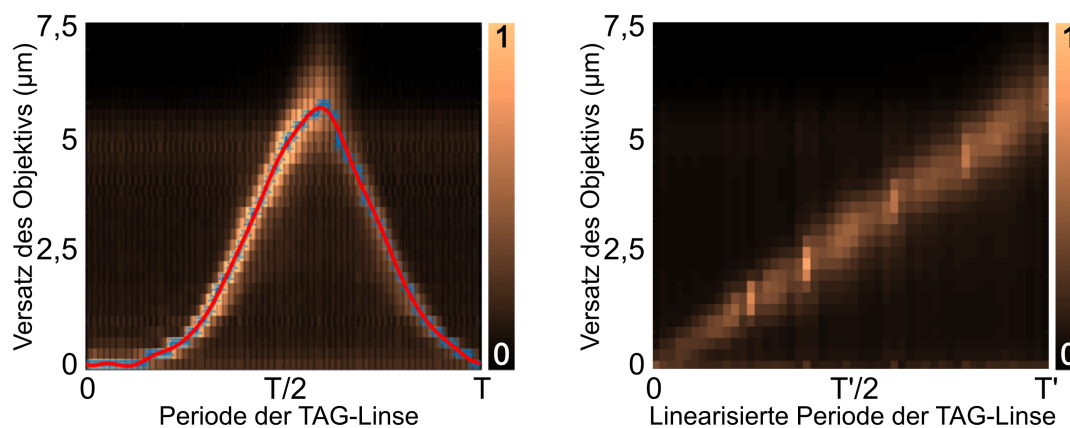


Abbildung 5.3: Kalibrierung der TAG-Linse mit Hilfe der Reflexion an einem Glasplättchen. Links: Position des Fokus über die Periode einer Schwingung der TAG-Linse. Die Intensitäten wurden dabei auf 1 normiert. Rechts: Position des Fokus über die berechnete linearisierte Periode der TAG-Linse.

detektierten Photonen über ihre Ankunftszeit am Detektor relativ zur Periode der TAG-Linse. Dies ist in Abbildung 5.3 dargestellt. Der gemessene Zusammenhang zwischen axialer Position des Fokus und Zeitpunkt relativ zur Periode der TAG-Linse wurde anschließend mit Hilfe einer Summe zweier Sinus-Funktionen angepasst. Daraus kann anschließend eine neue nichtlineare Zeitachse berechnet werden, auf der sich die axiale Bewegung des Fokus linear verhält. Es ist zu beachten, dass für die Aufnahme von Bildern eine Skalierung der Intensitäten vorgenommen werden muss, da sich der Laserfokus unterschiedlich lang in verschiedenen Bereichen des zu beobachtenden Volumens aufhält und somit verschiedene axiale Bereiche des Bildes unterschiedlich stark gewichtet werden.

Mit Hilfe der kalibrierten TAG-Linse kann der Strahl also axial durch eine Membran gerastert werden. Dies erlaubt, völlig analog zum Vorgehen beim Rastern in lateraler Richtung (siehe Abbildung 5.1), die Extraktion von zeitlichen Intensitätsverläufen, die anschließend für die Berechnung von Korrelationskurven verwendet werden können. Dies wird beispielhaft im nächsten Abschnitt gezeigt.

### 5.3 Pulsed interleaved Excitation (PIE) zur Verbesserung der IsFCS

Da das hier verwendete Mikroskop mit gepulsten Lasern und einem TCSPC-System zur präzisen Messung der Ankunftszeiten der Photonen ausgestattet ist, kann mit Hilfe einer zeitlich versetzten Anregung durch zwei Laserpulse (PIE, von engl. *pulse interleaved excitation*) eine Zwei-Farb-Kreuzkorrelation praktisch ohne spektrales Übersprechen gleichzeitig aufgenommen werden [148, 149]. Dies reduziert die nötige Anzahl gerasterter Linien auf zwei (bzw. ohne zwei-Fokus-FCS auf nur eine Linie) und verdoppelt so die Zeitauflösung. Die Anregungspulse werden dabei genau um ihre halbe Zyklusdauer zueinander verschoben. Dabei ist darauf zu achten, dass die Repetitionsfrequenz der Laser soweit reduziert werden muss, dass die Dauer zwischen den beiden Pulsen unterschiedlicher Laser deutlich größer ist als die Fluoreszenzlebensdauer der verwendeten Farbstoffe. Die detektierten Photonen können danach einfach dem jeweiligen Anregungslaser zugeordnet werden und ein spektrales Übersprechen wird vermieden. Im Folgenden werden ab sofort die Farbstoffe bzw. der Anregungslaser, der weiter in das rote



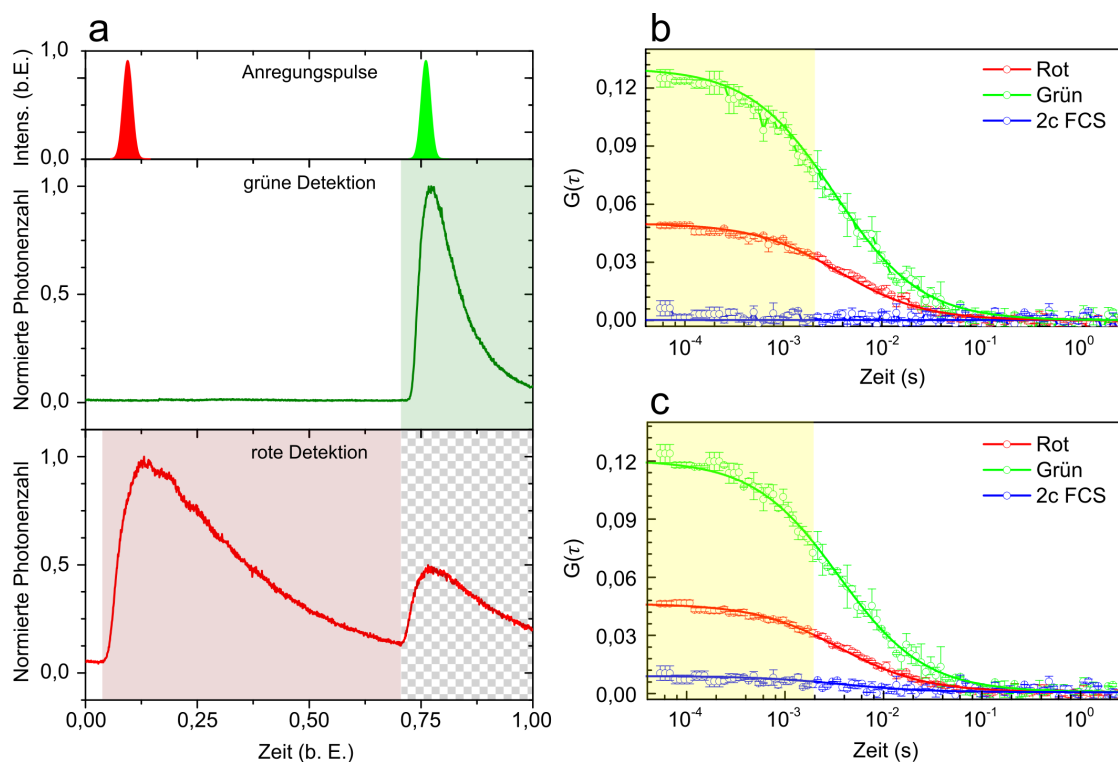


Abbildung 5.4: Prinzip der *pulsed interleaved excitation*. Als Probe wurden GUVs aus 90% DOPC (Avanti Polar Lipids, Alabaster AL, USA) und 10% DSPE (Mobitec, Göttingen), die mit 0,01 mol% Atto647N-DOPE (Atto-Tec) sowie 0,02 mol% DiI (Molecular Probes, Eugene OR, USA) fluorescent markiert wurden, verwendet. a) Zeitversetzte Anregungspulse des 640 nm und des 561 nm Lasers. Zeitaufgelöste Detektion in zwei Kanälen: grün bei  $(600 \pm 25)$  nm und rot bei  $(676 \pm 19)$  nm. Die jeweils detektierten Photonen können so klar dem jeweiligen Anregungslaser zugeordnet werden. Das spektrale Übersprechen in den roten Kanal nach grüner Anregung kann somit vom eigentlichen Signal im roten Kanal getrennt werden. b,c) Korrelationskurven, die durch axiales Linienrastern gemessen wurden. b) Die Autokorrelationen wurden aus den in a) farbig hinterlegten Bereichen berechnet. Ohne spektrales Übersprechen gibt es keine Kreuzkorrelation, da die Farbstoffe unabhängig voneinander durch die Membran diffundieren. c) Verwendet man das gesamte detektierte Signal ohne eine zeitliche Filterung je nach Anregungspuls so ergibt sich ein leicht anderes Bild. Die Autokorrelationen sind zwar praktisch identisch, durch das spektrale Übersprechen angeregter grüner Farbstoffe in den roten Kanal wird jedoch fälschlicherweise eine Kreuzkorrelation gemessen. Diese falsch positive Kreuzkorrelation suggeriert, dass eine Spezies existiert, die sowohl grün als auch rot markiert ist, z.B. durch Bindung der grünen und roten Farbstoffe aneinander. Dies ist jedoch nicht der Fall.

Spektrum verschoben ist, als *rot* und die kurzwelligeren Farbstoffe bzw. der dazugehörige Anregungslaser als *grün* bezeichnet.

In Abbildung 5.4 ist das Prinzip der PIE anhand einer lsFCS-Messung an GUVs gezeigt. Die Anregungspulse zweier verschiedener Laser sind zeitlich gegeneinander verschoben, so dass bei der Detektion der Photonen diese sich dem jeweiligen Anregungslaser zuordnen lassen. Dies erlaubt eine Einteilung in das gewünschte Signal (Detektion im roten Kanal nach roter Anregung und analog bei grün) und das unerwünschte Signal, das z.B. bei der Detektion im roten Kanal nach der Anregung im grünen Kanal zum einen durch Anregung der roten Fluorophore durch den grünen Laser und zum anderen durch Emission der grünen Fluorophore im roten Spektrum generiert wird. Da die beiden Fluorophore getrennt von-

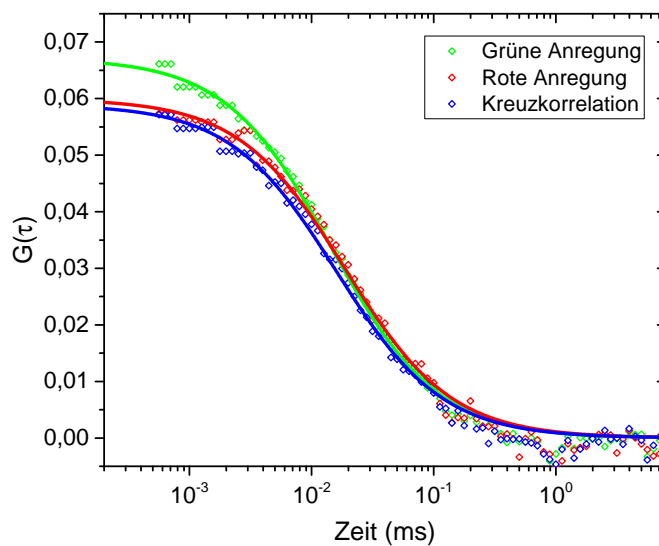


Abbildung 5.5: Axiale IsFCS Messung an GUVs (90% DOPC (Avanti Polar Lipids) und 10% DSPE (Mobitec) mit 0,01 mol% Atto647N-DOPE (Atto-Tec)). Die Anregung erfolgte bei 640 nm sowie 561 nm, die Detektion bei  $(676 \pm 19)$  nm. Aufgetragen sind die Autokorrelation nach roter Anregung, grüner Anregung sowie die Kreuzkorrelation der beiden gemessenen Intensitätsverläufe. Da dieselben Farbstoffmoleküle mit beiden Lasern angeregt wurden, wird eine vollständige Kreuzkorrelation, d.h., jeder Farbstoff trägt zur Kreuzkorrelation bei, erwartet. Die Kreuzkorrelationsamplitude sollte dann genau zwischen den beiden Autokorrelationsamplituden liegen. Abweichungen hiervon weisen darauf hin, dass in realen Systemen kein perfekter Überlapp zwischen den beiden Konfokalvolumina vorliegt.

einander diffundieren, ist keine Kreuzkorrelation der zeitlich gefilterten Signale messbar (siehe Abbildung 5.4 b)). Verwendet man jedoch das gesamte detektierte Signal ohne zeitliche Filterung, so entsteht fälschlicherweise eine Kreuzkorrelation durch spektrales Übersprechen (Abbildung 5.4 c)). Möchte man Bindungsaffinitäten z.B. zwischen unterschiedlich markierten Rezeptoren und Liganden messen, muss dies unbedingt verhindert werden. Der gelb hinterlegte Bereich in Abbildung 5.4 b) und c) zeigt die Messpunkte, die aufgrund der verbesserten Zeitauflösung nur bei axialem, nicht aber bei lateralem Linienerastern zur Verfügung stehen.

Ein weiterer großer Vorteil der Verwendung von PIE in Kombination mit IsFCS ist die Möglichkeit, den Überlapp zwischen den beiden Foki unterschiedlicher Anregungslaser zu vermessen. Hierzu kann neben dem eigentlich gewünschten Fluoreszenzsignal (d.h., grüner Detektionskanal nach grüner Anregung und roter Detektionskanal nach roter Anregung) auch genau der Anteil verwendet werden, der dem spektralen Übersprechen entspricht (d.h., roter Detektionskanal nach grüner Anregung). Das Ergebnis einer solchen Messung ist in Abbildung 5.5 gezeigt.

Da die Intensitätsverläufe von denselben Farbstoffen hervorgerufen werden, sollte eine vollständige Kreuzkorrelation vorliegen. Durch die unterschiedlichen Wellenlängen der Anregungslaser sind die Konfokalvolumina jedoch nicht gleich groß und damit auch die Amplituden unterschiedlich. Für den Fall perfekter Justage sollte die Kreuzkorrelationsamplitude genau in der Mitte zwischen den beiden Autokorrelationsamplituden liegen [79]. In der Praxis ist die Kreuzkorrelationsamplitude jedoch auf Grund des

nicht perfekten Überlapps der beiden Konfokalvolumina reduziert. Das gemessene Verhältnis zwischen der Kreuzkorrelation sowie der Amplitude der Autokorrelation des grünen Kanals  $\nu$  (hier:  $\nu = 0,89$ ) ist ein wichtiger Parameter zur Korrektur der gemessenen Dissoziationskonstanten. Für das Verhältnis der Amplituden der Kreuzkorrelation und der Autokorrelation des grünen Kanals gilt:

$$\frac{G_x(0)}{G_G(0)} = \frac{A_G}{A_x} \cdot \frac{[RG]}{([RG] + [R])}. \quad (5.1)$$

Im hier vorliegenden Fall ist die Konzentration der ungebundenen roten Fluorophore  $[R]$  gleich Null, da alle Farbstoffe in beiden Farbkanälen messbar sind. Somit gilt für den vorher gemessenen Faktor  $\nu$ :

$$\nu = \left. \frac{G_x(0)}{G_G(0)} \right|_{[R]=[G]=0} = \frac{A_G}{A_x} \quad (5.2)$$

und damit für die Berechnung der Dissoziationskonstanten nach Gleichung 2.56 unter der Annahme, dass die Liganden grün markiert sind:

$$K_d = \left( \frac{G_L(0)}{G_x(0)} \cdot \nu - 1 \right) \cdot [L]. \quad (5.3)$$

Mit Hilfe der PIE kann also einfach der Korrekturfaktor  $\nu$  berechnet werden, der das Amplitudenverhältnis der Korrelationskurven direkt mit dem gewünschten Konzentrationsverhältnis verknüpft und somit eine korrekte Bestimmung der  $K_d$  erlaubt.

## 5.4 Bleichkorrektur und Berechnung der Dissoziationskonstante

Bei der Messung von Diffusion in Membranen tritt, im Gegensatz zur FCS in 3D, oftmals Photobleichen als Problem zutage. Zum einen ist dies in der deutlich langsameren Diffusion und der daraus folgenden langen Aufenthaltszeit der Fluorophore im Fokus begründet. Trotz der Verwendung von IsFCS und der daraus resultierenden deutlichen Verminderung von Bestrahlung auf der Membran kann das Ausbleichen einiger Fluorophore nicht verhindert werden. Zum anderen sind auf Grund der Verteilung auf eine zweidimensionale Membran, im Gegensatz zur Verteilung in einem Volumen, wesentlich weniger Fluorophore vorhanden. Das Reservoir an frischen, ungebleichten Fluorophoren ist also kleiner, und die Gesamthelligkeit der untersuchten Struktur wird deutlich schneller abnehmen. Im Folgenden sollen die Einflüsse des Photobleichens auf die Korrelationskurven diskutiert werden. Für die Autokorrelation eines Intensitätsverlaufs gilt im Allgemeinen:

$$G(\tau) = \frac{\langle I(t) \cdot I(t + \tau) \rangle}{\langle I(t) \rangle^2} - 1. \quad (5.4)$$

Teilt man die Intensitätsverläufe in kleinere Teilabschnitte, so gilt

$$I_i(t) = I(t) \Big|_{t=t_i \rightarrow t_{i+1}}, \quad (5.5)$$

und damit für die Autokorrelation

$$G(\tau) = \frac{1}{N} \sum_{i=1}^N G_i(\tau) = \frac{1}{N} \sum_{i=1}^N \left( \frac{\langle I_i(t) \cdot I_i(t + \tau) \rangle}{\langle I_i(t) \rangle^2} - 1 \right). \quad (5.6)$$

Die gesamte Autokorrelation kann also als Mittelwert der einzelnen Korrelationen berechnet werden, so lange die Teilabschnitte des Intensitätsverlaufs groß genug gegenüber der Zeit sind, zu der die Korrelationskurve auf 0 abgefallen ist. Andernfalls würde eine mangelhafte Statistik bei hohen Korrelationszeiten die gemessenen Kurven zu stark verzerren. Um Artefakte in der Korrelation durch Photobleichen zu vermeiden, muss dieses in den Intensitätsverläufen modelliert und anschließend korrigiert werden. Typischerweise verwendet man hierfür eine einfach Exponentialfunktion oder eine Summe aus zwei Exponentialfunktionen, wenn der Austausch von gebleichten Fluorophoren durch frische Fluorophore aus einem Reservoir zusätzlich modelliert werden soll [150]. Für den korrigierten Intensitätsverlauf gilt

$$I'(t) = I(t) \cdot \gamma(t)^{-1}, \quad (5.7)$$

mit dem gemessenen Intensitätsverlauf  $I(t)$  und der angepassten Modellfunktion für das Photobleichen  $\gamma(t)$ . Die Modellfunktion ist dabei normiert ( $\gamma(0) = 1$ ), und es gilt für das zeitliche Mittel des korrigierten Intensitätsverlaufs  $\langle I'(t) \rangle = I(0)$ . Die Korrelation unkorrigierter Intensitätsverläufe würde bei sehr hohen Korrelationszeiten stark verzerrt werden, da dort die starke Antikorrelation des Photobleichens sichtbar werden würde. Im Folgenden soll die für die Bestimmung von Bindungsaffinitäten ausschlaggebende Amplitude der Korrelationskurve für  $\tau = 0$ , die direkt mit der Konzentration der einzelnen diffundierenden Entitäten verknüpft ist, unter Einfluss der Bleichkorrektur diskutiert werden.

Zu Beginn der Messung sind noch keine Fluorophore gebleicht, und es gilt

$$G_1^*(0) = G_1'(0) = G_1(0), \quad (5.8)$$

wobei  $G^*(\tau)$  die Korrelationskurve des idealen Intensitätsverlaufs (d.h. ohne Photobleichen) und  $G'(\tau)$  die Korrelationskurve, die aus dem korrigierten Intensitätsverlauf berechnet wird, beschreibt. Im Laufe des Experiments werden nach und nach Fluorophore bleichen, und die gemessene Konzentration wird sinken. Die tatsächliche Konzentration der Teilchen, die für die weitere Berechnung benötigt wird, wird sich jedoch nicht verändern. Betrachtet man die Korrelationsfunktion des korrigierten Intensitätsverlaufs, so gilt:

$$G'(0) = \frac{1}{N} \sum_{i=1}^N \frac{\text{Var}(I_i'(t))}{\langle I_i'(t) \rangle^2} = \frac{1}{N} \sum_{i=1}^N \frac{\text{Var}(I_i(t)\gamma^{-1})}{\langle I_i(t)\gamma^{-1} \rangle^2} = \frac{1}{N} \sum_{i=1}^N \frac{\gamma^{-2} \text{Var}(I_i(t))}{\gamma^{-2} \langle I_i(t) \rangle^2} = G(0). \quad (5.9)$$

$\text{Var}(X)$  beschreibt dabei die Varianz der Variablen  $X$ . Diese Umformung ist gültig, falls die Korrekturfunktion  $\gamma(t)$  in den einzelnen Teilbereichen des Intensitätsverlaufs als konstant angesehen werden kann. Da das Photobleichen typischerweise auf wesentlich größeren Zeitskalen stattfindet als die Diffusion der Fluorophore, ist diese Bedingung unter normalen experimentellen Gegebenheiten erfüllt. Wie Gleichung 5.9 zeigt, ist die Korrektur des Intensitätsverlaufs hin zu einem konstanten Mittelwert also nicht ausreichend, um auch die gemessenen Teilchenkonzentrationen zu korrigieren.

Geht man davon aus, dass die molekulare Helligkeit der Fluorophore konstant bleibt, so besteht über den Verlauf der Messung ein linearer Zusammenhang zwischen mittlerer detektierter Intensität und mittlerer Teilchenzahl im Konfokalvolumen:

$$\langle N_i \rangle \propto \frac{1}{G_i(0)} \propto \alpha \cdot \langle I_i(t) \rangle . \quad (5.10)$$

Setzt man die Amplitude der Korrelationskurve für den idealen Fall ohne Photobleichen in das Verhältnis mit der Amplitude der Korrelationskurve der gemessenen Daten, so ergibt sich:

$$\frac{G^*(0)}{G(0)} = \sum_{i=1}^N \frac{\alpha \langle I_i(t) \rangle}{\alpha \langle I_i^*(t) \rangle} = \sum_{i=1}^N \frac{\langle I_i(t) \rangle}{\langle I_i(t) \gamma^{-1} \rangle} = \sum_{i=1}^N \gamma = \langle \gamma(t) \rangle . \quad (5.11)$$

Die gemessene Amplitude muss also noch mit dem linearen Korrekturfaktor  $\langle \gamma(t) \rangle$  multipliziert werden, um die tatsächliche Amplitude der Korrelationskurve zu erhalten:

$$G^*(0) = \langle \gamma(t) \rangle \cdot G(0) . \quad (5.12)$$

Anders verhält es sich bei der Berechnung der Kreuzkorrelation. Die Amplitude der Kreuzkorrelation von zwei Intensitätsverläufen  $I_r(t)$  und  $I_g(t)$  ist gegeben als:

$$G_x(0) = \frac{\langle I_r(t) \cdot I_g(t) \rangle}{\langle I_r(t) \rangle \langle I_g(t) \rangle} - 1 = \frac{N_{\text{gebunden}}}{N_r N_g} . \quad (5.13)$$

Zunächst nimmt man an, dass die Wahrscheinlichkeit, dass ein Fluorophor gebleicht wird, nicht davon abhängt, ob er einzeln oder im Komplex vorliegt. Bleicht nun ein gewisser Anteil der Fluorophore, so trifft dies gebundene und ungebundene Fluorophore verhältnismäßig gleich. Der Quotient  $\frac{N_{\text{gebunden}}}{N_r N_g}$  bleibt also konstant und die Amplitude der Kreuzkorrelation wird nicht beeinflusst.

Um die Dissoziationskonstante einer Gleichgewichtsreaktion mit Hilfe der IsFCS zu bestimmen, wird der Quotient aus Autokorrelationsamplitude des Liganden und der Zwei-Farb-Kreuzkorrelationsamplitude verwendet. Da die Autokorrelationsamplitude im Gegensatz zur Kreuzkorrelationsamplitude mit Hilfe von Gleichung 5.12 korrigiert werden muss, wirkt sich eine unzureichende Korrektur direkt auf die berechnete Dissoziationskonstante aus und muss unbedingt vermieden werden.

Die oben beschriebenen Bleichkorrekturen sind anwendbar, so lange das Bleichen der Farbstoffe auf deutlich größeren Zeitskalen geschieht als die Diffusion der Fluorophore. Ist dies nicht mehr der Fall, können Diffusions- und Bleicheffekte in den Korrelationskurven nicht mehr unterschieden werden. Eine Korrektur ist dann nicht mehr ohne Weiteres möglich.

## 5.5 Software zur Auswertung der IsFCS

Die Einführung von PIE und die Notwendigkeit, das gemessene Intensitätssignal mit Hilfe der Synchronisationssignale des Strahlscanners (für das laterale Rastern) bzw. der TAG-Linse (für das axiale Rastern) in ein Pseudobild zu falten, erfordern die Verwendung der TCSPC-Detektion. Hier werden alle Ankunftszeiten detektierter Photonen sowie jeglicher Synchronisationspulse sowohl mit Hilfe einer sehr

genauen *microtime* (hier wird das Zeitfenster zwischen zwei Laserpulsen, also typischerweise 25 ns, mit einer Auflösung von 12bit diskretisiert und erlaubt so eine Messgenauigkeit von weniger als 10ps) und einer *macrotime* (dies beschreibt, nach dem wievielten Laserpuls seit Beginn der Messung das Photon angekommen ist, also den Zeitpunkt der Detektion mit einer Auflösung von 25 ns) aufgezeichnet. Die hierbei entstehenden Datenmengen bei bis zu 100 Millionen Photonen sind nicht zu vernachlässigen und erfordern effiziente Algorithmen zur weiteren Datenverarbeitung.

Die von der TCSPC-Elektronik generierten Daten müssen dafür zunächst in MATLAB, das zur weiteren Datenverarbeitung verwendet wird, eingelesen werden. Da die Software des Herstellers der TCSPC-Elektronik lediglich einen Export von ASCII-Dateien erlaubt und das Generieren und Einlesen dieser Teils mehr als 100MB großen Dateien viel Zeit in Anspruch nimmt, wurde zunächst ein Skript erstellt, das das Einlesen der Daten direkt aus den von der Software erzeugten Dateien erlaubt. In diesen Dateien sind die Informationen von jedem detektierten Ereignis in Datenblöcken von 4 Byte abgelegt, wobei jedem Bit eine eigene spezielle Bedeutung zugemessen wird. Der hierfür verwendete Programmcode ist im Anhang (siehe A.1) dargestellt.

Anschließend wird die *microtime* der Photonen in einem Histogramm aufgetragen. Diese Fluoreszenzzerfallskurve wird anschließend verwendet, um die zur PIE passenden Zeitfenster der Detektion zu wählen und die Photonen anschließend anhand dieser Zeitfenster in zwei getrennte Intensitätsverläufe aufzuteilen (siehe A.2).

Ein sehr wichtiger Teil der Datenauswertung ist die korrekte Faltung der zuvor erzeugten Intensitätsverläufe in Pseudo-Bilder. Hierfür muss jedes Photon dem entsprechenden Pixel zugewiesen werden, an dem es detektiert wurde. Des Weiteren müssen, um ein Bild zu erhalten, alle Photonen eines Pixels aufaddiert werden. Zunächst werden hierfür die Ankunftszeiten der Synchronisationspulse in einen Vektor geschrieben. Anhand dieses Vektors werden anschließend alle Photonen in einer Matrix angeordnet, so dass jeder Eintrag der Matrix der *macrotime* eines Photons entspricht und jede Zeile der Matrix genau einer gerasterten Linie. Anschließend können die sehr effizienten MATLAB-eigenen Algorithmen zur Erzeugung von Histogrammen verwendet werden, um die so gefundenen Photonen einer gerasterten Linie den jeweiligen Pixeln zuzuordnen. Der hierfür nötige Programmcode ist ebenfalls im Anhang dargestellt (siehe A.3).

Die so erzeugten Pseudo-Bilder werden abschließend so abgespeichert, dass die bereits zuvor verwendete und beschriebene Software [134] zum Auffinden der Membran und zur Berechnung der Korrelationen benutzt werden konnte. Hierbei wird mit Hilfe eines gleitenden Mittelwerts das Maximum des Pseudobildes in einem gewissen Bereich und damit die Position der Membran bestimmt. Anschließend wird die so gefundene Membranposition mit Hilfe eines Polynoms angepasst und geglättet. Dies verhindert eine Fehlbestimmung der Membranposition durch fluoreszente Cluster, die in den Bereich der gerasterten Linie schwimmen. Die Membran kann mit Hilfe der bestimmten Position begradigt werden und das Anpassen einer Normalverteilung erlaubt direkt, die Breite der Membran zu bestimmen. Ein Aufsummieren der einzelnen Linien über diese Breite um den Mittelpunkt der Membran ergibt anschließend den Intensitäts-Zeit-Verlauf, der zur Berechnung der Korrelationen verwendet werden kann. Dieser Intensitäts-Zeit-Verlauf kann mit Hilfe einer Exponentialfunktion angepasst werden, um, wie zuvor beschrieben, eine entsprechende Bleichkorrektur durchzuführen. Anschließend wird ein 'multi  $\tau$ '-Algorithmus zur Berechnung der Korrelationen verwendet [151, 152]. Dabei werden die Intensitäts-

Zeit-Verläufe in unterschiedliche lange Zeitabschnitte gruppiert (gebinnt) und anschließend korreliert. Dies verringert den Fehler der einzelnen Korrelationspunkte durch eine erhöhte Statistik.

Die so berechneten Korrelationsdaten können anschließend in Origin (OriginLab Corporation, Northampton MA, USA) eingelesen und mit Hilfe der jeweils passenden Modellfunktionen einzeln oder global angepasst werden.





## 6 Experimentelle Anwendung der Fluoreszenzkorrelationspektroskopie

Neben der Aufnahme von hochaufgelösten Bildern in zwei oder drei Dimensionen erlaubt die Fluoreszenzfluktuationsspektroskopie vor allem unerreichte quantitative Einblicke in biophysikalische Prozesse. Im folgenden Kapitel werden die zuvor beschriebenen Methoden zur Untersuchung von Dynamiken in Membranen verglichen und anschließend auf ein biologisches System aus dem aktuellen Forschungsgeschehen angewendet. Im zweiten Abschnitt sind die Ergebnisse zur Kombination von STED- und STEDD-Mikroskopie mit der FCS dargestellt.

### 6.1 Axiales Linienrastern zur Untersuchung biophysikalischer Prozesse

In diesem Abschnitt wird die neue Methode des axialen Linienrasterns mit der bisher bekannten Methode des lateralen Linienrasterns verglichen. Anschließend wird gezeigt, wie diese Methode für die Untersuchung von Bindungsaffinitäten zwischen Rezeptoren und Liganden in lebenden Zellen angewendet werden kann. Die gefundenen Ergebnisse werden dann mit Hilfe altbewährter Untersuchungsmethoden verifiziert.

#### 6.1.1 Die Vorteile axialer gegenüber lateraler IsFCS

Der Vorgang des lateralen und axialen Linienrasterns ist beispielhaft in Abbildung 6.1 dargestellt. Neben der deutlich verbesserten Zeitauflösung, die nicht länger durch den mechanischen Strahlscanner (d.h., durch die Trägheit der Scanspiegel), sondern durch die Resonanzfrequenz der TAG-Linse begrenzt ist, bietet das axiale Linienrastern noch weitere Vorteile gegenüber dem lateralen Linienrastern. Diese liegen alle in der Tatsache begründet, dass die Membran das Konfokalkvolumen jetzt in der x-y-Ebene schneidet und der resultierende Querschnitt somit kreisförmig ist.

Das laterale Linienrastern, das ein stark elliptisches Beobachtungsfeld (das Aspektverhältnis ist hier typischerweise zwischen drei und vier) aufweist, erfordert einen gewissen Spagat zwischen hohen Detektionsraten und niedrigem Photobleichen. Diffundieren Fluorophore eher entlang der kurzen Halbachse des Beobachtungsfeldes, so sind sie nur kurze Zeit im Beobachtungsfeld und es müssen in dieser Zeit ausreichend Photonen detektiert werden, um eine Korrelation berechnen zu können. Die Laserintensität muss also vergleichsweise hoch sein. Diffundieren die Fluorophore jedoch eher entlang der langen Halbachse, so halten sie sich verhältnismäßig lang im Beobachtungsfeld auf. Hier muss die Laserintensität also so gewählt werden, dass auch in der länger erforderlichen Messzeit wenig Photobleichen auftritt. Durch die Verwendung des axialen Linienrasterns und dem daraus resultierenden symmetrischen Beobachtungsfeld ist dieses Problem nicht vorhanden, und die experimentellen Parameter können für die eher kürzeren Diffusionszeiten optimiert werden. Neben der verkürzten Diffusionszeit ist auch die Amplitude

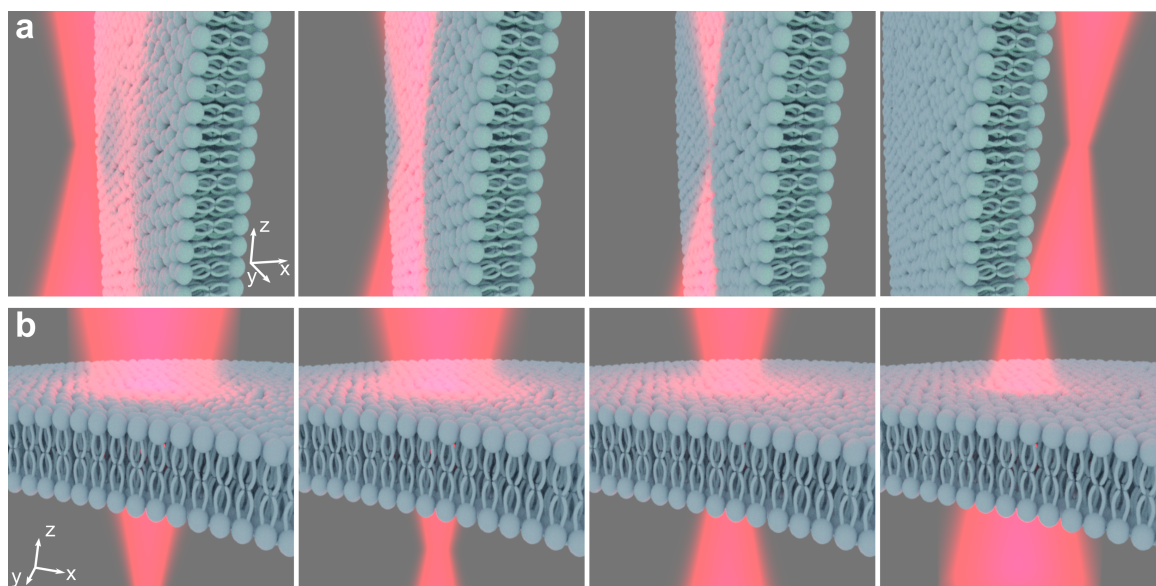


Abbildung 6.1: Beispielhafte Darstellung der beiden Möglichkeiten der IsFCS. a) Der Strahl wird mit Hilfe eines Strahlscanners lateral durch eine Doppellipidmembran bewegt, die sich in der  $y$ - $z$ -Ebene aufspannt. Der resultierende Querschnitt zwischen Membran und Strahl ist eine Ellipse. b) Der Strahl wird mit Hilfe der TAG-Linse senkrecht durch eine Membran bewegt, die sich in der  $x$ - $y$ -Ebene aufspannt. Der Querschnitt des Strahls ist hier gerade das laterale Profil der PSF und somit kreisförmig.

der axialen im Vergleich zur lateralen IsFCS erhöht. Dies folgt direkt aus dem verkleinerten Beobachtungsfeld. Beide Effekte, die verkürzte Diffusionszeit und die erhöhte Amplitude, sind gut in Abbildung 6.2 zu erkennen. Hierbei wurde derselbe GUV, der mit Hilfe des zuvor beschriebenen Protokolls aus 50% SM und 50% Cholesterol zusammengesetzt ist und mit ATTO647N-DPPE (Atto-Tec) eingefärbt wurde, einmal mit lateraler und einmal mit axialer IsFCS untersucht.

Gerade bei der *in vivo* Bestimmung von Bindungsaffinitäten (siehe Abschnitt 6.1.2) wird eine große Messstatistik benötigt, um eine exakte Quantifizierung zu ermöglichen. Dies liegt zum einen am komplexen Messverfahren und zum anderen an der Heterogenität der lebenden Proben. Sollen dann verschiedene Kombinationen von Rezeptoren, Liganden, fluoreszenten Markern und Zelltypen gemessen werden, ist die benötigte Messzeit für eine zuverlässige Korrelationsmessung nicht zu vernachlässigen. Auf Grund der Tatsache, dass bei der axialen IsFCS die Diffusion im Mittel weniger Zeit in Anspruch nimmt, ist auch zu erwarten, dass eine Bestimmung der Konzentrationen und Diffusionseigenschaften weniger Zeit in Anspruch nimmt als bei der lateralen IsFCS.

Des Weiteren bedeutet die erhöhte Amplitude der FCS-Kurven zugleich eine größere relative Fluktuation der Signale und hat damit direkt ein besseres Signal-zu-Rausch-Verhältnis zur Folge. Auch die Anpassung mit der Modellfunktion gestaltet sich in der axialen IsFCS einfacher, da im Vergleich zur lateralen IsFCS nur eine Diffusionskomponente auftritt und somit ein Anpassungsparameter weniger vorliegt.

Um zu zeigen, dass für die Aufnahme einer FCS-Kurve guter Qualität nur ein Bruchteil der Messzeit nötig ist, wenn man statt lateralem axiales Linienrastern verwendet, wurden im Folgenden beide Methoden an einer biologischen Probe verglichen. Hierfür wurden stabil mit LRP6-mCherry transfizierte H1703-Zellen verwendet, die durch Dr. Janine Wesslowski zur Verfügung gestellt wurden. Diese konnten nach der Aussaat auf entsprechende Objektträger anschließend bei 37 °C auf dem Mikroskop untersucht

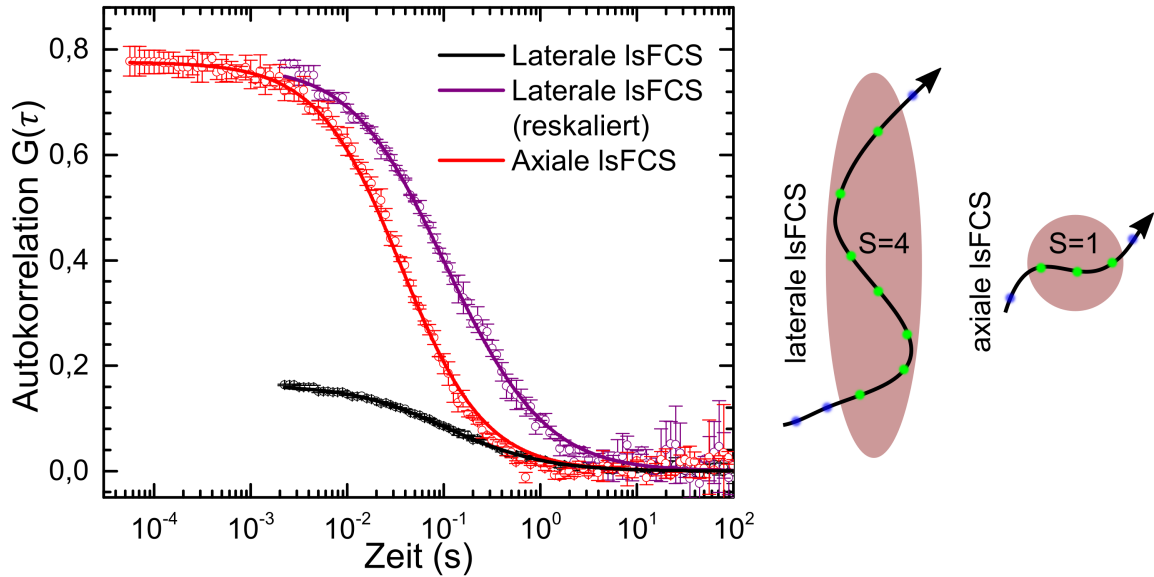


Abbildung 6.2: Ein aus 50 % SM und 50 % Cholesterol zusammengesetzter und mit ATTO647N-DPPE (Atto-Tec) eingefärbter GUV wurde mit Hilfe der beiden IsFCS-Methoden untersucht. a) Die resultierende FCS-Kurve der lateralen IsFCS zeigt eine deutlich langsamere Diffusion und eine verringerte Amplitude (d.h. größere Zahl an Fluorophoren, die sich im Mittel im Konfokolvolumen befinden) als die FCS-Kurve, die mit der axialen IsFCS aufgenommen wurde. Zum besseren Vergleich der Diffusionszeiten ist die FCS-Kurve, die mit Hilfe der lateralen IsFCS entstanden ist, zusätzlich auf die Amplitude der axialen IsFCS Kurve reskaliert eingezeichnet. b) Formen der beiden Beobachtungsfelder, durch die beispielhaft ein Fluorophor diffundiert. Die Messungen dauerten 200 s für die axiale und 300 s für die laterale IsFCS. Für die Messung wurde der 640 nm Laser mit einer Leistung in der Probe von  $5 \mu\text{W}$  verwendet. Für die laterale IsFCS rasterte der Strahlscanner wiederholt eine Linie der Länge  $10 \mu\text{m}$  mit einer Frequenz von 500 Hz.

werden. Für die Fehlerbetrachtung des lateralen Linienrasterns wurden die Diffusionseigenschaften von hLRP6-mCherry in 50 verschiedenen Zellen mit lateralem IsFCS gemessen. Aus den Messungen, die jeweils 400 s andauerten, konnten insgesamt 40 Intensitätsverläufe berechnet werden. Die restlichen zehn Messungen waren auf Grund von zu starker Bewegung der Zellen oder der Messung starker Fluoreszenzartefakte nicht brauchbar. Die Intensitätsverläufe wurden daraufhin am Ende entsprechend gekürzt, um die zu untersuchende Messzeit zu simulieren. Anschließend wurden für die verschiedenen Messzeiten jeweils 40 Korrelationskurven berechnet, mit Hilfe der Modellfunktion angepasst und den so gefundenen Parametern normiert. Im Anschluss daran wurde der Mittelwert aller 40 normierten Kurven gebildet, um daraufhin die Abweichung jeder einzelnen Kurve von der gemittelten Kurve (an den jeweiligen Punkten, an denen die Korrelation berechnet wurde) zu ermitteln:

$$\sigma_i = \sqrt{\frac{1}{t} \sum_t (FCS_i(t) - FCS_{\text{avg}}(t))^2}. \quad (6.1)$$

Zusätzlich erfolgten 10 Messungen über jeweils 400 s mit Hilfe der axialen IsFCS an derselben Probe. Auch von diesen so gewonnenen Intensitätsverläufen wurden jeweils bestimmte Bereiche ab Beginn der Verläufe ausgewählt, um die jeweils verkürzten Messzeiten zu simulieren. Die Berechnung der relativen Fehler der einzelnen Korrelationskurven erfolgte analog zum Vorgehen bei der lateralen IsFCS.

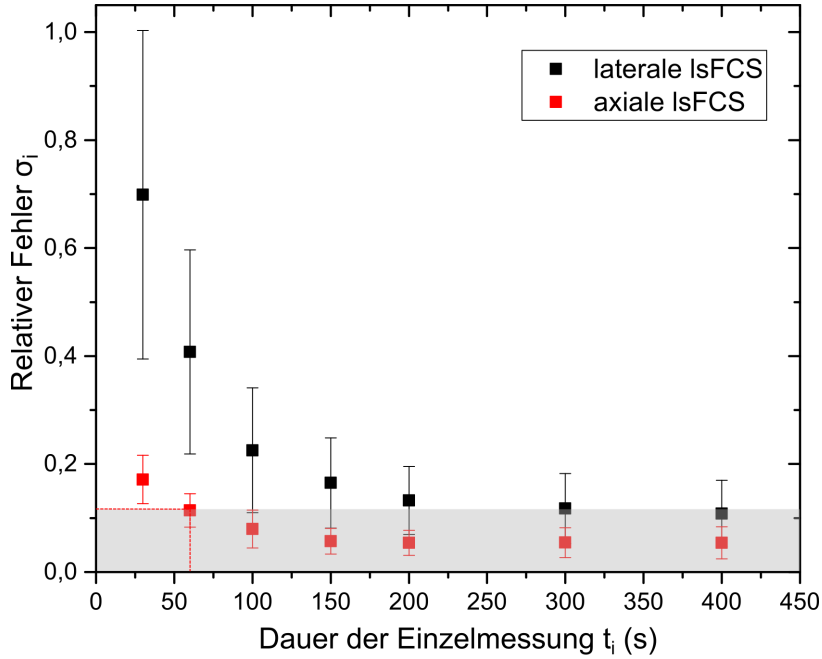


Abbildung 6.3: Mittelwert und Standardabweichung der relativen Abweichung einzelner FCS-Kurven vom Mittelwert aller FCS-Kurven. Die Messungen erfolgten an mit hLRP6-mCherry stabil transfizierten H1703 Zellen. Die Anregung erfolgte bei 561 nm mit 6  $\mu$ W, die Detektion im Bereich (600  $\pm$  19) nm. Der grau schraffierte Bereich zeigt den Bereich, in dem der mittlere relative Fehler der Messkurven geringer ist als bei einer axialen IsFCS Messung über 60 s. Um im Mittel in diesen Bereich zu gelangen, muss bei der lateralen IsFCS mindestens 300 s gemessen werden.

Die so gefundene Abweichung jeder einzelnen Kurve vom Mittelwert aller Kurven wurde anschließend abermals gemittelt und, zusammen mit der Standardabweichung vom Mittelwert, im Diagramm in Abbildung 6.3 in Abhängigkeit der Messzeit aufgetragen. Aus diesen Messdaten ist ersichtlich, dass die nötige Messzeit um einen gewissen relativen Fehler auf eine Einzelmessung zu unterschreiten, für die axiale IsFCS ca. fünfmal kürzer ist als die nötige Messzeit bei der lateralen IsFCS.

Der hier berechnete relative Fehler der Kurve kann als Standardabweichung der FCS-Kurve von ihrem Mittelwert verstanden werden. Möchte man also sicherstellen, dass man mit einer Wahrscheinlichkeit von 95 % einen Wert in einem gewissen Konfidenzintervall  $d$  um den tatsächlichen Wert misst, so muss man die Messung so oft wiederholen und mitteln, bis die resultierende Standardabweichung gerade einem Viertel der Breite des gewünschten Konfidenzintervalls entspricht.

Die Standardabweichung des Mittelwerts skaliert gerade mit der inversen Wurzel der Anzahl der Mittelungen:

$$\sigma_n = \frac{\sigma}{\sqrt{n}}. \quad (6.2)$$

Für die benötigte Messzeit  $T$  in Abhängigkeit der gewünschten Breite des Konfidenzintervalls gilt demnach

$$T_i(d) = n \cdot t_i = \left( \frac{\sigma_i}{d/4} \right)^2 \cdot t_i \quad (6.3)$$

mit der Standardabweichung der FCS-Kurve  $\sigma_i$  sowie der Messzeit für eine Messung  $t_i$ . Die mindestens benötigten Messzeiten in Abhängigkeit des gewünschten Konfidenzintervalls sind in Abbildung 6.4

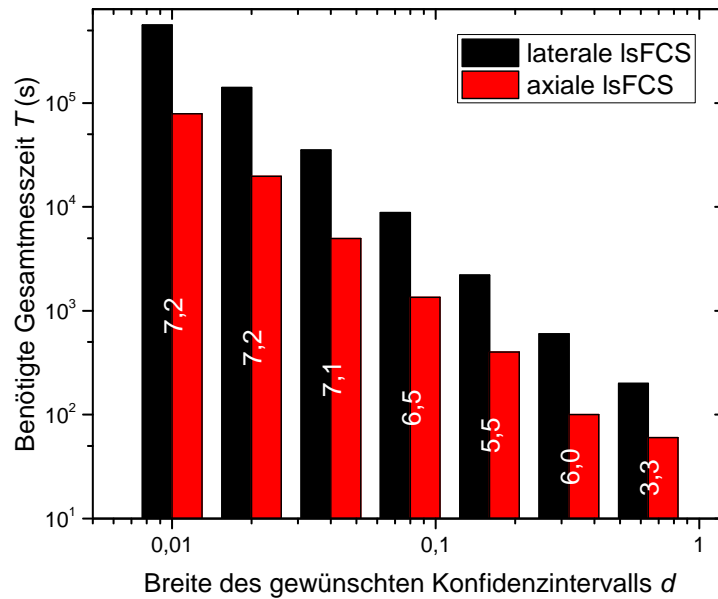


Abbildung 6.4: Die benötigten Gesamtmesszeiten, also das Produkt aus Anzahl der Einzelmessungen und der Einzelmesszeit, um durch Mittelung mit einer Wahrscheinlichkeit von über 95 % in einem Konfidenzintervall bestimmter Breite um die tatsächliche Korrelationskurve zu liegen (siehe Gleichung 6.3). Hierbei wurde jeweils die beste Kombination aus Einzelmesszeit und Anzahl der Messungen gewählt. Die Zahlen in den Balken geben das Verhältnis der Gesamtmesszeit zwischen lateraler und axialer IsFCS an. Die Daten für die Standardabweichung der Korrelationskurven in Abhängigkeit der Einzelmesszeit entstammen der Messung aus Abbildung 6.3.

aufgetragen. Die Gesamtmesszeiten wurden dabei für alle bestimmten Einzelmesszeiten berechnet. Anschließend wurde die Kombination aus Einzelmesszeit und Anzahl nötiger Messungen gewählt, die die kürzeste Gesamtmesszeit ergab. Das Optimum lag dabei durchweg bei einer Einzelmesszeit von 200 s für die laterale und 150 s für die axiale IsFCS. Aus diesen Berechnungen ist ersichtlich, dass die benötigte Messzeit, je nach Konfidenzintervall, um einen Faktor fünf bis sieben kürzer ist, wenn man die axiale IsFCS zur Messung der Korrelationskurven verwendet.

Neben der verkürzten Messzeit durch bessere Datenqualität sowie der verbesserten Zeitauflösung gibt es zwei weitere Gründe, die für den Einsatz der axialen IsFCS sprechen. Zum einen lassen sich chromatische Aberrationen lateral zumeist wesentlich besser kompensieren als axial, da so keine zusätzlichen Teleskope in jedem Anregungsstrahlengang nötig sind. Dies erlaubt einen deutlich besseren Überlapp der verschiedenen Konfokalvolumina in der Probe und somit eine genauere Bestimmung der Zwei-Farb-Kreuzkorrelation. Zum anderen erfordert das axiale IsFCS zwar den Einsatz einer TAG-Linse, aber ein Strahlscanner wird nicht benötigt. Dies vereinfacht den Aufbau eines Konfokalmikroskops wesentlich, da mit dem Scanner auch die Notwendigkeit einer präzisen Abbildung der Scanspiegel in die Rückapertur und die Verwendung der komplexen und zumeist aberrationsbehafteten Scanlinse entfällt. Konfokalmikroskope mit einem Rastertisch statt einem Strahlscanner sind wesentlich weiter verbreitet. Durch den Einbau einer TAG-Linse kann also jedes dieser Konfokalmikroskope, das auch dank eines TCSPC-

Systems für FCS verwendet werden kann, für die Untersuchung von Dynamiken in Membranen mit Hilfe der axialen IsFCS verwendet werden.

Abschließend ist zu erwähnen, dass das Rastern von sich in der x-y-Ebene aufspannenden Membranen unter Umständen zu Problemen führen kann. Soll die dem Deckglas zugewandte Membran verwendet werden, so sind schädliche Einflüsse der Oberfläche auf die Messung entweder auszuschließen oder die Oberfläche muss so präpariert werden, dass sich die zu untersuchenden Zellen deutlich von der Glasoberfläche entfernen. Bei der Verwendung der oberen Membran der Zelle können starke Brechungsindexsprünge durch Teile einer Zelle, wie z.B. dem Zellkern, die Qualität der PSF deutlich verschlechtern. Können sowohl schädliche Oberflächeneffekte nicht verhindert sowie eine ausreichende Qualität der PSF nach Durchgang durch die Zelle nicht sichergestellt werden, muss unter Umständen auf die Verwendung der lateralen IsFCS zurückgegriffen werden.

### 6.1.2 Messung der Bindungsaffinität von DKK1 und LRP6 durch IsFCS

Die im Folgenden dargestellten Ergebnisse sind ein Bestandteil eines umfangreichen Forschungsprojekts, das sich mit den Bindungsaffinitäten zwischen Liganden und Rezeptoren des so genannten wnt-Signalwegs beschäftigt. Sie demonstrieren die Anwendbarkeit der zuvor entwickelten Methode des axialen Linienrasterns in der biophysikalischen Forschung. Für dieses Projekt stellten Dr. Gary Davidson und Dr. Janine Wesslowski das hLRP6-mCherry Konstrukt zur Transfektion der Zellen sowie das mit hDKK1-eGFP angereicherte konditionierte Medium (CM, von engl. *conditioned medium*) zur Verfügung. Antonia Eckert kultivierte und transfizierte die Zellen. Die Durchführung und Auswertung der axialen IsFCS Untersuchungen erfolgte in Zusammenarbeit mit Dr. Peng Gao. Die Publikation der gesamten Ergebnisse ist in Vorbereitung.

Der wnt-Signalweg ist einer von vielen Signaltransduktionswegen, die die Kommunikationsmechanismen zwischen Zellen eines Organismus beschreiben [153]. Er spielt sowohl bei der Zellproliferation [154] als auch der Differenzierung von Stammzellen [155] eine große Rolle und ist damit besonders wichtig in der Embryonalentwicklung. Beim so genannten kanonischen wnt-Signalweg binden Proteine der wnt-Familie an einen heterodimeren Komplex aus Frizzled und LRP5/6 (*low-density lipoprotein receptor-related protein*) Proteinen [66]. Die Bindung von wnt-Proteinen kann am Ende des Signalwegs neben der Genexpression [67] auch Veränderungen am Cytoskelett regulieren [156]. Das Protein DKK1 (*dickkopf-related protein 1*) gilt als Inhibitor im wnt-Signalweg, da es durch seine Bindung an LRP6 den kanonischen wnt-Signalweg blockiert und somit reguliert [157, 158].

Defekte im wnt-Signalweg stehen im Zusammenhang mit verschiedensten Krankheiten wie z.B. Diabetes Typ 2 [159] oder verschiedenen Formen von Krebs [160]. Ein detailliertes Verständnis der Interaktionen und Bindungsaffinitäten der verschiedenen beteiligten Liganden und Rezeptoren ist daher eine Grundvoraussetzung für die effiziente Entwicklung von pharmazeutischen Therapien [161]. In der Literatur sind viele Methoden bekannt, die es erlauben, die Bindungsaffinitäten von Rezeptoren und Liganden *in vitro* zu untersuchen [81]. Diese Untersuchungen können sich aber unter Umständen deutlich von den tatsächlichen Verhältnissen in lebenden Zellen unterscheiden [162].

Um die Bindungsaffinität von hDKK1 und hLRP6 zu quantifizieren, wurden HEK293T-Zellen [163] mit hLRP6-mCherry transfiziert. Für die Herstellung des konditionierten Mediums wurden HEK293T-

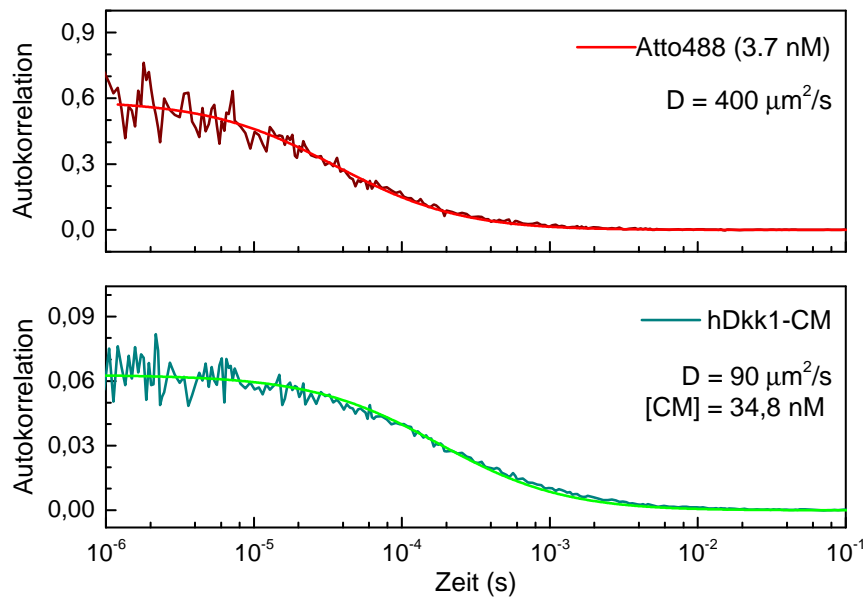


Abbildung 6.5: Oben: FCS-Messung an einer Farbstofflösung (Atto488 (Atto-Tec) verdünnt mit deionisiertem Wasser) bekannter Konzentration zur Kalibrierung des Konfokalvolumens. Unten: Messung der Konzentration von hDkk1-eGFP CM mit Hilfe der Amplitude der Korrelationskurve und dem vorher kalibrierten Konfokalvolumen. Die Anregung erfolgte in beiden Fällen mit Hilfe des 470 nm Lasers bei  $10\mu\text{W}$ . Anschließend wurde über 200s ein Intensitätsverlauf aufgenommen der anschließend korreliert wurde. Die Anpassung erfolgte mit Hilfe der Modellfunktion aus Gleichung 2.44.

Zellen mit hDkk1-eGFP transfiziert und anschließend wurde das Zellmedium inklusive des segregierten hDkk1-eGFP weiterverwendet. Die gesamte Probenpräparation wurde streng anhand bereits veröffentlichter Protokolle durchgeführt [134].

Um die Konzentration des CM zu bestimmen, wurden zunächst 3D-FCS-Messungen durchgeführt. Diese sind in Abbildung 6.5 gezeigt. Hierfür wurde das Konfokalvolumen zunächst mit einer Farbstoffprobe bekannter Konzentration kalibriert, und anschließend wurde die Konzentration des CM gemessen. Da die erwartete  $K_d$  im Bereich von  $10^{-10}\text{M}$  liegt [164, 165], wurde das CM anschließend mit DMEM auf die gewünschten Konzentrationen verdünnt.

Anschließend wurden die mit hLRP6-mCherry transfizierten Zellen mit dem CM inkubiert, bis sich ein Bindungsgleichgewicht eingestellt hatte. Die Probe wurde daraufhin mit Hilfe des Mikroskops untersucht. In Abbildung 6.6 a),b) sind Konfokalbilder des roten Kanals (Anregung bei 561 nm mit  $6\mu\text{W}$  sowie Detektion im Bereich  $(600 \pm 19)\text{nm}$ ), der die Verteilung der hLRP6-Proteine in der Zelle und auf der Membran zeigt, sowie Bilder des grünen Kanals (Anregung bei 470 nm mit  $12\mu\text{W}$  sowie Detektion im Bereich  $(525 \pm 25)\text{nm}$ ), die die an hLRP6 gebundenen hDkk1-Proteine zeigen, dargestellt. Mit Hilfe der axialen IsFCS kann nun die untere, also die dem Deckglas zugewandte Membran gerastert werden, um Auto- sowie Kreuzkorrelationskurven aufzunehmen. Diese Kurven einer beispielhaften Messung sind in Abbildung 6.6 c) dargestellt. Mit Hilfe der Amplituden der Korrelationskurven sowie der Konzentration des eingesetzten CM kann nach Gleichung 2.56 direkt die Dissoziationskonstante bestimmt werden.

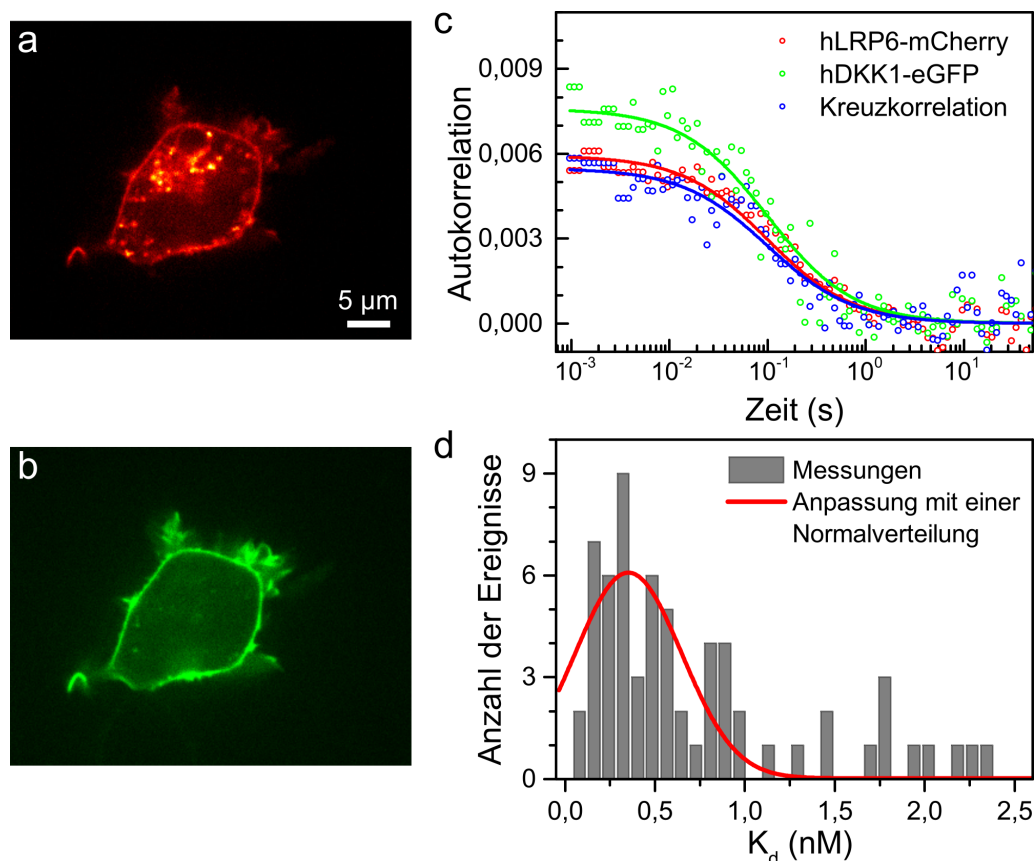


Abbildung 6.6: a),b) Konfokalaufnahmen einer Hek293T-Zelle, die mit LRP6-mCherry transfiziert und anschließend mit hDKK1-eGFP CM inkubiert wurde. a) Anregung bei 561 nm und Detektion bei  $(600 \pm 19)$  nm zur Darstellung des hLRP6-mCherry. b) Anregung bei 470 nm und Detektion bei  $(525 \pm 25)$  nm zur Darstellung des hDKK1-eGFP. Man sieht, dass eine nicht zu vernachlässigende Menge hDKK1 an die Membran der Zelle gebunden hat. c) FCS-Kurven, die mit Hilfe der axialen IsFCS über 120 s aufgenommen wurden, zeigen die Autokorrelation des roten Kanals (hLRP6), des grünen Kanals (hDKK1) sowie eine starke Kreuzkorrelation zwischen beiden Kanälen. Berechnet man die Dissoziationskonstante dieser Messung, ergibt sich  $K_d = 0,38$  nM. d) Eine statistische Auswertung von 65 Messungen an unterschiedlichen Zellen, Messtagen und bei unterschiedlichen Konzentrationen des freien Liganden ergibt nach Anpassung mit Hilfe einer Normalverteilung  $K_d = (0,38 \pm 0,04)$  nM.

Dabei ist zu beachten, dass die unterschiedlich großen Beobachtungsflächen in Betracht gezogen werden müssen, die mit Hilfe der Korrelation eines Farbstoffs nach Anregung durch unterschiedliche Laser einfach kalibriert werden können (siehe Abschnitt 5.3).

Um eine zuverlässige Bestimmung der  $K_d$  zu ermöglichen, kann diese Messung jetzt an unterschiedlichen Zellen und bei unterschiedlichen Konzentrationen des freien Liganden wiederholt werden. Es ist wichtig, dass diese Messungen bei einer freien Ligandenkonzentration im Bereich der  $K_d$  durchgeführt werden, um deren möglichst präzise Bestimmung zu ermöglichen. Ein Histogramm der sich ergebenden  $K_d$  über eine Messreihe von 65 einzelnen IsFCS-Messungen ist in Abbildung 6.6 d) dargestellt. Die Anpassung einer Normalverteilung an das Histogramm ergibt  $K_d = (0,38 \pm 0,04)$  nM.



### 6.1.3 Messung der Bindungsaffinität von DKK1 und LRP6 durch die Bestimmung der Bindungskinetik

Um die im vorherigen Abschnitt gemessenen Werte für die Bindungsaffinitäten zwischen hLRP6 und hDKK1 in lebenden Zellen zu verifizieren, wurde parallel zu den Untersuchungen mit der axialen IsFCS die Bindungsaffinität auch über die Bindungskinetik bestimmt. Hierfür wurden mit Hilfe eines kommerziellen Spinning-Disk-Mikroskops (Andor Revolution XD, BFi Optilas, München) Zeitserien der Bindung von hDKK1-eGFP an hLRP6-mCherry aufgenommen.

Die Aufnahme der Bilder erfolgte bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub>. Um Photobleichen auszuschließen, wurden anschließend für eine Stunde (drei Stunden) alle 100 s (300 s) Bilder mit einer Belichtungszeit von 200 ms aufgenommen, um die Assoziation (Dissoziation) der Liganden an die (von den) Rezeptoren zu messen. Für die Beobachtung der Rezeptoren erfolgte die Anregung bei 561 nm und die Detektion im Fenster (600 ± 19) nm, für die Beobachtung der mit eGFP markierten Liganden erfolgte die Anregung bei 488 nm und das Detektionsfenster lag bei (525 ± 25) nm.

Zur Durchführung der Bindungsexperimente wurden zunächst zur Untersuchung mit Hilfe des Mikroskops passende Zellen ausgewählt, und zwar Zellen mit archetypischer Morphologie sowie einer zum Medium hin exponierten Membran. Anschließend wurde das komplette Zellmedium durch eine vorgewärmte Verdünnung (1:5 und 1:10, die Verdünnung erfolgte abermals mit DMEM) des konditionierten Mediums ausgetauscht. Mit dem Austausch des Mediums startete die Aufnahme der Bilder. Für die Auswertung der Daten wurde die Intensität der Zellmembranen, die in Kontakt mit dem Zellmedium waren, in Abhängigkeit der Zeit aufgenommen. Dieses Vorgehen ist beispielhaft in Abbildung 6.7 dargestellt. Die gemessene Intensität im Bereich der Membran im Liganden-Kanal wurde vor der Bestimmung der charakteristischen Bindungszeit auf die Intensität im Rezeptor-Kanal im selben Bereich normiert, um Messartefakte durch eine Veränderung der Rezeptorkonzentration zu vermeiden.

Zur Messung der Dissoziation der Liganden wurden die Zellen zunächst mit sowohl 1:5 als auch 1:10 verdünntem CM inkubiert, bis das Gleichgewicht eingetreten war. Anschließend wurde wieder eine passende Stelle in der Probe mit Hilfe des Mikroskops ausgewählt. Vor dem Start der Messung wurde das komplette Medium um die Zellen entfernt und die Zellen wurden anschließend zweimal mit frischem Zellmedium gewaschen, bevor die Dissoziation der Liganden beobachtet wurde. Die Anpassung dieser Daten erfolgte mit einem exponentiellen Abfall.

Zur Bestimmung der Assoziationsraten mit ausreichender Statistik wurden anschließend 45 Zellen mit dem 1:5 verdünnten CM und 59 Zellen mit dem 1:10 verdünnten CM vermessen. Die Messung der Dissoziationsraten erfolgte an 20 verschiedenen Zellen. Die gefundenen Ergebnisse sind in Abbildung 6.8 dargestellt. Besonders die Messung der Assoziationsraten zeigt neben einer normalverteilten Spezies einige starke Ausreißer hin zu niedrigen Assoziationsraten. Um diesen Anomalien, die offensichtlich keine normale Bindungsdynamik aufweisen, kein großes statistisches Gewicht zu verleihen, wurden jeweils Normalverteilungen an die Histogramme angepasst und statt einem einfachen Mittelwert der Schwerpunkt der Normalverteilung für die weiteren Berechnungen verwendet. Die so gefundenen Werte weichen zwar deutlich von einem einfachen Mittelwert der Messwerte ab, bei der Betrachtung eines fehlergewichteten Mittelwertes sind die Abweichungen jedoch nur noch im Bereich um ±10%.

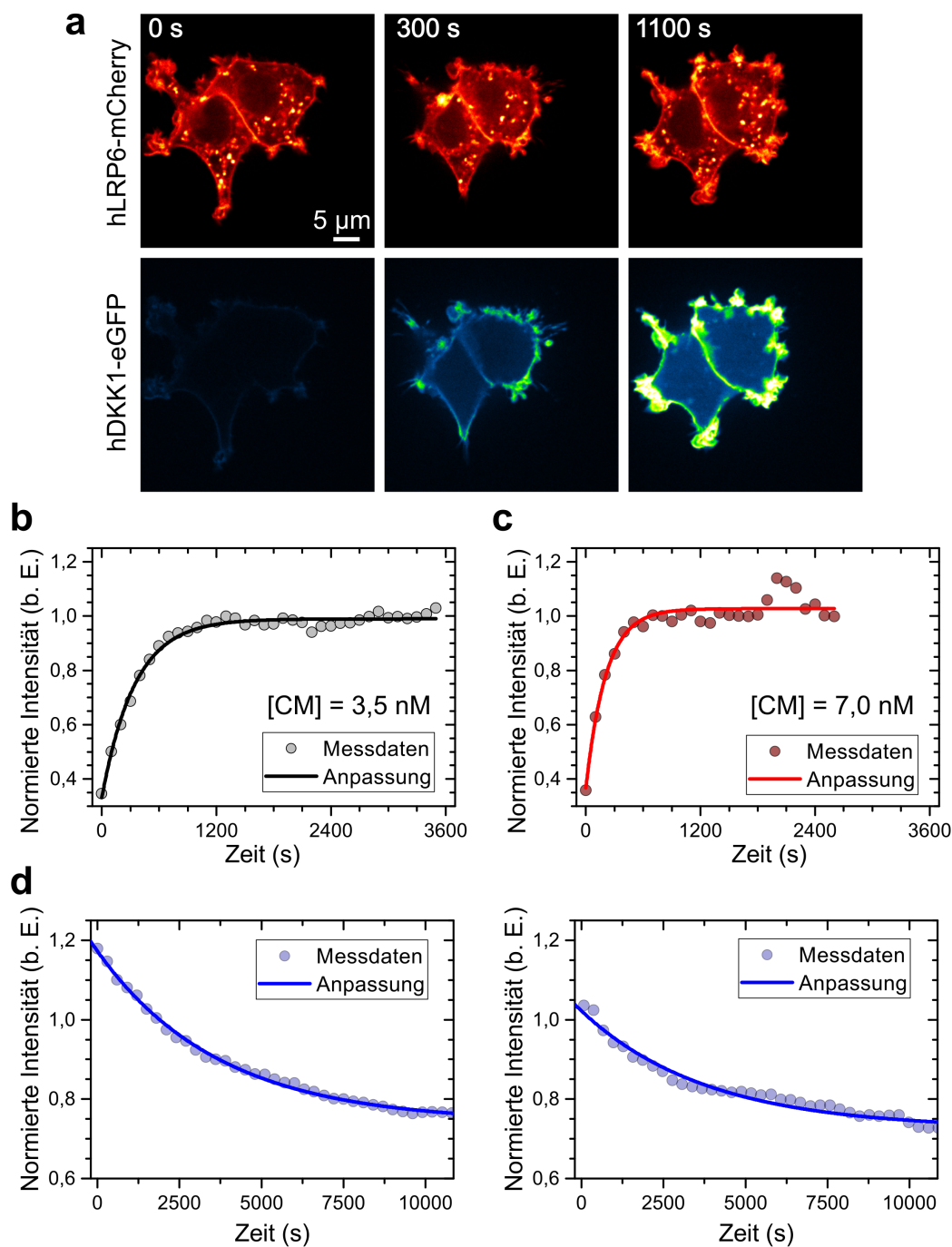


Abbildung 6.7: Messung der Assoziations- und Dissoziationskinetik von hDKK1-eGFP an hLRP6-mCherry. a) Zellbilder zu verschiedenen Zeitpunkten nach Zugabe des CM. Oben in Rot die Darstellung der Rezeptoren (hLRP6-mCherry) und unten in Grün die Darstellung der gebundenen Liganden (hDKK1-eGFP). b,c) Auswertung der Intensität auf der Membran der Zellen nach Zugabe des CM. Die Intensität der Liganden ist normiert auf die Intensität der Rezeptoren aufgetragen. Zur Anpassung wurde ein beschränktes exponentielles Wachstum verwendet, das eine charakteristische Zeit von  $\tau = 344$  s (b,  $[CM] = 3,5$  nM) bzw.  $\tau = 210$  s (c,  $[CM] = 7,0$  nM) ergibt. Dies ist ein jeweils für die Messreihe typischer Wert für die verwendeten Ligandenkonzentrationen. d) Darstellung der Dissoziation der Liganden. Die Zellen wurden zunächst in 1:5 verdünntem CM inkubiert, bis sich ein Gleichgewicht eingestellt hatte. Anschließend wurden die Zellen zweimal gewaschen, um alle freien Liganden zu entfernen. Die gezeigte Intensität ist abermals auf die Konzentration der Rezeptoren normiert. Die Anpassung mit einem exponentiellen Zerfall ergibt  $\tau = 3708$  s bzw.  $\tau = 3808$  s.

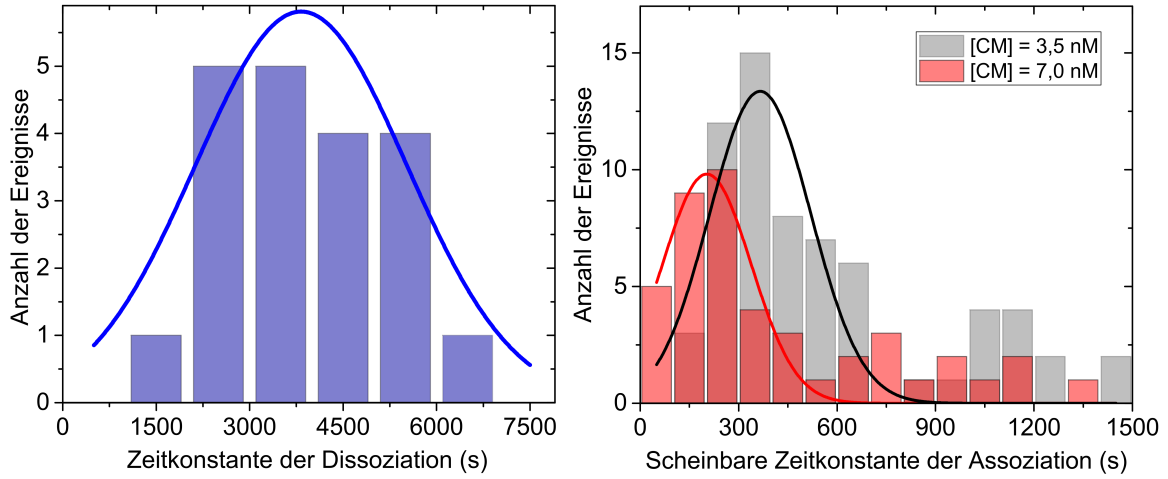


Abbildung 6.8: Statistische Auswertung der Messung der Assoziations- und Dissoziationskinetik von hDKK1-eGFP und hLRP6-mCherry. Alle Messungen wurden in Histogrammen aufgetragen. Anschließend wurden Normalverteilungen an die Histogramme angepasst, um die entsprechenden Zeitkonstanten der Dissoziation und Assoziation zu bestimmen.

Die so gemessenen Zeitkonstanten der Dissoziation- und Assoziation entsprechen gerade den inversen Ratenkoeffizienten. Der scheinbare Assoziationsratenkoeffizient  $k_{\text{on,app}}$  entspricht gerade der Überlagerung aus Assoziation und Dissoziation und kann mittels Gleichung 2.61 korrigiert werden. Anhand der korrigierten Assoziations- und Dissoziationsratenkoeffizienten sowie der Konzentration der freien Liganden kann anschließend die  $K_d$  der Interaktion zwischen hDKK1 und LRP6 berechnet werden. Für die Bestimmung der Fehler auf die  $K_d$  wurden die entsprechenden Fehler auf die Raten, die den Anpassungen mit den Normalverteilungen entstammen, sowie der Fehler auf die Bestimmung der Konzentration des CM entsprechend fortgepflanzt. Die Ergebnisse sind in Tabelle 6.1 zusammengefasst.

Tabelle 6.1: Ergebnisse der Messung der Bindungskinetik von hDKK1 und LRP6.

	[CM] = 3,5 nM	[CM] = 7,0 nM
$k_{\text{off}}$	$(2,6 \pm 0,1) \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$	
$k_{\text{on,app}}$	$(2,7 \pm 0,2) \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$	$(4,9 \pm 0,5) \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$
$k_{\text{on}}$	$(2,5 \pm 0,2) \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$	$(4,7 \pm 0,5) \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$
$K_d$	$(0,37 \pm 0,04) \text{ nM}$	$(0,39 \pm 0,05) \text{ nM}$

Die resultierenden Werte für den Dissoziationskoeffizienten sind in guter Übereinstimmung mit den Ergebnissen aus der axialen IsFCS sowie den bisher publizierten *in vitro* Studien [164]. Im Vergleich zu den Messungen des axialen Linienrastern ist der benötigte Messaufwand jedoch enorm groß. Ein Messpunkt kann hier nicht in ein bis zwei Minuten aufgenommen werden, sondern die Kinetik muss über Stunden hinweg beobachtet werden. Allein die hier gezeigten Ergebnisse, die lediglich die Interaktion zwischen einem einzigen von vielen Rezeptor-Liganden-Paaren des wnt-Signalwegs beschreiben, wurden über mehrere Wochen hinweg aufgenommen, um eine ausreichende Statistik für die Bestimmung

der  $K_d$  zu erhalten. Werden die Messparameter korrekt gewählt, so kann diese Messung mit Hilfe der axialen IsFCS problemlos an einem Messtag durchgeführt werden.

## 6.2 Höchstaufgelöste FCS in zwei und drei Dimensionen

Im folgenden Abschnitt soll die Kombination der FCS mit der STED-Mikroskopie beschrieben werden. Die einfache STED-Mikroskopie führt gerade in der Kombination mit der FCS nicht zu den erwarteten Ergebnissen. Dies liegt vor allem in der Dominanz des Hintergrundsignals in dreidimensionalen Proben und kann durch die Verwendung der STEDD-Mikroskopie vermieden werden. Abschließend wird erläutert, wie der Einsatz der STED-Mikroskopie die IsFCS verbessern kann.

### 6.2.1 STED-FCS in 3D

Es gibt mehrere Gründe, die eine erfolgreiche Kombination aus FCS und STED-Mikroskopie erstrebenswert machen. Wie bereits im vorherigen Abschnitt 6.1.1 diskutiert, ist ein möglichst symmetrisches, also in drei Dimensionen kugelförmiges Volumen erstrebenswert. Dieses kann mit Hilfe eines STED-Strahls, der mit der Zylinderphase moduliert wurde, erreicht werden. Des Weiteren ist die Möglichkeit, Heterogenitäten in den Diffusionseigenschaften mit deutlich höherer Auflösung zu detektieren, ein wesentlicher Vorteil der STED-FCS [71, 108]. Eines der Hauptprobleme der FCS ist jedoch, dass, um signifikante relative Fluktuationen der Fluorophore im beugungsbegrenzenden Konfokalvolumen zu erreichen, nur sehr gering konzentrierte Proben ( $< 100\text{ nM}$ ) untersucht werden können. Erreicht man mit Hilfe der STED-Mikroskopie eine effektive Verkleinerung des Konfokalvolumens, so können die gleichen relativen Fluktuationen bei deutlich höheren Konzentrationen gemessen werden. STED-FCS sollte also auch bei deutlich höheren Konzentrationen funktionieren, wie sie auch in biologischen Proben häufig vorkommen.

Zunächst wurde im Rahmen der Masterarbeit von Jan Otto Wolff untersucht, inwiefern mit Hilfe der STED-Mikroskopie ein isotropes Beobachtungsvolumen geschaffen werden kann. Hierzu wurde Atto655 (Atto-Tec) in einer Mischung aus Glycerin und Wasser (Volumenverhältnis 60:40) gelöst, um die Viskosität der Probe zu erhöhen und damit vergleichbare Bedingungen mit der Diffusion von Proteinen in biologischen Proben zu erreichen. Anschließend wurden bei verschiedenen Leistungen des STED-Lasers jeweils Korrelationskurven aufgenommen, die in Abbildung 6.9 a) dargestellt sind. Aus dieser Abbildung ist offensichtlich, dass die Amplitude bei geringen STED-Leistungen zwar zunächst steigt, bei höheren STED-Leistungen jedoch wieder fällt. Dies ist auf ein teilweise korreliertes Hintergrundsignal zurückzuführen, das sowohl aus der Wiederanregung der Fluorophore durch den STED-Strahl als auch die unvollständige Abregung von Fluorophoren in den Außenbereichen des Konfokalvolumens zusammengesetzt ist. Die Erhöhung des Hintergrundsignals bei gleichzeitiger Verkleinerung des Beobachtungsvolumens und einer damit einhergehenden Verminderung des Signals führt dann zu einer geringeren relativen Fluktuation des Intensitätssignals und damit zu einer scheinbar erhöhten Konzentration [109]. Um den Einfluss auf die Diffusionszeit zu testen, wurden alle FCS-Kurven mit Hilfe der bekannten Modellfunktion für freie 3D-Diffusion angepasst und anschließend auf ihre entsprechende Teilchenzahl normiert. Dies ist in Abbildung 6.9 b) aufgezeigt. Der deutliche Einfluss des STED-Strahls auf die Diffusionszeit ist aus der Verschiebung der FCS-Kurven hin zu kürzeren Zeiten ersichtlich.

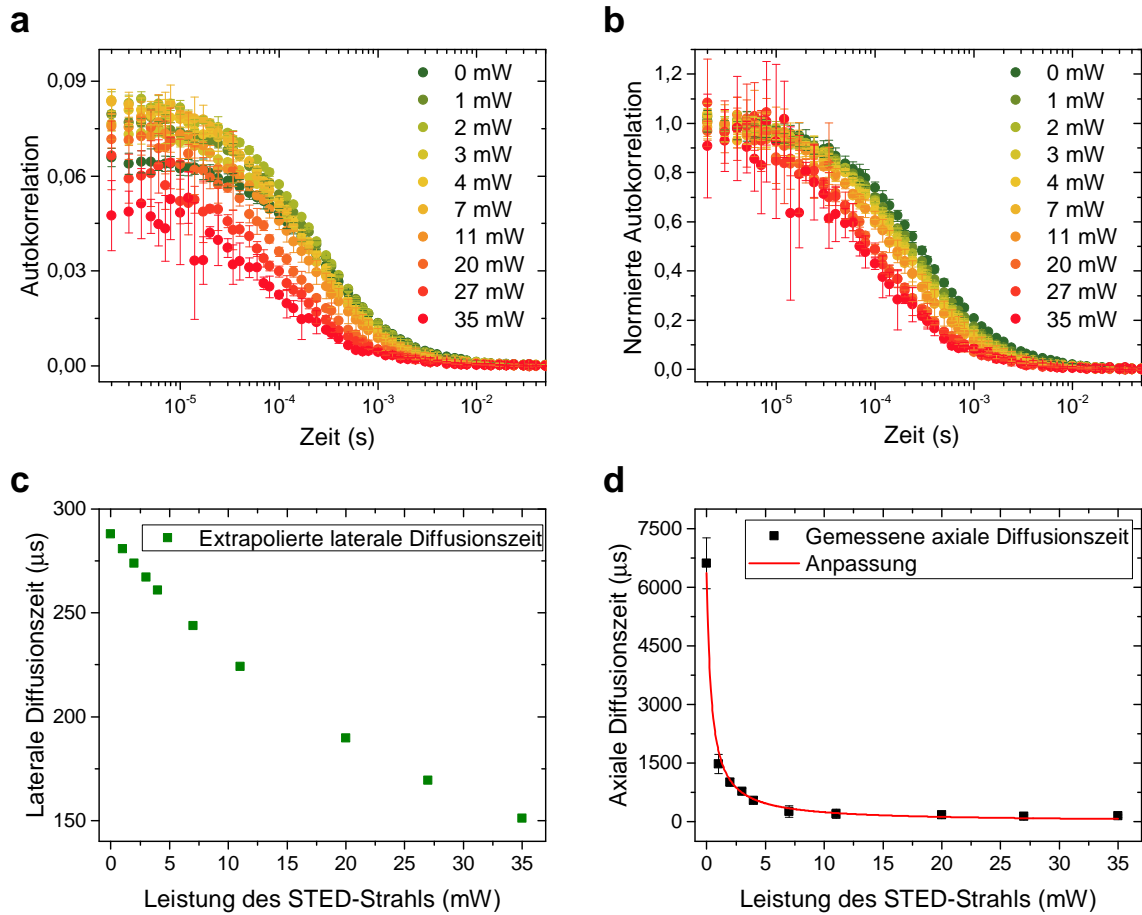


Abbildung 6.9: STED-FCS Untersuchungen an Atto655 (Atto-Tec) gelöst in einer Glycerol-Wasser Mischung (Volumenverhältnis 60:40). a),b) STED-FCS Kurven, die mit einem durch die Zylinderphase moduliertem STED-Strahl bei verschiedenen Leistungen aufgenommen wurden. Die Amplitude skaliert auf Grund des Hintergrundsignals nicht wie erwartet, eine Normierung der Kurven in b) zeigt jedoch schön die kontinuierliche Verschiebung zu kürzeren Diffusionszeiten. c) Gemessene laterale Diffusionszeit ohne STED-Strahl und dann anhand der zuvor bestimmten Ausdehnung der PSF extrapolierte Daten. d) Die axiale Diffusionszeit wurde bestimmt, indem an alle zuvor gemessenen FCS-Kurven eine Modellfunktion für freie 3D-Diffusion mit fixierter lateraler Diffusionszeit (aus c) angepasst wurde. Die so bestimmten axialen Diffusionszeiten skalieren exakt passend zur erwarteten Skalierung der axialen Ausdehnung des Beobachtungsvolumens. Die Anregung der Probe erfolgte bei 640 nm mit 25 μW, die Detektion im Bereich (676 ± 19) nm. Bei jeder STED-Leistung wurden fünf Kurven über jeweils 60 s aufgenommen und anschließend gemittelt. Die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung dieser Mittelung.

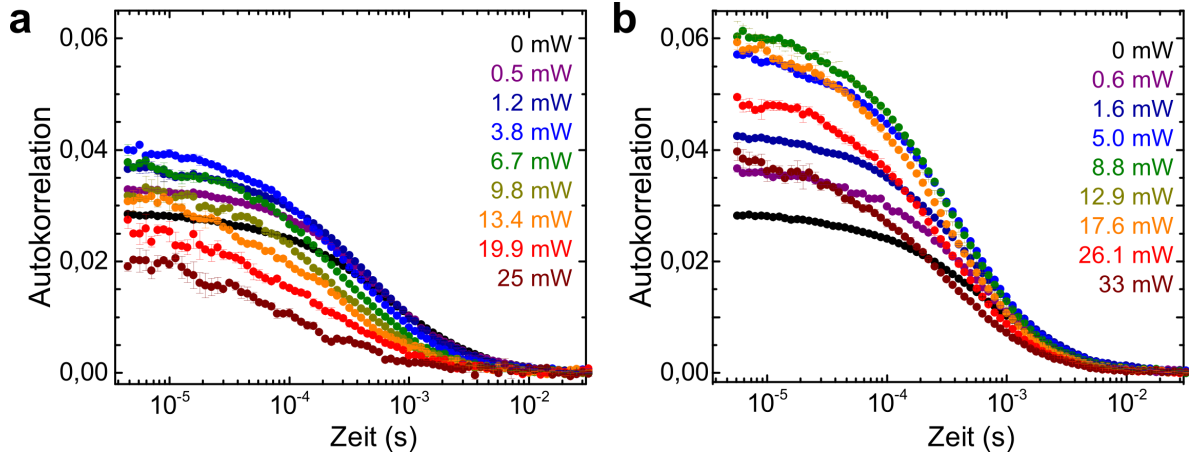


Abbildung 6.10: 3D-STED-FCS an einer 200 nM Atto655 (Atto-Tec) Lösung in Glycerol-Wasser (Massenverhältnis 72:28) bei verschiedenen STED-Leistungen. a) Der STED-Puls besteht aus einem Strahl, der mit einer Vortexphase 1. Ordnung moduliert wurde (55 % der Leistung) und einem STED-Strahl der mit einer Zylinderphase moduliert wurde (33 % der Leistung). b) Der STED-Puls besteht weiterhin aus dem mit der Zylinderphase modulierten Strahl (25 % der Leistung) sowie einem Strahl, der mit einer Vortexphase 2. Ordnung moduliert wurde (65 % der Leistung). Die restliche Leistung wurde für den unmodulierten Strahl für die STEDD-Mikroskopie benötigt, welcher in diesen Experimenten geblockt wurde. Die Anregung der Probe erfolgte bei 640 nm mit 6 µW, die Detektion im Bereich (676 ± 19) nm. Die gezeigten Kurven sind eine Mittelung aus drei einzelnen Experimenten, die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung (modifiziert aus [84]).

Um eine numerische Auswertung zu ermöglichen, wurden anschließend alle Kurven mit Hilfe einer fixierten lateralen Diffusionszeit angepasst, um so die axiale Diffusionszeit zu berechnen. Die laterale Diffusionszeit konnte hierfür aus der FCS-Kurve ohne STED-Laser gemessen werden. Die Skalierung über die STED-Leistung konnte anschließend mit Hilfe der Daten zur Verkleinerung der lateralen Ausdehnung der PSF unter Einfluss des mit einer Zylinderphase modulierten STED-Strahls (siehe Abbildung 3.7) extrapoliert werden. Die berechneten lateralen Diffusionszeiten sind in Abbildung 6.9 c) dargestellt. Die gemessenen axialen Diffusionszeiten sind in Abbildung 6.9 d) gezeigt und mit Hilfe der Gleichung

$$\tau_{\text{axial}}(I_{\text{STED}}) \propto z_0^2(I_{\text{STED}}) \propto \frac{z_0^2}{1 + z_0^2 a^2 \frac{I_{\text{STED}}}{I_{\text{Sat}}}} \quad (6.4)$$

angepasst. Die gute Anpassung der Kurve zeigt, dass die axialen Diffusionszeiten genauso skalieren wie von der Theorie vorhergesagt. Zum anderen sieht man, dass man bereits mit 7 mW STED-Leistung ein praktisch isotropes Beobachtungsvolumen erzeugen kann.

Anschließend wurde in Zusammenarbeit mit Dr. Peng Gao [84] untersucht, inwiefern die Skalierung der Amplitude der STED-FCS Kurven verbessert werden kann. Hierzu wurde ein zweiter STED-Strahl, der mit einer Vortexphase moduliert wurde, mit dem Strahl zur axialen Auflösungsverbesserung kombiniert. Anschließend wurden abermals STED-FCS-Kurven von Atto655 (Atto-Tec), das in einer Glycerin-Wasser-Mischung (Massenverhältnis 72:28) gelöst wurde, aufgenommen. Diese Kurven sind für verschiedene STED-Leistungen in Abbildung 6.10 dargestellt.

Die Kombination aus dem STED-Strahl mit der Vortex-Phase 1. Ordnung und dem STED-Strahl mit der Zylinderphase (siehe Abbildung 6.10 a)) zeigt dabei ein sehr ähnliches Bild wie zuvor die Messungen

aus Abbildung 6.9. Die Amplitude ist für geringe STED-Leistungen leicht erhöht, wird aber dann durch das schlechter werdende Verhältnis zwischen Signal und Hintergrund wieder geringer.

Die Verwendung einer Vortexphase 2. Ordnung in Kombination mit dem zylinderphasenmodulierten STED-Strahl (siehe Abbildung 6.10 b)) zeigt ein leicht verbessertes Ergebnis. Der Ring, der durch die Vortexphase 2. Ordnung erzeugt wird, ist dabei wesentlich größer als der Ring durch die Vortexphase 1. Ordnung (siehe Abbildung 3.2). Dies führt zum einen zu einer weniger starken Verkleinerung des Beobachtungsvolumens und erhöht somit die Anzahl an Signalphotonen. Zum anderen erlaubt er aber gleichzeitig auch eine bessere Abregung der Fluorophore in der Peripherie des Fokus. Des Weiteren ist zu erwähnen, dass der Ring, der durch die Vortexphase 2. Ordnung erzeugt wird, deutlich robuster gegenüber optischen Aberrationen ist und im Allgemeinen eine wesentlich geringere Restintensität im Zentrum des Rings aufweist. Doch auch mit der Vortexphase 2. Ordnung kann auf Grund des entstehenden Hintergrunds keine kontinuierliche Erhöhung der Amplitude der FCS-Kurven erreicht werden.

In der Literatur wurde zur Bestimmung der tatsächlichen Amplitude die Verwendung von Techniken zur Analyse der Intensitätsverteilung der Fluorophore vorgeschlagen (FIDA von engl. *fluorescence intensity distribution analysis* [166]), um so auf die korrekte Teilchenanzahl zu schließen [109]. Dieses Vorgehen erfordert, dass der Hintergrund vollkommen unkorreliert vom eigentlichen Signal ist. Dies ist jedoch eine sehr zweifelhafte Annahme, da sowohl bei der Wiederanregung durch den STED-Strahl als auch bei unvollständiger Abregung das entstehende Hintergrundsignal an die Trajektorien der diffundierenden Teilchen geknüpft und somit mehr oder weniger stark mit dem eigentlichen Signal korreliert ist.

Der Einsatz der STEDD-Mikroskopie kann jedoch den Hintergrund stark reduzieren und somit auch eine korrekte Amplitudenskalisierung bei der Kombination von STED und FCS ermöglichen, wie im folgenden Abschnitt gezeigt wird.

### 6.2.2 STEDD-FCS in 3D

Wie im vorherigen Abschnitt dargestellt, ist der entstehende Hintergrund das Hauptproblem bei der Kombination von STED und FCS. Da die FCS-Probe im zeitlichen Mittel keinerlei Struktur aufweist und die Fluorophore völlig gleich verteilt sind, ist eine Diskriminierung von Signal und Hintergrund noch schwieriger als beim Einsatz von STEDD in der Bildgebung. Die in diesem Abschnitt gezeigten Messungen wurden bereits publiziert [84]. Die Aufnahme und Analyse der Messdaten erfolgte gemeinsam mit Dr. Peng Gao.

Um das tatsächliche Potential der STEDD-FCS zu zeigen, wurde das Experiment aus Abbildung 6.10 mit STEDD wiederholt. Dies ist in Abbildung 6.11 gezeigt.

In Abbildung 6.11 a) und b) sind abermals die Ergebnisse für einen 3D-STEDD-Puls, der aus einem mit der Zylinderphase modulierten und einem mit einer Vortexphase erster (a) bzw. zweiter Ordnung (b) moduliertem STEDD-Strahl besteht, gezeigt. Zusätzlich wird ein unmodulierter STED-Strahl eingesetzt, um das Hintergrundsignal zu messen und anschließend zu korrigieren. In beiden Fällen skaliert die Amplitude jetzt wie erwartet mit der STED-Leistung. Dies bedeutet, dass der schädliche Einfluss des Hintergrunds nicht mehr relevant ist.

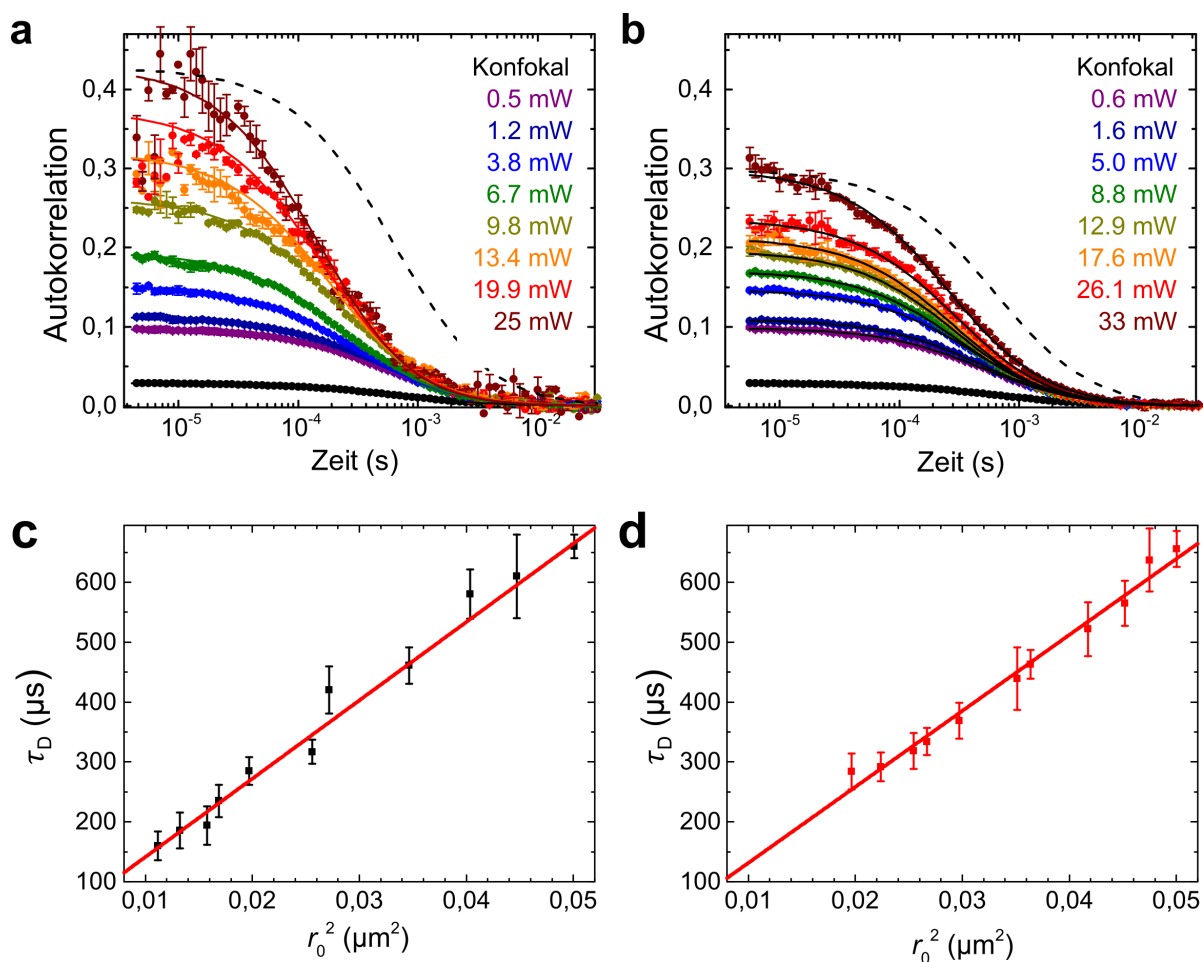


Abbildung 6.11: 3D-STED-FCS an einer 200 nM Atto655 (Atto-Tec) Lösung in Glycerol-Wasser (Massenverhältnis 72:28) bei verschiedenen STED-Leistungen. a) Der Abregungsstrahl besteht aus einem mit der Vortexphase modulierten (55 % der Leistung), einem mit einer Zylinderphase modulierten (33 % der Leistung) sowie einem unmodulierten (12 % der Leistung) Strahl. b) Ein mit der Zylinderphase modulierter Strahl (25 % der Leistung) sowie ein Strahl, der mit einer Vortexphase 2. Ordnung moduliert wurde (65 % der Leistung) sowie ein unmodulierter (10 % der Leistung) Strahl wurden hier verwendet, um die entsprechenden STED-Kurven aufzunehmen. c), d) Gemessene Diffusionszeit aufgetragen, über die, in Kalibrationsmessungen bestimmte, quadratische laterale Ausdehnung der effektiven PSF. Der erwartete lineare Zusammenhang passt gut zu den Messdaten und erlaubt eine Berechnung des Diffusionskoeffizienten. Die Anregung der Probe erfolgte bei 640 nm mit 6  $\mu$ W, die Detektion im Bereich  $(676 \pm 19)$  nm. Die gezeigten Kurven sind eine Mittelung aus drei einzelnen Experimenten, die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung (modifiziert aus [84]).



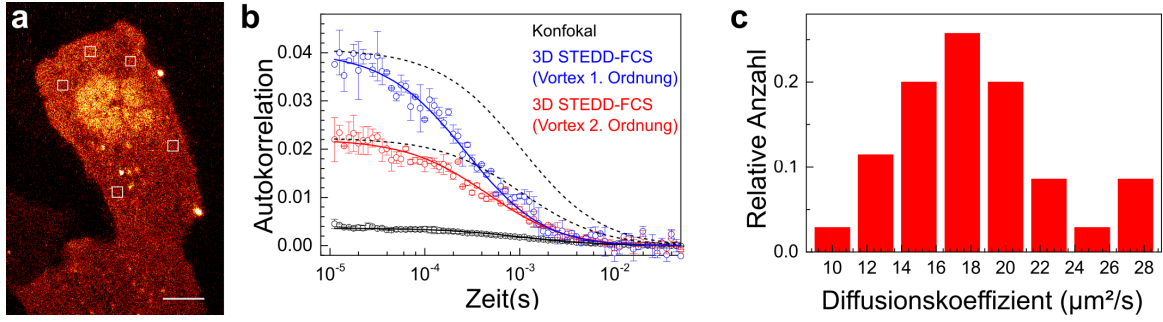


Abbildung 6.12: 3D-STEDD-FCS von Annexin A5-mGarnet in lebenden HeLa Zellen. a) Ein Konfokalbild der gleichmäßigen Verteilung von Annexin A5 im Zytoplast der Zelle. Die weißen Quadrate zeigen die Orte, an denen FCS-Kurven aufgenommen wurden. Der Skalierungsbalken hat eine Länge von  $10\mu\text{m}$ . b) Beispielhafte Messung der Diffusion von Annexin A5-mGarnet mit Hilfe konfokaler FCS (schwarz), STEDD-FCS mit Vortexphasen 1. (blau) und 2. Ordnung (rot). Die gestrichelten schwarzen Kurven zeigen die reskalierte konfokale FCS-Messung und erlauben eine bessere Einschätzung der Veränderung der Diffusionszeit. Die durchgezogenen Linien sind jeweils eine Anpassung mit einem Modell für freie 3D-Diffusion, das global an alle drei Kurven angepasst wurde. Die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung nach der Mittelung von zwei  $400\text{ s}$  langen Messungen. c) Messung der Diffusionskoeffizienten an acht verschiedenen Zellen, an denen jeweils fünf STEDD-FCS Messungen mit der Vortexphase 2. Ordnung durchgeführt wurden. Die heterogenen Diffusionseigenschaften von lebenden Zellen sind gut zu erkennen (modifiziert aus [84]).

Eine Auftragung der angepassten lateralen Diffusionszeiten über die, zuvor mit Hilfe von fluoreszenten Latexkügelchen bestimmte, quadrierte laterale Ausdehnung des Beobachtungsvolumens zeigt ein zu erwartendes lineares Verhalten (Abbildung 6.11 c) und d)). Es gilt für die laterale Diffusionszeit  $\tau_D$ :

$$\tau_D = \frac{r_0^2}{4D} \quad (6.5)$$

mit der quadrierten lateralen Ausdehnung des Beobachtungsvolumens  $r_0^2$  sowie dem Diffusionskoeffizienten  $D$ . Aus der Anpassung an die Messdaten kann also direkt der Diffusionskoeffizient bestimmt werden. Es gilt für die mit Hilfe der Vortexphase erster Ordnung aufgenommenen Daten  $D_1 = (19,1 \pm 0,8)\mu\text{m}^2\text{s}^{-1}$  sowie für die Daten, die mit Hilfe der Vortexphase zweiter Ordnung aufgenommen wurden  $D_2 = (19,8 \pm 0,5)\mu\text{m}^2\text{s}^{-1}$ . Ein Vergleich mit dem Literaturwert für den Diffusionskoeffizienten von Atto655 in wässriger Lösung [64] unter Berücksichtigung der um einen Faktor 25 erhöhten Viskosität durch die Glycerol-Wasser Mischung [167]  $D_{\text{Lit}} = (17,0 \pm 3,4)\mu\text{m}^2\text{s}^{-1}$  ergibt eine gute Übereinstimmung mit den gefundenen Werten. Die STEDD-FCS Daten skalieren also auch bezüglich der Diffusionszeit genau wie erwartet. Die deutlich vergrößerte Amplitude erlaubt dabei die Verwendung von höher konzentrierten Proben.

Im nächsten Schritt wird die STEDD-FCS auf ein biologisches System angewendet, um ihre grundsätzliche Tauglichkeit in der biophysikalischen Forschung unter Beweis zu stellen. Hierzu wurden HeLa-Zellen transfiziert, um das Fusionsprotein Annexin A5-mGarnet zu exprimieren. Annexin A5 soll eine Rolle in der Blutgerinnung [84] sowie der Reparatur von Zellmembranen spielen [168, 169]. Dieses Protein ist des Weiteren sehr homogen im Zytoplast verteilt und eignet sich somit hervorragend zur Untersuchung mit STEDD-FCS (siehe Abbildung 6.12 a)).

In Abbildung 6.12 b) ist die Mittelung aus jeweils zwei konfokalen FCS-Messungen (schwarz), STED-FCS Messungen mit der Vortexphase erster Ordnung (blau) und STED-FCS Messungen mit der Vortexphase zweiter Ordnung (rot) aufgetragen. Die globale Anpassung an alle drei Kurven mit einem gemeinsamen Diffusionskoeffizienten sowie zuvor kalibrierten Verhältnissen zwischen axialer und lateraler Ausdehnung des Fokus ergibt eine Erhöhung der Amplitude um einen Faktor 10 (1. Ordnung) bzw. 6 (2. Ordnung) und damit eine deutliche Verkleinerung des Beobachtungsvolumens durch STED. Die gemessenen Diffusionskoeffizienten ( $D_{\text{Konfokal}} = (17,6 \pm 0,8) \mu\text{m}^2 \text{s}^{-1}$ ,  $D_{\text{Vortex1}} = (18,8 \pm 1,0) \mu\text{m}^2 \text{s}^{-1}$  und  $D_{\text{Vortex2}} = (17,0 \pm 0,6) \mu\text{m}^2 \text{s}^{-1}$ ) sind, beispielhaft für die statistische Auswertung von 40 Messungen an fünf verschiedenen Zellen in Abbildung 6.12 c) dargestellt. Des Weiteren passen die gemessenen Diffusionskoeffizienten gut zu Werten, die für Proteine ähnlicher Größe im Zytosol gemessen wurden [170].

Die STED-FCS kann also auch zur Untersuchung von dreidimensionaler Diffusion in biologischen Präparaten eingesetzt werden. Dies erlaubt damit die Verwendung der FCS bei hoch konzentrierten Proben sowie zur Untersuchung von Heterogenitäten bei der Diffusion in Zellen in hoher räumlicher Auflösung.

### 6.2.3 STED-IsFCS in 2D

Im folgenden Abschnitt soll gezeigt werden, wie durch eine Kombination mit der STED-Mikroskopie die IsFCS weiter verbessert werden kann. Wie in Abschnitt 6.1.1 gezeigt wurde, ist ein symmetrisches Beobachtungsfeld, wie es bei der axialen IsFCS zu finden ist, dem elliptischen Beobachtungsfeld der lateralen IsFCS deutlich vorzuziehen. Anwendungsszenarien, in denen ein axiales Rastern der Membran unpraktikabel ist (z.B. durch Oberflächeneffekte oder in dichten Zellverbänden bzw. Gewebe), können die Verwendung der lateralen IsFCS zur Bestimmung der Dynamik in Membranen erfordern.

Kombiniert man die STED-Mikroskopie mit der Zylinderphase, also zur axialen Einschränkung des Beobachtungsvolumens, mit der IsFCS, so kann eine Angleichung der axialen und lateralen Ausdehnung des Beobachtungsfeldes erfolgen. Somit können die Vorteile der axialen IsFCS, die durch das symmetrische Beobachtungsfeld entstehen, auf das laterale Rastern übertragen werden.

In Abbildung 6.13 ist die laterale IsFCS in Kombination mit der axialen Einschränkung des Beobachtungsfeldes durch STED an einem GUV gezeigt. Da die Zylinderphase hauptsächlich eine axiale Einschränkung des Beobachtungsvolumens zur Folge hat, wird sich die laterale Diffusionszeit kaum ändern. Die relative Änderung in Abhängigkeit der verwendeten STED-Leistung kann durch Kalibrationsmessungen (siehe Abbildung 3.7) bestimmt werden. Dieser Faktor kann anschließend verwendet werden, um eine globale Anpassung der Modellfunktion an die gezeigten Daten vorzunehmen. Hieraus können sowohl die Verkleinerung des Beobachtungsfeldes anhand der Amplitude wie auch die Änderung des Aspektverhältnisses gemessen werden. Die eingesetzte STED-Leistung von 11 mW führt dabei zu einer Verringerung der mittleren Teilchenzahl im Beobachtungsfeld um einen Faktor 1,7 sowie zu einer Verminderung des Aspektverhältnisses um einen Faktor 1,8. Zieht man in Betracht, dass sich auch die laterale Ausdehnung des Beobachtungsvolumens bei dieser STED-Leistung um ca. 10% verringert, so ist offensichtlich, dass der inhärente Hintergrund in der STED-Mikroskopie bereits einen Einfluss auf die Amplitude der Kurve hat. Möchte man also ein isotropes Beobachtungsfeld erreichen, so müsste man die

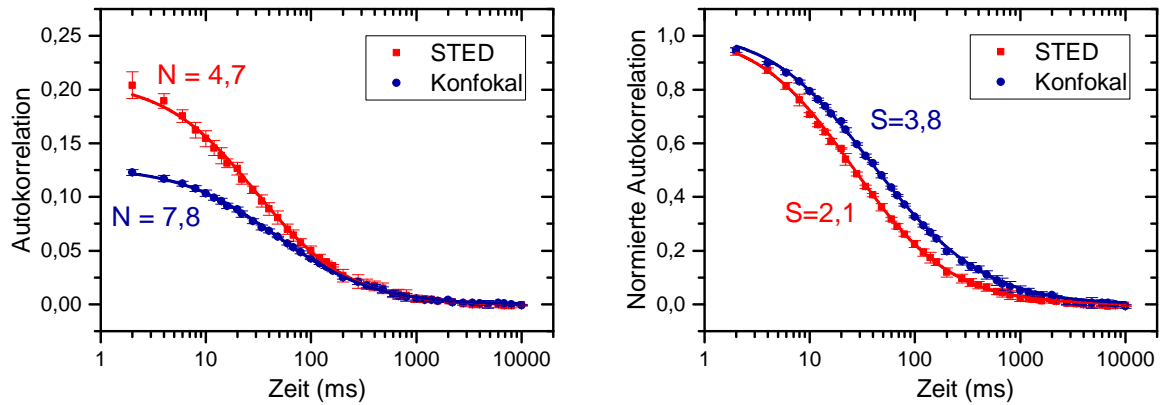


Abbildung 6.13: Laterale IsFCS an einem GUV aus 50% SM und 50% Cholesterol (beide Sigma-Aldrich), der mit 0,01 mol% Atto647N-DPPE (Atto-Tec) eingefärbt wurde. Links: Die gemessene Autokorrelation mit (rot) und ohne (blau) STED-Laser zeigt einer vergrößerte Amplitude, die durch die Verkleinerung des Beobachtungsfeldes in axialer Richtung durch den Einsatz des STED-Lasers entsteht. Die durchgezogenen Linien zeigen die globale Anpassung mit einer entsprechenden Modellfunktion (siehe Gleichung 2.47), die eine mittlere Teilchenzahl  $N$  im Beobachtungsfeld von  $N = 4,7$  beim Einsatz der STED-Mikroskopie und  $N = 7,8$  ohne Einsatz des STED-Lasers ergibt. Rechts: Die normierten Autokorrelationen verdeutlichen das deutlich reduzierte Aspektverhältnis  $S$ . Die Verschiebung der Autokorrelationskurve hin zu kürzeren Zeiten verdeutlicht die kürzere Aufenthaltszeit der Fluorophore im Beobachtungsfeld durch die Einschränkung der axialen Ausdehnung. Die laterale Diffusionszeit wurde global angepasst und über die zu erwartende Verkleinerung der lateralen Ausdehnung durch die Verwendung der Zylinderphase aneinander gekoppelt. Hieraus ergab sich  $\tau_{\text{lat}} = (17,1 \pm 0,5)$  ms ohne und  $\tau_{\text{lat}} = (14,0 \pm 0,4)$  ms mit Einsatz des STED-Lasers. Die Anregung erfolgte bei 640 nm mit  $15 \mu\text{W}$ . Zur Messung der Korrelationen wurde über 600 s eine  $20 \mu\text{m}$  lange Linie mit einer Frequenz von 500 Hz in einer Tiefe von  $3 \mu\text{m}$  durch die Membran gerastert. Der STED-Strahl hatte eine Wellenlänge von 780 nm sowie eine Leistung von 11 mW und wurde mit Hilfe der Zylinderphase phasenmoduliert. Die gezeigten Daten entsprechen einer Mittelung aus drei Messungen, die Fehlerbalken entsprechen der Standardabweichung dieser Mittelung.

eingesetzte STED-Leistung deutlich erhöhen. Das hierbei entstehende Signal-zu-Hintergrund Verhältnis würde dann, ebenso wie bei der STED-FCS in 3D, einen Einsatz der STEDD-Methode erfordern.



## 7 Zusammenfassung und Ausblick

Die Fluoreszenzmikroskopie hat sich durch ihr unvergleichliches Potential, spezifisch eingefärbte Strukturen nichtinvasiv zu beobachten, zu einer unersetzlichen Untersuchungsmethode der Lebenswissenschaften entwickelt. Der größte Nachteil der Fluoreszenzmikroskopie, die beugungsbedingte Beschränkung der Auflösung auf etwa die Hälfte der Wellenlänge, konnte durch die Entwicklung der STED-Mikroskopie um die Jahrtausendwende erstmals unterschritten werden. In dieser Arbeit wurde ein mit adaptiven Optiken ausgestattetes STED-Mikroskop zunächst für die Untersuchung lebender Zellen verwendet. Diese Untersuchungen sind besonders herausfordernd, da die verwendeten fluoreszenten Proteine bezüglich ihrer photophysikalischen Eigenschaften den normalerweise verwendeten organischen Farbstoffen deutlich unterlegen sind. Durch eine aufwendige Optimierung der Abregungsstrahlen mit Hilfe der adaptiven Optiken konnte dennoch eine Verbesserung der Auflösung um mehr als das Fünffache erzielt werden.

Ein großer Nachteil der STED-Mikroskopie ist der sowohl durch unvollständige Abregung als auch durch Wiederanregung entstehende Hintergrund, der sich besonders bei der dreidimensionalen Untersuchung dichter Strukturen als problematisch erweist. Die hier vorgestellte Entwicklung der *Stimulated Emission Double Depletion*, kurz STEDD-Mikroskopie, erlaubt die getrennte Messung und anschließende Subtraktion des nahezu gesamten Hintergrundsignals. Hierfür wird ein zweiter nicht phasenmodulierter STED-Puls auf der Zeitskala der Fluoreszenzlebensdauer der verwendeten Fluorophore verzögert und zusätzlich in die zu untersuchende Probe eingestrahlt. Dieser zweite STED-Puls sorgt für eine vollständige Abregung der Fluorophore, die das eigentliche Signal erzeugen. Die nach dem Eintreffen des zweiten STED-Pulses detektierten Photonen entsprechen also ausschließlich dem vorhandenen Hintergrundsignal. Die korrekt gewichtete Subtraktion dieses Hintergrunds von den Photonen, die zwischen dem ersten und zweiten STED-Puls eingetroffen sind und daher gerade dem einfachen STED-Bild mit Signal und Hintergrund entsprechen, erlaubt somit eine praktisch hintergrundfreie STED-Mikroskopie. Das Potential dieser Methode konnte anschließend bei der Aufnahme von höchst aufgelösten Zellbildern in zwei und vor allem drei Dimensionen demonstriert werden.

Neben der Aufnahme von Bildern ist auch die Fluoreszenzkorrelationsspektroskopie (FCS) ein wichtiges Instrument zur Quantifizierung von Vorgängen auf molekularer Ebene. Diese Methode erlaubt, aus der Fluktuation von Fluorophoren in einem kleinen Beobachtungsvolumen Rückschlüsse auf die Anzahl der Fluorophore im Volumen und ihre Diffusionseigenschaften zu treffen. Die Konzentration der Fluorophore ist dabei stark beschränkt, da die relative Fluktuation der Teilchen, die dem Messsignal entspricht, nicht zu gering werden darf. Eine Möglichkeit, die Messung auch bei höheren Konzentrationen möglich zu machen, ist dabei die Verkleinerung des Beobachtungsvolumens durch STED. Es konnte gezeigt werden, dass diese zu erwartende Verbesserung jedoch durch den inhärenten Hintergrund der STED-Mikroskopie zunichte gemacht wird. Die Minimierung der Hintergrundproblematik durch den Einsatz

der STEDD-Methode konnte auch hier gewinnbringend eingesetzt werden. Deutliche Verbesserungen durch den Einsatz der STEDD-FCS gegenüber der klassischen FCS konnten sowohl in Farbstofflösungen als auch im Zytosol von Zellen demonstriert werden.

In einem weiteren Projekt wurde das Mikroskop mit einer TAG-Linse ausgestattet. Diese Linse erlaubt eine schnell oszillierende Defokussierung des Strahls vor dem Objektiv und eine daraus resultierende schnelle axiale Bewegung des Konfokalvolumens in der Probe. In Anlehnung an die bereits bekannte Technik der lateralen Linienraster-FCS (lsFCS), die typischerweise zur Untersuchung von Dynamiken in Membranen verwendet wird, konnte so eine Methode entwickelt werden, die das axiale Rastern von Membranen erlaubt. Die deutlich höhere Zeitauflösung sowie das kleinere und symmetrische Beobachtungsvolumen erlauben dabei eine schnellere und präzisere Messung von Diffusion in Membranen. Diese Methode konnte anschließend zur Untersuchung von Bindungsaffinitäten eines Rezeptor-Liganden-Paares des so genannten Wnt-Signalwegs herangezogen werden. Abschließend wurde gezeigt, wie die Kombination der STED-Mikroskopie und der lsFCS die Vorteile der axialen lsFCS auf die laterale lsFCS übertragen könnte. Dies kann sich in Zukunft als hilfreich erweisen, da sich das axiale Rastern vor allem in dichten Zellverbänden oder Gewebe als problematisch erweisen könnte.

Gerade die Weiterentwicklung der hier aufgezeigten Kombination von STED und lateralem lsFCS scheint sinnvoll. Die Untersuchungen an fluoreszenten Latexkügelchen zeigen, dass bei höheren STED-Leistungen ein isotropes Beobachtungsvolumen erreicht werden könnte welches zu präferieren ist. Hier ist dann jedoch die Verwendung der STEDD-Methode erforderlich, da sich, ähnlich zur STED-FCS in drei Dimensionen, der entstehende Hintergrund als problematisch erweist. Auch die hier entwickelte axiale lsFCS könnte von einer Kombination mit STED profitieren. Die Kombination mit einer Vortexphase kann hier zu einer deutlichen Verringerung des Beobachtungsvolumens führen und somit vor allem bei hohen Fluorophorkonzentrationen oder sehr langsamer Diffusion die Anwendbarkeit der Methode deutlich verbessern. Eine Anwendung der hier gezeigten Techniken auf viele weitere Kombinationen aus Rezeptoren und Liganden des wnt-Signalweges wird zudem das Verständnis der Interaktionen auf molekularer Ebene ermöglichen und in Zukunft auch eine gezielte Entwicklung von pharmazeutischen Therapien gegen Krankheiten, die auf Defekten dieses Signalweges basieren, erlauben.

Im Bereich der höchstauflösten Bildgebung verspricht die Verwendung der TAG-Linse einen enormen Zeitgewinn bei der Aufnahme dreidimensionaler Strukturen. Da eine Periode der TAG-Linse deutlich kürzer ist als die typische Pixelverweildauer bei der Bildgebung, könnten ganze Volumina in derselben Zeit abgebildet werden, die jetzt für eine einzige zweidimensionale Aufnahme benötigt wird. In Kombination mit STEDD könnten so Schichtbilder mit Auflösungen weit unterhalb des Beugungslimits praktisch ohne Hintergrund aufgenommen werden. Diese bisher unerreichten Geschwindigkeiten bieten dann völlig neue Möglichkeiten, wie z.B. die Verfolgung einzelner Teilchentrajektorien in Echtzeit in drei Dimensionen.

## Literaturverzeichnis

- [1] Beyer, H. *Theorie und Praxis des Phasenkontrastverfahrens* (Akademische Verlagsgesellschaft, Frankfurt am Main, 1965).
- [2] Kubitscheck, U. *Fluorescence microscopy: From principles to biological applications / edited by Ulrich Kubitscheck* (Wiley-Blackwell, Weinheim, 2013).
- [3] Musumeci, G. Past, present and future: Overview on histology and histopathology. *J. Histol. Histopathol.* **1** (2014).
- [4] Lakowicz, J. R. *Principles of fluorescence spectroscopy* (Springer, New York, 2006), 3. Aufl.
- [5] Herschel, J. F. W. On a Case of Superficial Colour Presented by a Homogeneous Liquid Internally Colourless. *Philos. Trans. R. Soc. London, Ser. A* **135**, 143–145 (1845).
- [6] Einstein, A. Zur Quantentheorie der Strahlung. *Mittl. Phys. Gesell. Zürich* **18**, 47–62 (1916).
- [7] Haken, H. & Wolf, H. C. *Molekülphysik und Quantenchemie: Einführung in die experimentellen und theoretischen Grundlagen*. Springer-Lehrbuch (Springer, Berlin and New York, 2006), 5., völlig neubearb. und erw. Aufl.
- [8] Born, M. & Oppenheimer, R. Zur Quantentheorie der Molekeln. *Ann. Phys.* **389**, 457–484 (1927).
- [9] Franck, J. & Dymond, E. G. Elementary processes of photochemical reactions. *Trans. Faraday Soc.* **21**, 536 (1926).
- [10] Jabłoński, A. Über den Mechanismus der Photolumineszenz von Farbstoffphosphoren. *Z. Phys.* **94**, 38–46 (1935).
- [11] Stokes, G. G. On the Change of Refrangibility of Light. *Philos. Trans. R. Soc. London, Ser. A* **142**, 463–562 (1852).
- [12] Reichardt, C. & Welton, T. *Solvents and Solvent Effects in Organic Chemistry* (Wiley-VCH, Weinheim, 2011), 4., aktualis. u. erw. Aufl.
- [13] Baeyer, A. Über eine neue Klasse von Farbstoffen. *Ber. Dtsch. Chem. Ges.* **4**, 555–558 (1871).
- [14] Tpa2067. Cy3 Cy5 dyes.gif. URL [https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Cy3\\_Cy5\\_dyes.gif](https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Cy3_Cy5_dyes.gif).
- [15] invitrogen. Molecular Probes Handbook: A Guide to Fluorescent Probes and Labeling Technologies. URL <https://www.thermofisher.com/de/de/home/references/molecular-probes-the-handbook.html>.

- [16] Harke, B. *et al.* Resolution scaling in STED microscopy. *Opt. Express* **16**, 4154 (2008).
- [17] Meyer, L. *et al.* Dual-color STED microscopy at 30-nm focal-plane resolution. *Small* **4**, 1095–1100 (2008).
- [18] van de Linde, S. *et al.* Direct stochastic optical reconstruction microscopy with standard fluorescent probes. *Nat. Protoc.* **6**, 991–1009 (2011).
- [19] Wurm, C. A. *et al.* Sample preparation for STED microscopy. *Methods Mol. Biol.* **591**, 185–199 (2010).
- [20] Yano, Y. & Matsuzaki, K. Tag–probe labeling methods for live-cell imaging of membrane proteins. *Biochim. Biophys. Acta, Biomembr.* **1788**, 2124–2131 (2009).
- [21] Alivisatos, A. P. Semiconductor Clusters, Nanocrystals, and Quantum Dots. *Science* **271**, 933–937 (1996).
- [22] Michalet, X. *et al.* Quantum dots for live cells, in vivo imaging, and diagnostics. *Science* **307**, 538–544 (2005).
- [23] Derfus, A. M., Chan, W. C. W. & Bhatia, S. N. Probing the Cytotoxicity Of Semiconductor Quantum Dots. *Nano Lett.* **4**, 11–18 (2004).
- [24] Kloepfer, J. A. *et al.* Quantum Dots as Strain- and Metabolism-Specific Microbiological Labels. *Appl. Environ. Microbiol.* **69**, 4205–4213 (2003).
- [25] Zheng, J., Nicovich, P. R. & Dickson, R. M. Highly fluorescent noble-metal quantum dots. *Annu. Rev. Phys. Chem.* **58**, 409–431 (2007).
- [26] Fu, C.-C. *et al.* Characterization and application of single fluorescent nanodiamonds as cellular biomarkers. *PNAS* **104**, 727–732 (2007).
- [27] Arroyo-Camejo, S. *et al.* Stimulated emission depletion microscopy resolves individual nitrogen vacancy centers in diamond nanocrystals. *ACS Nano* **7**, 10912–10919 (2013).
- [28] Shimomura, O., Johnson, F. H. & Saiga, Y. Extraction, Purification and Properties of Aequorin, a Bioluminescent Protein from the Luminous Hydromedusan, Aequorea. *J. Cell. Comp. Physiol.* **59**, 223–239 (1962).
- [29] Kredel, S. *et al.* mRuby, a bright monomeric red fluorescent protein for labeling of subcellular structures. *PLoS One* **4**, e4391 (2009).
- [30] Akerboom, J., Looger, L. L. & Schreier, E. R. *Crystal structure of the engineered fluorescent protein mRuby, crystal form 1, pH 4.5* (2012).
- [31] Nienhaus, G. U. The green fluorescent protein: A key tool to study chemical processes in living cells. *Angew. Chem. Int. Ed.* **47**, 8992–8994 (2008).
- [32] Gerlach, D. *Geschichte der Mikroskopie* (Harri Deutsch, Frankfurt am Main, 2009), 1. Aufl.
- [33] Croft, W. J. *Under the microscope: A brief history of microscopy*, Bd. 5 von *Series in popular science* (World Scientific, Hackensack NJ, 2006).



- [34] Bardell, D. The invention of the microscope. *BIOS* **75**, 78–84 (2004).
- [35] Hecht, E. *Optik*. de Gruyter - Studium (Oldenbourg [u.a.], München, 2014), 6., verb. Aufl.
- [36] Hooke, R., George & George. *Micrographia, or some physiological descriptions of minute bodies made by magnifying glasses, with observations and inquiries thereupon*. By R. Hooke (Printed by Jo. Martyn, London, 1665).
- [37] Abbe, E. Beiträge zur Theorie des Mikroskops und der mikroskopischen Wahrnehmung. *Arch. Mikrosk. Anat.* **9**, 413–418 (1873).
- [38] White, J. G., Amos, W. B. & Fordham, M. An evaluation of confocal versus conventional imaging of biological structures by fluorescence light microscopy. *J. Cell Biol.* **105**, 41–48 (1987).
- [39] Minsky, M. Microscopy apparatus (1961).
- [40] Born, M. & Wolf, E. *Principles of optics: Electromagnetic theory of propagation, interference and diffraction of light / Max Born and Emil Wolf with contributions by A.B. Bhatia ... [et al.]* (Cambridge University Press, Cambridge, 1999), 7. erw. Aufl.
- [41] Airy, G. B. On the Diffraction of an Object-glass with Circular Aperture. *Trans. Camb. Philos. Soc.* **5**, 283–291 (1835).
- [42] Rayleigh. XXXI. Investigations in optics, with special reference to the spectroscope. *Philos. Mag.* **8**, 261–274 (1879).
- [43] Wilhelm, S. *et al.* Die konfokale Laser Scanning Mikroskopie.
- [44] Qian, H. & Elson, E. L. Analysis of confocal laser-microscope optics for 3-D fluorescence correlation spectroscopy. *Appl. Opt.* **30**, 1185–1195 (1991).
- [45] Wilson, T. & Sheppard, C. *Theory and practice of scanning optical microscopy* (Academic, London, 1984).
- [46] Wilson, T. & Carlini, A. R. Size of the detector in confocal imaging systems. *Opt. Lett.* **12**, 227 (1987).
- [47] Hopkins, H. H. The Airy Disc Formula For Systems Of High Relative Aperture. *Proc. Phys. Soc. London* **55** (1943).
- [48] Richards, B. & Wolf, E. Electromagnetic Diffraction in Optical Systems. II. Structure of the Image Field in an Aplanatic System. *Proc. R. Soc. London, Ser. A* **253**, 358–379 (1959).
- [49] Lin, J. *et al.* Fast vectorial calculation of the volumetric focused field distribution by using a three-dimensional Fourier transform. *Opt. Express* **20**, 1060–1069 (2012).
- [50] Chen, B., Zhang, Z. & Pu, J. Tight focusing of partially coherent and circularly polarized vortex beams. *J. Opt. Soc. Am. A* **26**, 862 (2009).
- [51] Binnig, G., Quate, C. F. & Gerber, C. Atomic force microscope. *Phys. Rev. Lett.* **56**, 930–933 (1986).

- [52] Binnig, G. & Rohrer, H. Scanning apparatus for surface analysis using vacuum-tunnel effect at cryogenic temperatures. (1984).
- [53] Ruska, E. The development of the electron microscope and of electron microscopy. *Rev. Mod. Phys.* **59**, 627–638 (1987).
- [54] Hell, S. W. & Wichmann, J. Breaking the diffraction resolution limit by stimulated emission: Stimulated-emission-depletion fluorescence microscopy. *Opt. Lett.* **19**, 780 (1994).
- [55] Klar, T. A. & Hell, S. W. Subdiffraction resolution in far-field fluorescence microscopy. *Opt. Lett.* **24**, 954 (1999).
- [56] Klar, T. A., Engel, E. & Hell, S. W. Breaking Abbe's diffraction resolution limit in fluorescence microscopy with stimulated emission depletion beams of various shapes. *Phys. Rev. E: Stat. Nonlinear Soft Matter Phys.* **64**, 66613 (2001).
- [57] Hell, S. W. Strategy for far-field optical imaging and writing without diffraction limit. *Phys. Lett. A* **326**, 140–145 (2004).
- [58] Westphal, V. & Hell, S. W. Nanoscale resolution in the focal plane of an optical microscope. *Phys. Rev. Lett.* **94**, 143903 (2005).
- [59] Xie, H. *et al.* Analytical description of high-aperture STED resolution with 0-2  $\pi$  vortex phase modulation. *J. Opt. Soc. Am. A* **30**, 1640–1645 (2013).
- [60] Magde, D., Elson, E. & Webb, W. W. Thermodynamic Fluctuations in a Reacting System—Measurement by Fluorescence Correlation Spectroscopy. *Phys. Rev. Lett.* **29**, 705–708 (1972).
- [61] Schwille, P. & Haustein, E. Fluorescence Correlation Spectroscopy: An Introduction to its Concepts and Applications (2002). URL [www.biophysics.org/portals/1/pdfs/education/schwille.pdf](http://www.biophysics.org/portals/1/pdfs/education/schwille.pdf).
- [62] Elson, E. L. 40 years of FCS: How it all began. In Tetin, S. Y. (Herausgeber) *Fluorescence fluctuation spectroscopy (FFS)*, Bd. 518 von *Methods in enzymology*, 0076-6879, 1–10 (Elsevier, Amsterdam, 2013).
- [63] Hess, S. T. & Webb, W. W. Focal Volume Optics and Experimental Artifacts in Confocal Fluorescence Correlation Spectroscopy. *Biophys. J.* **83**, 2300–2317 (2002).
- [64] Dertinger, T. *et al.* Two-focus fluorescence correlation spectroscopy: A new tool for accurate and absolute diffusion measurements. *ChemPhysChem* **8**, 433–443 (2007).
- [65] Cournia, Z. *et al.* Membrane Protein Structure, Function, and Dynamics: A Perspective from Experiments and Theory. *J. Membr. Biol.* **248**, 611–640 (2015).
- [66] Clevers, H. & Nusse, R. Wnt/beta-catenin signaling and disease. *Cell* **149**, 1192–1205 (2012).
- [67] MacDonald, B. T., Tamai, K. & He, X. Wnt/beta-catenin signaling: Components, mechanisms, and diseases. *Dev. Cell* **17**, 9–26 (2009).

- [68] Ries, J., Chiantia, S. & Schwille, P. Accurate Determination of Membrane Dynamics with Line-Scan FCS. *Biophys. J.* **96**, 1999–2008 (2009).
- [69] Petersen, N. O. Scanning fluorescence correlation spectroscopy: I. Theory and simulation of aggregation measurements. *Biophys. J.* **49**, 809–815 (1986).
- [70] Digman, M. A. *et al.* Measuring fast dynamics in solutions and cells with a laser scanning microscope. *Biophys. J.* **89**, 1317–1327 (2005).
- [71] Eggeling, C. *et al.* Direct observation of the nanoscale dynamics of membrane lipids in a living cell. *Nature* **457**, 1159–1162 (2009).
- [72] Hedde, P. N. *et al.* Stimulated emission depletion-based raster image correlation spectroscopy reveals biomolecular dynamics in live cells. *Nat. Commun.* **4**, 2093 (2013).
- [73] Bacia, K., Kim, S. A. & Schwille, P. Fluorescence cross-correlation spectroscopy in living cells. *Nat. Methods* **3**, 83–89 (2006).
- [74] Einstein, A. Über die von der molekularkinetischen Theorie der Wärme geforderte Bewegung von in ruhenden Flüssigkeiten suspendierten Teilchen. *Ann. Phys.* **322**, 549–560 (1905).
- [75] Rigler, R. & Mets, U. Diffusion of single molecules through a Gaussian laser beam. *Proc. SPIE* **1921**, 239 (1992).
- [76] Rigler, R., Widengren, J. & Mets, Ü. Interactions and Kinetics of Single Molecules as Observed by Fluorescence Correlation Spectroscopy. In Wolfbeis, O. S. (Herausgeber) *Fluorescence Spectroscopy*, 13–24 (Springer, Berlin and Heidelberg, 1993).
- [77] Saffman, P. G. & Delbrück, M. Brownian motion in biological membranes. *PNAS* **72**, 3111–3113 (1975).
- [78] Eigen, M. & Rigler, R. Sorting single molecules: Application to diagnostics and evolutionary biotechnology. *PNAS* 5740–5747 (1994).
- [79] Schwille, P., Meyer-Almes, F. J. & Rigler, R. Dual-color fluorescence cross-correlation spectroscopy for multicomponent diffusional analysis in solution. *Biophys. J.* **72**, 1878–1886 (1997).
- [80] Bacia, K. & Schwille, P. Practical guidelines for dual-color fluorescence cross-correlation spectroscopy. *Nat. Protoc.* **2**, 2842–2856 (2007).
- [81] de Jong, L. A. A. *et al.* Receptor-ligand binding assays: Technologies and applications. *J. Chromatogr. B* **829**, 1–25 (2005).
- [82] Attie, A. D. & Raines, R. T. Analysis of Receptor-Ligand Interactions. *J. Chem. Educ.* **72**, 119–124 (1995).
- [83] Berg, J. M. *et al.* Signaltransduktionswege. In Berg, J. M. *et al.* (Herausgeber) *Biochemistry*, 469–498 (Springer, New York, 2017).
- [84] Gao, P. *et al.* Background suppression in fluorescence nanoscopy with stimulated emission double depletion. *Nat. Photonics* **11**, 163–169 (2017).

- [85] Hedde, P. N. *Light Microscopy Beyond the Diffraction Barrier for Live Cell Studies*. Dissertation, Karlsruher Institut für Technologie, Karlsruhe (2013).
- [86] Hense, A. *et al.* Monomeric Garnet, a far-red fluorescent protein for live-cell STED imaging. *Sci. Rep.* **5**, 18006 (2015).
- [87] Dedecker, P. *et al.* Orientational effects in the excitation and de-excitation of single molecules interacting with donut-mode laser beams. *Opt. Express* **15**, 3372 (2007).
- [88] Galiani, S. *et al.* Strategies to maximize the performance of a STED microscope. *Opt. Express* **20**, 7362–7374 (2012).
- [89] Pawley, J. B. (Herausgeber) *Handbook of biological confocal microscopy* (Springer, New York, 2006), 3. Aufl.
- [90] Keller, J., Schönle, A. & Hell, S. W. Efficient fluorescence inhibition patterns for RESOLFT microscopy. *Opt. Express* **15**, 3361 (2007).
- [91] Reuss, M., Engelhardt, J. & Hell, S. W. Birefringent device converts a standard scanning microscope into a STED microscope that also maps molecular orientation. *Opt. Express* **18**, 1049–1058 (2010).
- [92] Hao, X. *et al.* Effects of polarization on the de-excitation dark focal spot in STED microscopy. *J. Opt.* **12**, 115707 (2010).
- [93] Deng, S. *et al.* Effects of primary aberrations on the fluorescence depletion patterns of STED microscopy. *Opt. Express* **18**, 1657–1666 (2010).
- [94] Reuss, M. *Simpler STED setups*. Dissertation, Universität Heidelberg, Heidelberg (2011).
- [95] Wildanger, D. *et al.* A STED microscope aligned by design. *Opt. Express* **17**, 16100–16110 (2009).
- [96] Babcock, H. W. The Possibility of Compensating Astronomical Seeing. *Publ. Astron. Soc. Pac.* **65**, 229 (1953).
- [97] Beckers, J. M. Adaptive Optics for Astronomy: Principles, Performance, and Applications. *Annu. Rev. Astron. Astrophys.* **31**, 13–62 (1993).
- [98] Prunsche, B. *Integration und Anwendung adaptiver Optiken in einem STED Mikroskop zur Untersuchung biophysikalischer Prozesse*. Masterarbeit, Karlsruher Institut für Technologie, Karlsruhe (2015).
- [99] Gould, T. J. *et al.* Adaptive optics enables 3D STED microscopy in aberrating specimens. *Opt. Express* **20**, 20998–21009 (2012).
- [100] Booth, M. J. Adaptive optical microscopy: The ongoing quest for a perfect image. *Light Sci. Appl.* **3**, e165 (2014).
- [101] Milkie, D. E., Betzig, E. & Ji, N. Pupil-segmentation-based adaptive optical microscopy with full-pupil illumination. *Opt. Lett.* **36**, 4206–4208 (2011).

- [102] Gao, P. *et al.* Phase-shift extraction for generalized phase-shifting interferometry. *Opt. Lett.* **34**, 3553–3555 (2009).
- [103] Wildanger, D. *et al.* STED microscopy with a supercontinuum laser source. *Opt. Express* **16**, 9614 (2008).
- [104] Cole, R. W., Jinadasa, T. & Brown, C. M. Measuring and interpreting point spread functions to determine confocal microscope resolution and ensure quality control. *Nat. Protoc.* **6**, 1929–1941 (2011).
- [105] Fourquet, W. Quick Guide to STED Sample Preparation: Updated version including STED lines 592 nm, 660 nm and 775 nm (2014). URL <https://www.leica-microsystems.com/science-lab/quick-guide-to-sted-sample-preparation/>.
- [106] Tetin, S. Y. (Herausgeber) *Fluorescence fluctuation spectroscopy (FFS)*, Bd. volume 518-519 von *Methods in enzymology*, 0076-6879 (Elsevier, Amsterdam, 2013).
- [107] Enderlein, J. *et al.* Statistical analysis of diffusion coefficient determination by fluorescence correlation spectroscopy. *J. Fluoresc.* **15**, 415–422 (2005).
- [108] Honigsmann, A. *et al.* Scanning STED-FCS reveals spatiotemporal heterogeneity of lipid interaction in the plasma membrane of living cells. *Nat. Commun.* **5**, 5412 (2014).
- [109] Kastrop, L. *et al.* Fluorescence fluctuation spectroscopy in subdiffraction focal volumes. *Phys. Rev. Lett.* **94**, 178104 (2005).
- [110] Gao, P. & Nienhaus, G. U. Precise background subtraction in stimulated emission double depletion nanoscopy. *Opt. Lett.* **42**, 831–834 (2017).
- [111] Vicidomini, G. *et al.* Sharper low-power STED nanoscopy by time gating. *Nat. Methods* **8**, 571–573 (2011).
- [112] Vicidomini, G. *et al.* STED with wavelengths closer to the emission maximum. *Opt. Express* **20**, 5225–5236 (2012).
- [113] Lanzanò, L. *et al.* Encoding and decoding spatio-temporal information for super-resolution microscopy. *Nat. Commun.* **6**, 6701 (2015).
- [114] Shaner, N. C., Steinbach, P. A. & Tsien, R. Y. A guide to choosing fluorescent proteins. *Nat. Methods* **2**, 905–909 (2005).
- [115] Giepmans, B. N. G. *et al.* The fluorescent toolbox for assessing protein location and function. *Science* **312**, 217–224 (2006).
- [116] Day, R. N. & Davidson, M. W. The fluorescent protein palette: Tools for cellular imaging. *Chem. Soc. Rev.* **38**, 2887–2921 (2009).
- [117] Chudakov, D. M. *et al.* Fluorescent proteins and their applications in imaging living cells and tissues. *Physiol. Rev.* **90**, 1103–1163 (2010).

- [118] Davidson, M. W. & Campbell, R. E. Engineered fluorescent proteins: Innovations and applications. *Nat. Methods* **6**, 713–717 (2009).
- [119] Hense, A. *Entwicklung eines fern-rot fluoreszierenden Proteins fuer die Anwendung in der hochauflösenden Fluoreszenzmikroskopie*. Dissertation, Karlsruher Institut für Technologie, Karlsruhe (2015).
- [120] Gluzman, Y. SV40-transformed simian cells support the replication of early SV40 mutants. *Cell* **23**, 175–182 (1981).
- [121] Wacker, S. A. *et al.* RITA, a novel modulator of Notch signalling, acts via nuclear export of RBP-J. *EMBO J.* **30**, 43–56 (2011).
- [122] Yildiz, A. *et al.* Kinesin walks hand-over-hand. *Science* **303**, 676–678 (2004).
- [123] Reck-Peterson, S. L. *et al.* Single-molecule analysis of dynein processivity and stepping behavior. *Cell* **126**, 335–348 (2006).
- [124] Heinrich, P. C. & Löffler, G. *Biochemie und Pathobiochemie*. Springer-Lehrbuch (Springer, Heidelberg, 2014), 9., vollst. überarb. Aufl.
- [125] Riedl, J. *et al.* Lifeact: A versatile marker to visualize F-actin. *Nat. Methods* **5**, 605–607 (2008).
- [126] Reisler, E. & Egelman, E. H. Actin structure and function: What we still do not understand. *J. Biol. Chem.* **282**, 36133–36137 (2007).
- [127] Mattila, P. & Lappalainen, P. Filopodia: molecular architecture and cellular functions. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **9**, 446–454 (2008).
- [128] Sagar *et al.* Communication between distant epithelial cells by filopodia-like protrusions during embryonic development. *Development* **142**, 665–671 (2015).
- [129] Stanganello, E. *et al.* Filopodia-based Wnt transport during vertebrate tissue patterning. *Nat. Commun.* **6**, 5846 (2015).
- [130] Coto Hernández, I. *et al.* A new filtering technique for removing anti-Stokes emission background in gated CW-STED microscopy. *J. Biophotonics* **7**, 376–380 (2014).
- [131] Ronzitti, E., Harke, B. & Diaspro, A. Frequency dependent detection in a STED microscope using modulated excitation light. *Opt. Express* **21**, 210–219 (2013).
- [132] Hanne, J. *et al.* STED nanoscopy with fluorescent quantum dots. *Nat. Commun.* **6**, 7127 (2015).
- [133] Scherer, W. F. Studies on the propagation in vitro of poliomyelitis viruses: IV. Viral multiplication in a stable strain of human malignant epithelial cells (strain HELA) derived from an epidermoid carcinoma of the cervix. *J. Exp. Med.* **97**, 695–710 (1953).
- [134] Dörlich, R. M. *et al.* Dual-color dual-focus line-scanning FCS for quantitative analysis of receptor-ligand interactions in living specimens. *Sci. Rep.* **5**, 10149 (2015).
- [135] Ries, J. & Schwille, P. Studying slow membrane dynamics with continuous wave scanning fluorescence correlation spectroscopy. *Biophys. J.* **91**, 1915–1924 (2006).

- [136] García-Sáez, A. J., Carrer, D. C. & Schwille, P. Fluorescence correlation spectroscopy for the study of membrane dynamics and organization in giant unilamellar vesicles. *Methods Mol. Biol.* **606**, 493–508 (2010).
- [137] Kahya, N. *et al.* Probing lipid mobility of raft-exhibiting model membranes by fluorescence correlation spectroscopy. *J. Biol. Chem.* **278**, 28109–28115 (2003).
- [138] Ries, J. & Schwille, P. New concepts for fluorescence correlation spectroscopy on membranes. *PCCP* **10**, 3487–3497 (2008).
- [139] Sinai, P. Correction of optical aberrations by neutron irradiation. *Appl. Opt.* **10**, 99–104 (1971).
- [140] Wood, R. W. *Physical optics* (The Macmillan Company, 1905).
- [141] Žukauskas, A. *et al.* Tuning the refractive index in 3D direct laser writing lithography: Towards GRIN microoptics. *Laser Photonics Rev.* **9**, 706–712 (2015).
- [142] Moughames, J. *et al.* Wavelength-scale light concentrator made by direct 3D laser writing of polymer metamaterials. *Sci. Rep.* **6**, 33627 (2016).
- [143] Moore, D. T. Gradient-index optics: A review. *Appl. Opt.* **19**, 1035–1038 (1980).
- [144] Marchand, E. W. *Gradient index optics* (Academic Press, New York and London, 1978).
- [145] Arnold, C. B., McLeod, E. & Mermillod-Blondin, A. Tunable Acoustic Gradient Index of Refraction Lens and System (2012).
- [146] Theriault, C., Guttenfelder, J. & Arnold, C. B. TAG Lens: Revolutionizing Optical Microscopy With Ultra-High Speed Variable Focus. *Microsc. Microanal.* **20**, 1092–1093 (2014).
- [147] Duocastella, M., Sun, B. & Arnold, C. B. Simultaneous imaging of multiple focal planes for three-dimensional microscopy using ultra-high-speed adaptive optics. *J. Biomed. Opt.* **17**, 050505 (2012).
- [148] Müller, B. K. *et al.* Pulsed interleaved excitation. *Biophys. J.* **89**, 3508–3522 (2005).
- [149] Thews, E. *et al.* Cross talk free fluorescence cross correlation spectroscopy in live cells. *Biophys. J.* **89**, 2069–2076 (2005).
- [150] Ries, J. *Advanced Fluorescence Correlation Techniques to Study Membrane Dynamics*. Dissertation, TU Dresden, Dresden (2008).
- [151] Wohland, T., Rigler, R. & Vogel, H. The Standard Deviation in Fluorescence Correlation Spectroscopy. *Biophys. J.* **80**, 2987–2999 (2001).
- [152] Schaezel, K. & Peters, R. Noise on multiple-tau photon correlation data. *Proc. SPIE* **1430**, 109 (1991).
- [153] Nusse, R. & Clevers, H. Wnt/beta-Catenin Signaling, Disease, and Emerging Therapeutic Modalities. *Cell* **169**, 985–999 (2017).
- [154] Niehrs, C. & Acebron, S. P. Mitotic and mitogenic Wnt signalling. *EMBO J.* **31**, 2705–2713 (2012).

- [155] van Camp, J. K. *et al.* Wnt signaling and the control of human stem cell fate. *Stem Cell Rev.* **10**, 207–229 (2014).
- [156] Sawa, H. Control of cell polarity and asymmetric division in *C. elegans*. *Curr. Top. Dev. Biol.* **101**, 55–76 (2012).
- [157] Semenov, M. V. *et al.* Head inducer Dickkopf-1 is a ligand for Wnt coreceptor LRP6. *Curr. Biol.* **11**, 951–961 (2001).
- [158] Cruciat, C.-M. & Niehrs, C. Secreted and transmembrane wnt inhibitors and activators. *Cold Spring Harbor Perspect. Biol.* **5**, a015081 (2013).
- [159] Bordonaro, M. Chapter 19 Role of Wnt Signaling in the Development of Type 2 Diabetes. In Litwack, G. (Herausgeber) *Insulin and IGFs*, Bd. 80 von *Vitamins and hormones*, 563–581 (Academic Press, Amsterdam and Oxford, 2009).
- [160] Moon, R. T. *et al.* WNT and beta-catenin signalling: Diseases and therapies. *Nat. Rev. Genet.* **5**, 691–701 (2004).
- [161] Anastas, J. N. & Moon, R. T. WNT signalling pathways as therapeutic targets in cancer. *Nat. Rev. Cancer* **13**, 11–26 (2013).
- [162] Ries, J. *et al.* Modular scanning FCS quantifies receptor-ligand interactions in living multicellular organisms. *Nat. Methods* **6**, 643–645 (2009).
- [163] DuBridge, R. B. *et al.* Analysis of mutation in human cells by using an Epstein-Barr virus shuttle system. *Mol. Cell. Biol.* **7**, 379–387 (1987).
- [164] Bafico, A. *et al.* Novel mechanism of Wnt signalling inhibition mediated by Dickkopf-1 interaction with LRP6/Arrow. *Nat. Cell Biol.* **3**, 683–686 (2001).
- [165] Niehrs, C. Function and biological roles of the Dickkopf family of Wnt modulators. *Oncogene* **25**, 7469–7481 (2006).
- [166] Kask, P. *et al.* Fluorescence-intensity distribution analysis and its application in biomolecular detection technology. *PNAS* **96**, 13756–13761 (1999).
- [167] Takamura, K., Fischer, H. & Morrow, N. R. Physical properties of aqueous glycerol solutions. *J. Pet. Sci. Technol.* **98-99**, 50–60 (2012).
- [168] Bouter, A. *et al.* Annexin-A5 assembled into two-dimensional arrays promotes cell membrane repair. *Nat. Commun.* **2**, 270 (2011).
- [169] Boye, T. L. & Nylandsted, J. Annexins in plasma membrane repair. *Biol. Chem.* **397**, 961–969 (2016).
- [170] Verkman, A. S. Solute and macromolecule diffusion in cellular aqueous compartments. *Trends Biochem. Sci* **27**, 27–33 (2002).



# A Anhang

## A.1 Einlesen von TCSPC-Daten in MATLAB

```
%% Read in the Data%%
[fname,pname]=uigetfile('*.spc');
figure()
    for module=1:2 % load data from both modules
        if module==1
            fid=fopen([pname fname],'r+');
        else
            fname2=replace(fname,'m1','m2');
            fid=fopen([pname fname2],'r+');
        end
        fseek(fid,4,-1);
        Data=fread(fid,[32,inf],'*ubit1','ieee-be');
        Data=Data';

%% Split into nFiles Parts
nFiles=10; %# of Files to Split into.. increase if Matlab throws error
length_file=length(Data);
length_fileparts = floor(length_file/nFiles);
Data_temp=Data;

for j = 1:1:nFiles
    Data=Data_temp((j-1)*length_fileparts+1:j*length_fileparts,:);
    if j==10
        Data=Data_temp((j-1)*length_fileparts+1:end,:);
    end

    % Not used after Data_MTOV
    INV=logical(Data(:,25));
    MTOV=logical(Data(:,26));
    % Used after Data_MTOV
    FLAG=logical(Data(:,28));
    P_Flag=logical(double(Data(:,12)).*FLAG);
    L_Flag=logical(double(Data(:,11)).*FLAG);
    F_Flag=logical(double(Data(:,10)).*FLAG);

    photon_there=logical(not(INV.*MTOV));
    num_phot=sum(not(photon_there));
```

```
Data_ADC=[Data(:,29:32) Data(:,17:24)];
Data_MT=[Data(:,13:16) Data(:,1:8)];

% If Invalid = 1, Overflow = 1 and it is NOT an Flag Entry calculate the
% number of overflows

Data_MTOV = uint64(double(bi2de([Data(:,29:32) Data(:,17:24)
Data(:,9:16) Data(:,1:8)], 'left-msb')).*~photon_there.*~FLAG);

    if j == 1
        Sum_Flag=FLAG;
        Sum_P_Flag=P_Flag;
        Sum_L_Flag=L_Flag;
        Sum_F_Flag=F_Flag;
        Sum_photon_there=photon_there;
        Sum_num_phot=num_phot;
        Sum_Data_ADC=Data_ADC;
        Sum_Data_MT=Data_MT;
        Sum_Data_MTOV=Data_MTOV;
        Sum_MTOV=MTOV;
    end
    if j ~= 1
        Sum_Flag=[Sum_Flag; FLAG];
        Sum_P_Flag=[Sum_P_Flag; P_Flag];
        Sum_L_Flag=[Sum_L_Flag; L_Flag];
        Sum_F_Flag=[Sum_F_Flag; F_Flag];
        Sum_photon_there=[Sum_photon_there; photon_there];
        Sum_num_phot=Sum_num_phot+num_phot;
        Sum_Data_ADC=[Sum_Data_ADC; Data_ADC];
        Sum_Data_MT=[Sum_Data_MT; Data_MT];
        Sum_MTOV=[Sum_MTOV; MTOV];
        Sum_Data_MTOV=[Sum_Data_MTOV; Data_MTOV];
    end
end

FLAG=Sum_Flag;
P_Flag=Sum_P_Flag;
L_Flag=Sum_L_Flag;
F_Flag=Sum_F_Flag;
photon_there=Sum_photon_there;
num_phot=Sum_num_phot;
Data_ADC=Sum_Data_ADC;
Data_MT=Sum_Data_MT;
Data_MTOV=Sum_Data_MTOV;
MTOV=Sum_MTOV;

j=2;
% if there is a photon + MT_overflow or a flag + MT_overflow it has to be
% counted in addition otherwise just read out ne number of overflows
for j=2:length_file
    Data_MTOV(j)=Data_MTOV(j-1)+Data_MTOV(j)+
```

```
uint64(logical(MTOV(j))&photon_there(j))+uint64(logical(MTOV(j))&FLAG(j));
end

Photons=[uint64(bi2de(Data_MT,'left-msb'))+4096*Data_MTOV
4095-uint64(bi2de(Data_ADC,'left-msb'))];

    if module==1
        Photons_M1_raw = Photons;
    else
        Photons_M2_raw = Photons;
    end

Photons=Photons(logical(photon_there.*~FLAG),:);
Photons_wo_Markers = Photons(Photons(:,2)~=0,:);
```

## A.2 Aufteilen der Photonen nach ihrer Ankunftszeit am Detektor

```
[N,edges]=histcounts(Photons(:,2),4096);
plot(N)

    if module==1
        Photons_M1=Photons_wo_Markers;
        M1_L_FLAG=L_Flag;
        real_photon_m1=photon_there.*~FLAG;
    else
        Photons_M2=Photons_wo_Markers(:,1);
        M2_L_FLAG=L_Flag;
        real_photon_m2=photon_there.*~FLAG;
    end
end

[~,name,~]=fileparts(fname);
save([pname name '_photons.mat'],'Photons_wo_Markers')

sep_time = 3500;

temp1 = find(Photons_M1_raw(:,2)<sep_time&M1_L_FLAG==0);
temp2 = find(Photons_M1_raw(:,2)>sep_time&M1_L_FLAG==0);

Photons_M1_raw_b = Photons_M1_raw;
Photons_M1_raw_b(temp1,2)=0;
Photons_M1_raw_r = Photons_M1_raw;
Photons_M1_raw_r(temp2,2)=0;
```

## A.3 Erzeugung des Pseudobildes

```

pixel_number = 100;
offset=60;

image_m1_r = make_pseudo_image(Photons_M1_raw_r,
M1_L_FLAG,real_photon_m1,pixel_number,offset);
image_m1_b = make_pseudo_image(Photons_M1_raw_b,
M1_L_FLAG,real_photon_m1,pixel_number,offset);
image_m2 = make_pseudo_image(Photons_M2_raw,
M2_L_FLAG,real_photon_m2,pixel_number,offset);

%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%
function [pseudo_image] = make_pseudo_image(Photons, L_Markers,
real_photon,pixel_number,offset)

%% Getting Data and removing entries that are wether L-Markers nor Photons..
%% IDEA: for PIE Splitting just set Microtime to 0
%% for elements that should not be regarded..

real_photon = real_photon + L_Markers;
no_photon = find(Photons(:,2)==0|real_photon==0);
Photons_1D = Photons(:,1);
clear Photons
Photons = Photons_1D;

Photons(no_photon)=[];
L_Markers(no_photon)=[];

temp=Photons.*uint64(L_Markers); % vector with 0 for photons or MT for L-Markers
findings=find(Photons(:,1)==temp(:,1)); %vector with indexes of every line marker

%% Maximum amount of Photons per Line
findings(end+1)=0;
findings(2:end,2)=findings(1:end-1,1);
findings(:,3)=findings(:,1)-findings(:,2);
max_phot_per_line=max(findings(:,3));
%% Refolding Data into Matrix with lines as real lines and all photons MTs
% NaN will be ignored by histcounts..
refolded=NaN(length(findings),max_phot_per_line+1);

% fold data into array, each line correspondents to one line
for j = 1:length(findings)
%in the scan, MT of photons is the value of the single elements
    if j == 1
        refolded(j,1:findings(j,3))=Photons(1:findings(j,1),1);
    else

```

```
        refolded(j,1:findings(j,3)+1)=Photons(findings(j-1,1):findings(j,1),1);
    end
end
%% Calculating usefull bin edges (100 Pixel,
%% from one L-Marker to the next) and binning data to generate image
bin_dist=double(Photons(L_Markers));
bin_dist(end+1)=0;
bin_dist(2:end,2)=bin_dist(1:end-1,1);
bin_dist(:,3)=bin_dist(:,1)-bin_dist(:,2);

edges = uint64(zeros (length(findings),pixel_number+1));
for l=1:length(findings)
edges(l,:) = linspace (bin_dist(l,2)+1,bin_dist(l,1)-1,pixel_number+1);
end

pseudo_image = uint8(zeros(length(findings),pixel_number));
for k = 1:length(findings)-1
pseudo_image(k,:)=histcounts(refolded(k,:),edges(k,:));
end

temp_image=reshape(pseudo_image',[],1);
temp_image=temp_image(1+offset:end);
temp_image=temp_image(1:end-pixel_number+offset);
pseudo_image=reshape(temp_image,pixel_number,[])';

%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%

display_bin = 10;

subplot(2,2,1)
% Display hist image..
image_new=zeros(floor((length(image_m1_r))/display_bin),pixel_number);
for jj=1:floor((length(image_m1_r))/display_bin)
image_new(jj,:)=single(sum(image_m1_r(display_bin*(jj-1)+
1:display_bin*(jj-1)+display_bin,:)));
end
imagesc(image_new)
title('M1 early');
subplot(2,2,2)
% Display hist image..
image_new=zeros(floor((length(image_m1_b))/display_bin),pixel_number);
for jj=1:floor((length(image_m1_b))/display_bin)
image_new(jj,:)=single(sum(image_m1_b(display_bin*(jj-1)+
1:display_bin*(jj-1)+display_bin,:)));
end
imagesc(image_new)
title('M1 late');
subplot(2,2,3)
```

```
% Display hist image..
image_new=zeros(floor((length(image_m2))/display_bin),pixel_number);
for jj=1:floor((length(image_m2))/display_bin)
image_new(jj,:)=single(sum(image_m2(display_bin*(jj-1)+
1:display_bin*(jj-1)+display_bin,:)));
end
imagesc(image_new)
title('M2');
toc
CombinedData.red_1=uint8(image_m1_r);
CombinedData.red_2=uint8(image_m1_b);
CombinedData.green_1=uint8(image_m2);
CombinedData.green_2=uint8(image_m2);
% CombinedData.pixdwell=pixel_dwell;

save([pname name '_combined.mat'],'CombinedData')
```





## B Publikationsliste

- Hense, A., Prunsche, B., Gao, P., Ishitsuka, Y., Nienhaus, K., Nienhaus, G. U.: **Monomeric Garnet, a far-red fluorescent protein for live-cell STED imaging** *Scientific Reports* **5** (2015) 18006.
- Gao, P.\*, Prunsche, B.\*, Zhou, L., Nienhaus, K., Nienhaus, G. U.: **Background suppression in fluorescence nanoscopy with stimulated emission double depletion** *Nature Photonics* **11** (2017) 163-169
- Gao, X., Gao, P., Prunsche, B., Nienhaus, G. U.: **Pulsed interleaved excitation-based line scanning raster image correlation spectroscopy (PIE-lsRICS)** *submitted*
- Mattes, B., Dang, Y., Greicius, G., Kaufmann, I., Oezbek, S., Prunsche, B., Rosenbauer, J., Stegmaier, J., Mikut, R., Nienhaus, G.U., Schug, A., Virshup, D., Scholpp, S.: **Cytonemes bridge Wnt autocrine and paracrine signaling systems** *submitted*

\*: *These authors contributed equally to the work.*



## C **Betreute Abschlussarbeiten**

- Patrick Stypa:  
**Zweifarbzweifokus-Linienraster-Fluoreszenzkorrelationsspektroskopie: Optimierung, Charakterisierung und Anwendung an biologischen Proben**  
Masterarbeit, 2016
- Julian Ferrero:  
**Erprobung einer STED-basierten Methode der Fokusmodulationsmikroskopie**  
Bachelorarbeit, 2016
- Jan Otto Wolff:  
**Kombination von höchstauflösender STED Nanoskopie und Linienraster Fluoreszenzkorrelationsspektroskopie zur Messung von Diffusionsprozessen in Membranen**  
Masterarbeit, 2018



## D Danksagungen

### **Prof. Gerd Ulrich Nienhaus**

Vielen Dank für die Ausbildung die ich während meiner Bachelor-, Master- und auch Doktorarbeit bei Ihnen genießen durfte. Die Mittel und Möglichkeiten, die uns in Ihrer Arbeitsgruppe zur Verfügung stehen, erlauben es, uns uneingeschränkt auf unsere wissenschaftliche Arbeit zu konzentrieren. Besonders möchte ich hervorheben, dass Sie sich immer viel Zeit genommen haben, um Fragestellungen und Probleme zu diskutieren, was ich immer sehr geschätzt habe.

### **Prof. Martin Wegener**

Vielen Dank für die Bereitschaft, sich trotz eines vollen Terminkalenders als Zweitgutachter zur Verfügung zu stellen.

### **Peng Gao**

Thank you so much for the great and close collaboration. I have learned so much from you and most of this work wouldn't have been possible without you. I wish you all the best for your future career as well-deserved Professor Peng Gao!

### **Otto, Patrick, Julian**

Vielen Dank an *meine Studenten* und im Besonderen an Otto für die erfolgreiche und angenehme Zusammenarbeit. Ich konnte viel von euch lernen und hoffe, euch auch etwas mit auf den Weg gegeben zu haben. Eure Mitarbeit war eine große Hilfe und hat die Dissertation in dieser Form erst möglich gemacht.

### **Anika, Antonia**

Vielen Dank euch beiden für die erfolgreiche Zusammenarbeit. Eure Expertise, vor allem in der Präparation biologischer Proben, hat viele hier gezeigte Untersuchungen ermöglicht.

### **Christoph**

Vielen Dank für die Unterstützung - du standest mir immer mit Rat und Tat zur Seite. Deine kollegiale und nette Art hat dich zu einem sehr angenehmen Büropartner und Kollegen gemacht, der sehr vermisst wird.

### **AG Nienhaus**

Vielen Dank an alle aktuellen und auch ehemaligen Kollegen. Sowohl bei wissenschaftlichen Fragestellungen aber auch an geselligen Abenden habe ich die Zusammenarbeit immer sehr genossen.

**Die "Physiker": Andi, Clemens, Heiner, Jochen, Steffen und Max**

Ohne eure Freundschaft und Unterstützung in den letzten 10 (und hoffentlich noch vielen weiteren) Jahren wäre ich sicherlich nicht in der Situation, gerade eine Danksagung verfassen zu dürfen.

**Meine Eltern**

Abgesehen davon, dass es auch biologisch unmöglich wäre, ohne euch hier zu sein, habt ihr mich mein ganzes Leben bedingungslos unterstützt und damit alles hier erst ermöglicht. Vielen Dank!