

**Konzeptentwicklung eines Speckle-Mikroskops zur Untersuchung  
pathophysiologischer Veränderungen durch humane Autoantikörper  
gegen den NMDA-Rezeptor**

**Dissertation  
Zur Erlangung des akademischen Grades  
Doktoringenieur(Dr.-Ing.)**

**vorgelegt der Fakultät für Informatik und Automatisierung  
der Technischen Universität Ilmenau**

**von Master of Engineering Lars Schmidl**

1. Gutachter Prof. Dr.-Ing. habil. Jens Haueisen (TU Ilmenau)
2. Gutachter Prof. Dr. med. Christian Geis (Universitätsklinikum Jena)
3. Gutachter Prof. Dr. Markus Sauer (Universität Würzburg)

Tag der Einreichung: 19.01.2022  
Tag der wissenschaftlichen Aussprache: 21.07.2022

DOI: 10.22032/dbt.53194  
URN: urn:nbn:de:gbv:ilm1-2022000304

## Kurzzusammenfassung

Die vorliegende Arbeit befasst sich mit dem Krankheitsbild der NMDA-Rezeptor Enzephalitis und der Entwicklung neuartiger Technologien, mit dem Ziel weitere tiefgreifende Erkenntnisse im Zusammenhang mit dieser Autoimmunerkrankung zu gewinnen.

In einem ersten Schritt werden für die Untersuchungen etablierte höchstauflösende Fluoreszenz-Mikroskopieverfahren aus dem Bereich der Lokalisationsmikroskopie eingesetzt. Hierbei kommen spezielle rekombinante monoklonale Patienten aAK gegen die NR1-Untereinheit des NMDA-Rezeptors zur Anwendung. Durch die Lokalisationsmikroskopie wird die synaptische Rezeptordichte quantifiziert und somit die Auswirkung der aAK auf die Rezeptormorphologie untersucht. Zusätzlich dazu wurde die Messung mittels Lokalisationsmikroskopie in einen  $10\ \mu\text{m}$  coronalen Hirnschnitt einer Maus etabliert, um so den nächsten Schritt für experimentelle Tierversuche vorzubereiten. Mit Hilfe der genutzten höchstauflösenden Mikroskopiemethoden konnte auch die Spezifität der rekombinanten monoklonalen Patienten aAK nachgewiesen werden. Als ein hervorzuhebendes Resultat der umfangreichen Untersuchungen nach Preinkubation mittels rekombinanter monoklonaler Patienten aAK wurde eine signifikante Abnahme der synaptischen Rezeptordichte ermittelt.

Um die gefundenen Erkenntnisse auf Basis der Lokalisationsmikroskopie auch auf Lebzellmessungen zu übertragen und zu untermauern, war es notwendig, ein neuartiges höchstauflösendes Mikroskop im Labor zu etablieren. Dieses Mikroskop arbeitet auf Basis einer speziellen Art der strukturierten Beleuchtungsmikroskopie und ermöglicht somit die Messung lebender Zellen. Als Beleuchtungsmuster wurden sogenannte Speckle verwendet. Dadurch konnte ein kosteneffizienter Aufbau realisiert werden, welcher im Bereich von wenigen Sekunden ein höchstaufgelöstes Bild aufnimmt. Die gezeigte Auflösung war im Bereich von etablierten Verfahren der strukturierten Beleuchtungsmikroskopie.

Auf Grundlage des entwickelten Mikroskops wurde ein Patent eingereicht und angenommen. Das Patent befasst sich mit der Möglichkeit die effektive Beleuchtungsfläche der Speckle durch die Nutzung von verschiedenen physikalischen Effekten zu reduzieren. Somit kann der Detektionsbereich verkleinert werden und im Idealfall in einem Einzelmolekül-Regime genutzt werden. Das eingereichte Patent überführt deshalb viele Varianten der höchstauflösenden Mikroskopie aus dem Bereich der scannenden Verfahren in den Bereich der Weitfeldmikroskopie und verbindet dem entsprechend auch die Stärken beider Verfahrensbereiche. Es wurde durch Simulationen gezeigt, dass es bei allen Varianten zu

einer Reduzierung der effektiven Beleuchtungsfläche kommt, und somit eine bessere höchstauflöste Rekonstruktion als bei der normalen Strukturierten Beleuchtungsmikroskopie ermöglicht.

In einem weiteren Punkt der vorliegenden Arbeit wird eine neuartige Kombinationsmöglichkeit von funktionellen Messungen in Form von Multi-Elektroden-Arrays (MEA) und morphologischen Messungen entwickelt. Das hier gezeigte ultradünne ( $< 100$  nm) und hochtransparente ( $T > 85\%$ ) MEA resultiert in einem Design und einer Materialkombination, so dass es für eine solche Verfahrenskombination eingesetzt werden kann. Es konnte gezeigt werden, dass es bei Untersuchungen mit der Lokalisationsbasierten Mikroskopiemethodik zu keinen Einflüssen auf die optischen Ergebnisse kommt und die Oberflächeneigenschaften durch ihre Spezifität Anwendungsvorteile bringen.

## Abstract

The present thesis deals with the clinical syndrome of NMDA receptor encephalitis and the development of novel technologies, with the aim to gain further in-depth knowledge in the context of this autoimmune disease.

In a first step, established super-resolution fluorescence microscopy techniques from the field of localization microscopy were used for the investigations. For this purpose specific recombinant monoclonal patient aAK against the NR1 subunit of the NMDA receptor were applied. Localization microscopy quantifies synaptic receptor density and thus investigates the effect of aAK on receptor morphology. In addition to this, measurements by using localization microscopy were established in a 10  $\mu\text{m}$  coronal brain slice of a mouse to prepare the next step for experimental animal studies. With the help of the super-resolution microscopy methods used, the specificity of the recombinant monoclonal patient aAK can also be demonstrated. A significant decrease in synaptic receptor density was determined as a result of the investigations after preincubation with recombinant monoclonal patient aAK.

In order to transfer and substantiate the findings based on the localisation microscopy to live cell measurements, it was necessary to establish a new type of super-resolution microscope in the laboratory. This microscope works on the principle of a special type of structured illumination microscopy and thus enables the measurement of living cells. As illumination patterns, speckles were used. This made it possible to realize a cost-efficient set-up that takes a super-resolution image in the range of a few seconds. The resolution shown was in the range of established methods of structured illumination microscopy.

A patent was filed and approved on the basis of the microscope that was developed. The patent deals with the possibility of reducing the effective illumination area of the speckle by using several physical effects. Thus, the detection area can be reduced and optimally it can be used in a single molecule regime. The patent presented here therefore transfers many types of super-resolution microscopy from the field of scanning methods to the field of wide-field microscopy, and thus combining the strengths of both techniques. It has been shown by simulations that a reduction of the effective illumination area occurs in all variants, thus enabling a better super-resolution reconstruction than with the normal structured illumination microscopy.

In a further part of the thesis, a novel combination of functional measurements in the form of multi-electrode arrays (MEA) and morphological measurements was developed.



The ultra-thin ( $< 100$  nm) and highly transparent ( $T > 85\%$ ) MEA shown here results in a design and material combination allowing it to be used for such a combination. It has been demonstrated that investigations with the localisation-based microscopy technique do not affect the optical results and that the surface properties bring application advantages due to their specificity.

## Abkürzungsverzeichnis

aAK	Auto-Antikörper
AChR	Acetylcholin-Rezeptor
AMPA	$\alpha$ -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid
AP	Aktionspotential
ATD	Aminoterninale Domäne
BBO-Kristall	$\beta$ -Bariumborat Kristall
BP	Bandpass
$C_L$	Konstanten Domäne
$Ca^{2+}$	Calcium-Ion
CCD / EMCCD	(Electron multiplying) charge-coupled device
CPP	3-(2-Carboxypiperazin-4-yl)propyl-1-phosphonic acid
CSF	Cerebrospinalflüssigkeit / Liquor
ddH <sub>2</sub> O	doppelt destilliertes Wasser
DIL	1,1'-Dioctadecyl-3,3,3',3'-Tetramethylindocarbocyanine Perchlorate
div	Day in vitro
EPI	Epifluoreszenz
Fab	Fragment antigen binding
Fc	crystallizable fragment / constant fragment
FLIM	Fluorescence lifetime imaging microscopy
FT	Strahlteiler
FWHM	Full width of half maximum
HEK 293	Humane embryonale Nierenzellen
Ig	Immunglobulin
ITO	Indium tin oxide
$K^+$	Kalium-Ion
LBD	Liganden-Bindungs-Domäne
LEMS	Lambert-Eaton-myasthenes Syndrom
LGI1	Leucine-rich glioma-inactivated Protein
LSM	Laserrastermikroskop ( <i>engl. Laser Scanning Mikroskop</i> )
MEA	mercaptoethylamine
MEA	Multi-Elektroden-Array

MG	Myastenia gravis
MgF <sub>2</sub>	Magnesiumfluorid
Mg <sup>2+</sup>	Magnesium-Ion
MK801	Dizocilpine
M-SBL	multiple-sparse Bayesian learning
NA	Numerische Apertur
Na <sup>+</sup>	Natrium-Ion
NIR	Nahes Infrarot
NMDA	N-Methyl-D-Aspartat
NTD	N-terminale Domäne
PALM	Photoactivation localization microscopy
PNS	Paraneoplastisches neurologisches Syndrom
PSD	Postsynaptische Dichte
PSF	Point-spread-function / Punktspreizfunktion
PSP / EPSP / IPSP	(exzitatorisches / inhibitorisches) postsynaptisches Potential
QDot	Quantumdot
REM	Rasterelektronenmikroskop
RESOLFT	Reversible saturable optical lineare (fluorescence) transitions
ROI	Region of Interest
S <sub>n</sub>	Singlett-Zustand
SEV	Sekundärelektronenvervielfacher
SHG	Frequenzverdopplung ( <i>engl. second harmonic generation</i> )
SIM	Structured illumination microscopy
SLM	Spatial light modulator
SMLM	Einzelmolekül Lokalisations-Mikroskopie ( <i>engl. single-molecule localisation microscopy</i> )
SNR	Signal-zu-Rauschverhältnis ( <i>engl. signal to noise ratio</i> )
SRM	Super-resolution microscopy
STED	Stimulated emission depletion
STORM / dSTORM	( <i>direct</i> ) Stochastic optical reconstruction microscopy
Ti:Sa / Ti:Saphire	Titan:Saphire

$T_n$	Triplet-Zustand
TMD	Transmembrandomäne
$V_L$	Variable Domäne
VGCC / VGKC	Spannungsgesteuerte Calcium- / Kalium-Kanäle
XRD	Röntgendiffraktometrie ( <i>engl. X-Ray Diffraction</i> )
ZNS	Zentrales Nervensystem

## Physikalische Größen und Symbole

A	Amplitude
D	Durchmesser der Oberfläche
$d_{\min}$	minimalster auflösbarer Abstand zweier Punkte
$E_n / \Delta E$	Energiezustand / Energieabstand zweier Energiezustände
$f_B$	Blendenfunktion
$\Delta h$	Höhendifferenz der Oberfläche
I	Intensität
K	Specklekontrast
$\vec{k}$	Wellenzahlvektor
N	Anzahl der detektierten Photonen
$n / \Delta n$	Brechzahl eines optischen Mediums / Brechzahldifferenz
NA	Numerische Apertur eines optischen Systems
z	Abstand zur Oberfläche
$\alpha$	Öffnungswinkel eines optischen Systems
$\Gamma_{xy}$	Kreuzkorrelationsfunktion
$\Gamma_{xx}$	Autokorrelationsfunktion
$\gamma$	Kohärenzgrad
$\Phi$	Phasenfunktion
$\Delta\varphi$	Phasenunterschied / Phasenverschiebung
$\lambda$	Wellenlänge der elektro-magnetischen Strahlung
$\sigma$	Standardabweichung
$\tau$	Zeitdifferenz

# Inhaltsverzeichnis

<b>Abkürzungsverzeichnis</b>	<b>I</b>
<b>Symbolverzeichnis</b>	<b>III</b>
<b>1 Einleitung</b>	<b>1</b>
<b>2 Höchstauflösende Mikroskopie im Bereich der NMDA-Rezeptor Enzephalitis</b>	<b>8</b>
2.1 Einleitung . . . . .	8
2.2 Methoden . . . . .	13
2.2.1 Zellkulturpräparation von primären hippocampalen Neuronen . . . . .	13
2.2.2 Präparation von Hirnschnitten . . . . .	14
2.2.3 Immunhistochemische Färbungen von biologischen Proben . . . . .	14
2.2.4 Aufbau und Funktionsweise des Zeiss Elyra P.1 Systems (SMLM) . . . . .	15
2.2.5 Analysemethoden zur Kolokalisation von lokalisationsbasierten Mi- kroskopieverfahren . . . . .	21
2.3 Ergebnisse . . . . .	22
2.3.1 Etablierung der Antikörperfärbung von synaptischen Markern . . . . .	22
2.3.2 Etablierung der Antikörperfärbung von NMDA-Rezeptoren . . . . .	24
2.3.3 Untersuchung der synaptischen NMDAR Expression in primären hippocampalen Neuronen - quantitative Analyse mittels <i>d</i> STORM . . . . .	26
2.4 Diskussion . . . . .	27
<b>3 Strukturierte Beleuchtungsmikroskopie auf Basis einer Specklebeleuchtung</b>	<b>31</b>
3.1 Einleitung . . . . .	31
3.2 Methoden . . . . .	38
3.2.1 Zellkulturpräparation für die Speckle-Mikroskopie . . . . .	38
3.2.2 Herstellung von Teststrukturen für die Fluoreszenzmikroskopie . . . . .	38
3.2.3 Pyrometrische Leistungsmessung . . . . .	38
3.2.4 Gitterspektrometer . . . . .	39
3.2.5 Aufbau und Funktionsweise des Zeiss Elyra 7 Systems (lattice-SIM) . . . . .	39
3.2.6 Modell-Sparse Bayesian Learning Algorithmus (M-SBL) . . . . .	40
3.3 Ergebnisse . . . . .	41
3.3.1 Charakterisierung der Laserquellen . . . . .	41
3.3.2 Kamera Kalibrierung . . . . .	43

3.3.3	Bestimmung der Specklegröße . . . . .	46
3.3.4	Bestimmung der Specklebewegung in Abhängigkeit von Drehzeit und angelegter Spannung . . . . .	54
3.3.5	Bestimmung der Specklebewegung in Abhängigkeit von der Ruhezeit $t_{\text{ruh}}$ . . . . .	57
3.3.6	Erweiterung auf ein Immersions-Objektiv ( <i>63x Wasser</i> ) . . . . .	59
3.3.7	Untersuchung der Rekonstruktion von Teststrukturen . . . . .	61
3.3.8	Vergleich verschiedener Systeme nach Strukturauflösung und Ein- satzgebiet . . . . .	63
3.4	Diskussion . . . . .	64
<b>4</b>	<b>Flächenreduktion von effektiven Beleuchtungsmustern im Konzeptsystem</b>	<b>80</b>
4.1	Einleitung . . . . .	80
4.2	Methoden . . . . .	82
4.2.1	Übertragung der 2-Photonenabsorption-Mikroskopie auf das Kon- zeptsystem . . . . .	82
4.2.2	Übertragung der STED-Mikroskopie auf das Konzeptsystem . . . . .	86
4.2.3	Übertragung der RESOLFT-Mikroskopie auf das Konzeptsystem . . . . .	89
4.3	Ergebnisse . . . . .	91
4.3.1	Simulation zur 2-Photonenabsorption-Mikroskopie . . . . .	91
4.3.2	Simulation zur STED-Mikroskopie . . . . .	94
4.3.3	Simulation zur RESOLFT-Mikroskopie . . . . .	95
4.4	Diskussion . . . . .	98
4.4.1	2-Photonenabsorption-Mikroskopie . . . . .	98
4.4.2	STED-Mikroskopie . . . . .	100
4.4.3	RESOLFT-Mikroskopie . . . . .	102
<b>5</b>	<b>Multi-Elektroden-Arrays für die höchstauflösende Mikroskopie</b>	<b>104</b>
5.1	Einleitung . . . . .	104
5.2	Methoden . . . . .	109
5.2.1	Verwendete Beschichtungsverfahren . . . . .	109
5.2.2	Verwendetes Strukturierungsverfahren . . . . .	112
5.2.3	Verfahren zur Struktur- und Oberflächencharakterisierung . . . . .	114
5.2.4	Verfahren zur optischen Charakterisierung . . . . .	118
5.2.5	Verfahren zur elektrischen Charakterisierung . . . . .	119

5.3	Ergebnisse . . . . .	119
5.3.1	Strukturcharakterisierung der MEAs . . . . .	119
5.3.2	Untersuchung der optischen Eigenschaften der MEAs . . . . .	123
5.3.3	Darstellung der elektronischen Eigenschaften der MEAs . . . . .	124
5.4	Diskussion . . . . .	125
5.5	Ausblick . . . . .	129
<b>6</b>	<b>Zusammenfassende Diskussion</b>	<b>131</b>
<b>7</b>	<b>Anhang</b>	<b>137</b>
	<b>Literatur</b>	<b>142</b>

## 1 Einleitung

Die Mikroskopie spielt in vielen Bereichen der biologischen und medizinischen Forschung sowie als Untersuchungsmethode zur Diagnose und Behandlung von Krankheiten eine große Rolle. Durch die ersten Mikroskope, welche 1637 von Antony van Leeuwenhoek (1632 - 1732) entwickelt wurden, konnten zum Beispiel schon Karies, der Aufbau von Früchten oder Samen sowie verschiedenste tierische Augen untersucht werden. Des Weiteren wurden 1882 durch Robert Koch (1843 - 1910) mit Hilfe der Mikroskopie die Erreger der Tuberkulose nachgewiesen. Diese und viele andere Entdeckungen waren nur durch die Weiterentwicklung von mikroskopischen Verfahren möglich. Eine der bedeutendsten Neuerungen in der Mikroskopie wurde durch Carl Zeiss (1816 - 1888), Otto Schott (1851 - 1935) und Ernst Abbe (1840 - 1905) im 19. Jahrhundert vorangetrieben. Durch die von Ernst Abbe beschriebene Auflösungsformel [1, 2] konnte erstmals die Auflösung eines Mikroskops definiert werden. Des Weiteren war es z.B. durch Ernst Abbe möglich, die chromatische Aberration von Mikroskopen zu berechnen und auf dieser Basis diese zu korrigieren. In demselben Jahrhundert wurde auch die sogenannte Köhlersche Beleuchtung durch August Köhler (1866 - 1948) in der Firma Zeiss entwickelt. Diese ermöglichte eine homogene Ausleuchtung des Präparates und somit eine Minimierung des Einflusses der unterschiedlichen Kontraste bei der Mikroskopie. Weiterhin wurde auch die Präparation von biologischen Objekten durch die Entwicklung von histologischen Färbungen durch Joseph von Gerlach (1820 - 1896) optimiert. Jedoch war die Auflösung der normalen Lichtmikroskopie, wie durch Abbe beschrieben, begrenzt und somit konnten kleinste biologische Strukturen im nm oder  $\mu\text{m}$  Bereich, wie zum Beispiel Viren, nicht dargestellt werden. Diese Auflösungseinschränkung hat sich mit der Entwicklung des ersten Elektronenmikroskops durch Ernst Ruska (1906 - 1988) und Max Knoll (1897 - 1969) im Jahre 1931 geändert [3]. Gleichzeitig wurde in der ersten Hälfte des 20. Jahrhunderts die Fluoreszenzmikroskopie entwickelt, bei der die Strukturen mit Fluorophore markiert und diese zur Fluoreszenz angeregt werden. Hierbei spielt das von Lord John William Strutt Rayleigh definierte Auflösungskriterium für selbstleuchtende Objekte eine bedeutende Rolle [4]. Weiterentwicklungen von einfachen Fluoreszenzmikroskopen, wie dem Laser-Scanning-Mikroskop oder dem Multi-Photonen-Fluoreszenzmikroskop, führten zur Signaldetektion aus tiefer liegenden Geweberegionen und somit zu einem umfassenderen Erkenntnisgewinn in der biomedizinischen Forschung. Dies ermöglichte gerade in den Neurowissenschaften neue Einblicke um Krankheitsbilder besser verstehen zu können. In den 1990er Jahren kam es zu einer weiteren Entwicklung



im Bereich der Fluoreszenzmikroskopie, der sogenannten höchstauflösenden Mikroskopie (engl. Super-resolution microscopy) [5, 6]. Durch diese Verfahren ist es nun möglich, in Auflösungsbereiche von Nanometern mit einfachen Fluoreszenzmarkierungen vorzudringen, für die früher ein Elektronenmikroskop benötigt wurde [7]. Durch die höchstauflösenden Mikroskopie-Verfahren war es nun zum Beispiel möglich, kleinste biologische Strukturen wie Rezeptoren, welche in vielen Krankheitsbildern eine entscheidende Rolle spielen, zu untersuchen.

Die höchstauflösende Fluoreszenzmikroskopie hat sich in den letzten Jahren zu einem äußerst wesentlichen Bestandteil bei der Analyse von (zell-) biologischen Fragestellungen entwickelt [7, 8, 9]. Im Feld dieser Mikroskopieart wurden im letzten Jahrzehnt unterschiedlichste Techniken in verschiedenen Anwendungsbereichen etabliert. Diese Techniken kann man grundsätzlich in zwei große Bereiche unterteilen.

Einer der Bereiche ist die strukturierte Beleuchtungsmikroskopie. Hierzu zählt das Weitfeldverfahren der strukturierten Beleuchtungsmikroskopie (engl. *structured illumination microscopy (SIM)*). Bei diesem Verfahren wird durch Vorwissen über die verwendeten Beleuchtungsstrukturen eine Mehrinformation aus den Aufnahmen gewonnen. Die Verwendung einer Beleuchtungsstruktur mit bekannten Eigenschaften ermöglicht die Aufnahme von Ortsfrequenzen, die im klassischen mikroskopischen Verfahren nicht verwertet werden können [6]. Zu diesem Zweck müssen aber bekannte, d. h. gut determinierte, Strukturen in den Objektraum projiziert und anschließend die Aufnahmen durch entsprechende Algorithmen so zerlegt werden, dass die höheren Ortsfrequenzen wieder eindeutig zugeordnet werden können. Ferner können im Objektraum höhere harmonische Frequenzen erzeugt und die Beleuchtungsstruktur somit wesentlich verkleinert werden, was wiederum zu einer Erhöhung der Auflösung führt [10]. In einer weiteren Entwicklungsetappe dieser strukturierten Beleuchtungsverfahren werden auch nicht bekannte Beleuchtungsstrukturen verwendet [11, 12, 13]. Hier sind die Auswertungsalgorithmen allerdings aufwendiger als beim SIM-Verfahren mit bekannten Strukturen.

Durch eine spezielle Weitfeldbeleuchtung, die ein nichtlineares Antwortverhalten der Fluorophore hervorruft, lässt sich ebenfalls die Auflösung weiter verbessern [14]. Die Probe wird hierbei mit Licht beleuchtet, dessen Intensität sinusförmig variiert, wobei die maximale Intensität nahe der Aktivierungsschwelle der Fluorophore liegt. Auch hier ist für die Auswertung ein komplexer Entfaltungsalgorithmus notwendig, um das höchst aufgelöste Bild berechnen zu können. Neben diesen Weitfeldverfahren zählen aber auch die konfokalen Ver-

fahren, wie die stimulierte Emissionsausbleichungsmikroskopie (*engl. stimulated emission depletion (STED)*) zu dieser Gruppe von höchstauflösenden Mikroskopen. Diese Verfahren verwenden Proben, die vor der mikroskopischen Untersuchung mit Fluoreszenzfarbstoffen markiert werden. Bei Beleuchtung der Probe mit entsprechenden Anregungswellenlängen werden die Fluoreszenzfarbstoffe (Fluorophore) zur spontanen Emission von Licht angeregt [5]. Durch gezieltes An- und stimuliertes Abregen der Fluorophore wird es möglich, ein höchstaufgelöstes Bild zu rekonstruieren. Weiterhin zählt auch die sogenannte RESOLFT-Mikroskopie (*engl. reversible saturable optical linear (fluorescence) transitions*) zu diesen konfokalen Verfahrenstechniken. Hierbei werden photoschaltbare Fluorophore verwendet. Diese werden durch unterschiedliche Wellenlängen zwischen strahlenden und nicht strahlenden Zuständen geschaltet, um so ein höchstaufgelöstes Bild zu rekonstruieren [15]. Dafür wird das Objektfeld, wie in der konfokalen Mikroskopie üblich, rasterförmig abgetastet. Aus den einzelnen Aufnahmen lassen sich anschließend die Bilder mit hoher räumlicher Auflösung zusammensetzen. Nachteilig ist hier zum einen die punktförmige Beleuchtung, d. h. der mit dem rasterförmigen Abtasten verbundene Zeitaufwand. Verfahrenstechnisch bedingt wird außerdem mit einer hohen Laserleistung gearbeitet, um eine möglichst große Auflösung zu erreichen. Dies belastet die Probe und kann zu phototoxischen Effekten führen [16].

Der andere Bereich umfasst die lokalisationsbasierten Weitfeldverfahren, welche unter dem Begriff Einzel-Molekül-Verfahren (SMLM) zu finden sind. In der Weitfeldmikroskopie wird das gesamte Bildfeld gleichzeitig ausgeleuchtet und die in diesem Gebiet vorhandenen Fluorophore angeregt und detektiert. Bei lokalisationsbasierten Verfahren wird hingegen in jedem Bild nur ein geringer Anteil der insgesamt vorhandenen Fluorophore in den eigentlichen Detektionsprozess einbezogen. Der größte Anteil von Fluorophore befindet sich in einem Zustand, in welchem sie kein Licht emittieren. In den aufgenommenen Bilder werden die Schwerpunkte der einzelnen Fluorophore ermittelt und anschließend zu einem höchstaufgelösten Bild rekonstruiert. Da es sich um eine stochastische Verteilung der angeregten Zustände handelt, werden für die Rekonstruktion eines höchstaufgelösten Bildes in der Regel mehrere zehntausend Bilder benötigt. Dies wiederum begrenzt die Aufnahmegeschwindigkeit für jeweils ein höchstaufgelöstes Bild und erschwert somit die Erfassung von schnellen Prozessen. Bei zu geringen Aufnahmezeiten werden nur Bilder mit unvollständigen Strukturinformationen erzeugt. Heutzutage sind viele Varianten des prinzipiell gleichen lokalisationsbasierten Verfahrens bekannt, beispielhaft sei das *d*STORM Verfahren (**d**irekten **S**tochastischen **O**ptischen **R**ekonstruktions**m**ikroskopie) genannt [17, 18].

Um die Übergangswahrscheinlichkeit der verwendeten Fluorophore in den Dunkel-Zustand zu erhöhen, werden bei diesen Verfahren oft starke Reduktionsmittel, z.B. Thiole wie  $\beta$ -Mercaptoethanol oder Mercaptoethylamin, verwendet. Diese Chemikalien sind jedoch in den verwendeten Konzentrationen für lebende Proben toxisch [19], was die Aufnahme von endogenen, dynamischen Prozessen über einen längeren Zeitraum nahezu unmöglich macht.

Das in der vorliegenden Arbeit (Kapitel 3) von mir entwickelte und dargestellte Speckle-Mikroskop stellt einen kostengünstigen Aufbau zu den beschriebenen Verfahren der strukturierten Beleuchtungsmikroskopie dar und bildet eine Grundlage für die Entwicklung neuartiger Techniken im Bereich der höchstauflösenden Mikroskope. Der vereinfachte Aufbau und die Funktionsweise des realisierten Mikroskops ist somit zu kommerziellen Systemen, wie zum Beispiel dem Elyra 7 System der Firma Zeiss (Kapitel 3.2.5) [20]), eine kostengünstige Alternative für intravitale Mikroskope. Die für das Mikroskop entwickelten, neuartigen Techniken sind in [21] patentiert und werden in Kapitel 4 beschrieben. Sie ermöglichen eine Kombination der Vorteile aus dem Bereich der konfokalen und der Weitfeld höchstauflösenden Techniken und stellen somit einen nächsten Schritt in der Weiterentwicklung höchstauflösender Mikroskope dar. Durch die in Simulationen gezeigte Reduktion der Größe des effektiven Beleuchtungsmusters (Kapitel 4) ist es mit diesem Mikroskop möglich, in den Auflösungsbereich ( $\sim 20$  nm) der SMLM-Mikroskopie zu gelangen, aber ohne die vorher beschriebenen negativ wirkenden Effekte des toxischen Puffers oder der langen Messzeiten berücksichtigen zu müssen. Diese neuartigen Techniken ermöglichen im Zeitbereich der SIM-Mikroskopie (wenige Sekunden), einen Auflösungsgewinn um den Faktor 10 zu erzielen. Somit liefert diese Arbeit zukünftige Entwicklungspotenziale und zeigt neue innovative Ansätze im Feld der höchstauflösenden Mikroskopie auf. Damit ist es nun möglich biologische Prozesse in kleinsten Struktureinheiten zu beobachten. Dies führt zu neuem Wissensgewinnen im Bereich der biomedizinischen Forschung und somit zur Entwicklung neuer Therapieansätze.

Die genannten Techniken der höchstauflösenden Fluoreszenzmikroskopie werden in der vorliegenden Forschungsarbeit (vgl. Kapitel 2) zur Untersuchung von Rezeptordichten verwendet, welche wichtige Aufschlüsse über das Krankheitsbild der Autoimmunenzephalitis liefern können [22, 23, 24]. Es wird beispielhaft für die Gruppe der Autoimmunenzephalitis auf die N-Methyl-D-Aspartat-Rezeptor (NMDA-Rezeptor) Enzephalitis eingegangen und der Einsatz dieser neuen Mikroskopieverfahren in Zellkulturexperimenten ge-

zeigt [25, 26, 27]. Die Autoimmunenenzephalitis stellt eine durch Autoantikörper vermittelte Gruppe entzündlicher Gehirnerkrankungen des zentralen Nervensystems (ZNS) dar, welche durch neuropsychiatrische Symptome gekennzeichnet sind [28]. Bereits länger bekannt sind zwei Krankheitsgruppen des Nervensystems, die auch mit Autoantikörpern vergesellschaftet sind. Zum einen ist das das paraneoplastische neurologische Syndrom (PNS) [29] und zum anderen die myasthenen Syndrome im peripheren Nervensystem, welche die ersten Einblicke auf die Wirkung von Autoantikörpern (aAK) auf die synaptische Funktion zeigten [30]. In den 2000er Jahren wurden bei Patienten Syndrome beschrieben, die einer paraneoplastischen Enzephalitis ähneln. Jedoch traten diese Symptome ohne Anwesenheit von Antikörpern gegen onkoneuronale intrazelluläre Proteine auf. Des Weiteren sprachen die Patienten gut auf die Immuntherapie an. Bei weiterführenden Untersuchungen wurden Autoantikörper gegen membranständige oder synaptische Proteine entdeckt [22]. In einer Fallstudie wurden Antikörper gegen Proteine nachgewiesen, welche mit einem Membrankomplex interagieren, der spannungsgesteuerte Kaliumkanäle (engl. voltage gated potassium channels, VGKC) beinhaltet. Unter Durchführung einer Immuntherapie und Plasmaaustausch verbesserte sich der neurologische Befund bei beiden Patientengruppen [23]. In einer anderen Fallstudie wurden ausgeprägte neuropsychiatrische Symptome bei vier jungen Frauen beschrieben, welche ebenfalls Antikörper gegen neuronale Oberflächenproteine aufwiesen [28]. Nach der Untersuchung der Antikörper-Spezifität stellte sich heraus, dass diese gegen die NR1-Untereinheit des NMDA-Rezeptors gerichtet waren. Alle in dieser Studie untersuchten Probanden hatten ein Ovarialteratom, wobei drei von ihnen gut auf die verabreichte Immuntherapie ansprachen [24]. Auf Grundlage dieser ersten Fallstudien wurde in vormals ätiologisch unklaren Patientengruppen eine Vielzahl verschiedener Syndrome identifiziert, die mit Antikörpern gegen neuronale Oberflächenantigene assoziiert sind. Der Nachweis der Antikörper erfolgte in Seren und Liquor der Patienten durch Immunreaktion auf Gehirnschnitten oder lebenden Neuronen [31, 32, 33]. Durch diese Immunmarkierung und die daraus resultierenden Reaktivitätsmuster, sowie Resultate aus der Massenspektroskopie und dem klinischen Phänotyp konnten neue Antigene identifiziert werden. Ein weiterer Schritt war die Entwicklung eines diagnostischen Tests für eine Routine-Untersuchung der neuen Krankheitsgruppe. Dieser Test basiert auf humanen embryonalen Nierenzellen (HEK 293). Diese werden mit den gesuchten Antigenen transfiziert und die Reaktivität von Antikörpern im Patienten-Serum oder im Liquor wird mittels Immunfluoreszenz ermittelt. Zurzeit sind mehr als 15 verschiedene Subtypen der autoimmunen Enzephalitis bekannt bei denen aAK gegen neuronale Oberflächenanti-

gene binden. Dabei führen 10 Subtypen zu einer Enzephalitis [34, 35] und die restlichen zeigen zerebellare Ataxien oder Funktionsstörungen des Rückenmarks. Jeder Subtyp hat spezifische aAK gegen das jeweilige neuronale Antigen, welche auch ein jeweils charakteristisches Krankheitsbild mit spezifischen Symptomen bei den Patienten hervorrufen. In dieser Krankheitsgruppe gibt es aAK gegen prä- und postsynaptische metabotrope Rezeptoren (GABAB), sowie gegen ionotrope Rezeptoren (NMDA-Rezeptor, AMPA-Rezeptor), gegen Ankerproteine (Neurexin-3), Vesikelproteine (Amphiphysin) und gegen Ankerproteine im synaptischen Spalt, welche die Prä- und Postsynapse verbinden (Leucine-rich glioma-inactivated Protein (LGI1)).

Die in der Arbeit gezeigten Ergebnisse stellen einen ersten wichtigen Schritt in der Etablierung der höchstauflösenden Mikroskopie in diesem Forschungsfeld dar. Somit können vorher nicht erklärable Effekte in Modellen gezielter untersucht werden. Weiterhin stellen die Ergebnisse eine Grundlage für weitergehende tiefere Analysen komplexerer Fragestellung dar. In dieser Arbeit werden die ersten Schritte zur Etablierung von lokalisationsbasierter höchstauflösender Mikroskopie in Hirnschnitten dargestellt [36]. Hierbei wird spezifisch auf die Problematik von Streueffekten im Gewebe näher eingegangen. Es werden Wege aufgezeigt, um die störenden Streueffekte im Gewebe zu umgehen und somit eine höchstauflösende Rekonstruktion zu ermöglichen.

Im Laufe der Arbeit etablierte sich die Idee, bei solch komplexen Fragestellungen wie im Bereich der Autoimmunenzephalitis die Kombination von funktionellen (elektrophysiologischen) und morphologischen (mikroskopischen) Methoden zu nutzen. Mit einer Kombination von beiden Verfahren in einem zu untersuchenden System, wäre es möglich, von denselben Strukturen zur gleichen Zeit funktionelle und morphologische Informationen zu erhalten und zu korrelieren. Somit kann eine Abweichung von Korrelationsergebnissen aus zwei verschiedenen Messungen umgangen und auch kompliziertere Fragestellungen an einer geringen Anzahl von Probenmaterial untersucht werden. Eine Komponente des neuartigen Setups stellt das oben beschriebene Speckle-Mikroskop dar. Für die funktionalen Messungen wurden von mir die komplexeren Fragestellungen von zeitlichen Reizleitungsprozessen / Feldpotenzialen mittels Multi-Elektroden-Arrays (MEA) untersucht.

Mit Hilfe von MEAs können Änderungen in der Zellaktivität und in der Zellpopulation analysiert werden. Weiterhin können Signalverarbeitung und -weiterleitung zwischen den einzelnen Zellen detektiert werden [37, 38]. Die Grundlage bilden hierbei Potenzial- bzw. Strommessungen nach elektrischer Reizgebung durch Kontaktelektroden, welche homo-

gen über die gesamte Messfläche verteilt sind. Dadurch ist eine komplexe Netzwerkanalyse möglich [39]. Die MEAs können die neuronalen, aktivitätsabhängigen Änderungen der Größe, Konnektivität oder Aktivierungsmuster von neuronalen Netzen und die Stärke von synaptischen Übertragungswegen untersuchen [40, 41, 42]. und kommen in den unterschiedlichsten Größen, Formen, Materialien und Designen in den verschiedensten Forschungsgebieten zum Einsatz. Kommerzielle MEAs bestehen in der Regel aus der Materialkombination von Titanitrid/Gold-Elektroden, Ti/ITO-Tracks, TiN/ITO Pads mit elektrisch isolierender SiO<sub>2</sub>- oder SiN-Oberfläche zur Zellaufnahme. Diese Oberflächen müssen zur Haftung von biologischen Objekten durch den Anwender funktionalisiert werden. Die von mir entwickelten, neuartigen MEAs aus einer Kombination von Indium-Zinn-Oxid (engl.: indium tin oxide - ITO) für die Elektroden und Magnesiumfluorid (MgF<sub>2</sub>) als Isolierschicht stellen eine Weiterentwicklung auf dem Gebiet der MEA Technologie dar. Diese neue Materialkombination ermöglicht den Einsatz in inversen Mikroskopen und somit die Verwendung dieser optisch hoch transparenten MEAs auch für die höchstauflösende Mikroskopie. Die von mir in [43] publizierten Ergebnisse eröffnen erste Ansätze einer erfolversprechenden elektrisch isolierenden MEA Oberflächenbeschichtung bei gleichzeitiger Funktionalisierung zur Zellaufnahme. Diese wird eine zusätzliche chemische Behandlung der Schichten zur Zellaufnahme nicht mehr notwendig machen.

Durch die Etablierung des Speckle-Mikroskops (Kapitel 3 und der in [21] und Kapitel 4 beschriebenen neuartigen Techniken der höchstauflösenden Mikroskopie in Kombination mit der in [43] und Kapitel 5 beschriebenen hoch transparenten, ultra dünnen und aberrationsminimierten Multi-Elektroden-Arrays stehen neue Wege zur Verfügung, um komplexer werdende Fragestellungen in den biomedizinischen Forschungsgebieten bearbeiten zu können.

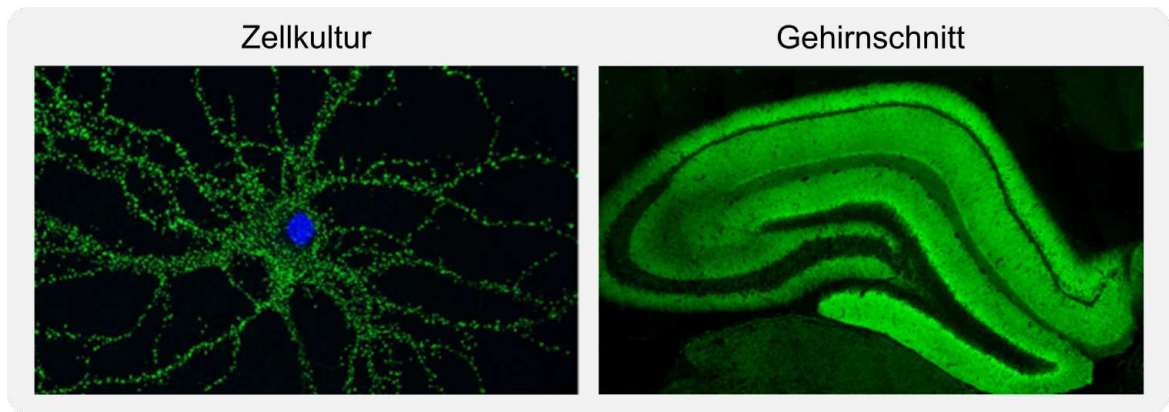
## 2 Höchstaufösende Mikroskopie im Bereich der NMDA-Rezeptor Enzephalitis

### 2.1 Einleitung

Zurzeit sind mehr als 15 verschiedene Subtypen der Autoimmunenkephalitis bekannt, bei denen Autoantikörper (aAK) gegen neuronale Oberflächenantigene binden. Dabei führen 10 Subtypen zu einer Enzephalitis [34, 35] und die restlichen zeigen zerebellare Ataxien oder Funktionsstörungen des Rückenmarks. Jeder Subtyp hat spezifische aAK gegen das jeweilige neuronale Antigen, was ein jeweils charakteristisches Krankheitsbild mit spezifischen Symptomen bei den Patienten hervorruft. In dieser Krankheitsgruppe gibt es aAK gegen prä- und postsynaptische metabotrope Rezeptoren (GABA<sub>B</sub>; engl. *gamma-aminobutyric acid<sub>B</sub>*) sowie gegen ionotrope Rezeptoren (NMDA-Rezeptor; engl. *N-Methyl-D-Aspartat-receptor*, AMPA-Rezeptor; engl. *α-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid-receptor*), gegen Ankerproteine (Neurexin-3α, Leucine-rich glioma-inactivated Protein (LGI1)) und Vesikelproteine (Amphiphysin).

Die NMDA-Rezeptor Enzephalitis, welche in dieser Arbeit untersucht wird, wurde erstmals 2007 durch die Arbeitsgruppe von Prof. Dalmau beschrieben [24]. Sie ist die häufigste Form der aAK vermittelten Enzephalitis. Eine Prädisposition besteht hierbei vorwiegend bei jungen Menschen bis ca. 35 Jahren [25], wobei mit 80 % ein deutliches Übergewicht der Betroffenen bei weiblichen Patienten dokumentiert ist. Die NMDA-Rezeptor Enzephalitis ist in einem Prozentsatz von ca. 40 % mit dem Vorliegen eines Ovarialteratoms, einem benignen Tumor mit z.T. neuroektodermalem Gewebe, verbunden. Bei Kindern liegt eher eine nicht-paraneoplastische Form vor [25]. Lediglich 2 % der Betroffenen weisen eine andere Tumor-Art auf. Bei der histologischen Untersuchung der Teratome von 25 Patienten konnte in allen Fällen eine Expression von NMDA-Rezeptoren nachgewiesen werden [26]. Bei 80 % der Patienten wurden schon initial in der Krankheitsphase Auffälligkeiten im Liquor festgestellt, wobei sich im Verlauf der Erkrankung diese Veränderungen bei fast allen Patienten zeigten [27]. 60 % der Patienten entwickelten oligoklonale Banden [27] und eine intrathekale Synthese der anti-NMDA-Antikörper [27, 44]. In Abbildung 1 ist ein charakteristisches Reaktivitätsmuster von aAK, welches aus einer Patientenprobe eines mit Anti-NMDA-Rezeptor Enzephalitis erkrankten Patienten gewonnen wurde, gegen die NR1 Untereinheit des NMDA-Rezeptors in einer primären neuronalen Zellkultur (links) und im Hippocampus mit der CA1 bis CA3-Region eines coronalen Gehirnschnittes einer Ratte





**Abbildung 1:** Darstellung des charakteristischen Reaktivitätsmusters von aAK, welche aus einer Patientenprobe eines mit Anti-NMDA-Rezeptor Enzephalitis erkrankten Patienten gewonnen wurde, gegen die NR1 Untereinheit des NMDA-Rezeptors in einer primären neuronalen Zellkultur (links) und im Hippocampus mit der CA1 bis CA3-Region eines coronalen Gehirnschnittes einer Ratte (rechts) [35].

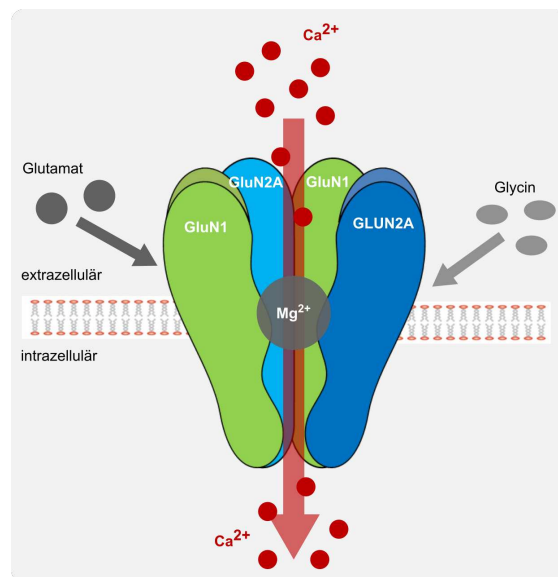
(rechts) zu sehen. Der therapeutische Ansatz bei einer NMDA-Rezeptor Enzephalitis besteht einerseits aus der Entfernung des Tumors, sofern vorhanden, und andererseits aus einer Immunsuppression. Diese kann je nach Schwere auch mit einer Plasmapherese und/oder der Gabe von Immunglobulinen kombiniert werden [45]. Bei der NMDA-Rezeptor Enzephalitis besteht eine gute therapeutische Prognose, wobei ca. 75 % der Patienten eine vollständige Heilung erfahren oder nur leichte Folgeeinschränkungen behalten [27]. Lediglich ein Viertel der Erkrankten behalten schwere neurologische Folgeschäden oder es kommt zum Tod des Patienten. Nach Monaten oder Jahren kann es bei 20 bis 25 % der Patienten zu einem erneuten Auftreten der Erkrankung kommen [25, 44]. Weiterhin lässt sich der Verlauf der NMDA-Rezeptor Enzephalitis in mehrere Phasen unterteilen, die zumeist in unterschiedlicher Ausprägung durchlaufen werden. In der ersten Phase des Krankheitsverlaufes treten bei 70 % der Patienten prodromale Symptome auf. Dazu zählen Fieber, Übelkeit, Erbrechen bzw. unspezifische Symptome ähnlich einer viralen Infektion [25]. In den ersten zwei Wochen bilden sich dann erste psychiatrische Symptome, wie zum Beispiel Schlaflosigkeit, Angst, Wahnvorstellungen, Manie oder Paranoia aus. Aus diesem Grund werden die Patienten auch oft primär einem Psychiater vorgestellt [27]. Diese psychotischen Symptome sowie auftretende Sprachprobleme überdecken jedoch meist ein weiteres sehr häufiges Symptom, und zwar die Störung im Kurzzeitgedächtnis [24, 25, 27]. Im weiteren Krankheitsverlauf treten dann Bewegungsstörungen wie Dystonien mit erhöhtem Muskeltonus auf. Diese werden von autonomer Instabilität begleitet, was zum Beispiel durch Hypoventilation, Tachy- und/oder Brachykardie gekennzeichnet ist [24, 46, 47].



Des Weiteren können in allen Krankheitsphasen der NMDA-Rezeptor Enzephalitis fokale bzw. generalisierte Krampfanfälle auftreten. Jedoch sind diese meist bei dem Patienten im frühen Stadium zu beobachten. Diesem Krankheitsverlauf schließt sich dann eine Erholungsphase an, die sich über lange Zeit, auch Monate und Jahre, erstrecken kann. Diese kann durch rechtzeitige Einleitung einer Immuntherapie verkürzt werden [24].

Um neue Therapiemöglichkeiten zu entwickeln oder bestehende auszubauen, muss die Struktur und die Einbettung in die synaptische Struktur des NMDA-Rezeptors bekannt sein. Die NMDA-Rezeptoren gehören genauso wie die AMPA- und Kainat-Rezeptoren zur Gruppe der ionotropen, Liganden-gesteuerten Glutamat-Rezeptoren (ionotrope Rezeptoren). Diese Gruppe von Rezeptoren vermittelt ihren zellulären Effekt durch den Aminosäure-Neurotransmitter Glutamat (Glutaminsäure). Die Aktivierung der ionotropen Rezeptoren führt nach einer kurzen Verzögerung (Latenzzeit) von wenigen Millisekunden zu einer Öffnung. Somit spielen diese Rezeptoren eine Rolle bei der schnellen synaptischen Übertragung. Der NMDA-Rezeptor wurde nach einem für ihn spezifischen Agonisten (NMDA) bezeichnet und besitzt in seiner Struktur Bindestellen für verschiedene Liganden wie NMDA, Glutamat oder Glycin (Koagonist). Hierbei repräsentiert die Stelle für die Glycin-Bindung eine Strychnin-insensitive Bindungsstelle. Die Bindung von Glycin ist für die Kanalöffnung notwendig. Des Weiteren befindet sich in der Pore des Rezeptors eine spannungssensitive Bindungsstelle für  $Mg^{2+}$ , was einen sogenannten 'Magnesium-Block ( $Mg^{2+}$ -Block)' hervorruft, welcher die Öffnungswahrscheinlichkeit des Rezeptors bei negativem Membranpotential reduziert. Es existiert zusätzlich am NMDA-Rezeptor noch eine Bindungsstelle für Polyamin. All diese Agonisten beeinflussen die Kanalleitfähigkeit des Rezeptors und steuern somit die Rezeptor-Funktion. Wegen des  $Mg^{2+}$ -Block setzt die Aktivierung des NMDA-Rezeptors eine Depolarisierung des Membranpotenzials voraus, welche den spannungsabhängigen  $Mg^{2+}$ -Block löst und die Pore öffnet. Weiterhin ist die Besetzung der Glycin-Bindungsstelle erforderlich. Die Öffnung des NMDA-Rezeptors kann durch verschiedene Stoffe wie CPP (engl. *3-(2-Carboxypiperazin-4-yl)propyl-1-phosphonic acid*), Phencyclidin, Ketamin oder MK801 (engl. *Dizocilpine*) verhindert bzw. blockiert werden. Polyamin kann die Aktivierung des NMDA-Rezeptors verstärken. Es wird vermutet, dass dies über intrazelluläre allosterische Bindungen erfolgt. Der NMDA-Rezeptor ist permeabel für Calcium- ( $Ca^{2+}$ ), Kalium- ( $K^+$ ) und Natrium-Ionen ( $Na^+$ ). Er weist eine größere Permeabilität von  $Ca^{2+}$  als AMPA- und Kainat-Rezeptoren auf. Dies folgt aus der Durchlässigkeit der Poren, die für den NMDA-Rezeptor 5- bis 10-mal höher für  $Ca^{2+}$  als

für  $\text{Na}^+$  und  $\text{K}^+$  ist. Weiterhin zeigt Glutamat an ruhenden Zellen (Membranpotenzial ca.  $-70\text{ mV}$ ) im Gegensatz zu depolarisierten Zellen (Membranpotenzial größer  $-50\text{ mV}$ ) keine messbaren Effekte auf NMDA-Rezeptoren. Durch die Depolarisation der Zellen kommt es zu einem Kationen-Einstrom, welcher vor allem aus  $\text{Ca}^{2+}$  besteht. Somit generieren NMDA-Rezeptoren primär keine elektrischen Signale, sondern erzeugen einen Anstieg des freien intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$  Gehaltes in Abhängigkeit vom Membranpotenzial. NMDA-Rezeptoren sind durch die Eigenschaft der spannungssensitiven Glutamat-Wirkung besonders wichtig für synaptische Plastizität und Lernvorgänge. Die klassische heterotetramere Struktur des NMDA-Rezeptors ist in Abbildung 2 zu sehen. Er besteht aus zwei NR1-Untereinheiten und zwei NR2-Untereinheiten. Es sind vier Subtypen der NR2-Untereinheit (A-D) bekannt. Die NR1-Untereinheit des NMDA-Rezeptors wird im weiteren Verlauf der Arbeit näher untersucht. Des Weiteren existiert auch eine NR3-Untereinheit mit den Subtypen A und B. Die N-terminale Domäne (NTD) des NMDA-Rezeptors ist genau wie die Liganden-Bindungs-Domäne (LBD) extrazellulär angeordnet. Zudem ist in Abbildung 2 der oben beschriebene  $\text{Mg}^{2+}$ -Block in der Pore des Rezeptors zu sehen, welcher die Öffnungswahrscheinlichkeit des Rezeptors reduziert. Der  $\text{Mg}^{2+}$ -Block liegt in der Transmembrandomäne (TMD), welche die Phospholipid Membran durchspannt. Die intrazelluläre C-terminale Domäne des NMDA-Rezeptors kann über Modulatoren die Eigenschaften des



**Abbildung 2:** Schematische Darstellung des NMDA-Rezeptors mit zwei NR1- (grün) und zwei NR2A-Untereinheiten (blau). In der Mitte der Pore sitzt der spannungsabhängige  $\text{Mg}^{2+}$ -Block (grau). Die Liganden Glutamat (grau, links) und Glycin (grau, rechts) sind neben dem Rezeptor dargestellt und können an die jeweilige Liganden-Bindungsstelle binden. Der Rezeptor durchspannt die Phospholipid Membran (orange Doppelstruktur). Des Weiteren ist ein möglicher Einstrom von Calcium-Ionen (rot) dargestellt.

Rezeptors beeinflussen [48]. Dieser Effekt kann sowohl positiv als auch negativ sein und sich auf die Ionendurchlässigkeit auswirken.

Nachfolgend wird auf die verschiedenen Experimente eingegangen, welche das Verständnis der Pathophysiologie der NMDA-Rezeptor Enzephalitis verbessern sollen. Diese erweitern die Erkenntnisse aus funktionellen Daten, welche unabhängig zu diesen Experimenten gewonnen wurden. Im ersten Schritt wurden Voruntersuchungen zur Optimierung der FärbeprozEDUREN (Kapitel 2.2.3) durchgeführt. Der Schritt diente zudem zur Findung der geeigneten Antikörper für die unterschiedlichen zu untersuchenden Präparate (primäre hippocampale Neuronenkulturen und  $10\ \mu\text{m}$  coronale Hirnschnitte einer Maus). Dazu wurden verschiedene rekombinante monoklonale NR1-Patientenantikörper getestet und bezüglich ihrer Bindungscharakteristik im Vergleich zu kommerziellen Antikörpern verglichen. Außerdem wurden entsprechende synaptische Marker untersucht, um diese in späteren Experimenten als Kollokalisationsstrukturen zu verwenden. Dies wird benötigt, um die Expression des NMDA-Rezeptors eindeutig synaptischen Strukturen zuweisen zu können. Dazu zählen der postsynaptische Marker Homer1 und der präsynaptische Marker Bassoon. Das in dieser Arbeit beschriebene Verfahren zur Aufnahme von höchstaufgelösten *d*STORM-Daten in  $10\ \mu\text{m}$  coronalen Hirnschnitten einer Maus stellt eine Neuerung in der single-Moleküle Lokalisations-Mikroskopie dar. Die Etablierung ist Voraussetzung für die Beantwortung komplexer Fragestellungen im Bereich der NMDA-Rezeptor Enzephalitis im Tiermodell und der Entwicklung neuer Therapieformen.

Die Problematik bei Schnitten ist ein hohes Signal außerhalb des Fokusbereichs, das bei Weitfeldmikroskopieverfahren (zum Beispiel *d*STORM) entsteht. Zusätzlich sind hohe Streusignale aus dem Gewebe zu erwarten. Zur eindeutigen Detektion von Lokalisationen wurde das Signal-zu-Rausch-Verhältnis bei *d*STORM-Aufnahmen im Gewebe optimiert. Für die Weitfeldmikroskopie im Gewebe sind in den letzten Jahren durch den Einsatz von adaptiven Optiken neue Möglichkeiten aufgegriffen worden. Diese ermöglichen Aufnahmen in tiefen Gewebeschichten ohne Verschlechterung des Signal-zu-Rausch-Verhältnisses (SNR; engl. *signal to noise ratio*). Das vorhandene System der Firma Zeiss (Kapitel 2.2.4) ist mit keinem solchen System ausgestattet, so dass alternative Strategien angewendet werden mussten. Um die Effekte des Streulichtes und des Lichtes außerhalb der Fokusebene zu minimieren, wurde die Gewebedicke verringert. Wichtig ist hierbei, die neuronale Netzstruktur nicht zu beeinträchtigen und das Optimum zwischen dem SNR für die Lokalisationsdetektion und einer intakten neuronalen Netzstruktur zu finden. Diese optimale

Gewebedicke gewährleistet eine hohe Auflösung bei der Minimierung von Störeffekten. Aus den gewonnenen Erkenntnissen sollen durch Untersuchung nachgeschalteter Signalwege Therapieverfahren entwickelt werden.

## 2.2 Methoden

### 2.2.1 Zellkulturpräparation von primären hippocampalen Neuronen

Für die Zellkulturexperimente kamen 18 mm Coverslips in 12-Well Platten zur Anwendung. Zur Erhöhung der Zelladhäsion wurden die Coverslips für ein bis zwei Stunden bei 37°C oder über Nacht bei Raumtemperatur mit Poly-D-Lysin inkubiert. Anschließend erfolgte die Entfernung des Poly-D-Lysins und eine zweimalige Spülung der Coverslips mit ddH<sub>2</sub>O. Die so vorbehandelten Coverslips sollten mindestens ein bis drei Stunden bei Raumtemperatur oder über Nacht im Inkubator bei 37°C trocknen. Im nächsten Schritt wurden Zellen aus dem Hippocampus von Embryonen (Tag 18, E18) aus schwangeren Wildtyp-Mäusen gewonnen. Die Entnahme der Hippocampi und Ablösung des umliegenden Gewebes wurde mit einem Skalpell in einer mit HBSS-Lösung (siehe Anhang Tabelle 13) befüllten Petrischale durchgeführt. Als Nächstes wurden die Hippocampi mit einer sterilen Uhrmacherpinzette in ca. 3 ml 0,25 % Trypsin-EDTA-Lösung in einen 15 ml Tube für 5 Minuten bei 37°C im Wasserbad inkubiert. Nach der vorgegebenen Zeit wurde die 0,25 % Trypsin-EDTA-Lösung entfernt und dreimal mit 37°C warmer HBSS-Lösung gespült. Die Hippocampi wurden anschließend im Plating-Medium (siehe Anhang Tabelle 14) mit einer verengten Glaspipette trituriert. Im Weiteren erfolgte die Herstellung einer Mischung aus 10 µl Zellsuspension und 10 µl Trypanblau. 10 µl dieser Lösung wurden in einer Neubauer-Zählkammer auf lebenden Zellen untersucht, welche sich durch Trypanblau im Kontrast zu toten Zellen unterscheiden. Als Nächstes musste die Dichte der Zellsuspension durch Hinzugabe von 37°C warmem Plating-Medium auf ca. 20.000 Zellen/cm<sup>2</sup> eingestellt werden. Die so gewonnene Zellsuspension musste anschließend auf die Coverslips gegeben werden, so dass die Zellen im Inkubator bei 37°C für ca. eine Stunde anhaften konnten. Abschließend wurde das Plating-Medium abgezogen und durch 1,3 ml warmes Neurobasal-Medium (siehe Anhang Tabelle 15) ersetzt. Die Kultivierung der Zellen erfolgte für die dSTORM Versuche über 14 Tage ohne Medienwechsel [49].

### 2.2.2 Präparation von Hirnschnitten

Für die Schnittpräparation wurden die runden, 18 mm großen Coverslips in einer eigens für die Oberflächenfunktionalisierung hergestellten Kammer mit einer Silan-Funktionsoberfläche versehen. Im ersten Schritt wurden dafür die Coverslips unter einem Abzug für 10 Minuten mit Aceton gereinigt und anschließend zweimal mit destilliertem Wasser abgespült. Im Anschluss erfolgte die Bedeckung der Coverslips für 4 Minuten mit der 2%igen APTES/Methanol-Lösung. Danach wurden diese zweimal mit destilliertem Wasser gespült, abgedeckt und bei Raumtemperatur über Nacht in einem Abzug zum Trocknen belassen. Für das nun mögliche Auftragen der 10  $\mu\text{m}$  Gewebeschnitte wurde das Gehirn der Mäuse nativ entnommen und in Tissue-Tek<sup>®</sup> eingebettet. Das eingebettete Gehirn wurde in  $-25^{\circ}\text{C}$  kaltem 2-Methylbutan eingefroren, welches durch Trockeneis auf dieser Temperatur gehalten und bei  $-80^{\circ}\text{C}$  bis zum Schneiden gelagert wurde. Aus den so hergestellten Tissue-Tek<sup>®</sup> Blöcken erfolgte mit dem Cryotome (CM3050S, Leica, Wetzlar, Deutschland) die Herstellung der 10  $\mu\text{m}$  coronalen Hirnschnitte, welche auf die funktionalisierten Coverslips aufgebracht und bei  $-20^{\circ}\text{C}$  in einer eigens dafür hergestellten Kammer gelagert wurden.

### 2.2.3 Immunhistochemische Färbungen von biologischen Proben

Für die erste Antikörperfärbung zur Darstellung der ersten Zielstruktur wurden die Hippocampus-Kulturen für eine Stunde bei Raumtemperatur mit dem Blockpuffer 1 (siehe Anhang Tabelle 16) behandelt. Zur Färbung intrazellulärer Strukturen wurde dem Blockpuffer bei Zellkulturen 0,1% und bei 10  $\mu\text{m}$  Schnitten 0,5% des Detergenz Triton X-100 hinzugegeben. Das Blocken soll unspezifische Bindungen der Antikörper an Zellstrukturen verhindern. Im nächsten Schritt wurde der erste primär-Antikörper (siehe Anhang Tabelle 7) über Nacht bei  $4^{\circ}\text{C}$  im Blockpuffer 2 (siehe Anhang Tabelle 17) inkubiert. Am nächsten Tag erfolgte dann die Entfernung der überschüssigen Antikörper durch sechsmaliges Waschen mit 1x PBS-Lösung bei Raumtemperatur und anschließend die Inkubation des ersten sekundär-Antikörpers im Blockpuffer 2 (siehe Anhang Tabelle 8) bei Raumtemperatur für zwei Stunden. Nach einem sechsmaligen Waschprozess mit der 1x PBS-Lösung wurde für die zweite Zielstruktur für eine Stunde mit dem entsprechenden Blockpuffer 1 bei Raumtemperatur geblockt. Anschließend wurde der primär-Antikörper der zweiten Zielstruktur

im Blockpuffer 2 über Nacht bei 4°C inkubiert. Am dritten Tag wurden dann die überschüssigen Antikörper durch einen sechsmaligen Waschprozess mit der 1x PBS-Lösung entfernt und der sekundär-Antikörper für die zweite Zielstruktur im Blockpuffer 2 für zwei Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Nach einem erneuten sechsmaligen Waschen mit der 1x PBS-Lösung konnte eine DAPI-Färbung, welche an die doppelsträngige Desoxyribonukleinsäure (ddDNS) bindet und somit die Zellkerne als Fluoreszenzsignal sichtbar macht, durchgeführt werden. Danach wurde die Zellkultur dreimal mit der 1x PBS-Lösung gewaschen und dann mit 4%igen PFA für 10 Minuten nachfixiert. Nach einem weiteren dreimaligen Waschschrift wurde die Hippocampus-Kulturen entweder in 1 ml der 1x PBS-Lösung gelagert oder mittels Fluoromount auf einen Objektträger aufgebracht.

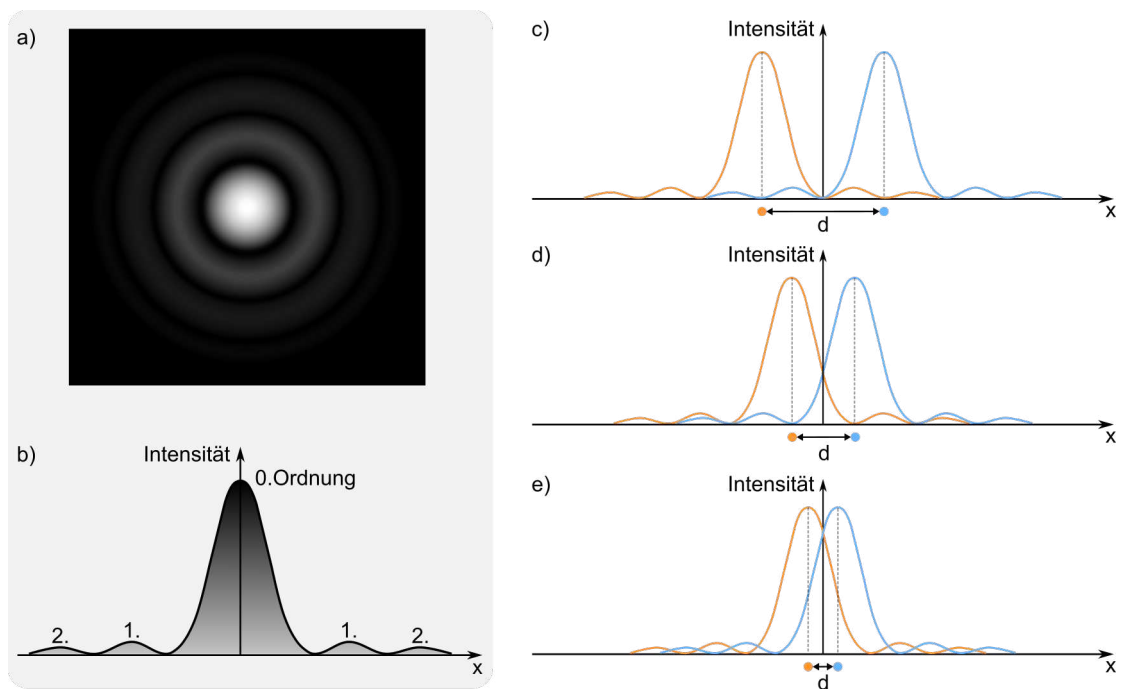
#### 2.2.4 Aufbau und Funktionsweise des Zeiss Elyra P.1 Systems (SMLM)

In Abbildung 3 (Mitte) ist das Elyra P.1 System von Zeiss gezeigt. Dieses kommerzielle super-resolution Mikroskop arbeitet mit lokalisationsbasiertem Verfahren. Es stehen 4 Laser (405 nm (50 mW), 488 nm (100 mW), 561 nm (200 mW) und 641 nm (500 mW)) zur Verfügung, mit denen ein breites Spektrum zur Anregung von gebräuchlichen Fluorophoren abgedeckt wird. Die Messungen in diesem Kapitel basieren alle auf dem Grundprinzip der Einzelmolekül Lokalisations-Mikroskopie (SMLM, engl. *single-molecule localisation microscopy*). Im Bereich der lokalisationsbasierten Verfahren existieren mehrere Methoden, um die Beugungsbegrenzung zu umgehen. In der Fluoreszenz-Mikroskopie wird allgemein die Beugungsbegrenzung durch das Rayleigh-Kriterium beschrieben. Dieses untersucht die Trennbarkeit von zwei Leuchtpunkten bzw. deren Punktspreizfunktionen (PSF) in



**Abbildung 3:** Photographie des Elyra P.1 Systems der Firma Zeiss (Mitte) mit DualCam Adapter und zwei EMCCD iXon+ (Oxford Instruments - Andor; links) und 3D slicer mit Phasenplatte und zugehöriger 3D-Doppel-Helix-PSF (rechts).

der Abbildungsebene eines optischen Systems. Somit kann die Aussage getroffen werden, ab welchem minimalen Abstand zweier Punktquellen diese am Beobachtungsort separiert wahrgenommen werden können. Hierbei beschreibt die PSF bzw. das Beugungsbild eines Punktes die Funktion einer Airy-Scheibe. In Abbildung 4a ist eine Intensitätsverteilung einer Airy-Scheibe in x- und y-Koordinaten zu sehen. Die Abbildung 4b zeigt den Intensitätsverlauf entlang des Schnittes durch den Mittelpunkt dieser Airy-Scheibe. Dargestellt ist ein typisches Bild einer Beugungsfunktion mit einem Hauptmaximum (0. Beugungsordnung), in welchem sich ein Großteil der Leistung befindet, und kleinere Nebenmaxima höherer Ordnungen. Zwischen den Maxima liegen die Intensitätsminima, d. h. die Nullstellen der Funktion. In Abbildung 4c bis 4e sind Schnitte durch Airy-Scheiben benachbarter Punkte mit unterschiedlichen Abständen zu sehen. Betrachtet wird der Intensitätsverlauf in Abhängigkeit vom Punktabstand ( $d$ ). Die Abbildung 4c präsentiert den Intensitätsverlauf zweier Punktabbildungen mit einem Abstand  $\Delta x = d$ , welcher größer als das Auflösungslimit ( $d_{\min}$ ) ist. Abbildung 4e zeigt den Intensitätsverlauf zweier Punktabbildungen mit  $\Delta x$  kleiner als  $d_{\min}$ . Diese Punkte sind nicht separierbar. In Abbildung 4d ist der Intensitätsverlauf zweier Punktabbildungen zu sehen, bei dem  $\Delta x$  dem minimal auflösbaren



**Abbildung 4:** a) 2D-Darstellung einer Intensitätsverteilung einer Punktquelle (Airy-Scheibe) und b) eines Schnittes entlang der X-Achse durch diese Intensitätsverteilung der Punktquelle. Darstellung der Überlagerung von Intensitätsverteilungen zweier Punktquellen mit unterschiedlichem Abstand ( $d$ ): c)  $\Delta x = d > d_{\min}$ , d)  $\Delta x = d = d_{\min}$ , e)  $\Delta x = d < d_{\min}$ .



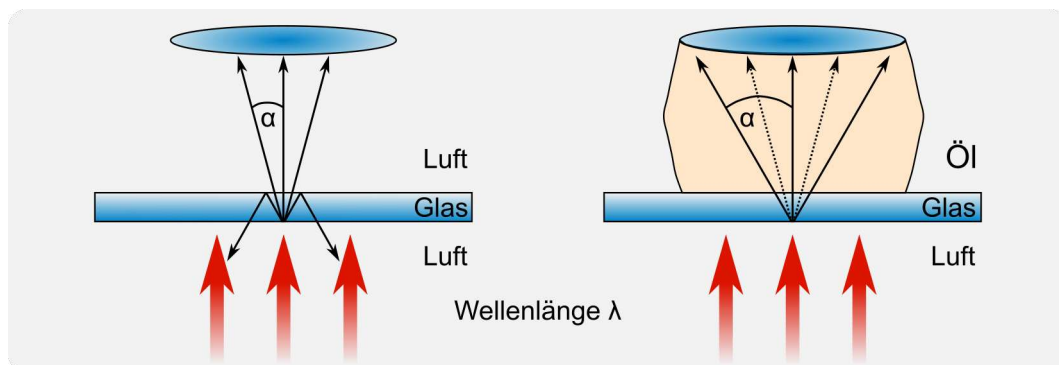
Abstand ( $d_{\min}$ ) entspricht. Dieser Zustand entspricht der Grenze, an dem zwei Punktabbildungen separierbar sind. In diesem Fall liegt das Hauptmaximum einer Airy-Scheibe im ersten Intensitätsminimum der anderen Airy-Scheibe. Durch diesen speziellen Abstand fällt das Minimum zwischen den beiden Hauptmaxima der Beugungsfunktionen durch Kurvenüberlagerung auf 73,5 % der maximalen Intensität ab. Dieser Abfall wurde von Sir Rayleigh als Grenze für die Auflösung bzw. Separierung von zwei Punktbildern definiert. In Gleichung 1 ist das Auflösungskriterium beschrieben [4].

$$d_{\min} = 0,61 \frac{\lambda}{\text{NA}} = 0,61 \frac{\lambda}{n \cdot \sin(\alpha)} \quad (1)$$

Die änderbaren Einflussgrößen für den kleinstmöglichen Abstand ( $d_{\min}$ ) zweier Leuchtpunkte sind die Wellenlänge ( $\lambda$ ) und die Numerische Apertur (NA) eines Objektivs. Die NA setzt sich aus der Brechzahl ( $n$ ) des Mediums zwischen Objekt und Objektiv sowie dem Öffnungswinkel ( $\alpha$ ) zusammen. Diese Größen sind in Abbildung 5 für ein Luftobjektiv (links) und ein Objektiv mit Immersionsöl (rechts) dargestellt. Die Gleichung 1 bezieht sich aber nur auf die laterale Auflösung (x-y-Ebene). Die axiale Auflösung der Punktbildfunktion (PSF) ist niedriger, was zu einer elliptischen Form der räumlichen PSF führt. Diese ist gerade bei 3D-Rekonstruktionen bzw. bei 3D-Aufnahmen entscheidend. Die axiale Auflösung kann durch Gleichung 2 beschrieben werden [2, 50].

$$d_{\min} = \frac{2 \cdot \lambda}{\text{NA}^2} = \frac{2 \cdot \lambda}{(n \cdot \sin(\alpha))^2} \quad (2)$$

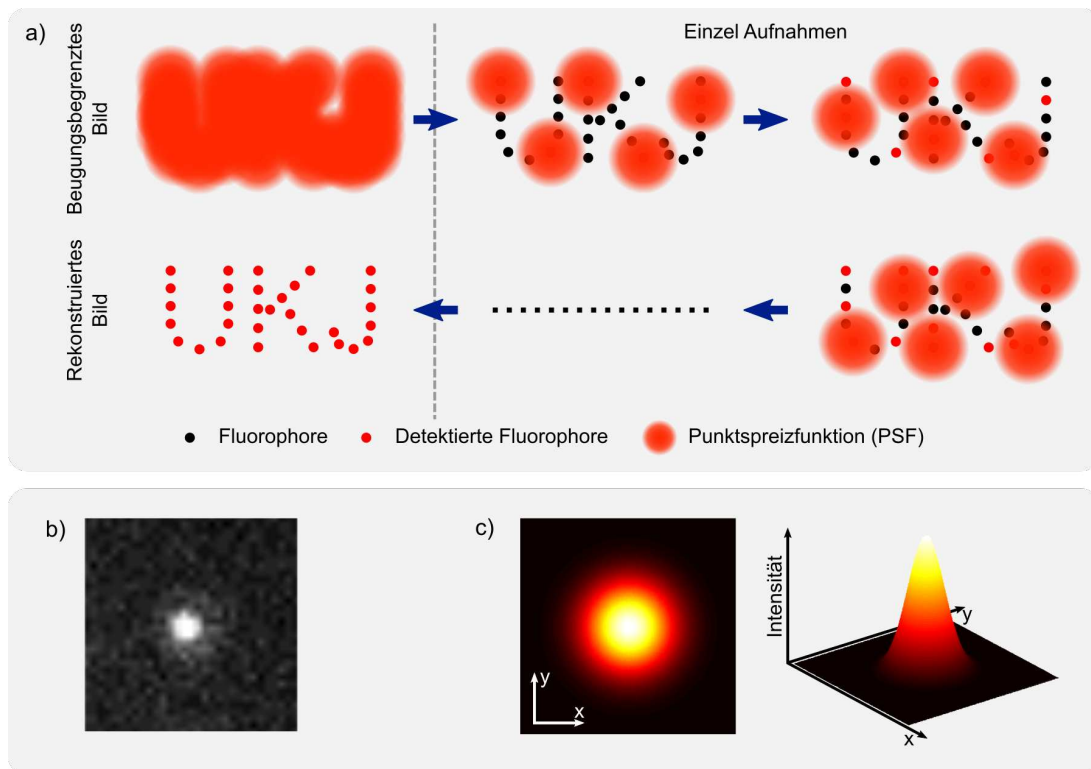
Alle Verfahren der SMLM basieren auf derselben Grundidee, nämlich das Rayleigh-Kriterium zu überwinden, indem sie zeitlich aufeinander folgende, räumlich getrennte PSFs in



**Abbildung 5:** Darstellung der Einflussgrößen Wellenlänge ( $\lambda$ ), Brechzahl ( $n$ ) und Öffnungswinkel ( $\alpha$ ) auf die Auflösung eines Mikroskops. Einfluss von Immersionsölen mit Brechzahlen  $n > 1$  auf den Öffnungswinkel ( $\alpha$ ) im Vergleich zu Standard-Luftobjektiven.



dem selben Bildausschnitt erzeugen [51]. Dies wird dadurch realisiert, dass die Mehrheit der Leuchtmittel daran gehindert wird, Licht zu emittieren, d. h. diese in einen nicht leuchtenden Zustand zu überführen [52, 53]. Andere Verfahren versuchen über nicht absorbierende Zustände der Leuchtmittel und das Umschalten zu fluoreszierenden Zuständen eine Separation von Emissionspunkten zu erzeugen [54, 55]. Durch einen statistischen Wechsel zwischen leuchtenden und nicht leuchtenden Zuständen werden bei der Aufnahme einer Bildreihe unterschiedliche Informationen von den einzelnen Bildern erhalten. Am Ende der Messung muss aus den Einzelaufnahmen ein höchst aufgelöstes Bild rekonstruiert werden. Das Prinzip ist in Abbildung 6a dargestellt. Um das dort gezeigte Rekonstruktionsprinzip durchzuführen, müssen die einzelnen PSFs der Fluorophore separiert werden. Bei der Rekonstruktion wird die detektierte PSF (siehe Abbildung 6b) mit einer mathematischen Funktion gefittet. Theoretisch müsste hier als Fit-Funktion die Airy-Scheibe verwendet werden. Um diesen rechentechnisch intensiven Schritt zu umgehen, wird ein zweidimen-



**Abbildung 6:** a) Schematische Darstellung des Lokalisationsprinzips an Hand des Schriftzuges UKJ. Mit einem beugungsbegrenzten Bild (oben, links), bestehend aus vielen einzelnen PSFs, einer Zeitreihe von Einzelbildern, bei dem unterschiedliche Informationen zur Schwerpunktslage von verschiedenen PSFs gesammelt werden (rechts), und einem rekonstruierten Bild, welches aus allen einzelnen Schwerpunktsinformationen zusammengesetzt wurde (unten links). b) Bild einer detektierten PSF durch einen Flächendetektor am Elyra P.1 System und c) die dazugehörige Gauss-Funktion 2- und 3-dimensional zur Schwerpunktsbestimmung der detektierten PSF.

sionaler Gauß-Fit aus Gleichung 3 (siehe Abbildung 6c) genutzt, der eine Näherung zur Airy-Scheibe darstellt.

$$f(x,y) = Ae^{-0,5 \left( \left( \frac{x-x_0}{\sigma_x} \right)^2 + \left( \frac{y-y_0}{\sigma_y} \right)^2 \right)} \quad (3)$$

Hierbei stellen  $\sigma_x$  und  $\sigma_y$  die Standardabweichungen der jeweiligen Koordinate, A die Amplitude der Gaußfunktion sowie  $x_0$  und  $y_0$  die Koordinaten des Zentrums der Gauß-Kurve, also die gesuchte Position der Punktlichtquelle, dar. Die Genauigkeit der Lokalisation dieses Zentrums hängt von der Anzahl der detektierten Photonen N ab, wobei jedes detektierte Photon als eine separate Ortsmessung mit einer Genauigkeit d betrachtet werden kann. Der daraus resultierende mittlere Fehler des Mittelwertes einer solchen Messreihe, dem bei jeder einzelnen Messung der Fehler  $\Delta x$  zugrunde liegt, kann wie folgt dargestellt werden [56]:

$$\Delta x_m = \frac{\Delta x}{\sqrt{n}}. \quad (4)$$

Hierbei ist  $n$  die Anzahl der Einzelmessungen in der Messreihe. Aus diesem Zusammenhang ergibt sich ein mittlerer Fehler für die Lokalisationsgenauigkeit des Zentrums  $(x_0, y_0)$  einer Punktquelle durch:

$$d_{\text{Lok}} = \frac{d}{\sqrt{N}} = \frac{\lambda}{2 \cdot \text{NA} \cdot \sqrt{N}}. \quad (5)$$

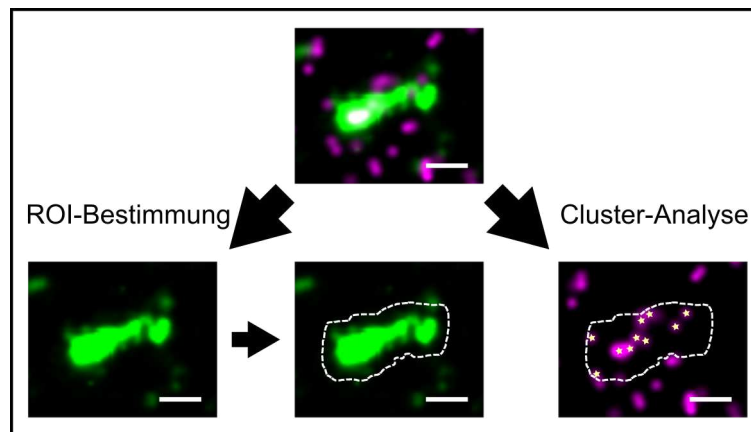
An Gleichung 5 ist zu erkennen, dass die Genauigkeit, ein Zentrum des Lichtpunktes zu lokalisieren, stark von der Anzahl der detektierten Photonen (N) abhängig ist. So ist bei einer großen Anzahl an detektierten Photonen die Genauigkeit und somit die Auflösung des rekonstruierten Bildes hoch. Deshalb müssen in der Lokalisationsmikroskopie Störeffekte wie Hintergrundrauschen minimiert werden [57, 58]. Das Elyra P.1 System besitzt die Möglichkeit, alle SMLM Methoden anzuwenden. Jedoch hat sich die Arbeitsgruppe auf die Durchführung der *d*STORM Mikroskopie spezialisiert. Die *d*STORM Mikroskopie ist ein spezielles Verfahren der **S**tochastischen **O**ptischen **R**ekonstruktions**m**ikroskopie (STORM). Beide Verfahren basieren auf demselben Prinzip, den größten Teil der Fluorophore in einen nicht fluoreszierenden Zustand zu überführen und einen kleinen Teil der Fluorophore zu detektieren. Im Gegensatz zu STORM benutzt man bei dem *d*STORM Prinzip nur ein Fluorophor und verzichtet auf den Aktivator. Bei bestimmten Pufferbedin-

gungen und durch Verwendung von hohen Laserleistungen können viele organische Fluorophore zeitweise in einen „aus“-Zustand überführt werden [59, 18]. Die Rückführungen in einen „an“-Zustand erfolgt spontan, wobei die Geschwindigkeit der Prozesse durch die Verwendung eines 405 nm Lasers beschleunigt werden kann. Wie bei allen Verfahren werden hier ebenfalls mehrere tausend Bilder für die Rekonstruktion aufgenommen [60, 19, 61].

Entscheidend für die *d*STORM Messungen in dieser Arbeit waren die Laserlinien 561 nm und 641 nm, wobei meist die kleineren Strukturen (z.B. Rezeptoren) für die Anregung mit 641 nm gefärbt wurden. Des Weiteren besitzt das Elyra P.1 System neben Standard Fluoreszenz-Filterwürfeln für die X-Cite Fluoreszenzlampe auch speziell gekittete, multi-bandige Laser-Filterwürfel. Diese Filterwürfel sind ausgerichtet, mehrere Laserlinien gleichzeitig oder mehrere Laserlinien aufeinander folgend ohne Wechseln des Filterwürfels zu verwenden. Für die Möglichkeit der gleichzeitigen Anregung zweier Leuchtmittel in der Probe steht im Elyra P.1 System zusätzlich ein sogenannter DualLink Adapter (siehe Abbildung 3) zur Verfügung. Der DualLink Adapter besitzt einen weiteren Filterwürfel, welcher an die verwendeten Leuchtmittel angepasst werden kann. Mit Hilfe dieses Filterwürfels können die Emissionsspektren der zwei Leuchtmittel separiert werden. Bei zu stark überlappenden Emissionsspektren ist eine Separierung nicht immer möglich. Deshalb muss für jedes Leuchtmittelpaar der DualLink Adapter angepasst und die Verwendbarkeit überprüft werden. Zusätzlich müssen weitere Wechselwirkungseffekte der beiden Leuchtmittel miteinander untersucht werden. Deshalb wurde in dieser Arbeit hauptsächlich mit einer sequentiellen Aufnahme der Strukturen gearbeitet. Das Elyra P.1 System verfügt ebenfalls über die Möglichkeit, 3D-Strukturen aus einer 2D-Aufnahme durch einen speziell angefertigten 3D-slicer in der Eintrittspupille des Objektivs zu rekonstruieren. Hierbei wird die PSF durch eine angepasste Phasenmaske in eine spezielle 3D-PSF umgewandelt, die je nach z-Position des Leuchtmittels eine andere Form hat. Eine beispielhafte 3D-PSF einer definierten z-Ebene ist in Abbildung 3 unter dem Bild des 3D-slicers zu sehen. Für diesen Prozess ist eine vorherige Kalibrierung der 3D-PSF mittels Testcharts durchzuführen. Die 3D-Rekonstruktion wurde derzeit hauptsächlich bei Zellkulturen eingesetzt.

## 2.2.5 Analysemethoden zur Kolokalisation von lokalisationsbasierten Mikroskopieverfahren

Zur Analyse der *d*STORM Datensätze wurden hauptsächlich Kolokalisationen zwischen Rezeptor-Clustern und einem synaptischen Marker untersucht. Das Vorgehen zur Analyse dieser Kolokalisation ist in Abbildung 7 beispielhaft zu sehen. Die Cluster-Analyse wird mittels der Software ImageJ durchgeführt. In einem ersten Schritt wurde eine vorläufige *Region of Interest* (ROI) in der höchstaufösenden Aufnahme des synaptischen Markers, welcher in Abbildung 7 grün dargestellt ist, ermittelt. Zur endgültigen ROI (Maske) Bestimmung wurde diese danach binarisiert und um 60 nm expandiert. Die Expansion ist notwendig, um die möglichen artifiziellen Abstände der Antikörperbindung mit dem jeweiligen Fluorophor zu berücksichtigen. Mit der so erstellten Maske kann in der Aufnahme der Rezeptoren, welche in Abbildung 7 in Magenta dargestellt ist, eine Cluster-Analyse durchgeführt werden. Die ermittelten Rezeptor-Cluster sind in Abbildung 7 mit Sternen gekennzeichnet. Über die ROI kann die Fläche des synaptischen Markers ermittelt werden und die Anzahl der Rezeptor-Cluster in Bezug auf die synaptische Fläche berechnet werden.

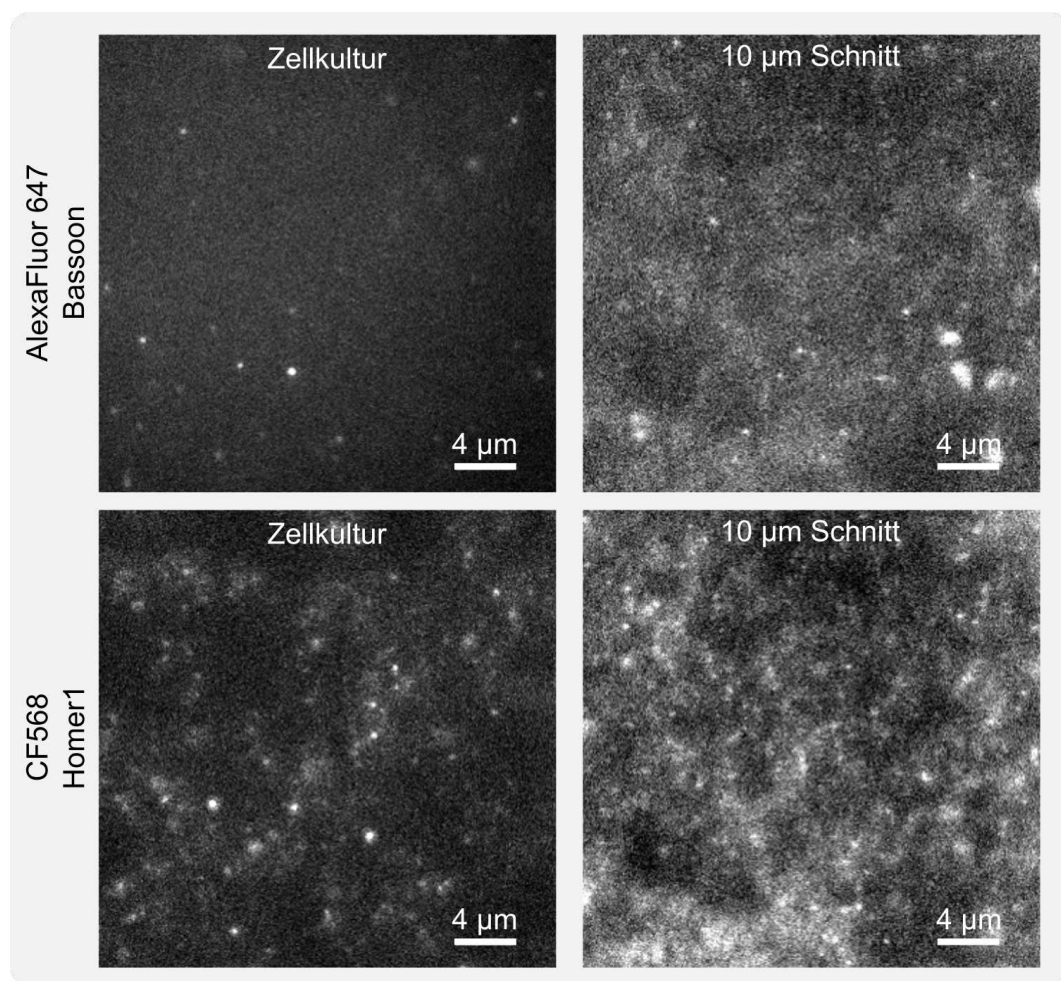


**Abbildung 7:** Verfahrensablauf zur Bestimmung der „Region of Interest“ (ROI) und zur Cluster-Analyse für die Kolokalisationsbestimmung von Rezeptoren und synaptischen Markern (Maßstab 200 nm). Das obere Bild stellt die Überlagerung einer Markerstruktur (grün) und einer Rezeptorstruktur (magenta) dar. Die Markerstruktur wird verwendet, um eine ROI zu ermitteln. Die ermittelte und expandierte ROI ist im mittleren Bild als gestrichelte weiße Linie dargestellt. Die detektierten Rezeptor-Cluster sind durch Sterne im rechten unteren Bild zu sehen.

## 2.3 Ergebnisse

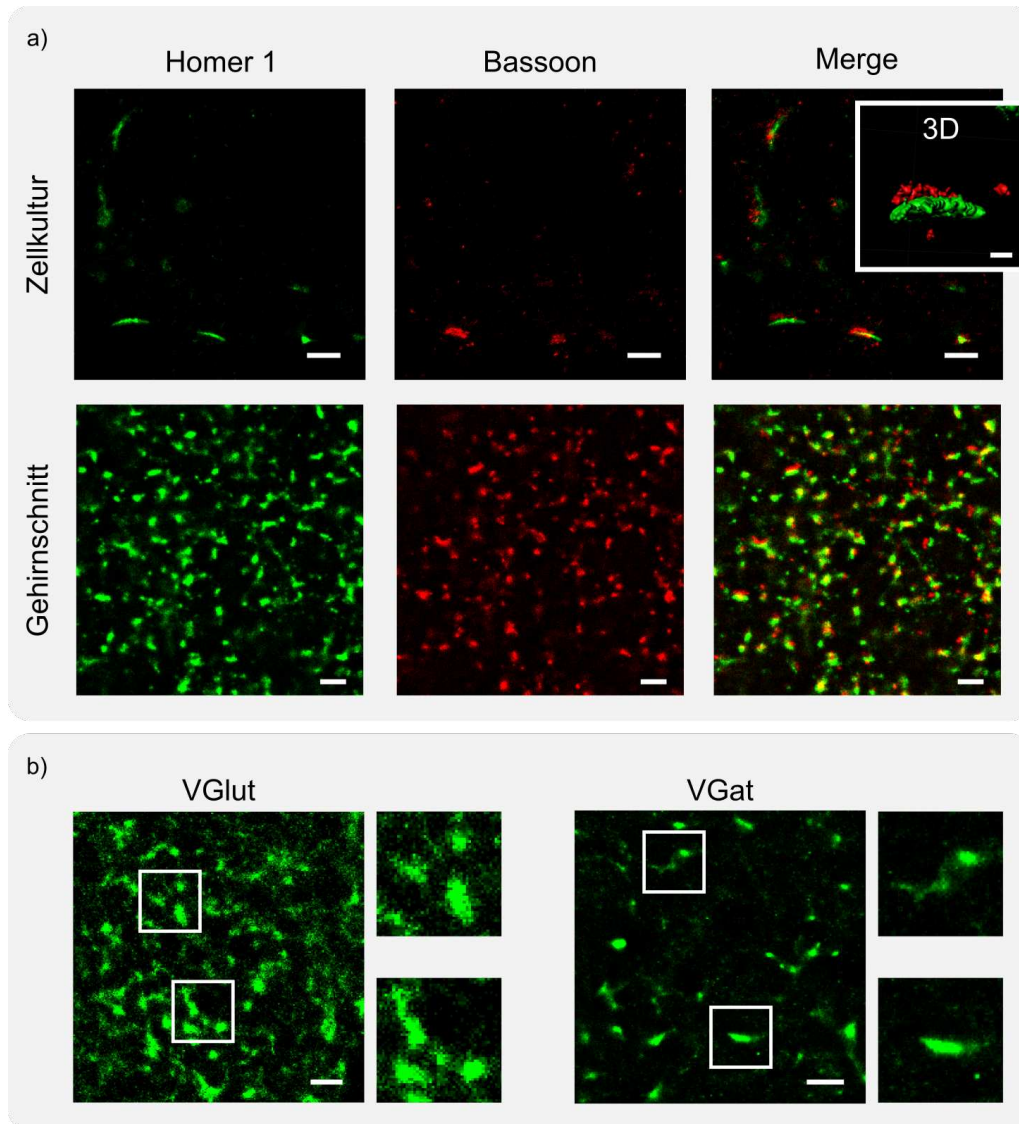
### 2.3.1 Etablierung der Antikörperfärbung von synaptischen Markern

Die in Abbildung 8 gezeigten Bilder stellen einzelne Frames einer Bildreihe von *d*STORM Aufnahmen dar. Es ist der Vergleich von primären hippocampalen Neuronenkulturen (links) und einem 10  $\mu\text{m}$  coronalen Hirnschnitt einer Maus (rechts) für den präsynaptischen Marker Bassoon mit dem Fluorophor Alexa Fluor 647 und dem postsynaptischen Marker Homer1 mit dem Fluorophor CF568 zu sehen. Die Aufnahmen im coronalen Hirnschnitt wurden im Stratum radiatum der CA1 Region des Hippocampus durchgeführt.



**Abbildung 8:** Vergleich zwischen Aufnahmen aus einer primären hippocampalen Neuronenkultur (links) und einem 10  $\mu\text{m}$  coronalen Hirnschnitt einer Maus (rechts) für zwei unterschiedliche Fluorophore (Alexa Fluor 647 und CF568). Abgebildet sind die PSF-Detektionen eines Frames aus einer Bildreihe der zwei Fluorophore Alexa Fluor 647 und CF568, welche an den präsynaptischen Marker Bassoon (oben) und den postsynaptischen Marker Homer1 (unten) gekoppelt sind.

Die Aufnahmen beider Strukturen erfolgten sequenziell. Um ein Photobleichen zu verhindern, wurde mit dem langwelligeren Fluorophor (AlexaFluor 647) begonnen. Die chromatische Aberration des Systems wurde durch ein Channel Alignment unter Verwendung von TetraSpekts Fluoreszenz Beads korrigiert und die Drifterscheinungen, die in unterschiedlichem Ausmaß während der Aufnahme auftreten können, durch einen in der Zeiss Software implementierten Drift-Algorithmus. Im Vergleich zwischen der primären hippocampalen Neuronenkultur (links) und einem  $10\ \mu\text{m}$  coronalen Hirnschnitt einer Maus (rechts) in



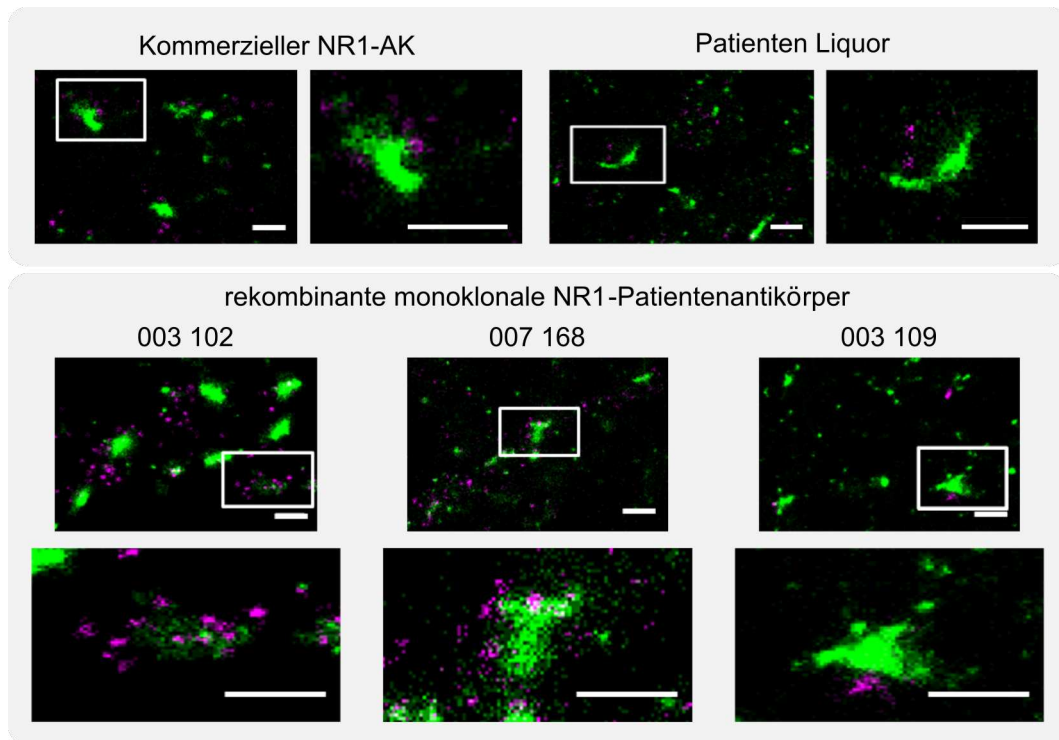
**Abbildung 9:** a) Einzelstrukturenrekonstruktionen für den präsynaptischen Marker Bassoon (Mitte) und den postsynaptischen Marker Homer1 (links) in der primären hippocampalen Neuronenkultur (oben) sowie im  $10\ \mu\text{m}$  coronalen Hirnschnitt einer Maus (unten) sowie die Überlagerung beider Strukturen mit 3D-Rekonstruktion in der primären hippocampalen Neuronenkultur (rechts). b) Einzelfärbung der vesikulären Transportproteine VGlut1 (links) und VGat (rechts) im  $10\ \mu\text{m}$  coronalen Hirnschnitt einer Maus (Maßstab 2D-Rekonstruktion  $1\ \mu\text{m}$ ; Maßstab 3D-Rekonstruktion  $400\ \text{nm}$ ).



Abbildung 8 sind die veränderten SNR-Verhältnisse der biologischen Strukturen zu sehen. Es ist ein SNR nahe 1 bei dem langwelligen Farbstoff AlexaFluor 647 in der primären hippocampalen Neuronenkultur zu erkennen. Bei kurzwelligen Farbstoffen ist eine Verschlechterung des SNR in der primären hippocampalen Neuronenkultur festzustellen. Eine deutliche Verschlechterung des SNR ist sowohl im langwelligen Spektralbereich mit Alexa Fluor 647 bei der präsynaptischen Markerstruktur Bassoon (Abbildung 8 oben) als auch im kurzwelligen Spektralbereich mit CF568 bei der postsynaptischen Markerstruktur Homer1 (Abbildung 8 unten) im  $10\ \mu\text{m}$  coronalen Hirnschnitt einer Maus zu beobachten. Die Ergebnisse der SMLM-Berechnung (Kapitel 2.2.4) für die Doppelfärbung (Kapitel 2.2.3) sind in Abbildung 9a zu sehen [62]. Des Weiteren wurden für weitere Experimente die vesikulären Transportproteine VGlut1 und VGat im  $10\ \mu\text{m}$  coronalen Hirnschnitt einer Maus mit dem Fluorophor CF568 etabliert. Die Strukturrekonstruktionen sind in Abbildung 9b zu sehen. Die Rekonstruktionen in der hippocampalen Neuronenkultur zeigen eine gute Strukturgenauigkeit und wenige Rekonstruktionsartefakte. Im  $10\ \mu\text{m}$  coronalen Hirnschnitt einer Maus ist wie erwartet eine hohe Dichte von post- und präsynaptischen Strukturen zu erkennen, wobei hier leichte Rekonstruktionsartefakte auftreten. Diese sind aus einem verschlechterten Kontrast zu folgern.

### 2.3.2 Etablierung der Antikörperfärbung von NMDA-Rezeptoren

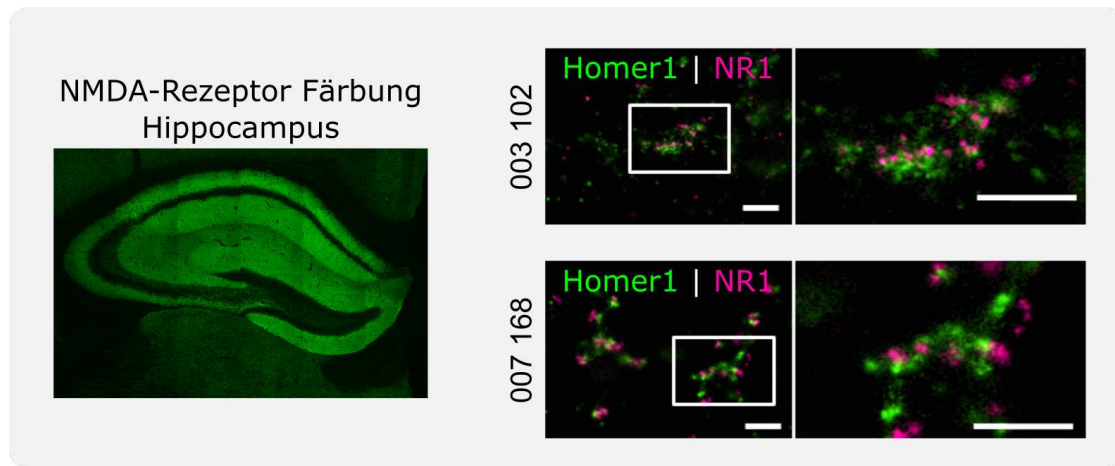
Im nächsten Schritt wurden Antikörper gegen die NR1 Untereinheit des NMDA-Rezeptors untersucht. Diese Tests wurden an primären hippocampalen Neuronenkulturen und an  $10\ \mu\text{m}$  coronalen Hirnschnitten einer Maus durchgeführt. Hierfür wurden verschiedene Antikörper (siehe Anhang Tabelle 7) auf ihre Bindungseigenschaften überprüft. Es standen ein kommerziell erhältlicher Antikörper sowie Liquorproben von NMDA-Rezeptor Enzephalitis Patienten zur Verfügung. Zusätzlich wurden rekombinante monoklonale NR1-Patientenantikörper (003 102; 003 109; 007 168; siehe Anhang Tabelle 7) verwendet [63]. Als Erstes erfolgte die Ermittlung der Lokalisation der NMDA-Rezeptoren. Da es sich bei dem NMDA-Rezeptor um einen überwiegend postsynaptisch lokalisierten Rezeptor handelt, konnte die Kolo-kalisation zum postsynaptischen Marker Homer1 bestimmt werden. Sie wurde zuerst in primären hippocampalen Neuronenkulturen durchgeführt. Beispielbilder der resultierenden Färbungen sind in Abbildung 10 zu sehen. Die Färbungen mit dem kommerziellen NR1-AK sowie dem Patienten-Liquor zeigten ein deutlich geringeres Signal als die meisten rekombinanten monoklonalen NR1-Patientenantikörper. Einzig der



**Abbildung 10:** Beispiel-Bilder einer Rekonstruktion mittels SMLM-Algorithmus einer Färbung gegen die NR1 Untereinheit des NMDA-Rezeptors mit verschiedenen primär-Antikörpern und mit einem entsprechenden sekundär-Antikörper, welcher mit Alexa Fluor 647 gekoppelt ist (links). Vergrößerte Bildausschnitte in der oberen Reihe rechts und in der unteren Reihe unterhalb der Originalbilder. Die obere Bildreihe zeigt die Färbung mittels eines kommerziell erhältlichen NR1-AK sowie die Färbung mittels Patienten Liquor jeweils in Magenta und den postsynaptischen Marker Homer1 in Grün zur Bestimmung der Kolokalisation. Die untere Bildreihe zeigt die Färbung mittels verschiedener rekombinanter monoklonaler NR1-Patientenantikörper (003 102; 007 168; 003 109) in Magenta und den postsynaptischen Marker Homer1 in Grün zur Bestimmung der Kolokalisation. (Maßstab 500 nm).

rekombinante monoklonale NR1-Patientenantikörper 003 109 wies ein ähnliches Bindungsverhalten wie der kommerzielle NR1-AK und der Patienten Liquor auf. Die beiden anderen rekombinanten monoklonalen NR1-Patientenantikörper zeigten deutliche Signale und eine bessere Kolokalisation mit dem postsynaptischen Marker Homer1. Weiterhin wurde mit beiden hoch affinen rekombinanten monoklonalen Patientenantikörpern Etablierungsversuche im  $10\ \mu\text{m}$  coronalen Hirnschnitt einer Maus durchgeführt. Diese sollten prüfen, ob die beiden ausgewählten Antikörper auch eine typische Bindungscharakteristik des NMDA-Rezeptors aufweisen, der im Kapitel 2.1 in Abbildung 1 (rechts) zu sehen ist. In Abbildung 11 ist auf der linken Seite das Bindungsverhalten des rekombinanten Antikörpers (003 102) im  $10\ \mu\text{m}$  coronalen Hirnschnitt einer Maus als Übersichtsaufnahme abgebildet. Des Weiteren sind in Abbildung 11 (rechts) die Kolokalisationen der NMDA-Rezeptoren, der



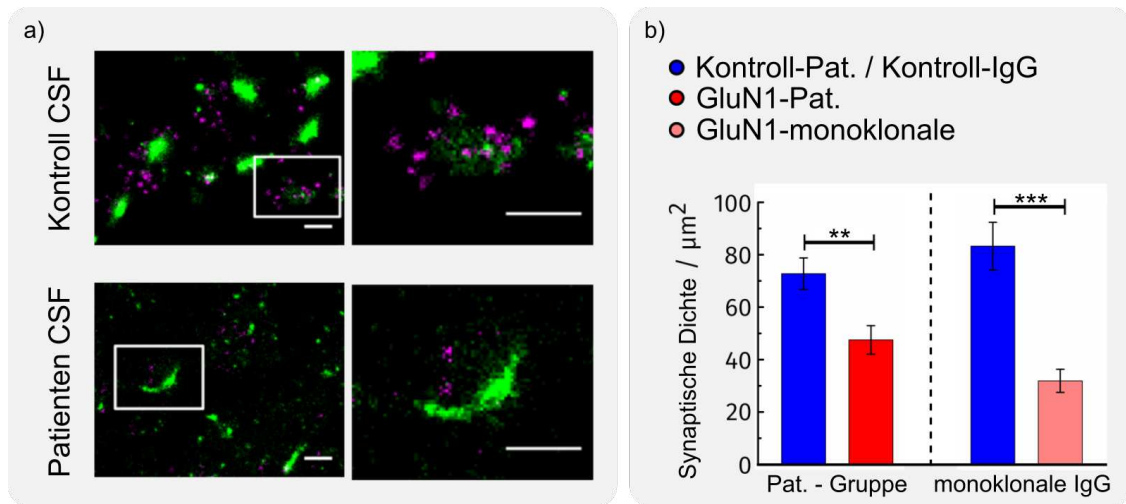


**Abbildung 11:** Beispiel-Übersichtsbild des Hippocampus eines  $10\ \mu\text{m}$  coronalen Hirnschnittes einer Maus mit einer NMDA-Rezeptorfärbung mit den rekombinanten monoklonalen NR1-Patientenantikörpern 003 102 und 007 168 und einen Sekundär-Antikörper gekoppelt mit Alexa Fluor 647 (links). Höchstaufgelöste Kolokalisationsbilder der NMDA-Rezeptorfärbung (NR1 Untereinheit) in Magenta mit dem postsynaptischen Marker Homer1 in Grün (Maßstab 500 nm).

beiden hoch affinen rekombinanten monoklonalen NR1-Patientenantikörper (003 102; 007 168) unter Verwendung eines Sekundär-Antikörpers, welcher mit Alexa Fluor 647 gekoppelt ist, zu sehen. Beide rekombinanten monoklonalen NR1-Patientenantikörper zeigen im  $10\ \mu\text{m}$  coronalen Hirnschnitt einer Maus eine typische NMDA-Rezeptorfärbung gegenüber Homer1.

### 2.3.3 Untersuchung der synaptischen NMDAR Expression in primären hippocampalen Neuronen - quantitative Analyse mittels *d*STORM

Als Erstes wurde die Veränderung der synaptischen Dichte von NMDA-Rezeptoren in einem Zellkultur-Modell untersucht. In diesem Modell wurden Zellkulturen am Tag 13 nach der Kultivierung (day in vitro - div) für 24 Stunden mit aus dem CSF (Cerebrospinalflüssigkeit, Liquor) aufgereinigten Antikörpern (Konzentration:  $20\ \mu\text{g}/\text{ml}$ ) eines NMDA-Rezeptor Enzephalitis Patienten sowie mit auf gleicher Weise gewonnenen Kontroll-Antikörpern (Konzentration:  $20\ \mu\text{g}/\text{ml}$ ) präinkubiert. Zusätzlich dazu wurde auch der vorher beschriebene rekombinante monoklonale NR1-Patientenantikörper 003 102 (Konzentration:  $1\ \mu\text{g}/\text{ml}$ ) und ein dazugehöriger Kontroll-Antikörper (Konzentration:  $20\ \mu\text{g}/\text{ml}$ ) präinkubiert. Diese vier Gruppen wurden nach 24 Stunden mit dem Kulturmedium gewaschen und anschließend mit 4%igen PFA fixiert. Die so fixierten Zellen wurden dann nach dem im Kapitel 2.2.3 beschriebenen Protokoll gefärbt. Die NMDA-Rezeptoren wurden mit



**Abbildung 12:** a) Beispiel-Aufnahme einer Homer1 und NR1 Färbung (Maßbalken 500 nm). b) Balkendiagramm der postsynaptischen Dichte von NMDA-Rezeptoren der vier Versuchsgruppen ( $n_{\text{Kontroll-Pat.}} = 40$  (Synapsen),  $n_{\text{GluN1-Pat.}} = 30$  (Synapsen),  $p = 0,0023$ ;  $n_{\text{Kontroll-IgG.}} = 40$  (Synapsen),  $n_{\text{GluN1-monoklonal.}} = 40$  (Synapsen),  $p = 1,9 \cdot 10^{-8}$ ).

dem rekombinanten monoklonalen NR1-Patientenantikörper 003 102 gegen den postsynaptischen Marker Homer 1 gefärbt. Als Sekundärfarbstoffe für die Rezeptorfärbung wurde Alexa Fluor 647 und für den synaptischen Marker CF568 verwendet. In Abbildung 12a ist ein Beispiel für eine NMDA-Rezeptor Färbung (magenta) mit einer Färbung des postsynaptischen Markers Homer1 (grün) nach der Präinkubation mit aufgereinigtem Kontroll-AK und Patienten-AK eines NMDA-Rezeptor Enzephalitis Patienten zu sehen. Die synaptische Dichte der NMDA-Rezeptoren wurde dann, wie in Kapitel 2.2.5 beschrieben, ausgewertet und ist für alle vier Gruppen in Abbildung 12b dargestellt. Wie in Abbildung 12b erkennbar, nimmt die postsynaptische Dichte der NMDA-Rezeptoren nach einer Präinkubation sowohl mit aufgereinigtem Patienten-AK von NMDA-Rezeptor Enzephalitis Patienten als auch mit den rekombinanten monoklonalen NR1 Patientenantikörpern signifikant ab.

## 2.4 Diskussion

Wie in Kapitel 2.3.1 gezeigt, spiegeln die veränderten SNR-Verhältnisse die Schwierigkeit der Weitfeldmikroskopie im Bereich der optischen Eindringtiefe wider [64]. Durch das Verlassen von Gewebemolayerstrukturen, wie primären hippocampalen Neuronenkulturen, hin zu dickeren Gewebestrukturen kommt es zu unterschiedlichen optischen Effekten, wie zum Beispiel Streuung in unterschiedlichen Gewebeschichten. Zusätzlich zeigt Gewebe ein unterschiedliches Streuverhalten [65] in unterschiedlichen Spektralbereichen. Daraus fol-

gen die unterschiedlichen SNRs aus Kapitel 2.3.1 im  $10\ \mu\text{m}$  coronalen Hirnschnitt einer Maus. Des Weiteren tritt bei Anregung mittels eines  $561\ \text{nm}$  Lasers für das Fluorophor CF568 mit hohen Laserleistungen, welche für die *d*STORM Technik notwendig sind, im Gewebe eine erhöhte Autofluoreszenz auf [66]. Diese Autofluoreszenz ist auch in geringerem Umfang in den Aufnahmen der Zellkultur (Abbildung 8 unten) zu sehen. Weiterhin sind Absorptionen in Gewebeschichten außerhalb der Fokusebene für die in Abbildung 8 erkennbare Verschlechterung der SNR von Bedeutung. Die Gesamtheit der aufgezählten Effekte kann durch die Reduktion der Schnittdicke des Gewebes beeinflusst werden. Eine weitere Möglichkeit neben der Reduktion der Schnittdicke stellt die sogenannte Clearing-Technik dar [67], welche mit einem erheblichen Behandlungsaufwand verbunden ist.

Die Rekonstruktion des postsynaptischen Markers Homer1 und des präsynaptischen Markers Bassoon konnte bei der hier gezeigten Schnittdicke von  $10\ \mu\text{m}$  durch den SMLM-Algorithmus der Firma Zeiss durchgeführt werden. Das Experiment zeigt, dass sowohl in den primären hippocampalen Neuronenkulturen als auch im coronalen Hirnschnitt einer Maus beide synaptischen Kompartimente separiert und der synaptische Spalt dargestellt werden können.

Des Weiteren wurden für spätere Experimente die vesikulären Transportproteine VGlut1 und VGat im  $10\ \mu\text{m}$  coronalen Hirnschnittgewebe einer Maus etabliert [68]. VGlut ist dabei Glutamat spezifisch. VGat ist an der Aufnahme von Glycin und GABA in synaptische Vesikel beteiligt. Die Etablierung dieser Strukturen wurde mit dem Fluorophore CF568 durchgeführt und wiesen dieselben Problematiken der Multilayerschichtaufnahme wie bei den zuvor etablierten postsynaptischen Marker Homer1 und präsynaptischen Marker Bassoon auf. Die Auflösung der Bildrekonstruktionen in primären hippocampalen Neuronenkulturen lag im Bereich zwischen  $50\ \text{nm}$  bis  $60\ \text{nm}$ . Die Auflösung in den  $10\ \mu\text{m}$  coronalen Hirnschnitten einer Maus war um  $40\%$  bis  $70\%$  reduziert und lag zwischen  $70\ \text{nm}$  und  $100\ \text{nm}$ . Dies lässt sich mit den oben erwähnten Effekten und den daraus resultierenden Lokalisationsproblematiken erklären. Einem verschlechterten SNR kann mit einer Erhöhung der Laserleistung in der Objektebene entgegengewirkt werden. Die Auflösung ist ausreichend, um zum Beispiel synaptische Marker oder Rezeptor-Cluster qualitativ analysieren zu können. Durch die oben beschriebenen Effekte im Gewebe sind jedoch vermehrte Rekonstruktionsartefakte zu erkennen [69]. Allerdings ist eine stärkere Reduktion der Schnittdicke nicht möglich, da sonst die synaptischen Strukturen zu stark beschnitten werden. Damit wurde aus diesen Ergebnissen die optimale Gewebedicke für coronale Hirnschnitte einer Maus für die späteren *d*STORM Experimente in Kapitel 5.3 auf  $10\ \mu\text{m}$

festgelegt. Für diese Gewebedicke konnten die PSFs sowohl von Alexa Fluor 647 und CF568 vom SMLM-Algorithmus lokalisiert, eine Rekonstruktion durchgeführt und die neuronale Netzwerkstruktur vollständig dargestellt werden.

Mit diesen Untersuchungen wurden zwei wichtige qualitative Teilergebnisse erzielt. Mit Hilfe der höchstauffösenden Mikroskopie kann bei einer Doppelfärbung von Homer1 und Bassoon der synaptische Spalt sichtbar dargestellt werden. Dieser liegt im Bereich weniger Nanometer und ist durch Standardmikroskopieverfahren nicht auflösbar [70]. Durch die oben beschriebene Verwendung von dünnen  $10\ \mu\text{m}$  Gewebsschnitten konnte mittels *d*STORM der synaptische Spalt nicht nur in primären hippocampalen Neuronenkulturen, sondern auch in coronalen Hirnschnitten einer Maus gezeigt werden. Somit ist die Auflösung auch in Multilayergewebestrukturen für eine qualitative Analyse von neuronalen Strukturen gegeben. Dies kann gerade bei komplexen Fragestellungen in den Neurowissenschaften, welche durch Zellkulturmodelle nicht oder nur teilweise beschreibbar sind, von entscheidender Bedeutung sein. Des Weiteren wurde auch versucht, eine 3D-Rekonstruktion der verschiedenen synaptischen Marker zu etablieren. Eine 3D-Rekonstruktion von Homer1 und Bassoon ist in Abbildung 9a (Ausschnitt rechts oben) gezeigt. Dies konnte jedoch nur in der Zellkultur mit einer ausreichenden Rekonstruktionsqualität und somit Auflösung umgesetzt werden. Das SNR in den  $10\ \mu\text{m}$  Schnitten war im kurzwelligen Bereich bei Anregung mit dem 561 nm Laser noch ungenügend. Somit konnte die im Kapitel 2.2.4 beschriebene Doppel-Helix PSF nicht genau lokalisiert werden. Dies liegt auch an einer sehr hohen Dichte von Emitttern in einem  $10\ \mu\text{m}$  dicken Schnitt. Durch eine Erhöhung der Laserleistung kann die Emitterdichte und somit das Schaltverhalten der Emitter verbessert werden [56]. Diese eingeschränkte Lokalisierung hatte eine deutliche Auswirkung auf die Auflösung. Die Auflösung der 3D-Rekonstruktion der primären hippocampalen Neuronenkulturen lag im Bereich zwischen 60 nm und 80 nm. Somit konnte der synaptische Spalt mit einer Größe um die 100 nm noch in ausreichender Weise dargestellt werden. Da die Auflösung bei der 3D-Rekonstruktion im coronalen Hirnschnitt einer Maus zwischen 110 nm und 140 nm und somit deutlich über der Größe des synaptischen Spalts liegt, ist die Anwendung der *d*STORM Technik mit 3D-Rekonstruktion für unsere neurologischen Fragestellungen ungeeignet.

Das verringerte Bindungsverhalten des rekombinanten monoklonalen NR1-Patientenantikörpers 003 109 gegenüber den anderen rekombinanten monoklonalen NR1-Patienten-

tikörpern ist damit zu erklären, dass es sich hierbei um einen niedrig affinen Antikörper handelt [63]. Nach der Auswertung der oben beschriebenen Experimente konnte eindeutig bestimmt werden, dass die Bindungsaffinitäten des kommerziellen NR1-AKs und der Patienten Liquor Proben für spätere Versuche nicht ausreichen. Im Gegensatz dazu findet man für die rekombinanten monoklonalen NR1-Patientenantikörper mit den Bezeichnungen 003 102 und 007 168 eine sehr gute Kolo-kalisation im Bereich des postsynaptischen Markers Homer1 [71]. Diese Bindungsverhalten bzw. diese Bindungscharakteristik ermöglicht den Einsatz dieser beiden rekombinanten monoklonalen NR1-Patientenantikörper in späteren Zellkulturexperimenten (Kapitel 2.3.3). In weiteren Versuchen mit einem 10  $\mu\text{m}$  coronalen Hirnschnitt einer Maus konnte die spezifische Bindung der beiden rekombinanten monoklonalen NR1-Patientenantikörper 003 102 und 007 168 nachgewiesen werden. Mit den in Abbildung 11 dargestellten Bindungseigenschaften wurde verifiziert, dass beide rekombinante monoklonale NR1-Patientenantikörper für nachfolgende Experimente in Kapitel 2.3.3 geeignet sind und eine gute Affinität gegenüber der NR1 Untereinheit des NMDA-Rezeptors aufweisen. Wie für die Zellkulturexperimente wurde auch für spätere Schnittexperimente der rekombinante monoklonale NR1-Patientenantikörper 003 102 verwendet, da dieser in größeren Mengen zur Verfügung stand.

Die in Abbildung 12 deutlich erkennbare Reduktion der postsynaptisch lokalisierten NMDA-Rezeptoren korrelieren gut mit funktionellen Messungen, die mittels elektrophysiologischen Methoden parallel in anderen Arbeiten zu der vorliegenden Arbeit durchgeführt wurden. Sie zeigen eine Reduktion der synaptischen NMDA-Rezeptor vermittelten postsynaptischen Ströme (Ergebnisse werden nicht gezeigt). Somit ist es durch die vorliegenden Ergebnisse möglich, Hypothesen aus funktionellen Messungen durch die morphologischen Messungen mittels der SRM zu bekräftigen. Dies stellt einen fundamentalen Schritt in der Erforschung des Krankheitsbildes der Autoimmunen-enzephalitis dar. Diese Abnahme hat zur Folge, dass weniger NMDA-Rezeptoren in der Synapse aktivierbar sind. Somit kommt es zu einem geringeren  $\text{Ca}^{2+}$  Einstrom in die Zelle, welcher u.a. eine Reduktion der Langzeitpotenzierung bewirkt und in einer Störung des Lernprozesses und des Gedächtnisses resultiert. Dies wurde in Tiermodellen für die NMDA-Rezeptor Enzephalitis gezeigt [72]. Weiterführende Experimente sollen die molekularen Grundlagen der durch aAK gestörten Langzeitpotenzierung untersuchen.

## 3 Strukturierte Beleuchtungsmikroskopie auf Basis einer Specklebeleuchtung

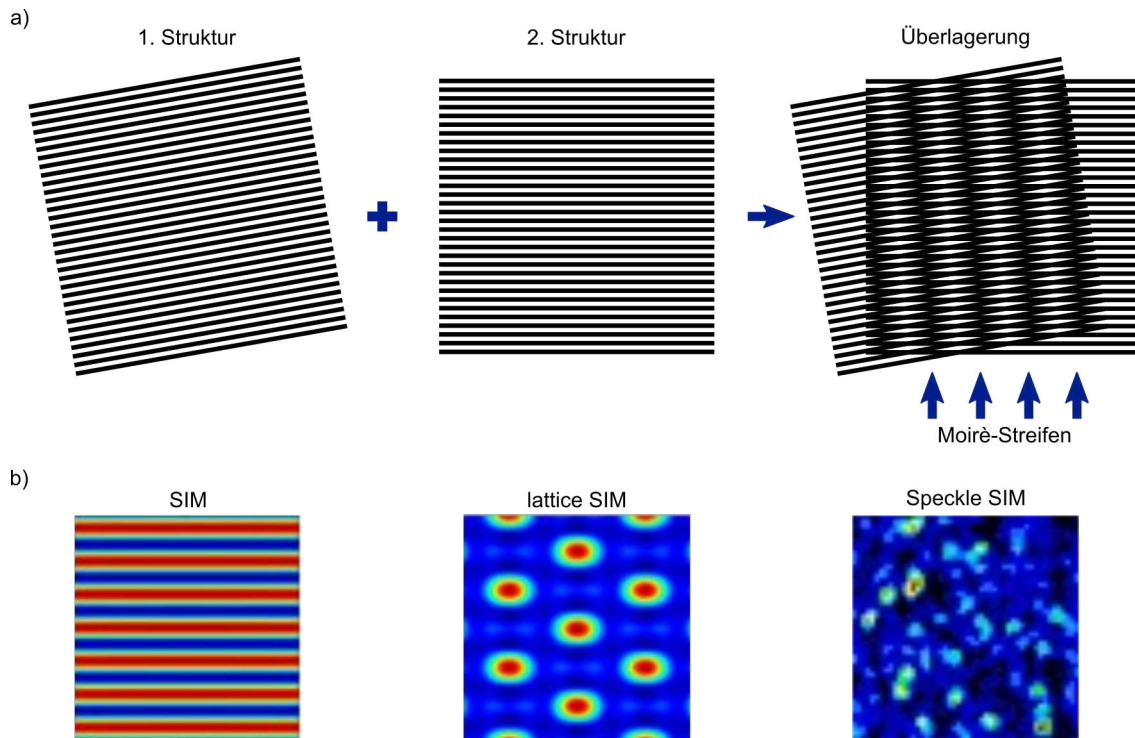
### 3.1 Einleitung

In diesem Kapitel soll die grundlegende Entwicklung eines Super-resolution Mikroskops auf Basis der strukturierten Beleuchtungsmikroskopie (SIM) beschrieben werden [6]. Die strukturierte Beleuchtungsmikroskopie hat besonders gegenüber den im Kapitel 2.2.4 beschriebenen lokalisationsbasierten Verfahren den Vorteil der Eignung zum Einsatz in der Lebendzellanalyse. Dies gelingt durch den Einsatz von niedrigen Laserleistungen und durch die hohe Aufnahmegeschwindigkeit der Systeme. Das in dieser Arbeit beschriebene System zählt dabei zu dem Feld der Weitfeldmikroskope. Weitfeldsysteme auf Basis der strukturierten Beleuchtungsmikroskopie haben gegenüber den scannenden Systemen dieser Verfahrensart, wie etwa der STED Mikroskopie, den Vorteil, mit deutlich weniger Laserleistung und mit einer niedrigen Aufnahmezeit zu arbeiten.

Bei der SIM-Mikroskopie handelt es sich um ein Weitfeldverfahren, welches durch die Beleuchtung der Probe mit Hilfe einer Beleuchtungsstruktur eine Verdoppelung der Auflösung sowohl in axialer als auch in lateraler Richtung ermöglicht. Für ein typisches SIM-Mikroskop wird als Beleuchtungsstruktur ein Lichtgitter verwendet [50], welches in 3 verschiedene Positionen im Sichtfeld auf der Probe verschoben und an jeder dieser Positionen in 3 unterschiedlichen Orientierungen aufgenommen wird. Aus diesen Aufnahmen wird anschließend ein hochaufgelöstes Bild berechnet.

Diese Art von Mikroskopie basiert auf dem physikalischen Moiré-Effekt. Dieser tritt auf, wenn man beispielsweise zwei Linienmuster mit einem Winkelversatz zueinander überlagert. Dabei kommt es zu einem Interferenzeffekt, welcher in Abbildung 13 zu sehen ist und als sogenannte Moiré-Streifen erscheint. Bei den Moiré-Streifen handelt es sich um ein neues, periodisches Liniengitter bei dem sowohl die Linienbreite als auch der Linienabstand viel größer ist als bei den Ausgangsgittern. Der Moiré-Effekt ist jedoch nicht nur bei Linienstrukturen zu sehen, sondern kommt auch bei nicht linienartigen Ausgangsstrukturen vor. In der SIM-Mikroskopie wird in kommerziellen Systemen ein Beleuchtungsgitter verwendet, das auf die Anregungswellenlänge der verwendeten Fluorophore in der Fokusebene des Objektivs abgestimmt ist und das auf die zu untersuchende Struktur abgebildet wird. Das zu detektierende Interferenz-(Moiré-) Bild besteht aus der bekannten Beleuchtungsstruktur, also dem Beleuchtungsgitter, und der unbekanntem Struktur in der Fokusebene.





**Abbildung 13:** a) Entstehung des Moiré-Effektes bei Überlagerung von zwei zueinander verdrehten Linienstrukturen. b) Farbverlaufsdarstellung der Intensitäten bei drei verschiedenen Beleuchtungsmöglichkeiten. Standard SIM Beleuchtung mit Liniengitter (links), lattice-SIM Beleuchtung mit punktförmigen Gitterstrukturen (Mitte) und Specklebeleuchtungsverteilung (rechts) [73, 74].

Die Berechnung des hochaufgelösten Bildes findet im Fourier-Raum statt [6, 73]. Hierfür wird das detektierte Bild durch eine Fourier-Transformation von einem orts aufgelösten in ein frequenz aufgelöstes (räumliche Frequenz) Bild überführt. Da das Moiré-Muster, das durch die Überlagerung von Beleuchtungsstruktur und Objektstruktur im Fourier-Raum entsteht, höhere Frequenzen beinhaltet, besitzt es im Ortsraum kleinere räumliche Strukturen [14, 75]. Somit kann durch die SIM-Mikroskopie unterhalb des Auflösungskriteriums gearbeitet und Bilder mit kleinsten Strukturen aufgenommen werden. Neueste Mikroskopiesysteme des SIM-Konzeptes arbeiten auf Grundlage des lattice-SIM Prinzips [73, 74]. Um weiterführende Fragestellungen aus dem Kapitel 2 zu bearbeiten oder Kombinationsmöglichkeiten, wie in Kapitel 5 beschrieben, zu entwickeln, ist es notwendig, höchstauflösende Mikroskope für die Lebendzellanalyse einsetzen zu können.

Die in der Arbeitsgruppe verwendeten lokalisationsbasierten höchstauflösenden Mikroskope (siehe Kapitel 2.2.4) sind für diese Art von Untersuchungen limitiert bzw. nicht geeignet. Zum einen sind die Aufnahmezeiten, welche mehrere Minuten betragen können,

für die meisten zu untersuchenden Prozesse zu lang und zum anderen wird für einige der lokalisationsbasierten Verfahren ein spezielles Sauerstoff-absorbierendes Puffersystem benötigt. Die meist verwendeten Puffersysteme mit Mercaptoethylamine (MEA) sind jedoch während einer längeren Messzeit toxisch für Zellen [19]. Deshalb war die Entwicklung eines Mikroskopes auf Basis der strukturierten Beleuchtungsmikroskopie notwendig. Das zu entwickelnde Mikroskop musste zusätzlich zum Vorteil einer hohen Aufnahmegeschwindigkeit und einer niedrigen Laserleistung auch eine einfache Handhabung und einen unkomplizierten Aufbau aufweisen. Diesbezüglich wurde der Mikroskopaufbau über eine Streuscheibe und die Verwendung von sogenannten Speckle realisiert.

Speckle an sich sind ein lange bekanntes optisches Phänomen. Sie können zum Beispiel für die 3D-Rekonstruktion von Objekten eingesetzt werden, können aber auch störende Einflüsse im Bereich der Lasertechnik haben. In der Mikroskopie werden sie oft zum Homogenisieren von Bildern oder als Beleuchtungsstruktur [12] eingesetzt. Die Beschreibung eines Specklefeldes wurde schon in den 70er Jahren durchgeführt [76, 77]. Für die spätere Betrachtung der Entstehung und der Charakterisierung von Specklefeldern ist der Begriff der optischen Kohärenz essentiell. Unter diesem Begriff versteht man die Fähigkeit zweier Wellenzüge (hier insbesondere elektromagnetische Wellen) zu interferieren. Diese Wellenzüge besitzen eine feste Phasenbeziehung. Es kommt somit zur konstruktiven oder destruktiven Überlagerung bzw. Interferenz. Des Weiteren unterscheidet man zwischen räumlicher und zeitlicher Kohärenz von elektromagnetischen Wellen.

Bei allgemeiner Betrachtung ist zu erwähnen, dass elektromagnetische Wellen oder Quellen elektromagnetischer Strahlung weder eine rein zeitliche noch eine rein räumliche Kohärenz aufweisen. In der Realität wird eine partielle Kohärenz sowohl zeitlich als auch räumlich auftreten. Im stationären Fall ist dieser Sachverhalt der partiellen Kohärenz durch den normierten, komplexen Kohärenzgrad  $\gamma$  und die (komplexen) Kreuzkorrelationsfunktionen  $\Gamma_{xy}(\tau)$  der Wellenzüge zu beschreiben [78].

$$\gamma_{12}(\tau) = \frac{\Gamma_{12}(\tau)}{\sqrt{\Gamma_{11}(\tau=0)}\sqrt{\Gamma_{22}(\tau=0)}} \quad (6)$$

Hierbei werden die einzelnen Teilwellen  $\vec{E}_j(\vec{r}, t)$

$$\vec{E}_j(\vec{r}, t) = \vec{A} \cdot e^{i(\vec{k}\vec{r} - \omega t)}, j \in \{1, 2\} \quad (7)$$

durch die Amplitude  $\vec{A}$  und dem Wellenzahlenvektor  $\vec{k}$  ( $\vec{k} = 2\pi/\lambda$  mit der Wellenlänge  $\lambda$ ) ausgedrückt. Des Weiteren liefert die (komplexe) Kreuzkorrelationsfunktion mit der



Zeitdifferenz  $\tau$

$$\Gamma_{12}(\tau) = \langle \vec{E}_1(\vec{r}_1, t) \vec{E}_2^*(\vec{r}_2, t + \tau) \rangle \quad (8)$$

ein Maß für die Ähnlichkeit zweier zeitlicher Verläufe von Wellenamplituden. Dieser Zusammenhang kann auch als wechselseitige Kohärenzfunktion verstanden werden. Durch diesen Zusammenhang aus Gleichung 8 können in Gleichung 9 die Autokorrelationsterme  $\Gamma_{11}(\tau = 0)$  und  $\Gamma_{22}(\tau = 0)$  auch durch die jeweilige Intensität  $I_1$  und  $I_2$  der Wellenamplitude zur Gleichung

$$\gamma_{12}(\tau) = \frac{\Gamma_{12}(\tau)}{\sqrt{I_1} \sqrt{I_2}} \quad (9)$$

abgewandelt werden. Anhand von Gleichung 9 kann nun für verschiedene Fälle ein direkter Zusammenhang zur Kohärenz gezogen werden. Hierbei gelten folgende Fälle in Bezug zur Kohärenz von (Teil-)Wellen:

$$\begin{aligned} |\gamma_{12}(\tau)| &= 1 \\ 0 < |\gamma_{12}(\tau)| &< 1 \\ |\gamma_{12}(\tau)| &= 0 \end{aligned}$$

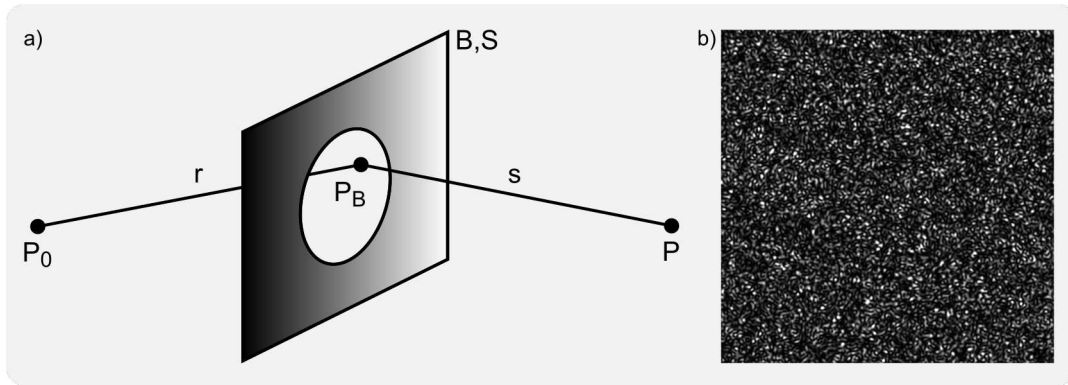
Betrachtet man nun beide Fälle der Kohärenz, also die räumliche und zeitliche Kohärenz separat, so kann die rein zeitliche Kohärenz durch  $\gamma(\tau)$  - es liegt keine räumliche Separation der Welle vor - und die rein räumliche Kohärenz durch  $\gamma(0)$  - es liegt keine zeitliche Differenz zwischen den Wellen vor - beschrieben werden.

Die Entstehung eines Specklefeldes hängt mit dem optischen Phänomen der Beugung an Strukturflächen zusammen. Wird eine Phasen- oder Amplitudenstruktur  $B$  in der Fläche  $S$  mit kohärentem Licht beleuchtet, so wird dieses gebeugt. Dies ist in Abbildung 14a dargestellt. Der Prozess der Beugung durch die Phasen- oder Amplitudenstruktur in der Fläche  $S$  wird im Allgemeinen durch das Fresnel-Kirchhoff'sche Beugungsintegral beschrieben. Des Weiteren wird in dieser Arbeit die Fraunhofer-Näherung des Beugungsintegrals betrachtet. In der Fraunhofer-Näherung werden kleine Blenden ( $B \rightarrow 0$ ) und große Abstände ( $P_0 P_B \rightarrow \infty; P_B P \rightarrow \infty$ ) also das Fernfeld berücksichtigt. Hierbei entspricht das Beugungsintegral in der Fraunhofer-Näherung der Fourier-transformierten Blendenfunktio-

on  $f_B$  mit der Wellenlänge  $\lambda$  entsprechend Gleichung 10:

$$u'(P) = \iint f_B(p, q) e^{-\frac{2\pi}{\lambda}(xp+yq)} dpdq; P = P(x, y). \quad (10)$$

Wird das Fernfeld einer beliebigen statistischen Phasenfunktion  $\Phi(p, y)$  mit  $f_B = e^{i\Phi(p, y)}$  innerhalb einer kreisförmigen Blendenöffnung und 0 außerhalb dieser Blendenöffnung berechnet, so erhält man im Fernfeld ein Specklefeld (Specklemuster), wie es in Abbildung 14b zu sehen ist. Aus der vorhergehenden Betrachtung können nun einige Eigenschaften



**Abbildung 14:** a) Darstellung des Beugungsprozesses bei Beleuchtung einer Blende B vom Objektpunkt  $P_0$  in den Blendenpunkt  $P_B$  in der Fläche S und die daraus resultierende Beugung an der Blende in dem Bildpunkt P. b) Beobachtetes Specklefeld (Interferenzfeld) in der Fraunhofer-Näherung im Bildpunkt P als Intensitätsverteilung.

und Zusammenhänge eines Specklefeldes hergeleitet und erläutert werden. Eine für die Verwendung des Specklefeldes als Beleuchtungsfeld wichtige Eigenschaft ist der Specklekontrast K (Gleichung 11).

$$K = \frac{\sigma_I}{\bar{I}} \quad (11)$$

Der Specklekontrast ist, wie in Gleichung 11 zu sehen, der Quotient aus der Standardabweichung  $\sigma_I$  und des Mittelwertes der Intensität  $\bar{I}$ . Wird dieser Specklekontrast nun für eine ideale Verteilung, wie in Abbildung 14b zu sehen ist, berechnet, erhält man als Specklekontrast den Wert 1. Diesen Kontrastwert erhält man also bei voll-entwickelten Specklefeldern. Hierbei gilt, dass die Phasenvariation größer als  $2\pi$  und die Autokorrelation der Phasenverteilung wesentlich kleiner als die Gesamtausdehnung der zur Interferenz beitragenden Phasenverteilung ist. Somit liegt eine sowohl zeitliche als auch räumliche, kohärente Beleuchtung vor. Weiterhin existieren zwei Arten von Specklefeldern, objekti-

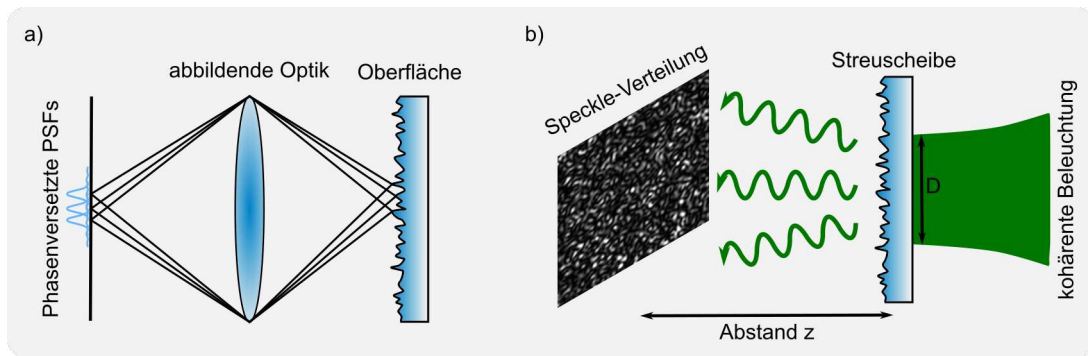
ve und subjektive Speckle. Als Erstes werden die objektiven Speckle betrachtet. Hierbei handelt es sich um ein Interferenzmuster statistischer Phasenverteilung, welches bei einer Freiraumausbreitung auftritt. In Abbildung 15b ist ein möglicher Aufbau zu sehen, um objektive Speckle zu beobachten. Hierbei bilden sich statistische Intensitätsverteilungen im Abstand  $z$  aus. Diese entstehen durch kohärente Superposition von Einzelwellen mit einer statistischen Phasenlage. Der für die statistische Intensitätsverteilung wichtige Phasenunterschied  $\Delta\rho = 2\pi/\lambda \cdot \Delta n \Delta h$  bei der Transmission der Einzelwellen entsteht durch die Rauheit und somit durch die statistische Höhenverteilung der Oberfläche und der Brechzahldifferenz  $\Delta n = n_1 - n_0$  des beleuchteten Objektes. Bei der Betrachtung in Reflexion entsteht ein Phasenunterschied  $\Delta\rho = 4\pi/\lambda \cdot \Delta h \cos(\Theta)$ , wobei  $\Theta$  den Einfallswinkel zur Oberflächennormalen und  $\Delta h$  die Höhendifferenz der Oberfläche darstellt. Für objektive Speckle erhält man eine Intensitätsverteilung  $I(x, y) = |u'(x, y)|^2$ , wobei sich  $u'(x, y)$  aus Gleichung 10 mit  $f_B(p, q) = A e^{i\Phi}$  mit einer statistischen Phasenverteilung  $\Phi(p, q)$  und einer Amplitude  $A(p, q)$  ergibt. Mittels der so entstandene statistische Intensitätsverteilung können die nachstehenden Aussagen über mittlere Specklegrößen in lateraler und axialer Richtung getroffen werden. Eine mittlere Specklegröße  $\delta x$  eines voll-entwickelten Specklefeldes ist abhängig von der Größe der Amplitudenverteilung der einfallenden Welle in der Ebene der statistischen Laufzeitunterschiede. Somit ergibt sich für eine kreisrunde Beleuchtung einer Oberfläche mit dem Durchmesser  $D$ , mit der Wellenlänge  $\lambda$  und einer Beobachtung der objektiven Speckle im Abstand  $z$  eine mittlere laterale Specklegröße nach [79] von:

$$\delta x_w = 1,4 \frac{\lambda z}{D}. \quad (12)$$

Die mittlere Specklegröße in axialer Richtung beträgt bei einer kreisrunden Beleuchtungsfläche:

$$\delta z_w = 6,7 \frac{\lambda z^2}{D^2}. \quad (13)$$

Durch die unterschiedlichen Einflüsse des Durchmessers  $D$  und des Abstandes  $z$  auf die laterale und axiale Größe ergibt sich die typische Zigarrenform der Speckle. Des Weiteren kann man erkennen, dass bei großen Abständen und kleinen Beleuchtungsdurchmessern ( $z \gg D$ ) eine sehr große Tiefenausdehnung der Speckle vorliegt. Eine weitere wichtige Eigenschaft der objektiven Speckle ist die Unabhängigkeit vom Betrachtungswinkel sowie die Unabhängigkeit vom Beobachtungssystem. Dies ergibt sich dadurch, dass Speckle stationäre Interferenzen im Raum sind. Anders als die objektiven Speckle entsteht die Inten-



**Abbildung 15:** Darstellung der Ausbildung von a) subjektiven Speckle durch die Abbildung einer rauen Oberfläche in die Bildebene und b) von objektiven Speckle im Abstand  $z$  durch die Beleuchtung einer rauen Oberfläche.

sitätsverteilung von subjektiven Speckle durch die kohärente Superposition von Teilwellen bei der optischen Abbildung. Dies ist in Abbildung 15a schematisch dargestellt. Bei der Abbildung der rauen Oberfläche des Objektes kommt es hierbei zur kohärenten Superposition von Teilwellen des abgebildeten Teilstückes der Oberfläche der PSF des abbildenden Systems [79]. Hierbei entstehen je nach Phasenlage der Teilwellen wiederum hellere oder dunklere Interferenzen in der Bildebene des optischen Systems. Bei einer solchen Überlagerung ist der optische Wegunterschied  $\Delta\rho$  abhängig vom Betrachtungswinkel, vom Abstand und der Apertur des abbildenden Systems. Damit sind subjektive Speckle im Gegensatz zu den objektiven Speckle nicht unabhängig vom Betrachtungswinkel. Genauso wie bei den objektiven Speckle können auch bei subjektiven Speckle Aussagen über die mittlere Specklegröße in lateraler und axialer Richtung getroffen werden. Hierbei hängt die mittlere Specklegröße  $\delta x$  in lateraler Richtung bei subjektiven Speckle von der Wellenlänge  $\lambda$ , der Brennweite  $f$  und dem Durchmesser  $D$  des Abbildungssystems ab.

$$\delta x_{SS} = 1,4 \frac{\lambda f}{D} \quad (14)$$

Die mittleren Speckle in axialer Richtung können durch die Gleichung:

$$\delta z_{SS} = 6,7 \frac{\lambda f^2}{D^2} \quad (15)$$

beschrieben werden.

## 3.2 Methoden

### 3.2.1 Zellkulturpräparation für die Speckle-Mikroskopie

Für Vorversuche zu den Plastizitätsmessungen wurden die Zellkulturen, wie in Kapitel 2.2.1 beschrieben, präpariert. Die kultivierten Zellkulturen wurden zwischen Tag 18 und 21 verwendet. In diesen Zellkulturen erfolgte eine Färbung einzelner Zellen unter Zuhilfenahme von Mikromanipulatoren (MM3A-LSrH, Kleindiek Nanotechnik GmbH, Deutschland; Kapitel 5.1 Abbildung 48a links) mit dem Membranfarbstoff 1,1'-Dioctadecyl-3,3,3',3'-Tetramethylindocarbocyanine Perchlorate (DIL), von welchem 1  $\mu$ l in Glaspipetten gefüllt wurde [80]. Die Pipette wurde für eine Stunde in Zellkontakt belassen, so dass der lipophile Membranfarbstoff die Membrane färben konnte. Danach wurde die Pipette von der Zelle entfernt. Dies geschah unter Inkubatorbedingungen bei 37°C und 5% Kohlendioxid (CO<sub>2</sub>). Der Vorgang wurde pro Kultur mehrere Male wiederholt.

### 3.2.2 Herstellung von Teststrukturen für die Fluoreszenzmikroskopie

Für die spätere Untersuchung der Auflösungsgrenze wurden neben QDot-Strukturen und biologischen Proben definierte Teststrukturen verwendet, deren Herstellung mittels Elektronenstrahlithografie erfolgte. Hierfür wurde der Fluoreszenzlack SX ARP 672.08/2 Rot 305 mit einer Schichtdicke von 670 nm auf ein Borofloat-Deckglas, welches eine Dicke von 170  $\mu$ m aufwies, aufgetragen. Die mittels Elektronenstrahl geschriebenen Strukturen wurden nach einer Entwicklungszeit von 180 s freigeätzt. Somit konnten die Abstände der einzelnen Strichperioden, wie in Abbildung 30 dargestellt, gemessen werden. Durch die Elektronenstrahlithografie war es möglich, Strukturabstände von 74 nm herzustellen.

### 3.2.3 Pyrometrische Leistungsmessung

Für die Leistungsmessungen in Kapitel 3.3.1 wurde ein Pyrometer PM2 mit Luftkühlung der Firma Coherent verwendet. Das verwendete Modell besitzt eine maximale Leistungsgrenze von 3,5 W und einen Empfindlichkeitsbereich zwischen 250 und 1100 nm. Ein Pyrometer besitzt einen Messkonus (optischer Sumpf), in welchem durch Vielfachreflexion die gesamte Energie des Lichtstrahls absorbiert wird. Zusätzlich besitzen die meisten Systeme einen Referenzkonus zur Erfassung der Einflüsse der Hintergrundstrahlung. Im

Messkonus kommt es zu einer Temperaturerhöhung  $\Delta T = E/C$ , wobei  $E$  die Energie des Laserstrahls und  $C$  die Wärmekapazität des Materials des Messkonus darstellt. Die erzeugte Temperaturdifferenz wird durch Thermoelemente in eine Thermospannung  $\Delta U = a\Delta T$  umgewandelt. Hierbei ist  $a$  die sogenannte Thermokraft der Thermoelemente und somit eine materialabhängige Konstante im Bereich von  $10^{-5}$  V/K. Durch Kalibration kann über die gemessene Thermospannung auf die Laserleistung geschlossen werden [81].

### 3.2.4 Gitterspektrometer

Die Laserspektren in Kapitel 3.3.1 wurden mittels USB-Spektrometer Red Tide USB-650 der Firma OceanOptics aufgenommen. Hierbei handelt es sich um ein fasergekoppeltes Spektrometer mit einem SMA905 Fasereingang. Das zu untersuchende Licht wird durch einen Spiegel auf ein Beugungsgitter reflektiert, welches das Licht in seine einzelnen spektralen Bestandteile aufspaltet. Die Aufspaltung erfolgt entsprechend der Beugungsgleichung  $a\{\sin(\Theta_m) - \sin(\Theta_i)\} = m\lambda$ , wobei  $a$  den Gitterabstand,  $\lambda$  die Wellenlänge,  $m$  die Beugungsordnung,  $\Theta_m$  den Einfallswinkel und  $\Theta_i$  den Ausfallswinkel darstellt. Das aufgespaltene Licht wird über einen weiteren Spiegel auf ein CCD Array, bestehend aus 650 px, gelenkt. Die spektrale Empfindlichkeit des Spektrometers liegt im Bereich zwischen 350 und 1000 nm. Die Auflösung des Spektrometers ist mit 1 nm gegeben [81].

### 3.2.5 Aufbau und Funktionsweise des Zeiss Elyra 7 Systems (lattice-SIM)

In Abbildung 16 (rechts) ist das Elyra 7 System der Firma Zeiss zu sehen [20]. Dieses kommerzielle Super-resolution Mikroskop arbeitet mit dem in Kapitel 3.1 beschriebenen Verfahren der strukturierten Beleuchtung, wobei es sich hier um ein lattice SIM System handelt (Abbildung 13b, mitte). Es stehen 4 Laser (405 nm (50 mW), 488 nm (500 mW), 561 nm (500 mW) und 641 nm (500 mW)) zur Verfügung, mit denen ein breites Spektrum zur Anregung von gebräuchlichen Fluorophoren abgedeckt wird. Die Beugungsstrukturen zur Beleuchtung werden über eine Interferenzmaske erzeugt und dann über ein Galvanometerspiegelsystem über die Probe bewegt. Das System verfügt über 5 unterschiedliche Beugungsgitter. Somit kann für jede Wellenlänge die optimale Beugungsstruktur erzeugt werden. Das fünfte Beugungsgitter ist für den sogenannten Apotome-Mode ausgelegt. Das System ist mit einem Quadband-Fluoreszenz Filter für alle Laserlinien ausgestattet. Die spektrale Separierung wird mittels DualCam Adapter durchgeführt, wobei kurzwelliges



**Abbildung 16:** Photographie des Elyra 7 Systems der Firma Zeiss (rechts) mit DualCam Adapter und zwei sCMOS (PcoEdge; links).

Licht auf Kamera 1 und langwelliges Licht auf Kamera 2 verarbeitet wird. Das System besitzt zwei sCMOS Kameras der Firma PcoEdge und ist bezogen auf den Grundaufbau sonst identisch mit dem in Kapitel 2.2.4 beschriebenen Elyra P.1 System. Es besitzt ebenfalls einen speziell angefertigten 3D-slicer in der Eintrittspupille des Objektivs, um die 3D-Bilder zu rekonstruieren. Hierbei wird die PSF durch eine angepasste Phasenmaske in eine spezielle 3D-PSF umgewandelt, die je nach  $z$ -Position des Leuchtmittels eine andere Form hat. Eine beispielhafte 3D-PSF einer definierten  $z$ -Ebene ist in Abbildung 3 unter dem Bild des 3D-slicers (rechts) zu sehen. Für diesen Prozess ist eine vorherige Kalibrierung der 3D-PSF mittels Testcharts durchzuführen. Die Phasenmaske und somit die 3D-PSF sind identisch mit der des Elyra P.1 Systems.

### 3.2.6 Modell-Sparse Bayesian Learning Algorithmus (M-SBL)

Für die Auswertung der erhaltenen Bildreihen des Speckle-Mikroskops wurde ein Modell-Sparse Bayesian Learning Algorithmus (M-SBL) verwendet [82, 83]. Als Modell in diesem Algorithmus dient ein multipel measurement vector System. Der M-SBL-Algorithmus ist ein Algorithmus zur Rückgewinnung mehrerer Signale. Hierbei werden zur Rückgewinnung eines Signals mehrere Messungen unter denselben Stützpunkten verwendet. M-SBL wurde in Speckle-SIM [13, 11] und STORM [84] eingesetzt und erzielte hervorragende Rekonstruktionsergebnisse.

Wenn eine fluoreszenzmarkierte Probe durch  $m$  Beleuchtungsmuster angeregt wird, ist die entsprechende detektierte Intensität in der Bildebene durch  $D_m = PSF(r) \otimes \{s(r) \cdot e_m(r)\}$

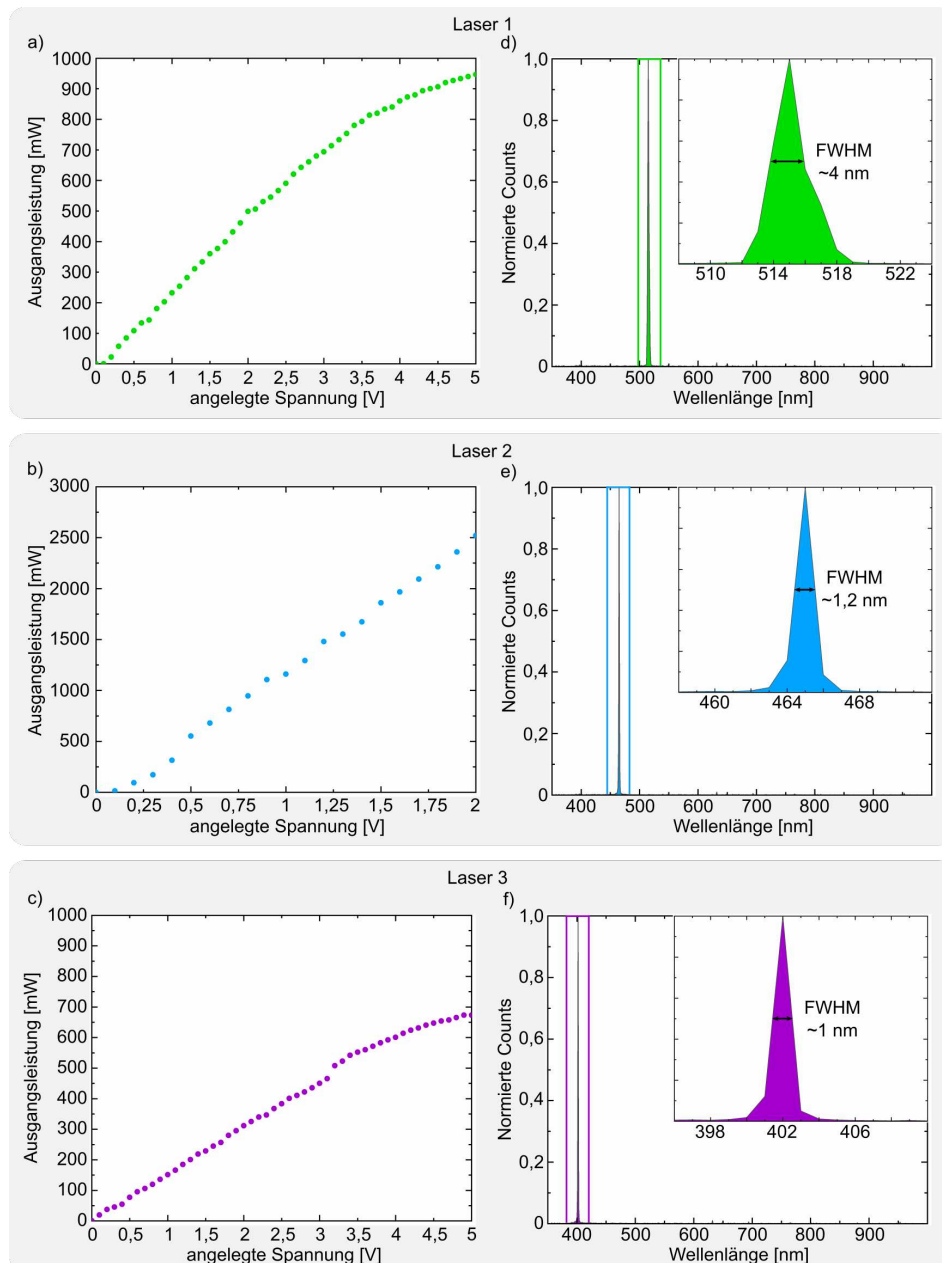
gekennzeichnet, wobei  $s(r)$  die Struktur der Probe,  $e_m(r)$  das  $m$ -te Beleuchtungsmuster,  $PSF(r)$  die Punktspizfunktion des Systems und  $\otimes$  die Faltungsoperation darstellt. Im M-SBL Algorithmus wird diese Formulierung des aufgenommenen Bildes  $D_m$  in eine Matrixschreibweise  $Y = HX$  umgeformt, wobei  $H$  die PSF Matrix, die in eine Spaltenschreibweise umgerechnet wurde, enthält. Die  $X$ -Matrix enthält den Ausdruck  $\{s(r) \cdot e_m(r)\}$  ebenfalls in einer Spaltenschreibweise. Die  $D$ -Matrix beinhaltet in einer Spaltenschreibweise die Information der aufgenommenen Bilder. Somit sind alle Informationen in Spalten-Vektoren überführt worden. Mit den so erhaltenen Matrizen wird eine Suche der optimalen  $X$ -Matrix durchgeführt, bei der mit der vorhandenen  $H$ -Matrix die Bildmatrix  $Y$  rekonstruiert werden kann.

### 3.3 Ergebnisse

#### 3.3.1 Charakterisierung der Laserquellen

Die Charakterisierung der Laserquellen wurde hinsichtlich der wichtigsten Parameter von Diodenlasersystemen durchgeführt. Hierzu zählen sowohl die Ausgangsleistungsabhängigkeit der Diodenlaser von der angelegten Spannung bzw. dem daraus resultierenden Diodenstrom, um so den optimalen Arbeitsbereich zu finden, als auch das Laserspektrum, um später die Fluoreszenz-Filter optimal auf die Laser anzupassen. In Abbildung 17a bis 17c sind die entsprechenden Ausgangsleistungen in Abhängigkeit von der angelegten Spannung, welche in 0,1 V Schritten erhöht wurde, und in Abbildung 17d bis 17f sind die entsprechenden Emissionsspektren der Diodenlaser nach dem Strahlteiler der drei Diodenlaser zu sehen. Die Leistungskurven sind mit dem in Kapitel 3.2.3 beschriebenen Leistungsmessgerät und Verfahren gemessen worden. Die Aufnahme der Spektren erfolgte mit einem USB-Spektrometer von OceanOptics mit einer Wellenlängenauflösung von 1 nm. Der Messbereich dieses Spektrometers liegt werksseitig im Bereich von 350 nm bis 1000 nm. Bei einer maximal angelegten Spannung von 5 V konnte bei Laser 1 (grüne Kurve) eine Ausgangsleistung von 946,6 mW ermittelt werden. Damit liegt die gemessene Ausgangsleistung 5% unter der Herstellerangabe. Bis ca. 3 mW ist ein linearer Verlauf der Messkurve in Abbildung 17a zu sehen. Danach ist ein Abflachen der Kurve zu höheren Spannungen deutlich zu erkennen. Die Leistungskurve von Laser 2 (blaue Kurve) konnte nur bis zu einer Spannung von 2 V vermessen werden. Bei dieser Spannung wurde eine Ausgangsleistung von 2,52 W ermittelt. Im gesamten Messbereich zeigt die Kurve einen linearen Anstieg der



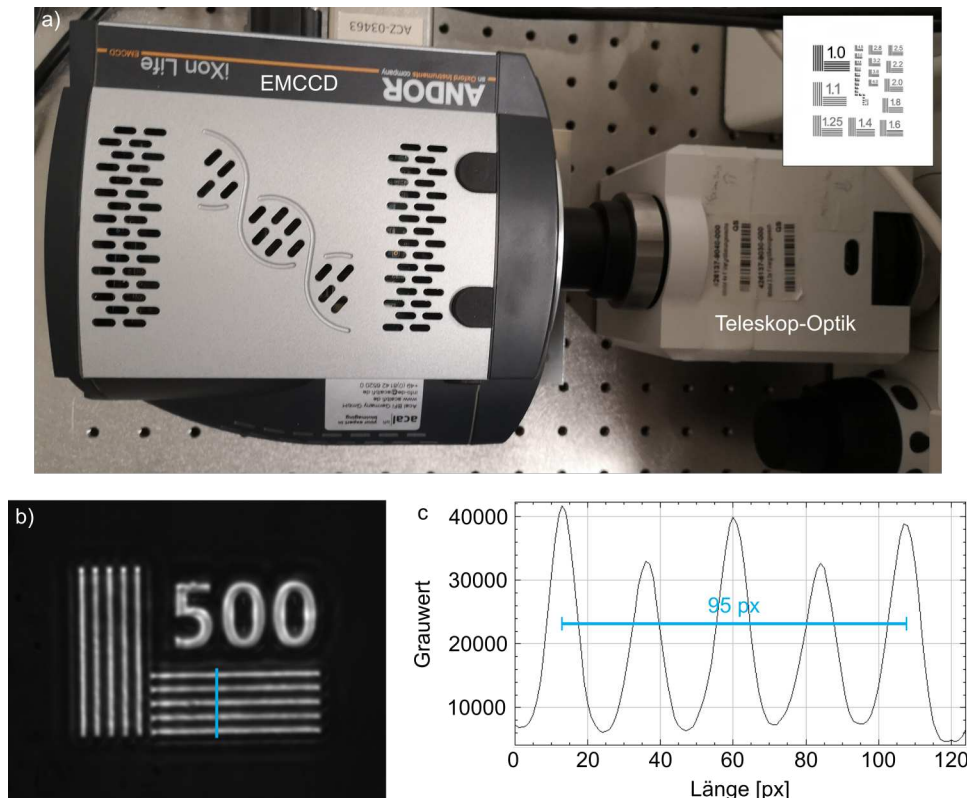


**Abbildung 17:** a) - c) Kennlinien zur Abhängigkeit der Ausgangsleistung der Diodenlaser (a) Laser 1 - grün; b) Laser 2 - blau; c) Laser 3 - violett) von der angelegten Spannung im Bereich von 0 V bis 5 V. Die Spannung wurde in 0,1 V Schritten bis 5 V verändert. Der lineare Bereich der Diodenlaser reicht bei Laser 1 und Laser 3 bis ca. 3 V und geht danach in den Sättigungsbereich über, welcher mit einem Abflachen der Messkurve einhergeht. Laser 2 konnte nur bis zu einer angelegten Spannung von 2 V vermessen werden, da der Messbereich des Spannungsmessgerätes ausgeschöpft war. Die maximalen Ausgangsleistungen betragen: Laser 1 - 946,6 mW; Laser 2 - 2,52 W bei 2 V; Laser 3 - 673 mW. d) - f) Spektren der drei vermessenen Laser (d) Laser 1 - grün; e) Laser 2 - blau; f) Laser 3 - violett) im gesamten Messbereich des USB-Spektrometers von Ocean Optics von 350 nm bis 1000 nm mit einem Ausschnitt (jeweils oben rechts) des spektralen Bereiches der Diodenlaser. Die FWHM der Laser beträgt für Laser 1 4 nm, für Laser 2 1,2 nm und für Laser 3 1 nm. Die Maxima liegen bei Laser 1 515 nm, bei Laser 2 465 nm und bei Laser 3 402 nm.

Ausgangsleistung über der angelegten Spannung. Für Laser 3 (violette Kurve) wurde ein ähnlicher Verlauf wie für Laser 1 beobachtet. Im unteren Spannungsbereich bis ca. 3 V der angelegten Spannung ist ein linearer Verlauf der Ausgangsleistung zu erkennen. Bei einer höheren Spannung zeigt sich ein Abflachen der Kurve. Die maximale Ausgangsleistung von Laser 3 wurde bei 5 V mit 673 mW gemessen. Damit liegt die Ausgangsleistung 48,6% unter der vom Hersteller angegebenen Ausgangsleistung von 1 W. Die Spektren der Laserdioden zeigen im Allgemeinen eine für Diodenlaser typische kleine spektrale Breite. Die Halbwertsbreite (FWHM - full width of half maximum) des Spektrums von Laser 1 beträgt ca. 4 nm und das Maximum liegt bei 515 nm. Das gemessene Spektrum weist eine Gesamtbreite von ca. 7 nm in einem spektralen Bereich von ca. 512 nm bis 519 nm auf. Das Maximum des Spektrums von Laser 2 liegt bei 465 nm und besitzt eine FWHM von ca. 1,2 nm, wobei das gesamte Spektrum dieses Lasers eine spektrale Breite von ca. 4,8 nm aufweist. Für den dritten Laser, Laser 3, ergibt sich ein Maximum bei 402 nm und die FWHM mit ca. 1 nm, wobei dies auch die spektrale Auflösungsgrenze des Spektrometers darstellt. Das gesamte Spektrum hat eine Breite von ca. 4,1 nm. Des Weiteren wurden für alle Diodenlaser Leistungsschwankungen unter 5 % für alle Messpunkte beobachtet.

### 3.3.2 Kamera Kalibrierung

Der nächste Schritt für den Aufbau des Speckle-Mikroskops ist die Kalibrierung der EM-CCD (Electron multiplying charge-coupled device; Andor iXON Life 888). Die EMCCD besteht aus einem 1024 x 1024 Pixel-Detektor, wobei jedes Pixel  $13 \mu\text{m} \times 13 \mu\text{m}$  groß ist. Zusätzlich wurde, wie in Abbildung 18a zu sehen ist, eine Teleskop-Optik zwischen EM-CCD und Mikroskop-Körper eingebracht. Das Teleskop kann zwischen einer 1-fach, einer 2,5-fach und einer 4-fach Vergrößerung wechseln. Neben den unterschiedlichen Vergrößerungen der Teleskop-Optik wurden auch drei unterschiedliche handelsübliche Objektive vermessen. Hierbei handelt es sich um ein 63x Luft-Objektiv (*LD Plan Neofluar 63x/0,75 Korr Ph2 M27; Zeiss*), 63x Wasser-Immersion-Objektiv (*C-Achromat 63x/1,20 W Korr M27; Zeiss*) und ein 100x Öl-Immersion-Objektiv ( *$\alpha$ -Plan-Apochromat 100x/1,46 Oil DIC M27; Zeiss*). Die Vermessung der Abbildungsgröße erfolgte mit Hilfe eines Kalibrierungs-Charts, welches in Abbildung 18a (rechts oben) dargestellt ist. Es wurde für jede Vergrößerung des Teleskops immer dasselbe Strichgitter des Kalibrierungs-Charts mit je 4 Strukturperioden untersucht. In Abbildung 18b ist beispielhaft die Struktur mit 500 Linienpaaren/mm zu erkennen, welche zur Kalibrierung des 63x Luft-Objektives verwendet



**Abbildung 18:** a) Foto der Kombination von Teleskop-Optik und EMCCD mit Bild eines Kalibrierungs-Charts (rechts oben). b) Aufnahme der 500 Linienpaare/mm Objektstruktur mit einer 2,5-fachen Vergrößerung durch das Teleskop. c) Schnittprofil der 500 Linienpaare/mm Objektstruktur zur Bestimmung der Pixelgröße mit eingezeichneter Länge von 4 Linienpaaren (blau; 95 px).

wurde. Danach wurde mit Hilfe der Bildverarbeitungssoftware ImageJ, eine OpenSource Bildverarbeitungsplattform, ein Schnittprofil durch die Struktur erstellt. Dieses Profil ist in Abbildung 18c für die oben genannte Objektiv-Struktur-Kombination zu sehen. Durch die Bestimmung der Länge in Pixeln von 4 Perioden der Struktur wurde dann für alle erwähnten Objektive die Pixelgröße in  $\mu\text{m}$  berechnet. Beispielhaft ist die Berechnung in den nachfolgenden Schritten für das 63x Luft-Objektiv mit der in Abbildung 18b und 18c gezeigten Struktur dargestellt.

Die Umrechnung der Linienpaare pro mm in die Länge eines Linienpaares erfolgt durch:

$$500 \frac{\text{Linienpaare}}{\text{mm}} \rightarrow 0,002 \frac{\text{mm}}{\text{Linienpaar}} = 2 \frac{\mu\text{m}}{\text{Linienpaar}}$$

4 Linienpaare besitzen somit eine Länge von:

$$\rightarrow 8 \mu\text{m}.$$

Die Pixelgröße aus den gemessenen 4 Linienpaaren aus Abbildung 18c ergibt sich somit durch:

$$\begin{aligned}
 4 \text{ Linienpaare} &= 95 \text{ px} \quad \text{und} \\
 95 \text{ px} &= 8 \mu\text{m} \quad \text{zu} \\
 &\rightarrow \underline{\underline{84,2 \text{ nm}}}.
 \end{aligned}$$

Die ermittelten Pixel-Größen für alle Varianten sind der nachstehenden Tabelle 1 und die daraus berechneten Auflösungsgrenzen in Pixeln für alle Laserlinien für das Abbe - und Rayleigh - Kriterium den Tabellen 2 und 3 zu entnehmen.

**Tabelle 1:** Darstellung der ermittelten Pixelgrößen für die Vergrößerungen der Teleskop-Optik unter Verwendung der verschiedenen Objektive

Objektive	Vergrößerung		
	1-fach	2,5-fach	4-fach
63x Luft	212,3 nm	84,2 nm	52,9 nm
63x Wasser	200,00 nm	80,00 nm	46,78 nm
100x Öl	127,5 nm	50,6 nm	31,45 nm

**Tabelle 2:** Darstellung der Auflösungsgrenze in Pixeln nach dem Abbe - Kriterium für die Vergrößerungen der Teleskop-Optik unter Verwendung der verschiedenen Objektive

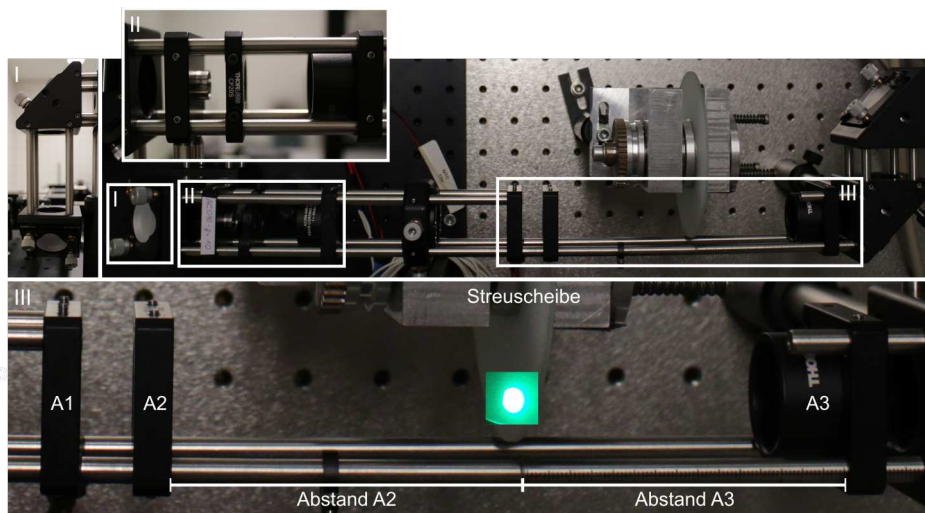
Vergrößerung Wellenlänge [nm]	1-fach			2,5-fach			4-fach		
	520	465	405	520	465	405	520	465	405
63x Luft	1,63	1,46	1,27	4,12	3,68	3,21	6,55	5,86	5,10
63x Wasser	1,08	0,97	0,84	2,71	2,42	2,11	4,63	4,14	3,61
100x Öl	1,40	1,25	1,09	3,52	3,15	2,74	5,66	5,06	4,41

**Tabelle 3:** Darstellung der Auflösungsgrenze in Pixeln nach dem Rayleigh - Kriterium für die Vergrößerungen der Teleskop-Optik unter Verwendung der verschiedenen Objektive

Vergrößerung Wellenlänge [nm]	1-fach			2,5-fach			4-fach		
	520	465	405	520	465	405	520	465	405
63x Luft	1,99	1,78	1,55	5,02	4,49	3,91	7,99	7,15	6,23
63x Wasser	1,32	1,18	1,03	3,30	2,95	2,57	5,65	5,05	4,40
100x Öl	1,70	1,52	1,33	4,29	3,84	3,34	6,91	6,18	5,38

### 3.3.3 Bestimmung der Specklegröße

Nach dem Periskop (siehe Abbildung 19 I) wurden die Laserstrahlen durch ein Kepler-Teleskop, welches aus zwei Achromaten (AC080-010-A-ML und AC254-040-A-ML, *Thorlabs*) besteht, expandiert. Zusätzlich erfolgte der Einbau einer Blende in die Zwischenbildebene (siehe Abbildung 19 II). Diese hat die Funktion einer Modenblende. Im weiteren Beleuchtungsstrukturierungsstrahlengang befindet sich ein adaptives Linsensystem (siehe Abbildung 19 III) bestehend aus den Achromaten A1 und A2 (AC254-100-A-ML und AC254-040-A-ML, *Thorlabs*) sowie der Streuscheibe in der Fokusebene des adaptiven Linsensystems und dem Achromaten A3 (AC254-060-A-ML, *Thorlabs*), welcher zusammen mit der Tubuslinse das Beleuchtungsfeld in die hintere Fokusebene (*engl. back focal plan*) bzw. die Eintrittspupille des Objektivs abbildet. Für die Messungen der Specklegröße in Abhängigkeit vom Abstand der Streuscheibe zum Achromaten A3 sowie für die Abhängigkeit der Specklegröße vom Beleuchtungspottdurchmesser auf der Streuscheibe



**Abbildung 19:** Aufbau des Beleuchtungsstrahlenganges zur Erzeugung der optimalen Beleuchtungsstrukturen (*Speckle*). I) Nach dem Lasermodul installiertes Periskop zur Strahleinkopplung in den die Beleuchtungsstruktur erzeugenden Strahlengang. II) Kepler-Teleskop zur Vergrößerung des Laserstrahls sowie zur Strahlformung. Zur Strahlformung befindet sich eine Irisblende in der Zwischenbildebene des Kepler-Teleskops, welche als Raumblyende bzw. Modenblende dient. Diese filtert die räumliche Intensitätsverteilung (*TEMs*) des Laserstrahls und optimiert somit das Strahlparameterprodukt. III) Aufbau des Strahlengangs zur Erzeugung der Beleuchtungsstruktur hinter dem Kepler-Teleskop (II) mit einem adaptiven Linsensystem, welches aus den Achromaten A1 und A2 besteht, eingesetzt zur Strahlformung des Beleuchtungspots auf der Streuscheibe. Des Weiteren ist die Streuscheibe in der Fokusebene des adaptiven Linsensystems und ein Achromat (A3), welcher zusammen mit der Tubuslinse im Mikroskopgrundkörper die *Speckle* in die hintere Fokusebene des Objektivs abbildet, zu sehen. Achromate A1 bis A3.

wurde mit einem Filter-Würfel gearbeitet, der einen Teil aller Laserlinien transmittiert bzw. reflektiert. In der Objektebene wurde ein Chromspiegel eingesetzt, welcher für alle Laserlinien stark reflektierend ist, um die Beleuchtungsstrukturen der Objektebene mit einer 2,5-fachen Vergrößerung durch die Teleskop-Optik (siehe Kapitel 3.3.2) auf die EM-CCD abzubilden. Als Erstes wurde die Abhängigkeit der Specklegröße von der Position des Achromaten A3 zur Streuscheibe untersucht. Dazu wurde die Position von A3 für alle Laserlinien zuerst in 5 mm Schritte grob und später in einem ausgewählten Bereich in 1 mm Schritte verändert. Somit konnte insgesamt ein Positionierungsbereich hinsichtlich des Abstandes (Abbildung 19 III - Abstand A3) zur Streuscheibe von 60 mm bis 85 mm untersucht werden. Weiterhin wurde mit einer parallelen Beleuchtung auf der Streuscheibe mit einem Strahldurchmesser von  $\sim 10$  mm (siehe Abbildung 19 III, Laserspot Bild) sowie mit konstanten Kameraparametern (Beleuchtungszeit 10 ms, Verstärkungsfaktor 20, Bildgröße 512 px x 512 px) und Laserleistungen (Laser 1: **0,3 V**, Laser 2: **0,1 V**, Laser 3: **0,4 V**) gearbeitet. Pro Position des Achromaten A3 wurden für jede Messung zwei Speckle-Bilder ( $B_1$  und  $B_2$ ) aufgenommen. Um die mittlere Specklegröße zu ermitteln, wurde die Kreuzkorrelation  $\Gamma_{11}$  des Bildes  $B_1$  mit sich selbst:

$$\Gamma_{11} = \langle B_1 B_1 \rangle$$

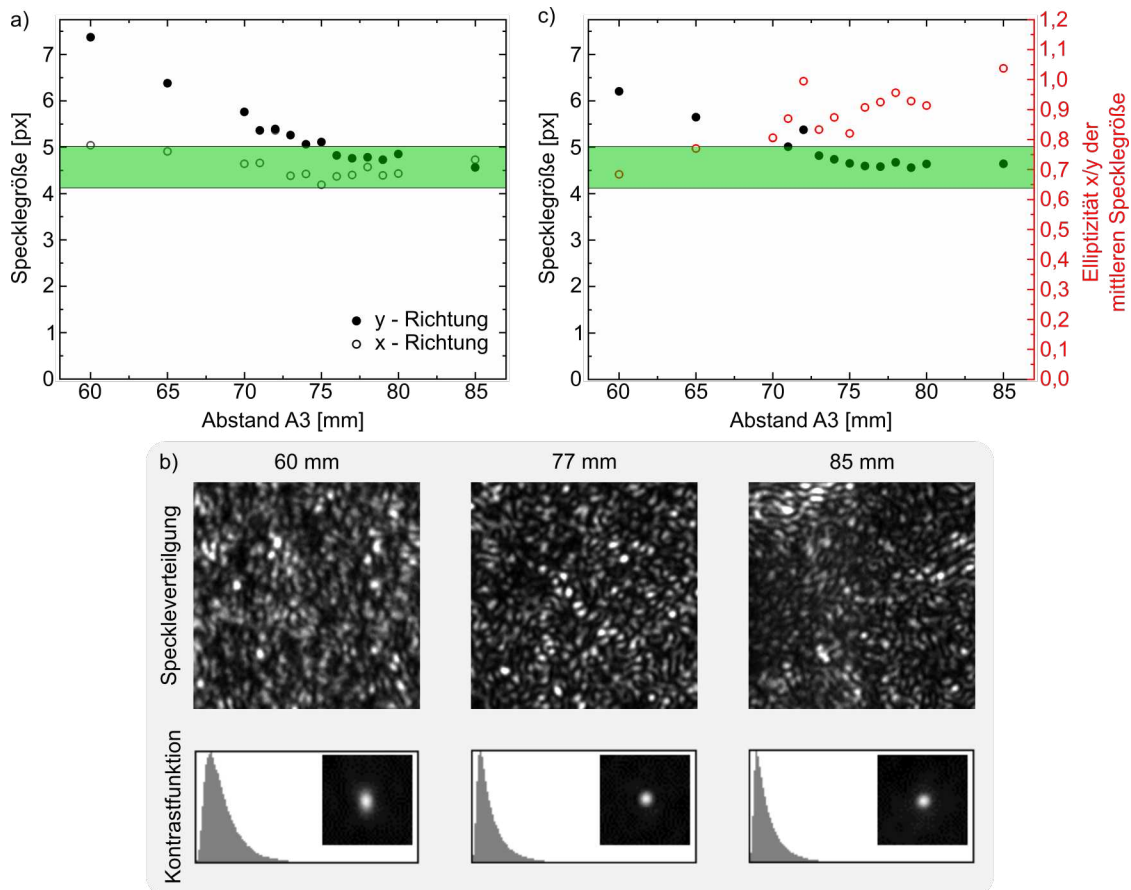
und die Kreuzkorrelation  $\Gamma_{12}$  des Bildes  $B_1$  mit dem Bild  $B_2$ :

$$\Gamma_{12} = \langle B_1 B_2 \rangle$$

voneinander subtrahiert:

$$\Gamma = \Gamma_{11} - \Gamma_{12}.$$

Aus den so erhaltenen Korrelations-Bildern ergab sich ein Profil-Schnitt des Korrelationspeaks in x- und y-Richtung, der mit Hilfe der OpenSource Software ImageJ erstellt wurde. Aus diesen Profil-Schnitten konnte mittels Gauß-Fit (Software Origin) die Halbwertsbreite (FWHM, **F**ull **W**idth at **H**alf **M**aximum) des Korrelationspeaks bestimmt und somit die mittlere Specklegröße ermittelt werden. In Abbildung 20 sind die Ergebnisse der Abhängigkeitsmessung für den Laser 1 mit einer Wellenlänge von 515 nm zu sehen. Auffällig ist bei den in Abbildung 20a gezeigten mittleren Specklegrößen in x- und y-Richtung, dass sich hauptsächlich die Ausdehnung in y-Richtung stark verändert. Die



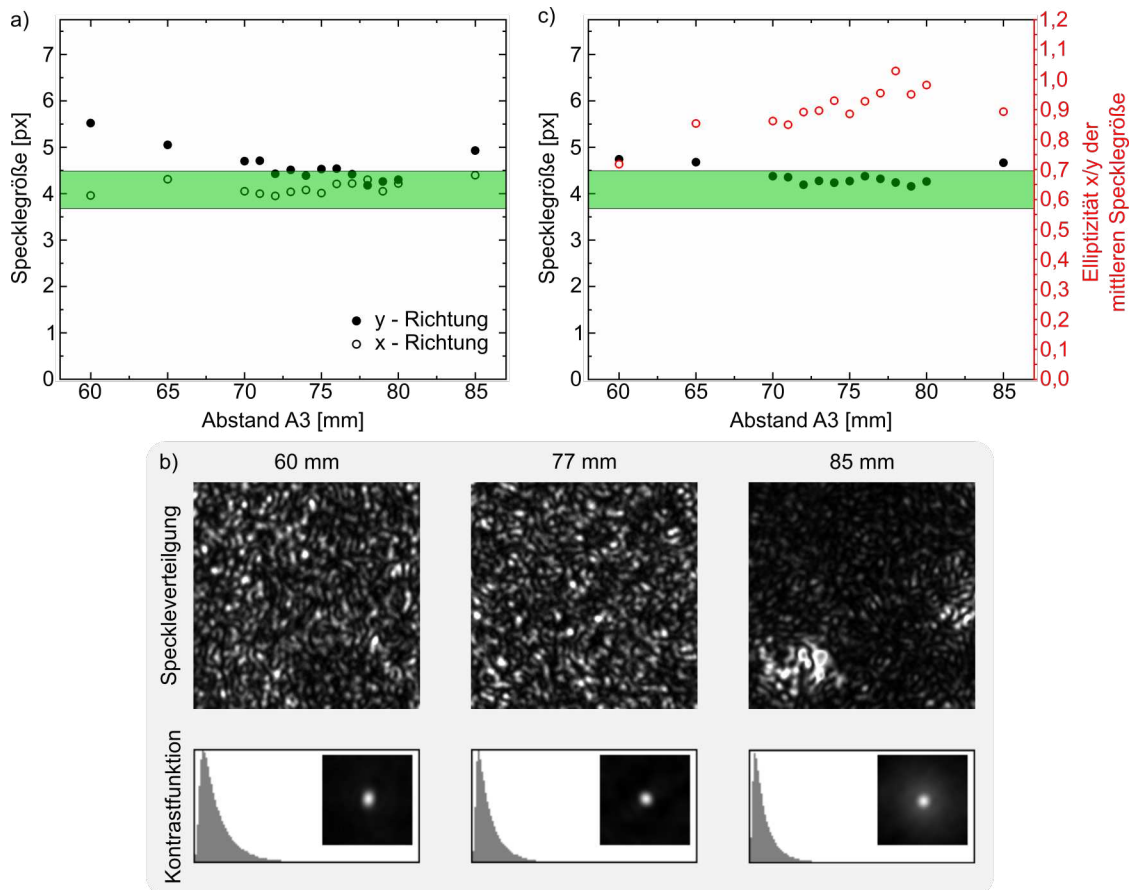
**Abbildung 20:** Messung der Abhängigkeit der Specklegröße vom Abstand des Achromaten A3 von der Streuscheibe bei einer Laserwellenlänge von 515 nm. a) Graphische Darstellung der mittleren Specklegröße in x- und y-Richtung in Abhängigkeit des Abstandes A3 des Achromaten A3 (Abbildung 19 III) von der Streuscheibe mit eingezeichneten Auflösungsgrenzen nach Abbe und Rayleigh (*grüner Bereich*). b) Beispieldarstellung von Specklefeldern in unterschiedlichen Abständen A3 des Achromaten A3 von der Streuscheibe und die dazugehörigen Kontrastfunktionen sowie die Korrelationspeaks. c) Graphische Darstellung der Mittelwerte aus den mittleren Specklegrößen in x- und y-Richtung in Abhängigkeit vom Abstand A3 des Achromaten A3 von der Streuscheibe (schwarz) mit den Auflösungsgrenzen nach Abbe und Rayleigh sowie die Elliptizität der mittleren Specklegrößen ( $x/y$ ) in Abhängigkeit vom Abstand A3 (Abbildung 19 III) des Achromaten A3 von der Streuscheibe (*rot*).

mittlere Specklegröße in x-Richtung befindet sich immer im Bereich der Auflösungsgrenzen von Abbe oder Rayleigh. Außerdem beträgt die maximale Abweichung der mittleren Specklegröße (kleinster zu größtem Wert) in x-Richtung nur ca. 20%. Dagegen nimmt diese Abweichung bei Betrachtung der y-Richtung einen Wert von 55% an. Zusätzlich dazu erreicht die mittlere Specklegröße in y-Richtung erst ab einem Abstand von A3 zur Streuscheibe von 75 mm eine Größenordnung im Bereich der Auflösungsgrenzen. Betrachtet man dazu in Abbildung 20c die Elliptizität der mittleren Specklegröße ( $x/y$ ), so ist erkennbar, dass mit größer werdendem Abstand A3 des Achromaten von der Streuscheibe

der Elliptizitätswert gegen 1 läuft. Dies bedeutet wiederum, dass bei größer werdendem Abstand die mittleren Ausdehnungen der Speckle in x- und y-Richtung ähnlich werden. Bei einem Abstand von 85 mm kann man sogar in Abbildung 20a und bei der Elliptizität in Abbildung 20c erkennen, dass die mittleren Specklegrößen fast identisch sind. In Abbildung 20b sind die Veränderungen der Specklefelder für drei verschiedene Abstände  $A_3$  des Achromaten  $A_3$  von der Streuscheibe sowie die dazugehörigen Kontrastfunktionen mit Korrelationspeak zu sehen. Bei einem Abstand von 60 mm ist sowohl in der Speckleverteilung als auch im Korrelationspeak ein Unterschied in x- und y-Richtung zu beobachten. Bei einem Abstand von 77 mm ist eine Standardspeckleverteilung sowie ein nahezu runder Korrelationspeak zu sehen. Bei einem größeren Abstand von 85 mm sind Artefakte in der Speckleverteilung zu erkennen. Dagegen zeigt sich ein Korrelationspeak und eine Kontrastfunktion wie bei 77 mm Abstand.

Die analog erhaltenen Darstellungen der Abhängigkeit der Specklegröße vom Abstand  $A_3$  des Achromaten  $A_3$  von der Streuscheibe für den Laser 2 mit einer Wellenlänge von 465 nm sind in Abbildung 21 zu sehen. Betrachtet man in Abbildung 21a die mittlere Specklegröße in x- und y-Richtung, so kann ein ähnliches Verhalten wie für Laser 1 beobachtet werden. Hierbei sind die Veränderungen in x-Richtung mit ca. 9% allerdings deutlich kleiner als bei Laser 1. Eine ähnliche Reduktion der Abhängigkeit der mittleren Specklegröße vom Abstand  $A_3$  ist auch in y-Richtung zu erkennen. Dort liegt die maximale Differenz bei 32%. Jedoch liegen auch hier die mittleren Specklegrößen bei kleinen Abständen des Achromaten  $A_3$  in einem Bereich deutlich außerhalb der erzielbaren Auflösungsgrenze. Erst ab einem Abstand des Achromaten  $A_3$  zur Streuscheibe größer 72 mm wird eine mittlere Specklegröße in y-Richtung im gewünschten Bereich der Auflösungsgrenze erzielt. Demgegenüber befinden sich alle für den Abstand  $A_3$  erhaltenen mittleren Specklegrößen in x-Richtung im Bereich der Auflösungsgrenze und haben, wie schon erwähnt, nur einen sehr kleinen Schwankungsbereich von 9%. Wird bei dieser Wellenlänge der Abstand 85 mm betrachtet, so ist zu erkennen, dass die mittlere Specklegröße sowohl in x- als auch in y-Richtung ansteigt. Bei Betrachtung der Elliptizität des Korrelationspeak erkennt man in Abbildung 21c einen Bereich ab ca. 74 mm, bei dem die mittleren Specklegrößen in x- und y-Richtung weniger als 10% voneinander abweichen. In Abbildung 21b sind die Veränderungen der Specklefelder für drei verschiedene Abstände  $A_3$  des Achromaten  $A_3$  von der Streuscheibe sowie die dazugehörigen Kontrastfunktionen mit Korrelationspeak analog zu Laser 1 zu sehen. Bei einem Abstand von 60 mm ist sowohl in der Speckleverteilung als auch im Korrelationspeak ein Unterschied in x- und y-Richtung analog zu Laser 1 zu erkennen.



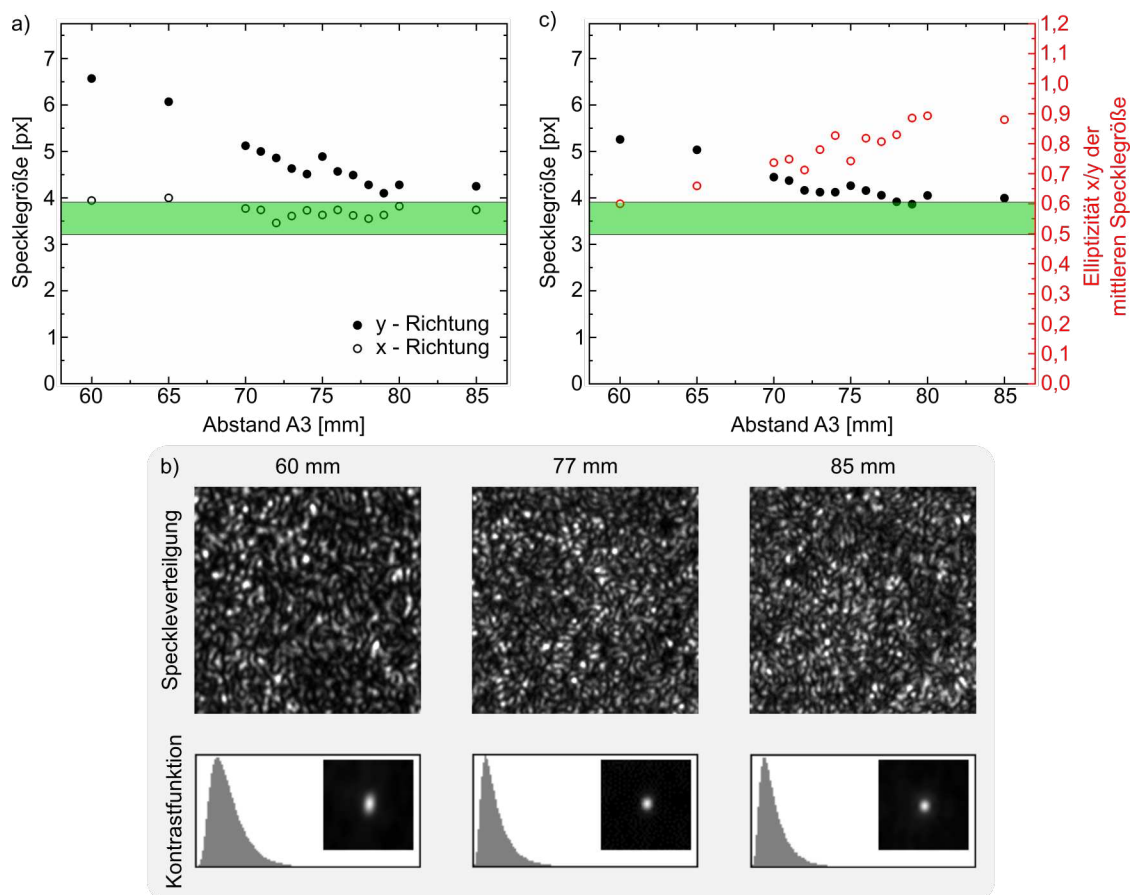


**Abbildung 21:** Messung der Abhängigkeit der Specklegröße vom Abstand des Achromaten A3 von der Streuscheibe bei einer Laserwellenlänge von 465 nm. a) Graphische Darstellung der mittleren Specklegröße in x- und y-Richtung in Abhängigkeit des Abstandes A3 des Achromaten A3 (Abbildung 19 III) von der Streuscheibe mit eingezeichneten Auflösungsgrenzen nach Abbe und Rayleigh (*grüner Bereich*). b) Beispieldarstellung von Specklefeldern in unterschiedlichen Abständen A3 des Achromaten A3 von der Streuscheibe und die dazugehörigen Kontrastfunktionen sowie die Korrelationspeak. c) Graphische Darstellung der Mittelwerte aus den mittleren Specklegrößen in x- und y-Richtung in Abhängigkeit vom Abstand A3 des Achromaten A3 von der Streuscheibe (*schwarz*) mit den Auflösungsgrenzen nach Abbe und Rayleigh sowie die Elliptizität der mittleren Specklegrößen ( $x/y$ ) in Abhängigkeit vom Abstand A3 (Abbildung 19 III) des Achromaten A3 von der Streuscheibe (*rot*).

Bei einem Abstand von 77 mm wird wie bei Laser 1 eine Standardspeckleverteilung sowie ein nahezu runder Korrelationspeak beobachtet. Bei einer weiteren Vergrößerung des Abstandes auf 85 mm bilden sich Artefakte in der Speckleverteilung. Diese Artefakte sind auch im Korrelationspeak durch einen runden Halo um den eigentlichen Korrelationspeak zu erkennen.

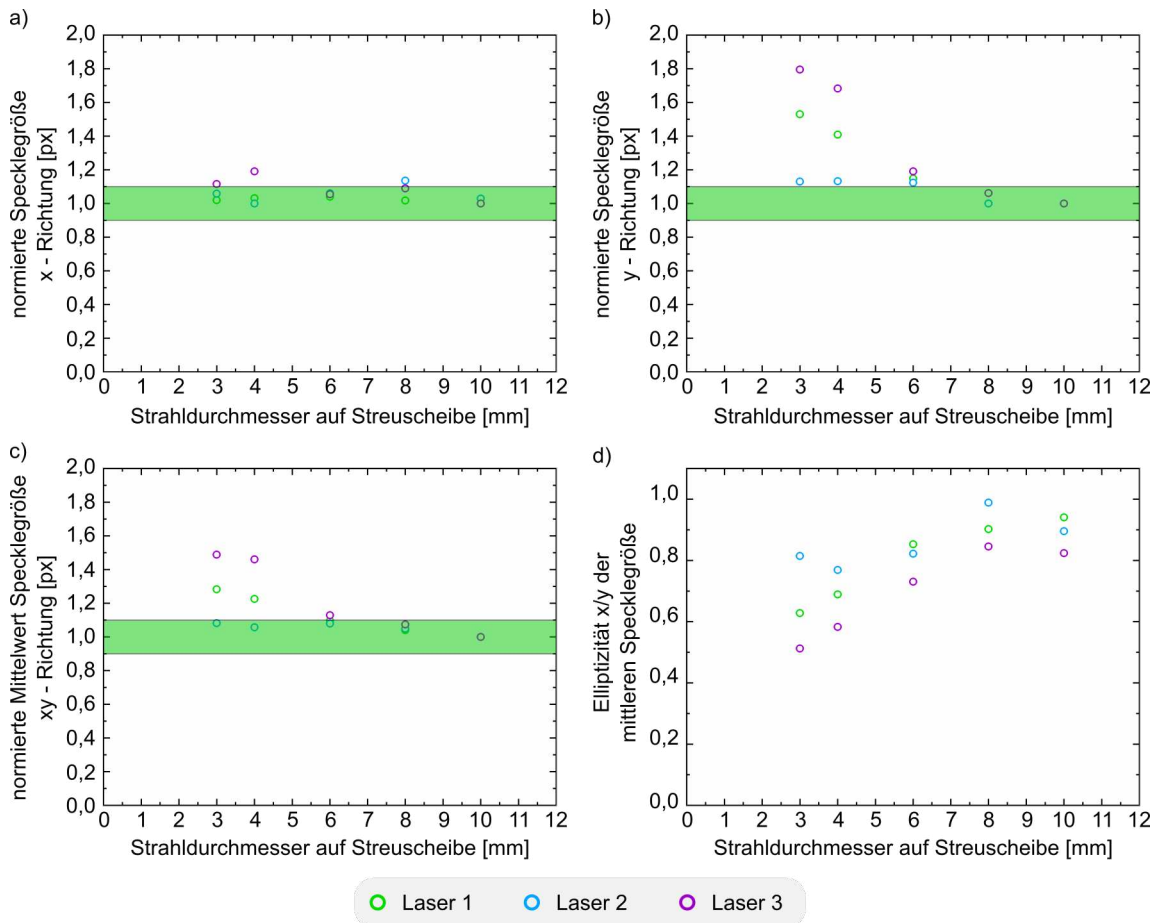
Als Letztes werden die analogen Messergebnisse für Laser 3 mit einer Wellenlänge von 402 nm betrachtet. Die Ergebnisse dieser Messungen sind in Abbildung 22 dargestellt. Die mittleren Specklegrößen in x- und y-Richtung (siehe Abbildung 22a) zeigen auch bei die-

ser Wellenlänge ein ähnliches Verhalten wie bei Laser 2 bezüglich beider Richtungen. Die Werte in x- Richtung sind fast bei jedem Abstand A3 des Achromaten A3 von der Streuscheibe im Bereich der Auflösungsgrenze, wobei die Messpunkte von 60 mm und 65 mm leicht oberhalb der Auflösungsgrenze liegen. Demgegenüber wird in y-Richtung wie schon bei den anderen Laserwellenlängen eine Reduzierung der mittleren Specklegröße mit zunehmendem Abstand A3 des Achromaten A3 von der Streuscheibe beobachtet. Hier ist jedoch klar festzustellen, dass die mittlere Specklegröße den Bereich der Auflösungsgrenze nur erreicht, aber für keinen Abstand innerhalb der Grenzen liegt. Der Mittelwert der



**Abbildung 22:** Messung der Abhängigkeit der Specklegröße vom Abstand des Achromaten A3 von der Streuscheibe bei einer Laserwellenlänge von 402 nm. a) Graphische Darstellung der mittleren Specklegröße in x- und y-Richtung in Abhängigkeit des Abstandes A3 des Achromaten A3 (Abbildung 19 III) von der Streuscheibe mit eingezeichneten Auflösungsgrenzen nach Abbe und Rayleigh (*grüner Bereich*). b) Beispieldarstellung von Specklefeldern in unterschiedlichen Abständen A3 des Achromaten A3 von der Streuscheibe und die dazugehörigen Kontrastfunktionen sowie die Korrelationspeaks. c) Graphische Darstellung der Mittelwerte aus den mittleren Specklegrößen in x- und y-Richtung in Abhängigkeit vom Abstand A3 des Achromaten A3 von der Streuscheibe (*schwarz*) mit den Auflösungsgrenzen nach Abbe und Rayleigh sowie die Elliptizität der mittleren Specklegrößen ( $x/y$ ) in Abhängigkeit vom Abstand A3 (Abbildung 19 III) des Achromaten A3 von der Streuscheibe (*rot*).

mittleren Specklegröße erreicht nur zwischen 78 mm und 79 mm die Auflösungsgrenze. Für die Elliptizität wird in diesem Bereich ebenfalls der maximale Wert von ca. 0,9 erzielt. In Abbildung 22b sind analog zu Laser 1 und Laser 2 die Veränderung der Specklefelder für drei verschiedene Abstände A3 des Achromaten A3 von der Streuscheibe sowie die dazugehörigen Konstrastfunktionen mit Korrelationspeaks zu sehen. Bei einem Abstand von 60 mm ist sowohl in der Speckleverteilung als auch im Korrelationspeak ein Unterschied in x- und y-Richtung analog zu Laser 1 und Laser 2 sichtbar. Des Weiteren wird eine



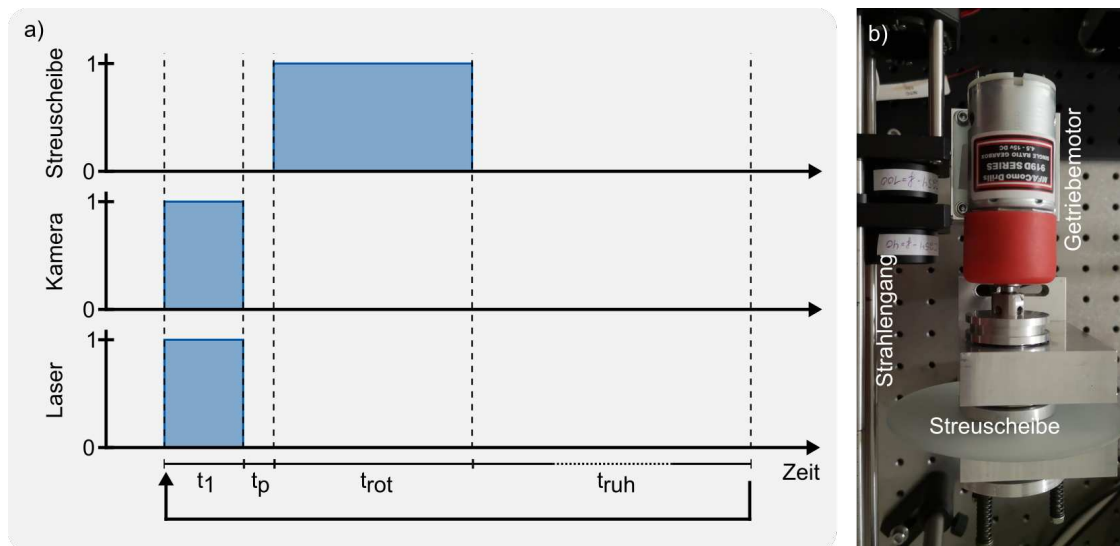
**Abbildung 23:** Darstellung der Messergebnisse der Abhängigkeit der mittleren Specklegrößen und verwandter Parameter vom Beleuchtungspotdurchmesser auf der Streuscheibe. Der Beleuchtungspot wurde zwischen 10 mm und 3 mm variiert. a) Graphische Darstellung der mittleren Specklegröße in x-Richtung für die 3 Laser in Abhängigkeit des Beleuchtungspotdurchmessers auf der Streuscheibe mit eingezeichneten Auflösungsgrenzen nach Abbe und Rayleigh (*grüner Bereich*). b) Graphische Darstellung der mittleren Specklegröße in y-Richtung für die 3 Laser in Abhängigkeit des Beleuchtungspotdurchmessers auf der Streuscheibe mit eingezeichneten Auflösungsgrenzen nach Abbe und Rayleigh (*grüner Bereich*). c) Graphische Darstellung der Mittelwerte der mittleren Specklegrößen in x- und y-Richtung in Abhängigkeit des Beleuchtungspotdurchmessers auf der Streuscheibe mit den Auflösungsgrenzen nach Abbe und Rayleigh (*grüner Bereich*). d) Sowie die Elliptizität der mittleren Specklegrößen (x/y) für die 3 Laser in Abhängigkeit des Beleuchtungspotdurchmessers auf der Streuscheibe.

deutliche Verschiebung zu höheren Grauwerten des Kontrastpeaks beobachtet. Bei einem Abstand von 77 mm ist analog zu Laser 1 und Laser 2 eine Standardspeckleverteilung sowie ein nahezu runder Korrelationspeak zu sehen. Auch hier werden bei Vergrößerung des Abstandes auf 85 mm kleinere Artefakte in der Speckleverteilung erkennbar.

Nach der Untersuchung und Festlegung des Abstandes A3 des Achromaten A3 von der Streuscheibe (Kapitel 3.4) folgte die Messung der Abhängigkeit der mittleren Specklegröße vom Beleuchtungspot auf der Streuscheibe durch die Variation der Achromaten A1 und A2 (siehe Abbildung 19 III). Hierfür wurde die Position des Achromaten A1 festgehalten und nur der Achromat A2 verschoben. Somit konnte die Größe des Beleuchtungspots auf der Streuscheibe variiert werden. Der Spotdurchmesser auf der Streuscheibe wurde von 10 mm auf 3 mm reduziert und so analog zum Achromaten A3 die mittlere Specklegröße in x- und y-Richtung über die Korrelation von zwei Specklefeldern bestimmt. Es wurden Messungen für alle 3 Laserwellenlängen durchgeführt. In Abbildung 23 sind die Messergebnisse der mittleren Specklegrößen in x- und y-Richtung sowie der Mittelwert der mittleren Specklegrößen und die Elliptizität  $x/y$  der mittleren Specklegrößen dargestellt. Wird in Abbildung 23a und 23b die mittlere Specklegröße in Abhängigkeit vom Spotdurchmesser von allen Lasern betrachtet, ist zu sehen, dass sich die mittlere Specklegröße in x-Richtung bei Veränderung des Spotdurchmessers nur unwesentlich ändert und sich immer im markierten Bereich der Auflösungsgrenze bewegt. Dagegen ist bei Betrachtung der y-Richtung deutlich eine Abhängigkeit zwischen Beleuchtungspotdurchmesser und der mittleren Specklegröße zu beobachten. Diese Beobachtungen sind für alle drei Laser identisch, aber unterschiedlich stark ausgeprägt. Laser 2 besitzt eine deutlich kleinere Abhängigkeit des Beleuchtungspots in y-Richtung als Laser 3. In y-Richtung erreichen die mittleren Specklegrößen den markierten Bereich der Auflösungsgrenze bei einem Spotdurchmesser von 8 mm. Die Mittelwerte der mittleren Specklegrößen erreichen schon bei einem Beleuchtungspotdurchmesser größer als 6 mm den markierten Auflösungsbereich (Abbildung 23c). Die Elliptizität nimmt mit größeren Beleuchtungspotdurchmessern zu und besitzt bei 8 mm bei allen drei Lasern ihr Maximum. Hinzu größeren Beleuchtungspotdurchmessern sinkt die Elliptizität der Speckle leicht ab.

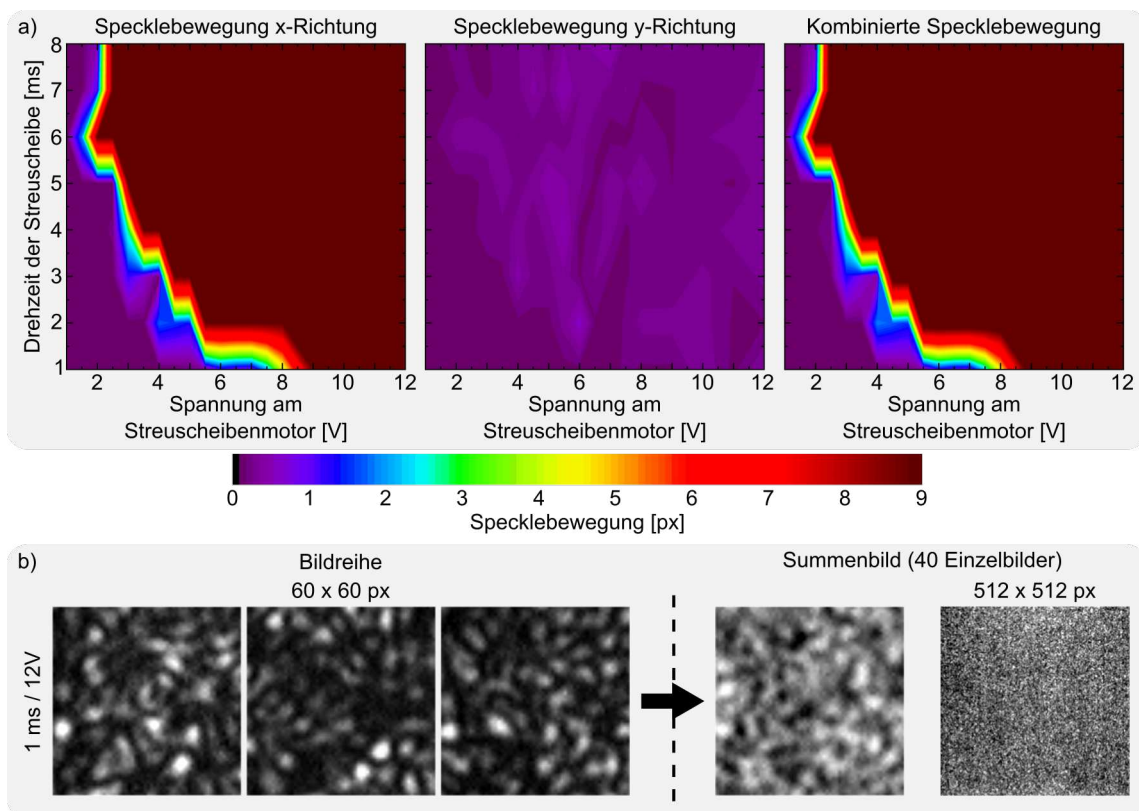
### 3.3.4 Bestimmung der Specklebewegung in Abhängigkeit von Drehzeit und angelegter Spannung

Die Bewegung der Speckle wurde bei Drehung der Streuscheibe (Ground glass 100mm 62620; Körnung 220; Edmund Optics) in Abhängigkeit von ihrer Rotationszeit und der am Getriebemotor (MFA/Como Drills 919D Series; Übersetzung 6:1) angelegten Spannung untersucht. Der zeitliche Ablaufplan bzw. die zeitliche Triggerung der Komponenten Laser, Kamera und Streuscheibe ist als Zeitstrahl in Abbildung 24a dargestellt. In Abbildung 24b ist der Strahlengang mit der Streuscheibe sowie die direkte Aufhängung des Getriebemotors mit der Rotationsachse der Streuscheibe zu sehen. Die Belichtung der Streuscheibe mit dem Laser erfolgte für eine Zeit  $t_1 = 4$  ms. Nach einer Pause von  $t_p = 1$  ms wurde die nächste Position angefahren. Diese Bewegung erfolgte mit einer variablen Zeit  $t_{rot}$  (1 ms bis 8 ms) und einer variablen Motorspannung  $V_{mot}$  (1 V bis 12 V) und wurde im Weiteren untersucht. Um mögliche mechanische Probleme beim Anhalten der Streuscheibe zu vermeiden, erwies sich die Festlegung einer Ruhezeit  $t_{ruh} = 1$  s zwischen jedem Zyklus (Belichtung und Drehung) als notwendig. Diese Schritte erfolgten zwecks Statistik 40-mal. Die Charakterisierung wurde auf Vorwissen basierend auf anderen Haltesystemen nur mittels Laser 1 bei einer angelegten Diodenspannung von 0,3 V für ein optimales SNR durchgeführt. Die weiteren Untersuchungen erfolgten mit einer Bildgröße von 512



**Abbildung 24:** a) Zeitlicher Synchronisationsverlauf der Komponenten Laser, Kamera und Streuscheibe für die Aufnahme und Bestimmung der Specklebewegung für die unterschiedlichen Laserwellenlängen und die Spannung-Rotationszeitpaarungen. b) Darstellung des optischen Strahlengangs im Bereich der Streuscheibe sowie die direkte Aufhängung des Getriebemotors mit der Rotationsachse der Streuscheibe.

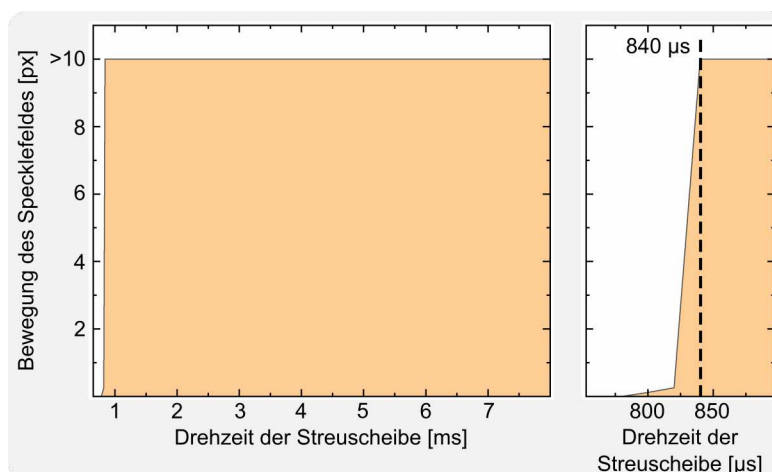
x 512 px und einer Vergrößerung am optischen Teleskop von 2,5x. Für die so erhaltenen Bildreihen konnte mittels Kreuzkorrelation zwischen zwei aufeinander folgenden Specklefeldern eine Verschiebung des Korrelationspeaks der Specklefelder sowohl in x- als auch in y-Richtung bestimmt werden. Diese Vorgehensweise ist jedoch durch eine notwendige Korrelation von aufeinander folgenden Bildern begrenzt. Existiert keine oder nur eine geringe Korrelation, was bei zeitlich langen Streuscheibenbewegungen der Fall ist, müssen die Bildreihen visuell überprüft werden. Bei kompletten nicht korrelierten Specklefeldern wurde ein Maximalwert für die Specklebewegung eingesetzt. Aus den erhaltenen Verschiebungen des Korrelationspeaks bzw. aus der Veränderung von zwei aufeinander folgenden Specklefeldern wurde im Anschluss ein Mittelwert der Verschiebung bzw. der Specklebewegung für jeden Messpunkt in x- und y-Richtung ermittelt. Diese Vorgehensweise ist angewandt worden, da es sowohl mechanische als auch elektrisch/steuerungstechnische Artefakte geben kann. Aus den beiden Bewegungsrichtungen ergibt sich zum Schluss eine



**Abbildung 25:** a) Abbildung der Specklebewegung in Pixel in x- und y-Richtung sowie die daraus resultierende vektorielle Darstellung der Specklebewegung für den Laser 1 in Abhängigkeit von der Spannung am Getriebemotor und der Rotationszeit der Streuscheibe. Die Pixelbewegung der Korrelationspeaks von aufeinander folgenden Specklefeldern ist frabcodiert. b) Bildreihe von drei aufeinanderfolgenden Specklefeldern bei einer Rotationszeit von 1 ms und einer Spannung von 12 V (links) und den daraus resultierenden Summenbildern einer Bildreihe von 40 Bildern (rechts).



vektorielle Bewegung der Specklefelder. Die so ermittelten Specklebewegungen sind für Laser 1 und für die einzelnen Bewegungsrichtungen in Abbildung 25a in einem Farbdia-gramm in Abhängigkeit von der Streuscheibendrehzeit und der angelegten Spannung am Getriebemotor dargestellt. Die ermittelten Pixel-Werte der Verschiebung der Korrelati-onspeaks wurden unter Berücksichtigung der theoretischen PSF-Größe für die einzelnen Laser in „PSF-Bewegungen“ umgerechnet. Hierbei sind die Werte für die theoretische PSF nach Abbe aus Tabelle 2 verwendet worden. Somit kann die benötigte minimale Bewegung von einer PSF-Größe direkt aus den Farbdia-grammen abgelesen werden. Aus Abbildung 25a ist zu erkennen, dass sich die Specklebewegung hauptsächlich aus Bewegungskompo-nenten in x-Richtung zusammensetzt. Die Bewegung in y-Richtung ist bei den möglichen Drehzeit-Spannung-Paaren eher zu vernachlässigen und immer kleiner als 1 Pixel. Um eine Aussage über eine minimal benötigte Bewegung des Specklefeldes treffen zu können, wurde als Grenzwert für die Specklefeldbewegung die Bewegung um eine Halbwertsbrei-te einer PSF festgelegt. Diese beträgt für den Laser 1 ca. 4,15 px. Bei Betrachtung der vektoriellen Bewegung des Specklefeldes unter diesen Gesichtspunkten ist zu erkennen, dass erst bei langer Drehzeit von 7 ms und 8 ms eine signifikante Specklebewegung bei einer angelegten Spannung von 1,5 V erzeugt werden konnte. Mit dieser direkten Getrie-beübersetzung auf die Rotationsachse der Streuscheibe sind bei Drehzeiten von 1 ms und Spannungen  $> 7,5$  V Specklefeldänderungen (grüner Bereich) erkennbar. Die Bewegung der Streuscheibe reicht bei über 8,5 V aus, um ein komplettes neues Specklefeld zu gene-rieren. Ein weiterer zusätzlicher Fakt bei dieser Getriebeübersetzung und Halterung sind



**Abbildung 26:** Abhängigkeit der Specklebewegung bei gleichbleibender 12 V Spannung am Getriebemotor, aber schrittweiser Reduzierung der Rotationszeit unter 1 ms. (links) Darstellung des gesamten Messbereiches des Teilversuches. (rechts) Vergrößerung der Abfallflanke bei kleinen Rotationszeiten um 850  $\mu$ s.

die sichtbaren sehr scharfen Übergänge der Specklefeldbewegung. In Abbildung 25b sind auf der linken Seite drei aufeinander folgende Einzelaufnahmen der Bildreihe für die Bestimmung der Specklebewegung beispielhaft für 12 V am Getriebemotor dargestellt. Von Bild zu Bild ist eine komplette Änderung der Specklefelder sichtbar. Um die Untersuchung zu vervollständigen, wurde für eine hohe Spannung von 12 V eine minimale Rotationszeit ermittelt. Hierfür wurde die Rotationszeit schrittweise bei gleichbleibender Spannung reduziert (Abbildung 26). Es zeigte sich, dass es möglich ist, die Rotationszeit bei einer 6:1 Getriebemotorübersetzung und einer direkten Aufhängung bis ca.  $840 \mu\text{s}$  zu reduzieren und trotzdem eine komplette Specklefeldveränderung zu erzeugen.

### 3.3.5 Bestimmung der Specklebewegung in Abhängigkeit von der Ruhezeit $t_{\text{ruh}}$

Es ist für die realisierten mechanischen Aufhängungen des Streuscheibensystems notwendig, eine entsprechende Ruhezeit  $t_{\text{ruh}}$  nach der Drehung der Streuscheibe zu ermitteln und zu definieren (siehe Abbildung 24). Die Wiederholrate der Bildaufnahmen (Bildaufnahmezyklus) wurde schrittweise von 1000 ms reduziert und jeweils 20 Bilder mit einer Aufnahmezeit von 4 ms bei einer definierten Wiederholrate aufgenommen. Aus den Aufnahmezyklen, welche in Abbildung 24 dargestellt sind, kann die Ruhezeit durch die Bildaufnahmezykluszeit ( $t_{\text{zyklus}}$ ), die Rotationszeit ( $t_{\text{rot}}$ ) und die Aufnahmezeit ( $t_1$ ) folgendermaßen berechnet werden:

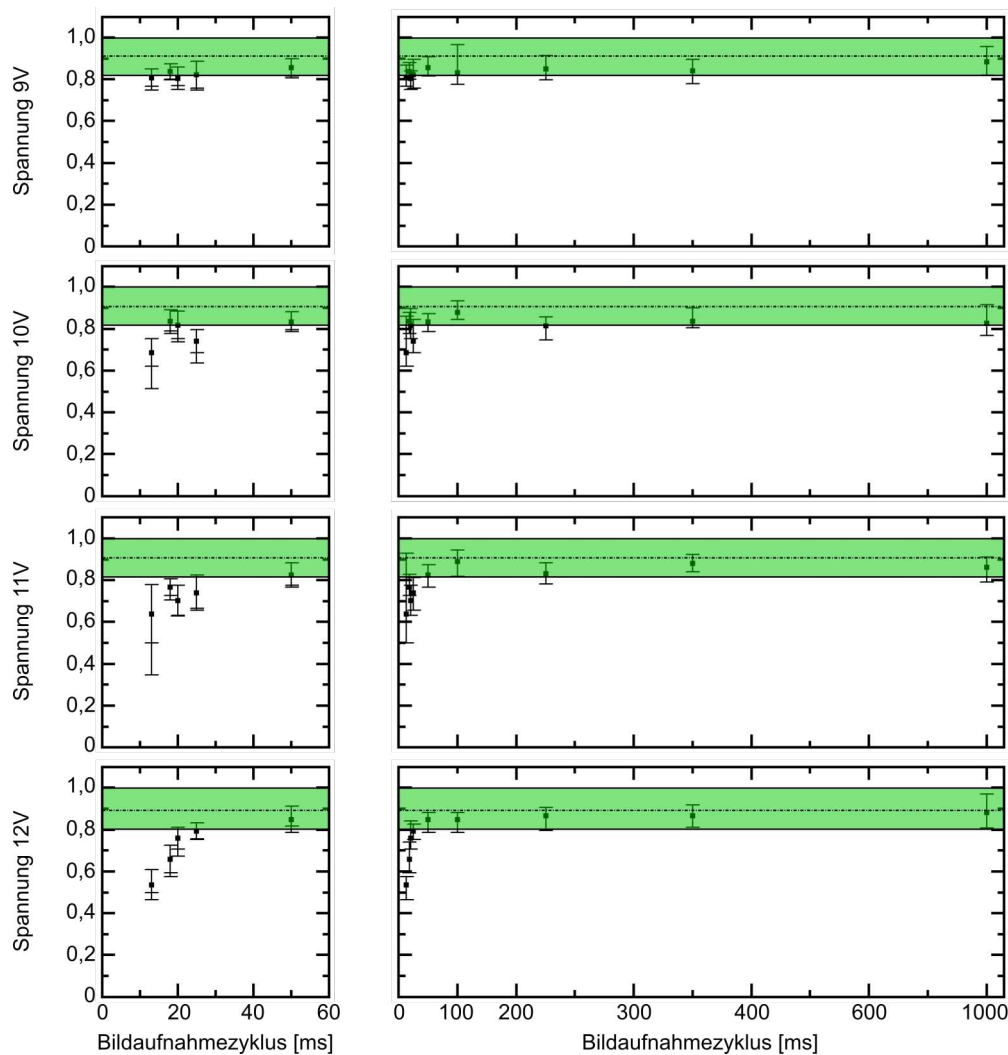
$$t_{\text{ruh}} = t_{\text{zyklus}} - t_1 - t_{\text{rot}}. \quad (16)$$

Die Verstärkung der Kamera wurde dem Laser angepasst, um eine Überbelichtung bzw. eine Unterbelichtung zu vermeiden. Die Bildgröße der aufgenommenen Bilder betrug  $128 \times 128 \text{ px}$ . Das erste Bild ist das Referenzbild, da es ohne vorausgegangene Bewegung aufgenommen wurde (Ruhebild). Der Kontrast der weiteren Bilder kann über:

$$K_{\text{bewegt}} = \frac{\frac{\text{Standardabweichung der Grauwerte}}{\text{Mittelwert der Grauwerte}}}{\text{Bildanzahl}} \quad (17)$$

berechnet werden. Die Veränderung des Bildaufnahmezyklus und die daraus resultierenden Kontrastveränderungen in den Specklefeldern in Abhängigkeit von 4 Spannungen (9 V bis 12 V) sind in Abbildung 27 dargestellt. Die ermittelten Kontrastwerte für die unterschiedlichen Bildaufnahmezyklen wurden jeweils mit einer oberen und unteren Schranke





**Abbildung 27:** Darstellung der Kontrastveränderung bei unterschiedlichen Spannungen (9 V bis 12 V) bei Reduzierung des Bildaufnahmezyklus. Die gestrichelte Linie stellt den Mittelwert aller Ruhebilder dar, wobei die Ruhebilder die ersten Bilder einer jeden Messreihe ohne Specklebewegung sind. Der grüne Bereich stellt den Toleranzbereich mit der oberen und unteren Schranke, welche durch eine Toleranzgrenze von 10% um die Mittelwerte der Ruhebilder bestimmt wurden, dar.

versehen. Diese Schranken stellen bei der entsprechenden Bildaufnahmezykluszeit den maximalen (obere Schranke) und den minimalen (untere Schranke) Wert des Kontrastes in der Bildreihe dar. Des Weiteren wurde über den Kontrast des oben erwähnten Ruhebildes aus allen unterschiedlichen Bildaufnahmezykluszeiten ein Mittelwert (gestrichelte Linie in Abbildung 27) berechnet und ein Toleranzbereich von 10 % um den Mittelwert aufgetragen (grüner Bereich in Abbildung 27). Daraus ist zu erkennen, dass bei großen Aufnahmezykluszeiten und allen vier Spannungen der Kontrastwert im Toleranzbereich liegt. Erst bei Aufnahmezykluszeiten unter 100 ms ist eine Kontrastreduzierung sichtbar. Dies ist insbesondere bei hohen Spannungen (12 V) sehr gut zu erkennen. Im linken Bereich von

Abbildung 27 ist deutlich zu beobachten, dass mit einer Aufnahmezykluszeit von 50 ms bei allen Spannungen der Kontrast im unteren Bereich des Toleranzbereiches liegt. Wird mit kurzen Aufnahmezykluszeiten gearbeitet und somit auch mit kurzen Ruhezeiten, ergibt sich für große Spannungen (12 V und 11 V) eine signifikante Reduktion des Kontrastes der bewegten Specklefelder und es kommt hier zu einer Verschmierung des Specklefeldes. Bei einer Spannung von 10 V sind die Kontrastwerte bis zu einer Aufnahmezykluszeit von 18 ms (entspricht einer Ruhezeit von 13 ms) zwar außerhalb des Toleranzbereiches, fallen jedoch erst unter 18 ms wie bei höheren Spannungen stark ab. Erst bei einer Spannung von 9 V liegen alle Kontrastwerte auch bei kleinen Aufnahmezykluszeiten in einem akzeptablen Bereich, aber dennoch an der Grenze des angestrebten Toleranzbereiches.

### 3.3.6 Erweiterung auf ein Immersions-Objektiv (63x Wasser)

Die in den vorhergehenden Kapiteln untersuchten und als optimal nachgewiesenen Einstellungen und Parameter müssen noch für das später ebenfalls zum Einsatz kommende 63x Wasser-Immersion-Objektiv überprüft werden. Hierfür wird sowohl die mittlere Specklegröße, analog Abbildung 23 in Kapitel 3.3.3, als auch die Verschmierung, analog Abbildung 27 in Kapitel 3.3.5, für die Optimierung der Parameter betrachtet.

In Tabelle 4 sind die Werte und die Grenzbereiche für die mittleren Specklegrößen in x- und y-Richtung sowie der Mittelwert aus x- und y-Richtung sowie die Elliptizität der mittleren Specklegrößen  $x/y$  unter Verwendung eines 63x Wasser-Immersion-Objektivs im Vergleich zu Werten für ein 63x Luft-Objektiv (Kapitel 3.3.3 bis 3.3.5) zusammengestellt. Man erkennt deutlich, dass für das 63x Wasser-Immersion-Objektiv die Werte für die mittlere Specklegröße sowohl in x- als auch in y-Richtung für Laser 1 unter den Werten des 63x Luft-Objektivs liegen. Aber auch die Elliptizität mit 0,96 deutet auf einen nahezu runden Korrelationspeak hin und somit auf ähnliche mittlere Ausdehnungen der Speckle in alle Raumrichtungen. Die mittleren Specklegrößen für Laser 1, 2 und 3 befinden sich deutlich über dem gewünschten Grenzbereich des Wasser-Immersion-Objektivs, zeigen aber Abweichungen kleiner 50% vom idealen Grenzbereich. Der Trend der Abweichungen wird sogar stärker, je näher der UV-Bereich kommt. Zusätzlich ist bei Laser 2 und Laser 3 eine deutliche Verschlechterung der Elliptizität zu beobachten. Diese folgt, wie in den vorherigen Kapiteln schon beschrieben, aus einer Vergrößerung der mittleren Specklegröße in y-Richtung. Nach der Untersuchung der Positionen der Achromate und den damit verbundenen mittleren Specklegrößen wurde noch die Rotationszeit (Kapitel

3.3.5) vermessen. Hierzu musste die Verschmierung, also der Kontrast des Bildes nach der Bewegung, betrachtet werden. In Tabelle 5 sind die ermittelten Kontrastwerte für das 63x Wasser-Immersion-Objektiv mit den dazugehörigen Grenzwerten und im Vergleich dazu die zu verwendenden Kontrastwerte für das 63x Luft-Objektiv dargestellt. Für die Ermittlung der Kontrastwerte wurden analog zu den Untersuchungen in Kapitel 3.3.5 20 Bilder

**Tabelle 4:** Darstellung der normierten mittleren Specklegrößen (NMS) in x-, y- und xy-Richtung (Mittelwert aus x- und y-Richtung) sowie die Elliptizität x/y der mittleren Specklegröße (mSg) bei Verwendung des 63x Wasser-Immersion-Objektivs im Vergleich zu dem 63x Luft-Objektiv mit angegebenem Grenzwertbereich für die minimale Auflösung. Grenzwertbestimmung über die ermittelten Beugungsgrenzen aus den Tabellen 1 bis 3.

	63x Wasser-Objektiv		63x Luft-Objektiv	
	Werte	Grenzwerte untere obere		Werte
<b>Laser 1</b>				
NMS x-Richtung [px]	4,29	2,71	3,3	4,52
NMS y-Richtung [px]	4,46	2,71	3,3	5,01
NMS xy-Richtung [px]	4,38	2,71	3,3	4,77
Elliptizität x/y der mSg	0,96	1	1	0,9
<b>Laser 2</b>				
NMS x-Richtung [px]	4,10	2,42	2,95	4,34
NMS y-Richtung [px]	4,79	2,42	2,95	4,39
NMS xy-Richtung [px]	4,44	2,42	2,95	4,37
Elliptizität x/y der mSg	0,86	1	1	0,99
<b>Laser 3</b>				
NMS x-Richtung [px]	3,92	2,11	2,57	3,77
NMS y-Richtung [px]	5,13	2,11	2,57	4,46
NMS xy-Richtung [px]	4,52	2,11	2,57	4,115
Elliptizität x/y der mSg	0,76	1	1	0,85

**Tabelle 5:** Darstellung der ermittelten Kontrastwerte nach Rotation mit einer Ruhezeit von 35 ms für das 63x Wasser-Immersion-Objektiv mit den dazugehörigen Grenzwerten sowie die Kontrastwerte nach einer Ruhezeit von 45 ms bzw. 15 ms für das 63x Luft-Objektiv.

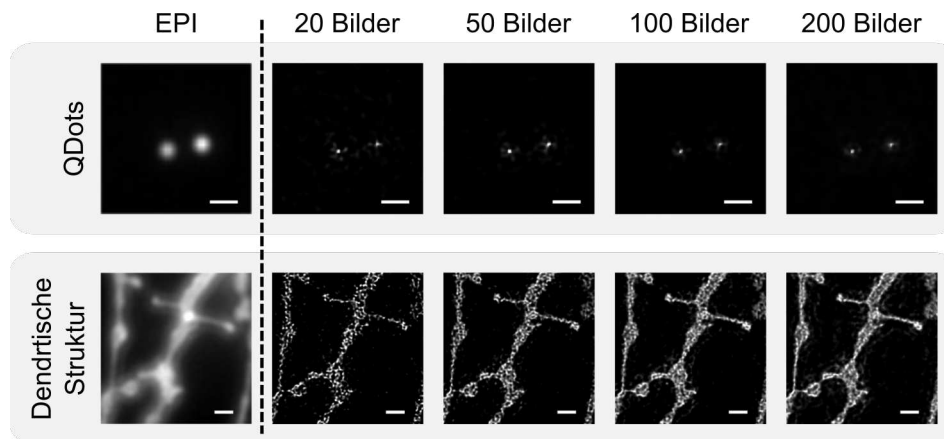
	63x Wasser-Immersion-Objektiv			63x Luft-Objektiv	
	Kontrastwerte $t_{\text{ruh}} = 35 \text{ ms}$	Grenzwert		Kontrastwerte	
		unterer	oberer	$t_{\text{ruh}} = 45 \text{ ms}$	$t_{\text{ruh}} = 15 \text{ ms}$
Laser 1	0,86	0,81	1,0	0,86	0,81
Laser 2	0,85	0,81	1,0	0,83	0,82
Laser 3	0,86	0,81	1,0	0,82	0,70

aufgenommen. Das erste Bild wurde als Vergleichs-Kontrastwert verwendet, welcher den Mittelwert des Toleranzbereiches bildet. Der Toleranzbereich wurde ebenfalls mit einer Schwankung von 10% um den Mittelwert angenommen. Wird der Kontrastwert für alle drei Laser bei Verwendung von 35 ms Ruhezeit (Tabelle 5) betrachtet, liegen diese exakt im Toleranzbereich. Bei Verringerung der Ruhezeit konnte jedoch festgestellt werden, dass die Kontrastwerte stark abfallen und den Toleranzbereich verfehlen.

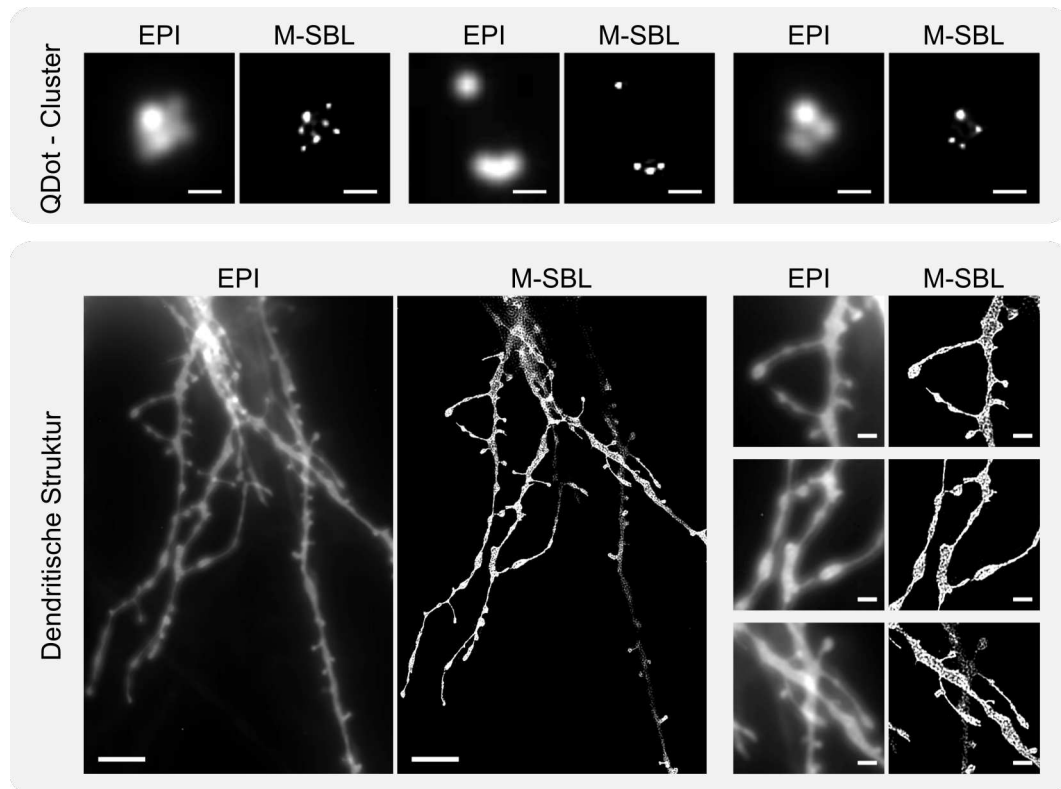
### 3.3.7 Untersuchung der Rekonstruktion von Teststrukturen

In diesem Kapitel soll die Erzeugung von hochaufgelösten Bildern mit dem Speckle-Mikroskop im Vordergrund stehen. Hierfür werden unterschiedliche Strukturen betrachtet. Zum einen sollen nicht organische Strukturen wie Quantum-dot (QDot)-Cluster oder über Fotolithografie hergestellte Auflösungsstrukturen untersucht und zum anderen organische Strukturen wie dendritische Spines dargestellt werden. Als Erstes wird überprüft, bei welcher Bildanzahl eine Rekonstruktion mittels M-SBL Algorithmus (Kapitel 3.2.6) [83, 13, 11] auswertbar ist und was die optimalen Parameter für die Rekonstruktion sind.

Die Analyse-Parameter wurden mit Hilfe von dendritischen Strukturen ermittelt, welche bezüglich ihrer Struktur-Stimmigkeit im Vergleich zum EPI-Fluoreszenzbild geprüft wurden. Des Weiteren zeigten sich ausgewählte QDots geeignet, um die Parameter zur

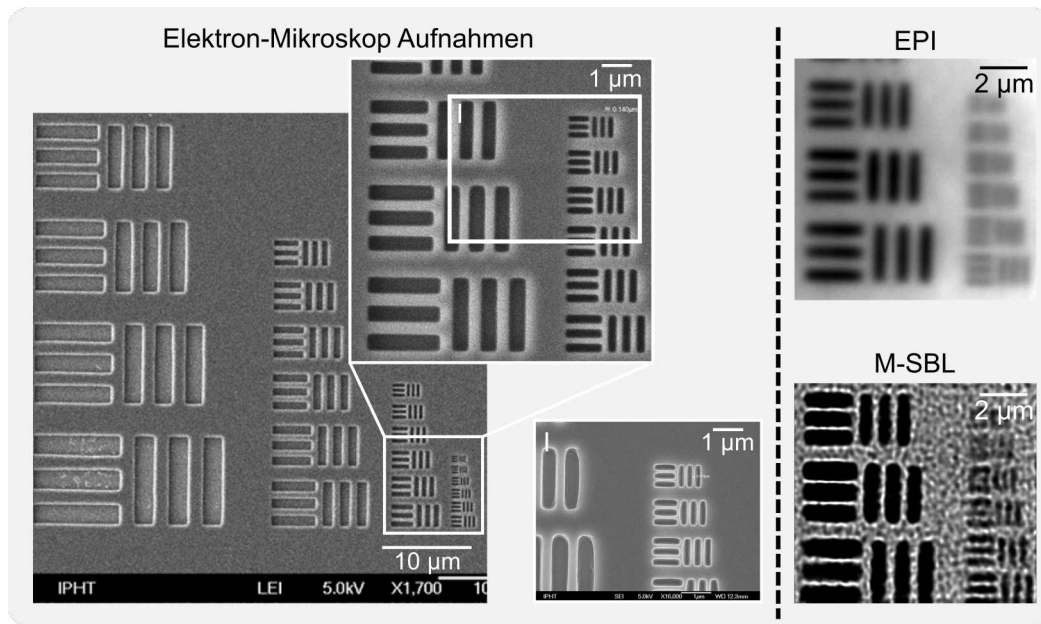


**Abbildung 28:** Gegenüberstellung einer Punktstruktur bestehend aus QDots (Maßstab 500 nm) und einer flächigen dendritischen Struktur (Maßstab  $1\ \mu\text{m}$ ) zur Bestimmung der benötigten Bildanzahl für eine Rekonstruktion mittels M-SBL Algorithmus [83, 11] und dazugehöriges EPI-Fluoreszenzbild (links). Darstellung der Rekonstruktionen der flächigen dendritischen Struktur und der QDot Struktur nach einer bestimmten Anzahl zur Rekonstruktion verwendeter Bilder (rechts). Die Bildanzahl zur Rekonstruktion wurde von 20 Bildern zu 200 Bildern erhöht. Die hochaufgelösten Rekonstruktionen wurden mittels M-SBL Algorithmus berechnet.



**Abbildung 29:** Beispielaufnahmen von QDot-Cluster (obere Bildreihe) und dendritischen Strukturen (untere Bildreihe) als EPI-Fluoreszenzbilder und den dazu gehörigen hochauflösenden Rekonstruktionen mittels M-SBL Algorithmus [83, 11]. (Maßstab: QDots 500 nm; Dendritische Strukturen, große Bilder  $4\ \mu\text{m}$  und kleine Bilder  $1\ \mu\text{m}$ ). Es sind verschiedene Strukturen dargestellt. Die Bilder zeigen einzelne QDots bis hin zu QDots Clustern mit mehreren QDots in einem kleinen Raumbereich sowie sich stark überlappende oder feine dendritische Strukturen.

Rekonstruktion zu bestimmen. Die Parameterbestimmung erfolgte für jedes Objektiv und jede Teleskop-Vergrößerung auf der EMCCD und wurde um die Bestimmung der benötigten Bildanzahl zur Rekonstruktion erweitert. In Abbildung 28 ist für eine QDot-Struktur (obere Reihe), bestehend aus zwei Punkten und einer flächigen dendritischen Struktur (untere Reihe), eine Rekonstruktionsreihe mit unterschiedlicher Bildanzahl und das dazugehörige EPI-Fluoreszenzbild zu sehen. Die gezeigten Bilder wurden mit dem 63x Wasser-Immersion-Objektiv aufgenommen. Um die Auflösungsgrenze des Systems zu bestimmen, wurden in einem ersten Schritt die genannten dendritischen Strukturen und die QDot Strukturen verwendet. In Abbildung 29 sind diese rekonstruierten Strukturen, welche mit dem 63x Wasser-Immersion-Objektiv mit einer NA von 1,2 aufgenommen wurden, dargestellt. Zu diesem Zweck wurden ebenfalls, wie in Kapitel 3.2.2 beschrieben, durch Elektronenstrahlolithografie Fluoreszenz-Testcharts hergestellt. Hierfür wurden unterschiedliche Herangehensweisen untersucht. Eines der resultierenden Fluoreszenz-Testcharts ist in Ab-

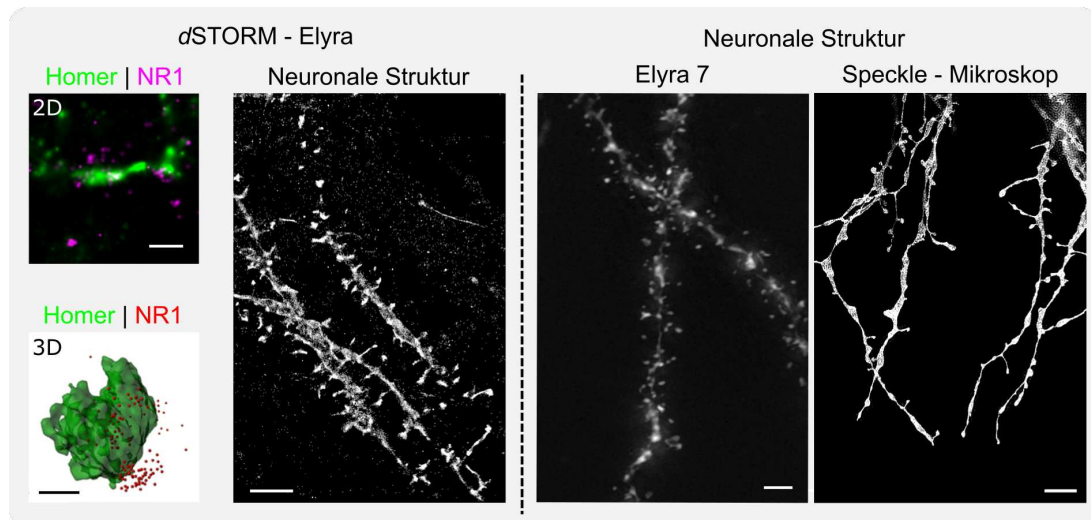


**Abbildung 30:** (links) Elektronen-Mikroskop Aufnahmen des Fluoreszenz-Testcharts, welches durch Elektronenstrahl-Lithografie hergestellt wurde, in unterschiedlichen Vergrößerungen. Zu sehen sind Linienstrukturen im Bereich von mehreren  $\mu\text{m}$  bis zu wenigen 100 nm Größe. (rechts) EPI-Fluoreszenz-Aufnahme (oben) und hochauflösende Rekonstruktion (unten) der kleinsten Strukturen im Bereich von wenigen 100 nm des Fluoreszenz-Testcharts.

Abbildung 30 zu sehen. Die Struktur besteht aus einem mit Farbstoff beladenen Lithografie-Lack. Weiterhin wurden keine starken Abweichungen in den Rekonstruktionsergebnissen aller Strukturen durch die in Kapitel 3.3.1 beschriebenen geringen Schwankungen in der Laserleistung beobachtet. Diese Beobachtungen zeigten sich bei einer hohen Anzahl von mehr als 100 Einzelrekonstruktionen.

### 3.3.8 Vergleich verschiedener Systeme nach Strukturauflösung und Einsatzgebiet

Für den Vergleich vorhandener Systeme mit dem neu entwickelten und realisierten Speckle-Mikroskop wurden unterschiedliche Beispiele von möglichen neuronalen Strukturen aufgenommen und in Abbildung 31 dargestellt. Es erfolgten *d*STORM Messungen an Rezeptor-Clustern und neuronalen Strukturen mit dem Elyra P.1 System. Unter Verwendung des neu aufgebauten Speckle-Mikroskops und des kommerziellen Elyra 7 lattice-SIM Systems wurden ebenfalls Messungen an neuronalen Strukturen durchgeführt, wobei am Elyra 7 mit einem 63x Öl-Immersionsobjektiv mit einer NA von 1,4 gearbeitet wurde. Zum Vergleich herangezogen können insbesondere die neuronalen Strukturen, die mit allen drei Systemen, einem lokalisationsbasierten System, dem lattice SIM System und dem Speckle-System



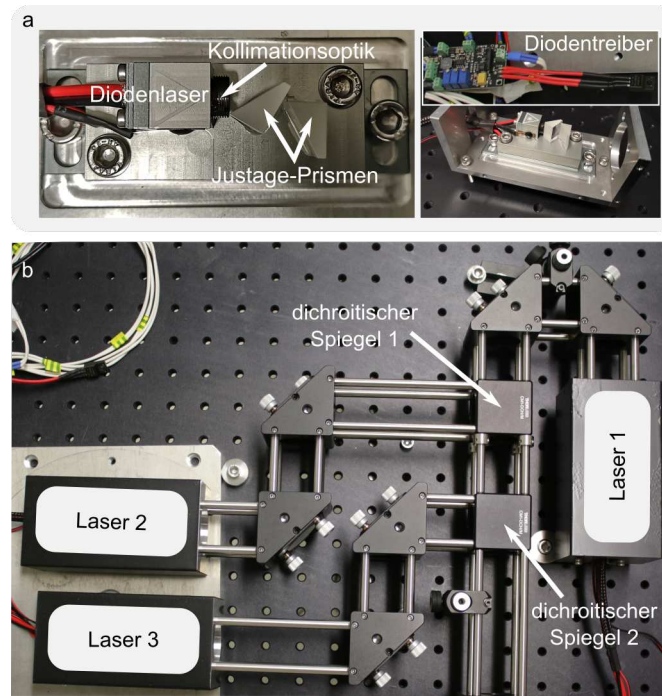
**Abbildung 31:** Darstellung unterschiedlicher hochauflöser Strukturen mittels den im Labor der Sektion für Translationale Neuroimmunologie vorhandenen Systemen. (links) *d*STORM Aufnahmen mittels Elyra P.1 System: (links) NMDA-Rezeptor-Cluster mit post-synaptischen Marker Homer1 (Maßstab 500 nm) sowohl in 2D (oben) als auch in 3D (unten) und (rechts) neuronale Struktur (Aufnahmezeit  $\sim 30$  s mit 1000 Bildern, Maßstab  $4 \mu\text{m}$ ). (rechts) Vergleich von neuronaler Struktur (links) aufgenommen mit dem Elyra 7 lattice SIM System (Aufnahmezeit  $\sim 1,5$  s mit 15 Phasen, Maßstab  $4 \mu\text{m}$ ) und (rechts) aufgenommen mit dem neu aufgebauten Speckle-Mikroskop (Maßstab  $4 \mu\text{m}$ ).

aufgenommen wurden. Zu erkennen sind visuell unterschiedliche Strukturauflösungen, die sich durch scharfe oder unscharfe Bilder zeigen. Das neu entwickelte Speckle-System zeigt im Vergleich eine hohe Strukturerkennbarkeit bei gleichem Maßstab und lässt somit neben den Vorteilen zur Lebendzellanalyse auch eine hohe Auflösung erwarten.

### 3.4 Diskussion

Die Ausgangsleistung und das jeweilige Spektrum der verwendeten Lasersysteme wurden in den Untersuchungen analysiert und die Ergebnisse in den vorangegangenen Kapiteln dargestellt. Bei den verwendeten Lasern handelt es sich um Diodenlaser (Lasertack GmbH, Kassel), welche eine kompakte kostengünstige Laservariante mit hohen Ausgangsleistungen im Vergleich zu Festkörperlasern darstellt. Für das entwickelte System wurden Diodenlaser mit der Wellenlänge 405 nm und 1 W Ausgangsleistung (Laser 3), 465 nm und 4,6 W Ausgangsleistung (Laser 2) sowie 520 nm mit 1 W Ausgangsleistung (Laser 1) verwendet. Diese Lasersysteme und die dazugehörigen Treiber sind in Abbildung 32a zu sehen. Alle Lasersysteme wurden mit einer zusätzlichen Temperatursteuerung zur Kühlung geliefert und, wie in Abbildung 32a (rechts) gezeigt, in eine selbst entwickelte Haltevorrichtung ein-





**Abbildung 32:** a) Diodenlaser-System mit optischen Komponenten zur Justierung des Strahlprofils und der Strahlführung sowie Diodentreiber zur Ansteuerung der Diodenlaser. b) Aufbau des Lasermoduls bestehend aus den Diodenlasern (Laser 1 bis Laser 3), zwei dielektrischen Spiegeln für jeden Laser und der Kombinationsoptik (dichroitische Strahlteiler) für die Nutzung aller drei Laserlinien in einem optischen Strahlengang.

gepasst. Dieses selbst entwickelte Gehäuse soll die empfindlichen Diodenlaser vor Staub schützen und zusätzlich die Reflexionen der Justage-Prismen (Abbildung 32a) blocken. Zu den ausgewählten vorjustierten Optiken der Diodenlaser gehören eine Kollimationsoptik, welche sich direkt am Diodenlaser befindet, und zwei Justage-Prismen. Die beiden Justage-Prismen, die auf die jeweiligen Laserwellenlängen angepasst sind, um das typisch ovale Strahlprofil der Diodenlaser [81] annähernd in ein rundes Strahlprofil zu transformieren (Abbildung 32a), sind im Strahlengang integriert worden. Die entwickelte Haltevorrichtung ermöglicht es zusätzlich, die Diodenlaser in das vorhandene Cage-System von Thorlabs aufzunehmen. Hierbei ist jeder Diodenlaser durch zwei zusätzliche dielektrische Spiegel (BB1-E02, Thorlabs) justierbar. Wie in Abbildung 32b zu erkennen ist, werden die drei Diodenlaser mit Hilfe von dichroitischen Strahlteilern (DMLP425R und DMLP490R, Thorlabs) miteinander gekoppelt und überlagert. Die Überlagerung erfolgte in zwei Schritten, so dass sichergestellt wurde, dass im resultierenden Strahlengang die Lichtwege identisch sind.

Die Leistungskurve von Laser 1 zeigt, dass die vom Hersteller angegebene Ausgangsleistung von 1 mW nahezu erreicht wird. Die leichten Verluste sind durch die Justage-Elemente am



Diodenlaser zu erklären, welche auch vom Hersteller in diesem Bereich angegeben werden (Datenblatt Min 0,85 W *Lasertack - New Laser Generation GmbH*). Bei der Vermessung von Laser 2 wurde erwartet, schon im niedrigen Bereich der angelegten Spannung hohe Ausgangsleistungen zu messen. Bei der Detektionsobergrenze des Leistungsmesskopfes wurde bei 2 V der angelegten Spannung eine Ausgangsleistung von 2,52 W erreicht. Die gemessenen Ausgangsleistungen dieses Diodenlasers sind jedoch für die Nutzung im Speckle-Mikroskop durchaus ausreichend. Bei Laser 3 ist zu erkennen, dass die maximale Ausgangsleistung bei ca. 670 mW liegt. Dieser Wert ist ebenfalls ausreichend für die Verwendung im System, liegt jedoch deutlich unterhalb der vom Hersteller angegebenen 1 W Ausgangsleistung. Die Verluste von 48,6% lassen sich zum Teil auf die Justage-Elemente im Diodenlaser zurückführen. Solch hohe Verluste bei Diodenlaser im Bereich von 405 nm sind aber durchaus zu erwarten. Dies resultiert aus Schwierigkeiten, das pn-Material, gerade in einem so hohen Leistungsbereich ( $\sim 1$  W), exakt herzustellen und zu strukturieren [85]. Die Abflachung der Leistungskurve bei hohen angelegten Spannungen bei Laser 1 und Laser 3 im oberen Leistungsbereich zeigt den typischen Übergang in den Sättigungsbereich der linearen Kennlinie und ist ein typisches Diodenlaser-Verhalten [81].

Neben der Ausgangsleistungskennlinie ist noch das spektrale Verhalten der Diodenlaser von großer Bedeutung. Die jeweiligen Spektren der Diodenlaser wurden immer vor und nach den dichroitischen Strahlteilern gemessen, um so eine Beeinflussung durch die Strahlteiler auszuschließen. Es wurden keine Veränderungen der Spektren durch die Bauelemente beobachtet. In den Abbildungen 17d bis 17f sind die entsprechenden Emissionsspektren der Diodenlaser nach dem Strahlteiler zu sehen. Die Spektren zeigen im Allgemeinen eine kleine spektrale Breite, was für Diodenlaser typisch ist [81]. Das Maximum vom Laser 1 liegt nicht wie im Datenblatt bei 520 nm, sondern bei 515 nm. Dieser Fakt ist für die spätere Auswahl von Fluorophoren oder Filtersystemen von Bedeutung. Alle anderen Diodenlaser-Spektren sind im vom Hersteller genannten Bereich wiederzufinden. Bei der Charakterisierung der Diodenlaser fällt auf, dass die spektrale Breite der Emissionslinie abnimmt, wenn man zu Diodenlasern mit kleineren Wellenlängen übergeht. Dieses Verhalten ist auf die pn-Übergänge zurückzuführen und eine typische Beobachtung bei Diodenlasern [81].

Bei Betrachtung der ermittelten Kamera-Pixelgrößen für die unterschiedlichen Teleskopvergrößerungen sollte in der realen Anwendung mit einer 2,5-fachen Teleskopvergrößerung gearbeitet werden. Diese Schlussfolgerung resultiert aus der Erfahrung, dass für eine optimale Rekonstruktion der Bilder eine Pixelgröße von ca. 80 nm bis 100 nm anzusetzen ist

[58, 60]. Damit kann die PSF auf ausreichend Pixel für eine Subpixel-Abtastung aufgeteilt werden. Wird dagegen die Pixelgröße zu klein gewählt, kann sich das SNR deutlich verschlechtern [86]. Dies resultiert daraus, dass in diesem Fall zu wenig Photonen pro Pixel detektiert werden können [58]. Bei der Betrachtung von kommerziellen Mikroskopie-Systemen, wie das Zeiss Elyra P.1 System (Kapitel 2.2.4), kann diese Erfahrung bestätigt werden. Das 100x Öl-Immersion-Objektiv besitzt im Elyra P.1 System eine Pixelgröße von 92,59 nm mit einer Vorvergrößerung von 1,6 und 138,89 nm bei einer Abbildung ohne Vergrößerung, wobei für *d*STORM Aufnahmen immer die 1,6-fache Vergrößerung verwendet wird. Das 63x Wasser-Immersion-Objektiv besitzt im Elyra P.1 System hingegen eine Pixelgröße von 143,37 nm bei einer 1,6-fachen Vorvergrößerung und liegt damit noch im Bereich einer verwendbaren Pixelgröße für die Lokalisationsmikroskopie [58, 60]. Dieses Objektiv wird jedoch selten für *d*STORM Messungen eingesetzt, da die Auflösungsverbesse- rung deutlich geringer ist als bei dem vorher beschriebenen 100x Öl-Immersion-Objektiv. Für einen Vergleich des Speckle-Mikroskops mit einem kommerziellen SIM-Mikroskop (*Elyra 7 lattice SIM; Zeiss*) betrachten wir die Pixelgröße eines solchen SIM-Systems. Das Elyra 7 System besitzt als Standard Objektiv ein 63x Öl-Immersion-Objektiv mit einer NA von 1,4. Bei einer Standardeinstellung ergibt sich eine Pixelgröße von 61,73 nm bei einer Vorvergrößerung von 1,6, wobei in der SIM-Mikroskopie im Gegensatz zur Lokalisationsmikroskopie, zu dem auch das Speckle-Mikroskop mit den entsprechende Algorithmen zählt, mit mehr Stützstellen gearbeitet werden muss [6]. Des Weiteren wird mit höheren Laserleistungen gearbeitet, um die reduzierten Photonendetektionen auszugleichen. Diese unterschiedliche Pixelgröße spielt eine entscheidende Rolle bei der Schwierigkeit, diese unterschiedlichen Verfahren zu kombinieren. Kann jedoch bei der Speckle-Mikroskopie mit denselben Pixelgrößen wie in der Lokalisationsmikroskopie gearbeitet werden, stellt das Speckle-Mikroskop die gewünschte Brücke zwischen den beiden Mikroskopieverfahren dar. Bei keiner Vorvergrößerung ergibt sich für dieses System eine Pixelgröße von 94,56 nm. Bei Betrachtung der in Kapitel 3.3.2 ermittelten Pixelgrößen ist aus den beschriebenen Betrachtungen die optimale Teleskopvergrößerung für das Speckle-Mikroskop ein Wert von 2,5x. Somit liegen die Pixelgrößen bei den hauptsächlich verwendeten 63x Objektiven annähernd bei 80 nm und es sollte zu einer optimalen Rekonstruktion und Photonenausbeute kommen. Nur bei dem 100x Objektiv könnte auf eine Vergrößerung verzichtet werden, um die Pixelgröße bei 127,5 nm zu belassen. Die bei einer 2,5-fachen Teleskopvergrößerung ermittelte Pixelgröße von 50,6 nm könnte bei schwachen Fluoreszenzsignalen zu einem schlechten SNR-Verhältnis führen oder eine Erhöhung der Laserleistung bedeuten [86].

Dies führt jedoch zu Limitierungen, wie ein schnelleres Ausbleichen der Farbstoffe oder die Überschreitung der Leistungsbelastung der organischen Probe [16]. Bei Betrachtung der Tabellen 2 und 3 können die eben getroffenen Aussagen bestätigt werden. Für alle 3 Laserwellenlängen wird die PSF auf ca. 3 Pixel abgebildet. Diese Pixelverteilung stellt in den meisten Fällen eine ausreichende Verteilung der PSF für eine subpixelgenaue Abtastung dar.

Der Strahlengang zur Speckleerzeugung ist in Abbildung 19 zu sehen. Das beschriebene Kepler-Teleskop dient der Vergrößerung der Laserstrahlquerschnitte, um die optimalen Specklegrößen zu erzeugen. Die Modenblende innerhalb des Kepler-Teleskops filtert störende Effekte höherer Transversalmoden (TEM; *engl. Transverse Electromagnetic Mode*, [81]) des Diodenlaserstrahlprofils heraus und verbessert das Strahlparameterprodukt. Durch das Auslöschen von Moden höherer Ordnung wird der Specklekontrast des Beleuchtungsfeldes verbessert [79]. Jedoch besitzt die Irisblende keine idealen Eigenschaften einer Lochmodenblende und filtert somit nicht alle höheren TEMs. Somit ist kein TEM<sub>00</sub>, was ein Gaußprofil bedeuten würde, möglich. Die Abstände der Achromaten im Kepler-Teleskop wurden so festgelegt, dass in einem Abstand von mehr als 3 m keine signifikante Veränderung des Strahldurchmessers beobachtet wurde. Somit kann von einem schwach divergenten Laserstrahl ausgegangen werden. Dies ist für die weitere Strahlformung durch das adaptive Linsensystem (Abbildung 19 III), bestehend aus A1 und A2, wichtig, da diese keine Divergenz des Laserstrahls ausgleichen müssen. Daher konnte mit einfacher geometrischer Optik für die Positionierung der Achromate und den daraus erzeugten Spotdurchmesser gerechnet werden. Auf Basis der Untersuchungen der Abhängigkeiten der Specklegröße von den in Kapitel 3.3.3 beschriebenen Parametern Spotgröße und Abstand von A3 zur Streuscheibe wurde die 2,5-fache Vergrößerung der Teleskop-Optik vor der EMCCD gewählt, da hier die besten Ergebnisse für eine Rekonstruktion zu erwarten waren. Da bei einer 1-fachen Vergrößerung die Strukturen auf eine zu geringe Anzahl von Pixeln abgebildet werden, führt dies zu einer Verschlechterung der Messergebnisse bezüglich der Specklegröße. Die 4-fache Vergrößerung hingegen verringert bei den benötigten niedrigen Laserleistungen den Kontrast der abgebildeten Speckle auf der EMCCD, der dann ebenfalls zu einer Verschlechterung der Messergebnisse bezüglich Specklegröße führen würde [86, 79]. Dies kann zwar durch höhere Laserleistungen korrigiert werden, jedoch besteht bei höheren Laserleistungen immer die Gefahr, dass höhere Moden anschwingen, welche nicht durch die Modenblende gefiltert werden und dadurch ebenfalls den Kontrast

verschlechtern und die Messergebnisse beeinflussen [81]. Somit wurde versucht, in jedem Experiment mit der optimal benötigten Lasereinstellung zu arbeiten. Das Ziel der Untersuchungen der Abhängigkeit der Specklegröße vom Abstand A3 des Achromaten A3 war es, die kleinstmögliche FWHM der Speckle zu erzielen, welche aber noch im Bereich der Auflösungsgrenze des optischen Systems liegen sollte. Zusätzlich zu den mittleren Specklegrößen wurden die Kontrastfunktionen des Specklefeldes betrachtet. Wie im Abschnitt 3.1 schon erläutert wurde, ist daraus die Anzahl der überlagerten Specklefelder ersichtlich [79]. Diese Auswerteschritte wurden für alle drei Laserwellenlängen durchgeführt, um am Ende eine gemeinsame optimale Position des Achromaten A3 für das Arbeiten mit allen drei Laserwellenlängen zu erhalten. Beginnend mit Laser 1 (Wellenlänge 515 nm) konnte die optimale Position des Achromaten A3 gefunden werden. Die entsprechenden Parameter sind in Abbildung 20 in Kapitel 3.3.3 dargestellt und beschrieben. Die dort präsentierten Ergebnisse zeigen, dass sich erst ab einem Abstand A3 des Achromaten A3 zur Streuscheibe von 75 mm die mittlere Specklegröße in x- und y-Richtung im Bereich der Auflösungsgrenzen von Abbe und Rayleigh befinden. Bei Betrachtung der Elliptizität in Abbildung 20c wäre der Abstand A3 des Achromaten A3 von der Streuscheibe von 85 mm der optimale Abstand für den Laser 1, da hier dieselben Specklegrößen in x- und y-Richtung vorliegen. Bei Betrachtung des Specklefeldes in Abbildung 20b (unteres Bild) fällt jedoch bezüglich eines Abstandes von 85 mm auf, dass es eine ungleichmäßige Intensitätsverteilung im Specklefeld gibt. Zusätzlich dazu ist an der Form der Speckle zu erkennen, dass keine optimale Abbildung der Beleuchtungsstruktur vorliegt. Wird hingegen das Specklefeld bei einem Abstand von 77 mm (siehe Abbildung 20b mittleres Bild) betrachtet, bei dem die Auflösungsgrenzen in beiden Richtungen erreicht werden, ist eine typische Speckleverteilung zu erkennen. Gleichzeitig ist die Abweichung von der Elliptizität bei 77 mm nur ca. 7%. Für kleine Abstände von 60 mm zur Streuscheibe (siehe Abbildung 20b oberes Bild) sind deutlich größere Speckle gerade in y-Richtung zu erkennen. Das Specklefeld bei diesem kleinen Abstand lässt eine Art Verschmierung der Speckle in y-Richtung vermuten. Ebenfalls sind in Abbildung 20b die zur Ermittlung der mittleren Specklegröße verwendeten Korrelationspeaks dargestellt. In diesen Korrelationspeaks sind sehr gut die Abweichungen von einer runden Form in x- und y-Richtung sichtbar. Gerade am Beispiel kleiner Abstände zur Streuscheibe ist eine deutliche Elliptizität anhand des Korrelationspeaks zu sehen. Werden zusätzlich noch die Kontrastfunktionen der Specklefelder betrachtet, aus denen, wie im Abschnitt 3.1 beschrieben, die Anzahl der überlagerten Specklefelder erkennbar ist, ist anzumerken, dass in allen Beispielen kein reines Specklefeld vorliegt. Bei Realisierung

von größeren Abständen deutet die Verschiebung der Kontrastfunktion auf die Überlagerung von maximal 2 Specklefeldern hin [79]. Dieses zweite Specklefeld kann durchaus durch Reflexionen von der Streuscheibe oder von anderen optischen Bauteilen innerhalb des Mikroskops hervorgerufen werden. Ein anderer Grund für das Auftreten besteht darin, dass es sich hierbei um die Speckle des Laserstrahls bzw. höherer TEMs handelt. Diese Speckle im Laserstrahl sind deutlich bei Betrachtung des Laserstrahls zu erkennen und auch für Diodenlaser durchaus typisch [81]. Bei kleinen Abständen  $A_3$  des Achromaten  $A_3$  von der Streuscheibe (60 mm) ist eine leicht stärkere Verschiebung der Kontrastfunktion nach rechts zu beobachten. Dies hat eine höhere Anzahl von überlagerten Specklefeldern als Ursache. In dieser Kontrastfunktion befinden sich maximal 3-4 Specklefelder [79]. Dieser Fakt kann aber auch eine Ursache für die Verschmierung des Specklefeldes in y-Richtung sein. Um die Auswahl der optimalen Beleuchtungsstruktur weiter zu vereinfachen, kann der Mittelwert der mittleren Specklegrößen in x- und y-Richtung ausgewertet werden. Dieser Mittelwert stellt die Gesamtheit der mittleren Specklegröße im vorliegenden Specklefeld dar. Der Verlauf ist in Abbildung 20c (schwarze Punkte) dargestellt. Wird nur der beschriebene Mittelwert betrachtet, so ist die allgemeine mittlere Specklegröße des Specklefeldes ab einem Abstand  $A_3$  von ca. 71 mm im Bereich der Auflösungsgrenzen und erreicht zwischen 76 mm und 77 mm ein Minimum. Somit wird für Laser 1 dieser Bereich als möglicher Arbeitsabstand festgelegt.

Als Nächstes wurde Laser 2 mit einer Wellenlänge von 465 nm mit den oben schon genannten Parametern getestet, um den Arbeitsabstand zu bestimmen. Wie in Kapitel 3.3.3 beschrieben, gibt es wie bei Laser 1 auch bei Laser 2 ein ähnliches Verhalten der mittleren Specklegröße in Abhängigkeit vom Abstand  $A_3$  des Achromaten  $A_3$  von der Streuscheibe. Die mittleren Specklegrößen in x- und y-Richtung nähern sich bei größer werdendem Abstand an, welches in der Elliptizität in Abbildung 21c sehr gut zu sehen ist. Bei einem Abstand  $A_3$  des Achromaten  $A_3$  von der Streuscheibe von 85 mm ist eine Verringerung der Elliptizität zu erkennen. Somit kommen allein aus dieser Betrachtung nur Bereiche zwischen 70 mm und 80 mm für Laser 2 als Arbeitsbereich in Betracht. Erst ab einem Abstand  $A_3$  von 74 mm sind geringe Abweichungen in x- und y-Richtung in der mittleren Specklegröße und eine Elliptizität größer 0,9 zu sehen. Somit wird der mögliche optimale Abstand  $A_3$  weiter eingegrenzt und muss über 74 mm liegen. Im Gegensatz zum Mittelwert der mittleren Specklegrößen bei Laser 1 kann in Abbildung 21c keine weitere Einschränkung über den Mittelwert erreicht werden, da dieser Mittelwert der mittleren Specklegröße im zuerst erwähnten Bereich von 70 mm bis 80 mm bei jedem Linsenabstand

immer in derselben Größenordnung liegt. Aus den Specklefeldern in Abbildung 21b ist eindeutig zu erkennen, dass ein Abstand größer 80 mm nicht sinnvoll wäre. Im Beispielbild (85 mm) sind viele Artefakte und zum Teil sehr flächige Beleuchtungsstrukturen zu erkennen, welche sich auch im Diagramm in Abbildung 21a widerspiegeln. Im Gegensatz zu Laser 1 sind für Laser 2 bei kleinen Abständen keine direkt sichtbaren Verschmierungen in y-Richtung sichtbar. Die leichten Unterschiede sind nur im Korrelations-Peak selbst für diesen kleinen Abstand gegeben. Die dargestellten Kontrastfunktionen unterscheiden sich anders als bei Laser 1 ebenfalls nicht. Daraus ist die Schlussfolgerung zu ziehen, dass bei genauer Betrachtung aller Kontrastfunktionen nur eine Überlagerung von zwei Specklefeldern innerhalb der Beleuchtungsstruktur existiert [79]. Dieses zweite Specklefeld kann, wie oben schon beschrieben, mehrere Ursachen haben. Analog zu Laser 1 sieht auch das Beispiel-Specklefeld bei einem Abstand  $A_3$  von 77 mm sehr gut aus. Bei Betrachtung des Korrelationspeak (Abbildung 21b, mittleres Bild) sind kaum Unterschiede in x- und y-Richtung der mittleren Specklegröße zu beobachten. Dieser ist in dem oben erwähnten Bereich des Abstandes  $A_3$  von mehr als 74 mm bis ca. 80 mm identisch (gezeigtes Beispiel bei 77 mm). Somit kann für diese Wellenlänge kein komplett eingeschränkter Bereich für den Abstand  $A_3$  des Achromaten  $A_3$  benannt werden.

Als Letztes wurde analog zu Laser 1 und Laser 2 die Abhängigkeit der Specklegröße vom Abstand  $A_3$  des Achromaten  $A_3$  zur Streuscheibe für Laser 3 untersucht. Hierbei ist ein ähnliches Verhalten wie bei Laser 2 zu beobachten. Jedoch wird in y-Richtung die Auflösungsgrenze nie erreicht. Bei Betrachtung der Zusammenhänge (Abbildung 22c) des Mittelwertes der mittleren Specklegröße für beide Richtungen kommt für diese Laserwellenlänge nur der Positionierungsbereich von 77 mm bis 79 mm als Arbeitsbereich in Betracht. In diesem Bereich liegt der Mittelwert der mittleren Specklegröße im Bereich der Auflösungsgrenze. Wird nun die Elliptizität des Korrelationspeak aus Abbildung 22c (rote Punkte) mit dem gerade beschriebenen Bereich verglichen, so wird der optimale Bereich für diese Laserwellenlänge noch einmal verkleinert. Dies liegt daran, dass die Elliptizität erst ab einem Abstand von 78 mm auf ca. 0,9 steigt. Somit ist der Bereich für Laser 3 zwischen 78 mm und 79 mm optimal. Werden in diese Betrachtungen nun noch die Specklefelder sowie die Kontrastfunktionen und Korrelationspeak aus Abbildung 22b einbezogen, wird der gerade beschriebene Bereich bestätigt. Bei einem kurzen Abstand von 60 mm (Abbildung 22b, oberes Bild) ist eine Verschmierung des Specklefeldes in y-Richtung deutlich zu erkennen, welche ebenfalls in dem Korrelations-Peak sichtbar wird. Außerdem weist die Kontrastfunktion eine starke Rechtsverschiebung auf, die wie bei La-

ser 1 auf eine Überlagerung von mindestens drei Specklefeldern hindeutet und auch die Verschmierung erklären könnte [79]. Bei der Betrachtung der Specklefelder und ihrer Eigenschaften bei größeren Abständen ab 77 mm ist zu erkennen, dass hier eine deutlich bessere Elliptizität des Korrelationspeak vorliegt. Aus den Kontrastfunktionen ist ersichtlich, dass eine Überlagerung von nur zwei Specklefeldern vorliegt [79], wobei die Gründe schon für die beiden beschriebenen Laserwellenlängen diskutiert wurden.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass für eine optimale Beleuchtungsstruktur für alle drei Laserwellenlängen ein eher größerer Abstand A3 des Achromaten A3 von der Streuscheibe notwendig ist. Hierbei spielt Laser 2 eine untergeordnete Rolle, da bei dieser Wellenlänge der größte nutzbare Abstandsbereich von 74 mm bis 80 mm ermittelt wurde. Der optimale Abstand für Laser 1 wurde zwischen 76 mm und 77 mm und für Laser 3 zwischen 78 mm und 79 mm erzielt. Somit liegt keine eindeutige Überschneidung der Abstandsbereiche vor. Jedoch kann der Positionierungsbereich der Linse für die Laserwellenlänge 405 nm (Laser 3) auf einen Abstand von 77 mm reduziert werden. Dies ist unter der Voraussetzung, dass die Elliptizität der mittleren Specklegröße als schwächere Optimierungsbedingung angenommen wird, möglich. Unter dieser Annahme wurde der Achromat A3 auf einen Abstand von 77 mm von der Streuscheibe platziert und erzeugt die im Mittel optimalen Beleuchtungsstrukturen für alle Laserwellenlängen.

Nach der Festlegung des Abstandes A3 des Achromaten A3 von der Streuscheibe wurde die Abhängigkeit der mittleren Specklegröße vom Beleuchtungspottdurchmesser untersucht. Das Verhalten der mittleren Specklegröße in x- und y-Richtung ähnelt bei Variation des Beleuchtungspottdurchmessers den vorher ermittelten Abhängigkeiten bei Variation des Abstandes A3 des Achromaten A3 von der Streuscheibe. Aus diesen beiden Ergebnissen kann als Rückschluss gesagt werden, dass im Strahlengang eine Blende vorhanden sein muss, welche die y-Richtung beschneidet. Vermutlich ist diese Blende der verwendete Einkoppel-Strahlteiler am Mikroskopgrundkörpereingang. Dieser kann jedoch im jetzigen Aufbau nicht verändert werden und stellt für zukünftige Veränderungen ein Verbesserungspotenzial dar. Aus der Evaluierung von x- und y-Richtung ist ein Beleuchtungspottdurchmesser von ca. 8 mm optimal, um so mittlere Specklegrößen in beiden Dimensionen innerhalb des markierten Toleranzbereiches zu erzeugen. Diese Festlegung wird bei Betrachtung des Mittelwertes der beiden mittleren Specklegrößen in Abbildung 23c noch einmal untermauert. Die ermittelten 8 mm stellen eine Grenze dar, bei der der Mittelwert für alle Laser im gewünschten Bereich der mittleren Specklegrößen liegt. Es ist aber auch möglich, falls der Beleuchtungspottdurchmesser zu groß ist und somit zu viel Leis-



tung verloren geht, den Spot auf bis zu 6 mm Durchmesser zu reduzieren, da bei dieser Beleuchtungspotgröße nur Laser 3 leicht außerhalb des gewünschten Bereiches liegt. Bei diesem Beleuchtungspotdurchmesser ist jedoch zu berücksichtigen, dass die Elliptizität in Abbildung 23d von Laser 1 und Laser 2 bei ca. 0,8 liegt und von Laser 3 deutlich unter 0,8. Somit liegen die Elliptizitätswerte aller Laser bei einem Beleuchtungspotdurchmesser von 6 mm deutlich unter denen für 8 mm. Auf Basis dieser Überlegungen wird letztendlich in den nachfolgenden Experimenten der Beleuchtungspotdurchmesser auf 8 mm über die Achromate A1 und A2 eingestellt. Es ist aber möglich, diesen Durchmesser leicht zu verändern und anzupassen, falls eine höhere Leistung bzw. Intensität auf der Probe benötigt wird.

Die Bestimmung der Specklebewegungen mit einer direkten Aufhängung des Getriebemotors auf der Drehachse der Streuscheibe ist in Kapitel 3.3.4 in Abbildung 25a dargestellt. Der Fakt, dass sich die vektorielle Specklebewegung hauptsächlich aus Komponenten in x-Richtung zusammensetzt, ist der Justage der Streuscheibe geschuldet, da die Beleuchtung der Streuscheibe genau in der horizontalen Ebene erfolgt. Somit setzt sich die in Abbildung 25a beobachtete vektorielle Bewegung des Specklefeldes hauptsächlich aus den x-Komponenten zusammen. In Kapitel 3.3.4 wird beschrieben, dass bei kleinen Spannungen erst bei längeren Drehzeiten eine Specklebewegung auftritt. Dieser Spannungsbereich ist zwar ideal für die Ansteuerung des Getriebemotors, da es hier zu weniger Ansteuerungsartefakten kommen kann, aber durch die langen Drehzeiten eher uninteressant für den Betrieb des Speckle-Mikroskops. Wie in Kapitel 3.3.4 beschrieben wird, kann schon ab einer Spannung am Getriebemotor von 7,5 V eine sichtbare Specklebewegung bei 1 ms Rotationszeit beobachtet werden. Wird die Spannung jedoch weiter erhöht, kommt es schnell zu einer kompletten Specklefeldänderung. Diese relativ scharfe Kante zwischen keiner und kompletter Bewegung ist der direkten Übersetzung des Getriebemotors auf die Rotationsachse der Streuscheibe geschuldet. Durch diesen direkten Antrieb kann das Drehmoment des Getriebemotors ohne mechanisches Spiel auf die Drehachse der Streuscheibe übertragen werden. Somit sind nur noch Ansteuerungsfehler des Getriebemotors bei kurzen Drehzeiten zu beachten. Durch die kompletten Specklebewegungen, welche in Abbildung 25b zu sehen sind, kann auf eine stochastische Verteilung der Speckle in einer Bildreihe geschlossen werden. Dies kann zu einer Reduktion der zur Auswertung benötigten Bilder führen, da statistisch gesehen früher eine homogene Ausleuchtung des gesamten Objekt-raumes erreicht wird [87]. Dies war bei Haltesystemen über eine Zahnradübersetzung nicht



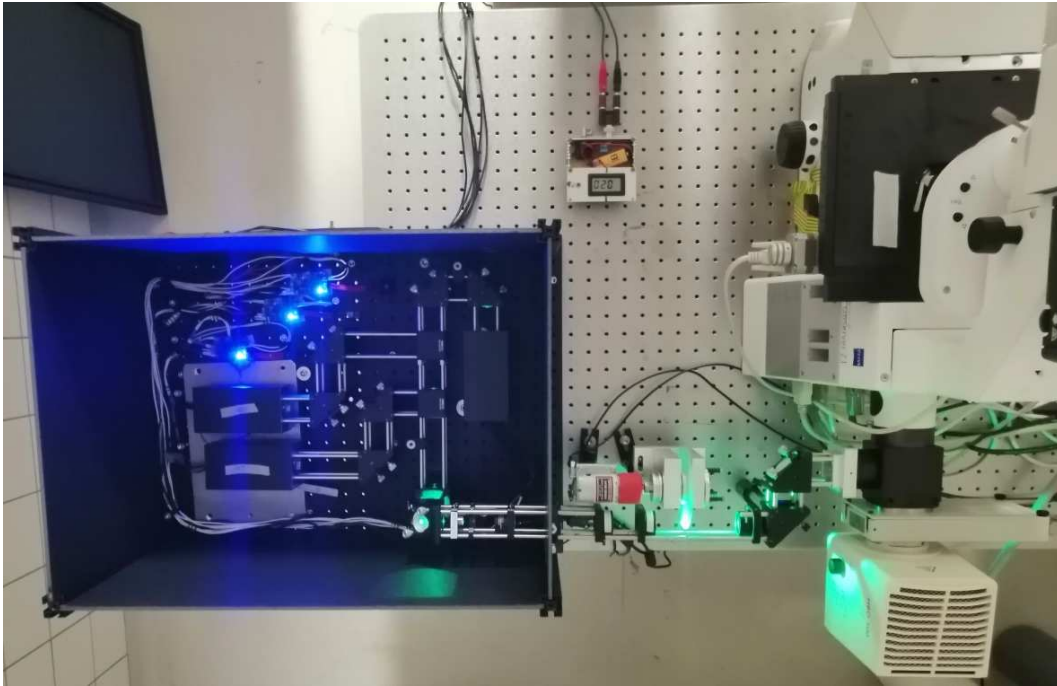
der Fall. Weiterhin ist es möglich, mit dieser Aufhängung unterhalb von 1 ms Rotationszeit zu arbeiten. Dies ist in Kapitel 3.3.4 in Abbildung 26 zu sehen. Jedoch waren bei diesen sehr kurzen Betriebszeiten auch deutlich vermehrte Ansteuerungsausfälle des Getriebemotors zu beobachten. Da es sich hierbei um einen einfachen Getriebemotor handelt, welcher nicht für diese kurzen Ansteuerungszeiten konzipiert wurde, waren diese Effekte zu erwarten. Auf Grundlage der gesamten Untersuchungen ist es jedoch möglich, zu noch kürzeren Rotationszeiten zu wechseln, wenn der Getriebemotor verändert wird.

Bei der Bestimmung der Ruhezeit  $t_{\text{ruh}}$  in Kapitel 3.3.5 ist für große Spannungen (12 V und 11 V) und Ruhezeiten unter 30 ms bei dem dort verwendeten Streuscheibenantrieb eine Verschmierung des Specklefeldes und somit eine Reduktion des Kontrastes zu erkennen. Dieses Ergebnis ist durch die hohen Spannungen und die zu kurzen Ruhezeiten zu erklären, da diese Zeiten nicht ausreichen, um das System zum Stillstand zu bringen. Somit existiert immer noch eine kleine Bewegung im System. Weiterhin ist neben dem mechanischen Spiel die Ansteuerzeit des verwendeten Getriebemotors für kurze Ruhezeiten eine Ursache für die Verschmierung. Bei einer kleineren Spannung ist kein starker Abfall des Kontrastes zu erkennen, jedoch treten dort relativ starke Schwankungen auf, was durchaus an der Ansteuerung des Getriebemotors liegen kann. Das Arbeiten im angegebenen Toleranzbereich (grüner Bereich) kann somit ab einer Aufnahmezykluszeit von 50 ms, also einer Ruhezeit von 45 ms, sichergestellt werden. Dennoch sind die Kontrastwerte bei 20 ms Aufnahmezykluszeit und einer Ruhezeit von 15 ms ebenfalls noch akzeptabel. In späteren Experimenten wird die längere Aufnahmezykluszeit verwendet, um die bestmögliche Beleuchtungsstruktur zu realisieren.

Die Überprüfung der für optimal befundenen Parameter für das 63x Wasser-Immersions-Objektiv ist insbesondere wichtig, da es sich hierbei um ein Objektiv mit höherer Numerischer Apertur handelt. Durch die Verwendung solcher Objektive kann es zu störenden polarisationsabhängigen Effekten kommen [88, 89]. Diese führen zu einer verschlechterten Auflösung und somit zu größeren Strukturen. Für die Darstellung kleinster Strukturen ist aber immer eine hohe NA von Vorteil [1, 4] und somit die Untersuchung dieser Effekte notwendig. Durch Veränderungen der in Abbildung 19 zu sehenden und in Kapitel 3.3.3 beschriebenen Achromate A1 bis A3 wurde versucht, die in Kapitel 3.3.6 beschriebenen Ergebnisse für die Vergleichsbetrachtung der beiden Objektive zu korrigieren bzw. zu optimieren. Jedoch wurde für keinen der verwendeten Laser eine optimale Position

gefunden, ohne den Justieraufwand bei einem möglichen Objektivwechsel zu vergrößern. Da zu einem späteren Zeitpunkt der primäre Einsatzbereich des Speckle-Mikroskops in erster Linie der Nachweis von Plastizitätsänderungen in vitalen Neuronen sein und die Kombination mit elektrophysiologischen Methoden angestrebt wird, kommen nur die in Kapitel 3.2.1 beschriebenen Membranfarbstoffe, die mit Laser 1 (Wellenlänge 520 nm) angeregt werden können, zum Einsatz. Hierfür wird das 63x Luft-Objektiv verwendet, weshalb die optimale Position der einzelnen Achromate belassen werden kann, die für das 63x Wasser-Objektiv ermittelt wurde. Die damit verbundene verstärkte Zunahme der Elliptizität in Abhängigkeit von der Wellenlänge kann auch auf Aberrationen im zusätzlichen Detektionsweg (Probe zu Kamera) basieren. Da es keine Möglichkeit gab, ein CCD-Chip direkt in die Objektebene zu platzieren, konnte diese Vermutung nicht überprüft werden. Ein weiterer Grund für die Vergrößerung der mittleren Speckleausdehnung gegenüber dem Grenzwert kann die Nutzung von Objektiven mit hohen Numerischen Aperturen ( $NA = 1,2$ ) und das Arbeiten mit linear polarisiertem Licht sein. Aufgrund eines eventuellen polarisationsbasierten Effektes wird in Zukunft angestrebt, mit azimuthaler Polarisation zu arbeiten [88, 90], um den Polarisierungseffekt von Objektiven mit hoher NA zu minimieren [88, 89]. Bei der Überprüfung der Aufnahmezykluszeit wurden die in Kapitel 3.3.6 beschriebenen Ergebnisse erzielt. Durch diese Ergebnisse ist eine Ruhezeit von 35 ms bei einem 63x Wasser-Immersions-Objektiv die minimale Ruhezeit für die Bewegung der Streuscheibe. Die Ruhezeiten für beide Objektive liegen in derselben Größenordnung von ca. 40 ms. Mit diesen Untersuchungen ist das neu aufgebaute Speckle-Mikroskop mit zwei unterschiedlichen Objektiven und drei unterschiedlichen Laserwellenlängen für die Erzeugung höchst aufgelöster Bilder charakterisiert und einsatzbereit. In Abbildung 33 ist das fertige System zu sehen.

Zur Auswertung der Bilder wurde der M-SBL Algorithmus, welcher zur Berechnung hoch aufgelöster Bilder mittels stochastischer Anregung verwendet werden kann, aus in der Literatur bekannten Algorithmen [12, 13] ausgewählt. Mit diesem Algorithmus wurde in der Literatur die beste Strukturauflösung [83, 13] erzielt. Auf Abbildung 28 ist gut zu erkennen, dass bei weniger als 100 Bildern insbesondere eine flächige Struktur, wie ein dendritisches Netzwerk (untere Reihe), nicht vollständig rekonstruiert werden kann. Erst ab 100 Bildern ist die Struktur gefüllt und kann als eine Fläche erkannt werden. Die Rekonstruktion einer Punktstruktur ist aber schon nach wenigen Bildern (ab 20 Bildern) möglich. In beiden Fällen sieht man im Vergleich zu dem dazugehörigen EPI-Fluoreszenzbild (links)



**Abbildung 33:** Fotografie des Speckle-Mikroskops mit Lasermodul und Spannungsquelle (links), Streuscheibenaufbau (mittig, grüner Spot) und Mikroskopgrundkörper (rechts).

eine sehr gute Übereinstimmung der Strukturen. Des Weiteren wurden die hochaufgelösten Bilder mit der System-PSF überlagert und mit den EPI-Fluoreszenzbildern korreliert. Dies ergab für alle Bilder eine sehr gute Übereinstimmung von über 90 %. Somit kann von einer erfolgreichen und genauen Rekonstruktion durch den Algorithmus auch bei unbekanntem Strukturen ausgegangen werden. Diese Messreihen vervollständigen die Voruntersuchungen zur Nutzung des Mikroskops für die Aufnahme hochaufgelöster Bilder. Für die Bestimmung des exakten Auflösungsvermögens dieses entwickelten Mikroskops wären spezielle Testcharts notwendig gewesen, die aber im Rahmen dieser Arbeit nicht zur Verfügung standen. Trotzdem konnte die Größenordnung für eine verbesserte Auflösung durch dieses System über QDot- und dendritische-Strukturen (Abbildung 29) und über Fluoreszenz-Testcharts (Abbildung 30) bestimmt werden. Die in Abbildung 29 dargestellten Bilder wurden mit dem 63x Wasser-Immersion-Objektiv mit einer NA von 1,2 aufgenommen. Daraus ergibt sich eine Auflösungsgrenze von ungefähr 300 nm für den Spektralbereich der Fluoreszenz, wobei dies nur unter idealen Bedingungen der Fall ist und nicht die im System vorhandenen Aberrationen berücksichtigt [91, 92]. Dies ist speziell an den QDot Bildern zu erkennen. Man kann insgesamt aber davon ausgehen, dass die Auflösung durch das Speckle-Mikroskop und den M-SBL Algorithmus wie bei Standard SIM-Verfahren um etwa das Doppelte verbessert werden kann. Dies scheint jedoch nicht die maximal erreich-

bare untere Auflösungsgrenze der Bilder zu sein. Laut Literatur ist eine Verbesserung auf ein Drittel der regulären Auflösung [83, 13] durch den M-SBL Algorithmus möglich. Dies kann jedoch auf Grund der Beschaffenheit der vorhandenen Teststrukturen in den vorliegenden Aufnahmen nicht bestätigt bzw. nachvollzogen werden. Aus diesem Grund wurde, wie in Kapitel 3.3.7 beschrieben, eine Fluoreszenz-Teststruktur mittels Elektronenstrahl-lithografie geschrieben. Leider ist auch mit diesen Testcharts eine exakte Bestimmung der Auflösungsgrenze nicht möglich, da bei der Herstellung der Mikrostrukturen Strukturierungsprobleme aufgetreten sind, was in den Raster-Elektron-Mikroskop Aufnahmen zu sehen ist. Aus diesem Grund konnte auch die Strukturierung eines Siemenssterns nicht erfolgen, mit dessen Hilfe die Auflösungsgrenze exakt erfassbar gewesen wäre [83, 12]. Trotzdem wurde mit dem Luft-Objektiv, wie in Abbildung 30 (rechte Seite) zu sehen ist, eine zufriedenstellende Rekonstruktion realisiert. Die Auflösungsgrenze des Objektivs in Kombination mit dem Fluoreszenz-Lack liegt bei ca. 500 nm. Die kleinsten noch auflösba- ren Strukturen haben eine Größe von ca. 200 nm. Somit kann auch hier bestätigt werden, dass die Auflösung wie beim Standard-SIM Verfahren [6] mindestens auf die Hälfte redu- ziert werden kann. Das Ziel, die Etablierung eines funktionsfähigen Speckle-Mikroskopes, wurde erreicht. Die genaue Ermittlung der maximal erreichbaren Auflösung ist noch aus- stehend und wird weiter vorangetrieben.

Zum Abschluss dieses Kapitels soll ein Vergleich der im Labor der Sektion für Transla- tionale Neuroimmunologie vorhandenen höchstauffösenden Mikroskopiesysteme erfolgen. Das Elyra P.1 System sowie das neu aufgebaute Speckle-Mikroskopie System weisen unter- schiedliche Vor- und Nachteile auf. Diese ergeben sich aus den jeweils zugrundeliegenden Verfahrenstechniken. Durch diese Unterschiede können sich diese Systeme exzellent ergän- zen und zum Beispiel neue Untersuchungsmöglichkeiten bei bestimmten Fragestellungen ermöglichen.

Ein Vorteil des Elyra P.1 Systems von Zeiss ergibt sich vor allem aus der hohen Auflösung der lokalisationsbasierten höchstauffösenden Mikroskopie (*d*STORM, STORM, **P**hoto- **a**ktiviert **L**okalisations**m**ikroskopie (**PALM**)) von Strukturen im Bereich von 50 nm [51, 55]. Somit ist es möglich, kleinste Strukturen, wie Rezeptor-Cluster, zu analysieren, wie es in Kapitel 2 gezeigt wurde. Jedoch liegt die Aufnahmezeit für ein hochaufgelöstes Bild im Rahmen mehrerer Minuten [51]. Dagegen sind mit dem Speckle-Mikroskop mit Auf- nahmezeiten unter 20 Sekunden deutlich schnellere Bildakquisen hochaufgelöster Bilder möglich. Die Bildaufnahme liegt jedoch zurzeit mit dem Speckle-Mikroskop in der Grö-

Benennung der normalen SIM-Mikroskopie (Elyra 7; Kapitel 3.2.5) [6]. Das bedeutet, dass die Auflösung nicht geeignet ist, um Rezeptor-Cluster zu analysieren. Jedoch findet die Stärke des Speckle-Systems Anwendung im Bereich von größeren Strukturen, wie der Morphologie synaptischer Dornfortsätze oder bei der zeitlichen Aufnahme von Änderungen der synaptischen Strukturen. Gerade diese morphologischen Änderungen sind durch die Lokalisations-Mikroskopie erschwert darzustellen, da einerseits die Aufnahmen zeitlich zu ausgedehnt sind, um schnelle Änderungen zu detektieren, und andererseits durch die Verwendung von speziellen Imaging-Puffern eine Toxizität für die Zellen gegeben ist [19]. Einzig die PALM-Methode wäre ohne Imaging-Puffer möglich, benötigt aber photoveränderbare Proteine, die in die jeweiligen Zellen integriert werden müssen. Somit wäre dort eine kompliziertere Vorbehandlung notwendig [55].

Damit ergeben sich für die beiden Mikroskoptypen Einsatzgebiete, die nach der spezifischen Fragestellung getrennt sind. Deshalb stellt das Speckle-Mikroskop auch eine Erweiterung der Aufnahmemöglichkeiten dar und wird vor allem im Bereich der Lebendzelluntersuchung deutliche Vorteile bringen. Als Konkurrenzsystem zum Speckle-Mikroskop ist das Elyra 7 lattice SIM System der Firma Zeiss zu betrachten. In Abbildung 31 sind Aufnahmen mit allen drei Systemen zu sehen. In den Bildern sind insbesondere bei den neuronalen Strukturen die Vorteile der Strukturierten Beleuchtungsmikroskope im Bereich der schnellen Bildaufnahme und der detaillierten Rekonstruktion zu erkennen. Die Aufnahmezeit im Bild der neuronalen Struktur, welches mit dem Elyra P.1 System aufgenommen wurde, wurde unter eine Minute reduziert. Mit einer Belichtungszeit von 25 ms konnten so 1000 Einzelbilder aufgenommen werden. Die geringe Bildanzahl realisierte aber keine vollständige Rekonstruktion der Struktur, wie auch in Abbildung 31 zu sehen ist. Da der Membranfarbstoff DIL bei den benötigten Laserleistungen für *d*STORM schnell ausbleicht und damit eine höhere Bildanzahl nicht möglich macht, konnte die Bildanzahl auch nicht erhöht werden. Dagegen ist die Struktur mittels Speckle-Mikroskop mit nur 300 Bildern und Elyra 7 lattice SIM mit 15 Phasenbildern in Abbildung 31 sehr gut rekonstruiert. Die Laserintensität des Speckle-Mikroskops und des Elyra 7 Systems war jedoch auch niedrig genug, um mehrere 1000 Bilder selbst mit dem schnell ausbleichenden DIL Farbstoff durchzuführen. Jedoch musste bei dem Farbstoff und der geringen Laserleistung eine lange Belichtungszeit von 150 ms am Elyra 7 System eingestellt werden. Somit ist die geringe Bildanzahl von 15 Phasen nahezu aufgebraucht. Weiterhin ist eine deutlich detailreichere Rekonstruktion der neuronalen Strukturen bei Verwendung des Speckle-Mikroskops zu erkennen. Es ist weiterhin festzustellen, dass die Bildanzahl bei einem Speckle-Mikroskop

deutlich reduziert werden kann, wenn mit definierten Specklefeldern das Bild abgetastet werden kann [11]. Wenn die Auflösung dabei gleich bleibt, verliert das Elyra 7 System auch den Zeitvorteil gegenüber dem simplen Speckle-Mikroskop. Diese Reduktion soll als nächster Schritt folgen. Weiterhin besteht die Optimierung auch in der Verbesserung der Auflösung des Speckle-Mikroskops, welches im nachfolgenden Kapitel 4 näher beschrieben wird.

## 4 Flächenreduktion von effektiven Beleuchtungsmustern im Konzeptsystem

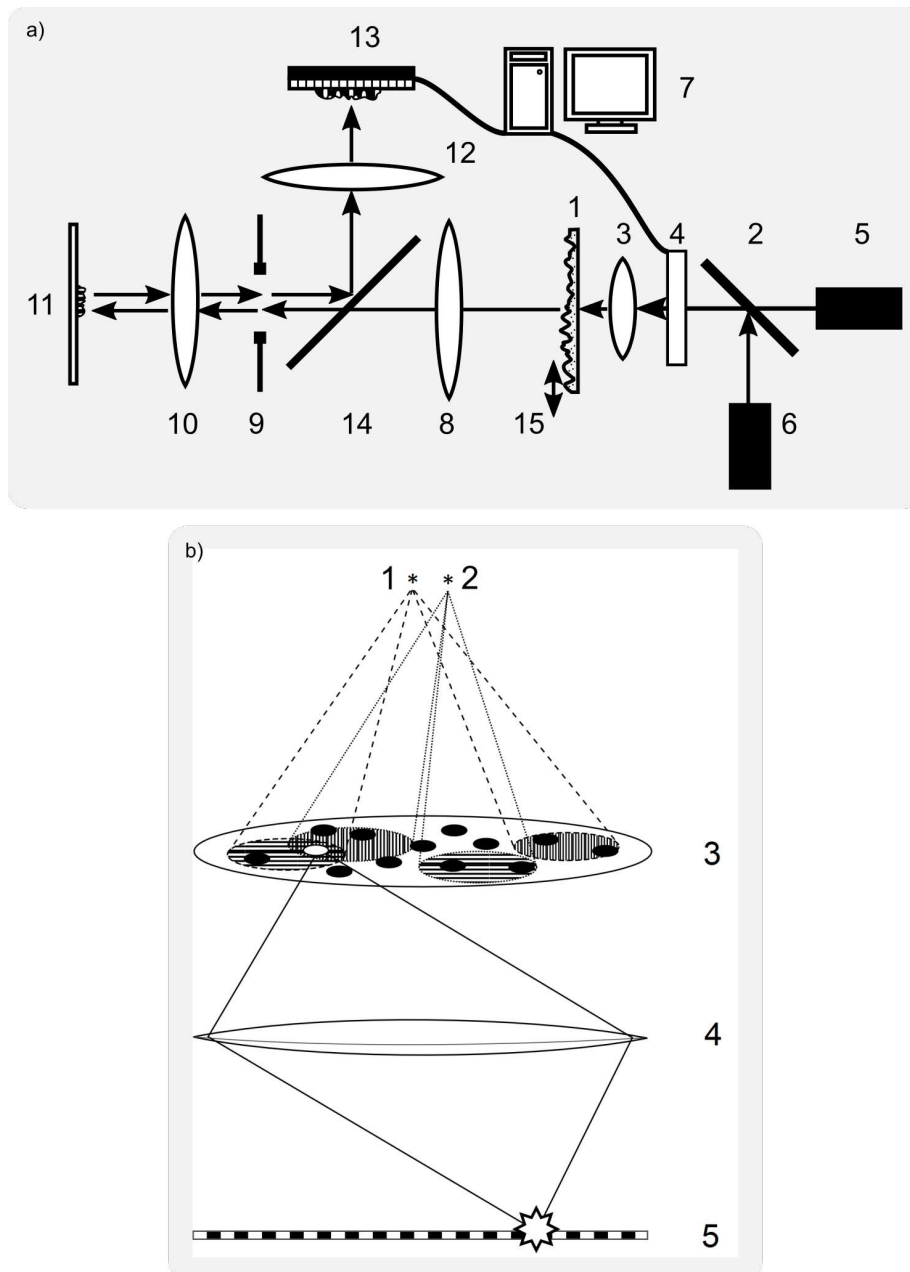
### 4.1 Einleitung

In den letzten Jahren sind zahlreiche Verfahren entwickelt worden, die das Auflösungskriterium [4] umgehen und somit Bilder von kleinsten Strukturen im Auflösungsbereich weniger Nanometer aufnehmen können. Dies ist in der medizinischen oder biologischen Forschung von großer Bedeutung. Bei den so entwickelten Mikroskopen spricht man von der höchstauflösenden Mikroskopie oder englisch: *super-resolution microscopy* (SRM). Wichtige Vertreter sind die Mikroskope, welche auf dem Prinzip der strukturierten Beleuchtung (SIM) [14, 75, 73] oder auf dem Prinzip der STED Mikroskopie [5] basieren und so die Auflösungsgrenze überwinden. Weiterhin zählen die lokalisationsbasierten Methoden, wie die PALM [93, 94] oder die STORM Mikroskopie [17] oder die *d*STORM Mikroskopie [95, 96], zu den weitverbreiteten Methoden der höchst aufgelösten Mikroskopie [62].

Die hier aufgezählten Verfahren bzw. Methoden lassen sich in zwei Gruppen unterteilen. Die erste Gruppe umfasst alle Verfahren, welche durch eine optisch strukturierte Anregung die Auflösungsgrenze überwinden. Hierzu zählen sowohl die Mikroskope basierend auf dem Prinzip von SIM als auch auf dem von STED. Die zweite Gruppe umfasst alle Verfahren, welche lokalisationsbasiert arbeiten. Dazu zählen die Verfahren wie PALM, STORM und *d*STORM.

Im Bereich der lokalisationsbasierten Verfahren wurden in den letzten Jahren verschiedene neue Techniken wie die FRET-PAINT Mikroskopie [97] etabliert. Im Bereich der strukturierten Beleuchtungsmikroskopie entwickelte sich die neue MinFlux Technik [98], welche eine Auflösung von bis zu 1 nm verspricht. Das im Rahmen dieser Arbeit eingereichte Patent [21] ist ebenfalls im Bereich der strukturierten Beleuchtungsmikroskopie angesiedelt. Es basiert auf der Idee, zur Beleuchtung der Probe mehrere Speckle-Felder (Beleuchtungsstrukturen) zu verwenden, welche entweder aus denselben oder aus unterschiedlichen Interferenzstrukturen mit derselben und / oder unterschiedlichen Wellenlänge bestehen. Durch zusätzliche Anwendung von unterschiedlichen physikalischen Absorptions-, Emissions- und / oder Schalteffekten wird die Beugungsbegrenzung des effektiven Speckle-Feldes überwunden. Damit zählt das Konzept zu der Gruppe der strukturierten Beleuchtungsmikroskope. In Abbildung 34a ist ein schematischer Aufbau und in Abbildung 34b die





**Abbildung 34:** a) Schematischer Aufbau des nach [21] beschriebenen Mikroskopkonzeptes zur Reduzierung der mittleren Größe des effektiven Speckle-Feldes. Die wichtigsten Komponenten dieses Aufbaus sind: (1) Streuscheibe; (2) Strahlkombiner; (3), (8) und (12) Linsen; (4) Shutter; (5) und (6) Laser; (7) Computer; (9) Hintere Fokusebene des Objektivs; (10) Objektiv; (11) Probe; (13) Detektor; (14) Filter-Würfel des Mikroskops; (15) Bewegungsvorrichtung für die Streuscheibe. b) Schematische Darstellung der Erzeugung einer verkleinerten effektiven Beleuchtungsstruktur durch Überlagerung zweier Speckle-Felder (horizontal und vertikal schraffiert) aus unterschiedlichen Quellen (1) und (2) in der Objektebene (3). Das effektive Beleuchtungsmuster entsteht nur im Bereich der Überlagerung der unterschiedlich schraffierten Speckle-Felder. Nur im überlagerten Bereich werden die Fluorophore (weißer Punkt) angeregt und durch eine Optik (4) auf einen Flächendetektor (5) abgebildet.



Idee zur Reduzierung der mittleren Größe des effektiven Speckle-Feldes dargestellt. Durch die Überlagerung des horizontal und vertikal schraffierten Beleuchtungsmusters entsteht der effektive Bereich, so dass nur eine geringe Anzahl an Leuchtmitteln (weißer Punkt) eine Fluoreszenzantwort gibt und somit zu einem Nachweis führt. Auf diese Weise ist es möglich, die Auflösung im rekonstruierten Bild zu erhöhen. Wie in der PALM-Technologie [99] kann man zum Beispiel reversible schaltbare Fluorophore oder Fluoreszenz-Proteine verwenden. Durch Nutzung von zwei unterschiedlichen Laserwellenlängen, wobei eine der Aktivierung oder Deaktivierung der Leuchtmittel dient und eine andere zur Anregung, wäre es möglich, eine, wie in Abbildung 34b erkennbar, verkleinerte effektive Beleuchtungsstruktur zu erzeugen. Weiterhin sind verschiedene nutzbare Sättigungseffekte, wie sie zum Beispiel in der STED-Mikroskopie [100] eingesetzt werden, denkbar. Einige solcher ausgearbeiteten Hypothesen werden in den Kapiteln 4.3.1 bis 4.3.3 näher erläutert.

Durch die Kombination der verschiedenen Effekte und der Überlagerung der Beleuchtungsmuster kann im Bereich der Weitfeldmikroskopie ein wichtiger Schritt zu besseren Auflösungen im Bereich der Lebendzellanalyse gegangen werden, da die hier gezeigten Kombinationen die Stärken der Weitfeldmikroskopie mit den Stärken der Punktbeleuchtungsmethoden verbinden. Dadurch können größere Objektfelder in kürzeren Zeiten höchstauflösend dargestellt werden.

## 4.2 Methoden

### 4.2.1 Übertragung der 2-Photonenabsorption-Mikroskopie auf das Konzeptsystem

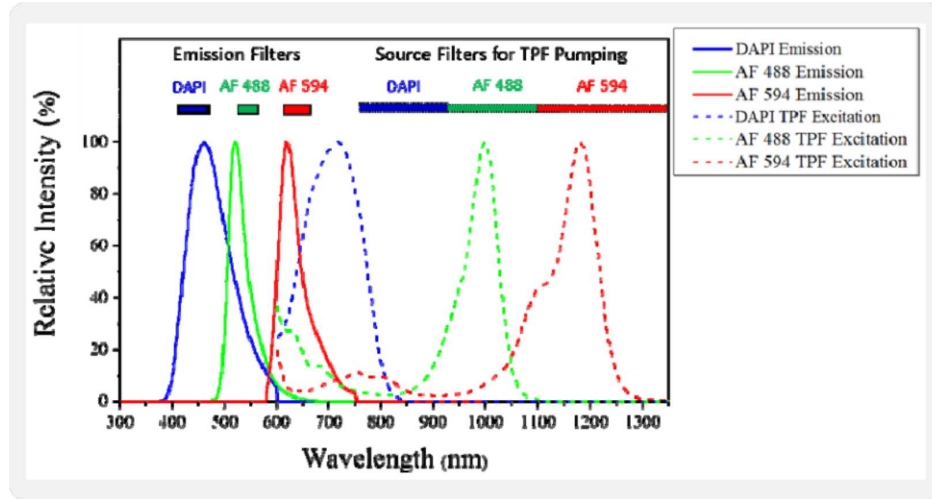
In dieser Arbeit wurde ein 2-Photonen Laserscanning Mikroskop LSM 710 der Firma Zeiss mit einem Ultrakurzpuls-Ti:Saphire (Ti:Sa)-Lasersystem (Chameleon Ultra, Coherent Inc., USA) eingesetzt und ist in Abbildung 35 zu sehen. Somit können Wellenlängen im roten bzw. nahem infraroten (NIR) Bereich abgedeckt und eine 2-Photonen Anregung für viele Farbstoffe realisiert werden. Der Ti:Sa Laser emittiert Licht im Bereich von 680 nm bis 1080 nm. Des Weiteren kann der Ti:Sa Laser durch einen nichtlinearen Kristall (einachsiger BBO-Kristall) frequenzverdoppelt (SHG; engl. *second harmonic generation*) werden und somit den sichtbaren Anregungsbereich (1-Photonen-Anregung) der Farbstoffe abdecken. Sowohl die Grundwellenlängen als auch die Harmonischen werden in den typischen LSM Strahlengang eingekoppelt. Des Weiteren ist noch ein Argon-



**Abbildung 35:** Foto des 2-Photonen-Mikroskops LSM 710 der Firma Zeiss. Im Hintergrund ist das Ultrakurzpuls-Ti:Saphire (Ti:Sa)-Lasersystem (Chameleon Ultra, Coherent Inc., USA) zu sehen (Laser). Des Weiteren ist der Strahlengang auf dem optischen Tisch bis zum Mikroskop abgebildet. Das Mikroskop selbst befindet sich im Vordergrund unter der schwarzen Abdeckung, welche die empfindlichen SEVs vor Raumlicht schützen soll.

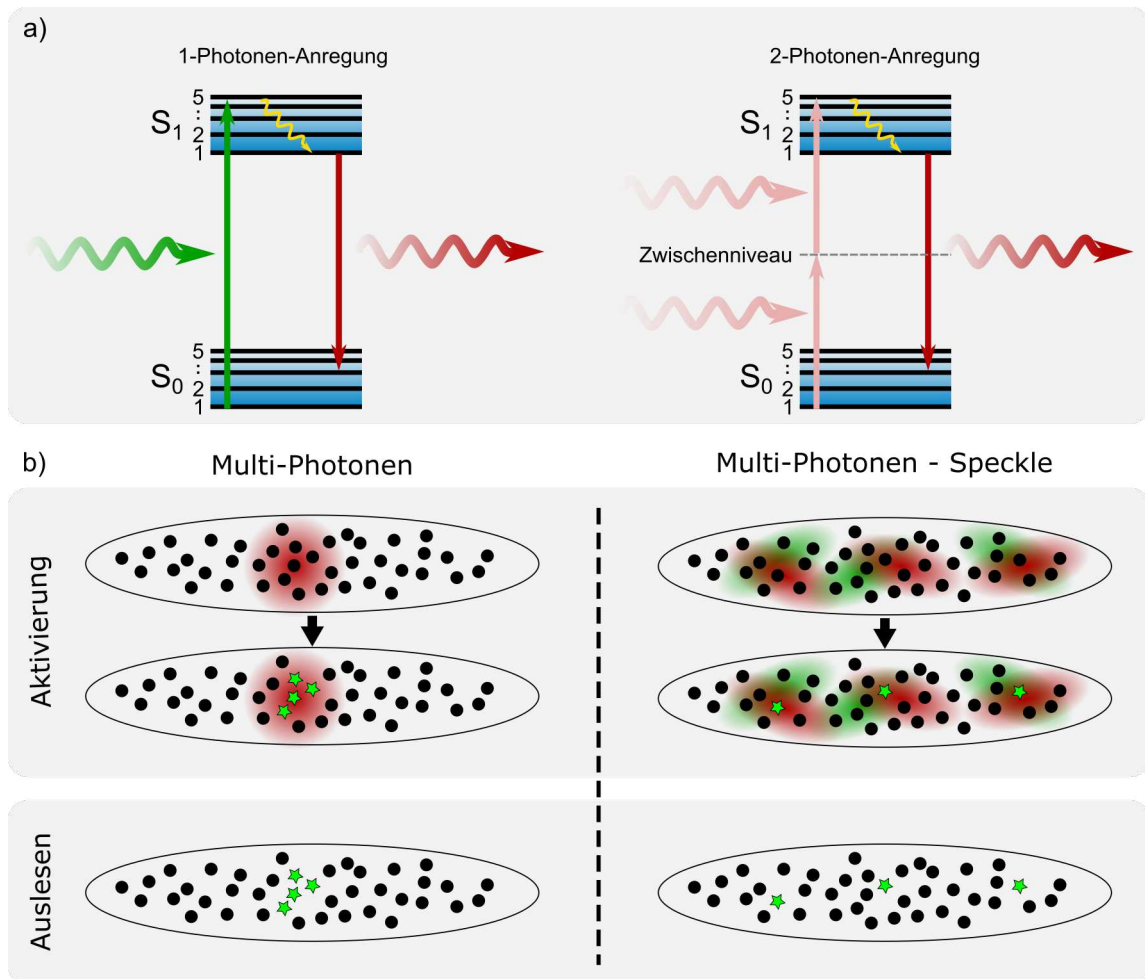
Ionen Laser für die Anregung bei 488 nm im System integriert. Das Filtersystem des Mikroskops ist auf die 2-Photonen-Anregung durch spezielle Filtersätze angepasst. Im späteren Versuch, beschrieben in Kapitel 4.3.1, wurde ein 63x Öl-Immersion-Objektiv (Plan-Apochromat NA = 1.4, Zeiss, Deutschland) für die Untersuchung einer 2-Photonen-Anregungs- bzw. Detektionsschwelle von Alexa Fluor 488 verwendet. Das 2-Photonen-Anregungsspektrum sowie das Emissionsspektrum von Alexa Fluor 488 sind in Abbildung 36 zu sehen [101]. Die grüne Kurve stellt das 2-Photonen-Absorptionsspektrum von Alexa Fluor 488 dar. Dieses liegt im Bereich von 750 nm bis 1100 nm. Das Emissionsspektrum wird durch den 2-Photonen-Absorptionsprozess nicht beeinflusst und zeigt sich im Bereich von 500 nm bis 650 nm. Entsprechend Abbildung 36 liegt die optimale 2-Photonen-Anregung bei 950 nm. Da die Laserleistung nur in einem bestimmten Rahmen reduziert werden kann, wurde für das 2-Photonen-Absorptionsexperiment eine Anregungswellenlänge von 770 nm gewählt. Somit kann gleichzeitig auch der Effekt einer reduzierten 2-Photonen-Absorptionswahrscheinlichkeit betrachtet werden. Zur Ermittlung der Detektionsschwelle für spätere Simulationen wurde die Abhängigkeit des arithmetischen Mittels vom Mittelwert des Untergrundes ( $\bar{B}$ ) und des Signals ( $\bar{S}$ ) zur Durchschnittsleistung betrachtet.

$$\text{MUS} = \frac{\bar{B} + \bar{S}}{2} \quad (18)$$



**Abbildung 36:** Emissions- und 2-Photonen-Absorptionsspektrum von verschiedenen Fluorophoren aus [101]. In Grün geplottet die beiden Spektren des verwendeten Fluorophors Alexa Fluor 488 dargestellt als relative Intensität. In Blau ist der Kernfarbstoff DAPI und in Rot Alexa Fluor 594 zu sehen.

Das Fluoreszenzsignal wird durch spezielle Sekundärelektronen-Vervielfacher (SEV) nachgewiesen, welche zusätzlich auch Messungen in der Fluoreszenzlebensdauer-Mikroskopie (FLIM; engl. *Fluorescence lifetime imaging microscopy*) ermöglichen. Für eine 2-Photonen-Anregung eines Atoms oder Moleküls werden zwei Photonen benötigt, da die Energie  $E_1$  eines Photons nicht ausreicht, um die Energiedifferenz  $\Delta E$  der Energielücke zwischen dem angeregten Zustand  $S_1$  und dem Grundzustand  $S_0$  zu überwinden ( $\Delta E = E_1 - E_2 = \hbar\nu_1 + \hbar\nu_2$ ). Dies liegt daran, dass kein erlaubtes Zwischenniveau (Abbildung 37a) zwischen den Energieniveaus  $E_1$  und  $E_2$  existiert. Somit müssten die Photonen annähernd gleichzeitig absorbiert werden. Jedoch ermöglicht die Energie-Zeit-Unschärferelation  $\Delta E \Delta t \geq \hbar/2$  ein kurzes Zeitintervall im Bereich von Femtosekunden für die Absorption der zwei Photonen. Das Energieniveauschema für einen 2-Photonen-Anregungsprozess ist in Abbildung 37a (rechts) im Vergleich zu einem 1-Photonen-Anregungsprozess (Abbildung 37a links) zu sehen. Weiterhin ist für einen solchen Prozess eine hohe zeitliche und räumliche Photonendichte erforderlich, um die Wahrscheinlichkeit (Zwei-Photonen-Wechselwirkungsquerschnitt  $\sigma_{2p}$ ) zu erhöhen, wobei für das Emissionsspektrum kaum messbare Unterschiede erwartet werden. Gleiches gilt für das Anregungsspektrum, das aber eine Rot-Verschiebung in den Infrarot(IR)-Bereich um einen Faktor 2 aufweist. Für die 2-Photonen-Absorption wird das Lambert-Beer'sche Gesetz der 1-Photonen-Absorption  $dI = -\alpha(\lambda) c I dx$  durch einen zusätzlichen Absorptionskoeffizienten zu  $dI = -c [\alpha(\lambda)I + \beta(\lambda)I^2] dx$  erweitert, wobei  $\alpha(\lambda)$  der Absorptionskoeffizient der 1-Photonen-Absorption,



**Abbildung 37:** a) Darstellung der Jablonski-Diagramme als 2-Niveau-Energieschema ( $S_0$  - Grundzustand und  $S_1$  - angeregter Zustand) mit stark aufgespaltenen Unterniveaus (1 bis 5) von einer 1- und 2-Photonen-Absorption. Die Anregungsprozesse bei der 1-Photonen-Absorption sind durch grüne und die Abregungsprozesse durch rote Pfeile markiert. Die Vibrations-Energie-Relaxation im angeregten Zustand ist durch einen gelben Pfeil dargestellt und stellt den Übergang von höheren auf niedrigere Unterniveaus in  $S_1$  dar. Bei der 2-Photonen-Anregung werden die Anregungsprozesse durch hellrote und die Abregungsprozesse durch rote Pfeile markiert. Des Weiteren ist das Zwischenniveau abgebildet. Der gelbe Pfeil stellt wie bei dem 1-Photonen-Prozess die Vibrations-Energie-Relaxation im  $S_1$  dar. b) Vergleichende Darstellung der Schritte eines Multi-Photonen-Prozesses durch einen Scan-Spot (rot; links) als Standardverfahren der Multi-Photonen-Absorptionsmikroskopie und eine mögliche Realisierung der Multi-Photonen-Anregung durch zwei Specklefelder (rot und grün) im Konzeptsystem eines Speckle-Mikroskops (rechts). Die detektierbaren Fluorophore sind als grüne Sterne im letzten Schritt des Auslesens markiert.

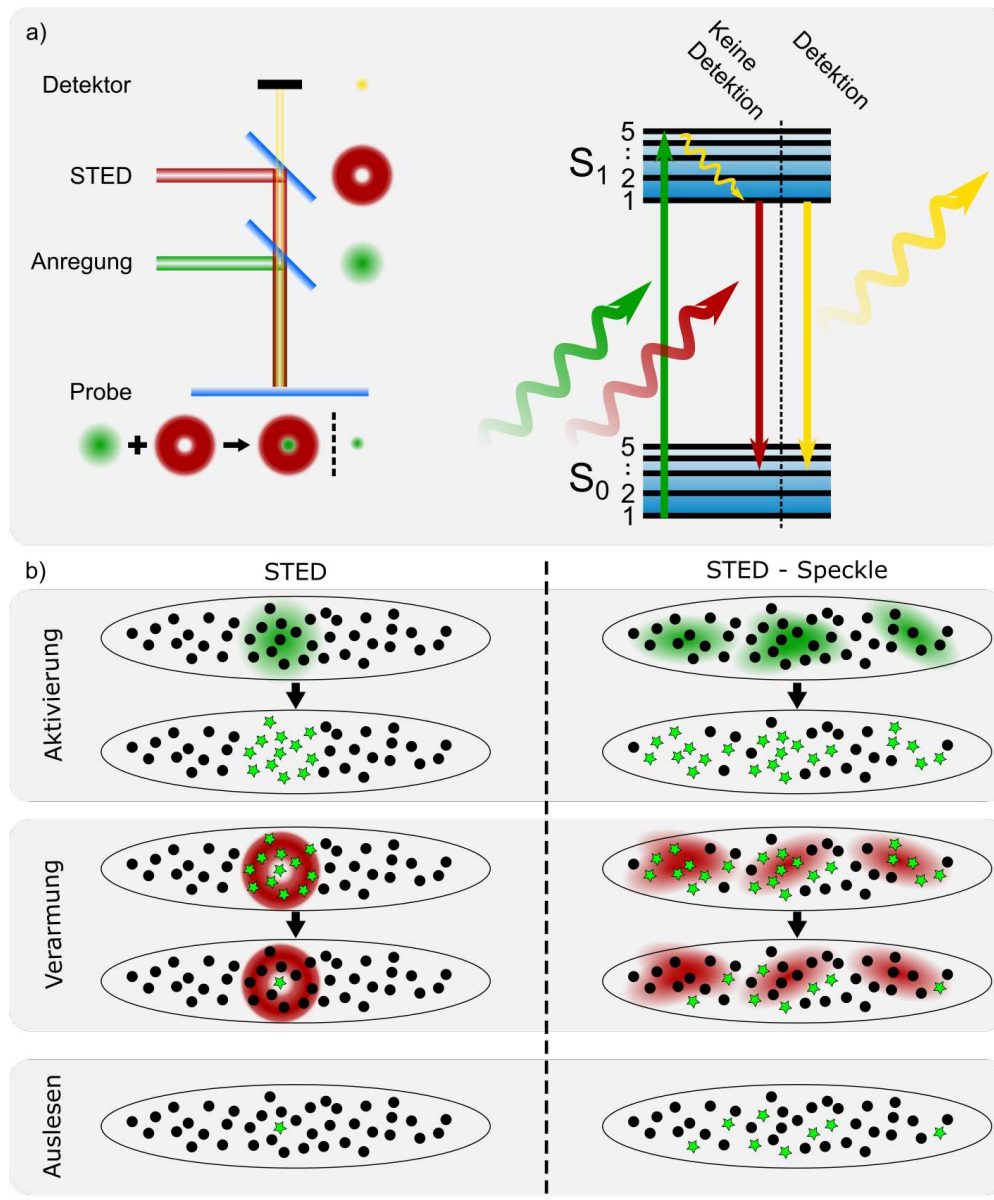
$\beta(\lambda)$  der Absorptionskoeffizient der 2-Photonen-Absorption,  $x$  die Schichtdicke und  $c$  die Konzentration darstellt [102].

Die mögliche Umsetzung eines 2-Photonen-Anregungsprozesses in der Speckle-Mikroskopie mit zwei Specklefeldern (grün und rot; rechts) im Vergleich zu einer normalen 2-Photonen-

bzw. Multi-Photonen-Anregung mittels eines scannenden Spots (roter Bereich; links) ist in Abbildung 37b zu sehen. Die Anregung der Fluorophore erfolgt nur in Bereichen bei dem die Intensität hoch genug für eine Multi-Photonen-Anregung ist. Somit werden nur Fluorophore bei der normalen Multi-Photonen-Anregung im Zentrum des Spots (grüne Sterne) angeregt. Diese Intensitätsabhängigkeit kann bei einem Speckle-Mikroskop, wie in Abbildung 37b auf der rechten Seite angedeutet, ausgenutzt werden. Das von mir betrachtete Konzept beinhaltet, dass die Intensität für eine detektierbare Multi-Photonen-Anregung nur in Bereichen, in denen sich zwei oder mehrere Specklefelder überlagern, erreicht wird. Somit werden nur Fluorophore aus diesen begrenzten Bereichen detektiert. Weitere Vorteile dieses Prozesses sind eine bessere Trennung von Anregungs- und Emissionsspektrum und die Möglichkeit, Aufnahmen auch in dickeren Gewebeschnitten oder sogar in lebenden Tieren zu realisieren. Der letzte Fakt hängt mit der starken Intensitätsabhängigkeit der Absorption zusammen, welche in der Formel des Lambert-Beerschen-Gesetzes deutlich mit einer quadratischen Abhängigkeit enthalten ist. Durch diese Abhängigkeit entsteht nur in einem kleinen Fokusbereich (kleine Volumina) Emissionslicht. Somit entfallen ein Großteil der störenden Streueffekte und auch die Emission aus anderen Gewebeschichten. Eine Anwendung eines solchen Effektes ist gerade bei der Weiterentwicklung des realisierten Speckle-Mikroskops in Richtung *Deep Imaging* im Bereich der ex-vivo oder sogar in-vivo Experimente von großer Bedeutung.

#### 4.2.2 Übertragung der STED-Mikroskopie auf das Konzeptsystem

Ein weiteres Konzept aus dem von mir mitentwickeltem Patent [21] basiert auf der Verwendung von Emissionseffekten zur Reduktion der effektiven Beleuchtungsfläche. Ein typischer Vertreter der Verwendung von Emissionseffekten ist die STED-Mikroskopie [5, 103]. Bei der Adaption auf das entwickelte Konzeptsystem wird das Prinzip der stimulierten Emissionsausbleichung genutzt, um die effektive Beleuchtungsfläche zu reduzieren. Ähnlich wie bei der STED-Mikroskopie, bei welcher ein Beleuchtungsring verwendet wird [5], um die Fläche des Beleuchtungspots zu reduzieren, werden hierbei ein oder mehrere gleiche oder unterschiedliche Specklefelder verwendet, um ein Beleuchtungs- bzw. Anregungsspecklefeld auszubleichen und somit die Anregungsfläche zu reduzieren. Hierfür kann sowohl ein STED-Specklefeld mit hoher Intensität als auch mehrere STED-Specklefelder mit jeweils niedrigeren Intensitäten, welche zum Schluss denselben ausbleichenden Effekt haben, verwendet werden. Dazu ist in Abbildung 38a ein einfacher schematischer Aufbau



**Abbildung 38:** a) Schematischer Aufbau eines STED-Mikroskops (links) mit dem Anregungsspot (grün) und dem STED-Donut (rot), welcher durch eine Phasenplatte erzeugt wird. Das detektierte Licht ist durch das gelbe Signal dargestellt. Das Prinzip zur Verkleinerung der Detektionsfläche ist unterhalb des Aufbaus und das Jablonski-Diagramm als 2-Niveau-Energieschema ( $S_0$  - Grundzustand und  $S_1$  - angeregter Zustand) mit stark aufgespaltenen Unterniveaus (1 bis 5) des STED-Prinzip rechts zu sehen. Die Anregung ist durch die grünen Pfeile, die stimulierte Abregung durch die roten Pfeile und das detektierte Licht durch die gelben Pfeile gekennzeichnet. Die Vibrations-Energie-Relaxation im angeregten Zustand ist durch einen gelben Pfeil dargestellt. b) Vergleichende Darstellung der Schritte eines STED-Prozesses durch einen Scan-Spot (rot - STED-Donut, grün - Anregungsspot; links) als Standardverfahren der STED-Mikroskopie und eine mögliche Realisierung der STED-Speckle-Mikroskopie durch zwei Specklefelder (rot - STED-Specklefeld und grün - Anregungsspecklefeld) im Konzeptsystem eines Speckle-Mikroskops (rechts). Die detektierbaren Fluorophore sind als grüne Sterne im letzten Schritt des Auslesens markiert.

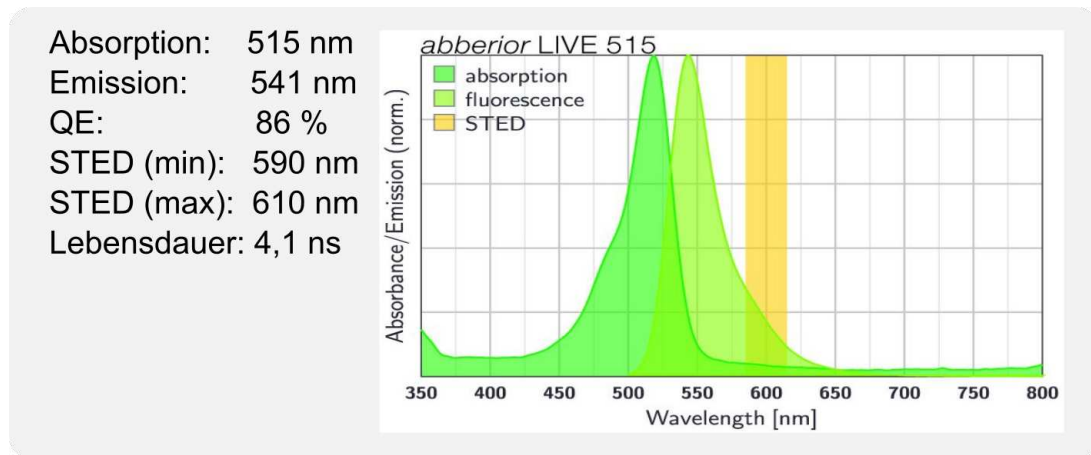


eines STED-Mikroskops (links; Anregungsspot - grün, STED-Donut - rot, Detektionslicht - gelb) und ein vereinfachtes Jablonski-Diagramm (rechts) als 2-Niveau-Energieschema ( $S_0$  - Grundzustand und  $S_1$  - angeregter Zustand) mit stark aufgespalteten Unterniveaus (1 bis 5) zum STED-Prinzip zu sehen.

STED basiert auf einem Laser-Scanning Mikroskop, welches durch einen zusätzlichen Ausbleichungs-Laser (STED-Laser; Abbildung 38a rote Struktur) erweitert wird [5, 100]. Dieser STED-Laser wird über eine Phasenmaske zu einem Phasenring (Donut) geformt. Der Donut erzeugt eine stimulierte Emission und bleicht so die Probe an dieser Stelle aus. Durch das Ausbleichen wird die Fluoreszenz aus einem kleineren Bereich detektiert. Der Ausbleicheffekt hängt von verschiedenen Parametern, wie der eingestrahnten Intensität ( $I$ ) oder der stoffspezifischen Sättigungsintensität ( $I_{\text{sat}}$ ), ab. Durch die Verwendung des Ausbleicheffektes erhält man eine erweiterte Auflösungsgrenze, wie sie in der nachstehenden Formel beschrieben wird.

$$d_{\min} = 0,61 \frac{\lambda}{n \cdot \sin(\alpha)} \cdot \frac{1}{\sqrt{1 + \frac{I}{I_{\text{sat}}}}} \quad (19)$$

Die Auflösung bei der STED-Mikroskopie ist somit abhängig von der Wellenlänge  $\lambda$ , der NA eines Objektivs (Brechzahl  $n$  des Mediums zwischen Objekt und Objektiv und dem Öffnungswinkel  $\alpha$  des Objektivs), der eingestrahnten Intensität des STED-Lasers  $I$  und der stoffspezifischen Sättigungsintensität  $I_{\text{sat}}$ . Betrachtet man die Formel genauer, so ist zu erkennen, dass die Auflösung durch das STED-Prinzip nur durch das Verhältnis von eingestrahelter Intensität im STED-Donut zu der Sättigungsintensität des Leuchtmittels gegeben ist. Somit kann das Auflösungslimit in der STED-Mikroskopie insbesondere in der deponierten Laserleistung gesehen werden. Des Weiteren ist gerade für Lebendzellmessungen die eingestrahlte Intensität von entscheidender Bedeutung und kann auch hier nicht beliebig erhöht werden. Inwieweit dieses STED-Prinzip für die Speckle-Mikroskopie verwendet werden kann, ist in Abbildung 38b zu sehen. Hier ist das Verfahren der STED-Mikroskopie (links) mit einer möglichen Einsatz-Variante in der Speckle-Mikroskopie (rechts) vergleichend gegenübergestellt. Auf der linken Seite findet bei der normalen STED-Mikroskopie die Separierung der zur Fluoreszenz angeregten und detektierten Fluorophore innerhalb des STED-Donuts (rote Struktur) statt. Auf der rechten Seite ist dieses Ausbleichprinzip mittels Specklefeld (rot) dargestellt. Die angeregten Fluorophore werden in bestimmten Bereichen durch das Specklefeld abgeregt. Diese separierten Fluorophore (Abbildung 38 grüne Sterne bei Auslesen) können dann detektiert werden. Dieses Verfahren der Abregung



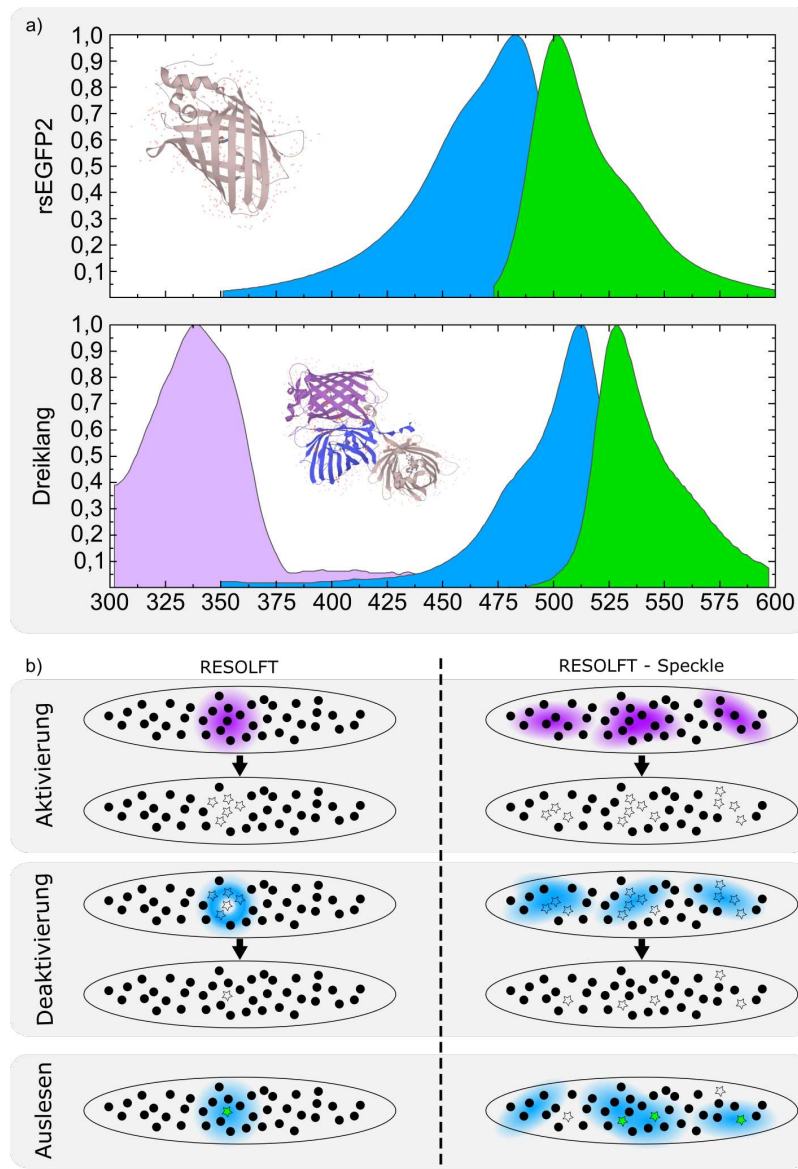
**Abbildung 39:** Spektrum und wichtige Daten des STED Fluorophores abberior LIVE 515. Maximale Anregung bei 515 nm und Detektionsmaximum bei 541 nm. Der Bereich für die STED Ausbleichung liegt zwischen 590 nm und 610 nm [104].

ist auch unter Nutzung eines Specklefeldes stark von der Intensität im STED-Specklefeld abhängig und kann je nach Intensität/Leistung unterschiedliche Separierungsergebnisse liefern. Für die Simulation zum Konzept des Speckle-STED-Mikroskops wird das STED Fluorophore abberior LIVE 515 verwendet [104]. Das Spektrum des Fluorophores und die wichtigsten Daten sind in Abbildung 39 zu sehen.

#### 4.2.3 Übertragung der RESOLFT-Mikroskopie auf das Konzeptsystem

Ein weiterer Konzeptbestandteil ist die Verwendung von photoschaltbaren Proteinen oder Fluorophoren. Hierbei wird ausgenutzt, dass die photoschaltbaren Leuchtmittel unter Bestrahlung von Licht zwischen zwei oder mehreren Zuständen geschaltet werden können. Da die meisten photoschaltbaren Leuchtmittel als photoschaltbare Proteine vorliegen, konzentriert sich dieses Kapitel genau auf diese Gruppe. Für die nachfolgenden Betrachtungen wurden, innerhalb der Gruppe der photoschaltbaren Proteine, die zwei Vertreter mit den Namen rsEGFP und Dreiklang gewählt. Die Fluoreszenz-Spektren sowie die Kristallstrukturen der beiden Proteine sind in Abbildung 40a zu sehen [105]. Zusätzlich ist in Abbildung 40b auf der linken Seite die typische Schrittfolge in der RESOLFT (englisch: reversible saturable optical linear (fluorescence) transitions; deutsch: reversibel sättigbare optische (Fluoreszenz-) Übergänge) - Mikroskopie dargestellt [106]. Ähnlich wie die PALM-Mikroskopie [55] werden hier ebenso photoschaltbare Leuchtmittel verwendet. Auf der rechten Seite der Abbildung 40b ist eine mögliche Schrittfolge der RESOLFT-Mikroskopie mittels Specklebeleuchtung zu sehen. In der RESOLFT-Mikroskopie werden die Leucht-





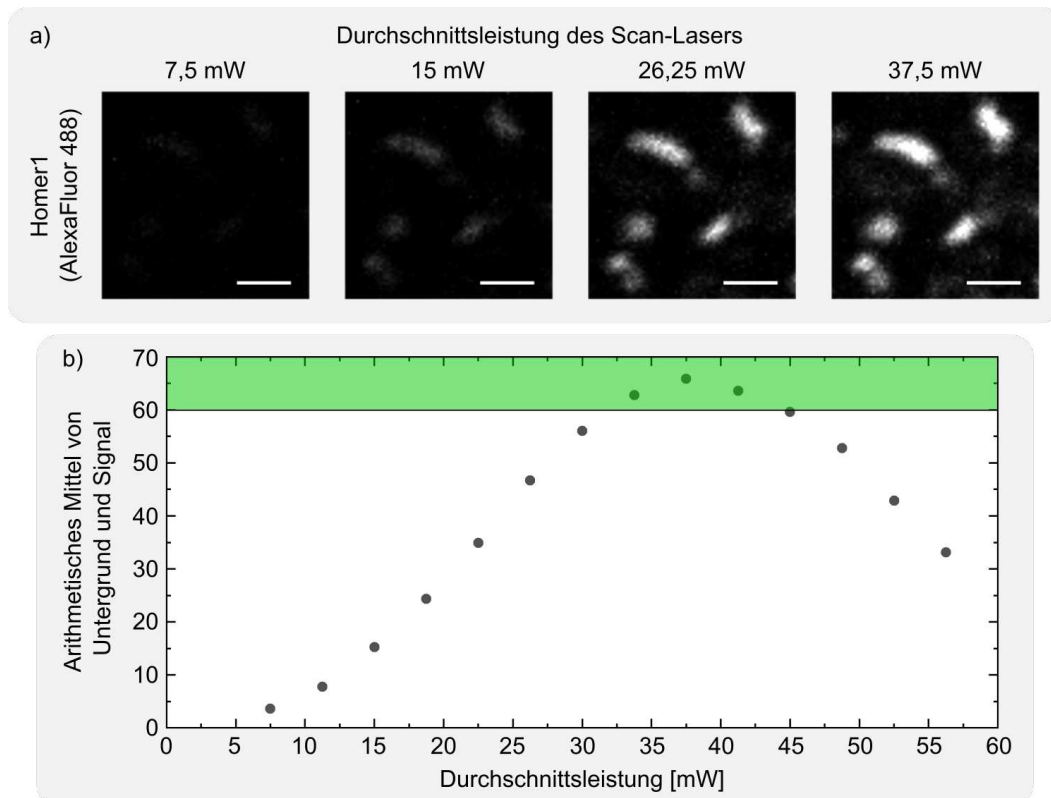
**Abbildung 40:** a) Emissions- und Absorptionsspektren des Aus- und An-Zustandes von zwei schaltbaren Fluoreszenz-Proteinen (rsEGFP2 oben und Dreiklang unten) sowie die dazugehörige Kristallstruktur der Proteine. In Blau sind die Anregungsspektren und in Grün die Abregungsspektren im An-Zustand zu sehen. Für Dreiklang ist in Violett das Anregungsspektrum zum Photoschalten im Aus-Zustand dargestellt [105]. b) (links) Typische Schrittfolge in der RESOLFT-Mikroskopie. Der Aktivierungsspot (violett) aktiviert die Fluorophore in einem bestimmten Bereich (weiße Sterne). Danach wird durch eine Ringbeleuchtung (blauer Ring) ein Teil der aktivierten Fluorophore zurück in den Aus-Zustand überführt. Als Letztes werden die restlichen Fluorophore ausgelesen (blauer Spot; grüne Sterne). (rechts) Mögliche Schrittfolge der RESOLFT-Mikroskopie bei Verwendung von einer Specklebeleuchtung. Durch ein Aktivierungsspecklefeld (violett) werden in bestimmten Bereichen Fluorophore in den An-Zustand (weiße Sterne) überführt. Als nächster Schritt wird durch ein Specklefeld (blau) ein Teil der aktivierten Fluorophore zurück in den Aus-Zustand überführt. Die restlichen Fluorophore (grüne Sterne) werden in einem letzten Schritt durch ein Specklefeld (blau) ausgelesen.

mittel in einem ersten Schritt meist durch kurzwelliges Licht aktiviert (rsEGFP2: 405 nm; Dreiklang: violettes Spektrum), d. h. in einen fluoreszenzfähigen Zustand überführt. Als nächster Schritt folgt eine Ausschaltung bzw. Deaktivierung (rsEGFP2: blaues Spektrum; Dreiklang: 405 nm) eines Bereiches der aktivierten Leuchtmittel. Dies erreicht man typischerweise wie bei der STED-Mikroskopie durch einen Donut. Dann werden mit einem normalen Gaußfokus die restlichen aktivierten Leuchtmittel ausgelesen (rsEGFP2: blaues Spektrum; Dreiklang: blaues Spektrum). Typischerweise ist die Auslesewellenlänge auch die Ausschaltwellenlänge, womit die Leuchtmittel wie rsEGFP2 [107, 15] nach dem Auslesen wieder in einen Aus-Zustand überführt werden. Bei dreifach schaltbaren Leuchtmitteln wie dem Dreiklang [108] besteht die Möglichkeit, noch einen separaten Ausschaltprozess nach dem Auslesen durchzuführen. Der Ausschaltprozess wird mit einer zusätzlichen Wellenlänge durchgeführt, so dass alle Leuchtmittel gleichzeitig in einen Aus-Zustand überführt werden. All diese Vorgänge erfolgen durch zeitlich zueinander versetzte Beleuchtungsstrukturen. Da bei dreifach schaltbaren Leuchtmitteln mit drei Wellenlängen gearbeitet wird und somit alle drei Prozesse voneinander getrennt erfolgen, ist dieses Leuchtmittel zu favorisieren.

## 4.3 Ergebnisse

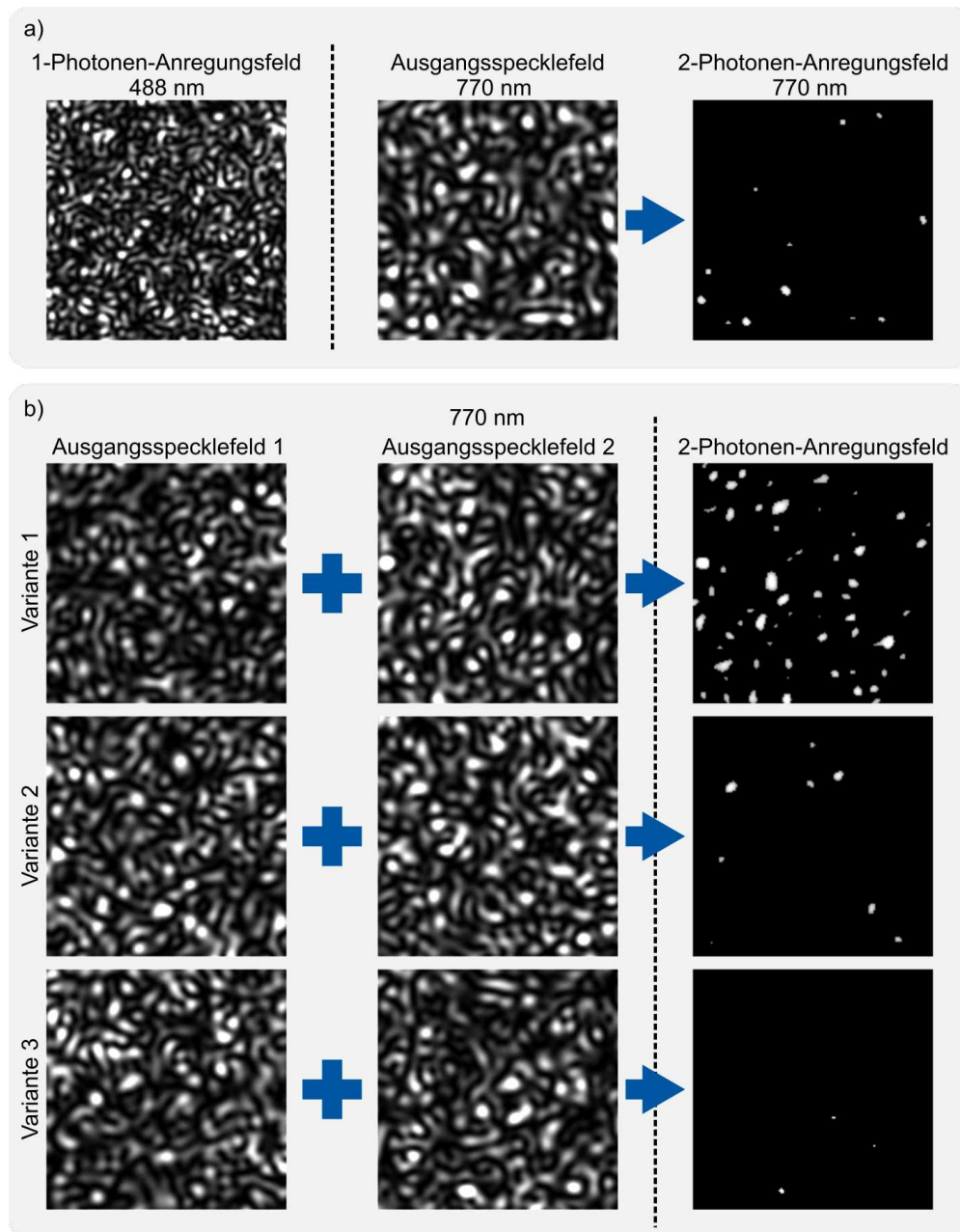
### 4.3.1 Simulation zur 2-Photonenabsorption-Mikroskopie

In Abbildung 41a sind Aufnahmen eines Strukturortes (postsynaptischer Marker Homer1) mit unterschiedlichen Durchschnittsleistungen des Scan-Lasers zu sehen. Die Aufnahmen wurden mit 4 Scans pro Bild bei einem Scanausschnitt von 512 x 512 px, einer „pixel dwell time“ von 4,80  $\mu$ s und einer Wellenlänge von 770 nm durchgeführt. Die Laserleistung wurde zwischen 0% und 1,5% bei einer maximalen Leistung von 3750 mW variiert. Des Weiteren ist in Abbildung 41b die Abhängigkeit des arithmetischen Mittels vom Mittelwert des Untergrunds ( $\bar{B}$ ) und des Signals ( $\bar{S}$ ) zur Durchschnittsleistung (Gleichung 18) zu sehen. Da das Hintergrundsignal gegenüber dem eigentlichen Signal nur schwach zunimmt, kann mit diesem arithmetischen Mittelwert die Zunahme des Signals gut bestimmt werden. Unter Zuhilfenahme dieser Kurve kann man die für die Simulation optimalsten Aufnahmeparameter identifizieren. Dieser Bereich ist in Abbildung 41b grün markiert. Für ein optimales Bild wird in den späteren Simulationen die Durchschnittsleistung von 37,5 mW verwendet. Aus den Bildern in Abbildung 41a ist visuell sichtbar, dass ab einer Leistung



**Abbildung 41:** a) Beispielbilder eines Strukturortes (Homer1) mit unterschiedlichen Durchschnittsleistungen des 2-Photonen-Anregungslasers zur Bestimmung der Detektionsschwelle der Emission bei einer 2-Photonen-Absorption. b) Graphische Darstellung der Abhängigkeit des arithmetischen Mittels von Untergrund und Signal von der eingestrahelten Durchschnittsleistung des 2-Photonen Lasers.

von ca. 15 mW die postsynaptischen Strukturen erkennbar werden. Diese Leistung wird als Grenzwert für die spätere Simulation genutzt. Verwendet man nun die Leistung von 37,5 mW als maximalen Wert (100%), liegt die Grenze der 2-Photonen-Anregung bei ca. 40% der maximalen Leistung. Des Weiteren musste festgestellt werden, dass schon bei Durchschnittsleistungen über 37,5 mW Ausbleichvorgänge in der Probe einsetzen. Dies ist gut im Kurvenabfall des arithmetischen Mittels von Untergrundsignal und Signal in Abbildung 41b zu sehen. Mit den aus diesem Versuch gewonnenen Informationen kann eine grundlegende Simulation durchgeführt werden. Ziel dieser Simulation ist es, die Speckelleistungen zu bestimmen, bei denen eine optimale Speckleüberlagerung erreicht wird. Es werden dafür 4 unterschiedliche Anregungskonstellationen näher beleuchtet. Die erste Konstellation ist die Verwendung eines einzelnen Specklefeldes für die 2-Photonen-Anregung. Hierbei entspricht die maximale Leistung aus dem Vorversuch der maximalen Speckleleistung des Feldes. Somit können nur Speckle, die über 40% der maximalen Leistung liegen, ein detektierbares Signal erzeugen. Daraus folgt, dass sich die Größe des Anregungsfel-



**Abbildung 42:** a) Simulation einer 2-Photonen-Anregung durch ein 2-Photonen-Spekcklefeld bei 770 nm. Das Anregungsspekcklefeld bei 770 nm (Mitte) mit dem dazugehörigen effektiven Beleuchtungsmuster durch die 2-Photonen-Detektionsgrenze bei 40 % der Maximalleistung (rechts). Das dazugehörige 1-Photonen-Anregungsspekcklefeld für Alexa Fluor 488 bei 488 nm (links). b) Simulation von 3 unterschiedlichen einfachen Überlagerungsvarianten von normierten Spekcklefeldern bei 770 nm (links und Mitte) und dem dazugehörigen 2-Photonen-effektiven Beleuchtungsmuster bei einem Anregungsgrenzwert von 40 % der maximalen Leistung. Variante 1: Anregung bei maximaler Leistung der Ausgangsspekcklefelder, welche der tatsächlichen maximalen Leistung entspricht. Variante 2: Anregung bei maximaler Leistung der Ausgangsspekcklefelder, welche 50 % der Leistung zwischen tatsächlicher maximaler Leistung und Grenzwertleistung entspricht. Variante 3: Anregung bei maximaler Leistung der Ausgangsspekcklefelder, welche der Grenzwertleistung entspricht.

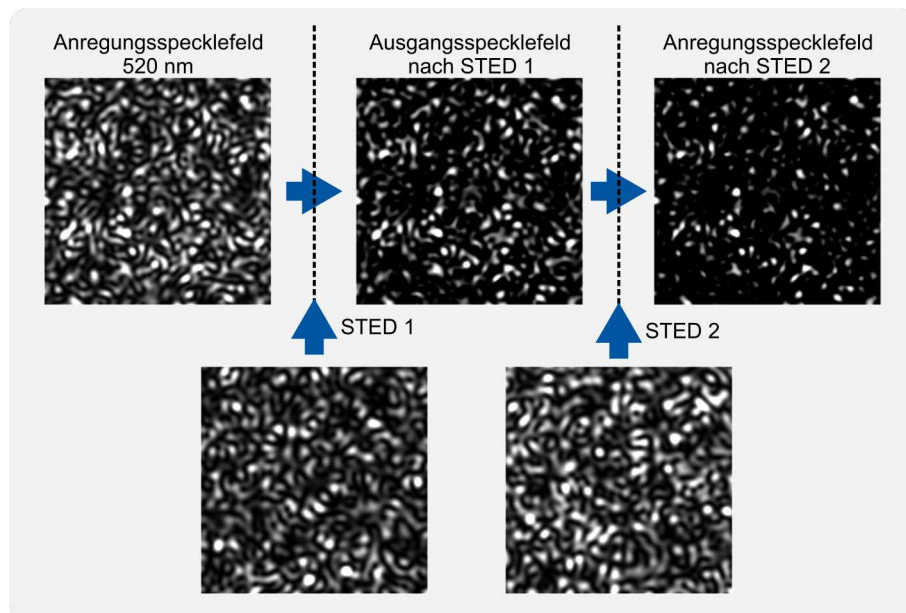
des gegenüber dem eingestrahnten Specklefeld bei 770 nm ändert (Abbildung 42a). Das neu entstandene effektive Beleuchtungsspecklefeld hat eine um rund 33% kleinere mittlere Specklegröße als das Ursprungsfeld bei 770 nm. Als Nächstes werden Varianten betrachtet, bei denen, wie im Mikroskop-Konzept [21] beschrieben, zwei Specklefelder benötigt werden. Diese können in einem zeitlichen Versatz zueinander oder durch unterschiedliche Polarisationsrichtungen gleichzeitig auf die Probe treffen. Hierbei werden nun drei unterschiedliche Fälle näher ausgeführt. Bei Variante 1 werden zwei normierte Specklefelder addiert und alle Werte größer 1 auf 1 zurückgesetzt. In einem nächsten Schritt werden der oben bestimmte Grenzwert auf 0,4 und alle kleineren Werte auf null gesetzt. Somit erhalten wir für diese Variante das 2-Photonen-Anregungsfeld, welches in Abbildung 42b dargestellt ist. In dieser Variante hat das neu entstandene effektive Beleuchtungsspecklefeld eine um rund 27% kleinere mittlere Specklegröße als das Ursprungsfeld bei 770 nm. In einer nächsten Variante (Variante 2) wurde die maximale Leistung der Speckle auf 50 % zwischen der Grenzleistung und der maximalen Leistung festgelegt und anschließend analog zu Variante 1 das 2-Photonen-Anregungsfeld erzeugt. In dieser zweiten Variante hat das neu entstandene effektive Beleuchtungsspecklefeld eine um rund 52% kleinere mittlere Specklegröße als das Ursprungsfeld bei 770 nm. In einer letzten Variante (Variante 3) wurde die maximale Leistung in den Ausgangsspecklefeldern genau auf die Grenzleistung aus dem Vorversuch gelegt und erneut das 2-Photonen-Anregungsfeld ermittelt. In dieser dritten Variante hat das neu entstandene effektive Beleuchtungsspecklefeld eine um rund 160% kleinere mittlere Specklegröße als das Ursprungsfeld bei 770 nm. Dies ist auch in Abbildung 42b im rechten unteren Bild deutlich zu sehen. Diese Variante lässt auch gegenüber einem Beleuchtungsspecklefeld bei 488 nm eine deutlich verkleinerte mittlere Specklegröße erkennen. Im Vergleich dazu liegen die mittleren Specklegrößen der anderen beiden Varianten in der Größenordnung eines Beleuchtungsfeldes bei 488 nm. In allen Varianten ist jedoch eine deutliche Separation der einzelnen Beleuchtungsmuster zu beobachten.

#### 4.3.2 Simulation zur STED-Mikroskopie

In Abbildung 43 ist eine Simulation für das Fluorophor „Abberior LIVE 515“ mit zwei aufeinander folgenden STED-Specklefeldern dargestellt. Die Simulation zeigt eine mögliche Variante unter der Verwendung von mehreren STED-Specklefeldern mit geringerer Intensität. Hierbei ist schon nach einer einfachen STED-Abregung eine Separierung des Anregungsfeldes zu erkennen, wobei die mittlere Specklegröße des neu entstandenen effektiven



Beleuchtungsspecklefeldes nur geringfügig um rund 3% kleiner ist als im Specklefeld bei 520 nm. Nach einer weiteren STED-Abregung durch ein sich vom ersten STED-Specklefeld unterscheidendes STED-Specklefeld ist eine noch deutlichere Separierung des Anregungsfeldes zu beobachten. Durch den zweiten Ausbleichungsschritt konnte die Tendenz der Reduzierung der mittleren Specklegröße des neuen effektiven Beleuchtungsfeldes gegenüber einem Specklefeld bei 520 nm auf eine Verkleinerung von über 10% erhöht werden. Diese Tendenz kann durch weitere STED-Specklefelder, welche das gleiche STED-Specklefeld oder kleinere Variationen der STED-Specklefelder sein können, noch erhöht werden. Somit stehen viele Möglichkeiten zur Realisierung eines solchen Systems zur Verfügung. Des Weiteren kann die Laserintensität, welche in diesem Beispiel gering war, ohne schädigende Effekte im Gewebe deutlich erhöht werden. Somit wird der oben beschriebene Effekt signifikant vergrößert.

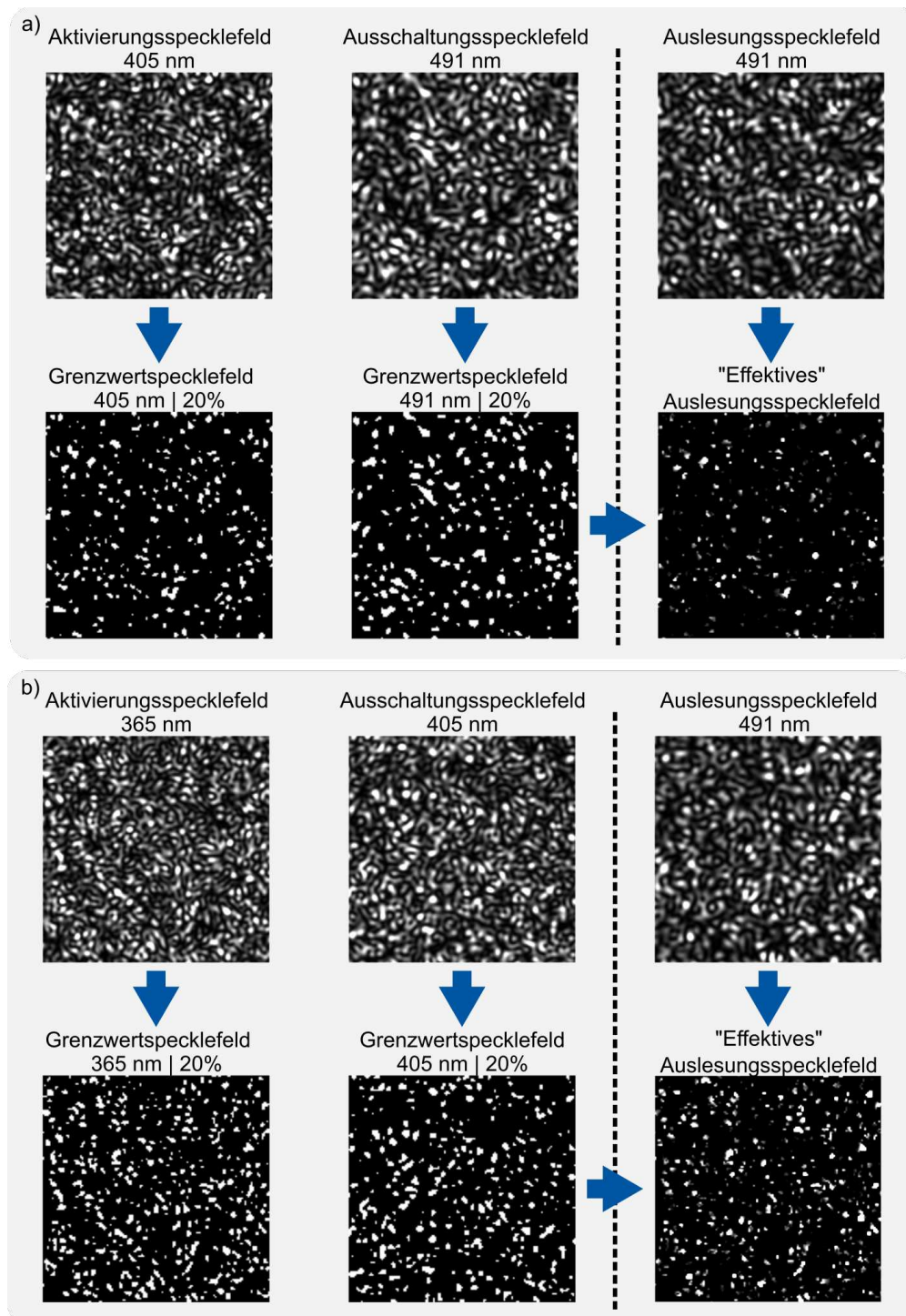


**Abbildung 43:** Simulation einer STED-Abregung mit zwei aufeinander folgenden STED-Specklefeldern des Fluorophores „Abberior LIVE 515“ nach einer Anregung bei 520 nm und einer STED-Wellenlänge von 600 nm.

#### 4.3.3 Simulation zur RESOLFT-Mikroskopie

In Abbildung 44 ist eine Simulation zum Konzept der Reduktion des effektiven Specklefeldes unter Verwendung von Aktivierungs- und Ausschaltprozessen zu sehen. In dieser Simulation werden beide Leuchtmittel (Proteine) aus Kapitel 4.2.3 betrachtet. Dies ist

notwendig, da sich die jeweilige Ausschaltwellenlänge und somit auch die Specklefelder stark unterscheiden. Des Weiteren wird davon ausgegangen, dass sowohl zur Aktivierung als auch zur Ausschaltung eine bestimmte Leistung bzw. Intensität überschritten werden muss, um das Leuchtmittel in den jeweilig anderen Zustand zu überführen. Dies wird somit als harte Grenze betrachtet. Die Aktivierungs-, Ausschalt- und Ausleseprozesse für die Erzeugung eines effektiven verkleinerten Beleuchtungsspecklefeldes sind in Abbildung 44a für die Wellenlängen von rsEGFP dargestellt, wobei hier, wie bei der Standard RESOLFT-Mikroskopie, ebenfalls zu berücksichtigen ist, dass die jeweiligen Specklefelder mit einem zeitlichen Versatz auf die Probe treffen. Die Wellenlänge 405 nm wird zur Aktivierung verwendet und die benötigte Aktivierungsleistung liegt bei 20 % der maximalen Leistung im Specklefeld. Die Wellenlänge 491 nm wird sowohl zur Deaktivierung als auch zur Auslesung der Struktur verwendet. Hierbei liegt der Grenzwert, der zur Deaktivierung benötigt wird, ebenfalls bei 20 % der maximalen Leistung im Specklefeld. Abbildung 44b zeigt die Erzeugung eines effektiven verkleinerten Beleuchtungsspecklefeldes unter Verwendung des Fluoreszenzproteins Dreiklang, wobei sich hier die Ausschalt- und die Auslesewellenlängen unterscheiden. In diesem Beispiel wird zur Aktivierung ultraviolettes Licht von 365 nm verwendet und die Aktivierungsgrenze ebenfalls mit 20 % der maximalen Leistung festgelegt. Für die Ausschaltung wird ein Beleuchtungsspecklefeld mit 405 nm erzeugt und auch hier die Grenze der maximalen Leistung bei 20 % fixiert. Das Auslesen erfolgt mit einem Beleuchtungsspecklefeld, erzeugt mit einer Wellenlänge von 491 nm. Die obere Reihe zeigt in beiden Fällen die Ausgangsspecklefelder, die der Beobachter sehen würde. In der unteren Reihe sind die resultierenden Grenzwertspecklefelder dargestellt. Zusätzlich erfolgte eine Binarisierung der Grenzwertspecklefelder. Die beiden Grenzwertspecklefelder wurden dann für beide Proteine mit dem Auslesespecklefeld überlagert, um so das resultierende „effektive“ Auslesespecklefeld zu erhalten. Dieses stellt dann das effektive Beleuchtungsfeld dar, da nur in den jetzt noch vorhandenen Bereichen eine Fluoreszenz detektiert werden kann. In der Simulation wurden die Detektionsgrenze bzw. das Detektionslimit der verwendeten CCD nicht berücksichtigt und somit die Prozesse vereinfacht. Im Beispiel von rsEGFP kann gezeigt werden, dass die mittlere Größe des effektiven Beleuchtungsspecklefeldes 40% kleiner ist als die eines Specklefeldes bei 491 nm. Des Weiteren ist die mittlere Specklegröße des neuen effektiven Beleuchtungsspecklefeldes rund 30% kleiner als die eines Specklefeldes bei 405 nm. Im Vergleich dazu kann unter Verwendung von Dreiklang gezeigt werden, dass die mittlere Specklegröße des effektiven Beleuchtungsspecklefeldes gegenüber einem Specklefeld bei 491 nm um rund 50% verkleinert ist. Betrachtet man hier ebenfalls das



**Abbildung 44:** Schematische Darstellung der Erzeugung eines verkleinerten effektiven Beleuchtungsspecklefeldes a) für das photoschaltbare Protein rsEGFP und b) für das photoschaltbare Protein Dreiklang unter Verwendung von Aktivierungs- und Ausschaltgrenzwerten für die entsprechende Wellenlänge aus Kapitel 4.2.3. Die obere Reihe zeigt jeweils die verwendeten Wellenlängen-abhängigen Specklefelder zum Aktivieren, Ausschalten und Auslesen. In der unteren Reihe sind binarisierte Masken des Aktivierungsspecklefeldes (links) und des Ausschaltungsspecklefeldes (Mitte) sowie das resultierende verkleinerte effektive Auslesungsspecklefeld (rechts) zu sehen.



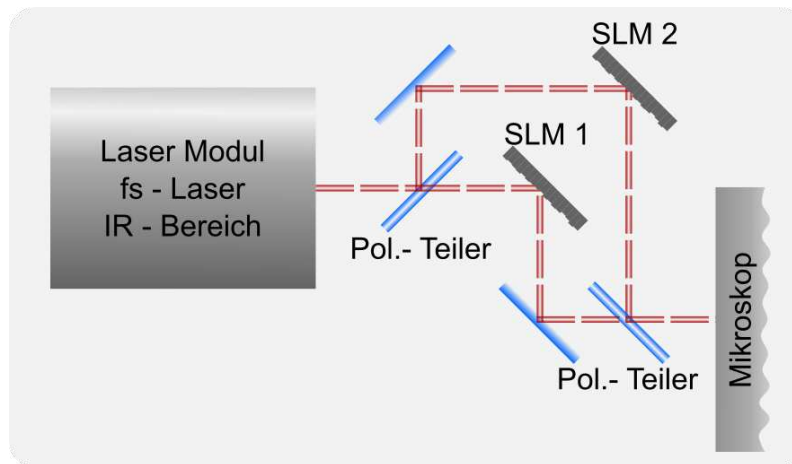
Verhältnis zu einem Specklefeld bei 405 nm, so erhält man eine um rund 40% verkleinerte mittlere Specklegröße des effektiven Beleuchtungsspecklefeldes.

## 4.4 Diskussion

### 4.4.1 2-Photonenabsorption-Mikroskopie

Aufbauend auf den gezeigten 2-Photonen-Absorptionsspektren [101] in Abbildung 36 konnte eine Detektionsschwelle (Anregungsschwelle) für Alexa Fluor 488 ermittelt werden. Durch diese experimentell ermittelten Daten konnten Simulationen zum Konzept der 2-Photonen-Speckle-Mikroskopie durchgeführt werden. In den Experimenten zur Detektionsschwelle wurde mit einem 2-Photonen-LSM (siehe (Kapitel 4.2.1) und unter Verwendung von Photomultipliern gearbeitet. Die Schwelle der Signaldetektion bei Flächendetektoren wird auf Grund ihrer anderen Detektionsempfindlichkeit abweichen [109]. Trotzdem liefert dieses Experiment erste Daten zur Realisierung des Multi-Photonen Konzeptes. Zur Ermittlung der Detektionsschwelle mussten jedoch einige Vorversuche durchgeführt werden. Hierzu zählt zum Beispiel die Ermittlung der optimalen Scanparameter, um Eckparameter für die eigentliche Aufnahme zu bestimmen, die Festlegung der Schrittweiten der Laserintensitäten und das Finden einer optimalen postsynaptischen Struktur (Homer1). Der in Abbildung 42b zu beobachtende Abfall bei mehr als 37,5 mW ist auf ein Ausbleichen der Struktur zurückzuführen. Die Detektionsschwelle bei 40 % der maximalen Leistung ist in Abbildung 42a im zweiten Bild von links gut zu sehen und liegt bei 15 mW.

Die auf diesen Vorversuch aufbauenden Simulationen zeigen deutlich die im Konzept beschriebene Reduktion des effektiven Beleuchtungsfeldes [21]. Betrachtet man in Abbildung 42a die Simulation eines Anregungsfeldes bei 770 nm, sieht man im 2-Photonen-Anregungsfeld (Abbildung 42 rechts) eine deutliche Separierung der einzelnen Anregungsspotspots im Specklefeld. Des Weiteren sind die so erzeugten Anregungsspotspots deutlich kleiner als die Speckle im normalen Anregungsfeld bei 770 nm (Abbildung 42 Mitte). Zusätzlich ist eine Separierung der einzelnen Anregungsspotspots auch gegenüber einem Anregungsfeld bei 488 nm, welches die Standardanregung von Alexa Fluor 488 ist, zu sehen (Abbildung 42 links). Somit konnte gezeigt werden, dass bei einer 2-Photonen-Anregung mit einem Specklefeld gegenüber einer normalen Anregung im sichtbaren Spektralbereich eine bessere Separierung der Anregungsbereiche zu sehen ist. Die Spotgrößen im 2-Photonen-Speckleanregungsfeld liegt in der Größenordnung der Specklegrößen eines Specklefeldes



**Abbildung 45:** Vereinfachte schematische Darstellung eines möglichen 2-Photonen-Speckle-Mikroskop Konzeptes mit den wichtigsten optischen Elementen. Der Laser wird durch einen Polarisationsstrahlteiler (Pol.-Teiler) in zwei Teilstrahlen aufgespalten. In jedem Teilstrahl wird durch ein SLM oder einen anderen Specklegenerator ein Interferenzmuster (Beleuchtungsmuster) erzeugt. Durch einen weiteren Polarisationsstrahlteiler (Pol.-Teiler) werden beide Strahlen zusammengeführt und in ein Mikroskop eingekoppelt.

bei 488 nm.

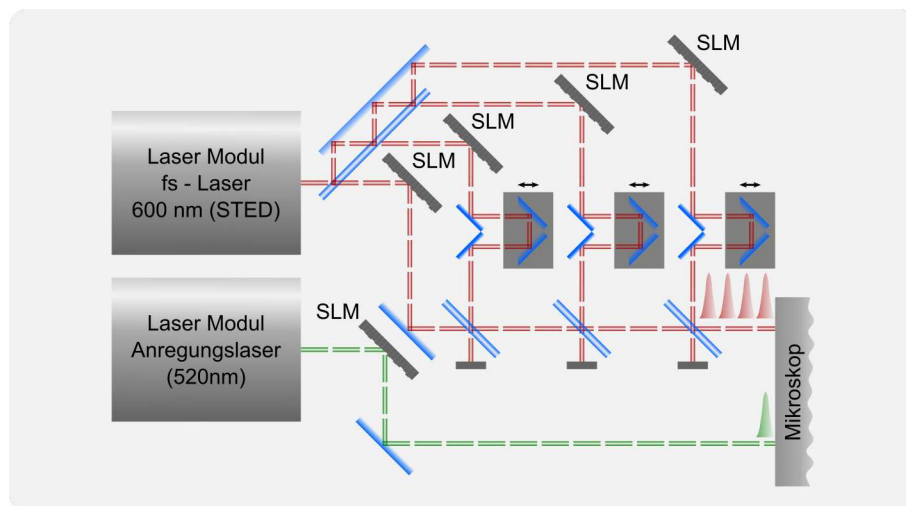
Die Variante 1, bei der die Leistung der Simulation der maximalen Leistung (37,5 mW) aus dem Vorversuch entspricht, zeigt ebenfalls eine deutlichere Separierung der einzelnen Anregungssspots im Anregungsfeld (Abbildung 42 Variante 1 rechts). Jedoch existieren zusätzlich große Anregungssspots innerhalb dieses Anregungsfeldes, welche in der Größenordnung der mittleren Specklegröße der ursprünglichen Speckle bei 770 nm liegen. Bei Variante 2, bei der die maximale Leistung der Simulation mittig zwischen der in den Vorversuchen ermittelten Grenzleistung (15 mW) und der maximalen Leistung (37,5 mW) liegt, ist wie bei Variante 1 auch eine deutliche Separierung der einzelnen Anregungssspots erkennbar (Abbildung 42 Variante 2 rechts). Des Weiteren ist die Größe der Anregungssspots im Vergleich zur Größe im Ausgangsspecklefeld deutlich kleiner geworden. Die Separierung der Anregungssspots ist ebenfalls signifikanter als bei Variante 1. Es existieren jedoch nur noch wenige effektive Beleuchtungsmuster in der Objektebene. Somit kann von einer notwendigen Erhöhung der für den Prozess benötigten Bilder ausgegangen werden. Die mittleren Specklegrößen des effektiven Beleuchtungsfeldes sind deutlich kleiner als die der Ausgangsfelder bei 770 nm und ebenfalls kleiner als die mittlere Specklegröße einer Anregung mittels eines Specklefeldes mit 488 nm. Bei Variante 3, bei der die maximale Leistung der Simulation genau der Grenzleistung (15 mW) aus dem Vorversuch entspricht, sind kaum noch mögliche Anregungssspots zu erkennen. Die erkennbaren Spots sind deutlich kleiner als die Größe der Ausgangsspeckle. Aus diesen einfachen Simulationen sollte die Laserleistung des

2-Photonen-Anregungslasers zwischen 50 % und 100 % der Grenzleistungen, entsprechend Variante 1 und Variante 2, für optimal separierte Specklefelder liegen. Des Weiteren sind auch Limitierungen bei der Verwendung typischer Specklefelder zu sehen. Es verschwinden gerade bei Variante 3 fast alle Anregungsbereiche. Dies ist darin begründet, dass in den Grundfeldern selbst nur wenige Bereiche im maximalen Leistungsbereich (37,5 mW) vorliegen [79], und kann zum Beispiel durch den Einsatz eines spatial light modulators (SLM) [110] zur Erzeugung von Specklefeldern oder Intensitätsmustern verbessert werden [12]. Die Simulationen auch mit einem einzelnen Specklefeld zeigen aber deutlich verbesserte Eigenschaften. In Abbildung 45 ist ein sehr vereinfachter schematischer Aufbau eines möglichen 2-Photonen-Speckle-Mikroskops zu sehen. Hierbei sind nur die wichtigsten optischen Elemente dargestellt. Der Laserstrahl wird durch einen Polarisationssteiler im Verhältnis 50:50 in 2 Strahlen aufgeteilt. Jeder einzelne Arm erhält einen separaten SLM bzw. Specklegenerator zur Erzeugung der unabhängigen Interferenzmuster. Diese Interferenzmuster werden über einen weiteren Polarisationssteiler zusammengeführt und in den Mikroskopkörper eingekoppelt. Dort wird die Probe mit den zwei Beleuchtungsmustern angeregt.

#### 4.4.2 STED-Mikroskopie

Ein weiteres Konzept zur Reduzierung der effektiven Beleuchtungsstrukturen [21] ist die Verwendung mehrerer Specklefelder als STED-Specklefeld. Je nachdem, ob man hierfür dieselben oder unterschiedliche Specklefelder benutzt, können unterschiedliche Bereiche der Probe ausgebleicht werden. Des Weiteren kann somit auch die Intensität/Leistung des einzelnen Specklefeldes reduziert werden, da der gesamte Ausbleicheffekt auf mehrere Specklefelder aufgeteilt wird. Dazu müssen die Specklefelder zeitlich kurz nacheinander auf die Probe treffen. Dieses Prinzip kann dazu genutzt werden, die effektive Beleuchtungsfläche eines Specklefeldes deutlich zu reduzieren. Dies wird durch die Simulation in Abbildung 43 gezeigt. Zusätzlich zeigt die durchgeführte Simulation, dass es möglich ist, mit mehreren intensitätsschwachen Specklefeldern einen Effekt bei der Reduktion der effektiven Beleuchtungsfläche zu erzielen. Ein möglicher Aufbau eines STED-Speckle Systems mit nur einem STED-Laser und einem Anregungslaser ist in Abbildung 46 dargestellt. In dieser Variante wird der STED-Laser durch eine geschickte Kombination von Strahlteilerplatten und Spiegeln in 4 Teilstrahlen aufgeteilt [111]. Hierbei muss jedoch beachtet werden, dass je nach gewünschter Anzahl von Teilstrahlen die Strahlteilerplatte so

angepasst werden muss, dass am Ende jeder Teilstrahl dieselbe Leistung besitzt. Jeder einzelne Teilstrahl läuft durch einen eigenen SLM zur Speckleerzeugung. Somit können verschiedene Varianten an Musterkombinationen realisiert werden. Zusätzlich sind in drei von vier Strahlwegen optische Bauteile für eine Variation der optischen Weglänge vorgesehen. So können die zeitlichen Abstände  $\Delta t$  der einzelnen Teilstrahlen nach der Strahlvereinigung exakt eingestellt werden, um störende Effekte, wie Interferenz der einzelnen Teilstrahlen, auszuschließen [78]. Die Strahlzusammenführung wird wieder über Strahlteilerplatten realisiert. Für die Bestimmung der Teilverhältnisse und der Ausgangsleistung des Lasers müssen die Verluste aller optischen Bauteile einbezogen werden. Daraus ergibt sich für die Realisierung der STED-Speckle-Mikroskopie auch die Notwendigkeit der Untersuchung vieler grundlegender Parameter, wie die Anzahl der STED-Specklefelder für eine optimale Reduzierung oder aber auch die Frage, ob die STED-Specklefelder eher unterschiedlicher Natur oder gleicher Natur sein sollten. Des Weiteren spielt die zeitliche Komponente der Überlagerung von STED-Specklefeldern auf der Probe eine entscheidende Rolle. Die optischen Verluste gerade bei der Separierung oder Zusammenführung der STED-Specklefelder sind entscheidend und müssen optimiert werden, da diese zum Schluss auch die Anzahl der STED-Specklefelder limitieren [112]. Außerdem wird für die Erzeu-

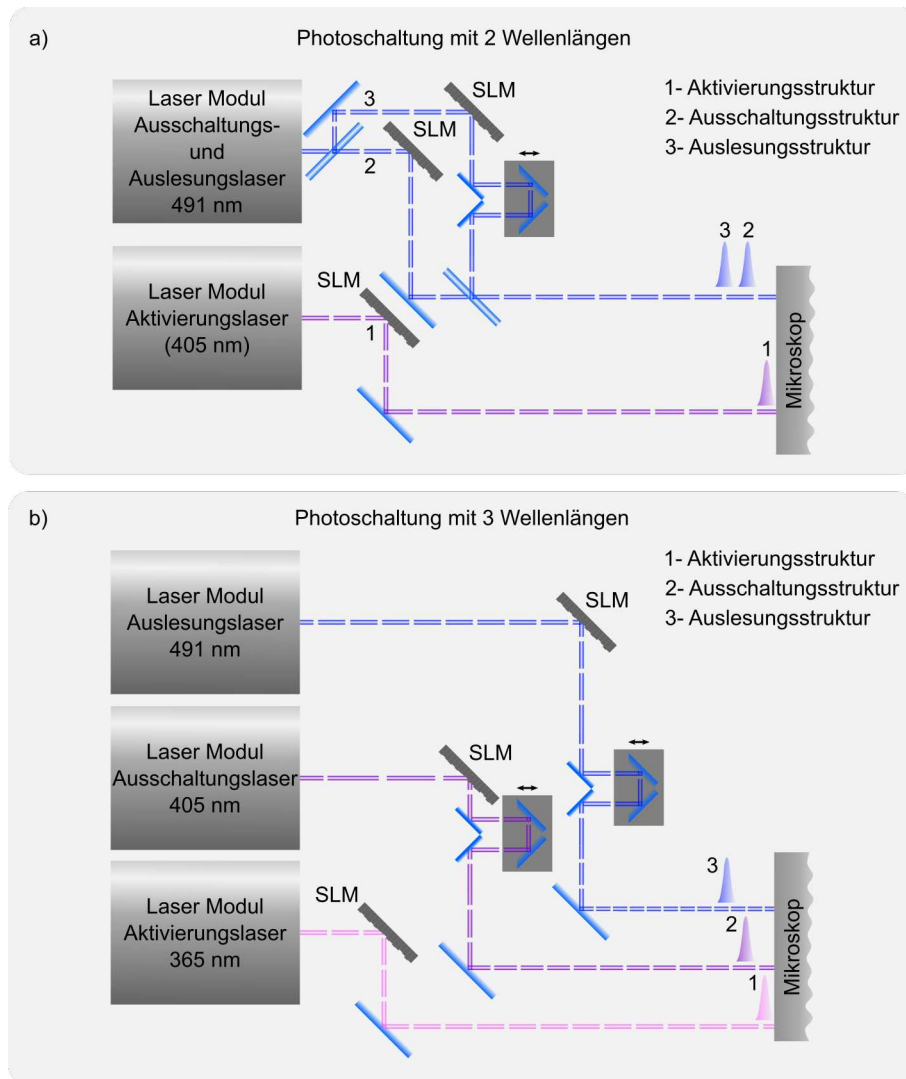


**Abbildung 46:** Schematische Darstellung einer Realisierungsmöglichkeit eines STED-Speckle Systems mit einem STED-Laser (rot; 600 nm) und einem Anregungslaser (grün; 520 nm). Der STED-Laser wird durch ein Strahlteilersystem bestehend aus Spiegeln und Strahlteilern in 4 separate STED-Felder aufgeteilt. Jedes STED-Feld besitzt einen eigenen SLM bzw. Specklegenerator, um dieselben oder unterschiedliche Specklefelder zu generieren. Des Weiteren ist jeder STED-Strahlengang mit einer Verzögerungseinheit ausgestattet. Der Anregungslaser besitzt ebenfalls im Strahlengang ein SLM bzw. ein Specklegenerator. Die STED-Specklefelder werden über Strahlteiler zusammengeführt. Sowohl die STED-Specklefelder als auch das Anregungsfeld wird in das Mikroskop eingekoppelt.

gung der STED-Specklefelder ein Hochleistungs-Laser benötigt, da bei einer großen Anzahl an STED-Specklefeldern mit Verlusten, wie sie oben beschrieben sind, gerechnet werden muss. Dieser Laser muss durchstimmbare sein und ein breites Frequenzspektrum abdecken. Deshalb wird für die Entwicklung eines solchen höchstauflösenden Mikroskopie-Systems eine neue Entwicklung im Bereich der Lasertechnik benötigt und kann nur durch eine Kooperation realisiert werden. Jedoch besitzt die Speckle-STED Mikroskopie gegenüber der normalen STED-Mikroskopie [5] einen großen zeitlichen Vorteil, da es sich bei der Nutzung von Speckle-Feldern um ein Weitfeld-Verfahren handelt und damit große Bildausschnitte schneller aufgenommen werden können.

#### 4.4.3 RESOLFT-Mikroskopie

Beide in Kapitel 4.3.3 dargestellten Simulationen für die zwei betrachteten photoschaltbaren Proteine zeigen eine deutliche Separierung der Auslesestrukturen in den effektiven Auslesespecklefeldern (siehe Abbildung 44a und b unten rechts) gegenüber den normalen Auslesespecklefeldern (siehe Abbildung 44a und b oben rechts). Auch die mittlere Strukturgröße der durch die Schaltprozesse erzeugten Auslesestrukturen ist gegenüber der mittleren Specklegröße der normalen Auslesespecklefelder, wie in der rechten Spalte zu sehen ist, deutlich reduziert. Somit kann über den Weg der RESOLFT-Mikroskopie [15] mit photoschaltbaren Prozessen das Konzept aus dem von mir mitentwickelten Patent [21] realisiert und die effektiven Beleuchtungsmuster reduziert werden. Neben der Verwendung von photoschaltbaren Proteinen aus der RESOLFT-Mikroskopie besteht auch die Möglichkeit der Verwendung von photokonvertierbaren Proteinen aus der PALM-Mikroskopie [113] im dargestellten Patentsystem. Hierfür kann zum Beispiel mEOS herangezogen werden [105, 114]. Mögliche Aufbau-Varianten sind schematisch in Abbildung 47 zu sehen. In beiden Varianten a) und b) müssen die verwendeten Pulse der Laser im richtigen zeitlichen Abstand zueinander die Probe beleuchten, um den beschriebenen Effekt durch Photoschaltung zu ermöglichen. Die Vor- und Nachteile des jeweiligen Aufbaus sind aus technischer Sicht in Folgendem zu sehen. Die Variante, welche drei Lasersysteme (Abbildung 47b) nutzt, ist raumgreifender, um alle Laser optimal zueinander zu justieren. Sie ist aber bezüglich Handhabung und allgemeiner Justierung des Strahlenganges einfacher als die Variante in Abbildung 47a mit zwei Lasersystemen. Bei dieser zuletzt erwähnten Variante ist die Justage des Ausschalt- und Ausleselasers kompliziert. Beide Varianten haben die Limitierung, dass sie nur für ein spezielles photoschaltbares Leuchtmittel ausgelegt sind.



**Abbildung 47:** Schematischer Aufbau für eine Nutzung photoschaltbarer Leuchtmittel bei denen a) die Auslese- und Ausschaltwellenlänge (blau) identisch und b) die Auslese- (blau) und Ausschaltwellenlänge (dunkelviolett) unterschiedlich für die Reduzierung der effektiven Beleuchtungsstruktur ist. Im Fall von identischer Ausschalt- und Auslesewellenlänge, gezeigt in a) wird der Laser über einen Strahlteiler in zwei Strahlen aufgeteilt. Jeder erzeugte Laserstrahl besitzt einen eigenen SLM bzw. Specklegenerator. Zusätzlich werden in den Strahlgängen der Ausschalt- und Auslesewellenlängen Verzögerungseinheiten eingebaut. Dies dient zum Erzeugen des Zeitversatzes der Laser auf der Probe. Alle Laserstrahlen werden dann ins Mikroskop eingekoppelt.

Das bedeutet, dass für ein weiteres Leuchtmittel weitere Laserstrahlgänge mit entsprechenden Lasern, die andere Wellenlängen emittieren, benötigt werden. Eine Alternative eröffnet sich bei Nutzung anderer Lasersysteme, wie z.B. Supercontinuum Laser [115] oder OPO Systeme [116], die aber kompliziertere Aufbauten notwendig machen.

## 5 Multi-Elektroden-Arrays für die höchstauflösende Mikroskopie

### 5.1 Einleitung

Die schnelle Entwicklung der Neurowissenschaften in den letzten Jahrzehnten ermöglicht ein immer besseres Verständnis der neuronalen Informationsprozesse und damit ein immer tieferes Verständnis von gesunden Reaktionsketten und pathophysiologischen Veränderungen bei Erkrankungen des zentralen Nervensystems. Bei neuropathologischen Veränderungen denkt man zuerst an degenerative Erkrankungen, aber auch Einflüsse z.B. durch eine veränderte synaptische Transmission bei Fehlregulation des Immunsystems oder durch andere Krankheitsbilder, wie in neuester Zeit die Corona Symptomatik zeigt, spielen bei neuronalen Prozessen eine wichtige Rolle. Hierbei kann nicht nur die Krankheit selbst im Bild und in der Signalgebung untersucht werden, sondern auch die Wirkung von spezifischen Arzneimitteln auf diese Prozesse.

Für Untersuchungen neuroimmunologischer Erkrankungen des zentralen Nervensystems werden neben elektrophysiologischen Methoden (Patch Clamp) auch optische bis hin zu höchstauflösenden lichtmikroskopischen Verfahren angewandt, die in den letzten Jahren stetig an Bedeutung gewonnen haben [8]. Mittels höchstauflösender mikroskopischer Verfahren ist es nun möglich, die laterale Auflösungsgrenze der Mikroskope von etwa 250 nm bis auf weniger als 20 nm zu reduzieren und somit Strukturveränderungen bis in den synaptischen Bereich zu beobachten. Um diese Auflösungen zu erreichen, wurden unterschiedliche Verfahren entwickelt, welche mit verschiedenen Beleuchtungsarten bzw. Wirkprinzipien arbeiten. Die Verfahren STED [5], RESOLFT [15] und SIM [6] arbeiten mit bekannten Beleuchtungsmustern, welche jedoch experimentell sehr aufwendig zu erzeugen sind. Dagegen nutzen die lokalisationsbasierten Verfahren wie PALM [99], STORM und dSTORM [51] das nichtlineare (statistische) Antwortverhalten von Fluorophoren aus und können die bisher geringste Auflösung im Bereich von 10 bis 20 nm erreichen. All diese Verfahren können für verschiedene Fragestellungen, bei denen morphologische Veränderungen durch verschiedene Krankheitsbilder ersichtlich sind, im Bereich der Neurowissenschaften eingesetzt werden. Somit stellen die höchstauflösenden Mikroskopie-Verfahren eine wichtige ergänzende Untersuchungsmethode zu den bereits vorhandenen Verfahren dar, um so Krankheitsbilder besser verstehen zu können.



Für die Betrachtung von zeitlichen Reizleitungsprozessen findet man, wie schon erwähnt, spezielle Techniken in der Elektrophysiologie. Mit Hilfe dieser Methoden können sowohl Änderungen in den Zellaktivitäten als auch in den Zellpopulationen registriert und Mechanismen der zellulären Signalverarbeitung und -weiterleitung zur Diagnostik von Krankheiten herangezogen werden [37, 38]. Grundlage sind Potential- bzw. Strommessungen nach elektrischer Reizgebung, wobei die Größe und Art der Potentiale zellspezifisch sind. Die Entwicklung der Elektrophysiologie, allgemein zur Untersuchung von Reizleitungsmechanismen über Ionenkanäle, in den Neurowissenschaften und der Herzphysiologie, begann schon Mitte des 20. Jahrhunderts und wird getrieben durch immer höhere räumliche Auflösung, einem sensitiven Nachweis und der Miniaturisierung. Zwei einfache Techniken sind manuelle und automatisierte Patch-Clamping (Voltage- oder Current-Clamp) oder Zwei-Elektroden-Voltage-Clamp Messplätze. Hierbei wird mit einer Mikropipette aus Glas, die einen Draht enthält, der in eine Elektrolyt-Lösung eintaucht, ein Patch (Ausschnitt) aus einer Membran der Zelle weggezogen und geöffnet. Bei Vorhandensein von Ionenkanälen kann ein Strom gemessen werden. Eine Aufrechterhaltung unterschiedlicher Ionenkonzentrationen in- und außerhalb der Zelle geschieht über Ionenkanäle und -transporter in der Zellmembran und das sogenannte Aktionspotential entsteht durch einen sensorisch oder elektrisch stimulierten Reiz. Die Clamp-Techniken ermöglichen Einblicke in das Verhalten der Ionenkanäle in Krankheitsstadien und das Wirken von Analyten. Sie können aber keine komplexe Netzwerkanalyse realisieren [39]. Die Betrachtung von Einzelzellen, die durch die Nutzung der Patch-Clamp-Technik ermöglicht wird, reicht ebenfalls nicht aus, um die Kommunikation von Neuronen zu verstehen und zu untersuchen. Hieraus leiten sich Vorteile der Entwicklung von sogenannten Multielektroden-Arrays (MEAs) ab, die die Untersuchung von neuronalen, aktivitätsabhängigen Änderungen der Größe, Konnektivität oder Aktivierungsmuster von neuronalen Netzen und die Stärke von synaptischen Übertragungswegen erlauben [40, 41, 42].

MEAs können:

- die räumlichen Eigenschaften der Plastizität und Konnektivität in verschiedenen Schichten innerhalb eines einzigen Schnittes aufzeigen,
- eine wesentlich längere Aufzeichnungsdauer als herkömmliche elektrophysiologische Techniken ermöglichen,



- den Einfluss von Störungen in den Signalleitungsmechanismen über einen großen Bereich abbilden und nicht nur in Einzelzellen (Netzwerkanalyse),
- Veränderungen der Signalleitung auch unter pathologischen Bedingungen aufzeigen,
- an verschiedenen Orten ohne Neusetzen von Elektroden stimulieren,
- an verschiedenen Orten Signale auslesen,
- non-invasive Messungen während der Kultivierungs- und Wachstumsphase ermöglichen.

Anwendung finden MEAs z.B. in der Verfolgung der Entwicklung oder der Differenzierung von Stammzellen, der Entwicklung von Krankheitsmodellen unter Verwendung von Hirnschnitten, Geweben oder Zellkulturen (z.B. in der Neurologie oder Kardiologie) und zur Beurteilung pharmakologischer Manipulationen für das Arzneimittel- oder phänotypische Screening oder von toxikologischen Tests. Die Entwicklung dieser Multi-Elektroden-Arrays war ein großer Fortschritt gerade hinsichtlich der Untersuchung von Neuronen in Hirnschnitten als komplexe Struktur und wurde von C.A. Thomas [117] schon 1972 eingeführt. Besondere Herausforderungen an die Entwicklung von MEAs sind:

- eine hohe räumliche Auflösung,
- Robustheit und
- eine sensitive Messwertaufnahme von kleinsten Potentialsignalen.

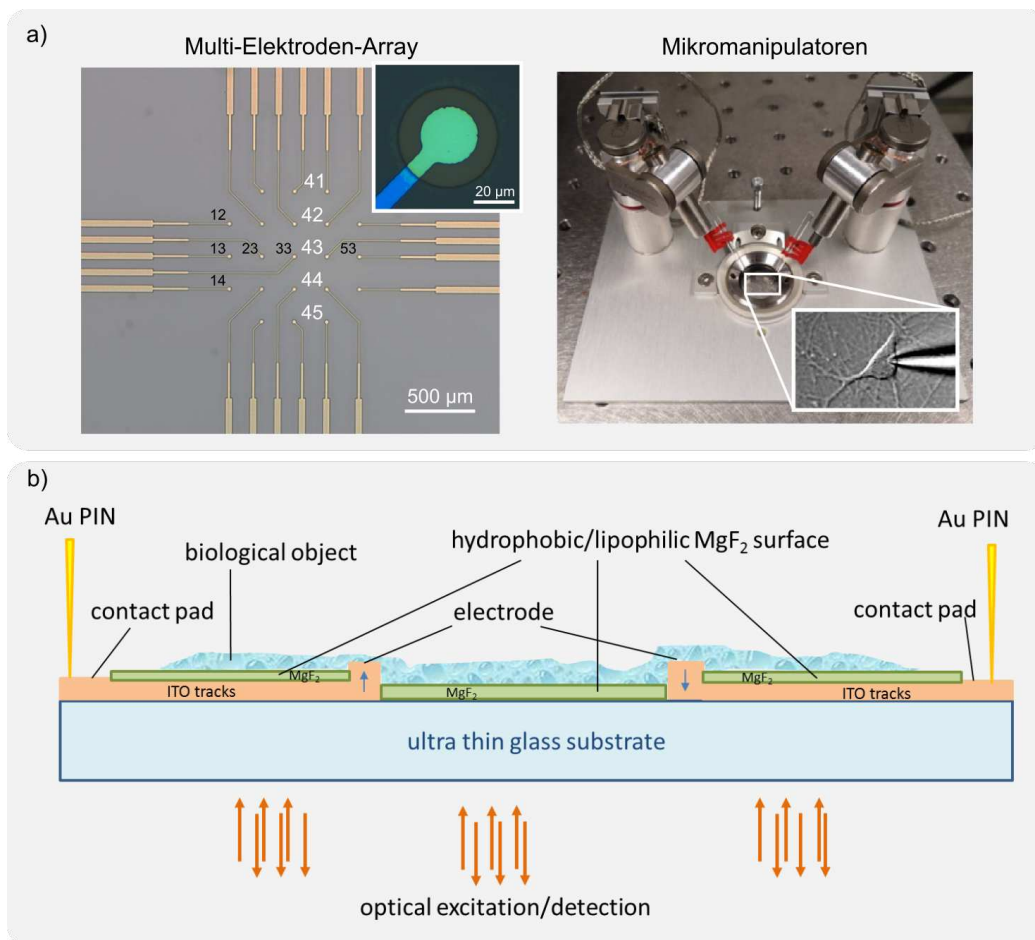
Somit ist die ständige Weiterentwicklung der MEA-Technologie getrieben von dem Wunsch nach erhöhter räumlicher Auflösung bei der Abtastung der Aktivitätsmuster sowie verbesserten Möglichkeiten zur Analyse und Reduktion der enormen Datenmengen, die bei den Experimenten im Labor anfallen.

MEAs sind ganz allgemein Chips unterschiedlicher Größe, Form, Material und Design, die in der Regel zusätzlich zu Mess- auch Anregungselektroden besitzen. Verschiedene Arten von Arrays können für eine Vielzahl von in-vitro- und in-vivo-Anwendungen genutzt werden [38, 41]. Gemeinsam ist ihnen eine parallelisierte, korrelierte, über einen längeren Zeitraum wiederholte Zellsignalmessung.

Kommerziell angebotene MEAs bestehen in der Regel aus Titanitrid/Gold-Elektroden, Ti/ITO-Tracks, TiN/ITO Pads mit elektrisch isolierender SiO<sub>2</sub>- oder SiN-Oberfläche zur Zellaufnahme. Diese Oberflächen müssen zur Haftung von biologischen Objekten durch den Anwender funktionalisiert werden. Eine solche Funktionalisierung kann über eine einmalige Silanisierung, einen toxischen Prozess, oder durch andere biologische Substanzen wie Poly-L-Lysine, Gelatine, Collagengele u.a. zur adhäsiven Oberflächenmodifikation erfolgen. Gerade bei anspruchsvollen Zelllinien in Grundlagenexperimenten und speziell bei Primärzellen ist eine Oberflächenbeschichtung für die Aufnahme der Zellkultur hilfreich oder unabdingbar. Die von mir in [43] publizierten Ergebnisse eröffnen erste Ansätze einer erfolgversprechenden elektrisch isolierenden MEA Oberflächenbeschichtung bei gleichzeitiger Funktionalisierung. Diese wird eine zusätzliche chemische Behandlung nicht mehr notwendig machen.

Wie schon beschrieben, werden verschiedenste Techniken im Bereich der neurowissenschaftlichen Forschung eingesetzt, um Krankheitsbilder besser verstehen zu können. Jedoch können diese Techniken alle nur separat angewendet werden. Die von mir entwickelte und verfolgte Idee, eine Kombination aus funktionellen (elektrophysiologischen) und morphologischen Messungen im Bereich der höchstauflösenden Mikroskopie in der neurowissenschaftlichen Forschung, stellt somit einen wichtigen Schritt dar. Hierbei können höchstauflösende Mikroskope mit Mikromanipulatoren für Einzelzellmessungen oder aber mit Multi-Elektroden-Arrays (MEA) für die Netzwerkanalyse kombiniert werden. In Abbildung 48a ist ein MEA-Chip mit 21 Elektroden und eine mögliche Halterung für Mikromanipulatoren für diese Applikation abgebildet. Entscheidend für eine solche Kombination ist die Lebendzellfähigkeit des höchstauflösenden Systems. Weiterhin ist die Möglichkeit von Aufnahmen in tieferen Gewebeschichten von Interesse, da zur Beantwortung komplexerer Fragestellungen in-vivo oder ex-vivo Experimente benötigt werden. Somit stellt ein Konzeptsystem aus Kapitel 4 eine mögliche Variante für eine solche Kombination dar. Für diese Kombination, welche auf einer von mir entwickelten Idee basiert, wurden in Kooperation mit dem Leibniz-IPHT, der FSU Jena und der EAH Jena erste Entwicklungsschritte durchgeführt. Hierfür habe ich in ersten Überlegungen eine geeignete Materialwahl aus unterschiedlichen Materialkandidaten getroffen. Erste Testversuche für Schichtkombinationen und Herstellungsparameter wurden an Beschichtungsanlagen der EAH Jena von mir in Eigenregie realisiert. Die späteren Strukturierungen und Beschichtungen in großer Stückzahl sowie die Materialcharakterisierung wurden in direkter Absprache mit mir durch

Mitarbeiter des Leibniz-IPHT vorgenommen. Die Versuche am Mikroskop sowie die Untersuchungen bezüglich der Oberflächeneigenschaften der Schichten und Schichtsysteme wurden von mir am Universitätsklinikum durchgeführt. Die Charakterisierung der elektrischen Eigenschaften der Chips erfolgte durch Mitarbeiter der FSU Jena (*IFK*) in direkter Zusammenarbeit mit mir. Da in der höchstauflösenden Mikroskopie aufgrund der obligaten Verwendung von Öl-Immersion-Objektiv mit inversen Mikroskopen gearbeitet werden muss, sind spezielle Anforderungen an die MEAs zu stellen. Das Prinzip der Kombination ist in Abbildung 48b zu sehen. Eine notwendige Anforderung ist die hohe optische Transpa-



**Abbildung 48:** a) (links) Mikroskop Bild eines 21-Elektroden Multi-Elektroden-Arrays mit Zoom (obere Ecke rechts) auf eine Elektrode. (rechts) Foto eines Haltesystems für Mikromanipulatoren mit zwei Mikromanipulatoren der Firma Kleindiek. Aufnahme einer gepatchten Zelle unter Verwendung des Haltesystems und der Mikromanipulatoren im Elyra P.1 System der Firma Zeiss. b) Schematische Darstellung des Schichtaufbaus eines MEAs für die Kombination mit einem inversen Mikroskop [43]. Zu sehen ist das Glassubstrat in Blau, die leitfähigen Tracks und Elektroden in Orange sowie die Isolierschicht, welche im zu entwickelnden System auch eine Hafteigenschaft (hydrophob und lipophil) aufweisen soll, in Grün. Der Kontakt zum Messsystem wird über Gold PINs realisiert (gelbe Spitzen). Die biologische Probe (blau gemustert) befindet sich auf der Oberfläche.

renz der elektrisch isolierenden Oberflächenmaterialien sowie der elektrischen Leiterbahnmaterialien. Diesbezüglich fiel für erste Untersuchungen die Wahl auf Indium-Zinn-Oxid (engl.: indium tin oxide - ITO) für das elektrische Leiterbahn-, Kontakt- und Pad-Material und auf Magnesiumfluorid ( $\text{MgF}_2$ ) für das funktionale Isolationsmaterial.

Eine solche Kombination könnte zum Beispiel der zeitgleichen Untersuchung und der Korrelation von morphologischen und physiologischen Prozessen in demselben Probenmaterial dienen. Höchstauflösende mikroskopische Techniken können dabei synaptische Rezeptorausstattungen und deren Veränderung untersuchen, während MEA-generierte Feldpotenziale die Netzwerkaktivität darstellen. Dies ermöglicht Rückschlüsse von Änderungen in einzelnen Synapsen auf das Netzwerk. Dies ist besonders in Hirnschnitten nach Induktion von LTP oder Präinkubation von Patientenmaterial von großem Interesse.

## 5.2 Methoden

### 5.2.1 Verwendete Beschichtungsverfahren

Das Ziel eines Materialabscheidungsprozesses ist das Aufbringen von Atomen oder Molekülen auf eine Festkörperoberfläche. Physikalische Gasphasenabschideverfahren (PVD; engl. *physical vapour deposition*) kann man in drei Teilprozesse unterteilen: die Erzeugung von Partikeln aus dem Targetmaterial und deren Überführung in die Gasphase, den Transport in der Gasphase zum Substrat und schließlich die Anlagerung und Schichtbildung auf einem Substrat. Die Bindungsstärke zwischen dem Adatom und dem Substrat wird durch eine Vielzahl von Parametern beeinflusst, wobei Adatom die Bezeichnung für ein fremdes Atom ist, welches nicht an der Substratoberfläche reflektiert wurde. Diese Parameter sind zum Beispiel Energie des Adatoms, Partialdruck, Substrattemperatur usw. Es bilden sich bei der Anlagerung auf der Substratoberfläche unterschiedliche Wachstumsmodi aus, da sich die Fremdatome durch Oberflächendiffusionsprozesse auf der Oberfläche bewegen können. Das Schichtwachstum kann man grundsätzlich in drei unterschiedliche Grenzflächenmechanismen unterteilen [118, 119, 120].

- Frank-van der Merwe-Wachstum

Die neue Schicht wächst Monolage für Monolage auf dem Substrat auf. Diese Wachstumsform wird oft als Lagenwachstum bezeichnet und tritt auf, wenn die Wechsel-

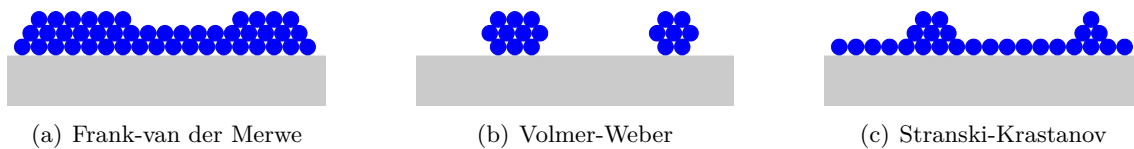
wirkung zwischen dem Adatom und dem Substrat größer ist als diejenige zwischen Adatomen untereinander.

- Volmer-Weber-Wachstum

Beim Volmer-Weber-Wachstum entsteht beim Abscheiden keine Fläche, sondern kleine Inseln, weshalb dieses Wachstum auch als Inselwachstum bekannt ist. Bei weiterer Schichtabscheidung wachsen die Inseln soweit, dass sie sich berühren und somit eine zusammenhängende Schicht bilden. Dieses Wachstum tritt auf, wenn die Wechselwirkung der Targetatome untereinander größer ist als die Wechselwirkung zwischen Targetatom und Substrat.

- Stranski-Krastanov-Wachstum

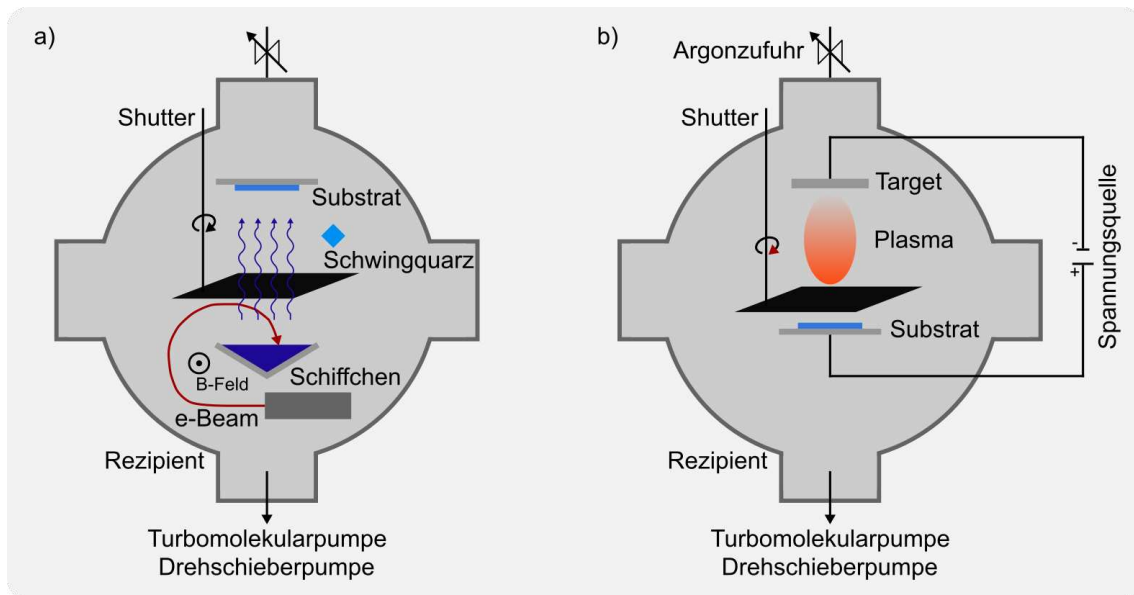
Wird eine Kombination aus beiden vorher genannten Wachstumsarten beobachtet, spricht man vom Stranski-Krastanov-Wachstum. Hierbei wachsen die ersten Monolagen in Form eines Frank-van der Merwe-Wachstums auf. Die weiteren Schichtlagen bilden auf den ersten Monolagen kleine Inseln nach dem Prinzip des Volmer-Weber-Wachstums.



**Abbildung 49:** Schematische Darstellung der möglichen Wachstumsarten für dünne Schichten. a) Frank-van der Merwe-Schichtwachstum zeigt ein monolagiges Wachstum der Schicht. Es tritt auf, wenn die Wechselwirkung zwischen Adatomen und Substrat größer ist als zwischen den Adatomen. b) Volmer-Weber-Schichtwachstum zeigt ein Inselwachstum auf dem Substrat. Inseln wachsen beim Beschichtungsprozess weiter und bilden im Verlauf der Beschichtung eine zusammenhängende Fläche. Es tritt auf, wenn die Wechselwirkung zwischen den Adatomen größer als zwischen den Adatomen und Substrat ist. c) Stranski-Krastanov-Schichtwachstum zeigt eine Kombination aus Frank-van der Merwe und Volmer-Weber-Schichtwachstum [118, 119, 120].

Für die Schichtherstellung der MEA-Chips wurden zwei Beschichtungsverfahren aus dem Bereich der physikalischen Gasphasenabscheidung (PVD; engl. *physical vapour deposition*) verwendet [121]. Das Verfahren des Elektronenstrahlverdampfens (EBE, engl. *Electron Beam Evaporation*) wurde für die Herstellung der  $\text{MgF}_2$ -Schichten eingesetzt, welches ein thermisches Beschichtungsverfahren für Feststoffe [122] ist. Das Beschichtungsmaterial

( $\text{MgF}_2$ ) wird in einem Tiegel (Schiffchen) im Rezipienten platziert und das Substratmaterial (Glassubstrat) gegenüber auf dem heizbaren Substrathalter befestigt. Die Evakuierung des Rezipienten erfolgt durch eine Vorvakuumpumpe und bei Erreichen eines Druckes von  $< 1 \cdot 10^{-1}$  Torr durch eine Turbomolekularpumpe auf einen Druck von  $1 \cdot 10^{-6}$  Torr. Das Aufheizen des Beschichtungsmaterials im Tiegel geschieht nicht über das Heizen des Tiegels, wie bei anderen thermischen Verfahren, sondern durch einen Elektronenstrahl. Damit erreicht man mit dem EBE-Verfahren im Gegensatz zu anderen thermischen Beschichtungsverfahren hohe Teilchenenergiedichten und kann hohe Verdampfungsraten erzeugen. Der Elektronenstrahl wird in das Verdampfungsmaterial gelenkt und heizt das Beschichtungsmaterial auf. Das Beschichtungsmaterial wird aufgeschmolzen und danach in die Gasphase überführt. Das Materialgas breitet sich gerichtet im Raum aus und kondensiert auf dem Substrat. Die Abscheiderate bzw. die Schichtdicke kann direkt durch einen Schwingquarz gemessen werden. Hierbei misst man die Änderung der Schwingungsfrequenz des kalibrierten Quarzes. Die Schwingungsfrequenz des Quarzes ändert sich entsprechend der Dicke der aufgetragenen Schicht aus der Gasphase des Beschichtungsmaterials. In Abbildung 50a ist ein schematischer Aufbau einer EBE-Anlage zu sehen. Für die Herstellung der ITO-Schichten wurde die Kathodenzerstäubung (engl. *Sputtern*) eingesetzt [123]. Die genutzte Anlage besteht aus einem Rezipienten, in welchem sich der Probenhalter und die Sputterquellen mit dem entsprechenden Target (ITO) sowie die zugehörigen Shutter befinden. Nach dem Einbau der Proben wird der Rezipient durch eine Vorvakuumpumpe und bei Erreichen eines Druckes von  $< 1 \cdot 10^{-1}$  mbar durch eine Turbomolekularpumpe auf einen Druck von  $1 \cdot 10^{-5}$  mbar abgepumpt. Nach Erreichen dieses Enddruckes wird der Rezipient mit Argon als Prozessgas bis zu einem Arbeitsdruck von  $5 \cdot 10^{-3}$  mbar geflutet. Da es sich beim ITO um ein leitfähiges Targetmaterial handelt, wurde das DC-Magnetron-Sputtern als Verfahren angewendet. Dieses Verfahren zeichnet sich durch den Beschuss des Targetmaterials mit Ionen eines Inertgases aus. Dazu wird eine Gleichspannung mit dem Target als Kathode verwendet. Das Zünden des Plasmas wird durch eine hohe Spannung initiiert. Die weitere Ionisierung des Gases ist ein selbsttragender Prozess. Das angelegte elektrische Feld beschleunigt die positiv geladenen Gasionen, welche dann auf das Target treffen. Durch den Impulsübertrag und im Target dadurch ausgelöste Stoßkaskaden können nun Teilchen aus dem Target herausgeschlagen werden, welche auf der gegenüberliegenden Probe kondensieren. Die Ionisierungswahrscheinlichkeit wird in der verwendeten Anlage weiter gesteigert, indem die Elektronenbahn durch ein von außen angelegtes Magnetfeld gekrümmt wird. Das Prinzip wird als Magnetron-Sputtern bezeichnet. Durch den verlän-



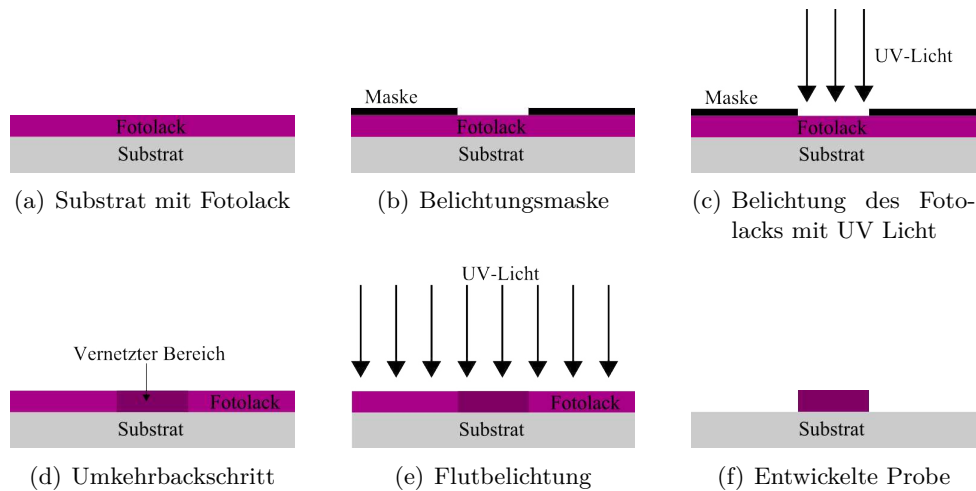
**Abbildung 50:** a) Schematischer Aufbau einer EBE-Anlage für die Dünnschichtherstellung. Im Rezipienten ist das Schiffchen mit dem Beschichtungsmaterial, der Shutter, welcher das Substrat und das Schiffchen räumlich trennt, sowie der Elektronenstrahl (rot), welcher durch ein B-Feld in das Schiffchen gelenkt wird, zu sehen. b) Schematischer Aufbau einer DC-Sputteranlage für die Dünnschichtherstellung. Im Rezipienten ist das Target und der Substrathalter mit dem Substrat, welche mit einer Spannungsquelle verbunden sind und als Kathode und Anode dienen, zu sehen. Weiterhin ist der Shutter, welcher das Target und das Substrat räumlich trennt, sowie die Plasmakeule, welche sich vom Target zum Substrat ausbreitet, dargestellt.

geren Weg der Elektronen steigt die Stoßwahrscheinlichkeit mit den Argon-Atomen. Somit wird die Ionisierungswahrscheinlichkeit erhöht, da mehr Argon-Ionen erzeugt werden. Da nun mehr Ionen vorhanden sind, um in Wechselwirkung mit dem Targetmaterial zu treten, wird mehr Targetmaterial herausgeschlagen und so die Sputterrate deutlich gesteigert. Der schematische Aufbau einer DC-Sputteranlage ist in Abbildung 50b dargestellt.

### 5.2.2 Verwendetes Strukturierungsverfahren

Zur Herstellung der  $\text{MgF}_2$ -Strukturen und der ITO Leiterbahnen für die MEAs wurde ein Maskenverfahren verwendet. In einem solchen photolithografischen Strukturierungsprozess kann man auf Positiv- oder Negativresiste zurückgreifen, die über eine Maskenstruktur belichtet werden. Verwendet man einen Negativresist, vernetzen die belichteten Bereiche und härten aus (siehe Abbildung 51). Im Falle der MEA-Herstellung erfolgte die ITO-Strukturierung mit einem Positivprozess und die  $\text{MgF}_2$ -Strukturierung mit einem Negativprozess. Für die komplexere Negativstrukturierung sind die grundlegenden





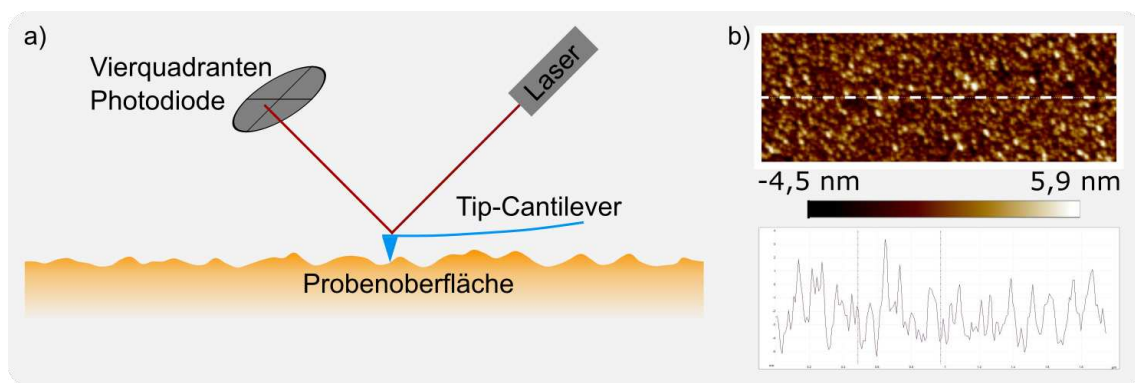
**Abbildung 51:** Beispielprozess: Herstellungsschritte einer Lackstruktur mittels Fotolithografie (Negativprozess) für eine nachfolgende Lift-off Strukturierung.

Verfahrensabläufe für die Herstellung einer Lift-off Struktur in Abbildung 51 schematisch dargestellt und können in [124] nachgelesen werden. Alle Prozessabläufe finden unter Reinraumbedingungen statt, um jegliche Kontamination mit Staubpartikeln möglichst zu vermeiden. Zuerst wird das Substrat mit Aceton und Isopropanol gereinigt und für 120 Sekunden bei  $100^{\circ}\text{C}$  ausgeheizt, um alle Wasserreste von der Oberfläche zu entfernen und so eine gute Haftung des Fotolacks auf der Substratoberfläche zu ermöglichen. Danach wird der Fotolack AZ<sup>®</sup> 5214E der Firma MicroChemicals mit Hilfe einer Pipette auf die ausgeheizte Probe gegeben. Durch die anschließende Nutzung eines Spin Coaters mit 4840 Umdrehungen pro Minute wird die Dicke des Lacks auf etwa  $1,4\ \mu\text{m}$  verringert. Dieser Lack ermöglicht bei der verwendeten Lackdicke und der weiteren Prozessierung relativ problemlos eine spätere Lift-off Strukturierung von Schichten bis zu einer Schichtdicke von ca. 400 nm. Hierbei wird das Substrat mittels Unterdruck auf dem Drehteller fixiert. Der nachfolgende Backschritt bei  $100^{\circ}\text{C}$  über eine Zeit von 600 Sekunden trocknet den Lack. Die fertig belackte Probe wird nun mit UV-Licht belichtet. Dabei gibt die Chrom-Maske zwischen Lampe und Probe die spätere Struktur vor. Da dieser Prozess in Kontaktbelichtung (Probe und Maske in direktem Kontakt) durchgeführt wird, kommt es zu einem 1:1 Übertrag der Maskenstruktur auf die Probe. Nach einer Belichtungszeit von 10 Sekunden muss die Probe erneut bei  $100^{\circ}\text{C}$  für 900 Sekunden ausgeheizt werden. Dies ist nötig, da bei der vorhandenen Chrom-Maske der Negativprozess genutzt wird. Beim Umkehrprozess wird die Probe erneut geheizt, damit sich die vorher belichteten Fotolackstellen stark vernetzen und so beim Entwickeln nicht gelöst werden. Nach Beendigung des Umkehrbackschrittes wird die Probe erneut für 99 Sekunden belichtet. Dies geschieht

in Flutbelichtung. Nun wird die Probe mit Hilfe des Entwicklers 726MIF entwickelt und anschließend mit destilliertem Wasser gereinigt.

### 5.2.3 Verfahren zur Struktur- und Oberflächencharakterisierung

Für die Oberflächencharakterisierung wurde ein Rasterkraftmikroskop (AFM, engl. *atomic force microscope*) im tapping mode verwendet (*Dimension Edge, BRUKER; Tap300Al-G, Bidget Sensors*) [125]. Mit dem AFM können quantitative Aussagen über die Oberflächen-topologie getroffen werden. Es wird mit einer Spitze, welche an einem Federbalken (Cantilever) angebracht ist, über die Oberfläche gescannt. Der Cantilever besitzt eine weiche Federkonstante und somit eine hohe Resonanzfrequenz ( $\omega = 10 - 100$  kHz). Die Genauigkeit der Konturbestimmung hängt stark vom Radius der Messspitze ab (allg.  $r = 4 - 30$  nm). Es handelt sich hierbei um monoatomare Spitzen aus harten Materialien (z.B. Diamant oder Siliziumverbindungen), welche eine pyramidenförmige Struktur aufweisen. Die Auslenkung der Spitze wird durch die Reflexion eines Laserstrahls gemessen. Dieser wird über einen Spiegel auf der Rückseite des Cantilevers auf eine Viersegment-Photodiode gelenkt. Somit kann die während des Scannens auf die Spitze wirkende Kraft gemessen werden. Aus der Kraft wird das Oberflächenprofil, wie in Abbildung 52b zu sehen ist, erstellt. Der Aufbau eines AFM ist in Abbildung 52a dargestellt. Der Scanbereich eines AFM beträgt typischerweise  $10 - 100 \mu\text{m}$  in x- und y-Richtung. Neben dem beschriebenen Lichtzeigerprinzip



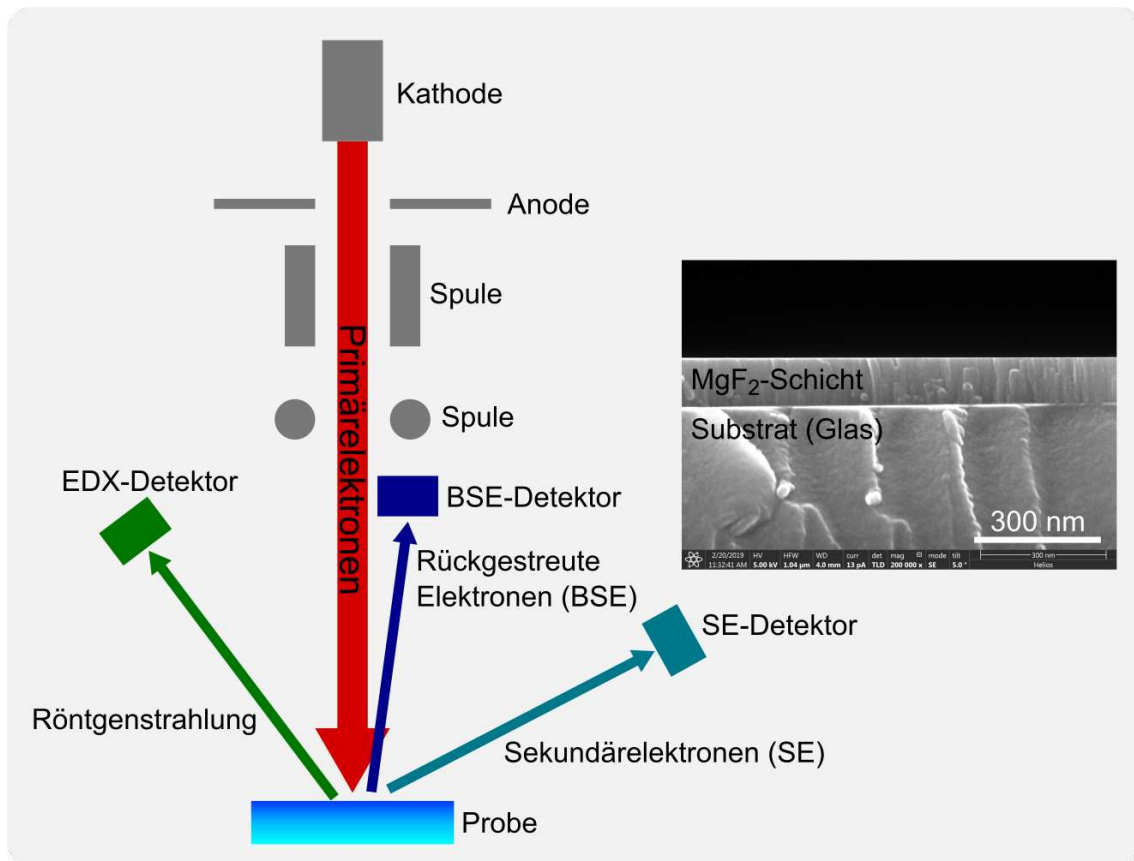
**Abbildung 52:** a) Schematischer Aufbau eines AFM im Contact mode. Zu sehen ist der Cantilever mit der AFM Spitze (blau), welcher über die Probenoberfläche (orange) gefahren wird. Die Veränderung der Höhe wird mittels Laserstrahl (rot), welcher auf der Oberseite des Cantilevers reflektiert und durch eine Vierquadranten Photodiode detektiert wird, vermessen. b) Rauheit einer vermessenen Oberfläche in Farbcodierung (oben) und die Höhenveränderungen eines horizontalen Schnittes durch die Bildmitte (weiße gestrichelte Linie; unten) [43].

kann auch eine kapazitive Messung erfolgen. Diese ist nur bei leitfähigen Materialien nutzbar. Es wird die kapazitive Änderung zwischen Messspitze und Oberfläche vermessen und daraus die Oberflächentopologie bestimmt. Des Weiteren existieren 3 unterschiedliche Betriebsmodi für ein AFM. Diese sind:

- Contact mode
- Non-contact mode
- Tapping mode.

Beim Contact mode wird die Spitze ständig mit einer konstanten Kraft gegen die Oberfläche gedrückt. Beim Abrastern der Oberfläche ergibt sich eine Abweichung von der konstanten Kraft, die gemessen wird. Im Non-contact mode rastert die Spitze die Probe berührungslos ab. Der Cantilever wird nahe der Resonanzfrequenz zum Schwingen angeregt. Hierbei werden abstandsabhängige Dämpfungen der Oszillation (Oszillationsamplitude, Phase und Frequenz) des Cantilevers gemessen. Beim Tapping mode wird die Spitze bei jeder Schwingung auf die Probenoberfläche abgesetzt.

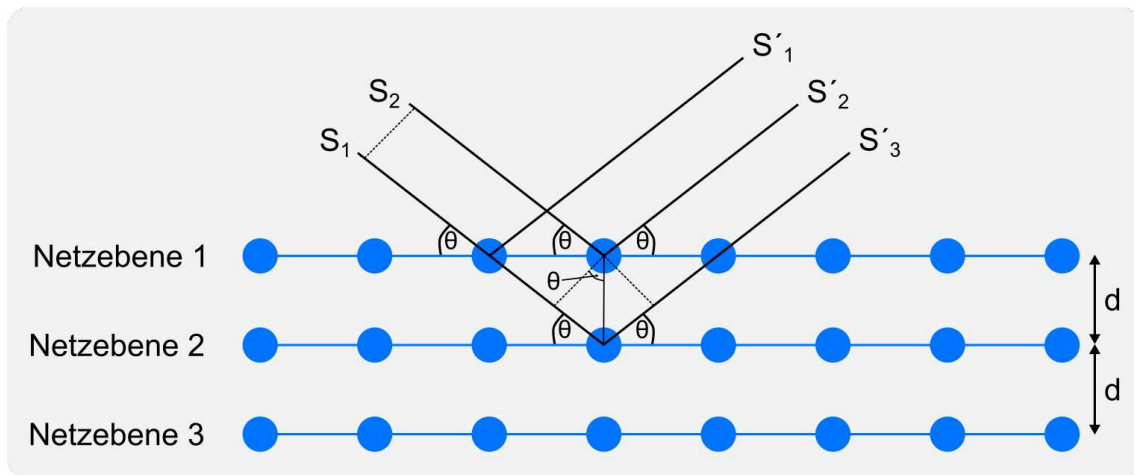
Eine weitere Technik, die zur Schichtcharakterisierung eingesetzt wurde, ist das Rasterelektronenmikroskop (REM; *FEI Helios NanoLab G3 UC, ThermoFisher Scientific*) [3]. Bei einem REM handelt es sich um ein Mikroskop, bei dem mit einem Elektronenstrahl die Probe abgescannt wird. Der Elektronenstrahl wird in der Kathode erzeugt und bis zur Anode beschleunigt. Danach findet man verschiedene Spulenanordnungen im Strahlengang, welche den Elektronenstrahl fokussieren und in x- und y-Richtung ablenken. Die zu untersuchenden Oberflächen können so mit einer Vergrößerung von 10 bis 10000-fach dargestellt werden. Somit ist es je nach Fokussierung des Elektronenstrahls unter optimalen Bedingungen möglich, Strukturgrößen von 2 bis 6 nm aufzulösen. In Abbildung 53 ist ein schematischer Aufbau eines REMs und eine seitliche Bruchkantenaufnahme von einem Glas-Substrat mit einer  $\text{MgF}_2$ -Schicht zu sehen. Bei der Wechselwirkung der Primärelektronen mit der Probe entstehen unterschiedliche Strahlungsarten, die als Signale detektiert werden können. Das sind vor allem die für eine Abbildung notwendigen Sekundärelektronen (SE), die rückgestreuten Elektronen aus dem Primärstrahl (BSE), sowie Bremsstrahlung durch die Wechselwirkung der Primärelektronen mit den Elektronen der Probe (Röntgenstrahlung). Die Röntgenstrahlung kann zur Elementaranalyse (EDX) verwendet werden. Jedoch muss die Probenoberfläche für REM-Untersuchungen eine gewisse



**Abbildung 53:** a) Schematischer Aufbau eines REMs. Zu sehen ist die Kathode an der Elektronenkanone und die Anode zur Beschleunigung der Elektronen. Danach sind Spulen angebracht, welche über magnetische Felder den Elektronenstrahl in x- und y-Richtung ablenken und fokussieren. Verschiedene Detektoren ermöglichen die Auswertung der unterschiedlichen Signale. Zu nennen sind hauptsächlich die rückgestreuten Elektronen (BSE), die Sekundärelektronen (SE) und die Röntgenstrahlung bzw. Bremsstrahlung [3]. Des Weiteren ist eine REM-Aufnahme einer Bruchkante eines Glas-Substrats mit einer MgF<sub>2</sub>-Schicht zu sehen.

Leitfähigkeit aufweisen, um eine Aufladung der Probe zu vermeiden. Besitzt eine Probe keine entsprechende Leitfähigkeit, so kann sie durch eine zusätzliche Beschichtung, zum Beispiel mit Kohlenstoff erreicht werden.

Weiterhin wurde die Röntgendiffraktometrie (XRD, engl. *X-Ray Diffraction*) zur Bestimmung der Kristallstruktur bzw. der Kristallinität der dünnen Schichten eingesetzt [126], da viele Schichteigenschaften von der Kristallinität abhängig sind. Die Kristallinität wiederum wird stark von den Beschichtungsparametern und damit durch die Wachstumsbedingungen beeinflusst. Mittels XRD können Aussagen über die Schichtzusammensetzung, die Wachstumsarten, wie ein- oder polykristallines Wachstum, die Textur und die Korngröße getroffen oder die Änderung der Gitterkonstanten beobachtet werden. Insbesondere hän-



**Abbildung 54:** Schematische Darstellung der Beugung am Kristallgitter mit 3 Netzebenen mit dem Abstand  $d$ . Es entsteht eine konstruktive Interferenz bei Erfüllung der Bragg-Bedingung bei einem Einfallswinkel  $\Theta$  für Weglängenunterschiede  $n\lambda = 2d \cdot \sin \Theta$  [126].

gen die gewünschten lipophilen und hydrophoben Eigenschaften einer Schicht stark von den genannten Parametern ab.

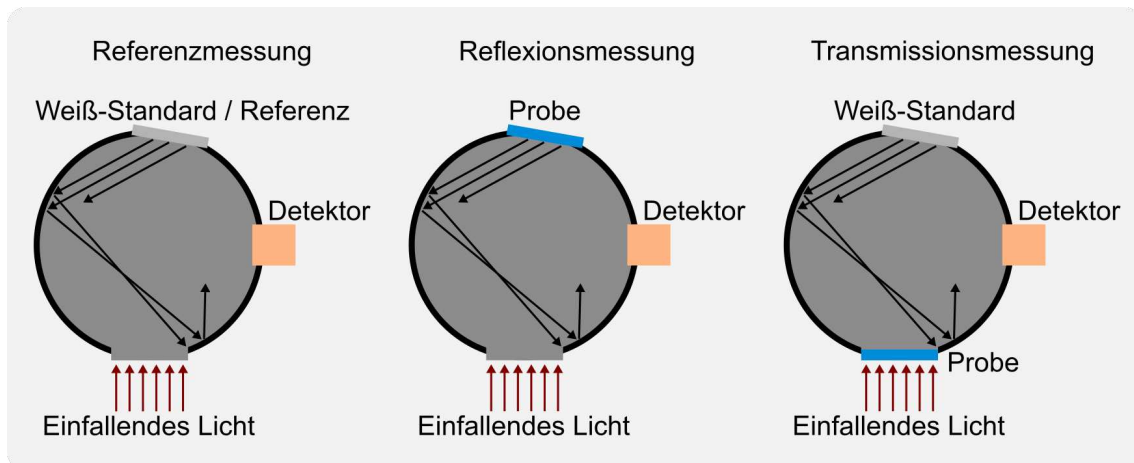
Ein  $\Theta$ - $2\Theta$ -Scan ermöglicht Aussagen zur kristallinen Orientierung der Schicht. Hierbei wird die Bragg-Beugung (Gleichung 20) verwendet.

$$n \cdot \lambda = 2d_{hkl} \cdot \sin \Theta \quad (20)$$

( $hkl$ ) sind die sogenannten Millerschen Indizes, welche die Lage der Schar von parallelen Netzebenen im reziproken Gitter beschreiben.  $n$  bezeichnet in der Gleichung die Brechzahl,  $\lambda$  die Wellenlänge,  $\Theta$  den Beugungswinkel und  $d$  den Gitterabstand. Ein solcher  $\Theta$ - $2\Theta$ -Scan zeigt unter bestimmten Winkeln  $\Theta$  Reflexe, für die die Bragg-Bedingung (Gleichung 20) gilt (Abbildung 54). Beim Nachweis dieser Reflexe liegen die Netzebenen mit dem Abstand  $d_{hkl}$  parallel zur Oberfläche. Der Netzebenenabstand  $d_{hkl}$  ist abhängig von der Gitterstruktur der zu untersuchenden Kristalle. ITO und  $\text{MgF}_2$  weisen einfache kubische Gitterstrukturen auf. Der Netzebenenabstand für kubische Gitter ergibt sich aus  $1/d_{hkl}^2 = h^2 + k^2 + l^2/a^2$ , wobei  $a$  die Raumachsen darstellt. Die Gitterkonstante kann aus der Winkellage des Reflexes und dem daraus berechneten Netzebenenabstand  $d_{hkl}$  und durch die Zuordnung der Millerschen Indizes ermittelt werden.

### 5.2.4 Verfahren zur optischen Charakterisierung

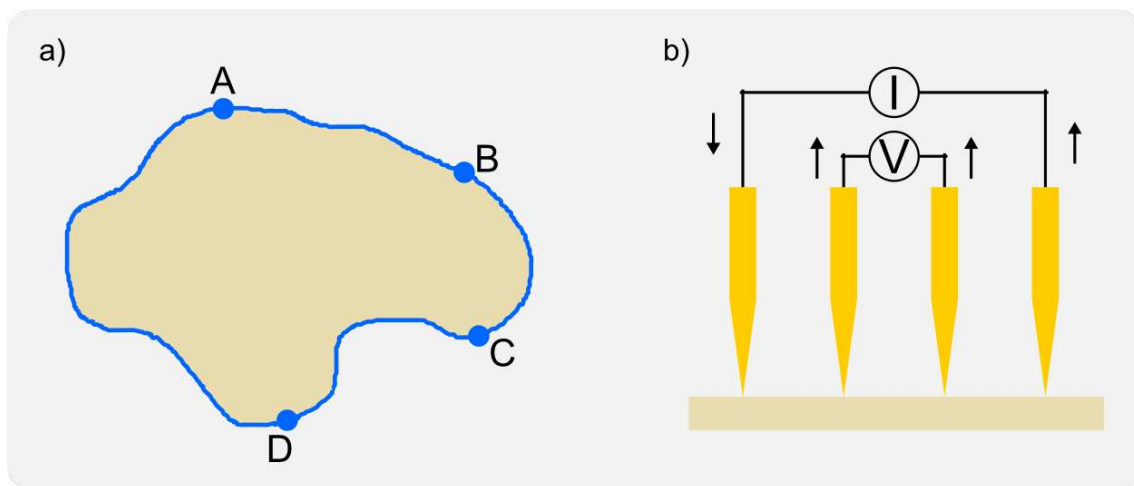
Die optische Charakterisierung der Schichten erfolgte mittels Spektrometer (Lambda 900, *Perkin Elmer Instruments*). Das genutzte Spektrometer scannt vom UV- bis in den NIR-Spektralbereich (200 - 2400 nm). Es wurden Transmissions-, Reflexions- und Extinktionsmessungen an den Schichtsystemen durchgeführt. Für die spektrale Zerlegung des Lampenlichtes werden in diesem Gerät Gitter verwendet. Allgemein ist dies aber auch über Prismen möglich [127]. Durch die Erweiterung des Spektrometers mit einer Ulbrichtkugel konnten die Parameter integral über große Flächen und Raumwinkel bestimmt werden. Das Messprinzip mit einer Ulbrichtkugel für die Referenz-, Transmissions- und Reflexionsmessung ist in Abbildung 55 zu sehen. Die Absorption ergibt sich aus der Subtraktion von Transmission und Reflexion. Für die Referenzmessung wird ein Weiß-Standard verwendet. Durch Nutzung einer Ulbrichtkugel wird nicht nur der direkte Anteil der transmittierten und reflektierten Strahlung sondern, auch der Streulichtanteil im Halbraum berücksichtigt.



**Abbildung 55:** Dargestellt sind die drei Messschritte eines Spektrometers mit Ulbrichtkugel. (links) Darstellung der Referenzmessung mittels Weiß-Standard ohne Probe. (Mitte) Darstellung der Reflexionsmessung in einer Ulbrichtkugel, wobei die Probe den Platz des Weiß-Standards einnimmt und das reflektierte Licht am Detektor gemessen wird. (rechts) Darstellung der Transmissionsmessung in einer Ulbrichtkugel. Hierbei wird das transmittierte Licht der Probe vermessen, welches in die Ulbrichtkugel eintritt.

### 5.2.5 Verfahren zur elektrischen Charakterisierung

Zur elektrischen Charakterisierung der MEA-Strukturen wurden 4-Punktmessungen durchgeführt. Eine 4-Punktmessung kann allgemein als Van der Pauw Anordnung (Abbildung 56a) oder vereinfacht als lineare Anordnung (Abbildung 56b) ausgelegt sein. Für die Charakterisierung der MEA-Strukturen wurde entsprechend der in Abbildung 56b gezeigten schematischen Messanordnung über die zwei äußeren Elektroden ein Strom angelegt und über die beiden inneren Elektroden das Potential (entsprechender Kontaktpadabgriff) gemessen [128, 129]. Die Elektroden wurden dabei über eine leitfähige Folie mit einem definierten Widerstand miteinander verbunden. Mit Hilfe dieser Verfahrensweise kann überprüft werden, ob die Isolation der  $\text{MgF}_2$ -Schicht (siehe Kapitel 5.3.3) gegeben ist.



**Abbildung 56:** a) Darstellung einer 4-Punktmessung nach der Van der Pauw Methode [129]. b) Darstellung einer einfachen linearen Anordnung von Messspitzen.

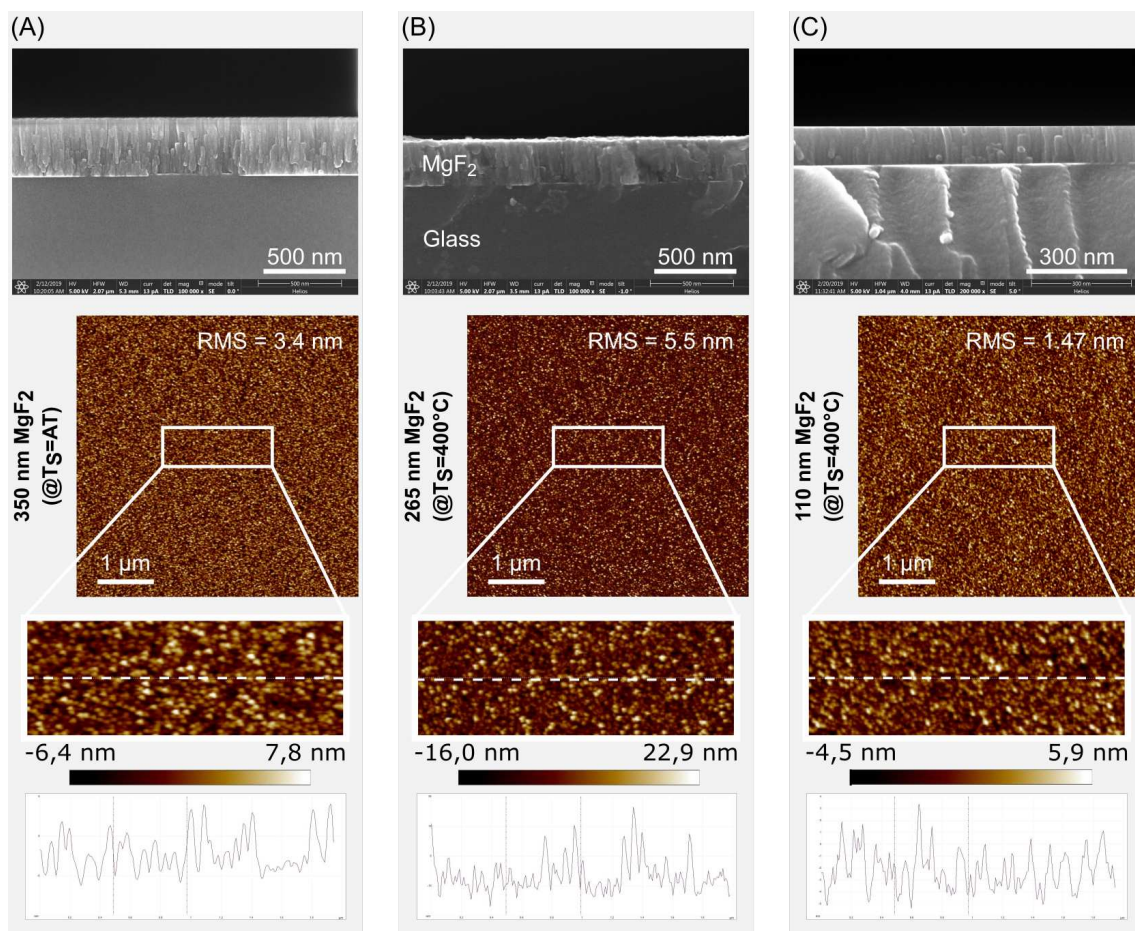
## 5.3 Ergebnisse

### 5.3.1 Strukturcharakterisierung der MEAs

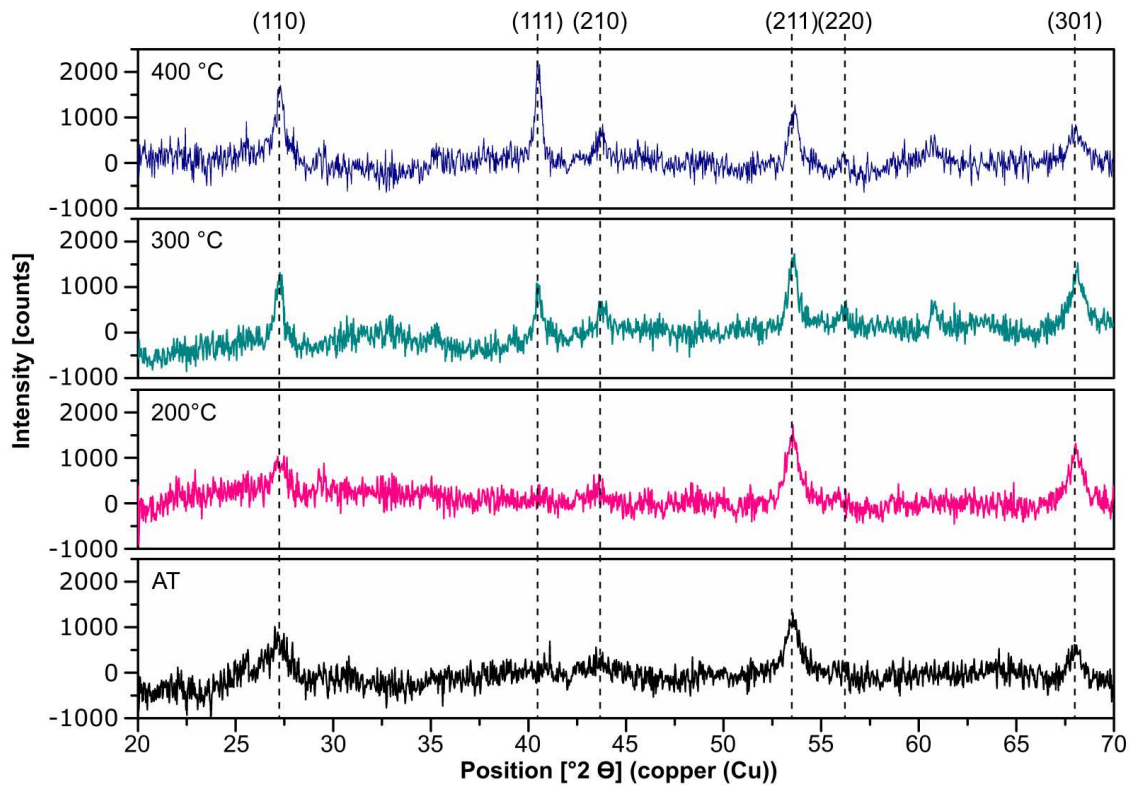
AFM- sowie Querschnitts-REM-Aufnahmen zeigen in Abbildung 57 die Werte der Rauigkeits- und Schichtstrukturentwicklung in Abhängigkeit von Substrattemperatur und Schichtdicke. Die Aufnahmen wurden, wie in Kapitel 5.2.3 beschrieben, generiert. Die obere Reihe zeigt REM-Aufnahmen der  $\text{MgF}_2$ -Schicht auf dem Glas-Coverslip im Querschnitt. Somit



kann die Körnung und die Schichtwachstumsstruktur untersucht werden. Die unteren Reihen zeigen AFM-Oberflächen-Aufnahmen der  $\text{MgF}_2$ -Schicht mit den jeweiligen Abscheidesubstrattemperaturen und Schichtdicken. Zusätzlich sind die RMS-Werte (Oberflächenrauheit, RMS - Root Mean Square) der einzelnen Schichten in der mittleren Reihe zu sehen. Die RMS-Werte variieren von 3,4 nm (links), 5,5 nm (Mitte) bis 1,47 nm (rechts). In der unteren Reihe sind vergrößerte Ausschnitte aus den AFM-Aufnahmen der jeweiligen Oberflächen und ein Rauheitsprofil entlang eines Schnittes (gestrichelte Linie) dargestellt. Zusätzlich zu den Oberflächenparametern wurde auch die Kristallstruktur von den  $\text{MgF}_2$ -Schichten, die bei unterschiedlichen Substrattemperaturen aufwuchsen, untersucht. Die Kristallinität hat Einfluss auf die Schichteigenschaften (optische, elektrische und chemi-



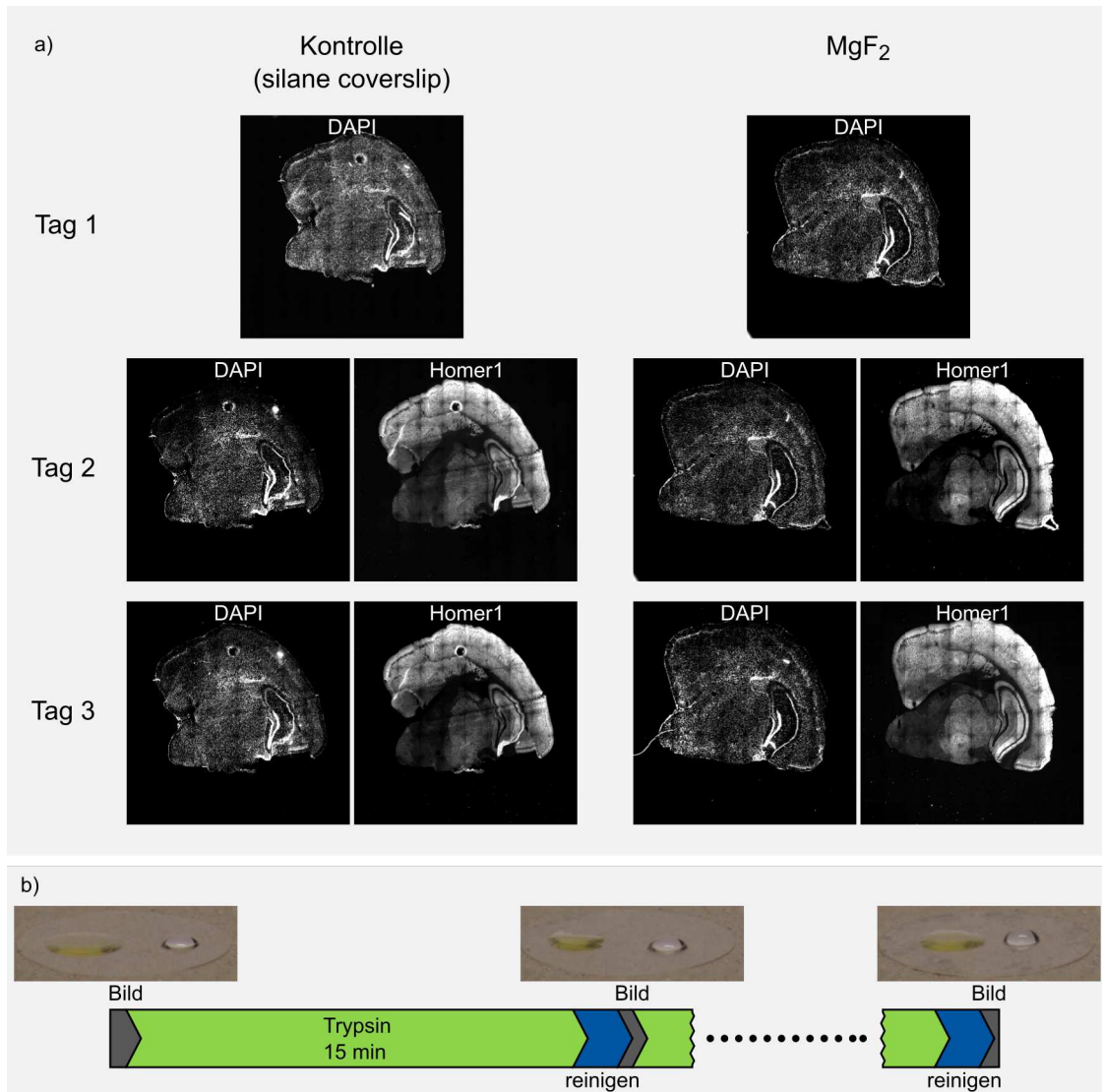
**Abbildung 57:** (obere Reihe) Querschnitts-REM-Aufnahmen von  $\text{MgF}_2$ -Schichten mit unterschiedlichen Schichtdicken bei einer Beschleunigungsspannung von 5 kV. (untere Reihe) AFM-Aufnahmen ( $5 \times 5 \mu\text{m}^2$ ) mit RMS-Rauheitswerten der Schichtoberflächen und vergrößerten Bereichen mit den entsprechenden Höhenprofilen (Schnitt bei gestrichelter Linie). Die Helligkeit verdeutlicht die Oberflächenmorphologie der  $\text{MgF}_2$ -Schicht. Die  $\text{MgF}_2$ -Schichten wurden mit unterschiedlicher Dicke auf verschiedenen beheizten Glassubstraten hergestellt. (A)  $d = 350 \text{ nm}$ ,  $T_s = \text{Umgebungstemperatur (AT)}$ , (B)  $d = 265 \text{ nm}$ ,  $T_s = 400^\circ\text{C}$ , (C)  $d = 110 \text{ nm}$ ,  $T_s = 400^\circ\text{C}$  [43].



**Abbildung 58:**  $\Theta$ - $2\Theta$ -Scan von MgF<sub>2</sub>-Schichten mit einer Schichtdicke von 110 nm, die bei vier verschiedenen Substrattemperaturen hergestellt wurden. Die Substrattemperaturen variierten von AT (schwarz), 200 °C (magenta), 300 °C (grün) bis 400 °C (blau). Die XRD-Signale des amorphen Glases wurden subtrahiert. Zuordnung der Beugungsreflexe zu den Gitterebenen (hkl) sind durch gestrichelte Linien gekennzeichnet. Der Scan-Winkel wurde von 20° bis 70° variert. [43].

sche), ist abhängig vom Schichtwachstum und somit auch von den Beschichtungsparametern [130, 131]. Hierfür wurde ein  $\Theta$ - $2\Theta$ -Scan (Kapitel 5.2.3) von MgF<sub>2</sub>-Schichten mit einer Schichtdicke von 100 nm durchgeführt. Das Ergebnis ist in Abbildung 58 für 4 unterschiedliche Substrattemperaturen zu sehen. Die XRD-Spektren sind mit dem amorphen Glassubstrat korrigiert. Die Substrattemperatur wurde von AT (ambient temperature) bis 400 °C variiert. Die Haftfestigkeit von biologischem Material, die durch die lipophilen und hydrophoben Eigenschaften der MgF<sub>2</sub>-Schicht erreicht werden soll, wurde mit Hilfe von 10  $\mu$ m dicken coronalen Hirnschnitten einer Maus überprüft. Diese 10  $\mu$ m Schnitte wurden, wie in Kapitel 2.2.2 beschrieben, sowohl auf silanierte Coverslips als auch mit MgF<sub>2</sub> beschichtete Coverslips aufgebracht und anschließend nach einem Standardfärbeprotokoll aus dem Kapitel 2.2.3 in einem Doppelfärbeprozess mit einem post- (Homer1) und präsynaptischen (Bassoon) Marker bzw. mit einem postsynaptischen Marker (Homer1) und einer Rezeptorstruktur (GluA2) gefärbt. In Abbildung 59a sind Fluoreszenzaufnahmen der Kernstruktur (DAPI) bzw. ab Tag 2 die Färbung des postsynaptischen Markers

an unterschiedlichen Tagen der Färbung zu sehen. In Abbildung 59b ist das Verhalten der lipophilen und hydrophoben Eigenschaft der  $MgF_2$ -Schicht während bzw. nach aufeinanderfolgenden Waschschrritten mittels Trypsin dargestellt. Hierfür wurden Öl- und Wassertropfen auf die Coverslips gegeben und durch ein Foto die Kontaktwinkel dokumentiert. Danach wurden die Coverslips für 15 min mit Trypsin bedeckt. Anschließend folgte ein Reinigungsprozess mittels PBS und ein erneutes Aufpipettieren eines Öl- und

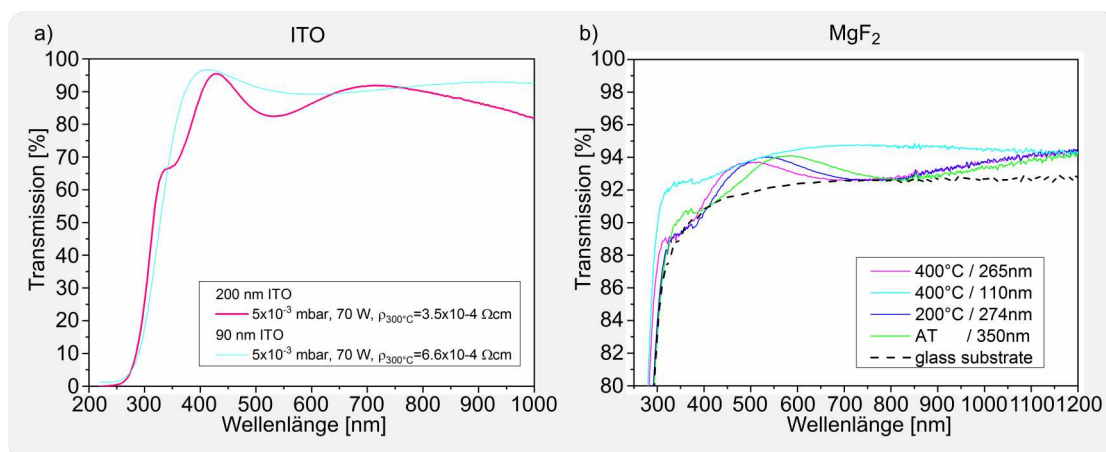


**Abbildung 59:** a) Vergleich der Haftfestigkeit von  $10\ \mu\text{m}$  dicken coronalen Hirnschnitten einer Maus auf einer funktionalisierten  $MgF_2$ -Schicht (rechts) zu einer silanisierten Oberfläche (links) [43]. Die Schnitte sind an den Tagen 1 bis 3 mit einer DAPI-Färbung zu sehen und am Tag 2 und 3 mit der Färbung des postsynaptischen Markers Homer1. b) Schrittfolge für einen simulierten Waschprozess zur Wiederverwendbarkeit der Coverslips mit  $MgF_2$ -Schicht. Die Bilder zeigen die lipophilen und hydrophoben Eigenschaften an Hand von Wasser- und Öl-Tropfen. Die Bilder wurden jeweils nach den Reinigungsprozessen bzw. vor der Verwendung des Trypsins, welches der Reinigung der Coverslips von biologischem Material dient, aufgenommen [43].

Wassertropfens auf die Coverslips. Dieser Vorgang wurde mehrere Male wiederholt, um so die übliche Reinigungsprozedur der Coverslips von organischen Materialien zu simulieren. Der Prozess wurde mit 10 unterschiedlichen Coverslips mit  $\text{MgF}_2$ -Schicht sowie 10 Coverslips, welche mit Silan behandelt wurden, wiederholt. Bei allen Reihen konnte der Reinigungsprozess, wie in Abbildung 59b zu sehen ist, mehrmals erfolgreich durchgeführt werden, ohne dass die gewünschten Oberflächenfunktionalitäten verloren gingen. Zusätzlich lieferten Schnittfärbungen auf bereits mehrmals gereinigten Coverslips dasselbe positive Ergebnis zur Haftfestigkeit bei einer Drei-Tages-Färbung mit den oben beschriebenen Strukturen (siehe Abbildung 59).

### 5.3.2 Untersuchung der optischen Eigenschaften der MEAs

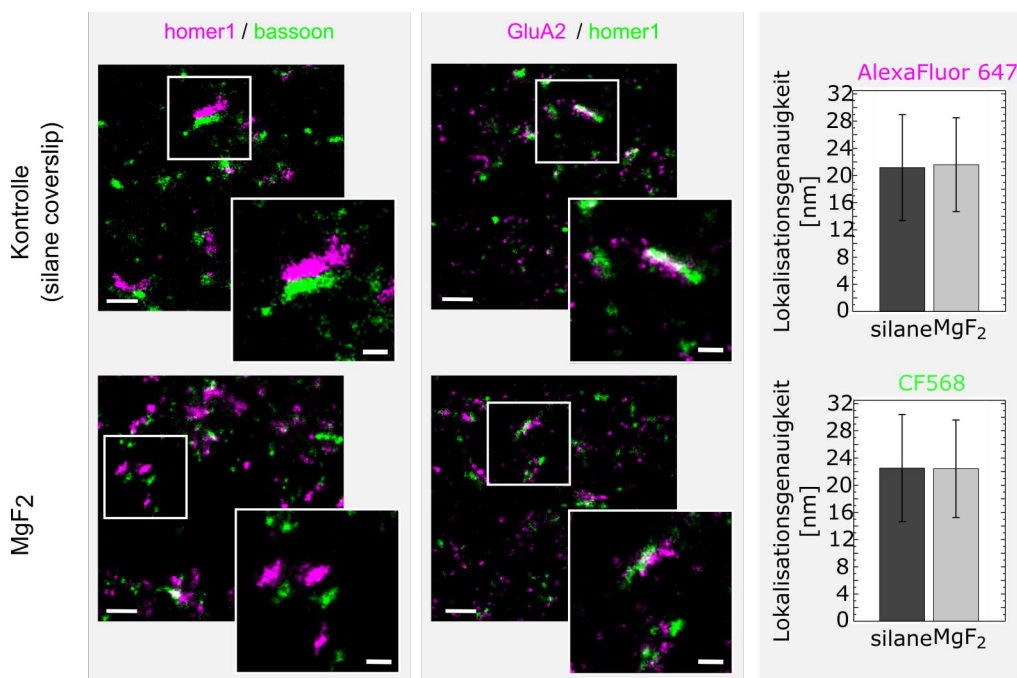
Die optischen Eigenschaften der beiden Materialien ITO und  $\text{MgF}_2$  wurden mittels einfacher Transmissionsmessungen, wie in Kapitel 5.2.4 beschrieben, untersucht. Für die spektralen Untersuchungen sind Deckgläser (R.Langensbrinck GmbH) mit unterschiedlichen Dicken bis zu einer unteren Grenze von  $170\ \mu\text{m}$  und einem Durchmesser von 18 mm mit beiden Materialien beschichtet worden. Weiterhin wurden die Beschichtungsparameter abhängig von der Beschichtungsmethode variiert. Die Sputterabscheidung des ITOs ließ eine Variation des Sputterdruckes, der Sputterleistung und eines nachgeschalteten Heizprozesses der Probe (post-deposition Temperung) zu, während bei der Elektronenstrahlver-



**Abbildung 60:** a) Transmissionskurven im sichtbaren Spektralbereich von ITO-Schichten unterschiedlicher Dicke, bei gleicher Substrattemperatur und Sputterleistung und gleichem Arbeitsdruck in der Sputteranlage. b) Transmissionskurven von  $\text{MgF}_2$ -Schichten unterschiedlicher Dicke und unterschiedlichen Abscheidesubstrattemperaturen sowie eine Vergleichsmessung des unbeschichteten Substrates (gestrichelte Linie) [43].



dampfung des  $\text{MgF}_2$  insbesondere die Variation der Substrattemperatur für verschiedene Schichteigenschaften verantwortlich war. Ausgewählte Beispiele sind in Abbildung 60 für beide Materialien zu sehen. Mittels der in Kapitel 5.3.1 gezeigten Färbungen von  $10\ \mu\text{m}$  dicken coronalen Hirnschnitten einer Maus wurden Aufnahmen mit einem höchstauflösenden Mikroskop durchgeführt. Hierfür wurde das in Kapitel 2.2.4 gezeigte Elyra P.1 System verwendet. Die *d*STORM Technik dient der Feststellung der optischen Qualität der hergestellten Schichten für die Verwendung in der höchstauflösenden Mikroskopie. Die Rekonstruktionen der beiden Doppelstrukturen sind in Abbildung 61 mit der dazugehörigen Lokalisationsgenauigkeit für die verwendeten Farbstoffe dargestellt [43].

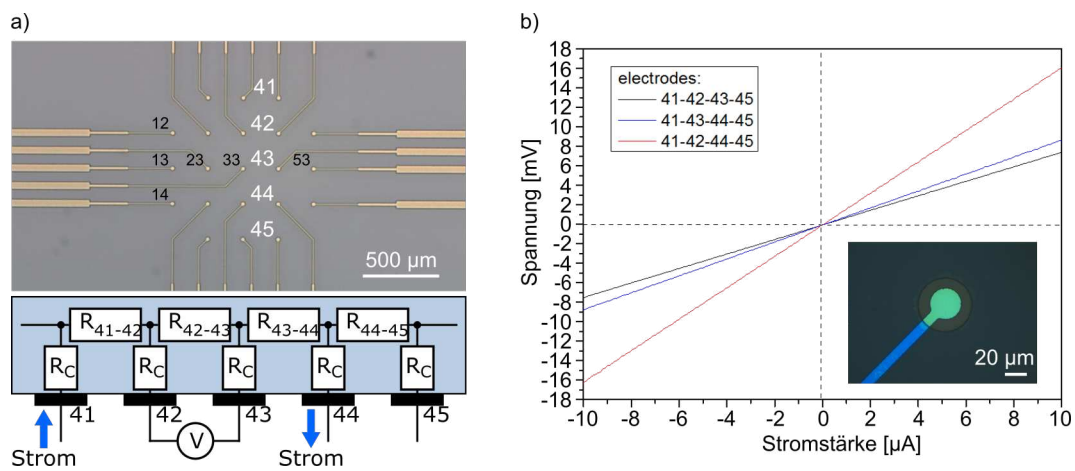


**Abbildung 61:** Rekonstruktion von Doppelstrukturen bestehend aus einem postsynaptischen Marker (Homer1) und einem präsynaptischen Marker (Bassoon) (links). Rekonstruktion einer Doppelstruktur bestehend aus einem postsynaptischen Marker (Homer1) und der AMPA-Rezeptoruntereinheit GluA2 (Mitte). Darstellung der Lokalisationsgenauigkeit für beide Farbstoffe bei den unterschiedlichen Funktionalisierungen (rechts) [43] (Maßstab: große Bilder 500 nm und kleine Bilder 200 nm).

### 5.3.3 Darstellung der elektronischen Eigenschaften der MEAs

Neben den strukturellen und optischen Eigenschaften konnte in [43] ebenfalls gezeigt werden, dass eine dünne ( $\sim 110\ \text{nm}$ )  $\text{MgF}_2$ -Schicht eine elektrisch isolierende Wirkung besitzt. Dazu wurde eine leitfähige Folie mit einem definierten Widerstand auf die ITO-

Kontaktelektroden gelegt und somit alle Elektroden, die durch die  $\text{MgF}_2$ -Schicht zueinander elektrisch isoliert waren, miteinander verbunden. Danach wurde, wie in Abbildung 62b dargestellt, eine Spannungs-Strom-Kennlinie aufgenommen. Die entsprechende 4-Punktmessanordnung ist in Abbildung 62a zu sehen. Für die Kennlinienaufnahmen wurden die in Abbildung 62 weiß markierten Elektroden genutzt. Die Spannungs-Strom-Graphen in Abbildung 62b zeigen die unterschiedlichen Verläufe bei unterschiedlichen Abgriffen. Bei allen Kurven ist aber ein linearer ohmscher Verlauf zu beobachten, der auf eine gute Isolation der Elektroden zueinander schließen lässt.



**Abbildung 62:** a) Elektroden-Anordnung auf einem MEA-Chip und Darstellung einer 4-Punktmessanordnung zwischen den Kontaktpads 41 bis 45. b) Spannungs-Strom-Diagramm der 4-Punktmessanordnung, der in a) gezeigten Kontaktpads (weiße Zahlen) [43].

## 5.4 Diskussion

In einem ersten Schritt wurde die Schichtstruktur der  $\text{MgF}_2$ -Schicht mittels AFM und REM untersucht. Für die Analyse der Mikrostruktur kann das Strukturzonenmodell (SZM) von Movchan und Demchishin herangezogen werden [132]. Bei der Verdampfung wird die Schichtmikrostruktur durch die Depositionstemperatur, d.h. durch das Verhältnis von Substrattemperatur ( $T_s$ ) und Schmelztemperatur ( $T_m$ ) des Materials, beeinflusst. Das Wachstumsmodellschema ist in 3 Strukturzonen unterteilt (Zone 1:  $T_s < 0,3 T_m$ , Zone 2:  $0,3 T_m < T_s < 0,5 T_m$ ; Zone 3:  $0,5 T_m < T_s$ ). Die Schmelztemperatur von  $\text{MgF}_2$  liegt bei 1536 K. Die Abscheidung der Schichten wurde bei Substrattemperaturen gleich oder unter

400°C durchgeführt. Der resultierende Schichtaufbau kann somit nur durch die Strukturzone 1 oder Zone 2 beschrieben werden. Die Schichten der Zone 1 (Abbildung 49a); ( $T_s = AT$ ,  $T_s/T_m = 0,19$ ) zeichnen sich durch eine säulenförmige Struktur mit feinen Faserstrukturen aus, die durch Hohlraumgrenzen getrennt sind. Die Säulen sind im Allgemeinen keine Einzelkörner. Sie können aus kleineren Körnern bestehen oder auch amorph sein. Das Wachstum wird in dieser Zone weniger durch eine unzureichende Adatomdiffusion, sondern eher durch atomare Abschattung bestimmt. Ein derartiger Wachstumsmodus deutet auf eine poröse Realstruktur hin [130]. Bei 400°C abgeschiedene  $MgF_2$ -Schichten (Abbildung 49b) und c);  $T_s = 400^\circ C$ ,  $T_s/T_m = 0,44$ ) gehören bereits zur Zone 2. Dort bilden sich breitere kegelförmige bzw. säulenförmige Körner aus, das Gefüge ist aber weniger löchrig als in Zone 1 [130]. Außerdem ist aus der Literatur [130] bekannt, dass dickere Schichten in der Regel zu rauerer Oberflächen führen, was man beim Vergleich von Abbildung 49b) und c) auch in den AFM Aufnahmen der hergestellten Schichten beobachten kann [130]. Zu beachten ist aber, dass eine Veränderung des Materials oder der Abscheidebedingungen (z.B. höhere Abscheidetemperatur) zu einem Wechsel im Zonenmodell und damit zu einer anderen Mikrostruktur / Gefüge führen kann [130]. Darüber hinaus müssen mögliche Wassereinschlüsse bei der Nutzung der Chips hinsichtlich des Alterungsverhaltens der Schichten [130] beachtet werden. Dieses Phänomen ist jedoch durch eine nachgeschaltete Lagerung im Vakuum bei dünnen Schichten reversibel. Auf Basis aller durchgeführten Voruntersuchungen wurden  $MgF_2$ -Schichten mit einer Schichtdicke von 110 nm für weitere Experimente verwendet. Dadurch können mögliche kontraproduktive Einflüsse von dickeren Schichten vernachlässigt werden [130]. Das Röntgenbeugungsmuster (XRD) (Reflexposition, Höhe und Breite der Reflexe; Abbildung 58) liefert weitere strukturelle Eigenschaftsinformationen über das Material wie Kristallstruktur, Korngrößen, Defekte der  $MgF_2$ -Schicht, die sowohl optische als auch elektrische Eigenschaften und das chemische Verhalten beeinflussen können [130]. Die Reflexpositionen der verschiedenen  $MgF_2$ -Schichten, die bei  $27,3^\circ$ ,  $40,5^\circ$ ,  $43,7^\circ$ ,  $53,6^\circ$ ,  $56,2^\circ$  und  $68,0^\circ$  liegen, entsprechen den bekannten (110), (111), (210), (211), (220) und (301) Reflexen des idealen  $MgF_2$  Einkristalls. Die Kristallstruktur der bei Raumtemperatur (AT) auf Glassubstraten abgeschiedenen Schichten ist polykristallin und zeigt schwache (110), (211) und (301) Peaks, während bei höheren Temperaturen ( $T_s = 300^\circ C$ ) die polykristalline Struktur einen ausgeprägten (111)-Peak entwickelt und der Reflex der (110)-Netzebene zunimmt. Die Reflexe werden mit zunehmender Substrattemperatur schmaler. Das bedeutet eine Veränderung der Kristallitgröße und der Defekte in der Schichtstruktur [130].

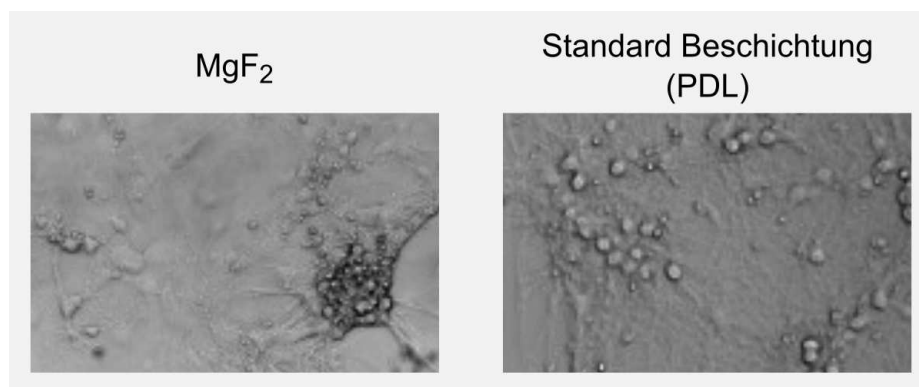


Neben der Oberflächenbeschaffenheit und der Kristallstruktur sind für die spätere Anwendung auch die optischen Schichteigenschaften von Bedeutung. In Abhängigkeit von der Schichtdicke bilden sich entsprechend Interferenzmaxima und -minima bei beiden Schichtmaterialien aus, welche in Abbildung 60 zu sehen sind [78]. Bei ITO-Schichten, die nach der Beschichtung noch in einem Ofen unter Atmosphäre bis 300°C nachgetempert wurden, ist die Schichtdickenabhängigkeit der Transmission gut zu erkennen [133]. Dünnere ITO-Schichten zeigen eine flachere Transmissionskurve im gesamten sichtbaren Spektralbereich, während es bei dickeren Schichten zur Ausbildung ausgeprägter Maxima und Minima in der Transmissionskurve kommt. Ein ähnliches Verhalten zeigen auch die MgF<sub>2</sub>-Schichten. Dünnere Schichten weisen im Gegensatz zu dicken Schichten ebenfalls eine breite spektrale Verteilung ohne Modulationen in der Transmission auf [78]. Im Vergleich zu ITO ist für die MgF<sub>2</sub>-Kurven jedoch wellenlängenabhängig eine Erhöhung der Transmission je nach Schichtdicke und Beschichtungsparametern gegenüber dem reinen Glas-Substrat im gesamten Spektralbereich (Abbildung 60b; gestrichelte Linie) zu beobachten. Deshalb wird dieses Material in der optischen Bauteilentwicklung sowohl als Einzelschicht, aber auch insbesondere in Schichtsystem für Antireflexschicht eingesetzt [134].

Für ITO-Schichten spielt nicht nur die Transparenz eine entscheidende Rolle, sondern auch der spezifische Widerstand als Materialeigenschaft, der für die Leitfähigkeit verantwortlich ist. Dieser variiert nicht nur mit der Schichtdicke, sondern auch mit der Nachbehandlung der Proben durch Tempern [133]. Beim Temperprozess nach der Beschichtung mit Temperaturen von 250-300°C in einem Ofen unter Atmosphäre zeigten sich die besten spezifischen Widerstände. Dies legt nahe, dass es notwendig ist, entweder mit Beschichtungsverfahren, die hohe Teilchenenergien generieren, eventuell unter Sauerstoffzugabe oder mit einer zusätzlichen Nachbehandlung der Schicht zu arbeiten, da die Eigenschaften der ITO-Schichten umso besser werden, je kristalliner sie aufwachsen [133, 135]. Die elektrischen Eigenschaften sind aber auch für die MgF<sub>2</sub>-Oberflächenschicht von Bedeutung. Dieses Material muss isolierend zwischen den ITO-Leiterbahnen und dem zu untersuchenden Testobjekt wirken [136]. Dazu muss es dicht gepackt auf dem Substrat wachsen, was durch hochenergetische Beschichtungsverfahren, z.B. wie im Rahmen der Arbeit in einer Elektronenstrahlverdampferanlage bei hohen Substrattemperaturen, realisiert werden kann. Der lineare Verlauf der Spannungs-Strom-Kennlinien in Abbildung 62 deutet auf ein gut isolierendes Verhalten der MgF<sub>2</sub>-Schicht hin. Bei Durchbrüchen würde es zu einer

Abweichung von der Linearität kommen. Die untersuchten Eigenschaften der neuen Materialkombination ITO/MgF<sub>2</sub>, die von mir in [43] dargelegt und aufgezeigt wurden, zeigen die Möglichkeit auf, diese zur Herstellung optisch hoch transparenter und ultradünner MEAs einzusetzen. Gleichzeitig konnte in [43] gezeigt werden, dass die MgF<sub>2</sub>-Oberfläche einen hydrophoben und lipophilen Charakter aufweist, der auch nach mehreren Waschprozessen mit Trypsin erhalten bleibt, wie in Abbildung 59b zu sehen ist. Somit weisen die MgF<sub>2</sub>-Oberflächen ein ähnliches Verhalten, wie zum Beispiel durch Silanisierung funktionalisierte Oberflächen auf [43], welche sonst standardmäßig zur Haftung organischer Materialien genutzt werden [36]. Diese Haftungseigenschaft bzw. die lipophile und hydrophobe Eigenschaft (Abbildung 59a) wurden an 10 μm coronalen Kryohirnschnitten einer Maus nachgewiesen. Sowohl bei den silanisierten als auch bei den mit MgF<sub>2</sub> beschichteten Coverslips sind keine Ablöseeffekte der Schnitte zu beobachten. Dies deutet auf einen ähnlichen lipophilen Charakter der MgF<sub>2</sub>-Schicht und der Silan-Oberfläche hin. Diese Grundeigenschaft kann und soll in weiteren Versuchen so angepasst werden, dass es ohne weitere Funktionalisierung [49] möglich ist, Zellkulturen bzw. Schnittkulturen auf einer wiederholt verwendbaren MgF<sub>2</sub>-Schicht wachsen zu lassen. Dies wurde in ersten Experimenten in Abbildung 63 gezeigt.

Des Weiteren spricht die Tatsache, dass die Haftfestigkeit auch nach der Färbung und nach den Waschzyklen nicht verloren gegangen ist, für eine dicht gewachsene Schichtstruktur und dies auch bei geringen Schichtdicken von ca. 100 nm auf sehr dünnen Glas-Substraten. Aufgrund dieser Tatsache ist es möglich, Aberrationen im optischen System weiter zu minimieren [137].



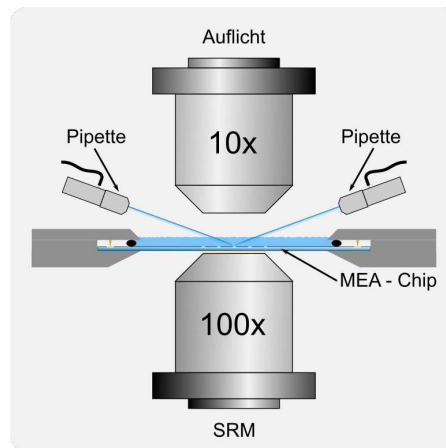
**Abbildung 63:** Aufnahme von primären hippocampalen Zellkulturen am div 14 mit unterschiedlichen Haftvermittlern auf dem Glas-Substrat. (links) Wachstum der primären hippocampalen Zellkultur auf einer 110 nm dicken MgF<sub>2</sub>-Schicht. (rechts) Wachstum der primären hippocampalen Zellkultur auf einer Standard Beschichtung mittels PDL.

Eine Aberrationsfreiheit konnte durch den Einsatz von höchstauflösender Mikroskopie bestätigt werden. Hierzu wurden die Strukturen der Doppelfärbung mittels der *d*STORM Technik untersucht. Diese lokalisationsbasierte Technik wurde eingesetzt, da sie sehr anfällig auf kleinste optische Fehler reagiert und bei den gut separierten PSFs Abbildungsfehler deutlich erkennbar sind. Durch diese Untersuchungen wurde ausgeschlossen, dass es zu Abbildungsfehlern, hervorgerufen durch die  $\text{MgF}_2$ -Schicht, z.B. durch doppelbrechende Eigenschaften, kommt [138].

Visuell sind keine Unterschiede zwischen den beiden untersuchten Oberflächenbeschichtungen der Coverslips zu erkennen, da in beiden Fällen die rekonstruierten Strukturen gut erkennbar sind. Auch aus der Lokalisationsgenauigkeit ist kein Unterschied ersichtlich. Die ähnlichen Lokalisationsgenauigkeiten zeigen, dass auch mit einer bi-funktionalen 110 nm dicken  $\text{MgF}_2$ -Schicht keine Verschlechterung des optischen Nachweises verbunden ist, also keine zusätzlichen Aberrationen durch die dünne Schicht zu erwarten ist. Mit den gezeigten Ergebnissen wurde bestätigt, dass die von mir favorisierte Materialauswahl auch für die zukünftig angestrebten Gesamtziele optimale Eigenschaften aufweist.

## 5.5 Ausblick

In weiterführenden Arbeiten soll die Funktionalisierung der neuen MEA-Oberfläche genauer untersucht werden, um das angesprochene Anwachsen von Zellkulturen oder Schnittkulturen zu verbessern. Weiterhin ist angedacht, durch zusätzliche Nanostrukturierung wie Mottenaugenstrukturen [139] oder das Einbringen von Nanopartikeln, wie zum Beispiel Gold Nanopartikel [140], das Wachstum der biologischen Strukturen gezielt zu lenken bzw. zu verbessern. Ein weiteres Ziel für zukünftige Arbeiten wird die Optimierung der Strukturdicke und die Entwicklung einer optimierten Halterung mit mikroelektronischen Bauteilen sein. Diesbezüglich soll eine Mikro- bzw. Nanoelektrik in Kooperation mit der Industrie entwickelt werden. In diesem Rahmen ist ebenfalls ein passender Mikroskop-Grundkörper zu designen, welcher die Möglichkeit bietet, sowohl die MEA-Plattform als auch Manipulatoren für kombinierte Einzelzellmessungen mit einem höchstauflösenden Mikroskop zu vereinen. Eine Möglichkeit, die von mir verfolgte Idee, diese unterschiedlichen Verfahren in einem kombinierten Aufbau zusammenzuführen, ist in Abbildung 64 dargestellt. Ein solcher Aufbau besteht aus einem aufrechten Mikroskop System, welches mit kleinen, meist Luft- oder Wasser-Objektiven für die Elektrophysiologie und einem inversen Mikroskop mit Objektiven mit hohen numerischen Aperturen für die höchstauflösende



**Abbildung 64:** Darstellung einer Möglichkeit der Integration von einer MEA-Plattform mit Manipulatoren zur Einzelzelleableitung und einem höchstauflösenden inversen Mikroskop.

Mikroskopie ausgestattet ist. Somit können beide Systeme separat oder als Systemeinheit arbeiten. Durch diese neuartige Kombinationsmöglichkeit von höchstauflösender morphologischer Strukturanalyse und funktioneller Einzelzell- und / oder Netzwerkanalyse können neuronale Prozesse mit einem zeitlich und morphologisch höchst aufgelösten innovativen Verfahren untersucht werden. In einem weiteren zukünftigen Schritt soll die Kultivierung von Hirnschnittkulturen auf den MEA-Chip etabliert werden, um ex-vivo Experimente zu ermöglichen [141]. Diesbezüglich ist die Verwendung von entsprechenden höchstauflösenden Mikroskopen notwendig. Hierfür eignet sich das in Kapitel 4 beschriebene Konzept der Multi-Photonen-Speckle-Mikroskopie. Dieses Konzept kann im Rahmen einer Erweiterung im Bereich der Spinning Disk Mikroskopie auf die Anwendung optimiert werden [142].

Neben den optischen Verbesserungen müssen auch die Schichtsysteme optimiert werden. Hierzu sollen weitere optisch hochtransparente Materialien sowohl für die Leiterbahnen als auch für die Isolierschicht, zum Beispiel andere Fluorid-Schichten, untersucht werden [143, 144]. Eine weitere Optimierungsmöglichkeit stellt die Verwendung von hochenergetischen Beschichtungsverfahren wie die Pulsed Laser Deposition (PLD) dar. Bei diesem Verfahren besitzen die Teilchen in der Plasmakaulke, welche durch Laserablation am Target erzeugt werden, hohe Energien und führen zu kompakten Schichten. Die PLD kann gerade bei ITO-Schichten sowohl die elektrischen als auch die optischen Eigenschaften deutlich verbessern [135, 133]. Dieses Verfahren wird in der industriellen Beschichtung kaum verwendet, da es nur für kleinflächige Proben einsetzbar ist. Jedoch liegen die MEA Substrate mit später maximal 2 Zoll im Bereich der Substratgröße, die für die PLD nutzbar sind.

## 6 Zusammenfassende Diskussion

Ein wesentlicher Grundbaustein dieser Dissertation waren Untersuchungen hinsichtlich der Gewinnung von experimentellen Daten zur Evaluierung neurologischer Krankheitsbilder. Es konnte gezeigt werden, dass durch rekombinante monoklonale NR1-Antikörper von Patienten mit NMDA-Rezeptor Enzephalitis die NMDA-Rezeptorfelder in primären Neuronen markiert werden können. Zudem konnte mit ihnen die Rezeptordichte mittels lokalisationbasierter höchstauflösender Mikroskopie quantifiziert werden. Hierfür wurde im Labor unter anderem ein Protokoll zur Kalkulation der Rezeptordichteverteilung gegenüber einer synaptischen Marker-Struktur etabliert. Bei diesen Untersuchungen zeigte sich nach einer Präinkubation mit antikörperhaltigem Liquor eines NMDA-Rezeptor Enzephalitis Patienten bzw. mit den rekombinanten, humanen monoklonalen NR1-Antikörpern gegenüber den jeweiligen Kontrollgruppen eine signifikante Reduktion der postsynaptischen NMDA-Rezeptordichte. Für nachfolgende Experimente wurde die Immunfluoreszenzfärbung von synaptischen Strukturen sowie von Glutamatrezeptoren an Gehirnschnittpräparaten etabliert. Um die störenden Effekte für die Weitfeldmikroskopie, wie zum Beispiel die Streuung im Gewebe, zu verringern, erfolgte eine Optimierung der Dicke des Gewebes. Das Signal-zu-Rausch-Verhältnis in einem  $10\ \mu\text{m}$  Hirnschnitt erwies sich dabei für eine Rekonstruktion der Einzeldetektion in der *d*STORM Mikroskopie als ausreichend. Somit wurde die Möglichkeit eröffnet, im Labor höchstauflösende morphologische Untersuchungen im Mausmodell durchzuführen. Durch die Etablierung im Bereich der höchstauflösenden Mikroskopie können nun genauere Aussagen über das Bindungsverhalten von Antikörpern und deren Auswirkung auf die subzellulären Strukturen im Krankheitsbild der Autoimmun-Enzephalitis gewonnen werden. Die Auswirkung von rekombinanten, humanen monoklonalen NR1-Antikörpern stellt ebenfalls einen neuen Schritt in der Untersuchung des Krankheitsbildes dar, da diese Art von Antikörpern, wie in dieser Arbeit gezeigt wurde, hochspezifisch ist und somit neue Untersuchungsmöglichkeiten eröffnet hat. Des Weiteren ist die Etablierung von Schnittmessungen von großer Bedeutung, um die Untersuchungen von einem Zellkulturmodell in ein Tiermodell zu überführen und somit komplexere Zusammenhänge im Krankheitsbild untersuchen und verstehen zu können.

Die in dem Präinkubations-Experiment gewonnenen morphologischen Daten zur Reduktion der NMDA-Rezeptordichte korrelieren sehr gut mit früher gewonnenen funktionellen Daten. Hieraus ergab sich für mich der Ansatz, eine technische Kombination zur simul-

tanen Aufzeichnung von funktionellen und morphologischen Zusammenhängen zu entwickeln. Diese Idee ist insbesondere deshalb von Bedeutung, da gerade bei komplexen biologischen und/oder biomedizinischen Fragestellungen eine Verbindung zwischen höchstauflösenden morphologischen und funktionellen Datensätzen wichtige Zusatzinformationen ergeben kann. Durch eine solche Kombination können (sub)-zellulär ablaufende Prozesse sowohl zeitlich als auch räumlich mit hoher Detailliertheit aufgelöst werden. Ein erster Schritt in Richtung der angestrebten Kombination war die Entwicklung und der Aufbau eines höchstauflösenden Mikroskopes im Labor, welches auf der Basis der strukturierten Beleuchtung arbeitet (Kapitel 3). Dieses Mikroskop verwendet als Beleuchtungsstruktur ein sogenanntes Specklefeld. Für den Aufbau des neuen Mikroskops wurden Diodenlaser als Lichtquelle verwendet, die bei geringen Kosten eine große Ausgangsleistung bieten. Alle drei verwendeten Diodenlaser konnten Ausgangsleistungen über 600 mW erzeugen und stellten somit eine optimale Lichtquelle für den Aufbau dar. Die Bandbreite der Diodenlaser lag im Bereich kleiner 4 nm und erlaubte somit eine gute spektrale Separierung. Zur Erzeugung der Specklefelder wurde eine einfache Streuscheibe verwendet und ihre Bewegung durch einen direkt mit der Rotationsachse der Streuscheibe gekoppelten Getriebemotor realisiert. Mit diesem Aufbau erfolgten die Untersuchungen in Kapitel 3 hinsichtlich der optimalen Positionen der für die Abbildung verantwortlichen Achromate zur Erzeugung des kleinstmöglichen Specklefeldes. Somit konnten Beleuchtungsstrukturen im Bereich der Beugungsbegrenzung und daraus folgend kleinstmögliche Detektionsbereiche erzeugt werden. Weiterhin wurden die Specklebewegungen untersucht. In ersten Experimenten stellte sich das mechanische Spiel als größte Problematik für eine Specklefeldbewegung dar. Durch die umgesetzte direkte Kopplung des Getriebemotors mit der Drehachse der Streuscheibe konnte das Spiel minimiert und mit Parameterpaaren von kurzen Rotationszeiten und hohen Spannungen (siehe Kapitel 3.3.4 bis 3.3.5) gearbeitet werden. Bei dem eingesetzten Getriebemotor mit einer 6:1 Übersetzung zeigten sich deutlich scharfe Übergänge im Bereich zwischen keiner Änderung und einer kompletten Änderung des Specklefeldes. Bei dieser Getriebemotorübersetzung war es möglich, Rotationszeiten unterhalb einer Millisekunde bei einer gleichzeitigen kompletten Specklefeldänderung zu erreichen. Durch diese Getriebeaufhängung konnte gezeigt werden, dass selbst mit einfachsten Getriebemotoren die optimale Streuscheibenbewegung zu einer angestrebten kompletten Änderung des Specklefeldes führt und gleichzeitig das mechanische Spiel reduziert wird. Nachfolgend wurde die benötigte Ruhezeit zwischen der Rotation und der Aufnahme über eine Kontrastermittlung des aufgenommenen Specklefeldes ermittelt. Hieraus ergab sich, dass

Aufnahmezykluszeiten von 18 ms möglich sind, die einer Ruhezeit von 13 ms entsprechen. Somit sind angestrebte kurze Aufnahmezykluszeiten realisierbar.

Nach der Bestimmung der wichtigsten technischen Aufnahmeparameter des höchstauflösenden Mikroskops wurden an verschiedenen Testobjekten die für eine Rekonstruktion der Struktur benötigten Bildanzahlen ermittelt. Hierbei zeigte sich mit Hilfe von QDots, dass die Rekonstruktion von Punktstrukturen schon nach 10-20 Bildern erfolgreich ist. Jedoch benötigt man für flächigere Strukturen mindestens 100 Bilder, um eine gute Rekonstruktion der Objekte zu erhalten, wie es am Beispiel von dendritischen Strukturen beobachtet wurde. Mit diesen so gewonnenen Parametern erfolgte die Durchführung von Untersuchungen sowohl mit QDot Clustern als auch mit weiteren dendritischen Strukturen, aber auch mit Hilfe von selbst entwickelten Fluoreszenz-Testcharts hinsichtlich der Auflösungsgrenze. Es konnte gezeigt werden, dass die Auflösung mit dem verwendeten 63x Wasser-Immersion-Objektiv mit einer NA von 1,2 wie beim klassischen SIM auf die Hälfte reduziert werden konnte. Für genauere Aussagen zur maximal erreichbaren Auflösung fehlten im Labor die speziellen Proben beziehungsweise konnten keine Testcharts für den Nanometerbereich unter 200 nm hergestellt werden. Jedoch zeigte sich in den Aufnahmen der dendritischen Strukturen, dass die gewonnene Auflösung ausreichend ist, um detaillierte Aufnahmen der in Zukunft zu untersuchenden primären Neurone zu realisieren. Im Vergleich zu dem im Labor vorhandenen lokalisationsbasierten höchstauflösenden Mikroskop sind aber Unterschiede in der Auflösung erkennbar. Im Vergleich zum Elyra 7 lattice SIM System zeigte sich eine detailliertere Auflösung von dendritischen Strukturen. Mit Hilfe des Speckle-Mikroskops wird es aber nicht möglich sein, einzelne Rezeptor-Cluster aufzulösen, wie es zum Beispiel durch *d*STORM möglich ist. Lebendzellprozesse, wie zum Beispiel die Veränderung von synaptischen Strukturen wie Spines in vitalen Neuronen, sind jedoch schwer durch die lokalisationsbasierten Verfahren darstellbar. Hier wird in Zukunft der primäre Einsatzbereich des Speckle-Mikroskops liegen. Somit ist es für die biomedizinische Forschung von großer Bedeutung, die Vor- und Nachteile des Einsatzbereiches jedes einzelnen Mikroskopieverfahrens zu kennen und entsprechend der Fragestellung der geplanten Experimente das richtige Verfahren einzusetzen.

Ein weiterer Bestandteil dieser Dissertation war es, im Rahmen eines eingereichten Internationalen Patentes [21] Möglichkeiten für die Weiterentwicklung eines Speckle-basierten höchstauflösenden Mikroskops zu untersuchen. Die Idee des von mir und den Partner der FSU eingereichten Patentes basiert auf der Reduzierung der effektiven Speckle. D.



h., dass durch verschiedene physikalische Effekte eine Verkleinerung der Bereiche, in denen Fluorophore angeregt und detektiert werden, erzielt werden soll. Hierbei handelt es sich hauptsächlich um Absorptions-, Emissions- und Schalteffekte. Die drei Hauptprinzipien sind in Kapitel 4 beschrieben und basieren auf der Multi-Photonen-Absorption, der Stimulierten Fluoreszenz Ausbleichung (STED) und der Photoschaltung. Diese aus anderen Mikroskopie-Verfahren bekannten Effekte können auch im Bereich der Speckle-Mikroskopie Anwendung finden. Zusätzlich zu diesen Effekten wird im Patent vorausgesetzt, dass mindestens zwei Specklefelder für die Reduktion des effektiven Specklefeldes eingesetzt werden. In Kapitel 4 ist für jeden dieser Effekte die Beschreibung des Standardverfahrens in der Mikroskopie im Vergleich zum Einsatz im Bereich der Speckle-Mikroskopie dargelegt. Für Multi-Photonen-Absorptionsprozesse wurden als Beispiel 2-Photonen-Absorption Testmessungen durchgeführt, um eine Detektionsschwelle zu ermitteln. Diese wurde als Grundlage für Simulationen verwendet. Die Resultate zeigen, dass durch die Verwendung von mehreren Specklefeldern unter Berücksichtigung der 2-Photonen-Absorption eine deutliche Reduzierung und Separierung des effektiven Specklefeldes stattfindet. In Simulationen konnten dieselben Effekte sowohl bei der Verwendung von photoschaltbaren Fluorophoren als auch bei der Ausnutzung der stimulierten Fluoreszenzausbleichung gezeigt werden. Die beschriebenen potenziellen Verbesserungen sind für Weiterentwicklungen der höchstauflösenden Mikroskopie in den nächsten Jahren nutzbar, da das Speckle-Mikroskop die Stärken der Punktmikroskopieverfahren und der Weitfeldmikroskopie geschickt kombiniert.

Ein weiterer Punkt dieser Arbeit befasste sich mit der Kombination vom höchstauflösenden Mikroskopie und funktionellen Messungen in Form von Netzwerkanalysen mittels Multi-Elektroden-Arrays. Es wurde dargelegt, dass unter Verwendung von speziellen Schicht- und Elektrodenmaterialien eine aberrationsfreie optische Messung durch die hergestellten ultradünnen MEAs realisiert werden kann. Dies wurde durch *d*STORM Messungen an 10  $\mu\text{m}$  Schnittpräparaten gezeigt. Hierbei war keine Deformierung der PSF zu erkennen, was sich vergleichend auch in den Rekonstruktionsergebnissen in Bezug auf normale Glas-Substrate ergab. Des Weiteren konnten die isolierenden Eigenschaften einer dünnen  $\text{MgF}_2$ -Funktionsschicht durch elektrische Vierpunktmessungen und somit auch die gute Leitfähigkeit der ITO-Dünnschicht-Leiterbahnen gezeigt werden. Die hergestellten Dünnschichtsysteme wurden durch Variation der Schichtdicke und der Beschichtungsparameter zusätzlich in ihren Transmissionseigenschaften auf die jeweiligen Bedingungen

angepasst. Jedoch existiert insbesondere im Beschichtungsprozess noch Entwicklungspotenzial. Gerade die Transparenz und die elektrische Leitfähigkeit des Leitungsmaterials ITO können durch andere Beschichtungsprozesse wie die „Pulsed Laser Deposition“ noch weiter verbessert werden. Ein weiterer Vorteil von  $\text{MgF}_2$ -Schichtsystemen besteht in der Haftvermittlung der Schicht zu organischen Präparaten. Ein Nachweis dieser Eigenschaft erfolgte experimentell an  $10\ \mu\text{m}$  Schnittpräparaten. Zusätzlich ist auch die mehrfache Wiederverwendbarkeit der Chips ohne Verlust von wichtigen optischen Eigenschaften und der Haftvermittlung von großem Vorteil. Auch hier ist weiteres Entwicklungspotenzial durch zusätzliche Oberflächenbehandlungen der  $\text{MgF}_2$ -Schicht oder durch Nanostrukturierung vorhanden.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass von mir im Rahmen dieser Arbeit erste Zellkultur Experimente mit rekombinanten monoklonalen humanen NR1-Antikörpern durchgeführt und im Weiteren die Aufnahmen von Gewebe im Bereich der lokalisationsbasierten Mikroskopie etabliert wurden. Dazu war die eigenständige Erstellung und Etablierung eines neuen Färbeprotokolls notwendig. Diese Experimente stellen den nächsten Schritt für ein besseres Verständnis des Krankheitsbildes der NMDA-Rezeptor Enzephalitis dar. Außerdem wurde selbstständig und in Eigenverantwortung das Konzept des Speckle-Mikroskops aufgestellt und realisiert. Das entwickelte und erläuterte System stellt den ersten Schritt in einem neu eröffneten Feld der höchstauflösenden Mikroskopie dar, indem die Verfahren der Punktdetektoren mit den Weitfeldverfahren kombiniert werden. Weiterhin wurden die mittels Elektronenstrahlithografie hergestellten Teststrukturen entwickelt, welche im Feld der höchstauflösenden Mikroskopie so noch nicht vorhanden waren. Durch solche oder weiterentwickelte Struktur-Charts wäre es erstmals möglich, alle höchstauflösenden Mikroskopieverfahren mittels eines Testcharts zu charakterisieren und für viele Methoden erstmals eine exakte Auflösung mittels Probe zu messen. Das Konzept des eingereichten Patentes zur reduzierten effektiven Beleuchtungsmustergröße wurde zusammen mit der Physik entwickelt. Die Simulationen und Vorexperimente im Bereich dieses neuen Feldes wurden eigenständig durchgeführt. Die momentan und in Zukunft anstehende Realisierung dieses Patentes ergibt sich aus der Realisierung der oben beschriebenen Kombination der unterschiedlichen Mikroskopieverfahren und wird eine neue Tür im Bereich der höchstauflösenden Mikroskopie für verschiedene Fragestellungen öffnen, da es durch diese neuen Verfahren möglich sein wird, in einem Bereich von  $50\ \text{nm}$  Lebendzelluntersuchungen durchzuführen. Als letzter Punkt wurde in dieser Arbeit eigenständig

die Entwicklung einer MEA-Plattform für die Kombination mit der höchstauflösenden Mikroskopie vorangetrieben. Das Design, die verwendeten Materialien und Technologien wurden selbstständig erarbeitet und untersucht. Diese Plattform stellt in Kombination mit den Patentverfahren eine neuartige und einzigartige Untersuchungsmöglichkeit von komplexen Fragestellungen im Bereich der biomedizinischen Forschung dar und eröffnet neue Möglichkeiten, bestimmte Fragestellungen zu untersuchen und genauere Einblicke in Krankheitsbilder zu gewinnen.

## 7 Anhang

Tabelle 6: chemische Substanzen

Substanzen	Firma
Aceton	Sigma-Aldrich (320110)
Bovine Serum Albumin (BSA)	Sigma-Aldrich (A4503-50G)
B-27 <sup>®</sup> Serum-Free Supplement (50x)	Gibco (17504-001)
Cysteamine Hydrochloride	Sigma-Aldrich (M6500-25G)
Dulbeccos Phosphate Buffered Saline (DPBS 10x konzentration)	Sigma-Aldrich (59331C-1000ML)
Fluoromount-G	SouthernBiotech (0100-01)
HBSS, Calcium und Magnesium, Phenolrot (10x)	Life Technologies Ltd, Paisley, U.K. (14025-050)
HEPES (1 M)	Life Technologies Ltd, Paisley, U.K. (15630056)
Kaliumhydroxid (Pellets)	Fluka (60370)
L-Glutamin 200mM (100x)	Life Technologies Ltd, Paisley, U.K. (25030024)
MEM (mit Glutamin, Phenolrot; ohne HEPES)	Life Technologies Ltd, Paisley, U.K. (31095-029)
Methanol	Roth (X948.2)
Neurobasal <sup>®</sup> Medium (1x)	Gibco (21103-049)
Normal Donkey Serum (NDS)	Millipore (S30-100ML)
Normal Goat Serum (NGS)	Pan Biotech (P30-1001)
Penicillin-Streptomycin (100x)	Gibco (10378-016)
Poly-D-Lysin - Lösung (50µg/ml)	Sigma-Aldrich (P6407)
Tissue-Tek <sup>®</sup>	Sakura (4583)
Triton X-100	Merck (1.08603.1000)
Trypanblau 0,4 %	Sigma-Aldrich (T8154)
10 % Pferdeserum	Gibco (26050-88)
0,6 % Glucose	Roth (HN06.3)
0,25 % Trypsin-EDTA mit Phenolrot	Gibco (25200-056)
(3-Aminopropyl)triethoxysilane	Sigma-Aldrich (281778-100ML)
2-Methylbutan	Sigma-Aldrich (59070-11)

**Tabelle 7:** Verwendete Primär-Antikörperverdünnungen

Antikörper	Wirtsspezies	Hersteller	Verdünnung
VGlut (vesikulärer Glutamat-transporter)	Meerschwein, polyclonal	Synaptic System, Göttingen, Deutschland	1:10000
VGat (vesikulärer GABA-transporter)	Meerschwein, polyclonal	Synaptic System, Göttingen, Deutschland	1:2000
NR1 (human, rekombinant; 003 102)	Mensch, monoclonal	PD Dr. Harald Prüss, Berlin, Deutschland	1:500
NR1 (human, rekombinant; 007 168)	Mensch, monoclonal	PD Dr. Harald Prüss, Berlin, Deutschland	1:500
NR1 (human, rekombinant; 003 109)	Mensch, monoclonal	PD Dr. Harald Prüss, Berlin, Deutschland	1:200
NR1	Maus, monoclonal	Millipore, Burlington, USA	1:300
Homer1	Meerschwein, polyclonal	Synaptic System, Göttingen, Deutschland	1:300
Homer1	Hase polyclonal	Synaptic System, Göttingen, Deutschland	1:400
Bassoon	Meerschwein, polyclonal	Synaptic System, Göttingen, Deutschland	1:500

**Tabelle 8:** Sekundär-Antikörperverdünnungen mit Fluoreszenzfarbstoffen

Farbstoff	Hersteller / Lieferant	Wirtsspezies	Zielspezies	Verdünnung	Anwendung
CF568	Biotium Inc., Fremont, USA	Esel	Meerschwein	1:200	<i>d</i> STORM
Alexa Fluor 647	Life Technologies, Carlsbad, USA	Ziege	Mensch	1:200	<i>d</i> STORM
Alexa Fluor 532	Life Technologies, Carlsbad, USA	Ziege	Kaninchen	1:200	Speckle
Streptavidin Cy3 conjugate	Sigma	-	-	1:1000	Speckle (Spine)
Vybrant Dil cell labeling solution	Life Technologies, Carlsbad, USA	-	-	-	Speckle (Spine)

**Tabelle 9:** Zusammensetzung der 1x PBS - Lösung (50 ml)

Stoffe	Menge
DPBS 10x	5 ml
Millipore Reinstwasser	45 ml

**Tabelle 10:** Zusammensetzung der 1M KOH - Lösung (50 ml)

Stoffe	Menge
Kaliumhydroxid (Pellets)	2,8055 g
dH <sub>2</sub> O	50 ml

**Tabelle 11:** Zusammensetzung der 1M MEA / PBS - Lösung (1 ml)

Stoffe	Menge
Cysteamine Hydrochloride	0,113 g
1x PBS - Lösung	1 ml

**Tabelle 12:** Zusammensetzung *d*STORM Puffer (pH~7,9 / 100mM MEA / PBS / 1 ml)

Stoffe	Menge
1M MEA / PBS - Lösung	100 $\mu$ l
1x PBS - Lösung	900 $\mu$ l
1M KOH - Lösung	24 - 26 $\mu$ l (pH~7,9)

**Tabelle 13:** Zusammensetzung HBSS - Lösung (250 ml)

Stoffe	Menge
HBSS, Calcium und Magnesium, Phenolrot (10x)	20 ml
Penicillin-Streptomycin (100x)	1 ml
1 M HEPES (1 M)	1,4 ml
Mit dH <sub>2</sub> O auf 200 ml auffüllen	

**Tabelle 14:** Zusammensetzung Plating - Medium (100 ml)

<b>Stoffe</b>	<b>Menge</b>
MEM (mit Glutamin, Phenolrot; ohne HEPES)	88 ml
Penicillin-Streptomycin (100x)	500 $\mu$ l
10 % Pferdeserum	10 ml
0,6 % Glucose	1,333 ml

**Tabelle 15:** Zusammensetzung Neurobasal - Medium (100 ml)

<b>Stoffe</b>	<b>Menge</b>
Neurobasal <sup>®</sup> Medium (1x)	100 ml
Penicillin-Streptomycin (100x)	500 $\mu$ l
L-Glutamin 200 mM (100x)	1 ml
B-27 <sup>®</sup> Serum-Free Supplement (50x)	2 ml

**Tabelle 16:** Zusammensetzung 10 % BSA / PBS - Lösung (100 ml)

<b>Stoffe</b>	<b>Menge</b>
BSA	10 g
1x PBS - Lösung	100 ml

**Tabelle 17:** Zusammensetzung Blockpuffer 1 (10 % BSA / 10 % Serum / PBS / 1 ml )

<b>Stoffe</b>	<b>Menge</b>
10 % BSA / PBS - Lösung	900 $\mu$ l
NGS und / oder NDS	100 $\mu$ l
Triton X-100 (bei intrazellulärer Färbung)	1 $\mu$ l



**Tabelle 18:** Zusammensetzung Blockpuffer 2 (1 % BSA / 1 % Serum / PBS)

<b>Stoffe</b>	<b>Menge</b>
1x PBS - Lösung	810 $\mu$ l
10% BSA / PBS - Lösung	90 $\mu$ l
NGS und / oder NDS	10 $\mu$ l
Triton X-100 (bei intrazellulärer Färbung)	1 $\mu$ l

**Tabelle 19:** Zusammensetzung 2% APTES / Methanol - Lösung ( 1 ml)

<b>Stoffe</b>	<b>Menge</b>
APTES	40 $\mu$ l
Methanol (100 %)	960 $\mu$ l

## Literatur

- [1] E. Abbe, “Beiträge zur Theorie des Mikroskops und der mikroskopischen Wahrnehmung,” Archiv für Mikroskopische Anatomie, vol. 9, pp. 413–468, dec 1873.
- [2] M. Mulisch and U. Welsch, eds., Romeis - Mikroskopische Technik. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 19 ed., 2015.
- [3] L. Reimer and G. Pfefferkorn, Raster-Elektronenmikroskopie. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2 ed., 1977.
- [4] J. W. L. R. Strutt, “XV. On the theory of optical images, with special reference to the microscope,” The London, Edinburgh, and Dublin Philosophical Magazine and Journal of Science, vol. 42, pp. 167–195, aug 1896.
- [5] S. W. Hell and J. Wichmann, “Breaking the diffraction resolution limit by stimulated emission: stimulated-emission-depletion fluorescence microscopy,” Optics Letters, vol. 19, pp. 780–782, jun 1994.
- [6] M. G. L. Gustafsson, “Surpassing the lateral resolution limit by a factor of two using structured illumination microscopy,” Journal of Microscopy, vol. 198, pp. 82–87, may 2000.
- [7] C. Franke, U. Repnik, S. Segeletz, N. Brouilly, Y. Kalaidzidis, J.-M. Verbavatz, and M. Zerial, “Correlative single-molecule localization microscopy and electron tomography reveals endosome nanoscale domains,” Traffic (Copenhagen, Denmark), vol. 20, pp. 601–617, aug 2019.
- [8] H. Haselmann, F. Mannara, C. Werner, J. Planagumà, F. Miguez-Cabello, L. Schmidl, B. Grünewald, M. Petit-Pedrol, K. Kirmse, J. Classen, F. Demir, N. Klöcker, D. Soto, S. Doose, J. Dalmau, S. Hallermann, and C. Geis, “Human Autoantibodies against the AMPA Receptor Subunit GluA2 Induce Receptor Reorganization and Memory Dysfunction,” Neuron, vol. 100, pp. 91–105.e9, oct 2018.
- [9] C. Werner, M. Sauer, and C. Geis, “Super-resolving Microscopy in Neuroscience,” Chemical reviews, mar 2021.

- [10] R. Heintzmann and M. G. L. Gustafsson, "Subdiffraction resolution in continuous samples," Nature Photonics, vol. 3, pp. 362–364, july 2009.
- [11] S. Labouesse, A. Negash, J. Idier, S. Bourguignon, T. Mangeat, P. Liu, A. Sentenac, and M. Allain, "Joint Reconstruction Strategy for Structured Illumination Microscopy With Unknown Illuminations.," IEEE transactions on image processing : a publication of the IEEE Signal Processing Society, vol. 26, pp. 2480–2493, may 2017.
- [12] E. Mudry, K. Belkebir, J. Girard, J. Savatier, E. Le Moal, C. Nicoletti, M. Allain, and A. Sentenac, "Structured illumination microscopy using unknown speckle patterns," Nature Photonics, vol. 6, pp. 312–315, apr 2012.
- [13] J. Min, J. Jang, D. Keum, S.-W. Ryu, C. Choi, K.-H. Jeong, and J. C. Ye, "Fluorescent microscopy beyond diffraction limits using speckle illumination and joint support recovery," Scientific Reports, vol. 3, p. 2075, jun 2013.
- [14] M. G. L. Gustafsson, "Nonlinear structured-illumination microscopy: Wide-field fluorescence imaging with theoretically unlimited resolution," Proceedings of the National Academy of Sciences, vol. 102, pp. 13081–13086, sep 2005.
- [15] M. Hofmann, C. Eggeling, S. Jakobs, and S. W. Hell, "Breaking the diffraction barrier in fluorescence microscopy at low light intensities by using reversibly photoswitchable proteins.," Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, vol. 102, pp. 17565–17569, dec 2005.
- [16] S. Waldchen, J. Lehmann, T. Klein, S. van de Linde, and M. Sauer, "Light-induced cell damage in live-cell super-resolution microscopy," Scientific Reports, vol. 5, p. 15348, oct 2015.
- [17] M. J. Rust, M. Bates, and X. Zhuang, "Sub-diffraction-limit imaging by stochastic optical reconstruction microscopy (STORM)," Nature Methods, vol. 3, pp. 793–796, oct 2006.
- [18] M. Heilemann, S. van de Linde, M. Schuttpelz, R. Kasper, B. Seefeldt, A. Mukherjee, P. Tinnefeld, and M. Sauer, "Subdiffraction-resolution fluorescence imaging with conventional fluorescent probes.," Angewandte Chemie, vol. 47, pp. 6172–6176, jul 2008.

- [19] S. van de Linde, A. Loschberger, T. Klein, M. Heidebreder, S. Wolter, M. Heilemann, and M. Sauer, “Direct stochastic optical reconstruction microscopy with standard fluorescent probes,” Nature Protocols, vol. 6, pp. 991–1009, jun 2011.
- [20] A. Loschberger, Y. Novikau, R. Netz, M.-C. Spindler, R. Benavente, T. Klein, M. Sauer, and D. I. Kleppe, “Super-resolution imaging by dual iterative structured illumination microscopy,” bioRxiv, may 2021.
- [21] L. Schmidl, A. Stark, D. Weigel, R. Kowarschik, and C. Geis, “Verfahren und Vorrichtung zur hochaufgelosten Fluoreszenzmikroskopie,” 2018.
- [22] B. M. Ances, R. Vitaliani, R. A. Taylor, D. S. Liebeskind, A. Voloschin, D. J. Houghton, S. L. Galetta, M. Dichter, A. Alavi, M. R. Rosenfeld, and J. Dalmau, “Treatment-responsive limbic encephalitis identified by neuropil antibodies: MRI and PET correlates.,” Brain : a journal of neurology, vol. 128, pp. 1764–1777, aug 2005.
- [23] C. Buckley, J. Oger, L. Clover, E. Tuzun, K. Carpenter, M. Jackson, and A. Vincent, “Potassium channel antibodies in two patients with reversible limbic encephalitis.,” Annals of neurology, vol. 50, pp. 73–78, jul 2001.
- [24] J. Dalmau and L. Bataller, “[Limbic encephalitis: the new cell membrane antigens and a proposal of clinical-immunological classification with therapeutic implications].,” Neurologia, vol. 22, pp. 526–537, oct 2007.
- [25] J. Dalmau, E. Lancaster, E. Martinez-Hernandez, M. R. Rosenfeld, and R. Balice-Gordon, “Clinical experience and laboratory investigations in patients with anti-NMDAR encephalitis.,” The Lancet. Neurology, vol. 10, pp. 63–74, jan 2011.
- [26] E. Tuzun, L. Zhou, J. M. Baehring, S. Bannykh, M. R. Rosenfeld, and J. Dalmau, “Evidence for antibody-mediated pathogenesis in anti-NMDAR encephalitis associated with ovarian teratoma.,” Acta neuropathologica, vol. 118, pp. 737–743, dec 2009.
- [27] J. Dalmau, A. J. Gleichman, E. G. Hughes, J. E. Rossi, X. Peng, M. Lai, S. K. Desai, M. R. Rosenfeld, R. Balice-Gordon, and D. R. Lynch, “Anti-NMDA-receptor encephalitis: case series and analysis of the effects of antibodies.,” The Lancet. Neurology, vol. 7, pp. 1091–1098, dec 2008.

- [28] R. Vitaliani, W. Mason, B. Ances, T. Zwerdling, Z. Jiang, and J. Dalmau, “Paraneoplastic encephalitis, psychiatric symptoms, and hypoventilation in ovarian teratoma.,” Annals of neurology, vol. 58, pp. 594–604, oct 2005.
- [29] R. B. Darnell and J. B. Posner, “Paraneoplastic syndromes involving the nervous system.,” The New England journal of medicine, vol. 349, pp. 1543–1554, oct 2003.
- [30] S. A. Waterman, B. Lang, and J. Newsom-Davis, “Effect of Lambert-Eaton myasthenic syndrome antibodies on autonomic neurons in the mouse.,” Annals of neurology, vol. 42, pp. 147–156, aug 1997.
- [31] M. Lai, M. G. M. Huijbers, E. Lancaster, F. Graus, L. Bataller, R. Balice-Gordon, J. K. Cowell, and J. Dalmau, “Investigation of LGI1 as the antigen in limbic encephalitis previously attributed to potassium channels: a case series.,” The Lancet. Neurology, vol. 9, pp. 776–785, aug 2010.
- [32] E. Lancaster, M. Lai, X. Peng, E. Hughes, R. Constantinescu, J. Raizer, D. Friedman, M. B. Skeen, W. Grisold, A. Kimura, K. Ohta, T. Iizuka, M. Guzman, F. Graus, S. J. Moss, R. Balice-Gordon, and J. Dalmau, “Antibodies to the GABA(B) receptor in limbic encephalitis with seizures: case series and characterisation of the antigen.,” The Lancet. Neurology, vol. 9, pp. 67–76, jan 2010.
- [33] E. Lancaster, E. Martinez-Hernandez, and J. Dalmau, “Encephalitis and antibodies to synaptic and neuronal cell surface proteins.,” Neurology, vol. 77, pp. 179–189, jul 2011.
- [34] E. Lancaster, “The Diagnosis and Treatment of Autoimmune Encephalitis.,” Journal of clinical neurology, vol. 12, pp. 1–13, jan 2016.
- [35] J. Dalmau, C. Geis, and F. Graus, “Autoantibodies to Synaptic Receptors and Neuronal Cell Surface Proteins in Autoimmune Diseases of the Central Nervous System.,” Physiological reviews, vol. 97, pp. 839–887, apr 2017.
- [36] M. Pauli, M. M. Paul, S. Proppert, A. Mrestani, M. Sharifi, F. Repp, L. Kürzinger, P. Kollmannsberger, M. Sauer, M. Heckmann, and A.-L. Sirén, “Targeted volumetric single-molecule localization microscopy of defined presynaptic structures in brain sections,” Communications Biology, vol. 4, p. 407, mar 2021.

- [37] H. Koch, C. E. Nituread, S. Theiss, C. G. Bien, C. Elger, K.-P. Wandinger, A. Vincent, M. Malter, P. Körtvelyessy, H. Lerche, and M. Dihné, “In vitro neuronal network activity as a new functional diagnostic system to detect effects of Cerebrospinal fluid from autoimmune encephalitis patients,” Scientific Reports, vol. 9, p. 5591, apr 2019.
- [38] M. E. Spira and A. Hai, “Multi-electrode array technologies for neuroscience and cardiology.,” Nature nanotechnology, vol. 8, pp. 83–94, feb 2013.
- [39] A. Verkhratsky and V. Parpura, History of electrophysiology and the patch clamp, vol. 1183. 2014.
- [40] M.-G. Liu, X.-F. Chen, T. He, Z. Li, and J. Chen, “Use of multi-electrode array recordings in studies of network synaptic plasticity in both time and space.,” Neuroscience bulletin, vol. 28, pp. 409–422, aug 2012.
- [41] S. U. Jantzen, S. Ferrea, C. Wach, K. Quasthoff, S. Illes, D. Scherfeld, H.-P. Hartung, R. J. Seitz, and M. Dihné, “In vitro neuronal network activity in NMDA receptor encephalitis.,” BMC neuroscience, vol. 14, p. 17, feb 2013.
- [42] E. M. Hiolski, S. Ito, J. M. Beggs, K. A. Lefebvre, A. M. Litke, and D. R. Smith, “Domoic acid disrupts the activity and connectivity of neuronal networks in organotypic brain slice cultures.,” Neurotoxicology, vol. 56, pp. 215–224, sep 2016.
- [43] L. Schmidl, G. Schmidl, A. Gawlik, J. Dellith, U. Hübner, V. Tympel, F. Schmidl, J. Plentz, C. Geis, and H. Haselmann, “Combining super-resolution microscopy with neuronal network recording using magnesium fluoride thin films as cover layer for multi-electrode array technology.,” Scientific reports, vol. 9, p. 16110, nov 2019.
- [44] S. R. Irani, K. Bera, P. Waters, L. Zuliani, S. Maxwell, M. S. Zandi, M. A. Frieese, I. Galea, D. M. Kullmann, D. Beeson, B. Lang, C. G. Bien, and A. Vincent, “N-methyl-D-aspartate antibody encephalitis: temporal progression of clinical and paraclinical observations in a predominantly non-paraneoplastic disorder of both sexes.,” Brain : a journal of neurology, vol. 133, pp. 1655–1667, jun 2010.
- [45] N. Florance-Ryan and J. Dalmau, “Update on anti-N-methyl-D-aspartate receptor encephalitis in children and adolescents.,” Current opinion in pediatrics, vol. 22, pp. 739–744, dec 2010.

- [46] N. R. Florance, R. L. Davis, C. Lam, C. Szperka, L. Zhou, S. Ahmad, C. J. Campen, H. Moss, N. Peter, A. J. Gleichman, C. A. Glaser, D. R. Lynch, M. R. Rosenfeld, and J. Dalmau, “Anti-N-methyl-D-aspartate receptor (NMDAR) encephalitis in children and adolescents.,” Annals of neurology, vol. 66, pp. 11–18, jul 2009.
- [47] T. Iizuka, F. Sakai, T. Ide, T. Monzen, S. Yoshii, M. Iigaya, K. Suzuki, D. R. Lynch, N. Suzuki, T. Hata, and J. Dalmau, “Anti-NMDA receptor encephalitis in Japan: long-term outcome without tumor removal.,” Neurology, vol. 70, pp. 504–511, feb 2008.
- [48] K. Sapkota, K. Dore, K. Tang, M. Irvine, G. Fang, E. S. Burnell, R. Malinow, D. E. Jane, and D. T. Monaghan, “The NMDA receptor intracellular C-terminal domains reciprocally interact with allosteric modulators.,” Biochemical pharmacology, vol. 159, pp. 140–153, jan 2019.
- [49] S. Kaech and G. Banker, “Culturing hippocampal neurons,” Nature Protocols, vol. 1, pp. 2406–2415, dec 2006.
- [50] M. Yamanaka, N. I. Smith, and K. Fujita, “Introduction to super-resolution microscopy.,” Microscopy, vol. 63, pp. 177–192, jun 2014.
- [51] M. Sauer, “Localization microscopy coming of age: from concepts to biological impact,” Journal of Cell Science, vol. 126, pp. 3505–3513, aug 2013.
- [52] B. Huang, W. Wang, M. Bates, and X. Zhuang, “Three-dimensional super-resolution imaging by stochastic optical reconstruction microscopy.,” Science, vol. 319, pp. 810–813, feb 2008.
- [53] S. A. Jones, S.-H. Shim, J. He, and X. Zhuang, “Fast, three-dimensional super-resolution imaging of live cells.,” Nature methods, vol. 8, pp. 499–508, jun 2011.
- [54] T. Klein, S. van de Linde, and M. Sauer, “Live-cell super-resolution imaging goes multicolor.,” Chembiochem : a European journal of chemical biology, vol. 13, pp. 1861–1863, sep 2012.
- [55] S. T. Hess, T. P. K. Girirajan, and M. D. Mason, “Ultra-high resolution imaging by fluorescence photoactivation localization microscopy.,” Biophysical journal, vol. 91, pp. 4258–4272, dec 2006.



- [56] S. van de Linde and M. Sauer, “How to switch a fluorophore: from undesired blinking to controlled photoswitching,” Chemical Society Reviews, vol. 43, pp. 1076–1087, aug 2013.
- [57] J. Vogelsang, C. Steinhauer, C. Forthmann, I. H. Stein, B. Person-Skegro, T. Cordes, and P. Tinnefeld, “Make them blink: probes for super-resolution microscopy.,” Chemphyschem : a European journal of chemical physics and physical chemistry, vol. 11, pp. 2475–2490, aug 2010.
- [58] R. E. Thompson, D. R. Larson, and W. W. Webb, “Precise nanometer localization analysis for individual fluorescent probes.,” Biophysical journal, vol. 82, pp. 2775–2783, may 2002.
- [59] P. Schäfer, S. van de Linde, J. Lehmann, M. Sauer, and S. Doose, “Methylene blue- and thiol-based oxygen depletion for super-resolution imaging.,” Analytical chemistry, vol. 85, pp. 3393–3400, mar 2013.
- [60] S. van de Linde, S. Aufmkolk, C. Franke, T. Holm, T. Klein, A. Löscherger, S. Proppert, S. Wolter, and M. Sauer, “Investigating Cellular Structures at the Nanoscale with Organic Fluorophores,” Chemistry & Biology, vol. 20, no. 1, pp. 8–18, 2013.
- [61] T. Holm, T. Klein, A. Löscherger, T. Klamp, G. Wiebusch, S. van de Linde, and M. Sauer, “A blueprint for cost-efficient localization microscopy.,” Chemphyschem : a European journal of chemical physics and physical chemistry, vol. 15, pp. 651–654, mar 2014.
- [62] G. Patterson, M. Davidson, S. Manley, and J. Lippincott-Schwartz, “Superresolution imaging using single-molecule localization.,” Annual review of physical chemistry, vol. 61, pp. 345–367, may 2010.
- [63] N. K. Wenke, J. Kreye, E. Andrzejak, A. van Casteren, J. Leubner, M. S. Murgueitio, S. M. Reincke, C. Secker, L. Schmidl, C. Geis, F. Ackermann, M. Nikolaus, C. C. Garner, H. Wardemann, G. Wolber, and H. Prüss, “N-methyl-D-aspartate receptor dysfunction by unmutated human antibodies against the NR1 subunit.,” Annals of neurology, vol. 85, pp. 771–776, may 2019.
- [64] A. Badon, A. C. Boccara, G. Lerosey, M. Fink, and A. Aubry, “Multiple scattering limit in optical microscopy,” Optics Express, vol. 25, pp. 28914–28934, nov 2017.

- [65] A. Ishimaru, “Acoustical and optical scattering and imaging of tissues: an overview,” in *Medical Imaging 2001: Ultrasonic Imaging and Signal Processing*, vol. 4325, pp. 1–10, 2001.
- [66] M. Monici, “Cell and tissue autofluorescence research and diagnostic applications,” vol. 11 of *Biotechnology Annual Review*, pp. 227–256, Elsevier, 2005.
- [67] H. R. Ueda, A. Ertürk, K. Chung, V. Gradinaru, A. Chédotal, P. Tomancak, and P. J. Keller, “Tissue clearing and its applications in neuroscience,” *Nature Reviews Neuroscience*, vol. 21, pp. 61–79, feb 2020.
- [68] G. Fattorini, C. Ciriachi, and F. Conti, “Few, activity-dependent, and ubiquitous vglut1/vgat terminals in rat and mouse brain,” *Frontiers in Cellular Neuroscience*, vol. 11, p. 229, aug 2017.
- [69] E. J. Rees, M. Erdelyi, G. S. K. Schierle, A. Knight, and C. F. Kaminski, “Elements of image processing in localization microscopy,” *Journal of Optics*, vol. 15, p. 094012, sep 2013.
- [70] J. Tønnesen and U. V. Nägerl, “Superresolution imaging for neuroscience,” *Experimental Neurology*, vol. 242, pp. 33–40, apr 2013.
- [71] L.-T. Ly, J. Kreye, B. Jurek, J. Leubner, F. Scheibe, J. Lemcke, N. K. Wenke, S. M. Reincke, and H. Prüss, “Affinities of human NMDA receptor autoantibodies: implications for disease mechanisms and clinical diagnostics,” *Journal of Neurology*, vol. 265, pp. 2625–2632, sep 2018.
- [72] J. Planagumà, H. Haselmann, F. Mannara, M. Petit-Pedrol, B. Grünewald, E. Aguilar, L. Röpke, E. Martín-García, M. J. Titulaer, P. Jercog, F. Graus, R. Maldonado, C. Geis, and J. Dalmau, “Ephrin-B2 prevents N-methyl-D-aspartate receptor antibody effects on memory and neuroplasticity,” *Annals of neurology*, vol. 80, pp. 388–400, sep 2016.
- [73] F. Ströhl and C. F. Kaminski, “Frontiers in structured illumination microscopy,” *Optica*, vol. 3, pp. 667–677, jun 2016.
- [74] A. J. Siebenmorgen and Y. Novikau, “Structured Illumination Microscopy with a 3D Lattice for Live Cell Imaging,” *Zeiss technical note*, pp. 1–7, sep 2018.

- [75] M. Saxena, G. Eluru, and S. S. Gorthi, “Structured illumination microscopy,” Advances in Optics and Photonics, vol. 7, pp. 241–275, jun 2015.
- [76] N. George, A. Jain, and R. D. S. Melville, “Speckle, diffusers, and depolarization,” Applied physics, vol. 6, pp. 65–70, feb 1975.
- [77] H. M. Pedersen, “On the Contrast of Polychromatic Speckle Patterns and Its Dependence on Surface Roughness,” Optica Acta: International Journal of Optics, vol. 22, pp. 15–24, jan 1975.
- [78] E. Hecht, Optik. Gruyter, Walter de GmbH, 2018.
- [79] J. W. Goodman, Speckle Phenomena in Optics: Theory and Applications. Roberts & Company Publishers, 2th ed.
- [80] P. Maiti, J. Manna, and M. P. McDonald, “Merging advanced technologies with classical methods to uncover dendritic spine dynamics: A hot spot of synaptic plasticity,” Neuroscience research, vol. 96, pp. 1–13, jul 2015.
- [81] H. J. Eichler and J. Eichler, Laser. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2015.
- [82] J. Wu, S. Li, H. Cao, D. Lin, B. Yu, and J. Qu, “Resolution improvement of multifocal structured illumination microscopy with sparse Bayesian learning algorithm,” Optics Express, vol. 26, pp. 31430–31438, nov 2018.
- [83] M. Kim, C. Park, C. Rodriguez, Y. Park, and Y.-H. Cho, “Superresolution imaging with optical fluctuation using speckle patterns illumination,” Scientific Reports, vol. 5, p. 16525, nov 2015.
- [84] J. Wu, S. Li, S. Zhang, D. Lin, B. Yu, and J. Qu, “Fast analysis method for stochastic optical reconstruction microscopy using multiple measurement vector model sparse Bayesian learning,” Optics Letters, vol. 43, pp. 3977–3980, aug 2018.
- [85] K. V. R. M. Murali, V. B. Naik, and D. Datta, “Gallium-nitride-based light-emitting diodes,” Resonance, vol. 20, pp. 605–616, aug 2015.

- [86] T. Chen, P. B. Catrysse, A. E. Gamal, and B. A. Wandell, “How small should pixel size be?,” in Sensors and Camera Systems for Scientific, Industrial, and Digital Photography Applications (N. Sampat, T. Yeh, M. M. Blouke, N. Sampat, G. M. W. Jr., and T. Yeh, eds.), vol. 3965, pp. 451–459, International Society for Optics and Photonics, SPIE, may 2000.
- [87] L.-H. Yeh, L. Tian, and L. Waller, “Structured illumination microscopy with unknown patterns and a statistical prior,” Biomedical Optics Express, vol. 8, pp. 695–711, feb 2017.
- [88] H. Kang, B. Jia, and M. Gu, “Polarization characterization in the focal volume of high numerical aperture objectives,” Opt. Express, vol. 18, pp. 10813–10821, may 2010.
- [89] N. Lindlein, S. Quabis, U. Peschel, and G. Leuchs, “High numerical aperture imaging with different polarization patterns,” Optics Express, vol. 15, pp. 5827–5842, apr 2007.
- [90] M. D. Lew and W. E. Moerner, “Azimuthal Polarization Filtering for Accurate, Precise, and Robust Single-Molecule Localization Microscopy,” Nano Letters, vol. 14, pp. 6407–6413, oct 2014.
- [91] M. Booth, “Adaptive optical microscopy: The ongoing quest for a perfect image,” Light: Science & Applications, vol. 3, p. e165, apr 2014.
- [92] M. Schwertner, M. J. Booth, and T. Wilson, “Characterizing specimen induced aberrations for high NA adaptive optical microscopy,” Optic Express, vol. 12, pp. 6540–6552, dec 2004.
- [93] H. Shroff, C. G. Galbraith, J. A. Galbraith, and E. Betzig, “Live-cell photoactivated localization microscopy of nanoscale adhesion dynamics,” Nature Methods, vol. 5, pp. 417–423, apr 2008.
- [94] S.-H. Shim, C. Xia, G. Zhong, H. P. Babcock, J. C. Vaughan, B. Huang, X. Wang, C. Xu, G.-Q. Bi, and X. Zhuang, “Super-resolution fluorescence imaging of organelles in live cells with photoswitchable membrane probes,” Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, vol. 109, pp. 13978–13983, aug 2012.

- [95] M. Heilemann, S. van de Linde, A. Mukherjee, and M. Sauer, "Super-resolution imaging with small organic fluorophores.," Angewandte Chemie, vol. 48, pp. 6903–6908, aug 2009.
- [96] T. Klein, S. Proppert, and M. Sauer, "Eight years of single-molecule localization microscopy," Histochemistry and cell biology, vol. 141, pp. 561–575, jun 2014.
- [97] C. Böger, A.-S. Hafner, T. Schlichthärle, M. T. Strauss, S. Malkusch, U. Endesfelder, R. Jungmann, E. M. Schuman, and M. Heilemann, "Super-resolution imaging and estimation of protein copy numbers at single synapses with DNA-point accumulation for imaging in nanoscale topography.," Neurophotonics, vol. 6, p. 35008, jul 2019.
- [98] F. Balzarotti, Y. Eilers, K. C. Gwosch, A. H. Gynnå, V. Westphal, F. D. Stefani, J. Elf, and S. W. Hell, "Nanometer resolution imaging and tracking of fluorescent molecules with minimal photon fluxes.," Science, vol. 355, pp. 606–612, feb 2017.
- [99] M. Bates, B. Huang, G. T. Dempsey, and X. Zhuang, "Multicolor super-resolution imaging with photo-switchable fluorescent probes.," Science, vol. 317, pp. 1749–1753, sep 2007.
- [100] T. A. Klar, S. Jakobs, M. Dyba, A. Egner, and S. W. Hell, "Fluorescence microscopy with diffraction resolution barrier broken by stimulated emission.," Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, vol. 97, pp. 8206–8210, jul 2000.
- [101] K.-C. Li, L. L. H. Huang, J.-H. Liang, and M.-C. Chan, "Simple approach to three-color two-photon microscopy by a fiber-optic wavelength convertor," Biomedical Optics Express, vol. 7, pp. 4803–4815, nov 2016.
- [102] G. Kraus, "W. Schmidt Optische Spektroskopie - Eine Einführung für Naturwissenschaftler und Techniker.," Berichte der Bunsengesellschaft für physikalische Chemie, vol. 99, pp. 1073–1074, sep 1995.
- [103] C. Eggeling, K. I. Willig, and F. J. Barrantes, "STED microscopy of living cells—new frontiers in membrane and neurobiology.," Journal of neurochemistry, vol. 126, pp. 203–212, jul 2013.
- [104] Webseite, "<https://abberior.shop/abberior-LIVE-515>," mar 2021.

- [105] Webseite, “<https://www.fpbases.org>,” apr 2020.
- [106] M. A. Schwentker, H. Bock, M. Hofmann, S. Jakobs, J. Bewersdorf, C. Eggeling, and S. W. Hell, “Wide-field subdiffraction RESOLFT microscopy using fluorescent protein photoswitching,” Microscopy Research and Technique, vol. 70, pp. 269–280, mar 2007.
- [107] T. Grotjohann, I. Testa, M. Reuss, T. Brakemann, C. Eggeling, S. W. Hell, and S. Jakobs, “rsEGFP2 enables fast RESOLFT nanoscopy of living cells.,” eLife, vol. 1, p. e00248, dec 2012.
- [108] N. A. Jensen, J. G. Danzl, K. I. Willig, F. Lavoie-Cardinal, T. Brakemann, S. W. Hell, and S. Jakobs, “Coordinate-Targeted and Coordinate-Stochastic Super-Resolution Microscopy with the Reversibly Switchable Fluorescent Protein Dreiklang,” ChemPhysChem, vol. 15, pp. 756–762, mar 2014.
- [109] G. Liu, Y. Wu, F. Chen, C. Shao, Y. Cheng, and H. Gao, “A comparison of PMT-based and CCD-based sensors for electrochemiluminescence detection of sunset yellow in soft drinks,” Food Chemistry, vol. 362, p. 130219, nov 2021.
- [110] Y. Dai, J. Antonello, and M. J. Booth, “Calibration of a phase-only spatial light modulator for both phase and retardance modulation,” Optics Express, vol. 27, pp. 17912–17926, jun 2019.
- [111] R. Kurtz, M. Fricke, J. Kalb, P. Tinnefeld, and M. Sauer, “Application of multiline two-photon microscopy to functional in vivo imaging.,” Journal of neuroscience methods, vol. 151, pp. 276–286, mar 2006.
- [112] L.-W. Wang, Y. Chen, W. Yan, X.-Y. Weng, Z.-G. Yang, T. Ye, and J.-L. Qu, “Increasing fluorescence lifetime for resolution improvement in stimulated emission depletion nanoscopy.,” Journal of biophotonics, vol. 12, p. e201800315, may 2019.
- [113] S. van de Linde, M. Heilemann, and M. Sauer, “Live-Cell Super-Resolution Imaging with Synthetic Fluorophores,” Annual Review of Physical Chemistry, vol. 63, pp. 519–540, may 2012.

- [114] J. Lippincott-Schwartz and G. H. Patterson, "Photoactivatable fluorescent proteins for diffraction-limited and super-resolution imaging.," Trends in cell biology, vol. 19, pp. 555–565, nov 2009.
- [115] D. Wildanger, E. Rittweger, L. Kastrup, and S. W. Hell, "STED microscopy with a supercontinuum laser source," Optics Express, vol. 16, pp. 9614–9621, jun 2008.
- [116] S. Brustlein, P. Ferrand, N. Walther, S. Brasselet, H. Rigneault, C. Billaudeau, and D. D. Marguet, "Optical parametric oscillator-based light source for coherent Raman scattering microscopy: practical overview," Journal of Biomedical Optics, vol. 16, pp. 1–10, feb 2011.
- [117] C. A. J. Thomas, P. A. Springer, G. E. Loeb, Y. Berwald-Netter, and L. M. Okun, "A miniature microelectrode array to monitor the bioelectric activity of cultured cells.," Experimental cell research, vol. 74, pp. 61–66, sep 1972.
- [118] N. Kaiser, "Review of the fundamentals of thin-film growth," Applied Optics, vol. 41, pp. 3053–3060, jun 2002.
- [119] K. Reichelt, "Nucleation and growth of thin films," Vacuum, vol. 38, pp. 1083–1099, jan 1988.
- [120] J. A. Venables, G. D. T. Spiller, and M. Hanbucken, "Nucleation and growth of thin films," Reports on Progress in Physics, vol. 47, pp. 399–459, apr 1984.
- [121] M. K. Lake, PVD-Beschichtungstechnologie, pp. 879–896. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2009.
- [122] F. A. Smidt, Ion Beam Assisted Deposition of Thin Films and Coatings, pp. 417–454. Dordrecht: Springer Netherlands, 1989.
- [123] P. J. Kelly and R. D. Arnell, "Magnetron sputtering: a review of recent developments and applications," Vacuum, vol. 56, no. 3, pp. 159–172, 2000.
- [124] U. Hilleringmann, Lithografie, pp. 36–54. Wiesbaden: Vieweg+Teubner Verlag, 1996.
- [125] G. Binnig, C. F. Quate, and C. Gerber, "Atomic Force Microscope," PHYSICAL REVIEW LETTERS, vol. 56, pp. 930–933, mar 1986.
- [126] K. Kopitzki and P. Herzog, Einfuehrung in die Festkörperphysik : 6th Edition. 2007.

- [127] W. Demtröder, Laserspektroskopie 1. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2011.
- [128] L. I. Maissel and R. Glang, Handbook of Thin Film Technology. McGraw-Hill handbooks, McGraw-Hill, 1970.
- [129] T. Matsumura and Y. Sato, “A Theoretical Study on Van Der Pauw Measurement Values of Inhomogeneous Compound Semiconductor Thin Films,” Journal of Modern Physics, vol. 01, pp. 340–347, nov 2010.
- [130] L. Dumas, E. Quesnel, J.-Y. Robic, and Y. Pauleau, “Characterization of magnesium fluoride thin films deposited by direct electron beam evaporation,” Journal of Vacuum Science & Technology A, vol. 18, pp. 465–469, mar 2000.
- [131] C. Guo, M. Kong, D. Lin, C. Liu, and B. Li, “Microstructure-related properties of magnesium fluoride films at 193nm by oblique-angle deposition,” Optics Express, vol. 21, pp. 960–967, jan 2013.
- [132] B. A. Movchan and A. V. Demchishin, “STRUCTURE AND PROPERTIES OF THICK CONDENSATES OF NICKEL, TITANIUM, TUNGSTEN, ALUMINUM OXIDES, AND ZIRCONIUM DIOXIDE IN VACUUM.,” 1969.
- [133] J. H. Kim, K. A. Jeon, G. H. Kim, and S. Y. Lee, “Electrical, structural, and optical properties of ITO thin films prepared at room temperature by pulsed laser deposition,” Applied Surface Science, vol. 252, pp. 4834–4837, apr 2006.
- [134] W. A. A. Syed, N. Rafiq, A. Ali, R.-u. Din, and W. H. Shah, “Multilayer AR coatings of TiO<sub>2</sub>/MgF<sub>2</sub> for application in optoelectronic devices,” Optik, vol. 136, pp. 564–572, may 2017.
- [135] C. Viespe, I. Nicolae, C. Sima, C. Grigoriu, and R. Medianu, “ITO thin films deposited by advanced pulsed laser deposition,” Thin Solid Films, vol. 515, pp. 8771–8775, oct 2007.
- [136] B. J. Sealy, A. J. Crocker, M. J. Lee, and R. F. Egerton, “Electrical properties of evaporated MgF<sub>2</sub> films,” Thin Solid Films, vol. 11, pp. 365–376, aug 1972.
- [137] D. G. Flagello, T. Milster, and A. E. Rosenbluth, “Theory of high-NA imaging in homogeneous thin films,” J. Opt. Soc. Am. A, vol. 13, pp. 53–64, jan 1996.



- [138] M. J. Dodge, “Refractive properties of magnesium fluoride,” Appl. Opt., vol. 23, pp. 1980–1985, jun 1984.
- [139] P. F. Rios, H. Dodiuk, S. Kenig, S. McCarthy, and A. Dotan, “Transparent ultra-hydrophobic surfaces,” Journal of Adhesion Science and Technology, vol. 21, pp. 399–408, apr 2007.
- [140] S. Gilles, S. Winter, K. E. Michael, S. H. Meffert, P. Li, K. Greben, U. Simon, A. Offenhäusser, and D. Mayer, “Control of Cell Adhesion and Neurite Outgrowth by Patterned Gold Nanoparticles with Tunable Attractive or Repulsive Surface Properties,” Small, vol. 8, pp. 3357–3367, jul 2012.
- [141] A. van Bergen, T. Papanikolaou, A. Schuker, A. Möller, and B. Schlosshauer, “Long-term stimulation of mouse hippocampal slice culture on microelectrode array,” Brain Research Protocols, vol. 11, pp. 123–133, may 2003.
- [142] R. Gräf, J. Rietdorf, and T. Zimmermann, “Live cell spinning disk microscopy.,” Advances in biochemical engineering/biotechnology, vol. 95, pp. 57–75, may 2005.
- [143] Y. Y. Illarionov, A. G. Banskchikov, D. K. Polyushkin, S. Wachter, T. Knobloch, M. Thesberg, L. Mennel, M. Paur, M. Stöger-Pollach, A. Steiger-Thirsfeld, M. I. Vexler, M. Walzl, N. S. Sokolov, T. Mueller, and T. Grasser, “Ultrathin calcium fluoride insulators for two-dimensional field-effect transistors,” Nature Electronics, vol. 2, pp. 230–235, june 2019.
- [144] G. Cappellini, A. Bosin, G. Serra, J. Furthmüller, F. Bechstedt, and S. Botti, “Electronic and optical properties of small metal fluoride clusters,” ACS Omega, vol. 5, pp. 13268–13277, may 2020.

## Abbildungsverzeichnis

1	Darstellung des Reaktivitätsmusters von aAK gegen den NMDA-Rezeptor in einer primären neuronalen Zellkultur und im Hippocampus. . . . .	9
2	Schematische Darstellung des NMDA-Rezeptors. . . . .	11
3	Fotographie des Elyra P.1 Systems der Firma Zeiss. . . . .	15
4	Darstellung einer Airy-Scheibe und Überlagerung von Airy-Scheiben zweier Punktquellen. . . . .	16
5	Darstellung der verschiedenen Einflussgrößen auf die Auflösung eines Mikroskops. . . . .	17
6	Schematische Darstellung des Lokalisationsprinzips mit den detektierten PSF. 18	
7	Verfahrensablauf zur Bestimmung der „Region of Interest“ (ROI) und zur Cluster-Analyse für die Kolo-kalisationsbestimmung von Rezeptoren und synaptischen Markern. . . . .	21
8	Vergleich zwischen Aufnahmen aus einer primären hippocampalen Neuro-nenkultur und einem 10 $\mu$ m coronalen Hirnschnitt einer Maus für zwei un-terschiedliche Fluorophore. . . . .	22
9	Rekonstruktionen für verschiedene synaptische Marker. . . . .	23
10	Rekonstruktion von verschiedenen primären Antikörpern gegen den NMDA-Rezeptor. . . . .	25
11	Übersichtsbild des Hippocampus und Rekonstruktionsbilder eines 10 $\mu$ m co-ronalen Hirnschnittes einer Maus mit einer NMDA-Rezeptorfärbung. . . . .	26
12	Ergebnisse der Untersuchung des Effektes von aAK gegen den NMDA-Rezeptor. . . . .	27
13	Beleuchtungsmuster in der SIM-Mikroskopie. . . . .	32
14	Darstellung des Beugungsprozesses bei Beleuchtung einer Blende und Ent-stehung eines Specklefeldes im Fernfeld. . . . .	35
15	Darstellung der Ausbildung von subjektiven und objektiven Speckle. . . . .	37
16	Fotographie des Elyra 7 Systems der Firma Zeiss. . . . .	40
17	Charakterisierung der Laserdioden im Lasermodul. . . . .	42
18	Darstellung des Detektionsstrahlenganges und der Bestimmung der Pixel-größen. . . . .	44
19	Aufbau des Beleuchtungsstrahlenganges zur Erzeugung der optimalen Be-leuchtungsstrukturen ( <i>Speckle</i> ). . . . .	46

20	Messung der Abhängigkeit der Specklegröße vom Abstand des Achromaten A3 von der Streuscheibe bei einer Laserwellenlänge von 515 nm. . . . .	48
21	Messung der Abhängigkeit der Specklegröße vom Abstand des Achromaten A3 von der Streuscheibe bei einer Laserwellenlänge von 465 nm. . . . .	50
22	Messung der Abhängigkeit der Specklegröße vom Abstand des Achromaten A3 von der Streuscheibe bei einer Laserwellenlänge von 402 nm. . . . .	51
23	Darstellung der Messergebnisse der Abhängigkeit der mittleren Specklegrößen und verwandter Parameter vom Beleuchtungspottdurchmesser auf der Streuscheibe. . . . .	52
24	Darstellung der Streuscheibe mit Speckle-Erzeugung und Synchronisation der Systemkomponenten. . . . .	54
25	Abbildung der Specklebewegung in Pixel in x-, y-Richtung sowie die resultierende vektorielle Bewegung. . . . .	55
26	Abhängigkeit der Specklebewegung bei gleichbleibender Spannung und Reduzierung der Rotationszeit. . . . .	56
27	Darstellung der Kontrastveränderung bei unterschiedlichen Spannungen bei Reduzierung des Bildaufnahmezyklus. . . . .	58
28	Gegenüberstellung einer Punktstruktur und einer flächigen dendritischen Struktur zur Bestimmung der benötigten Bildanzahl für eine Rekonstruktion mittels M-SBL Algorithmus. . . . .	61
29	Beispielaufnahmen und Rekonstruktion von QDot-Cluster und dendritischen Strukturen. . . . .	62
30	Ergebnisse mittels Fluoreszenz-Testcharts. . . . .	63
31	Vergleich verschiedener hochauflösender Systeme. . . . .	64
32	Darstellung des Lasermoduls. . . . .	65
33	Fotografie des Speckle-Mikroskops. . . . .	76
34	Schematischer Aufbau des nach [21] beschriebenen Mikroskopkonzeptes zur Reduzierung der mittleren Größe des effektiven Speckle-Feldes. . . . .	81
35	Foto des 2-Photonen-Mikroskops LSM 710 der Firma Zeiss. . . . .	83
36	Emissions- und 2-Photonen-Absorptionsspektrum von verschiedenen Fluorophoren aus [101]. . . . .	84
37	Vergleichende Darstellung der Schritte eines Multi-Photonen-Prozesses durch einen Scan-Spot und eine mögliche Realisierung der Multi-Photonen-Anregung durch zwei Specklefelder. . . . .	85

38	Schematischer Aufbau eines STED-Mikroskops sowie vergleichende Darstellung der Schritte eines STED-Prozesses durch einen Scan-Spot und eine mögliche Realisierung der STED-Speckle-Mikroskopie durch zwei Specklefelder. . . . .	87
39	Spektrum und wichtige Daten des STED Fluorophores abberior LIVE 515.	89
40	Emissions- und Absorptionsspektren des Aus- und An-Zustandes von zwei schaltbaren Fluoreszenz-Proteinen sowie die Schrittfolge in der RESOLFT-Mikroskopie im Vergleich zu einer möglichen Schrittfolge der RESOLFT-Mikroskopie bei Verwendung von einer Specklebeleuchtung. . . . .	90
41	Ergebnisse der Bestimmung der 2-PE Detektionsschwelle. . . . .	92
42	Simulationen zur Anregung mittels Specklefeld auf dem Prinzip der 2-PE-Mikroskopie. . . . .	93
43	Simulationen zur Anregung mittels Specklefeld auf dem Prinzip der STED-Mikroskopie. . . . .	95
44	Simulationen zur Anregung mittels Specklefeld auf dem Prinzip der RESOLFT-Mikroskopie. . . . .	97
45	Schematische Darstellung eines möglichen 2-Photonen-Speckle-Mikroskop Konzeptes. . . . .	99
46	Schematische Darstellung eines möglichen STED-Speckle-Mikroskop Konzeptes. . . . .	101
47	Schematische Darstellung eines möglichen RESOLFT-Speckle-Mikroskop Konzeptes. . . . .	103
48	Darstellung von Kombinationsmöglichkeiten von Mikroskopie und Elektrophysiologie. . . . .	108
49	Schematische Darstellung der möglichen Wachstumsarten für dünne Schichten. . . . .	110
50	Schematischer Aufbau verschiedener Anlagen für die Dünnschichtherstellung.	112
51	Beispielprozess: Herstellungsschritte einer Lackstruktur mittels Fotolithografie. . . . .	113
52	Schematischer Aufbau und Funktionsweise eines AFM. . . . .	114
53	Schematischer Aufbau und Funktionsweise eines REMs. . . . .	116
54	Schematische Darstellung der Beugung am Kristallgitter mit 3 Netzebenen mit dem Abstand $d$ . . . . .	117
55	Darstellung von drei Messschritten eines Spektrometers mit Ulbrichtkugel. .	118

56	Darstellung einer 4-Punktmessung nach der Van der Pauw Methode und mittels linearer Spitzenanordnung. . . . .	119
57	Ergebnisse zur Strukturcharakterisierung mittels AFM. . . . .	120
58	Ergebnisse zur Strukturcharakterisierung mittels $\Theta$ -2 $\Theta$ -Scan. . . . .	121
59	Ergebnisse zur Haftfestigkeitsüberprüfung von biologischen Proben. . . . .	122
60	Ergebnisse zur optischen Charakterisierung mittels Transmissionsmessung. .	123
61	Ergebnisse zur optischen Untersuchung mittels Lokalisationsmikroskopie. .	124
62	Ergebnisse zur elektronischen Charakterisierung der MEAs. . . . .	125
63	Aufnahme von primären hippocampalen Zellkulturen auf unterschiedlichen Oberflächen. . . . .	128
64	Darstellung einer Möglichkeit der Integration von einer MEA-Plattform mit Manipulatoren in ein Mikroskop. . . . .	130

## Tabellenverzeichnis

1	Darstellung der ermittelten Pixelgrößen für die Vergrößerungen der Teleskop-Optik unter Verwendung der verschiedenen Objektive . . . . .	45
2	Darstellung der Auflösungsgrenze in Pixeln nach dem Abbe - Kriterium für die Vergrößerungen der Teleskop-Optik unter Verwendung der verschiedenen Objektive . . . . .	45
3	Darstellung der Auflösungsgrenze in Pixeln nach dem Rayleigh - Kriterium für die Vergrößerungen der Teleskop-Optik unter Verwendung der verschiedenen Objektive . . . . .	45
4	Darstellung der normierten mittleren Specklegrößen in x-, y- und xy-Richtung sowie die Elliptizität $x/y$ der mittleren Specklegröße im Vergleich von 63x Wasser-Immersion-Objektivs im Vergleich zu dem 63x Luft-Objektiv. . . . .	60
5	Darstellung der ermittelten Kontrastwerte nach Rotation mit einer Ruhezeit von 35 ms für das 63x Wasser-Immersion-Objektiv . . . . .	60
6	chemische Substanzen . . . . .	137
7	Verwendete Primär-Antikörperverdünnungen . . . . .	138
8	Sekundär-Antikörperverdünnungen mit Fluoreszenzfarbstoffen . . . . .	138
9	Zusammensetzung der 1x PBS - Lösung (50 ml) . . . . .	139
10	Zusammensetzung der 1M KOH - Lösung (50 ml) . . . . .	139
11	Zusammensetzung der 1M MEA / PBS - Lösung (1 ml) . . . . .	139
12	Zusammensetzung <i>d</i> STORM Puffer (pH~7,9 / 100mM MEA / PBS / 1 ml) . . . . .	139
13	Zusammensetzung HBSS - Lösung (250 ml) . . . . .	139
14	Zusammensetzung Plating - Medium (100 ml) . . . . .	140
15	Zusammensetzung Neurobasal - Medium (100 ml) . . . . .	140
16	Zusammensetzung 10 % BSA / PBS - Lösung (100 ml) . . . . .	140
17	Zusammensetzung Blockpuffer 1 (10 % BSA / 10 % Serum / PBS / 1 ml) . . . . .	140
18	Zusammensetzung Blockpuffer 2 (1 % BSA / 1 % Serum / PBS) . . . . .	141
19	Zusammensetzung 2 % APTES / Methanol - Lösung ( 1 ml) . . . . .	141

## Danksagung

Auf diesem Weg möchte ich all denjenigen danken, die mir beim Erstellen der vorliegenden Arbeit zur Seite standen und mich mit Ihren Ratschlägen unterstützten. Im Laufe diese Promotion konnte ich in vielen Gruppen des UKJ, der FSU Jena und des Leibniz-IPHTs wissenschaftliche Kollegen finden.

Ich bedanke mich insbesondere bei Prof. Dr. Christian Geis, der es mir ermöglichte, diese Promotion am Universitätsklinikum Jena in der Sektion für Translationale Neuroimmunologie zu bearbeiten. Seine wertvolle Unterstützung bei der Einarbeitung in eine neue Thematik der Neurowissenschaften und im Verlaufe des gesamten Bearbeitungszeitraumes, haben mich in meiner beruflichen und persönlichen Entwicklung weit vorangebracht. Des Weiteren bedanke ich mich bei Prof. Jens Haueisen, welcher mir die Möglichkeit gegeben hat, diese Arbeit an der TU Ilmenau einzureichen und mich auf diesem Weg an der TU begleitete.

Den alten und neuen Mitarbeitern der Sektion für Translationale Neuroimmunologie gebührt genauso mein Dank. Besonders danke ich Dr. Holger Haselmann für die Ratschläge während der Arbeit und für die wertvollen Diskussionen in Bezug auf die Arbeit, aber auch im privaten. Für die großartige Unterstützung im Labor danke ich unseren Technischen Assistenten Claudia Sommer und Christin Reißig, welche Vieles möglich gemacht haben und immer zur Stelle waren, wenn man sie gebraucht hat. Genauso danke ich meinen alten Kollegen Dr. Christian Werner, welcher mich in der Gruppe als sein Nachfolger in der Mikroskopie eingearbeitet hat, bevor er zurück nach Würzburg gegangen ist, und natürlich für das Vertrauen, dass ich seine Aufgaben erledigen kann. Weiterhin gebührt mein Dank Marin Kempfer der mich seit Beginn seiner Tätigkeit in der Gruppe in vielen Situationen unterstützt hat und es ermöglicht hat, dass ich mich in den letzten Monaten voll auf die Fertigstellung der Dissertation konzentrieren konnte. Auch bei Dr. Nina Hahn möchte ich mich für viele großartige Gespräche und für eine großartige Unterstützung bedanken. Ein großer Dank gehört auch Nils Mein und seiner Mutter Karin Mein, welche die Arbeit sehr gründlich Korrektur gelesen haben. Natürlich auch allen hier nicht namentlich genannten Mitgliedern der Arbeitsgruppe möchte ich meinen Dank aussprechen.

Ebenfalls bedanke ich mich bei Dr. Christian Schmeer und PD Dr. Silke Keiner für die vielen Gespräche und Unterstützungen. Außerdem bedanke ich mich bei Dr. Diane Wengeroth und Julia Lindner für die Unterstützung in so mancher Stunde und für viele großartige Gespräche.

An dieser Stelle möchte ich auch Prof. Christian Eggeling und jun. Prof. Christian Franke danken. Sie hatten oft ein offenes Ohr und haben, wenn sie die Möglichkeit sahen, mit Rat und Tat geholfen. Weiterhin möchte ich jun. Prof. Christian Franke und seinen Mitarbeitern Dr. Andreas Stark und Gregor Jörg Gentsch für die sehr herzliche Zusammenarbeit in der universitären Arbeitsgruppe danken. Ich hoffe, dass mit dieser Zusammenarbeit die Basis für gute wissenschaftliche Projektergebnisse in der Zukunft ist. Zusätzlich möchte ich mich bei Prof. Richard Kowarschik und Dr. Daniel Weigel bedanken, welche mich im Laufe der Arbeit in wissenschaftlich / technischen Gesprächen und bei der Patenteinreichung ebenfalls unterstützt haben.

Auch bei vielen Kollegen wie zum Beispiel Leonie Kaczmarek oder Philipp Lorenz, welche ich durch das Medizinerpraktikum kennen gelernt habe, möchte ich mich hier für viele tiefgründige Gespräche bedanken. Bedanken möchte ich mich ebenfalls bei Dr. Christian Katzer, mit dem ich viele Jahre gute und tiefgründige Gespräche im Laufe der Mediziner-Ausbildung und darüber hinausgeführt habe.

Zum Schluss möchte ich noch meiner Familie danken, welche immer hinter mir standen und mich in jeder Situation unterstützt haben.

Auch jedem nicht namentlich angesprochenen, der mich bei der Erstellung dieser Dissertation unterstützt hat, soll gedankt sein. Ich hoffe, ich habe nicht allzu viele „gute Seelen“ vergessen.



## Erklärung

Ich versichere, dass ich die vorliegende Arbeit ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Die aus anderen Quellen direkt oder indirekt übernommenen Daten und Konzepte sind unter Angabe der Quelle gekennzeichnet.

Bei der Auswahl und Auswertung folgenden Materials haben mir die nachstehend aufgeführten Personen in der jeweils beschriebenen Weise unentgeltlich geholfen:

1. Frau C. Sommer (Universitätsklinikum Jena, Sektion für Translationale Neuroimmunologie), bei der Herstellung von primären neuronalen Zellkulturen, sowie die Herstellung von 10  $\mu\text{m}$  Schnitten.
2. Prof. R. Kowarschik, Dr. D. Weigel, Herr A. Stark (Friedrich-Schiller-Universität Jena, Institut für angewandte Optik und Biophysik), bei der Erstellung des Patentantrages sowie des Aufbaus eines ersten Mikroskop-Prototyps.
3. Dr. G. Schmidl, Dr. U. Hübner, Dr. J. Dellith, Frau A. Gawlik, Frau A. Dellith, Frau C. Schmidt (Leibniz IPHT Jena, Funktionale Grenzflächen, Kompetenzzentrum für Mikro-Nanotechnologie) bei der Strukturierung der Testcharts sowie der Herstellung und der strukturellen Charakterisierung der MEA-Systeme.
4. apl. Prof. F. Schmidl, Dr. V. Tympel (Friedrich-Schiller-Universität Jena, Institut für Festkörperphysik) für die Hilfe bei der Durchführung der elektrischen Charakterisierung der hergestellten MEA-Systeme.

Weitere Personen waren an der inhaltlich-materiellen Erstellung der vorliegenden Arbeit nicht beteiligt. Insbesondere habe ich hierfür nicht die entgeltliche Hilfe von Vermittlungs- bzw. Beratungsdiensten (Promotionsberatern oder anderen Personen) in Anspruch genommen. Niemand hat von mir unmittelbar oder mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen.

Die Arbeit wurde bisher weder im In- noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer Prüfungsbehörde vorgelegt.

Ich bin darauf hingewiesen worden, dass die Unrichtigkeit der vorstehenden Erklärung als Täuschungsversuch bewertet wird und gemäß § 7 Abs. 10 der Promotionsordnung den Abbruch des Promotionsverfahrens zur Folge hat.

Jena, den 13. August 2022  
(Ort, Datum)

(Lars Schmidl)

# Lars Schmidl

## *Master of Engineering*

---

### Akademische Ausbildung

- 09/2013 bis 01/2016 Master-Studium  
Laser- und Optotechnologie  
Ernst-Abbe Hochschule Jena  
Abschluss: Master of Engineering
- 09/2010 bis 08/2013 Bachelor-Studium  
Laser- und Optotechnologie  
Ernst-Abbe Hochschule Jena  
Abschluss: Bachelor of Engineering
- 10/2007 bis 09/2010 Diplom-Studium  
Physik  
Technischen Universität Dresden  
Abschluss: 6 Semester

---

### Berufliche akademische Tätigkeiten

- seit 01/2016 Wissenschaftlicher Mitarbeiter  
Sektion für Translationale Neuroimmunologie  
Hans-Berger-Klinik für Neurologie  
Universitätsklinikum Jena
- 02/2015 bis 04/2015 Auslandspraktikum an der University of New Mexico, Albuquerque
- 08/2011 bis 09/2011 Praktikum am Insitut für Festkörperphysik der FSU Jena
- 08/2010 bis 09/2010 Praktikum am Insitut für Festkörperphysik der FSU Jena

---

### Berufliche Weiterbildungen

- 09/2013 bis 01/2016 **Weiter-/Ausbildung** Laserschutzbeauftragter

---

### Vortragstätigkeiten

- 25.06.2019 **JSMM Symposium, Dornburg - L. Schmidl**  
MEA-4-SRM High end technology for neurobiological applications.
- 03.06.2019 **Receptor Light Symposium, Jena - L.Schmidl**  
Human anti-NR1 autoantibodies induce synaptic pathology with functional relevant loss of postsynaptic NMDA receptors.

---

## Postervorträge

14. - 17.04.2019 **OSA Biophotonics Congress: Optics in the Life Sciences, Tucson, USA**  
**L. Schmidl**, L. Röpke, M. Ceanga, J. Kreye, N. Wenke, H. Haselmann, H. Prüß, C. Geis  
Human anti-NR1 autoantibodies induce synaptic pathology with functional relevant loss of postsynaptic NMDA receptors.
20. - 23.03.2019 **German Neuroscience Society Meeting, Göttingen, Deutschland**  
H. Haselmann, F. Mannara, C. Werner, J. Planagumà, **L. Schmidl**, F. Miguez-Cabello, M. Petit-Pedrol, D. Soto, S. Doose, J. Dalmau, S. Hallermann, C. Geis  
Human Autoantibodies against the AMPA Receptor Subunit GluA2 induce Receptor Reorganization and Memory Dysfunction.
07. - 11.07.2018 **FENS - Federation of European Neuroscience Societies, Berlin, Deutschland**  
**L. Schmidl**, L. Röpke, M. Ceanga, J. Kreye, N. Wenke, H. Prüß, C. Geis  
Human anti-NR1 autoantibodies induce synaptic pathology with functional relevant loss of postsynaptic NMDA receptors.
- 2018 **TRR166 Retreat, Masserberg, Deutschland**  
F. Neubert, **L. Schmidl**, G. Beliu, H. Haselmann, C. Werner, S. Doose, C. Geis  
Investigating humoral autoimmunity against the NMDA-receptor NR1 subunit by super-resolution fluorescence microscopy: effects on synapse integrity and function.
- 18.-22.09.2017 **DokDok - Abbe School of Photonics, Suhl, Deutschland**  
**L. Schmidl**, D. Weigel, C. Geis  
A cost efficient and fast super-resolution speckle microscope for applications in vital tissue.
- 06.03.2017 **Neurologie Retreat, Bad Blankenburg, Deutschland**  
**L. Schmidl**, C. Werner, C. Geis  
Investigating humoral autoimmunity against the NMDA-receptor NR1 subunit and dendritic structure using *d*STORM.
- 2016 **TRR166 Retreat, Masserberg, Deutschland**  
S. Doose, C. Geis, J. Grüner, H. Haselmann, F. Neubert, **L. Schmidl**, C. Werner  
Investigating humoral autoimmunity against the NMDA-receptor NR1 subunit by super-resolution fluorescence microscopy: effects on synapse integrity and function.

---

## Lehr- und Betreuungstätigkeiten

- Seit WS 2011/12 Tutor für Physik für Mediziner an der FSU Jena  
WS 2012/13 Ehrenamtlich Praktikumsassistent für das Physikpraktikum der Mediziner an der FSU Jena  
Seit WS 2014/15 Ehrenamtlich Praktikumsassistent für das Physikpraktikum der Mediziner an der FSU Jena  
SS 2015 Tutor für Experimental-Physik II an der Ernst-Abbe Hochschule Jena im Fachbereich SciTec  
WS 2010/11 Tutor für Experimental-Physik I an der Ernst-Abbe Hochschule Jena im Fachbereich SciTec  
WS 2020/21 laufend Betreuung Bachelorarbeit  
Friedrich-Schiller-Universität Jena  
WS 2020/21 laufend Betreuung Masterarbeit  
Friedrich-Schiller-Universität Jena  
SS 2019 laufend Betreuung Doktorarbeit  
Universitätsklinikum Jena  
SS 2016 Betreuung Summer school Studenten  
Universitätsklinikum Jena

Jena, den 21. Dezember 2021

## Publikationen

### Fachzeitschriften

- [01] **L. Schmidl**, G. Schmidl, A. Gawlik, J. Dellith, U. Hübner, V. Tympel, F. Schmidl, J. Plentz, C. Geis, and H. Haselmann, „Combining super-resolution microscopy with neuronal network recording using magnesium fluoride thin films as cover layer for multielectrode array technology.“ *Scientific reports*, vol. 9, p. 16110, **nov 2019**.
- [02] N. K. Wenke, J. Kreye, E. Andrzejak, A. van Casteren, J. Leubner, M. S. Murgueitio, S. M. Reincke, C. Secker, **L. Schmidl**, C. Geis, F. Ackermann, M. Nikolaus, C. C. Garner, H. Wardemann, G. Wolber, H. Prüss, „N-methyl-D-aspartate receptor dysfunction by unmutated human antibodies against the NR1 subunit.“ *Annals of neurology*, vol. 85, p. 771, **mai 2019**.
- [03] H. Haselmann, F. Mannara, C. Werner, J. Planagumà, F. Miguez-Cabello, **L. Schmidl**, B. Grünewald, M. Petit-Pedrol, K. Kirmse, J. Classen, F. Demir, N. Klöcker, D. Soto, S. Doose, J. Dalmau, S. Hallermann, C. Geis, „Human Autoantibodies against the AMPA Receptor Subunit GluA2 Induce Receptor Reorganization and Memory Dysfunction.“ *Neuron*, vol. 100, p.91, **okt 2018**.

### Patente

- [01] **L. Schmidl**, A. Stark, D. Weigel, R. Kowarschik, C. Geis, „Verfahren und Vorrichtung zur hochaufgelösten Fluoreszenzmikroskopie.“ (DE) 10 2018 124 984.5, **2018**.

### Tagungen (Vorträge/Poster)

#### Vorträge

- [01] **L. Schmidl**, „MEA-4-SRM High end technology for neurobiological applications.“ JSMM Symposium, Dornburg, **2019** (25.06.2019).
- [02] **L. Schmidl**, „Human anti-NR1 autoantibodies induce synaptic pathology with functional relevant loss of postsynaptic NMDA receptors.“ Receptor Light Symposium, Jena, **2019** (03.06.2019).

## Poster

- [01] **L. Schmidl**, L. Röpke, M. Ceanga, J. Kreye, N. Wenke, H. Haselmann, H. Prüß, C. Geis, „Human anti-NR1 autoantibodies induce synaptic pathology with functional relevant loss of postsynaptic NMDA receptors.“ OSA Biophotonics Congress: Optics in the Life Sciences, Tuscon, USA, **2019** (14. - 17.04.2019).
- [02] H. Haselmann, F. Mannara, C. Werner, J. Planagumà, **L. Schmidl**, F. Miguez-Cabello, M. Petit-Pedrol, D. Soto, S. Doose, J. Dalmau, S. Hallermann, C. Geis, „Human Autoantibodies against the AMPA Receptor Subunit GluA2 induce Receptor Reorganization and Memory Dysfunction.“ German Neuroscience Society Meeting, Göttingen, **2019** (20. - 23.03.2019).
- [03] **L. Schmidl**, L. Röpke, M. Ceanga, J. Kreye, N. Wenke, H. Prüß, C. Geis, „Human anti-NR1 autoantibodies induce synaptic pathology with functional relevant loss of postsynaptic NMDA receptors.“ FENS - Federation of European Neuroscience Societies, Berlin, **2018** (07. - 11.07.2018).
- [04] F. Neubert, **L. Schmidl**, G. Beliu, H. Haselmann, C. Werner, S. Doose, C. Geis, „Investigating humoral autoimmunity against the NMDA-receptor NR1 subunit by super-resolution fluorescence microscopy: effects on synapse integrity and function.“ TRR166 Retreat, Masserberg, **2018**.
- [05] **L. Schmidl**, D. Weigel, C. Geis, „A cost efficient and fast super-resolution speckle microscope for applications in vital tissue.“ DokDok Suhl, Abbe School of Photonics, **2017** (18. - 22.09.2017).
- [06] **L. Schmidl**, C. Werner, C. Geis, Neurologie Retreat, „Investigating humoral autoimmunity against the NMDA-receptor NR1 subunit and dendritic structure using *d*STORM.“ Neuro Retreat, Bad Blankenburg, **2017** (06.03.2017).
- [07] S. Doose, C. Geis, J. Grüner, H. Haselmann, F. Neubert, **L. Schmidl**, C. Werner, „Investigating humoral autoimmunity against the NMDA-receptor NR1 subunit by super-resolution fluorescence microscopy: effects on synapse integrity and function.“ TRR166 Retreat, Masserberg, **2016**.