
Schnelle und hochsensitive multifokale Zwei-Photonen-Laser-Raster-Mikroskopie

Neue Anwendungsgebiete in der
Biologie, Chemie und Physik

Dissertation an der
Universität Bielefeld, Fakultät für Physik

vorgelegt von Matthias Fricke

April 2007

Schnelle und hochsensitive multifokale Zwei-Photonen-Laser-Raster-Mikroskopie

Neue Anwendungsgebiete in der
Biologie, Chemie und Physik

Dissertation
zur Erlangung des akademischen Grades
Doktor der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

an der Fakultät für Physik
der Universität Bielefeld

vorgelegt von
Matthias Fricke
aus Bielefeld

April 2007

Gutachter: Prof. Dr. Markus Sauer
Prof. Dr. Günter Reiss

Gedruckt auf alterungsbeständigem Papier gemäß DIN ISO 9706

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
2	Grundlagen der TPLSM	9
2.1	Theorie des Zwei-Photonen-Anregungsprozesses	11
2.2	Theorie der Fluoreszenzemission	21
2.3	Prinzipieller Aufbau eines TPLSM	26
2.3.1	Die verschiedenen Rasterverfahren	31
2.4	Parallel-Processing in der LSM – multi-fokale TPLSM	37
2.4.1	Grundlagen des Parallel-Processing in der TPLSM	38
2.4.2	Realisierung des Parallel-Processing – Aufbau des Strahlteilers	42
2.4.3	Bildverarbeitung beim Parallel-Processing	45
2.5	Theorie der Auflösung	49
2.5.1	Erreichbare laterale Auflösung	49
2.5.2	Erreichbare axiale Auflösung	56
2.6	GFP – ein natürlicher Farbstoff	60
2.7	Photophysik von Quantendots	65
2.8	Weitere Aspekte der TPLSM	74
2.8.1	Strahlenschädigung und Ausbleichen der Proben	74
2.8.2	Farbstoffauswahl, Ausbleichen der Farbstoffe	75
2.8.3	Vorteile der TPLSM aus Sicht der Anwendung	76
3	Versuchsaufbau	77
3.1	Aufbau des multifokalen TPLSM im Überblick	78
3.2	Charakterisierung des SpectraPhysics MaiTai-Lasers	82
3.3	Charakterisierung des LaVision Biotec TriM-Scope	86
3.4	Charakterisierung des Olympus IX70-Mikroskopes	93
3.4.1	z-Positionierung der Beobachtungsebene	96

3.4.2	Bestimmung der PSF / Auflösung	96
3.5	Charakterisierung der Andor iXon EMCCD-Kamera	98
3.5.1	Empfindlichkeit des TPLSM unter typischen Messbedingungen	100
4	Anwendungen der multifokalen Zwei-Photonen-Laser-Raster-Mikroskopie	103
4.1	Bestimmung der maximal erreichbaren Auflösung mit Hilfe von Quantendots	104
4.1.1	Grundsätzliche Beobachtbarkeit der Quantendots	105
4.1.2	Bestimmung der Detektionseffizienz	109
4.1.3	Bestimmung der PSF als maximal erreichbare Auflösung	112
4.2	Flächige Anregung – Abbilden ohne Rastern	115
4.3	Selbstorganisation in der Chemie: Morphosynthese sternförmiger Titandioxid/ Siliziumdioxid-Schalen	121
4.4	Lokalisierung struktureller und regulatorischer Komponenten von COP1-umhüllten Vesikeln in lebenden Wurzelzellen	129
4.5	Neurobiologie: Optische Kalzium-Messung in Nervenzellen	149
4.5.1	Prinzipieller Nachweis der Anwendbarkeit eines TPLSM zur <i>in vivo</i> -Kalzium-Messung	154
4.5.2	Multizeilen-TPLSM zur <i>in vivo</i> -Kalzium-Untersuchung	166
4.5.3	Auswirkung der Streuung auf die Auflösung	172
5	Diskussion und Ausblick	179
6	Zusammenfassung	195
	Literatur	201
	Publikationen mit eigener Beteiligung	223
	Danksagung	225
	Eidesstattliche Erklärung	227

Abbildungsverzeichnis

2.1.1	Zwei-Photonen-Anregungsprozess aus dem Grundzustand $ g\rangle$ in den angeregten Zustand $ e\rangle$ über den virtuellen Zwischenzustand $ v\rangle$	12
2.1.2	Qualitativer Vergleich des idealisierten Molekülpotentials mit dem realen Potential bei veränderlichen Kernabständen.	14
2.1.3	Ein-Photonen- und Zwei-Photonen-Absorption in Abhängigkeit des axialen Abstandes von einer Linse für einen Strahl mit gaußförmigem Strahlprofil	19
2.1.4	Ein-Photonen- und Zwei-Photonen-Anregung in einer farbstoffgefüllten Küvette, aus M.K. ROBINSON [38]	21
2.2.1	Vibrations- und Rotations-Energieniveaus eines zweiatomigen Moleküls, zusammen mit der parabolischen Näherung des Potentialverlaufes	22
2.2.2	JABLONSKI-Diagramm: Gezeigt sind die möglichen Übergänge zwischen den Singulett-Zuständen und dem Triplett-Zustand	23
2.3.1	Idealisiertes dreidimensionales Rasterverfahren	27
2.3.2	Vergleich des Aufbaus eines CLSM und eines TPLSM	29
2.3.3	Rastermodi eines LSM	32
2.3.4	Verschlechterung der Auflösung im non-descanned Modus des Strahlrasterverfahrens	36
2.4.1	Skizzierung des idealen Parallel Processing	39
2.4.2	Prinzipieller Strahlteiler Aufbau nach T. NIELSEN <i>et al.</i> [16]	42
2.4.3	Realer Aufbau des Strahlteilers im verwendeten TriM-Scope	43
2.4.4	Alternativer Strahlteiler Aufbau mit einem Mikrolinsenraster, nach J. BEWERSDORF <i>et al.</i> [44]	44
2.4.5	Gegenüberstellung eines idealen Rastergitters und eines realen Rastergitters	47

2.4.6	Triangulation real aufgenommener Rasterpunkte, (A) zeigt das Triangulationsgitter, (B) die Überlagerung mit dem berechneten Bild	48
2.5.1	Die Standardgeometrie der Beugungstheorie mit Bezeichnung der notwendigen Elemente der Rechnung	50
2.5.2	FRAUNHOFER-Beugung mit und ohne Linse	52
2.5.3	Die BESSEL-Funktionen J_1 und J_1^2 und das AIRY-Scheibchen	53
2.5.4	Intensitätsverläufe von AIRY-Scheibchen: links: zwei noch auflösbare Punktlichtquellen, rechts: Intensitätsprofile bei CLSM und TPLSM	54
2.5.5	Geometrie für die Berechnung der elektrischen Feldverteilung im Bereich des Fokus	57
2.5.6	normierte Intensitätsverteilung im Fokusbereich für eine konvergierende sphärische Welle – Isophoten in einer meridionalen Ebene, aus BORN & WOLF [46]	59
2.5.7	normierter Intensitätsverlauf $((\sin x)/x)^2$ entlang der Optischen Achse und Anwendung des RAYLEIGH-Kriteriums zur Auflösungsbestimmung	59
2.6.1	Zwei zueinander gedrehte Gesamtansichten der Tonnenstruktur des GFP (aus F. YANG <i>et al.</i> [51])	61
2.7.1	Größenvergleich von Quantendots und vergleichbaren Objekten aus X. MICHALET <i>et al.</i> [70]	65
2.7.2	Veränderung der Bandstruktur beim Übergang vom Festkörper (links) zum Nanokristall (rechts) aus V.I. KLIMOV [71]	68
2.7.3	Lösungen von CdSe-Quantendots unterschiedlicher Größe, die unter UV-Beleuchtung in verschiedenen Farben leuchten, aus V.I. KLIMOV [71]	68
2.7.4	Normierte Emissionsspektren von Kern- und Kern/Hülle-Nanokristallen aus BAROVSKY (QUANTUM DOT CORP.) [72]	69
2.7.5	Anregungsspektren von CdSe-Nanokristallen unterschiedlicher Größe, aus C.B. MURRAY <i>et al.</i> [74]: (A) zeigt Absorptionsspektren unterschiedlich großer Kristalle, (B) zeigt das Absorptions- und Emissionsspektrum eines Kristalls	70
2.7.6	Schematisches Energieniveaudiagramm für Elektronen (oben) und Löcher (unten), aus L.W. WANG <i>et al.</i> [76]	72

3.1.1	Die wichtigsten Geräte des multifokalen TPLSM-Aufbaus und detaillierter Strahlverlauf innerhalb des TriM-Scopes und des Mikroskopes.	79
3.1.2	Ansteuerung der Geräte und Synchronisation der Ansteuerung.	81
3.1.3	Ansteuerung der Geräte und Synchronisation der Ansteuerung beim Zeilenrasterverfahren.	81
3.2.1	Wellenlängenabhängigkeit der Ausgangsleistung $P_{\text{Laser}}(\lambda)$ des Lasers und der Laserleistung $P_{\text{Obj.}}(\lambda)$ nach dem Objektiv	83
3.3.1	Innenansicht des LaVision Biotec TriM-Scope	87
3.3.2	Vergleich der Homogenität der Rastergebiete bei matrixförmiger (links) und linienförmiger Strahlanordnung (rechts)	88
3.4.1	Transmissionskurven des Dichroiten und des Zwei-Photonen-Sperrfilters	93
3.4.2	Transmissionskurven der Emissionsfilter für CFP, GFP und YFP	94
3.5.1	Prinzip des Verstärkungsregisters der EMCCD-Kamera	99
3.5.2	Konzentrationsreihe einer CFP- und einer YFP-Lösung unter typischen Messbedingungen	101
4.1.1	Bilder von Quantendots bei verschiedenen Belichtungszeiten	106
4.1.2	Zeitspuren dreier Quantendots aus Abb. 4.1.1 (A), die ein unterschiedliches Blink-Verhalten zeigen	108
4.1.3	Zeitlicher Verlauf der Wahrscheinlichkeit, mit der sich ein Quantendot im angeregten Zustand befindet	110
4.1.4	Quantendot-Bilder zur Bestimmung der PSF, aufgenommen im Multistrahl- und Einzelstrahlbetrieb	113
4.1.5	Vergleich der Einzelstrahl- und Multistrahl-PSF, berechnet aus den beiden Bildern der Abb. 4.1.4 mit Hilfe des Autokorrelationsverfahrens	114
4.2.1	Aufbau des Multistrahl-TPLSM für das Experiment zur Abbildung ohne Rastern	116
4.2.2	Fluoreszenzbild und Intensitätsprofile bei flächiger Anregung	117
4.2.3	Fluoreszierende Latexkügelchen, aufgenommen mit dem Aufbau für die flächige Anregung	118
4.2.4	Hellfeld- und Fluoreszenzbild von Rhodamin 6G-gefärbten He- fezellen bei flächiger Anregung	118
4.2.5	Vergleich der „sea response“-Kurven bei flächiger Anregung mit der theoretischen Kurve und einem aufgeweiteten Einzelstrahl gleicher Größe	120

4.3.1	Hellfeldbilder einer Zeitserie der spontanen Emulgierung eines Tropfens Chlorcyclohexan nach Mikroinjektion in eine wässrige Lösung von CTAB	123
4.3.2	Hellfeldbilder einer Zeitserie der Bildung einer sternförmigen Morphologie an einem Tropfen Chlorcyclohexan mit TBOT in eine wässrige Lösung von CTAB	125
4.3.3	Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen von sternförmigen Titandioxid/Siliziumdioxid-Schalen. Links: typische Morphologie mineralisierter Schalen. Rechts: Bruchstellen der Stacheln	125
4.3.4	Repräsentative Fluoreszenz- und Hellfeldbilder der Randbereiche der Öltropfen mit den ausgebildeten Stacheln aus dem vorstufenfreien System und dem System mit Titandioxid-Vorstufe	127
4.4.1	Skizze des Golgi-Apprates, des Endoplasmatischen Retikulums und der zwischen ihnen ausgetauschten Transportvesikel.	130
4.4.2	TPLSM-Bilder der <i>in vivo</i> -Lokalisierung von Komponenten der COPI-umhüllten Vesikel in <i>Medicago truncatula</i> -Wurzelzellen	134
4.4.3	Zeitserie dreier fluoreszierender Strukturen in einem Ausschnitt einer mit Mt ζ -COP2:: <i>GFP</i> transformierten <i>Medicago truncatula</i> -Wurzelzelle	135
4.4.4	Bewegungsmuster individueller fluoreszierender Strukturen im Cytoplasma der <i>M. truncatula</i> -Wurzelzellen	137
4.4.5	CLSM-Fluoreszenzaufnahmen der Doppelfärbung mit Mitotracker von MtArf1:: <i>GFP</i> -transformierten <i>M. truncatula</i> -Wurzelzellen, um die Mitochondrien sichtbar zu machen	139
4.4.6	CLSM-Fluoreszenzaufnahmen der Doppelfärbung mit FM4-64 von MtArf1:: <i>GFP</i> -transformierten <i>M. truncatula</i> -Wurzelzellen, um die Endomembranen sichtbar zu machen, bei kurzzeitiger und langzeitiger Inkubation	140
4.4.7	Reversible Wirkung von Latrunculin B als Inhibitor auf Mt ζ -COP1:: <i>GFP</i> -transformierte <i>M. truncatula</i> -Wurzelzellen	141
4.4.8	Bewegung entlang des ER-Netzwerkes durch Anfärbung des ER mit dem Farbstoff DiOC ₅ und Strömungsinhibierung durch Brefeldin A	142
4.4.9	Lokalisierung der (A) dominant inaktiven und (B) dominant aktiven MtArf1:: <i>GFP</i> -Mutanten in <i>M. truncatula</i> -Wurzelzellen	145
4.5.1	Schematische Darstellung des Kopfes einer Fliege (caudale Ansicht)	150

4.5.2	Typischer Aufbau einer Nervenzelle, aus N.A. CAMPBELL & J.B. REECE [175]	152
4.5.3	Aufbau des TPLSM für das erste Experiment zur <i>in vivo</i> -Untersuchung von fluoreszenzmarkierten Nervenzellen	155
4.5.4	Anregungs- und Emissionsspektrum des kalziumsensitiven Fluoreszenzfarbstoffes Fluo-4	156
4.5.5	Epifluoreszenzaufnahme der endterminalen Axon-Verzweigungen des untersuchten VS2-Neurons mit markierten Rasterpositionen	159
4.5.6	Zeitverlauf der relativen Fluoreszenzänderung $\Delta F/F_0$ aus den Zeilenrasterungen der zwei in Abb. 4.5.5 markierten Positionen .	161
4.5.7	Links: Zeitreihe von Epifluoreszenzaufnahmen des VS2-Neurons aus Abb. 4.5.5, Rechts: Zeitverlauf der relativen Fluoreszenzänderung $\Delta F/F_0$	163
4.5.8	Multizeilen-TPLSM-Aufbau für das zweite Experiment zur <i>in vivo</i> -Untersuchung fluoreszenzmarkierter Nervenzellen	167
4.5.9	Bildsequenz der präsynaptischen Region eines VS-Neuron während visueller Stimulation	168
4.5.10	Gegenüberstellung von Bildrastermodus und Multizeilenmodus bei Abbildung einer endterminalen Axon-Verzweigung	169
4.5.11	Zeitlicher Verlauf der Kalziumkonzentration aufgenommen im Multizeilenmodus	170
4.5.12	Zeitlicher Verlauf der Kalziumkonzentration in den Dornen und dem zugehörigen axonalen Strang	171
4.5.13	Vergleich der räumlichen Fluoreszenzintensitätsprofile eines einzelnen Neuriten an Stellen mit homogener und inhomogener Fluoreszenzverteilung	174

Tabellenverzeichnis

3.2.1	Ausgewählte Spezifikationen des SpectraPhysics MaiTai-Lasers [87]	84
3.2.2	Ausgewählte Herstellerangaben des Coherent <i>Vitesse</i> -Lasers [88]	85
3.3.1	Ausgewählte Spezifikationen des LaVision Biotec TriM-Scope [89]	91
3.3.2	Ausgewählte Spezifikationen der GSI Lumonics VM500--Rasterspiegelantriebe [90,91]	91
3.3.3	Ausgewählte Spezifikationen der GSI Lumonics MiniSAX-Treiberkarte [92,93]	92
3.3.4	Ausgewählte Spezifikationen der GSI Lumonics SC2000--Schnittstellenkarte [94]	92
3.4.1	Ausgewählte Spezifikationen des Olympus IX70 Mikroskopes [95,96]	95
3.4.2	Ausgewählte Spezifikationen des z-Piezotranslators von PI (Physik Instrumente GmbH) [97,98]	96
3.5.1	Ausgewählte Spezifikationen der Andor iXon EMCCD-Kamera [100,101]	100
4.4.1	Quantifizierungen der Bewegungsmuster der fünf ausgewählten fluoreszierenden Strukturen aus Abb. 4.4.4.	138
4.5.1	Ausgewählte Spezifikationen des Einzel-Photonen-Zählmoduls von LaserComponents GmbH [178]	157
4.5.2	Ausgewählte Spezifikationen der Puls-Zählkarte PMM328 von Becker & Hickl GmbH [179]	157
4.5.3	Ausgewählte Spezifikationen der Imager3-CCD-Kamera [182] .	162

Kapitel 1

Einleitung

*Daß ich erkenne was die Welt,
Im Innersten zusammenhält, ...*

JOHANN WOLFGANG VON GOETHE,
FAUST, 1. TEIL, VERS 382,383

Mit diesem Zitat beschreibt J.W. VON GOETHE die Neugierde des Menschen, verschiedenste Sachverhalte von Grund auf zu verstehen, also in das Innerste hineinzuschauen. Im naturwissenschaftlichen Bereich, besonders der Biologie und der Medizin, kann dieses Hineinschauen durchaus wörtlich verstanden werden, denn mit Hilfe der Mikroskopie ist es möglich, in die Präparate hineinzuschauen und mit der Erfindung des Mikroskopes durch ROBERT HOOKE (1635 – 1703) [1] begann ein immer genaueres Verständnis in den Naturwissenschaften.

Das von R. HOOKE erfundene Lichtmikroskop arbeitete als ein Durchlichtmikroskop (Transmissionsmikroskop), bei dem das Licht einer Lampe das zu untersuchende Präparat durchstrahlt und im Okular ein Bild erzeugt. Die Abbildungseigenschaften der Transmissionsmikroskope sind durch eine Reihe von Abwandlungen verbessert worden, wie z. B. das Dunkelfeld-Verfahren oder das Phasen-Kontrast-Verfahren.

Neben der Lichtmikroskopie konnten in der zweiten Hälfte des 20. Jahrhunderts auch andere Mikroskopie-Prinzipien realisiert werden, die sich z. B. unterteilen lassen in lichtmikroskopische und nicht-lichtmikroskopische Verfahren. Zu den letzteren gehören die Raster-Elektronen-Mikroskopie (REM), die Raster-Kraft-Mikroskopie (gebräuchlich ist hierfür eher die englische Abkürzung AFM) oder die Raster-Tunnel-Mikroskopie (RTM) – gemeinsam ist diesen Verfahren,

dass sie eine deutlich höhere Auflösung (bei einem REM bis zu $\Delta x = 5$ nm, bei einem RTM sogar bis zu $\Delta x = 0.1$ nm) als die Lichtmikroskopie bieten. Lichtmikroskope haben nach dem RAYLEIGH-Kriterium eine Auflösung, die auf etwa die Hälfte der verwendeten Anregungswellenlänge beschränkt ist (vgl. Kap. 2.5). Die nicht-lichtmikroskopischen Verfahren besitzen aber die Einschränkung, dass sie nur die Oberflächen der Proben abbilden können. Somit wird das Innere einer Probe nur dann zugänglich bzw. die Probe kann nur dann dreidimensional abgebildet werden, wenn sie in dünne Schichten geschnitten wird. Diese Probenpräparation ist recht aufwendig und verhindert eine Untersuchung von biologischen Proben in ihrer natürlichen Umgebung, da die Zellen durch entsprechende chemische Lösungen fixiert und stabilisiert werden müssen, um die Schnitte anfertigen zu können. In einem REM erfolgt die Abbildung der Probe zudem im Hochvakuum, was ebenfalls nicht einer natürlichen Umgebung entspricht.

Und somit hat die von R. HOOKE schon vor über 300 Jahren erfundene Transmissionslichtmikroskopie einen immer noch hohen Stellenwert in der heutigen Forschung, denn sie ermöglicht Messungen, die mit anderen Verfahren nicht durchzuführen sind und die genannten Nachteile der nicht-lichtmikroskopischen Verfahren werden so zu Vorteilen der lichtmikroskopischen Verfahren.

Die lichtmikroskopischen Verfahren arbeiten berührungslos, sie stören das zu untersuchende Objekt in der Regel nicht. Einer der wichtigsten Vorteile aber ist, dass Lichtmikroskope nicht auf die Abbildung von Oberflächen beschränkt sind, sondern auch Bilder aus unterschiedlichen Tiefen einer transparenten Probe wiedergeben können, was ebenso zur dreidimensionalen Darstellung verwendet werden kann. Ein zweiter wichtiger Vorteil ist die nicht-destruktive Abbildung, was die Untersuchung biologischer Proben in ihrer natürlichen physiologischen Umgebung erlaubt (vgl. Kap. 4.4). Beide Vorteile zusammen ermöglichen also die dreidimensionale Darstellung von intakten lebenden Zellen und die Informationsgewinnung aus dem Volumen der Präparate über die Vielfalt der in ihnen ablaufenden Prozesse. Dieser Aspekt wird für die zukünftige Forschung in der Biologie, Pharmazie und Medizin sehr wichtig werden, um z. B. die Wirkung von Medikamenten zu verstehen und zu optimieren oder um die Früherkennung von Tumoren zu verbessern [2–7].

Die lichtmikroskopischen Verfahren lassen sich unterteilen in Transmissions- und Fluoreszenzmikroskopie, die sich in einer ersten Betrachtung durch die Gleichheit respektive Unterschiedlichkeit der Wellenlänge des eingestrahlt und detektierten Lichtes auszeichnen. Bei den Transmissionsmikroskopen wird die Probe von einer Lampe beleuchtet und das transmittierte Licht wird mit Hilfe

des vergrößernden Objektivs auf einen Detektor abgebildet, im einfachsten Fall in das menschliche Auge. Bei der Fluoreszenzmikroskopie wird die Probe zwar auch von einer Lichtquelle beleuchtet, aber dieses Licht gelangt nicht auf den Detektor, sondern regt die Probe zur Fluoreszenz an und das Fluoreszenzlicht wird auf den Detektor abgebildet.

Biologische Proben zeigen aber im allgemeinen keine Fluoreszenz bzw. nur eine geringe Eigenfluoreszenz (Autofluoreszenz). Für die Fluoreszenzmikroskopie müssen die Proben deshalb mit Fluoreszenzfarbstoffen präpariert werden, um das zu detektierende Signal in der Zelle zu erzeugen. Diese notwendige Präparation stellt jedoch keinen schwerwiegenden Nachteil dar, denn auf diese Weise lassen sich sehr spezifisch bestimmte Komponenten der Probe anfärben. Es gibt eine Vielzahl von speziell für diese Aufgabe entwickelten Fluoreszenzfarbstoffen. So können z. B. nur DNA-haltige Organellen der Zelle angefärbt und untersucht werden. Die Fülle der Färbemöglichkeiten zeigt z. B. der Produktkatalog der Firma Molecular Probes [8]. Diese Präparation muss nicht notwendigerweise direkt vor der mikroskopischen Untersuchung stattfinden und sie ist auch nicht so aufwendig wie eine Vakuum-Präparation bei REM-Messungen, so dass die Untersuchungszeit kurzlebiger Proben nicht besonders verkürzt wird.

Inzwischen lassen sich auch einzelne Proteine und sogar Moleküle anfärben und mit Einzelmolekülspektroskopischen Messungen untersuchen, wie von P. TINNEFELD & M. SAUER [9] beschrieben wurde. Zellen können durch veränderte Gensequenzen dazu gebracht werden, Fusionsproteine aus dem ursprünglichen Protein und einem fluoreszierenden Protein – Abwandlungen des natürlichen Grün Fluoreszierenden Proteins (GFP¹) – zu bilden.

Mit aktuellen Messaufbauten können auch andere Einzelmoleküle schon auf Zellmembranen, d. h. Oberflächen, in ihrer Dynamik abgebildet werden [9]. Mittlerweile können diese Messungen auch innerhalb einer Zelle stattfinden und es kann sogar die Auflösung gesteigert werden [10]. Somit lassen sich Vorgänge auf molekularer Ebene in einer lebenden Zelle untersuchen.

Aus der Klasse der Fluoreszenzmikroskope sind zunächst die Epifluoreszenzmikroskope zu nennen. Diese beleuchten die Probe ähnlich wie die Transmissionsmikroskope im gesamten Sichtfeld. Dadurch ist auch sofort das vollständige Fluoreszenzbild sichtbar. Durch das Objektiv wird die Probe mit kurzwelligem Licht (blau oder ultraviolett) durchstrahlt. Fluoreszierende Farbstoffe, mit denen die Probe angefärbt wurde, emittieren ihr (rotverschobenes) Fluoreszenzlicht, das der Experimentator im Okular beobachten kann. Hier bietet sich nun

¹nach der englischen Bezeichnung: Green Fluorescent Protein = GFP

die Möglichkeit, mit mehreren Farbstoffen verschiedene Zellbestandteile anzu-färben und diese aufgrund der unterschiedlichen Farben des Fluoreszenzlichtes sowohl simultan als auch differenziert zu beobachten, sofern die benutzten Farbstoffe alle gleichzeitig durch die Lichtquelle angeregt werden können.

Fluoreszenzfarbstoffe ermöglichen Messungen aber nicht nur durch ihre emittierte Intensität. Unterschiedlich angefärbte Zellkompartimente können anhand des unterschiedlichen Emissionsspektrums, also der Farbe, differenziert werden. Dynamische Prozesse innerhalb der Probe, wie Interaktionen zwischen Proteinen, können das Emissionsspektrum verändern, z. B. aufgrund eines strahlungslosen Energietransfers nach FÖRSTER (FRET-Effekt). Eine weitere verbreitete Messgröße ist die Fluoreszenzlebensdauer, die ebenfalls zur Analyse der Vorgänge in den Proben verwendet werden kann. Die zusätzlichen Möglichkeiten erlauben noch detailliertere Messungen an den Proben.

Der Vorteil der Fluoreszenzmikroskopie liegt in der Messung der charakteristischen Eigenschaften des Fluoreszenzlichtes, so dass aus der Intensität, der Fluoreszenzlebensdauer, dem Spektrum und der Polarisierung wichtige Informationen gewonnen werden können [11], mit denen sich dann spezielle Untersuchungen zu biochemischen Reaktionen, dem pH-Wert oder der Ca^{2+} -Konzentration durchführen lassen [12, 13]. Zusammen mit der hohen Ortsauflösung sind diese Untersuchungen von großem Interesse in der Biologie und Pharmazie.

Mit der Erfindung des Lasers stand eine weitere Lichtquelle zur Fluoreszenzanregung zur Verfügung, was zur Entwicklung der Laser-Raster-Mikroskope führte. In diesen Mikroskopen wird die Probe in einem Rasterverfahren mit Hilfe eines in die Probe fokussierten Lasers untersucht. Die gemessenen Daten der Rasterpunkte werden anschließend zu einem Bild zusammengesetzt. Laser-Raster-Mikroskope (LSM²) lassen sich weiter unterteilen in Ein-Photonen- und Zwei-Photonen-LSMs³. Diese Bezeichnung besagt, dass in einem CLSM ein Laser mit einer Wellenlänge benutzt wird, die gerade der Anregungswellenlänge des Farbstoffes entspricht und dieser somit durch Absorption eines Photons geeigneter Frequenz in den angeregten Zustand gebracht werden kann. In einem TPLSM dagegen hat der Laser die doppelte Wellenlänge. Der Farbstoff wird durch einen Zwei-Photonen-Anregungsprozess zur Fluoreszenz angeregt.

²nach der englischen Bezeichnung: Laser Scanning Microscope

³im Folgenden werden die Ein-Photonen-LSMs auch als konfokale LSMs (engl.: Confocal LSM = CLSM) bezeichnet und die Zwei-Photonen-LSM als TPLSMs (engl.: Two Photon LSM) bzw. auch Multi-Photonen-LSMs. Diese Bezeichnung lässt sich auf die ursprünglichen Bauformen und Wellenlängen zurückführen, auch wenn in neuester Zeit auch TPLSMs mit einem konfokalem Strahlengang realisiert wurden.

Die Zwei-Photonen-Laser-Raster-Mikroskopie ist eine relativ neue Entwicklung im Bereich der Fluoreszenzmikroskopie – sie wurde erst 1990 von W. DENK *et al.* [14] entwickelt –, denn erst mit der Entwicklung von Femtosekunden-Lasern (z. B. Titan-Saphir-Laser) steht eine ausreichend effiziente Laserquelle zur Verfügung, die die Zwei-Photonen-Anregung ermöglicht und zudem auch eine leichte Handhabung erlaubt.

Ein Vorteil der doppelten Anregungswellenlänge eines TPLSM besteht darin, dass die typischerweise im Infraroten (IR) liegende Wellenlänge weniger gestreut wird als die im sichtbaren (VIS) oder ultravioletten (UV) Bereich liegenden Anregungswellenlängen eines CLSM. Die geringere Streuung der IR-Strahlung ermöglicht deshalb auch eine größere Eindringtiefe des Anregungslichtes in die Probe (pflanzlicher Zellverband oder Gewebeprobe) und erlaubt somit Aufnahmen aus tieferliegenden Schichten bei vergleichbar hoher Auflösung wie bei einem CLSM in geringeren Tiefen – mit einem konfokalem LSM wären derartige Aufnahmen nur schwierig zu realisieren. Die große Eindringtiefe wurde in der hier vorgelegten Arbeit bei der Untersuchung von GFP-markierten Wurzelzellen und bei den neurophysiologischen Untersuchungen in einem Fliegenhirn genutzt, denn in beiden Fällen ist ein deutlicher Unterschied bezüglich der Physiologie und interzellulären Interaktion zwischen den Zellen an der Probenoberfläche und den tiefer im Gewebe liegenden Zellen zu erwarten.

Zudem hat die verwendete Wellenlänge eines TPLSM Auswirkungen auf den Aufbau des LSM, so dass die Unterscheidung in konfokale und Multiphotonen Laser-Raster-Mikroskope in technologischer Hinsicht Vor- und Nachteile zeigt. Die Laser-Raster-Mikroskope haben die genannten Vorzüge der Lichtmikroskope und der Messung mit Fluoreszenzfarbstoffen. Durch ihren Aufbau haben sie den weiteren Vorteil, dass das Signal nur dem Fokus und so einer bestimmten Position in der Probe zugeordnet werden kann. Auf diese Weise lassen sich definierte Schichten aus einer intakten Probe abbilden, was als die Fähigkeit eines LSM zu „Optischen Schnitten“⁴ bezeichnet wird.

LSMs haben aufgrund ihres Rasterverfahrens zwar den Nachteil, dass die Aufnahme eines Bildes eine gewisse Zeit in Anspruch nimmt, dagegen bieten insbesondere TPLSMs gegenüber einem Epifluoreszenzmikroskop oder einem CLSM die Vorteile der Möglichkeit zu Optischen Schnitten zusammen mit einer deutlich geringeren Schädigung der Proben durch den verwendeten Laser [15].

Ein Nachteil der Laser-Raster-Mikroskopie ist das Verfahren zur Datenaufnahme: die Probe wird punktwise abgerastert, dies ist ein zeitaufwendiger Vorgang.

⁴engl.: Optical Sectioning

Dieser Nachteil kann durch Verwendung mehrerer Strahlen deutlich reduziert werden [16]. Durch die Parallelisierung des Rasterverfahrens (Parallel Processing) verringert sich die Bildaufnahmedauer proportional zur Anzahl der verwendeten Strahlen, sofern die übrigen Komponenten des Aufbaus gleich bleiben. So kann bei Verwendung von 64 Strahlen die Bildaufnahmezeit um den Faktor 64 verkürzt werden.

Die hier vorgestellte Arbeit beschäftigt sich mit der Verbesserung der multifokalen Zwei-Photonen-Laser-Raster-Mikroskopie im Hinblick auf die Beschleunigung der Datenaufnahme, die Erhöhung der Empfindlichkeit und der Anwendungsvielfalt.

Die beiden Aspekte der Empfindlichkeit und der Verkürzung der Belichtungszeit einer Aufnahme sind durch das zur Verfügung stehende Signal aus der Probe eng miteinander verbunden, so dass beide Parameter nicht ohne gegenseitige Beeinflussung verbessert werden können. Dennoch konnten durch Verwendung einer hochmodernen CCD-Kamera beide Parameter im Vergleich zum bisherigen Aufbau verbessert werden.

Im theoretischen Teil der Arbeit wird zunächst der Zwei-Photonen-Anregungsprozess mit Hilfe bekannter Größen aus der linearen Optik hergeleitet, so dass auch ohne quantenmechanische Rechnungen die grundlegenden Eigenschaften des Zwei-Photonen-Anregungsprozesses gezeigt werden können. Mit diesen Eigenschaften wird der große Vorteil der TPLSM verständlich, der darin besteht, dass die Anregung der Fluorophore nur auf das Fokusvolumen beschränkt ist. Nachdem der Anregungsprozess diskutiert wurde, beschreibt der folgende Abschnitt die Theorie der Fluoreszenzemission. Die Einschränkung der Anregung auf das Fokusvolumen hat auch Auswirkungen auf den Aufbau eines TPLSM, weshalb das Grundprinzip des TPLSM-Aufbaus zusammen mit einem Vergleich mit dem CLSM-Aufbau dargelegt wird. Der anschließende Abschnitt erläutert die Grundlagen des Parallel-Processings, also der grundlegenden Technologie, um die Datenaufnahme der LSMs deutlich zu beschleunigen und so neue Zeitskalenbereiche biologischer Untersuchungen und auch neue Experimente der TPLSM zugänglich zu machen. Dieses Grundlagenkapitel behandelt weiterhin die Theorie der lateralen und axialen Auflösung. Anschließend werden zwei der benutzten Fluoreszenzmarker genauer vorgestellt. Zum einen werden die Eigenschaften des natürlichen Farbstoffes GFP dargelegt, denn dieses fluoreszierende Protein stellt eine sehr interessante Möglichkeit zur Anfärbung biologischer Proben dar. Zum anderen stellen Quantendots eine ebenso interessante Möglichkeit zum Anfärben einer Probe dar. Deshalb werden einleitend die photophysikalischen

Eigenschaften von Quantendots dargelegt. Zum Abschluss dieses Kapitels werden weitere Aspekte der TPLSM wie Strahlenschädigung und Farbstoffauswahl diskutiert.

Nach einer Beschreibung des verwendeten Aufbaus mit den einzelnen Komponenten und deren Eigenschaften werden schließlich die Vielzahl der Anwendungsmöglichkeiten der TPLSM in Biologie, Chemie und Physik anhand einiger Experimenten gezeigt, die mit dem vorgestellten Aufbau durchgeführt wurden.

Die aktuelle Literatur der letzten Jahre zeigt, dass die Multiphotonen-Mikroskopie trotz ihrer Vorteile noch keine sehr große Verbreitung in der angewandten Forschung gefunden hat. Die Anwendungen erstrecken sich aber dennoch über weite Gebiete der Biologie und Medizin. So werden Untersuchungen auf dem interdisziplinären Gebiet der Gewebetechnologie durchgeführt, wobei die Multiphotonen-Mikroskopie zur hochauflösenden 3D-Darstellung von Kollagen und Elastin im Gewebe genutzt wird [17]. Andere Untersuchungen beschäftigen sich mit der Zelladhäsion und Zellorientierung in einem Kollagengerüst [18]. Auch hierbei wurde die Multiphotonen-Mikroskopie zur 3D-Darstellung des Zellverbandes angewandt. In der Neurobiologie ist die Multiphotonen-Mikroskopie auch schon angewandt worden [19], allerdings nicht zur Untersuchung der zellulären Vorgänge bei einer Reizleitung, sondern zur Untersuchung von Interaktionen verschiedener Zelltypen und von physiologischen Vorgängen an denen Mitochondrien beteiligt sind. In Review-Artikeln werden weitere Anwendungen vorgestellt [20], die sich mit der Darstellung der zellulären Strukturen und langsam ablaufenden Vorgängen in Zellen beschäftigen. Aber die Multiphotonen-Mikroskopie wird auch zur Untersuchung der Wundheilung der Kornea [21] und anderer Augenkrankheiten [22, 23] angewendet. Eine weitere Anwendung ist die Untersuchung der ALZHEIMER-Krankheit [24].

Noch seltener als diese anwendungsbezogenen Anwendungen der Multiphotonen-Mikroskopie sind aber Anwendungen der multifokalen Multiphotonen-Mikroskopie beschrieben. Hier findet sich noch ein größerer Teil an Experimenten, die sich auf die Weiterentwicklung der multifokalen Multiphotonen-Mikroskopie beziehen [25–27]. Ein geringerer Anteil der in den Publikationen beschriebenen Experimente nutzt die multifokale Multiphotonen-Mikroskopie in einem anwendungsbezogenen Sinne, z. B. zur Beobachtung der Interaktion von Proteinen [28] oder zum Verständnis des Vesikeltransportes in Pflanzenzellen [29].

Die multifokale Multiphotonen-Mikroskopie bietet aber viele Vorteile gegenüber der bisher genutzten CLSM und einstrahligen Multiphotonen-Mikroskopie. Dazu gehören die bekannten Vorteile der TPLSM, wie z. B. die geringere Proben-schädigung und die große Eindringtiefe. Der hier realisierte Aufbau erlaubt auch

eine einfache Probenhandhabung praktisch wie in der klassischen Lichtmikroskopie. Insbesondere aber der Geschwindigkeitsvorteil der multifokalen TPLSM ist für biologische Untersuchungen wichtig, um die in lebenden Zellen ablaufenden Prozesse auf neuen Zeitskalen untersuchen zu können.

In Kombination mit einer neuartigen schnellen und empfindlichen EMCCD-Kamera als Detektor demonstriert die vorliegende Arbeit die Vorteile der multifokalen TPLSM an einigen exemplarischen Anwendungen aus der Physik, Biologie und Chemie. Die multifokale TPLSM kann, wie die vorliegende Arbeit zeigt, erfolgreich für die Untersuchung von Quantendots, die chemische Grundlagenforschung zur Biomineralisation, die Untersuchung der Transportphänomene von Vesikeln in Pflanzenzellen sowie die neurophysiologischen Untersuchungen an Nervenzellen in einem Fliegenhirn eingesetzt werden. Zudem kann mit der multifokalen TPLSM eine neue Technologie zur flächigen Anregung ohne Rastern realisiert werden, die mit einem konventionellen einstrahligen TPLSM prinzipiell nicht realisierbar ist.

Nach der Demonstration der grundsätzlichen Anwendbarkeit der Quantendots in der TPLSM, kann mit Hilfe der Quantendots die Detektionseffizienz und die maximal erreichbare Auflösung des hier realisierten TPLSM-Aufbaus bestimmt werden. Bei den Experimenten zur Biomineralisation kann die TPLSM die Struktur aufklären, wenn das aus zwei flüssigen Phasen bestehende Modellsystem durch die grundlegende Reaktion seine Morphologie ändert. Für die Untersuchung der Transportphänomene von Vesikeln in Pflanzenzellen werden GFP-fusionierte Proteine verwendet, die an den Golgi-Apparaten aggregieren und so die Bewegung der Golgi-Apparate entlang des Netzwerkes des Endoplasmatischen Retikulums sichtbar machen. Die Bewegung lässt sich quantifizieren und durch die Anwendung von Inhibitoren weiter spezifizieren. Bei den neurophysiologischen Untersuchungen kann die TPLSM erfolgreich zur *in vivo*-Messung der Kalzium-Dynamik in Nervenzellen des visuellen Systems bei optischer Stimulation angewendet werden. Hierbei werden die Vor- und Nachteile der verschiedenen Betriebsmodi des TPLSM bezüglich der räumlichen und zeitlichen Auflösung sowie der Möglichkeit zur Bildgebung diskutiert.

Kapitel 2

Grundlagen der Zwei-Photonen-Laser-Raster-Mikroskopie

Dieses Kapitel beschäftigt sich mit den Grundlagen der Zwei-Photonen-Laser-Raster-Mikroskopie (TPLSM¹) im Hinblick auf die für die nachfolgenden Kapitel wichtigen Aspekte.

Der Aufbau, der in dieser Arbeit verwendet wurde, gehört in die Klasse der Fluoreszenzmikroskope. Bei diesen Mikroskopen werden die Probe selbst oder spezielle Farbstoffe, mit denen die Probe präpariert wurde, zur Emission von Fluoreszenzlicht angeregt. In Epifluoreszenzmikroskopen und Konfokalen Laser-Raster-Mikroskopen entspricht die Energie des Anregungslichtes dem energetischen Abstand zwischen dem Grund- und ersten Anregungszustand der fluoreszierenden Moleküle. Diese Form der Anregung wird als Ein-Photonen-Anregung bezeichnet, weil die notwendige Energie mit einem einzigen Photon übertragen wird. Die Quantenmechanik eröffnet aber noch eine weitere Möglichkeit der Anregung, bei der die Energie der Anregungsphotonen kleiner als der energetische Abstand zwischen Grund- und Anregungszustand sein darf, dafür müssen aber mindestens zwei Photonen an der Anregung beteiligt sein.

Die Herleitung des Zwei-Photonen-Anregungsprozesses mit Hilfe der Quantenmechanik zeigt auch noch weitere Effekte auf, die durch diesen nicht-linearen Prozess möglich sind. Für die Mikroskopie ist jedoch nur der Zwei-Photonen-Anregungsprozess interessant und so zeigt Kap. 2.1 eine einfache Herleitung des Anregungsprozesses basierend auf den Grundlagen der klassischen Optik. Mit dem Ergebnis lässt sich der entscheidende Vorteil der Zwei-Photonen-Anregung

¹nach der englischen Bezeichnung: Two-Photon-Laser-Scanning-Microscopy = TPLSM

gegenüber der Ein-Photonen-Anregung erklären: die Beschränkung der Anregung auf das Fokusvolumen. Vervollständigt wird die Darstellung des Fluoreszenzprozesses durch die in Kap. 2.2 beschriebenen theoretischen Grundlagen über die Emission des Fluoreszenzlichtes.

Die Anwendung des Zwei-Photonen-Anregungsprozesses in einem LSM erlaubt mehrere Varianten der Konstruktion eines LSM. Kap. 2.3 diskutiert deshalb den prinzipiellen Aufbau eines TPLSM und die Funktion der einzelnen Komponenten. Dabei wird auf die verschiedenen Rasterverfahren eingegangen, die mit den Konstruktionsvarianten möglich sind und die ihre jeweils typischen Vor- und Nachteile besitzen.

Kap. 2.4 geht auf die Theorie des Parallel-Processings ein. Dies ist die Technik, die die in Kap. 4 beschriebenen Anwendungen erst ermöglicht, da durch das Parallel-Processing die notwendige deutliche Erhöhung der Aufnahmegeschwindigkeit erzielt wird. Laser-Raster-Mikroskope, die mit nur einem Strahl arbeiten, haben wie alle Rasterverfahren den Nachteil, dass eine Bildaufnahme sehr langsam ist, da an jedem Rasterpunkt der Detektor so lange belichtet werden muss, bis ein ausreichendes Signal aufgenommen worden ist.

Bessere Detektoren und erhöhte Fluoreszenzanregung durch stärkere Laser können zwar die Belichtungszeit verkürzen, aber die Anregung ist durch mögliche Schädigung oder gar Zerstörung der Probe nach oben begrenzt. Grundsätzlich lässt sich das Rasterverfahren nur durch Parallelisierung, also das gleichzeitige Detektieren von mehreren Rasterpunkten beschleunigen. Dies bewirkt eine Beschleunigung der Datenaufnahme um den Faktor der Anzahl gleichzeitig detektierter Rasterpunkte. Der in diesen Experimenten verwendete Aufbau arbeitet mit 64 Strahlen, so dass sich die Datenaufnahme maximal um einen Faktor 64 beschleunigt.

Eine wichtige Größe für die Mikroskopie ist die Auflösung. Sie gibt den minimalen Abstand an, den zwei Objekte in der Probe haben dürfen, um auf dem Bild noch getrennt wahrgenommen zu werden. Der theoretische Hintergrund der mit Lichtmikroskopen erreichbaren Auflösung wird in Kap. 2.5 dargelegt, wobei noch zwischen der lateralen und der axialen Auflösung unterschieden wird. Beide Größen sind für den hier vorgestellten Aufbau wichtig, mit dem auch dreidimensionale Aufnahmen gemacht werden können.

In den beiden Kapiteln 2.6 und 2.7 werden die Eigenschaften der beiden Fluoreszenzmarker GFP und Quantendots beschrieben, denn diese beiden Farbstoffe bieten interessante Möglichkeiten zur Anfärbung einer Probe. Zum Abschluss dieses Theorie-Kapitels diskutiert Kap. 2.8 weitere erwähnenswerte Aspekte der TPLSM.

2.1 Theorie des Zwei-Photonen-Anregungsprozesses

Bei der Fluoreszenzmikroskopie wird die Lichtemission der zur Fluoreszenz angeregten Moleküle detektiert. Die Energie der emittierten Fluoreszenzphotonen nehmen die Moleküle zuvor durch Absorption von Photonen des Anregungslichtes auf, die das Molekül (oder allgemeiner auch ein Atom) vom energetischen Grundzustand $|g\rangle$ in einen angeregten Zustand $|e\rangle$ bringen, von dem aus es wieder in den Grundzustand zurückfällt und ein Lichtquant emittiert. Die Energie der bei der Anregung absorbierten Lichtquanten muss also der Energiedifferenz ΔE der beiden beteiligten Zustände entsprechen.

$$\Delta E = E_{|e\rangle} - E_{|g\rangle} = h\nu_{abs} \quad (2.1.1)$$

Zur Anregung der Moleküle können dieser BOHRschen Frequenzbedingung nach also Photonen der Frequenz ν_{abs} (mit h dem PLANCKschen Wirkungsquantum) eingestrahlt werden, welche dann absorbiert werden – dies ist der Fall der Ein-Photonen-Anregung.

Die Quantenmechanik erlaubt es aber auch, dass die zur Anregung notwendige Energie ΔE durch mehrere Photonen übertragen wird, wenn diese Photonen gleichzeitig absorbiert werden und die Summe ihrer Einzelenergien der Anregungsenergie ΔE entspricht. Hierbei treten dann in der quantenmechanischen Berechnung sogenannte virtuelle Zwischenzustände $|\nu\rangle$ auf. Die quantenmechanischen Berechnungen, die zur Entdeckung der Mehr-Photonen-Anregung führten, wurden erstmals von MARIA GÖPPERT-MAYER im Jahre 1931 durchgeführt [30]. Die Berechnungen zeigten auch, dass die beteiligten Photonen nicht die gleiche Energie bzw. Wellenlänge haben müssen. In den Aufbauten der Zwei-Photonen-Mikroskope findet sich in der Regel nur ein Laser, so dass die Photonen alle gleiche Energie besitzen. Diese beiden Fälle sind in Abb. 2.1.1 skizziert. (A) zeigt den allgemeinen Fall der Zwei-Photonen-Anregung, (B) die Anregung mit zwei Photonen gleicher Energie.

Die für die Verwendung in einem TPLSM wichtige Auswirkung der auf den Fokus beschränkten Anregung aufgrund dieser Zwei-Photonen-Anregung lässt sich durch Betrachtung des Absorptionskoeffizienten α qualitativ herleiten.

Die folgende kurze Herleitung des Absorptionskoeffizienten basiert im wesentlichen auf den Darstellungen in KLEIN & FURTAK [31], HECHT & ZAJAC [32] und R. W. BOYD [33]. Diese Darstellungen, die sich auf eine Ein-Photonen-Anregung beziehen, werden durch Elemente der nicht-linearen Optik erwei-

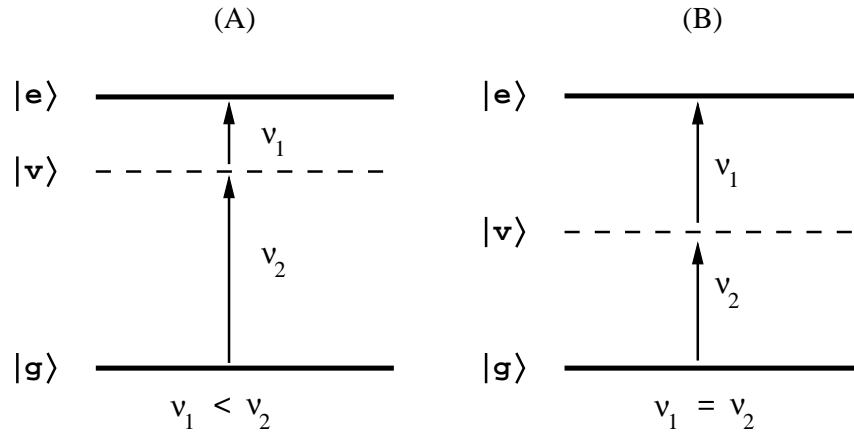


Abbildung 2.1.1: Zwei-Photonen-Anregungsprozess aus dem Grundzustand $|g\rangle$ in den angeregten Zustand $|e\rangle$ über den virtuellen Zwischenzustand $|v\rangle$: (A) zeigt die Anregung mit zwei Photonen mit zwei verschiedenen Frequenzen $\nu_1 < \nu_2$, (B) zeigt die Anregung mit zwei Photonen gleicher Frequenzen $\nu_1 = \nu_2$.

tert, um eine Darstellung des Absorptionskoeffizienten α bei der Zwei-Photonen-Anregung zu erhalten.

Ebenso wie im Fall der Ein-Photonen-Anregung sind auch bei der Zwei-Photonen-Anregung alle im folgenden auftretenden materialbezogenen Größen sehr stark von der optischen Frequenz ν bzw. der Wellenlänge $\lambda = c/\nu$ abhängig.

Ausgangspunkt für die Herleitung der Eigenschaften des Absorptionskoeffizienten α ist die Wellengleichung für elektromagnetische Wellen in Materie, wie man sie aus den Maxwell-Gleichungen herleiten kann:

$$\nabla^2 \vec{E} - \frac{1}{c^2} \frac{\partial^2 \vec{E}}{\partial t^2} = \frac{1}{c^2} \frac{\partial^2 \vec{P}(\vec{E})}{\partial t^2} \quad (2.1.2)$$

Betrachtet man den Fall, dass sich die elektromagnetische Welle in einem lokalen, isotropen, linearen Medium ausbreitet [31], so lässt sich die durch das äußere elektrische Feld \vec{E} induzierte Polarisation $\vec{P}(\vec{E})$ schreiben als

$$\vec{P}(\vec{E}) = \epsilon_0 \chi \vec{E} \quad (2.1.3)$$

mit ϵ_0 der Dielektrizitätskonstanten und χ der dielektrischen Suszeptibilität. Über die Definition der dielektrischen Verschiebung \vec{D} lässt sich die im allgemeinen komplexwertige Dielektrizitätsfunktion κ definieren:

$$\kappa \equiv 1 + \chi \quad (2.1.4)$$

Bei der Ausbreitung einer elektromagnetische Welle in Materie, kann man – ausgehend von der Formulierung des zeitlich gemittelten Poynting-Vektors – folgende Beziehung für den Absorptionskoeffizienten α ableiten [31]:

$$\alpha = \frac{4\pi k}{\lambda_0} \quad (2.1.5)$$

In dieser Gleichung ist λ_0 die Vakuumwellenlänge des Lichtes und k ist der komplexe Anteil des Brechungsindex \tilde{n} . Folgt man der Darstellung in KLEIN & FUR-TAK [31, Kap. 2.4], die mit entsprechenden Modifikationen auch für dichte Materie gilt, kann man nun unter Verwendung der molekularen Polarisierbarkeit p die dielektrische Funktion κ ableiten. Unter der Annahme, dass die Materie, in der sich die Welle ausbreitet, nicht magnetisch ist ($\mu = \mu_0$), ergibt sich der komplexwertigen Anteil des Brechungsindex k zu:

$$k = \frac{1}{2} \text{Im}(\kappa) \quad (2.1.6)$$

Dies kann nun in Gl. (2.1.5) eingesetzt werden, so dass sich der Absorptionskoeffizient α letztendlich auf die Polarisation der Materie \vec{P} zurückführen lässt, wenn man noch Gl. (2.1.4) und Gl. (2.1.3) hinzuzieht:

$$\alpha = \frac{4\pi}{\lambda} \text{Im}(1 + \chi) \quad (2.1.7)$$

Bis hierher tauchen in den Gleichungen makroskopische Größen auf, die sich allerdings auch als über eine große Zahl von Atomen/Molekülen gemittelte mikroskopische Größen verstehen lassen.

Für den letzten Schritt der Argumentation wird die Polarisation \vec{P} auf mikroskopischer Ebene betrachtet. Wird ein Atom/Molekül mit einer elektromagnetischen Welle bestrahlt, fangen die Elektronen an, um ihre Nullpunktlage im Molekülpotential zu schwingen. Die Reaktion der Elektronen auf das äußere elektrische Feld kann durch das Modell des harmonischen Oszillators beschrieben werden. Der tatsächliche Potentialverlauf für die Elektronen im COULOMB-Feld des Kernes wird durch einen parabelförmigen Verlauf angenähert, solange sich die Elektronen in ihrer „Nullposition“ befinden und keine größeren Schwingungen um diese Nullage ausführen.

Mit diesem Modell berechnet sich die atomare/molekulare Polarisierbarkeit p , die durch das äußere elektrische Feld $\vec{E}_m(\vec{r}_i)$ am Ort des i -ten Moleküls induziert wird, zu:

$$\vec{p}_i = p\vec{E}_m(\vec{r}_i) \quad \text{und} \quad \vec{P} = \frac{1}{\Delta V} \sum_i \vec{p}_i \quad (2.1.8)$$

Das induzierte Dipolmoment \vec{p}_i eines i -ten Moleküls, ist desweiteren über ein makroskopisch kleines, aber mikroskopisch dennoch großes Volumen ΔV zum mittleren Dipolmoment pro Einheitsvolumen \vec{P} gemittelt worden. Somit geht die atomare/molekulare Polarisierbarkeit p über die Polarisation $\vec{P}(\vec{E})$ (Gl. (2.1.3)) in den makroskopischen Absorptionskoeffizienten α (Gl. (2.1.7)) ein.

Das idealisierte Potential eines harmonischen Oszillators ist eine gute Näherung für das tatsächliche Potential, solange die Feldstärke des äußeren elektrischen Feldes im Bereich der charakteristischen atomaren Feldstärke E_{atom} liegt. Die charakteristische Feldstärke hat einen Wert von etwa $E_{atom} \approx 5 \cdot 10^{11}$ V/m.

Hat das äußere Feld dagegen eine größere Feldstärke – z. B. bei Bestrahlung der Atome/Moleküle mit einem entsprechend starken Laser –, macht sich die Abweichung des tatsächlich im Molekül vorhandenen Potentials zum idealisierten Potential bemerkbar. Abb. 2.1.2 zeigt qualitativ diese Abweichung.

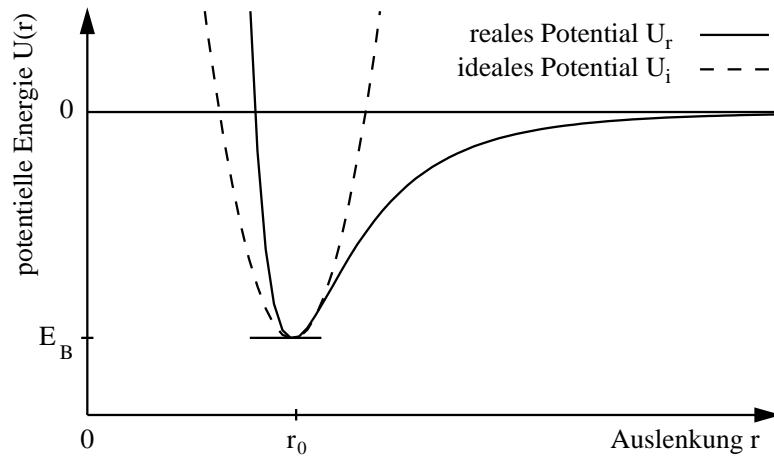


Abbildung 2.1.2: Qualitativer Vergleich des idealisierten Molekülpotentials $U_i(r)$ (harmonischer Oszillator) mit dem realen Potential $U_r(r)$ bei veränderlichen Kernabständen r . Im Abstand r_0 ist ein Elektron mit der Bindungsenergie E_B in der Nullpunktslage.

Der Ansatz der Polarisation in Gl. (2.1.3) ist solange gültig, wie die Feldstärke \vec{E} des eingestrahnten Lichtes kleiner als E_{atom} ist, so dass die Elektronen nur Schwingungen kleiner Amplitude um die Nullpunktslage ausführen und die Annahme eines harmonischen Oszillator-Potentials gerechtfertigt ist. Bei der Einstrahlung von Laserlicht, insbesondere von gepulstem Laserlicht, ist dagegen die Intensität hoch und diese Annahme trifft nicht mehr zu.

Die Reaktion der Materie auf das äußere Feld wird durch die Suszeptibilität χ beschrieben, so dass bei Abweichungen vom idealisierten Fall an dieser Stelle die Korrekturterme durch eine Potenzreihen-Entwicklung der Polarisierung $\vec{P}(\vec{E})$ ausgedrückt werden können (vergleiche mit Gl. (2.1.3)):

$$\begin{aligned}\vec{P}(\vec{E}) &= \vec{P}_0 + \vec{P}_1 + \vec{P}_2 + \dots \\ &= \epsilon_0 \chi^{(0)} \vec{E} + \epsilon_0 \chi^{(1)} \vec{E}^2 + \epsilon_0 \chi^{(2)} \vec{E}^3 + \dots\end{aligned}\quad (2.1.9)$$

Diese Entwicklung von $\vec{P}(\vec{E})$ und die höheren Ordnungen von χ müssen an allen Stellen in die Rechnung einbezogen werden und wirken sich in allen zuvor genannten Gleichungen aus.

In BERGMANN & SCHÄFER [34] findet man für die einzelnen Ordnungen der Suszeptibilität in den entsprechenden Einheiten folgende Größenordnungen:

$$\chi^{(0)} \approx 1, \quad \chi^{(1)} \approx 10^{-12} \text{m/V}, \quad \chi^{(2)} \approx 10^{-21} \text{m}^2/\text{V}^2$$

Diese höheren Ordnungen zeigen sich schließlich auch im Absorptionskoeffizienten, der sich jetzt näherungsweise schreiben lässt als:

$$\alpha = \frac{4\pi}{\lambda} \text{Im}(1 + \chi(\lambda)) \quad \Leftrightarrow \quad \alpha' + \alpha'' \approx \alpha^{(0)} + \alpha^{(2)} I \quad (2.1.10)$$

Der erste Term α' beschreibt die Ein-Photonen-Absorption, der zweite Term α'' die Zwei-Photonen-Absorption – die Terme mit höheren Ordnungen beschreiben dann Multi-Photonen-Prozesse noch höherer Ordnung. Der Einfluss und die physikalischen Auswirkungen der ersten Ordnung des Absorptionskoeffizienten $\alpha^{(1)}$ seien an dieser Stelle nicht betrachtet, da diese z. B. zum Effekt der Erzeugung der Zweiten Harmonischen führen und im hier betrachteten Fall keinen Einfluss auf die Zwei-Photonen-Absorption haben.

In Gl. (2.1.10) ist sowohl die für den Zwei-Photonen-Anregungsprozess wichtige Intensitätsabhängigkeit als auch die Wellenlängenabhängigkeit des Zwei-Photonen-Absorptionskoeffizienten erkennbar, da alle Größen – wie am Anfang des Kapitels kurz erwähnt – sehr stark wellenlängen- bzw. frequenzabhängig sind, also insbesondere auch $\alpha^{(2)} = \alpha^{(2)}(\lambda)$ gilt. Bei der starken Wellenlängenabhängigkeit ist auch anzumerken, dass der Ein-Photonen-Absorptionsquerschnitt $\alpha^{(0)}$ und der Zwei-Photonen-Absorptionsquerschnitt $\alpha^{(2)}$ zwar beide für die gleiche Wellenlänge λ große Werte annehmen können, so dass eine gleichzeitige Ein- und Zwei-Photonen-Absorption beobachtet werden kann. Aber im allgemeinen werden in den Experimenten die Anregungsbedingungen so gewählt, dass dieser Fall nicht auftritt.

Die oben dargelegten Zusammenhänge lassen sich auch mit quantenmechanischen Rechnungen bestätigen, wie es zum Beispiel von R. W. BOYD [33] gezeigt wird.

Die oben genannten Werte für die Größenordnungen der Suszeptibilität χ bewirken nach Gl. (2.1.7), dass auch der Zwei-Photonen-Absorptionskoeffizient $\alpha^{(2)}$ um mehrere Größenordnungen kleiner ist als der Ein-Photonen-Absorptionskoeffizient $\alpha^{(0)}$. Damit dennoch Zwei-Photonen-Anregungsprozesse in großer Anzahl stattfinden, muss nach Gl. (2.1.10) mit großen Intensitäten I gearbeitet werden. Solche großen Intensitäten können mit gepulsten Lasern erreicht werden. Oft werden Titan-Saphir-Laser (Ti:Sa-Laser) als Laserquellen für LSMs verwendet, die mit cw-Ausgangsleistungen von etwa 0.5 – 2 W und Pulsdauern im Femtosekundenbereich die gewünschten hohen Intensitäten liefern. Zum Beispiel erzeugt ein 1 W-Laser mit 50 fs-Pulsen in einem $1 \mu\text{m}^2$ großen Fokusquerschnitt eine Intensität von $30 \text{ TW}/\text{cm}^2$.

Der makroskopische Absorptionsquerschnitt α ist über die Teilchenzahldichte n_0 mit dem molekularen Wirkungsquerschnitt σ , genauer dem optischen Absorptionsquerschnitt pro Molekül, verknüpft [34, 35]:

$$\alpha = n_0 \sigma \quad (2.1.11)$$

$$\Leftrightarrow \alpha^{(0)} + \alpha^{(2)} I = n_0 \sigma^{(0)} + n_0 \sigma^{(2)} \frac{I}{h\nu} \quad (2.1.12)$$

Hierbei ist I die eingestrahlte Laserintensität und ν die Frequenz des Laserlichtes.

Auch in Gl. (2.1.12) wirken sich die höheren Ordnungen von α in σ aus, insbesondere zeigt sich, dass der molekulare Zwei-Photonen-Absorptionsquerschnitt $\sigma'' = n_0 \sigma^{(2)} I / h\nu$ intensitätsabhängig ist. Dies führt zu der bekannten Aussage, dass die Zwei-Photonen-Absorption vom Quadrat der eingestrahkten Laserintensität I abhängt. Für die molekulare Anregungsrate R gilt zunächst allgemein:

$$R = \sigma \frac{I}{h\nu}$$

mit h dem PLANCKschen Wirkungsquantum, ν der Frequenz des eingestrahkten Laserlichtes und σ dem molekularen Absorptionsquerschnitt. Für den Fall der Zwei-Photonen-Absorption verfeinert sich diese Formel durch Einsetzen des intensitätsabhängigen Zwei-Photonen-Absorptionsquerschnittes σ'' zu:

$$R = \sigma'' \frac{I}{h\nu} = \sigma^{(2)} \frac{I^2}{h\nu} \quad (2.1.13)$$

Hier ist die quadratische Abhängigkeit der molekularen Anregungsrate R von der eingestrahlten Laserintensität I .

Die Werte für die Zwei-Photonen-Absorptionsquerschnitte $\sigma^{(2)}$ liegen in der Größenordnung von $\sigma^{(2)} = 10^{-50} \text{ cm}^4\text{s}$ [34, 36]. Allerdings sind bisher noch nicht viele Zwei-Photonen-Absorptionsquerschnitte $\sigma^{(2)}$ von Farbstoffen, die typischerweise in der Mikroskopie verwendet werden, vermessen worden [16].

In den vorherigen Abschnitten ist ein einfacher Weg gezeigt worden, um zu verstehen, wie sich die hohen Feldstärken des Laserlichtes auf den molekularen Wirkungsquerschnitt σ auswirken und höhere Ordnungen $\sigma^{(1)}$ und $\sigma^{(2)}$ sichtbar werden lassen. Das Ergebnis ist die Intensitätsabhängigkeit des Zwei-Photonen-Wirkungsquerschnittes $\sigma^{(2)}$. In den folgenden Abschnitten wird gezeigt, welche Auswirkung diese Intensitätsabhängigkeit in der Anwendung in einem Mikroskop – genauer bei der Fokussierung durch eine Linse – hat. Vergleicht man weiterhin noch den Fall der Ein-Photonen-Absorption mit dem der Zwei-Photonen-Absorption, so lassen sich aus diesem Ergebnis einige Vorteile der Zwei-Photonen-Mikroskopie ablesen.

Wird ein Laserstrahl mit einem gaußförmigen Strahlprofil durch eine Linse fokussiert, so bleibt sein Strahlprofil erhalten und für seinen Strahlradius $w(z)$ in der Nähe des Fokus entlang der Strahlachse z gilt [35]:

$$w(z) = w_0 \sqrt{1 + \left(\frac{\lambda z}{\pi w_0^2} \right)^2}$$

Dabei ist w_0 der Radius des Strahlquerschnittes im Fokus (auch Strahltaile genannt) und λ die Wellenlänge des Lasers.

Benutzt man einen gepulsten Laserstrahl mit diesem gaußförmigen Strahlprofil und einem ebenfalls gaußförmigen zeitlichen Profil, so lässt sich für seine Intensität $I(r, \phi, z, t)$ in der Nähe des Fokus schreiben:

$$I(r, \phi, z, t) = E_0 \frac{2}{\pi w^2(z)} \exp\left(-\frac{2}{w^2(z)} r^2\right) \frac{2\sqrt{\ln(2)}}{\tau\sqrt{\pi}} \exp\left(-\frac{4\ln(2)}{\tau^2} t^2\right)$$

Dabei ist E_0 die Gesamtenergie im Puls, r die radiale Entfernung von der Strahlachse, z der Abstand vom Fokus, t die Zeit und τ ist die volle zeitliche Halbwertsbreite des Pulses, kurz Pulsdauer genannt.

Für die Anregungswahrscheinlichkeit pro Puls gilt im Falle der Ein-Photonen-Absorption

$$\begin{aligned} p_{1P}(r, \phi, z) &= \sigma^{(0)} \int_{-\infty}^{\infty} \frac{I(r, \phi, z, t)}{h\nu} dt \\ &= \sigma^{(0)} \frac{E_0}{h\nu} \frac{2}{\pi w^2(z)} \exp\left(-\frac{2}{w^2(z)} r^2\right) \end{aligned} \quad (2.1.14)$$

bzw. im Fall der Zwei-Photonen-Absorption:

$$\begin{aligned} p_{2P}(r, \phi, z) &= \sigma^{(2)} \int_{-\infty}^{\infty} \left(\frac{I(r, \phi, z, t)}{h\nu}\right)^2 dt \\ &= \sigma^{(2)} \frac{E_0^2}{(h\nu)^2} \left(\frac{2}{\pi w^2(z)}\right)^2 \exp\left(-\frac{4}{w^2(z)} r^2\right) \frac{\sqrt{2 \ln(2)}}{\sqrt{\pi}} \frac{1}{\tau} \end{aligned} \quad (2.1.15)$$

Um das entlang der Strahlachse entstehende Signal berechnen zu können, muss die Anzahl der aus dem Laserstrahl absorbierten Photonen N_{abs} bestimmt werden. Die tatsächliche Zahl der entstehenden Fluoreszenzphotonen hängt dann noch von der konstanten Quanteneffizienz γ des Farbstoffes ab. Die Zahl der pro Puls absorbierten Photonen $N_{abs}(r, \phi, z)$ in einem Volumenelement $dV = r dr d\phi dz$ berechnet sich nach:

$$N_{abs}(r, \phi, z) = n_F p(r, \phi, z) dV$$

Hier ist n_F die homogene Volumendichte der Farbstoffmoleküle.

Hieraus berechnet sich die Anzahl der pro Puls absorbierten Photonen $N_{abs}(z)$ in der Tiefe z für die Ein-Photonen-Absorption zu:

$$\begin{aligned} N_{abs,1P}(z) &= n_F \int_0^{2\pi} \int_0^{\infty} p_{1P}(r, \phi, z) r dr d\phi \cdot dz \\ &= n_F \sigma^{(0)} \frac{E_0}{h\nu} dz \end{aligned} \quad (2.1.16)$$

Für die Zwei-Photonen-Absorption ergibt sich dagegen:

$$\begin{aligned} N_{abs,2P}(z) &= n_F \int_0^{2\pi} \int_0^{\infty} p_{2P}^2(r, \phi, z) r dr d\phi \cdot dz \\ &= n_F \sigma^{(2)} \frac{E_0^2}{(h\nu)^2} \frac{\sqrt{2 \ln(2)}}{\sqrt{\pi}} \frac{1}{\pi w^2(z)} \frac{1}{\tau} dz \end{aligned} \quad (2.1.17)$$

Bei der Ein-Photonen-Anregung ist die Zahl der absorbierten Photonen $N_{abs,1P}(z)$ entlang der Strahlachse eine Konstante, d. h. von der Position z auf der Strahlachse unabhängig. Bei der Zwei-Photonen-Anregung dagegen geht der Strahlquerschnitt $A(z) = \pi w^2(z)$ und damit die Entfernung z zur Linse in die Zahl der absorbierten Photonen $N_{abs,2P}(z)$ mit ein und dies führt im Fokus zu einer höheren Absorption als außerhalb des Fokus. Abb. 2.1 verdeutlicht dies in einer Skizze.

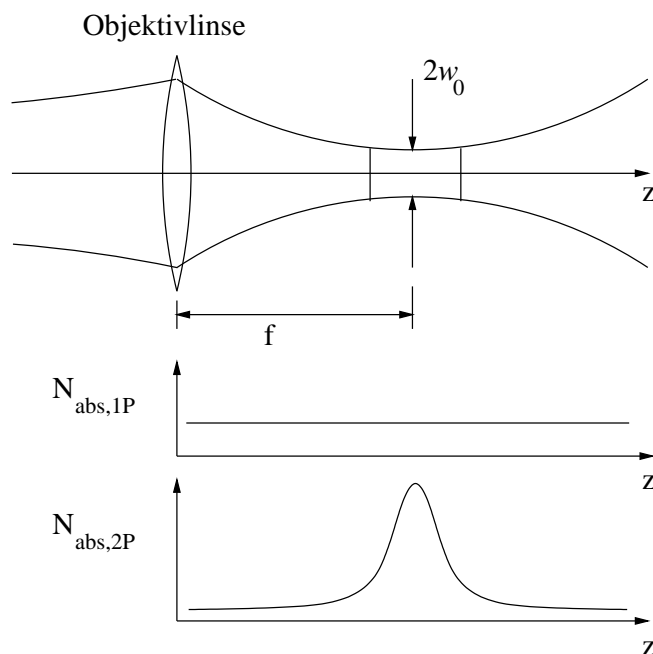


Abbildung 2.1.3: Ein-Photonen- und Zwei-Photonen-Absorption ($N_{abs,1P}$ und $N_{abs,2P}$) in Abhängigkeit des axialen Abstandes z von einer Linse der Brennweite f für einen Strahl mit gaußförmigem Strahlprofil: im Fokus hat der Strahl einen Durchmesser von $2w_0$ (Strahltaile). Die $N_{abs,2P}$ -Kurve entspricht der $1/w^2(z)$ -Abhängigkeit eines LORENTZ-Profiles.

Wie diese Abbildung zeigt, entsteht ein Großteil des Fluoreszenzsignals bei Zwei-Photonen-Anregung im Fokus des Laserstrahls. Dies ist der entscheidende Vorteil der Zwei-Photonen-Anregung, denn nur hier im Fokus ist die Intensität hoch genug, um Anregungsprozesse in ausreichender Zahl für ein deutliches Signal zu ermöglichen.

Neben der reziproken Abhängigkeit von der Strahlquerschnittsfläche $A(z)$ ist in Gl. (2.1.17) noch eine weitere Möglichkeit erkennbar, um ein höheres Zwei-Photonen-Signal zu erhalten, denn die Anregungswahrscheinlichkeit wird auch

durch die reziproke Pulsdauer $1/\tau$ bestimmt: mit kürzeren Pulsen entsteht ein höheres Signal. Die Auswirkungen der Pulsdauer wird von D. HELLWEG [37] ausführlicher diskutiert.

Nach Gl. (2.1.10) bzw. Gl. (2.1.12) wäre auch eine gleichzeitige Ein-Photonen- und Zwei-Photonen-Anregung möglich, aber aufgrund der starken Wellenlängenabhängigkeit der Absorptionsquerschnitte $\sigma^{(0)}$ und $\sigma^{(2)}$ fallen im allgemeinen die Resonanzen im Absorptionsspektrum für Ein-Photonen- und Zwei-Photonen-Absorption nicht zusammen.

Geht man auf die in Abb. 2.1.1 skizzierte Idee zurück, so ist die Anregungswellenlänge bei der Zwei-Photonen-Anregung gerade doppelt so groß ist wie bei der Ein-Photonen-Anregung. In der Regel wird diese doppelte Wellenlänge eine Wellenlänge sein, bei der keine Ein-Photonen-Anregung stattfindet, sondern nur eine Zwei-Photonen-Anregung. Am Beispiel einer wässrigen Lösung mit einem Fluoreszenzfarbstoff heißt dies, dass man mit Licht der Wellenlänge $\lambda \approx 800$ nm in die Probe fokussieren kann, welches die fluoreszierenden Moleküle durch den Zwei-Photonen-Prozess mit effektiv $\lambda \approx 400$ nm anregt. Für die Wellenlänge von $\lambda \approx 800$ nm findet in der wässrigen Lösung aber keine Ein-Photonen-Absorption statt. Dies bedeutet, dass man nur aus dem Fokus Signal erhält.

Die Tatsache, dass bei der Zwei-Photonen-Anregung das Signal nur im Fokus entsteht, hat auch Vorteile für den Aufbau des Detektionsstrahlenganges. Diese werden in Kap. 2.3 erläutert.

Zum Abschluss dieses Kapitels zeigt die folgende Abb. 2.1.4 ein Photo mit dem Unterschied zwischen Ein- und Zwei-Photonen-Anregung, das die zuvor beschriebenen Zusammenhänge in einen Experiment bestätigt.

In diesem Bild werden zwei Laserstrahlen in eine farbstoffgefüllte Küvette fokussiert. Der obere Strahl zeigt die Ein-Photonen-Anregung mit der Wellenlänge, die der Anregungswellenlänge des Farbstoffs entspricht. Der untere Strahl hat die doppelte Wellenlänge und kann daher nur durch Zwei-Photonen-Anregung die Farbstoffmoleküle zur Fluoreszenz anregen.

Man sieht, wie bei der Ein-Photonen-Anregung entlang der gesamten Strahlachse Absorption und damit auch Fluoreszenzemission stattfindet, während bei der Zwei-Photonen-Anregung nur aus dem Fokus (durch den Pfeil gekennzeichnet) Fluoreszenz emittiert wird.

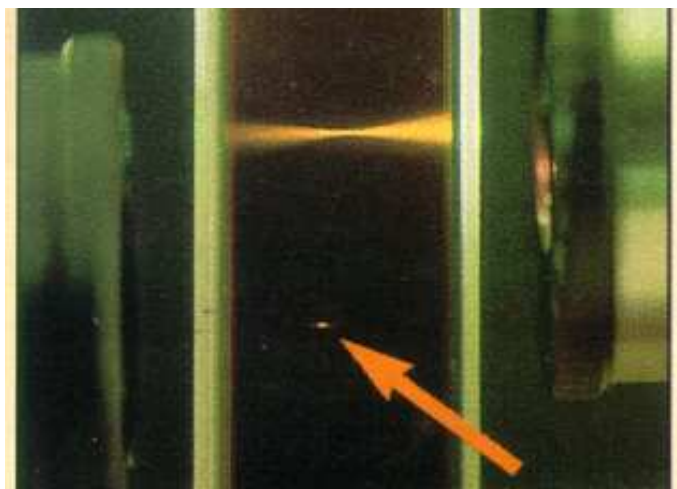


Abbildung 2.1.4: Ein-Photonen- und Zwei-Photonen-Anregung in einer farb-stoffgefüllten Küvette, aus M.K. ROBINSON [38].

2.2 Theorie der Fluoreszenzemission

Neben der Absorption mit Hilfe des Zwei-Photonen-Anregungsprozesses ist der zweite grundlegende Baustein für die TPLSM die Emission von Fluoreszenzphotonen, denn sie bilden das Signal, das aus der Probe detektiert und zu einem Bild zusammengesetzt wird.

Fluoreszenz, oder allgemeiner Lumineszenz, ist ein Vorgang, bei dem ein Molekül von einem angeregten elektronischen Zustand in den elektronischen Grundzustand übergeht und die freiwerdende Energie durch Strahlung abgibt. Allerdings kann die Fluoreszenz nicht als isolierter Vorgang in einem Molekül betrachtet werden, sondern es gibt noch weitere wichtige Reaktionskanäle im Molekül, die mit der Fluoreszenz konkurrieren oder sie stark beeinflussen. Ein JABLONSKI-Diagramm² stellt diese Zusammenhänge übersichtlich dar.

Zuvor jedoch sollen noch ein paar Anmerkungen zu der zugrundeliegenden Physik, die die Struktur des JABLONSKI-Diagramms erklärt, gemacht werden.

Grundlage der atomphysikalischen Beschreibung der elektronischen Struktur von Molekülen ist die Lösung der SCHRÖDINGER-Gleichung, die in ihrem HAMILTON-Operator die kinetischen Energien T und das Gesamtpotential $V_{n,v,J}$

²nach Alexander Jablonski, 1898 – 1980

aus der COULOMB-Wechselwirkung zwischen den Kernen und allen Elektronen berücksichtigt, die das Molekül formen:

$$H\Phi = [T + V_{n,v,J}]\Phi = E_{n,v,J}\Phi \quad (2.2.1)$$

Dabei bezeichnet die Quantenzahl n die elektronischen Energieniveaus, v die Vibrations-/Schwingungsniveaus und J die Rotationsniveaus.

Die Lösung der SCHRÖDINGER-Gleichung beschreibt den Potentialverlauf, dem die Elektronen in der Umgebung eines Atomkerns unterliegen, in Abhängigkeit der drei Quantenzahlen. Abb. 2.2.1 zeigt den tatsächlichen Potentialverlauf zusammen mit der parabolischen Näherung eines harmonischen Oszillators, die für die niedrigen Energieniveaus eine einfache mathematische Lösung der SCHRÖDINGER-Gleichung erlaubt.

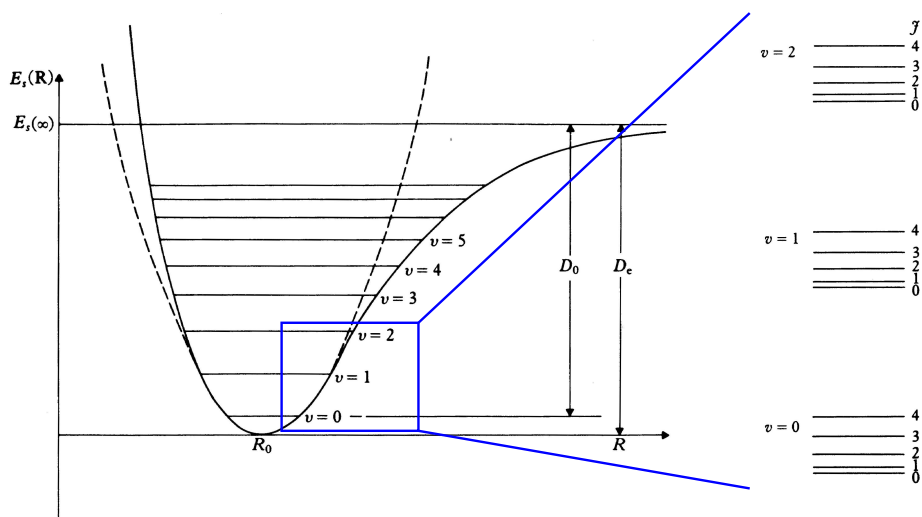


Abbildung 2.2.1: Vibrations- und Rotations-Energieniveaus eines zweiatomigen Moleküls, zusammen mit der parabolischen Näherung des Potentialverlaufes. Rechts sind vergrößert die Rotationsniveaus der einzelnen Vibrationsniveaus skizziert. Zusammengestellt aus B.H. BRANSDEN & C.J. JOACHAIN [39]

Diese Vibrations- und Rotationsniveaus spalten die elektronischen Niveaus jeweils in eine Anzahl von Unterniveaus auf. Die Energien der elektronischen Niveaus liegen im Bereich von einigen Elektronenvolt (eV), die Vibrationsniveaus haben dagegen Energien in der Größenordnung von 0.1 eV, während die Rotationsenergien sogar nur im Bereich von einigen 0.001 eV liegen. Letztere ent-

sprechen der Energie von elektromagnetischen Wellen im fernen Infrarot- und Mikrowellenbereich.

Ein JABLONSKI-Diagramm zeigt nun schematisch diese Energieniveaus für den elektronischen Grundzustand S_0 des Moleküls und die angeregten Singulett-Zustände S_1 und S_2 , außerdem ist bei der Lumineszenzbeschreibung auch die Beteiligung eines ersten angeregten Triplettzustandes T_1 zu beachten, der nur durch sogenannte verbotene Übergänge zu erreichen ist. Zudem sind im Diagramm auch meistens die Vibrationsniveaus eingezeichnet.

Absorption/Anregung:

$$10^{-15} \text{ s}$$

Interne Konversion:

$$10^{-14} \text{ s} - 10^{-10} \text{ s}$$

Schwingungsrelaxation:

$$10^{-12} \text{ s} - 10^{-10} \text{ s}$$

Intersystem Crossing:

$$10^{-10} \text{ s} - 10^{-8} \text{ s}$$

Fluoreszenz:

$$10^{-9} \text{ s} - 10^{-7} \text{ s}$$

Phosphoreszenz:

$$10^{-3} \text{ s} - 100 \text{ s}$$

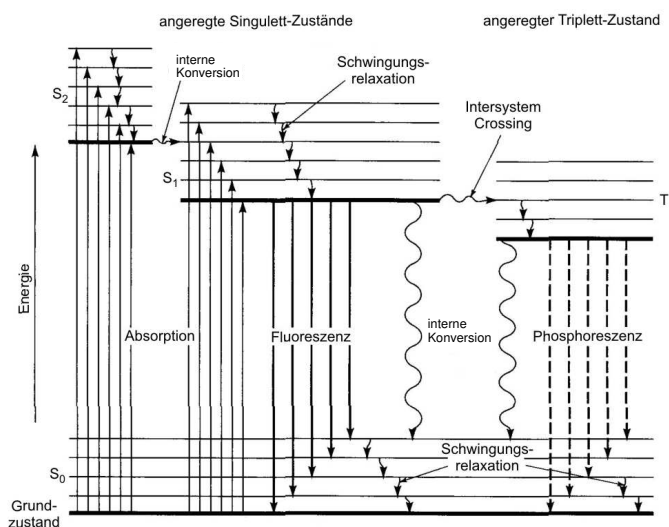


Abbildung 2.2.2: JABLONSKI-Diagramm: Gezeigt sind die möglichen Übergänge zwischen den Singulett-Zuständen S_0 , S_1 und S_2 sowie dem Triplett-Zustand T_1 .

Das JABLONSKI-Diagramm erklärt sich am einfachsten anhand der natürlichen Reihenfolge der bei der Lumineszenz auftretenden Prozesse folgt: Anregung, Relaxation, Energieabgabe.

Die Besetzung der einzelnen Niveaus wird im thermischen Gleichgewicht durch die BOLTZMANN-Verteilung beschrieben. Bei Raumtemperatur befinden sich die Elektronen eines anzuregenden Moleküls aufgrund der niedrigen Energie quasi alle im elektronischen Grundzustand S_0 und praktisch auch alle im niedrigsten Vibrationsniveau $\nu = 0$, so dass die Anregung immer aus diesem Zustand erfolgt.

Die Anregung eines Moleküls erfolgt durch Absorption von Photonen der Energie $E = h\nu$ (h = PLANCKSches Wirkungsquantum, ν = Frequenz des ein-

gestrahlten Lichtes). Die Absorption erfolgt quasi instantan im Bereich von 10^{-15} Sekunden (fs-Bereich). Dadurch werden die Elektronen vom elektronischen Grundzustand S_0 , $v = 0$ in den ersten oder zweiten angeregten Zustand S_1 oder S_2 gebracht. Da die Anregung nicht mit einer Spinänderung verbunden ist, ist der angeregte Zustand wieder ein Singulett-Zustand. Die BOHRsche Frequenzbedingung (Gl. (2.1.1)) gilt immer noch, allerdings sind die Quantenzahlen ν und J mit einzubeziehen. Durch den geringen energetischen Abstand der Vibrations- und Rotationsniveaus und die DOPPLER-Verbreiterung der Absorptionslinien kann statt einer atomaren Absorptionslinie ein breites Absorptionsspektrum beobachtet werden. Für die Absorption in Flüssigkeiten trägt auch das Lösungsmittel zu einer Verbreiterung der Absorptionslinien bei. Die unterschiedlichen Übergangswahrscheinlichkeiten zwischen den beteiligten Niveaus bestimmen die Form des Absorptionsspektrums mit seiner Breite und eventuellen Spitzen.

Nach der Anregung folgt ein Relaxationsprozess, bei dem das Molekül durch Schwingungsrelaxation und interne Konversion Energie an die umgebenden Moleküle als Wärme abgibt. Der Relaxationsprozess findet auf einer Zeitskala im Pikosekunden-Bereich statt und ist somit noch ca. um einen Faktor 1000 schneller als die typische Zeit im Nanosekundenbereich, während der ein Molekül im angeregten Zustand bleibt. Das Molekül relaxiert von einem angeregten Vibrations- und Rotationszustand in den niedrigsten Vibrationszustand ($v = 0$) des angeregten elektronischen Zustandes S_1 . Erfolgt dabei ein Übergang von einem höheren angeregten Zustand $S_{n>1}$, so bezeichnet man die Übergänge als interne Konversion. Diese findet auf einer Zeitskala im Bereich von 10^{-14} sec. bis 10^{-10} sec. statt, zudem wird keine Strahlung emittiert. Ebenfalls im Pikosekunden-Bereich (10^{-12} sec. bis 10^{-10} sec.) erfolgt die Schwingungsrelaxation, bei der die Übergänge zwischen den Vibrationsniveaus innerhalb eines elektronischen Niveaus erfolgen. Am Ende dieses Relaxationsprozesses befindet sich das Molekül quasi immer im niedrigsten Vibrationsniveau des ersten angeregten elektronischen Zustandes: S_1 , $v = 0$.

Der dritte und letzte Prozess bei der Lumineszenz ist die Energieabgabe, die das Molekül vom angeregten Zustand wieder zurück in den Grundzustand bringt. Die Energieabgabe kann mit Strahlungsemission (Fluoreszenz, Phosphoreszenz) und strahlungslos (Quenching) erfolgen. Für die Energieabgabe stehen jetzt mehrere Reaktionskanäle zur Verfügung, die allerdings mit zum Teil sehr unterschiedlicher Wahrscheinlichkeit stattfinden und sich am besten durch die beteiligten Energieniveaus gliedern lassen.

Falls nur die beiden Singulett-Zustände S_1 und S_0 beteiligt sind, kann es zur strahlungslosen Energieabgabe, zum Quenching und zur Fluoreszenz kommen.

Bei der strahlungslosen Energieabgabe wird die Energie als Wärme an die Umgebung abgegeben. Beim Quenching kollidiert das sich noch im angeregten Zustand befindende Molekül mit einem anderen Molekül und gibt seine Energie durch einen inelastischen Stoß an das andere Molekül ab. Diese beiden strahlungslosen Energieabgaben erfolgen auf einer Zeitskala im Bereich von 10^{-7} sec. bis 10^{-5} sec. Für die Fluoreszenzmikroskopie ist aber der dritte dieser Reaktionskanäle am wichtigsten: die Fluoreszenz. Bei der Fluoreszenz gibt das Molekül seine Energie in Form eines Photons ab, das vom Molekül emittiert wird. Die Zeitskala für diesen Vorgang liegt im Bereich von 10^{-9} sec. bis 10^{-7} sec., also im Nanosekundenbereich. Bei allen drei Prozessen befindet sich das Molekül (evtl. noch nach einer Vibrationsrelaxation) wieder im elektronischen Grundzustand S_0 mit $v = 0$. Aufgrund der energetischen Nähe der Vibrationsniveaus des Grundzustandes S_0 und einer DOPPLER-Verbreiterung durch die thermische Bewegung ist die Fluoreszenz ähnlich wie bei der Absorption nicht monochromatisch, sondern es ist ein Emissionsspektrum zu beobachten, das meistens gespiegelt zum Absorptionsspektrum ist. Die Moleküle können die Anregungs-Emissions-Zyklus viele hundert mal durchlaufen, bevor der chemisch sehr reaktive angeregte Zustand das Molekül derart verändert, dass es nicht mehr fluoresziert. Man bezeichnet diesen Vorgang auch als „Ausbleichen“ des Fluoreszenzfarbstoffes.

Die weiteren Reaktionskanäle der Energieabgabe beinhalten zusätzlich zu den beiden Singulett-Zuständen S_0 und S_1 noch den ersten angeregten Triplett-Zustand T_1 . Der erste Vorgang bei diesen Reaktionskanälen ist das „inter system crossing“ bei dem das Molekül durch einen verbotenen Übergang vom Singulett-Zustand S_1 in den Triplett-Zustand T_1 übergeht (10^{-10} sec. bis 10^{-8} sec.). Da dieser Übergang mit einer Änderung des Elektronenspins verbunden ist, ist dieser Übergang sehr unwahrscheinlich und tritt somit sehr selten auf. Von diesem Triplett-Zustand aus gibt es wieder die drei Möglichkeiten der Energieabgabe wie sie schon beim Singulett-Zustand beschrieben wurden: strahlungslose Energieabgabe, Quenching und Emission von Photonen. Da der Übergang vom Triplett-Zustand T_1 zum Singulett-Grundzustand S_0 aber ein verbotener Übergang ist, sind die Zeitskalen für diese Übergänge sehr viel größer als beim zuvor beschriebenen Fall: die strahlungslose Energieabgabe und das Quenching liegen beide im Bereich von 10^{-3} sec. bis 100 sec. Aber auch die Emission von Photonen, die in diesem Fall Phosphoreszenz genannt wird, liegt in diesem Zeitbereich. Für die Phosphoreszenz gilt ebenfalls wie bei der Fluoreszenz, dass aufgrund der energetisch dicht liegenden Vibrations- und Rotationsniveaus des Grundzustandes ein Emissionsspektrum statt einer einzelnen Emissionslinie beobachtet werden kann. Zusätzlich gibt es in diesem Molekülzustand aber noch einen weiteren

Reaktionskanal: die verzögerte Fluoreszenz. Hierbei erfolgt ein zweiter verbotener Übergang vom Triplett-Zustand T_1 zurück in den ersten angeregten Singulett-Zustand S_1 , von dem aus das Molekül dann ein Fluoreszenzphoton in der zuvor beschriebenen Weise emittiert. Aufgrund der beteiligten Niveaus ist diese Emission eine Fluoreszenzerscheinung, die aber wegen der verbotenen Übergänge in einen sehr viel längeren Bereich der Zeitskala verschoben, also stark verzögert ist.

Die Beteiligung von noch höher angeregten Niveaus ($n > 2$) ist denkbar, aber dafür ist sehr kurzwelliges Licht notwendig, die statt in einer Anregung auch andere Wechselwirkungen mit dem Molekül wie eine Dissoziation hervorrufen können. Zudem werden die Relaxationsprozesse das Molekül auch bei höher angeregten Zuständen zuerst wieder in den ersten angeregten Singulett-Zustand bringen, bevor die Fluoreszenz stattfindet.

Für die Fluoreszenzmikroskopie ist die zuvor beschriebene Fluoreszenz der wichtigste Reaktionskanal, der dank der hohen Übergangswahrscheinlichkeiten auch hauptsächlich auftritt.

2.3 Prinzipieller Aufbau eines Zwei-Photonen-Laser-Raster-Mikroskopes

Zur Erklärung des Funktionsprinzips und zur Verdeutlichung der Vorteile der Zwei-Photonen-Laser-Raster-Mikroskopie wird an dieser Stelle zunächst kurz die Epifluoreszenzmikroskopie dargestellt.

Das Prinzip der Epifluoreszenzmikroskopie wird unter anderem von J.B. PAWLEY (ED.) [40, Kap. 1] und D.L. WOKOSIN *et al.* [41] erklärt. Bei einem Epifluoreszenzmikroskop wird die Probe mit einer UV-Lampe durchleuchtet, um die Probe in ihrer gesamten Ausdehnung (x-y-, aber auch z-Richtung) zur Fluoreszenz anzuregen. Dies ist das gleiche Prinzip wie bei einem Transmissionsmikroskop, das mit einer Weißlichtlampe die Probe durchleuchtet.

Ein Lichtmikroskop und ein Epifluoreszenzmikroskop unterscheiden sich somit nur darin, welches Licht zur Abbildung verwendet wird: beim Lichtmikroskop wird das transmittierte oder reflektierte Licht einer Lampe abgebildet, bei Epifluoreszenz das Fluoreszenzlicht aus dem Präparat. Bei beiden Mikroskopieverfahren ist das Bild auf dem Detektor dann die Projektion des gesamten Probenvolumens in die Bildebene, wobei sich das scharfe Bild der eingestellten (fokussierten) Objektebene mit den unscharfen Bildern der darüber- und darunterliegenden Ebenen überlagert.

Den nächsten Schritt in der Entwicklung der Fluoreszenzmikroskopie stellen die Laser-Raster-Mikroskope (LSM) dar. Das erste LSM war ein konfokales Laser-Raster-Mikroskop, das 1972 von M.D. EGGER patentiert wurde [40, Kap. 1 und Referenzen]; dabei wird das Prinzip des konfokalen Mikroskopes verwendet, das von M. MINSKY realisiert wurde [42, und Referenzen]. Das erste Zwei-Photonen-Laser-Raster-Mikroskop ist 1990 von W. DENK und W.W. WEBB *et al.* entwickelt worden [14]. Die folgenden Abschnitte gehen detaillierter auf diese Art der Fluoreszenzmikroskope ein. Die Realisierung der LSMs hat deshalb erst so viele Jahre nach den theoretischen Vorarbeiten stattgefunden, weil zunächst gepulste Laser als Lichtquellen realisiert werden mussten, die langzeitstabil arbeiteten und eine unkomplizierte Handhabung erlaubten, was bei frühen Labor-Lasersystemen nicht unbedingt gegeben war.

Im Gegensatz zu Epifluoreszenzmikroskopen arbeiten LSMs mit einem dreidimensionalen Rasterverfahren, bei dem in einem einzelnen Rasterschritt nur die Fluoreszenz aus dem Fokus, d. h. einem einzelnen Punkt, gemessen wird. Da der Fokus nicht nur in der xy -Ebene, sondern auch in verschiedenen Tiefen (z -Achse) die Probe abrastern kann, ist es mit den Laser-Raster-Mikroskopen möglich, einzelne Schichten des Präparates zu untersuchen. Diese Methode wird deshalb „optischer Schnitt“ genannt, denn das Präparat muss nicht zerschnitten werden, um einzelne Schichten zu untersuchen. Im rechten Teil der Abb. 2.3.1 ist dies skizziert. Damit bieten sich Laser-Raster-Mikroskope auch dazu an, Schichten in lebenden Zellen mit hoher Auflösung zu untersuchen.

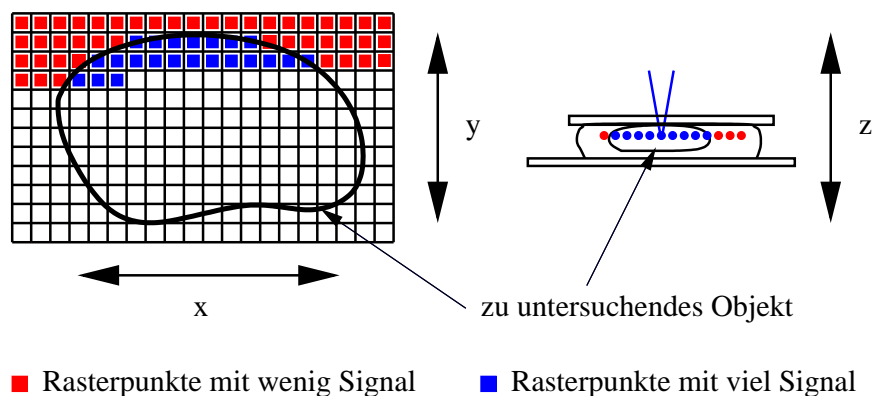


Abbildung 2.3.1: Idealisieretes dreidimensionales Rasterverfahren: der Laserfokus rastert eine xy -Ebene innerhalb der Probe in einer durch die z -Position festgelegten Tiefe.

Prinzipieller Strahlverlauf in LSMs: Den prinzipiellen Strahlverlauf in den LSMs zeigt Abb. 2.3.2, wobei sich die Abbildung auf den Strahlverlauf im Mikroskop beschränkt und die Darstellung in diesem Abschnitt nicht auf alle in der Praxis notwendigen optische Komponenten eingeht. Diese Abbildung erlaubt aber dennoch den Vergleich der Vorteile und Nachteile der beiden Konstruktionsprinzipien.

Bei den LSMs wird ein Laserstrahl über einen dichroitischen Spiegel in das Objektiv eingestrahlt. Die Wellenlänge des Lasers liegt bei den CLSMs im ultravioletten (UV) oder sichtbaren (VIS) Wellenlängenbereich, die TPLSMs verwenden eine infrarote (IR) Wellenlänge. Das Objektiv fokussiert den Laserstrahl in das Präparat. Der Laserstrahl regt im Präparat die Fluoreszenz an, die dann wiederum vom Objektiv aufgenommen und auf den Detektor abgebildet wird, wobei der dichroitische Spiegel für das Fluoreszenzlicht hoch transparent ist.

Die Eigenschaft der Zwei-Photonen-Anregung, nur im Fokus Fluoreszenz anzuregen, wirkt sich auf den Aufbau eines TPLSM aus. Der Aufbau ist zwar im Wesentlichen der gleiche wie bei einem CLSM, aber es fehlt die Lochblende, und gerade dies bietet große Vorteile für ein TPLSM, welche im Folgenden mit Hilfe der Abb. 2.3.2 erklärt werden.

Die Lochblende: Bei einem CLSM wird mit Ein-Photonen-Anregung gearbeitet und so entsteht das Fluoreszenzsignal auf dem gesamten Weg des Laserslichtes durch die Probe. Für die eindeutige Zuordnung des gemessenen Fluoreszenzsignal zu der Rasterposition wird deshalb die Lochblende so in der Bildebene des Objektivs positioniert, dass die konfokale Abbildung gewährleistet wird und nur die Fluoreszenz aus dem Fokus durch sie hindurchtritt (vgl. Abb. 2.3.2, durchgezogener Strahlverlauf). Dadurch wird auch die dreidimensionale Auflösung möglich. Fluoreszenz von außerhalb des Fokus, die Hintergrundfluoreszenz, kann dagegen das Loch der Blende nicht passieren (vgl. Abb. 2.3.2, gestrichelte Strahlverläufe). Auch Streulicht aus der Probe wird von der Blende unterdrückt und kann nicht auf den Detektor, z. B. einen Photomultiplier, fallen, der die Fluoreszenzintensität registriert.

Bei einem TPLSM stammt das gesamte gemessene Signal aufgrund der Zwei-Photonen-Anregung aus dem Fokus (vgl. Kap. 2.1). Es existiert auch keine Hintergrundfluoreszenz, die unterdrückt werden müsste. Die Lochblende wird also nicht benötigt und der Detektor ist in der Bildebene positioniert. So wird auch die konfokale Abbildungsbedingung durch die Positionierung von Detektor und Fokus, der die einzige Signalquelle ist, erfüllt.

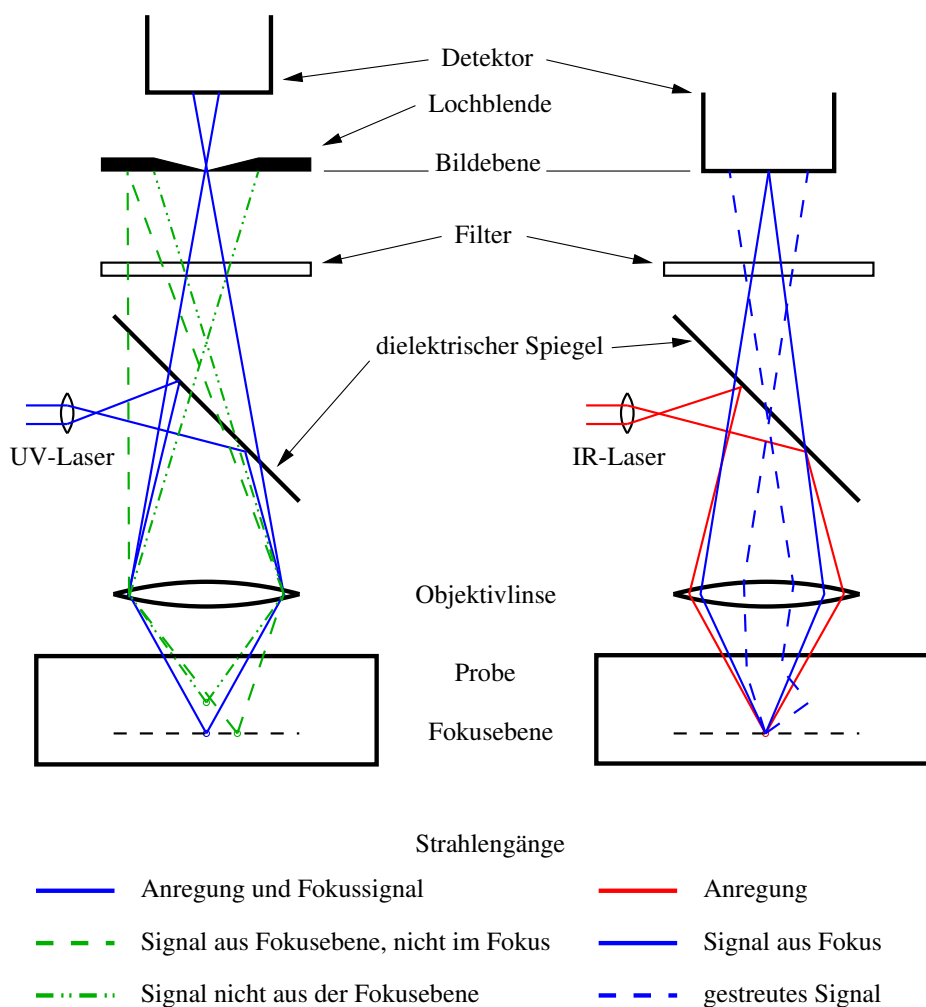


Abbildung 2.3.2: Vergleich des Aufbaus eines CLSM und eines TPLSM. In beiden Fällen wird ein Laserstrahl (Ultraviolett (UV) oder Infrarot (IR)) über einen dichroitischen Spiegel durch das Objektiv in die Probe fokussiert und die Fluoreszenz wird vom Objektiv auf den Detektor abgebildet. Der Filter blockt das noch in den Detektionsstrahlengang gelangende Anregungslicht.

Wenn die Lochblende nicht mehr im Strahlengang liegt, steht effektiv eine größere Detektoröffnung zur Verfügung, und es können auch Fluoreszenzphotonen in den Detektor gelangen, die aus dem Fokus stammen, aber in der Probe gestreut wurden. Im rechten Teil der Abbildung 2.3.2 ist ein solcher Strahlverlauf durch die gestrichelte Linie angedeutet. In einem CLSM würden diese gestreuten Photonen nicht mehr das Loch der Blende treffen, was zu einem reduzierten Signal führt. Zudem können bei einem CLSM Photonen von außerhalb des Fokus (Hintergrundfluoreszenz) noch in das Loch der Blende hineingestreut werden, was zu einem höheren Rauschsignal auf dem Detektor führt. Ein TPLSM hat also ein besseres Signal-Rausch-Verhältnis als ein CLSM.

Desweiteren muss die Lochblende sehr genau positioniert werden, damit sie mit dem Fokus zusammen exakt die Abbildungsbedingung erfüllt. Die Präzision dieser Justierung beeinflusst das Signal-Rausch-Verhältnis ebenfalls sehr stark.

Der dichroitische 45°-Filter: Ein weiteres wichtiges Bauteil aus Abb. 2.3.2 ist der dichroitische 45°-Spiegel, der zum einen die Aufgabe hat, das Anregungslaserlicht in das Objektiv umzulenken, und zum anderen die Fluoreszenz und das Laserlicht im Detektionsstrahlengang zu trennen. Die Trennung der Wellenlängen gelingt durch eine dielektrische Beschichtung, die für die Anregungswellenlänge hochreflektierend, für die Fluoreszenzwellenlänge dagegen hochtransparent ist (für das Prinzip vgl. dazu KLEIN & FURTAK [31]). Je enger die zu trennenden Wellenlängen bei einander liegen, desto aufwendiger wird die Konstruktion eines dichroitischen Spiegels.

Der Sperrfilter: Ebenso wichtig wie der dichroitische 45°-Spiegel ist in beiden Aufbauten der Sperrfilter, der im Detektionsstrahlengang zwischen dem dichroitischen Spiegel und der Bildebene liegt. Der Sperrfilter ist notwendig, da immer ein kleiner Teil des Anregungslaserlichtes an den optischen Komponenten reflektiert wird und zusammen mit dem Fluoreszenzsignal in den Detektionsstrahlengang gelangt. Es gelangt ca. 1 % des reflektierten Anregungslichtes durch den dichroitischen Spiegel hindurch in den weiteren Detektionsstrahlengang. Dieser Rest ist etwa um einen Faktor 100 intensiver als das interessierende Fluoreszenzsignal und würde das Fluoreszenzsignal auf dem Detektor sehr stark überstrahlen. Mit Hilfe des Sperrfilters, der ab einer bestimmten Wellenlänge hochreflektierend ist und so die Anregungswellenlänge blockt, kann dieser Rest des Anregungslichtes vom Signal getrennt werden.

2.3.1 Die verschiedenen Rasterverfahren

Dieser Abschnitt beschäftigt sich mit dem prinzipiellen Strahlverlauf im Detektionsstrahlengang, da hier mehrere Realisierungen möglich sind. Um die Probe abrastern zu können, müssen Probe und Laserfokus relativ zueinander bewegt werden, was durch zwei Verfahren erreicht werden kann: das Probenrasterverfahren und das Strahlrasterverfahren. Diese werden zusammen mit den möglichen Detektionsmodi in Abb. 2.3.3 dargestellt.

Bei der Probenrastung wird die Probe unter dem ortsfesten Laserstrahl bewegt. Dazu wird meist der gesamte Probentisch mit Hilfe eines Schrittmotor- oder eines piezoelektrischen Antriebes mit sub- μm -Auflösung in der x-y-Ebene verfahren. Die Aufnahmetiefe entlang der z-Achse kann ebenfalls mit Hilfe einer dieser beiden Antriebsarten verändert werden. Betrachtet man den Detektionsstrahlengang in den Teilen (A) und (B) der Abb. 2.3.3, so sind dort keine beweglichen optischen Elemente zu finden, die den Strahlengang dynamisch beeinflussen könnten. Da sich bei der Probenrastung der Laserfokus immer an der selben Position befindet (statischer Anregungsstrahlengang), entsteht auch der Bildpunkt in der Bildebene immer an derselben Position. Man kann also von einem statischen Detektionsstrahlengang sprechen. Damit kann ein Detektor mit kleiner Detektionsfläche verwendet werden. Es kommen also z. B. Photomultiplier oder Avalanche-Photodioden in Frage. Allerdings muss bei diesem Probenrasterverfahren der Detektor zu jeder Rasterposition ausgelesen werden und die aufgenommenen Daten müssen unter Beachtung ihrer Rasterposition mit einem Bildverarbeitungsprogramm zu einem Gesamtbild zusammengesetzt werden. Die Probenrastung ist im Teil (A) der Abb. 2.3.3 gezeigt.

Bei der Strahlrastung dagegen wird der Laserstrahl über die ortsfeste Probe bewegt. Dies gelingt in der x-y-Rastereinheit durch zwei bewegliche Spiegel – der erste für die x-Richtung, der zweite für die y-Richtung. Die Spiegelantriebe haben eine sub-mrad-Winkelauflösung und können zudem mit hohen Frequenzen (im kHz-Bereich) angesteuert werden. Die Spiegelrastereinheit muss vor der Lasereinkopplung in das Mikroskop, also im Anregungsstrahlengang, positioniert werden. So entsteht ein dynamischer Anregungsstrahlengang.

Für den Detektionsstrahlengang gibt es jetzt auch die Möglichkeit einer statischen oder einer dynamischen Strahlführung. Diese beiden Detektionsmodi bezeichnet man als „non-descanned“ Modus im Falle des statischen Detektionsstrahlenganges und als „descanned“ Modus im Falle des dynamischen Detektionsstrahlenganges. Der non-descanned Modus ist in Abb. 2.3.3 (B) gezeigt, während der descanned Modus in Abb. 2.3.3 (C) skizziert ist.

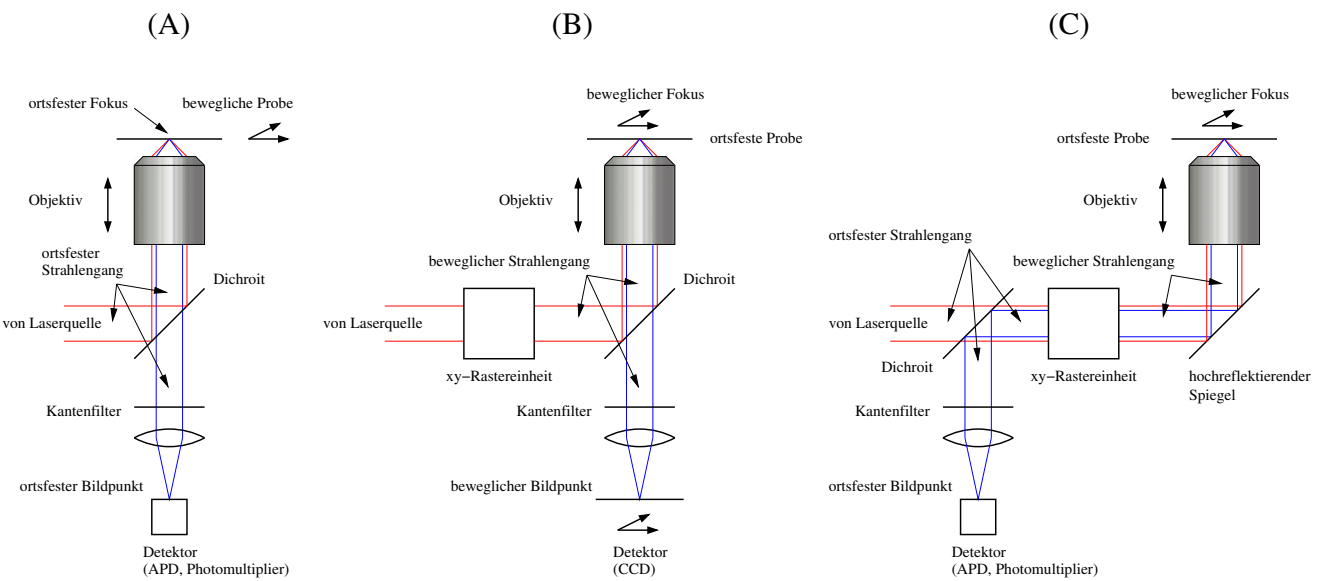


Abbildung 2.3.3: Rastermodi eines LSM: (A) zeigt den Strahlverlauf beim Probenrasterverfahren, (B) zeigt das Strahlrasterverfahren im non-descanned Modus und (C) zeigt das Strahlrasterverfahren im descanned Modus.

Wenn im non-descanned Modus durch die beweglichen Spiegel der Laserfokus die verschiedenen Rasterpunkte in der Probe trifft, liegt der zugehörige Bildpunkt für jede Rasterposition an einer anderen Stelle in der Bildebene. Man benötigt also einen großflächigen Detektor um das Signal zu detektieren. Für ein Rastergebiet von $50 \times 50 \mu\text{m}^2$ und einer 90-fachen Vergrößerung bewegt sich der Bildpunkt in der Detektorebene auf einer $4.5 \times 4.5 \text{ mm}^2$ großen Fläche. Ein Punktdetektor (z. B. eine Avalanche-Photodiode (APD)) wie im Probenrasterverfahren benötigt demnach eine ebenso große aktive Sensorfläche. Für den non-descanned Modus bieten sich stattdessen CCD-Kameras an. Dieser non-descanned Modus hat den Vorteil, dass eine Bildverarbeitung, die aus den Rasterpositionen und den gemessenen Signalen ein Bild zusammensetzen muss, entfällt. Setzt man die Belichtungszeit der Kamera gleich der Zeit, die zum Rastern aller Probenpunkte benötigt wird, so entsteht auf der Kamera das fertig zusammengesetzte Bild, das nur noch ausgelesen werden muss. Dies ist möglich, weil zu jedem Rasterpunkt ein neuer Bildpunkt belichtet wird, der an einer anderen Stelle auf der Kamera liegt und die zuvor belichteten Bildpunkte nicht beeinflusst. Im Idealfall entspricht die Anzahl aller Bildpunkte der Anzahl der Rasterpunkte und jeder Bildpunkt enthält nur die Information des zu ihm gehörigen Rasterpunktes in der Probe. Auf der Kamera entsteht also Punkt für Punkt das Bild der Probe. Nachteilig wird die Verwendung einer CCD-Kamera, wenn diese Idealbedingungen nicht erfüllt sind. In diesem Fall beeinflussen sich die Bildpunkte auf der CCD-Kamera und die erreichbare Auflösung reduziert sich. Zum non-descanned Modus muss auch gesagt werden, dass er nur mit einem TPLSM realisiert werden kann, denn an der Stelle des Bildpunktes muss bei einem CLSM die Lochblende für die konfokale Abbildung positioniert werden. Und eine starr positionierte Lochblende ist aufgrund des sich bewegenden Bildpunktes nicht einsetzbar – eine Lochblende dagegen, die sich exakt mit dem Bildpunkt und der hohen Geschwindigkeit der Rasterspiegel mitbewegt, dürfte technisch nur extrem schwierig zu realisieren sein.

Die dritte Möglichkeit der Strahlführung ist in Abb. 2.3.3 (C) für den descanned Modus gezeigt. Der Unterschied im Aufbau – verglichen mit Abb. 2.3.3 (A) und (B) – besteht darin, dass basierend auf dem Strahlverlauf des Probenrasterverfahrens (Abb. 2.3.3 (A)) die x-y-Spiegelrastereinheit und ein für Anregungs- und Fluoreszenzwellenlänge hochreflektierender Spiegel zwischen dem dichroitischen 45° -Spiegel und dem Objektiv eingesetzt wird. Für den Anregungsstrahlengang ist mit der Spiegelrastereinheit das Strahlrasterverfahren realisiert. Die Fluoreszenz findet im Nanosekundenbereich statt, die Bewegung der Rasterspiegel dagegen im Millisekundenbereich. Die Fluoreszenz ist also um einen Faktor 10^6 schneller.

Dies bedeutet, dass die Rasterspiegel ihre Position, mit der sie den Anregungslaser zum Rasterpunkt in der Probe gelenkt haben, nicht geändert haben, wenn die Fluoreszenz aus der Probe auf dem Weg des Anregungslasers zurückläuft. Das Fluoreszenzsignal passiert die Rasterspiegel also unter den gleichen Ablenkwinkeln, mit dem zuvor der Anregungsstrahl abgelenkt wurde. Deshalb läuft das Fluoreszenzsignal nach den Rasterspiegeln auf der gleichen Achse wie der Anregungsstrahl, bevor es durch den dichroitischen 45° -Spiegel in Richtung Detektor umgelenkt wird. Man kann auch sagen, dass die Rasterspiegel die Dynamik, die sie zuvor dem Anregungsstrahl aufgeprägt haben, beim Fluoreszenzsignal wieder herausnehmen. Betrachtet man einen einzelnen Rasterschritt, so entspricht der Strahlverlauf dem des Probenrasterverfahrens, nur dass weitere optische Elemente (die Spiegel) eingebaut wurden, um den Strahl mit festen Einstellungen weiterzuleiten. Dieser Vergleich eines Einzelrasterschrittes mit der Probenrasterung oder auch die Betrachtung der „aufgehobenen“ Dynamik zeigen, dass das Signal aller Rasterpunkte in der Probe auf denselben Bildpunkt abgebildet wird. Wie beim Probenrasterverfahren reicht ein Detektor mit kleiner Detektionsfläche aus (APD, Photomultiplier). Aber auch hier besteht wie beim Probenrasterverfahren die Notwendigkeit, das Signal für jeden einzelnen Rasterpunkt auszulesen und die Daten später mit einem Bildverarbeitungsprogramm zu einem Bild zusammenzusetzen.

Vorteile und Nachteile der Rasterverfahren: Die drei vorgestellten Rasterverfahren haben Vor- und Nachteile nicht nur hinsichtlich der Schwierigkeiten beim experimentellen Aufbau, sondern auch hinsichtlich der Verwendbarkeit bei verschiedenen experimentellen Voraussetzungen bzw. Anforderungen.

In Bezug auf die Datenaufnahmegeschwindigkeit ist der non-descanned Modus des Strahlrasterverfahrens am schnellsten, weil die Rasterspiegel mit hohen Frequenzen angesteuert werden können und vom großflächigen Detektor, der in der Regel eine CCD-Kamera ist, sofort die fertigen Bilder ausgelesen werden können. Dies ist bei aktuellen CCD-Kameras ebenfalls mit hoher Geschwindigkeit möglich. Am langsamsten ist dagegen das Probenrasterverfahren, weil die Antriebe für den Probenstisch aufgrund der hohen Masse des Probenstisches diesen nur mit niedrigen Frequenzen bewegen können. Außerdem muss zu jeder Rasterposition der Detektor ausgelesen werden. Dies ist aber durch schnelle APDs und der zugehörigen schnellen Elektronik mit ausreichend hoher Geschwindigkeit möglich.

In Bezug auf den Aufbau sind der non-descanned Modus des Strahlrasterverfahrens und das Probenrasterverfahren ungefähr gleich schwierig zu realisieren.

Beim non-descanned Modus ist die Spiegelrastereinheit als komplexes Bauteil präzise in den Strahlengang einzubauen, dafür muss der großflächige Detektor auf die Bildebene justiert werden. Laterale Verschiebungen in der Bildebene führen lediglich zu einer nicht zentrierten Position des Bildes auf dem Detektor. Beim Probenrasterverfahren entfällt die Spiegelrastereinheit, stattdessen muss der Detektor mit seiner kleinen Detektionsfläche präzise in den Bildpunkt justiert werden – hierbei sind laterale und axiale Position sehr wichtig. Bei einem CLSM müsste statt des Detektors die Lochblende sehr exakt positioniert werden, wie dies zuvor schon erwähnt wurde. Am aufwendigsten ist der descanned Modus des Strahlrasterverfahrens zu justieren, denn hier muss das Fluoreszenzsignal exakt auf der gleichen optischen Achse wie das Anregungslicht verlaufen, damit beim Rastern der Bildpunkt auf dem Detektor immer am gleichen Ort liegt. Zudem muss der Detektor wie beim Probenrasterverfahren exakt positioniert werden.

Im Hinblick auf die Empfindlichkeit haben die „Punkt“-Detektoren des Probenrasterverfahrens bzw. des descanned Modus Vorteile gegenüber einer CCD-Kamera als flächigem Detektor beim non-descanned Modus. So können mit APDs einzelne Photonen detektiert und gezählt werden, z. B. mit dem SPCM-Modul von PerkinElmer und der PMM328-Zählkarte von Becker & Hickl (vgl. Kap. 4.5.1 und Tab. 4.5.1). Mit diesen Modellen ist auch eine hohe Datenaufnahmegeschwindigkeit, genauer Photonenzählrate, von bis zu 10 MHz möglich. Typische CCD-Kameras können aufgrund ihrer geringeren Quanteneffizienz von ca. 50 % (z. B. PCO SensiCam: $QE \approx 45\%$, oder PCO SensiCam: $QE \approx 60\%$, beide von PCO Computer Optics GmbH) keine Einzelphotonen nachweisen bzw. die Einzelphotonen werden von der Kameraelektronik nicht als Messwert (Zählimpuls, Count) registriert. Erst mehrere Photonen im selben Pixel erzeugen einen Count. Dennoch gibt es auch hier neuere Entwicklungen wie die Andor iXon EMCCD-Kamera, die sich durch eine hohe Quanteneffizienz von $QE \approx 95\%$ auszeichnet und zudem einen schnell auslesbaren CCD-Chip mit großer Pixelanzahl besitzt (vgl. Kap. 3.5).

Ein letzter Aspekt, der hier erwähnt werden soll, bezieht sich auf die Auflösung, die bei den drei Verfahren erreicht werden kann. Eine Punktquelle in der Probe wird durch den Detektionsstrahlengang in ein AIRY-Scheibchen auf den Detektor abgebildet. Mathematisch wird diese unscharfe Abbildung durch die Punkantwortfunktion (PSF³) dargestellt. Ist idealisierend die PSF in allen drei Aufbauten gleich, so erreichen alle drei Verfahren die gleiche Auflösung im Fokus (vgl. Kap. 2.5). Aber bei einer streuenden Probe werden Unterschiede bei der

³nach der englischen Bezeichnung: Point Spread Function = PSF

beobachteten Auflösung auf den Bildern feststellbar, die durch das Rasterverfahren bedingt sind. Die streuende Probe vergrößert zwar auch schon den Fokus des Anregungslaser, aber dies geschieht in allen drei Verfahren auf die gleiche Art und Weise. Wird jetzt der Fokus, d. h. das Fluoreszenzlicht, auf den Detektor abgebildet, so ist aufgrund der wieder vorhandenen Streuung in der Probe das AIRY-Scheibchen größer als im idealen nicht-streuenden Fall.

Bei Verwendung einer Rasterschrittweite, die der lateralen Auflösung in einer nicht-streuenden Probe entspricht, liegen auf einem flächigen Detektor die AIRY-Scheibchen ohne gegenseitige Beeinflussung nebeneinander, vgl. Abb. 2.3.4 (A). Ihr Signal kann jeweils einem Kamerapixel zugewiesen werden. Bei einer streuenden Probe aber überlagern sich die vergrößerten AIRY-Scheibchen auf dem flächigen Detektor und dies führt zu einer schlechteren Auflösung beim non-descanned Modus des Strahlrasterverfahrens, vgl. Abb. 2.3.4 (B).

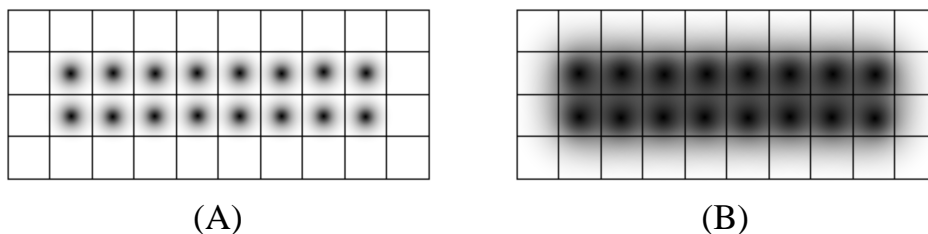


Abbildung 2.3.4: Verschlechterung der Auflösung beim non-descanned Modus des Strahlrasterverfahrens durch eine streuende Probe.

Die Punktdetektoren der beiden anderen Verfahren – in der Realität Photodioden mit einer kleinen sensitiven Fläche – können aber sowohl für eine nicht-streuende Probe, als auch für eine streuende Probe das gesamte Signal aus der Probe aufnehmen und der angefahrenen Rasterposition zuordnen. Dies gilt auch für die vergrößerten AIRY-Scheibchen. Die Streuung des Fluoreszenzsignales wirkt sich in den rekonstruierten Bildern also nicht negativ auf die Auflösung aus. Die aufgenommenen Bilder des non-descanned Modus wirken durch die Streuung dagegen verschmiert, d. h. unschärfer. Es sei noch einmal darauf hingewiesen, dass die Verschlechterung der Auflösung durch die Streuung des Anregungslichtes in der Probe und den daraus resultierenden vergrößerten Fokus in die vorigen Betrachtungen nicht eingeht und für alle drei Verfahren zutrifft.

2.4 Parallel-Processing in der Laser-Raster-Mikroskopie – multi-fokale TPLSM

Die TPLSM bietet aufgrund der Möglichkeit der optischen Schnitte und aufgrund der geringen Strahlenschädigung beste Voraussetzungen zur Untersuchung auch lebender Zellen und der in ihnen ablaufenden Prozesse. Nachdem der Aufbau der Zelle schon sehr genau bekannt ist, haben in der Biologie Fragen nach dem genauen zeitlichen Ablauf von Prozessen innerhalb einer Zelle an Bedeutung gewonnen.

Grundsätzlich wird die Dauer der Bildaufnahme durch das entstehenden Signal bestimmt. Da immer ein komplettes Bild aufgenommen werden soll, setzt sich die Aufnahmedauer pro Bild aus dem Produkt von Integrationszeit pro Rasterpunkt und der Anzahl der Rasterpunkte, d. h. der Bildgröße, zusammen. Die Integrationszeit ist dabei die Zeit, die der Detektor an einem Rasterpunkt benötigt, um ein ausreichendes Signal mit akzeptablem Signal-Rausch-Verhältnis aufnehmen zu können. Der Integrationszeitraum hängt direkt mit der Anzahl der entstehenden Fluoreszenzphotonen zusammen (vgl. Kap. 2.1), denn je mehr Photonen pro Laserpuls entstehen, desto kleiner ist die Integrationszeit pro Rasterpunkt. T. NIELSEN *et al.* [16] berechnet eine Integrationszeit pro Rasterpunkt von 100 μ s, was bei einer Bildgröße von 300×300 Bildpunkten zu einer Messzeit von etwa 10 Sekunden pro Bild führt. Sofern die im Mikroskop eingesetzten Komponenten, wie Detektor und Rastereinheit zum Verfahren des Mikroskopisches (beim Probenrasterverfahren), mit dieser Geschwindigkeit betrieben werden können, hat das Mikroskop seine maximale Arbeitsgeschwindigkeit erreicht. Andernfalls wird die Arbeitsgeschwindigkeit von der langsamsten Komponente bestimmt. Die Aufnahmezeit pro Bild bestimmt auch die biologischen Prozesse, deren Zeitverhalten noch untersucht werden kann. Prozesse, die schneller als diese Aufnahmezeit in einer Zelle ablaufen, können nicht betrachtet werden. Daher ist es verständlich, dass immer höhere Bildaufnahmegeschwindigkeiten erreicht werden sollen, um auch schnelle Prozesse in den Zellen untersuchen und verstehen zu können, damit letztendlich ein vollständiges Bild der Funktionsweise einer Zelle entsteht.

Die notwendige erhöhte Aufnahmegeschwindigkeit pro Bild, um auch schnell ablaufende Prozesse untersuchen zu können, kann durch Parallel-Processing erreicht werden. Parallel Processing bedeutet, dass nicht mehr nur ein einziger Laserstrahl die Probe abrastert, sondern dass mehrere Strahlen gleichzeitig jeweils einen Teil des gesamten Aufnahmegebietes rastern. Durch das Parallel-Processing

werden in der Probe mehrere Foki gleichzeitig erzeugt, so dass diese Methode als multi-fokale Zwei-Photonen-Laser-Raster-Mikroskopie bezeichnet wird.

Kap. 2.4.1 beschreibt die Grundlagen des Parallel Processing, wie sie idealerweise umgesetzt werden sollten. Kap. 2.4.2 beschreibt die tatsächliche Realisierung im vorliegenden Experiment und Kap. 2.4.3 geht auf die Bildverarbeitung der drei zuvor diskutierten Rasterverfahren ein, durch die die gemessenen Daten unter Beachtung der durch den Aufbau gegebenen Eigenarten in Bilder umgewandelt werden.

2.4.1 Grundlagen des Parallel-Processing in der Zwei-Photonen-Laser-Raster-Mikroskopie

Wie zuvor in der Einleitung erwähnt, bedeutet Parallel-Processing, dass das zu rasternde Gebiet nicht mehr von einem einzigen Strahl, sondern von mehreren Strahlen gleichzeitig abgerastert wird. Die Teilstrahlen werden aus einem einzigen Strahl mit Hilfe eines Strahlteilers erzeugt und sollten untereinander gleiche Eigenschaften haben – die Gründe werden im Folgenden noch genannt. Die Anordnung der Strahlen kann auf zwei Weisen erfolgen: als Matrix oder als Linie.

Die matrixförmige Anordnung der Strahlen wird von T. NIELSEN *et al.* [16] dargestellt und mit dieser Idee lässt sich auch die Vorstellung der Zusammensetzung des Gesamtbildes aus Teilbildern am besten nachvollziehen: Jeder dieser Einzelstrahlen erzeugt ein Teilbild und alle Teilbilder werden nach der Datenaufnahme zum Gesamtbild zusammengesetzt. Abb. 2.4.1 zeigt diese Zerlegung des gesamten Rastergebietes in die Teilgebiete.

Die matrixmäßige Anordnung der Strahlen ist aber mit Problemen hinsichtlich der technischen Umsetzung und der Bildbearbeitung verbunden. Abb. 2.4.1 zeigt, dass die Teilgebiete präzise aneinander anschließen und die Rasterpositionen der Teilgebiete sich exakt zu einem großen, das Gesamtgebiet umfassenden, gleichmäßigen Raster zusammensetzen. Es gibt keine Überlappung der Teilgebiete und die Rasterpositionen der Teilgebiete sind nicht gegeneinander versetzt. Dies ist der Idealfall des Parallel Processing, der eine perfekte Justierung des Strahlteilers in Bezug auf die Strahlpositionen verlangt. Diese perfekte Justierung ist in der Praxis aber nur schwer zu erreichen.

Mit der Linien-Anordnung der Strahlen, die im vorliegenden TPLSM-Aufbau verwendet wird, kann wie mit der Matrix-Anordnung der größte Geschwindigkeitsvorteil erreicht werden und die Bildverarbeitung kann so einfach wie bei der Einzelstrahl-Methode bleiben. Voraussetzung ist aber wieder die perfekte Justie-

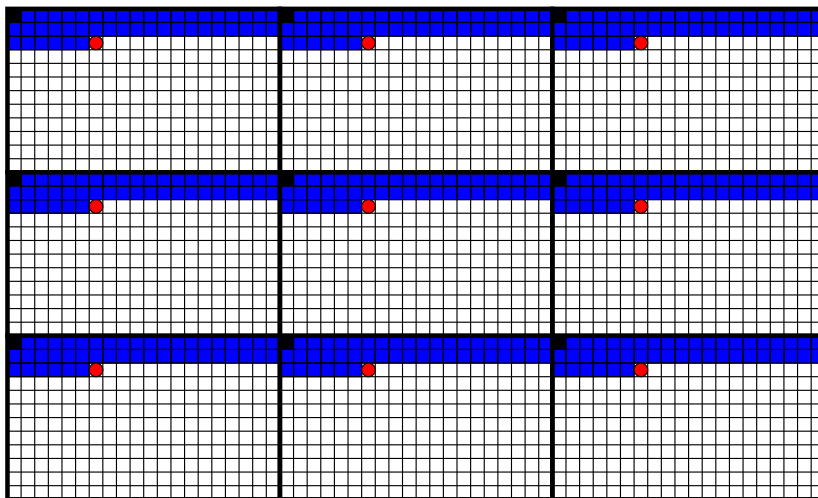


Abbildung 2.4.1: Skizzierung des idealen Parallel Processing: die einzelnen Kästchen stellen die Rasterpositionen dar (schwarz: Startposition ((0,0)-Pixel) jedes Strahles, blau: schon gerasterte Positionen, rot: aktuelle Rasterposition), die dickeren Linien trennen die einzelnen Teilrastergebiete. Hier wird das Gesamtgebiet beispielhaft von 3×3 Strahlen gerastert. Ein ähnliches Bild zeigt sich aber auch für die Linienanordnung der Foki.

zung der Strahlpositionen, bei der die Strahlpositionen (genauer die Abstände der Strahlen, die Rasterschrittweite und die Größe des Teilgebietes) der multi-fokalen Anordnung mit den Rasterpositionen eines Einzelstrahlbaus übereinstimmen müssen.

Die Linienanordnung der Strahlen ist zwar bezüglich der Idee des Parallel-Processing gleichwertig mit der Matrix-Anordnung, sie bietet aber bei der technischen Realisierung und im Hinblick auf die Vielfalt der Anwendungen viele Vorteile gegenüber der Matrix-Anordnung. Diese Vorteile werden in Kap. 2.4.2 diskutiert.

Die Zeitdauer der Aufnahme eines Bildes verkürzt sich im Idealfall, d. h. ohne Überlappung der Teilrastergebiete, proportional zur Anzahl der verwendeten Strahlen, weil sich auch die Größe der Teilrastergebiete jedes Strahls gerade um den Faktor der Strahlanzahl verkleinert. Bei Verwendung von 64 Strahlen, wie dies im vorliegenden Aufbau geschieht, verkürzt sich die Aufnahmezeit also um den Faktor 64. Würde die Bildaufnahme mit einem Einzelstrahl beispielsweise 1 Minute dauern, so beträgt die Bildaufnahmezeit beim Parallel-Processing mit 64 Strahlen nur noch 1 Sekunde. Diese Zahlen verdeutlichen, dass durch das

Parallel-Processing Prozesse in einer Zelle untersucht werden können, die auf einer deutlich kürzeren Zeitskala liegen.

Neben diesem Geschwindigkeitsvorteil haben die Mehr-Strahl-Verfahren den weiteren Vorteil, dass die vom Laser zur Verfügung gestellte Leistung besser ausgenutzt wird. Wie in Kap. 2.8.1 noch dargestellt wird, darf die Leistung in einem einzelnen Strahl nicht zu groß werden, da sonst Strahlenschäden in der Zelle auftreten. Die heute zur Verfügung stehenden Laser erzeugen aber Strahlen, die ein Vielfaches dieser Leistung haben. Im Hinblick auf die gepulsten Laser ist z. B. beim Titan-Saphir-Laser auch eine Mindestleistung notwendig, damit ein Pulsbetrieb überhaupt möglich ist. Deshalb wird bei den Einzelstrahlmethoden immer ein großer Teil der Laserleistung ohne Nutzen abgeführt. Beträgt beispielsweise die maximale Leistung ohne Strahlenschäden 5 mW und wird ein Laser mit 320 mW Leistung verwendet, so müssen bei einer Einzelstrahlmethode 315 mW nutzlos abgeführt werden, während bei einem Mehr-Strahl-Mikroskop mit dieser Leistung 64 Strahlen gleichzeitig benutzt werden können.

Anforderungen an den Strahlteiler für Parallel-Processing:

Falls mit mehreren Strahlen gearbeitet wird, sollten die folgenden Punkte beachtet werden, denn sie können für die Bildaufnahme vermeidbare Probleme darstellen.

Der zur Teilstrahlerzeugung verwendete Strahlteiler muss die folgenden Anforderungen erfüllen, damit gleiche Teilstrahlen erzeugt werden:

- Die Teilstrahlen sollten gleiche Intensität haben, damit für alle Teilbilder die gleichen Bildaufnahmebedingungen gelten. Intensitäts- und daraus resultierende Signalunterschiede können zwar durch Korrekturfaktoren zwischen den Teilstrahlen ausgeglichen werden; dennoch sind Artefakte in der Bildverarbeitung nicht auszuschließen, wie im Abschnitt „Probleme der Bildverarbeitung“ in Kap. 2.4.3 für den Fall einer Matrix-Anordnung der Strahlen diskutiert wird. Desweiteren grenzen die durch die Intensitätsunterschiede entstehenden Signalunterschiede den effektiv nutzbaren Dynamikbereich des Detektors ein.
- Die Teilstrahlen sollten gleiche Strahlprofile haben, damit alle Teilstrahlen nach der Fokussierung gleiche Foki bilden, und damit gleiche Auflösung und Anregungswahrscheinlichkeiten bieten.
- Für einen kleinen Fokus ist es auch notwendig, dass alle Strahlen die volle Apertur des Objektivs ausnutzen (vgl. Kap. 2.5).

- Der Aufbau sollte möglichst gleiche optische Wege für alle Teilstrahlen gewährleisten, so dass die gepulsten Strahlen keiner unterschiedlichen Dispersion unterliegen und nur ein sehr kleiner zeitlicher Versatz zwischen den Strahlen entsteht. Dieser zeitliche Versatz, der für den hier aufgebauten Strahlteiler im ps-Bereich liegt, hat aber den Vorteil, dass sich die einzelnen Strahlkegel nach dem Austritt aus dem Objektiv zeitlich nicht überlagern. Falls die Strahlen alle gleichzeitig durch das Objektiv laufen, kann in den überlappenden Regionen der Strahlkegel ein unerwünschtes Fluoreszenzsignal entstehen. Dies reduziert die Möglichkeit der optischen Schnitte [43].
- Um die verschiedenen Strahlpositionen in der Probe zu erreichen, müssen die Teilstrahlen unter verschiedenen Winkeln ins Objektiv einfallen (siehe Kap. 2.4.2).

Durch einen Strahlteiler mit diesen Eigenschaften wird gewährleistet, dass für alle Teilbilder die gleichen Aufnahmebedingungen gelten und man keine nachträglichen Korrekturen einbringen muss, die ansonsten die nachfolgende Bildverarbeitung aufwendiger werden lassen könnten. Für eine unproblematische Bildverarbeitung sollten die Foki außerdem das oben erwähnte gleichmäßige Raster (Matrix oder Linie) einhalten.

Damit Parallel Processing mit mehreren Strahlen möglich ist, muss auch der Detektor in der Lage sein, die Signale aller Strahlen gleichzeitig aufzunehmen. Hier bieten sich CCD-Kameras als geeignete Detektoren an.

Die CCD-Kamera kann als flächiger Detektor auch im non-descanned Modus des Strahlrasterverfahrens verwendet werden. Mit Photodioden oder Photomultipliern ist dies nur möglich (vgl. Kap. 2.3.1), wenn die Sensorfläche groß genug, die Bewegung des Fluoreszenzsignal in der Detektorebene aufzunehmen und wenn das sequenzielle Auslesen der Daten zu den einzelnen Rasterpunkten und die anschließende Bildverarbeitung in Kauf genommen wird. Von einer CCD-Kamera kann das komplette Bild ausgelesen werden, wobei Auflösung reduziert sein kann. Die Verwendung von Photodioden ist im descanned Modus möglich, verlangt aber eine präzise Justierung des Strahlverlaufes und eine weitere Optik zwischen dielektrischem Spiegel und Detektor (vgl. Abb. 2.3.3 C), um die Bildpunkte der Foki so weit zu separieren, dass sie auf die einzelnen Photodioden fallen können. Diese Optik hat für den Multistrahl-descanned-Modus weitere Signalverluste und eine aufwendigeren Justierung zur Folge. Dazu kommt eine aufwendige Elektronik, um die Photodioden synchron anzusteuern und die Daten schnellstmöglich auslesen zu können – die Verwendung einer Diodenzeile reduziert diese Probleme nur teilweise.

Denkbar ist auch ein Multistrahl-CLSM im descanned Modus. Hierbei müsste vor die zuvor erwähnten Photodioden noch jeweils eine Lochblende eingebaut werden. Ein derartiger Aufbau mit einzeln justierbaren Lochblenden und Photodioden ist aber technisch nur sehr aufwendig aufzubauen und ist zusammen mit der aufwendigen Justierung für die praktische Anwendung ungeeignet.

2.4.2 Realisierung des Parallel-Processing – Aufbau des Strahlteilers

Das Kernstück eines multifokalen-TPLSM ist der Strahlteiler, der aus einem Strahl des Lasers die vielen Strahlen für die Rasterung der Probe erzeugt.

Der in diesem Experiment aufgebaute Strahlteiler erzeugt 64 Strahlen in einer Linien-Anordnung. Hervorzuheben ist, dass bei dem hier vorliegenden Aufbau die Eigenschaften des Eingangsstrahles in allen Teilstrahlen erhalten bleiben. Abb. 2.4.2 zeigt den prinzipiellen Aufbau des Strahlteilers, wie er von T. NIELSEN *et al.* [16] realisiert wurde.

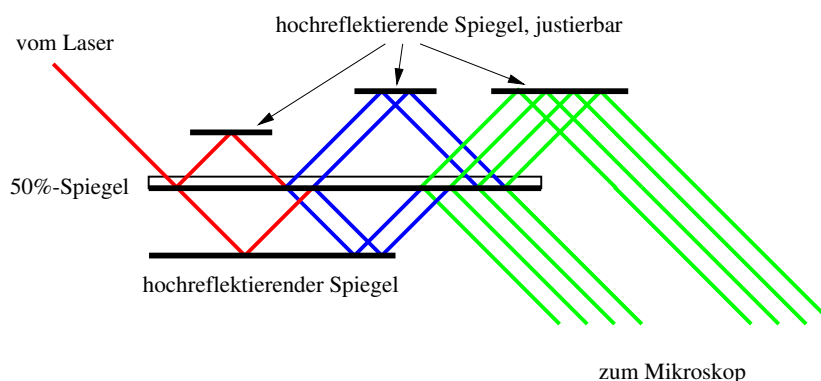


Abbildung 2.4.2: Prinzipieller Strahlteileraufbau nach T. NIELSEN *et al.* [16]: Der Strahlteiler besteht aus einem 50%-Spiegel und vier hochreflektierenden Spiegeln. Die verschiedenen Farben der Strahlen kennzeichnen jeweils einen Aufspaltungsschritt und verdeutlichen den Strahlverlauf.

Der Strahlteiler in Abb. 2.4.2 besteht aus einem 50%-Spiegel und fünf hochreflektierenden Spiegeln, von denen drei justierbar sind. Trifft ein Laserstrahl auf den 50%-Spiegel, so wird er in zwei gleiche Strahlen aufgeteilt (rot in Abb. 2.4.2), die noch alle Eigenschaften des einfallenden Strahles haben. Wie Abb. 2.4.2 zeigt, werden diese zwei Teilstrahlen von den hochreflektierenden Spiegeln zurück auf

2.4. PARALLEL-PROCESSING IN DER LSM – MULTI-FOKALE TPLSM 43

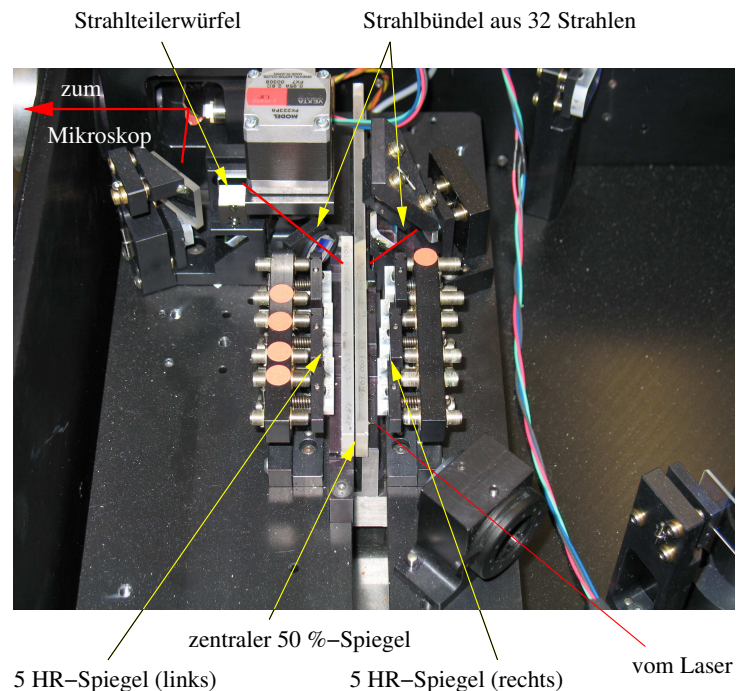


Abbildung 2.4.3: Realer Aufbau des Strahlteilers im verwendeten TriM-Scope: Der Strahlteiler setzt das Prinzip aus Abb. 2.4.2 um, arbeitet aber mit fünf hochreflektierenden Spiegeln. Dadurch entstehen am Ausgang des Strahlteilers zwei Strahlbündel mit je 32 Strahlen, die im Strahlteilerwürfel zu einer Linie aus 64 Strahlen zusammengeführt werden.

den 50%-Spiegel gelenkt und dort ein weiteres Mal aufgespalten, wobei ihre Auftreff- bzw. Aufspaltungspunkte auf dem 50%-Spiegel nicht gleich sind, da die hochreflektierenden Spiegel leicht unterschiedliche Abstände zum 50%-Spiegel haben (blau in Abb. 2.4.2). Dieser Vorgang lässt sich mehrmals wiederholen, wobei sich die Anzahl der Teilstrahlen jeweils verdoppelt. Bei einer Anzahl von n Paaren von hochreflektierenden Spiegeln, entstehen in einer Stufe 2^{n+1} Teilstrahlen, die auf einer Linie liegen.

Abb. 2.4.3 zeigt die reale Umsetzung des Prinzips aus Abb. 2.4.2, wobei hier fünf Spiegelpaare verwendet werden, die somit eine Linie von 64 Strahlen erzeugen. Zudem ist erkennbar, dass die hochreflektierenden Spiegel alle mit Stell-schrauben justierbar sind. Mit den justierbaren Spiegeln wird der Austrittswinkel der Strahlen aus dem Strahlteiler eingestellt und damit können die Strahlpositionen (Abstände und Versatz) in der Probe genau justiert werden, denn nach der

geometrischen Optik bestimmt der Einfallswinkel in das Objektiv, wie weit sich der Fokus eines einzelnen Strahles in der Brennebene von der optischen Achse entfernt. Die Vorteile des Strahlteilers mit der linienförmigen Strahlanordnung werden zusammen mit den weiteren Komponenten im Kap. 3.3 über das TriM-Scope beschrieben.

Ein Vorteil des hier realisierten Aufbaus ist die prinzipielle leichte Erweiterbarkeit, um noch mehr Strahlen zu erzeugen. Es muss lediglich ein zusätzliches Spiegelpaar eingebaut werden und danach kann mit der doppelten Strahlanzahl gearbeitet werden, sofern der Laser genügend Leistung für jeden Einzelstrahl liefert.

Ein weiterer Vorteil dieses Strahlteileraufbaus ist, dass die in Kap. 2.4.1 geforderte Gleichartigkeit der Strahlen gewährleistet wird und so für alle Rastergebiete die gleichen Aufnahmebedingungen gelten. Dazu kommt die sehr gute Ausnutzung der vorhandenen Laserleistung: bis auf die immer vorhandenen Absorptionsverluste der Spiegel wird die gesamte vom Laser zur Verfügung gestellte Leistung auf die Teilstrahlen verteilt. Bei einem Mikrolinsenraster ist dies nicht gegeben, wie im folgenden beschrieben wird. Weitere Ausführungen zum Strahlteiler finden sich in T. NIELSEN *et al.* [16].

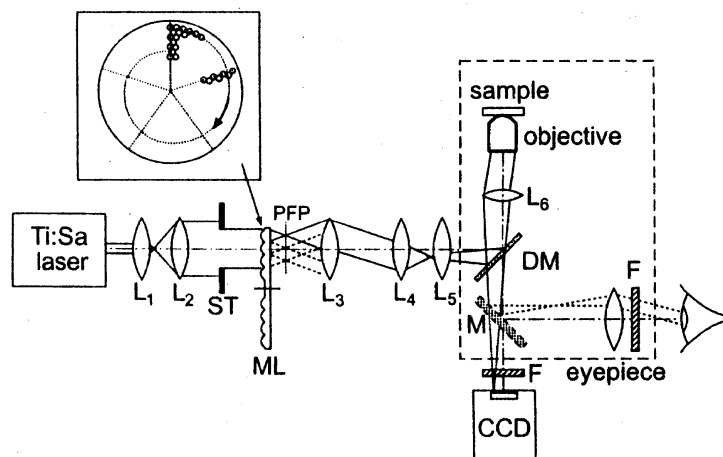


Abbildung 2.4.4: Alternativer Strahlteileraufbau mit einem Mikrolinsenraster, nach J. BEWERSDORF *et al.* [44]. Der Laserstrahl wird von den Linsen L_1 und L_2 aufgeweitet und beleuchtet das Mikrolinsenraster (ML). Die in der Brennebene PFP entstehenden Foki werden durch weitere Linsen und das Objektiv in die Probe abgebildet. Der weitere Aufbau mit dem dichroitischen Spiegel DM entspricht einem üblichen LSM.

Abb. 2.4.4 zeigt eine alternative Möglichkeit, einen Strahlteiler zu realisieren, indem ein Mikrolinsenraster verwendet wird (aus J. BEWERSDORF *et al.* [44]).

Vergleicht man den im vorliegenden Experiment verwendeten Aufbau des Strahlteilers – genauer gesagt das Prinzip der Strahlvervielfachung mit Hilfe eines 50 %-Spiegels – mit demjenigen, der ein Mikrolinsenraster mit einem aufgeweiteten Laserstrahl verwendet, so stellt man fest, dass die Laserleistung bei Verwendung des Linsenrasters nicht gut ausgenutzt werden kann. Der zur Beleuchtung benutzte Laserstrahl hat ein gaußförmiges Strahlprofil, das radial stark abfällt. Deshalb werden die äußeren Linsen des Rasters – und damit die Randstrahlen – deutlich weniger intensiv beleuchtet als die zentral liegenden Linsen. Falls man nur den zentralen Bereich des aufgeweiteten Strahles für eine relativ gleichmäßige Beleuchtung des Linsenrasters benutzt, bleibt ein großer Teil der Laserenergie ungenutzt. Beides widerspricht den Anforderungen für einen idealen Strahlteiler, der die gesamte Laserleistung gleichmäßig auf alle Strahlen verteilen soll.

2.4.3 Bildverarbeitung beim Parallel-Processing

Um alle Rasterpositionen der Probe abzutasten, gibt es zwei Möglichkeiten: entweder das Strahlrasterverfahren oder das Probenrasterverfahren, vgl. Abb. 2.3.1.

Der in Kap. 2.4.2 angesprochene Aufbau von J. BEWERSDORF *et al.* [44] mit einem Linsenraster ermöglicht eine recht leichte Strahlrasterung, indem man das Linsenraster rotieren lässt und als NIPKOW-Disk verwendet, wodurch auch eine Echtzeitbeobachtung möglich ist. Weitere Ausführungen zum NIPKOW-Verfahren sind z. B. in J.B. PAWLEY (ED.) [40, Kap. 1 und Kap. 10] zu finden. Der Aufbau, der im vorliegenden Experiment realisiert wurde, verwendet wie der Aufbau von J. BEWERSDORF *et al.* [44] ebenfalls das Strahlrasterverfahren im non-descanned Modus. Somit ist aufgrund der hohen Frequenz der x-y-Rasterspiegel von 1 kHz eine Echtzeitbeobachtung der Probe auf der angeschlossenen CCD-Kamera und im Okular möglich.

Wie in Kap. 2.3.1 erwähnt, sollte aufgrund der sich durch das Rastern bewegenden Bildpunkte ein flächiger Detektor, wie eine CCD-Kamera, verwendet werden. Wegen der nicht auftretenden gegenseitigen Beeinflussung der Bildpunkte auf dem Detektor kann der Detektor während der gesamten Aufnahme eines Einzelbildes geöffnet bleiben (vergleichbar mit der Dauerbelichtung einer Spiegelreflexkamera), so dass sich das Bild auf der CCD-Kamera zusammensetzt und es ausreicht, die Kamera erst nach der kompletten Rasterung auszulesen. Dies ist zudem eine Möglichkeit, die Bildaufnahme zu beschleunigen, denn die Auslesezeit der CCD-Kamera geht nur einmal in die Aufnahmedauer ein und muss nicht

für jede Rasterposition dazugerechnet werden, wie es beim Probenrasterverfahren und im descanned Modus notwendig wäre. Der CCD-Chip sollte recht groß sein, damit er viele Pixel aufnehmen kann und man ein hochauflösendes Bild erhält. Da von der CCD-Kamera sofort das fertige Bild ausgelesen werden kann, ist keine weitere Bildverarbeitung notwendig. Beim Probenrasterverfahren und im descanned Modus des Strahlrasterverfahrens ist dagegen erst noch eine unter Umständen aufwendige Bildverarbeitung notwendig, die im Folgenden noch diskutiert wird. Eine Echtzeitbeobachtung kann deshalb nicht so schnell wie im non-descanned Modus durchgeführt werden. Durch eine schnell aufeinanderfolgende Aufnahme mehrerer Einzelbilder ist auch die Aufnahme einer Zeitreihe zur Untersuchung der Dynamik in der Probe möglich. Wird die Einzelbildaufnahme mit der Ansteuerung der z-Position synchronisiert, so können ebenso einfach Bilder aus verschiedenen Tiefen der Probe aufgenommen und somit ein dreidimensionales Bild der Probe erhalten werden. Gerade für diese dreidimensionalen Aufnahmen ist eine hohe Datenaufnahmegeschwindigkeit wünschenswert, damit sich die Probe während der Aufnahmezeit so wenig wie möglich verändert. Auch die Kombination der 3D-Aufnahme mit der Zeitreihe ist denkbar, um zeitliche Dynamik im Volumen der Probe zu beobachten, allerdings entsteht hierbei eine sehr große Datenmenge. Der non-descanned Modus bietet also mit einer schnellen CCD-Kamera eine sehr einfache Bildverarbeitung.

Eine schnelle CCD-Kamera ist wegen der einfacheren Justierung auch als Detektor im Probenrasterverfahren und beim descanned Modus einsetzbar. Bei diesen Verfahren mit feststehenden Bildpunkten soll der Detektor zu jeder Rasterposition die Intensität der einzelnen Bildpunkte liefern – bei Verwendung von 64 Strahlen sind das jeweils 64 Intensitätswerte für jede Rasterposition. Diese 64 Werte kann auch der CCD-Chip theoretisch auf 64 Pixeln detektieren. Die große Datenmenge eines ganzen CCD-Bildes von z. B. 512 x 512 Pixeln kann bei den CCD-Kameras durch Binning und die Definition von Teilbildern auf dem CCD-Chip auf die interessierenden Daten reduziert werden. Die reduzierte Datenmenge pro Bild ermöglicht eine erhöhte Aufnahmegeschwindigkeit der CCD-Kamera.

Für ein Multistrahl-TPLSM mit 64 Strahlen ergibt sich im Punktrasterverfahren zu jeder Rasterposition ein Datensatz bestehend aus den Koordinaten (x, y, z) der angefahrenen Position und den 64 Intensitätsmesswerten. Für den Fall eines perfekt justierten Strahlteilers (vgl. Kap. 2.4.2) bräuchte ein Bildverarbeitungsprogramm diese Messwerte nur den Pixeln des Gesamtbildes zuzuordnen, wobei die Teilbilder sich nicht überlappen oder gegeneinander versetzt sind, wie dies in Abb. 2.4.5 (A) gezeigt ist.

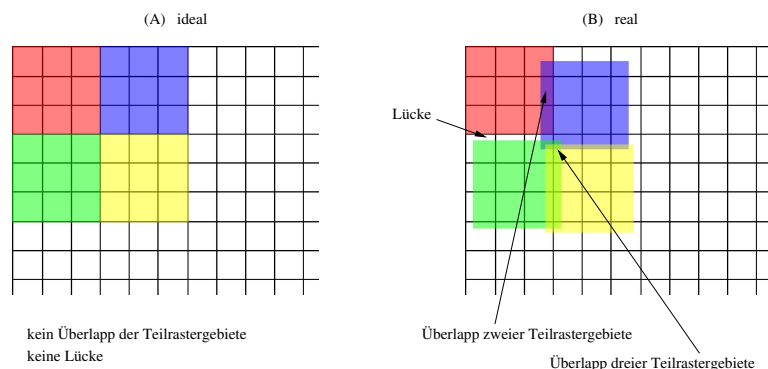


Abbildung 2.4.5: Gegenüberstellung eines idealen Rastergitters (A) und eines realen Rastergitters (B). Beim realen Rastergitter sind die einzelnen gleichmäßigen Gitter der Teilrastrergebiete gegeneinander verschoben und überlagern sich teilweise.

In der Praxis wird sich der Strahlteiler allerdings nicht so perfekt justieren lassen wie in Abb. 2.4.5 (A). Stattdessen haben die einzelnen Strahlen gegenüber ihrer idealen Position einen Versatz (Abb. 2.4.5 (B)). Auch eine eventuelle Verzerrung des vorgegebenen gleichmäßigen idealen Rasters durch die Rastereinheit muss mit einbezogen werden. Diese Verzerrung bedingt eine Kalibrierung und Korrekturrechnung der aufgenommenen Daten/Rasterpositionen. Dies führt letztendlich dazu, dass der Überlapp der Teilbilder, der für die verschiedenen Strahlen in der Regel noch unterschiedlich sein wird, mittels eines Triangulationsverfahrens aufwendig korrigiert werden muss. Die mit der Triangulation berechneten zweidimensionalen Bilder lassen sich anschließend weiter zu einer dreidimensionalen Volumendarstellung verarbeiten. Die Triangulation kann aber auch zu Problemen führen, die im nächsten Abschnitt kurz diskutiert werden.

Probleme der Bildverarbeitung:

Die hier beschriebenen Probleme bei der Bildverarbeitung treten hauptsächlich beim Probenrasterverfahren und beim descanned Modus des Strahlrasterverfahrens auf in Bezug auf die Bildrekonstruktion mittels Triangulation.

Aber schon bei der Datenaufnahme verlangen diese Punktrasterverfahren Detektoren mit hoher Geschwindigkeit, um eine hohe Bildrate der Gesamtbilder zu ermöglichen. Die Belichtungszeit/Integrationszeit für jede Rasterposition liegt bei wenigen Mikrosekunden pro Pixel. Dies macht für die Ansteuerung der Detektoren eine aufwendige Hochfrequenzelektronik erforderlich.

Arbeitet man bei diesen Verfahren mit einer CCD-Kamera, so entsteht eine große Datenmenge aufgrund der viele Pixel ohne Information. Durch die aktuelle Computer- und CCD-Kameratechnik ist dieses Problem aber deutlich relativiert worden.

Prinzipiell ist der Bildverarbeitung der beiden genannten Verfahren relativ einfach, durch die notwendige Anwendung der Korrekturrechnung können aber neue Schwierigkeiten auftreten, die die Erzeugung der Bilder oder die Qualität der Bilder negativ beeinflussen. Die zuvor erwähnte Triangulation ist rechenintensiv, so dass eine Echtzeitbeobachtung verhindert wird. Zudem können sich hierbei Bildartefakte herausbilden, die die Bildqualität deutlich mindern. In einem früheren Experiment [45] hatten die Strahlpositionen nur jeweils einen kleinen Versatz gegeneinander, aber dadurch entstanden im berechneten Bild durch die Triangulation Streifen, die die Qualität des berechneten Bildes deutlich verschlechterten, wie in Abb. 2.4.6 zu sehen ist. Diese Artefakte lassen sich aber durch eine gute Justierung des Strahlteilers bezüglich des Versatzes und der einzelnen Strahlintensitäten verringern.

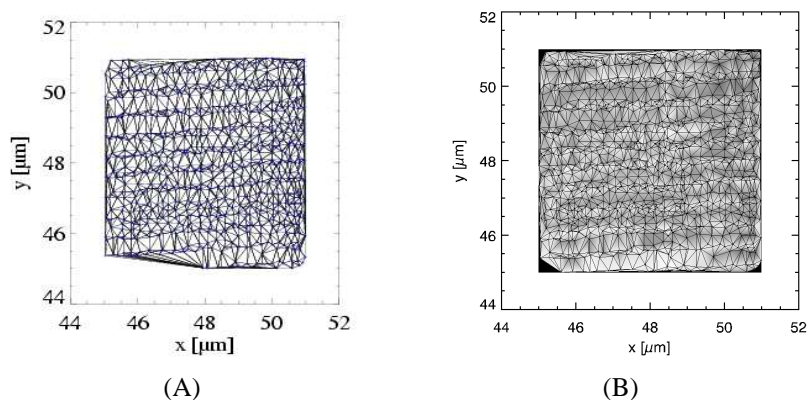


Abbildung 2.4.6: Triangulation real aufgenommener Rasterpunkte. (A) zeigt die Messpositionen und die Triangulationsgitter, (B) zeigt das Bild (A) zusammen mit der Überlagerung des berechneten, triangulierten Bildes. In dem berechneten Bild (B) sind die Streifen (Intensitätsunterschiede) als Rechenartefakt zu erkennen, obwohl sich eine eher gleichmäßige Fläche (Intensität) hätte ergeben sollen.

Auch beim non-descanned Modus des Strahlrasterverfahrens können Probleme auftreten. Diese betreffen aber die Auflösung in den aufgenommenen Bildern. Dieses Problem ist schon in Kap. 2.3.1 „Vorteile und Nachteile der Rasterverfahren“ diskutiert worden.

Fasst man die Kapitel 2.3 und 2.4 zusammen, so hat der non-descanned Modus des Strahlrasterverfahrens in Bezug auf den Aufbau mit dem Strahlengang, die Aufnahmegeschwindigkeit und die einfache Bildverarbeitung deutliche Vorteile gegenüber den anderen beiden Verfahren (Probenrasterverfahren und descanned Modus des Strahlrasterverfahrens). Für die meistens Anwendungen werden diese Vorteile am wichtigsten sein, wobei es auch sicherlich Anwendungen gibt, für die die Auflösung der wichtigste Aspekt des Mikroskopaufbaus ist. Für solche Auflösungs-orientierte Anwendungen wird eines der beiden anderen Verfahren den Vorzug gegenüber dem non-descanned Modus des Strahlrasterverfahrens bekommen.

2.5 Theorie der Auflösung

In diesem Kapitel soll gezeigt werden, wie man von der Beugungstheorie des Lichtes zu den Formeln für die erreichbare Auflösung eines Mikroskopes gelangt.

Grundlage für die Bestimmung der Auflösung eines optischen Systems ist die Bildentstehungstheorie von ERNST ABBE. Die Ergebnisse für die Bestimmung der Auflösung lassen sich aber auch mit der einfacheren Darstellung der FRAUNHOFERSchen Beugungstheorie herleiten. Für die Bestimmung der Auflösung in lateraler und axialer Richtung muss in beiden Fällen noch das RAYLEIGH-Kriterium für die Auflösung hinzugenommen werden.

Die nachfolgende Darstellung fasst die Ausführungen aus KLEIN & FURTAK [31] und BORN & WOLF [46] zusammen.

2.5.1 Erreichbare laterale Auflösung

Ausgangspunkt für die Herleitung der lateralen Auflösung sind die Überlegungen der FRAUNHOFERSchen Beugungstheorie.

Hierbei wird die Ausbreitung des elektrischen Feldes von einer Punktquelle durch eine Öffnung in einer Blende bis zu einem Beobachtungspunkt untersucht. Die folgende Abb. 2.5.1 skizziert die Geometrie für die Beugungstheorie mit den für die nachfolgenden Rechnungen notwendigen Bezeichnungen.

Vom Quellpunkt $P(x, y)$ geht eine Kugelwelle aus, die am Punkt $\tilde{P}(\tilde{x}, \tilde{y})$ die Öffnung der Blende trifft und dort ein elektrisches Feld besitzt gemäß der Gleichung:

$$\tilde{E} = \frac{A}{R} e^{i(\omega t - kR)}$$

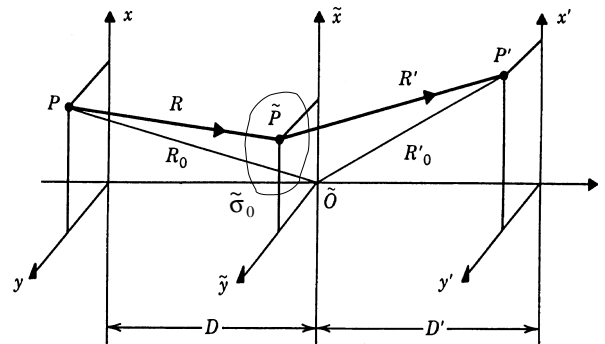


Abbildung 2.5.1: Die Standardgeometrie der Beugungstheorie mit Bezeichnung der notwendigen Elemente der Rechnung nach KLEIN & FURTAK [31]: $P(x, y)$ ist der Quellpunkt; $\tilde{P}(\tilde{x}, \tilde{y})$ ist ein Punkt in der BlendenEbene, wobei die Blende durch die offene Fläche $\tilde{\sigma}_0$ gegeben ist; $P'(x', y')$ ist der Beobachtungspunkt. Der Koordinatenursprung liegt im Punkt \tilde{O} . Die Abstände D, D' zwischen den drei Ebenen sind real deutlich größer, da die Darstellung hier in z -Richtung gestaucht ist.

Wird die Öffnung in der Blende als punktförmig idealisiert, so wird die Öffnung zum Ausgangspunkt einer Sekundärwelle im HUYGENSSchen Sinne. Für die am Beobachtungspunkt $P'(x', y')$ ankommende Welle lässt sich das elektrische Feld \vec{E} der Sekundärwelle in Abhängigkeit von der ursprünglichen Kugelwelle berechnen.

Eine endlich große Öffnung kann als Summe unendlich vieler infinitesimaler Öffnungen angesehen werden. Am Beobachtungspunkt überlagern sich alle Sekundärwellen zum resultierenden Feld und somit ergibt sich in einem allgemeinen Ansatz das Beugungsintegral zu:

$$E' = C \iint_{\sigma_0} \tilde{\tau} \tilde{E} \frac{1}{R'} e^{-ikR'} d\sigma \quad (2.5.1)$$

Hier ist, wie in Abb. 2.5.1 teilweise auch zu sehen, E' das elektrische Feld am Beobachtungspunkt P' , \tilde{E} das elektrische Feld in der Blendenöffnung, σ_0 die Fläche der Blendenöffnung, R' der Abstand zwischen Blendenöffnung und Beobachtungspunkt P' und C ergibt sich durch die exaktere Rechnung des hier jetzt nicht diskutierten FRESNEL-Formalismus zu $C = i/2$. Dazu kommt die Transmissionsfunktion $\tilde{\tau}(\tilde{x}, \tilde{y})$, mit der eine unterschiedliche Amplitudentransmission innerhalb der Öffnung beschrieben wird, aber verallgemeinert auch die Lage der Öffnung in der BlendenEbene angegeben werden kann.

Die beiden Radien R und R' lassen sich mit Hilfe des Satzes des PYTHAGORAS durch die Koordinaten der Quellen- und Blendenebene bzw. der Blenden- und Beobachtungsebene ausdrücken. Die FRAUNHOFERSche Beugungstheorie führt nun durch eine Reihenentwicklung um die Abstände R_0 bzw. R'_0 eine lineare Näherung ein:

$$R \simeq R_0 - \left(\frac{x}{R_0}\right)\tilde{x} - \left(\frac{y}{R_0}\right)\tilde{y} \quad \text{bzw.} \quad R' \simeq R'_0 - \left(\frac{x'}{R'_0}\right)\tilde{x} - \left(\frac{y'}{R'_0}\right)\tilde{y} \quad (2.5.2)$$

Diese Näherung ist nur für den Fall des Fernfeldes gültig, wenn R_0 groß und die Blendenöffnung (also (\tilde{x}, \tilde{y})) klein ist, oder mathematisch ausgedrückt, wenn gilt:

$$|\tilde{x}| \ll \sqrt{R_0\lambda} \quad \text{und} \quad |\tilde{y}| \ll \sqrt{R_0\lambda} \quad (2.5.3)$$

Die weitere Rechnung beinhaltet eine Koordinatentransformation, die die ursprünglichen Koordinaten von P und P' sowie die Wellenlänge λ kombiniert in (u, v) ausdrückt. Mit einer weiteren Näherung führt dies zu dem Ergebnis:

$$\begin{aligned} E'(u, v) &= \frac{i}{2} A e^{i\phi_0} \frac{1}{R_0 R'_0} \cdot \iint_{-\infty}^{+\infty} \tilde{\tau}(\tilde{x}, \tilde{y}) e^{-i2\pi(u\tilde{x} + v\tilde{y})} d\tilde{x} d\tilde{y} \quad (2.5.4) \\ &= \frac{i}{2} A e^{i\phi_0} \frac{1}{R_0 R'_0} \cdot T(u, v) \end{aligned}$$

$$\text{wobei: } T(u, v) \equiv \iint_{-\infty}^{+\infty} \tilde{\tau}(\tilde{x}, \tilde{y}) e^{-i2\pi(u\tilde{x} + v\tilde{y})} d\tilde{x} d\tilde{y} \quad (2.5.5)$$

Diese Gleichung beinhaltet in der Gleichheit von $T(u, v)$ mit dem Doppelintegral über $\tilde{\tau}(\tilde{x}, \tilde{y})$ das wichtige Ergebnis, dass die elektrische Feldverteilung E' am Beobachtungspunkt P' im Falle der FRAUNHOFER-Beugung proportional zur Fouriertransformierten $T(u, v)$ der Transmissionsfunktion $\tilde{\tau}(\tilde{x}, \tilde{y})$ ist, also $T = \mathcal{F}(\tilde{\tau})$.

Dieses Ergebnis erlaubt es nun, die elektrische Feldverteilung und somit auch die Intensitätsverteilung in der Brennebene des Mikroskopobjektives zu berechnen, wenn eine Punktlichtquelle durch dieses Objektiv bzw. eine Linse abgebildet wird. Denn zum einen stellt die Objektivlinse eine kreisförmige Öffnung in der zuvor genannten Blendenebene dar, zum anderen lässt sich zeigen, dass eine Linse bewirkt, dass die quasi-parallelen Strahlen, die nach der FRAUNHOFER-Bedingung erst in sehr großen Abständen R'_0 am Beobachtungspunkt P' zusammenlaufen, schon in der endlichen Entfernung der Brennweite f der Linse zusammengeführt werden (vgl. Abb. 2.5.2). Auch mathematisch lässt sich zeigen, dass

mit der Linse das gleiche Beugungsmuster wie ohne Linse entsteht. Der Durchmesser der beugenden Öffnung, der in die Rechnung eingeht, wird dabei dann auch durch die Größe der Linse mitbestimmt, falls keine kleineren Blenden beteiligt sind.

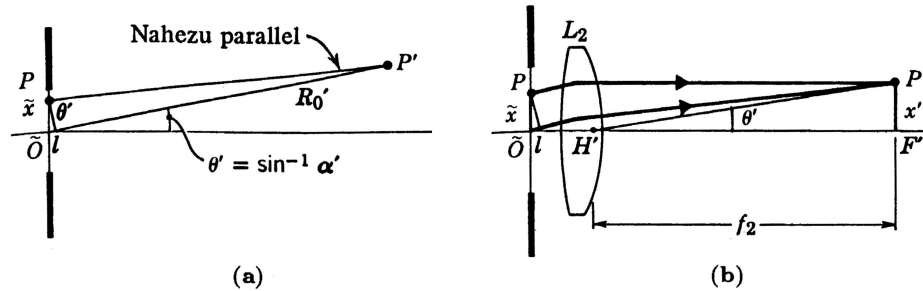


Abbildung 2.5.2: FRAUNHOFER-Beugung (a) ohne und (b) mit Linse nach KLEIN & FURTAK [31]. Mit Hilfe der Linse wird das eigentlich in sehr großer Entfernung von der beugenden Öffnung entstehende FRAUNHOFERSche Beugungsmuster in die Brennebene der Linse gebracht, die sich im kleineren Abstand der Brennweite f_2 hinter der beugenden Öffnung befindet.

Drückt man die Fouriertransformierte $T(u, v)$ und ihre verallgemeinerten Koordinaten (u, v) durch Polarkoordinaten $(\rho, \tilde{\phi})$ aus, und nimmt man an, dass die Punktlichtquelle auf der optischen Achse liegt, so wird die Fouriertransformation Gl. (2.5.5) zu:

$$T(\rho, \tilde{\phi}) = \int_0^{\tilde{r}_0} \tilde{r} \int_0^{2\pi} e^{-i2\pi\rho\tilde{r}\cos(\tilde{\phi}-\phi')} d\tilde{\phi} d\tilde{r} \quad (2.5.6)$$

Dieses Integral lässt sich mit der BESSEL-Funktion nullter Ordnung J_0 lösen:

$$T(\rho) = 2\pi\tilde{r}_0^2 \frac{J_1(2\pi\tilde{r}_0\rho)}{2\pi\tilde{r}_0\rho} \quad (2.5.7)$$

dabei ist J_1 die BESSEL-Funktion erster Ordnung und ρ reduziert sich für die oben genannten Bedingungen auf $\rho = r'/(\lambda R'_0)$, und beinhaltet neben den bekannten Größen λ und R'_0 noch den radialen Abstand r' des Beobachtungspunktes von der optischen Achse.

Den qualitativen Verlauf der $T(\rho)$ -Funktion zeigt der Graph zu $2J_1(\omega)/\omega$, die quadrierte Darstellung $[2J_1(\omega)/\omega]^2$ spiegelt somit den qualitativen Intensitätsverlauf des Beugungsmusters in der Brennebene der Linse wieder. Beide Graphen sind in Abb. 2.5.3 gezeigt, zusammen mit einem qualitativen zweidimensionalen Bild der Intensitätsverteilung J_1^2 in der Brennebene. Das zentrale Maximum des zwei-dimensionalen Intensitätsverlaufes wird AIRY-Scheibchen genannt.

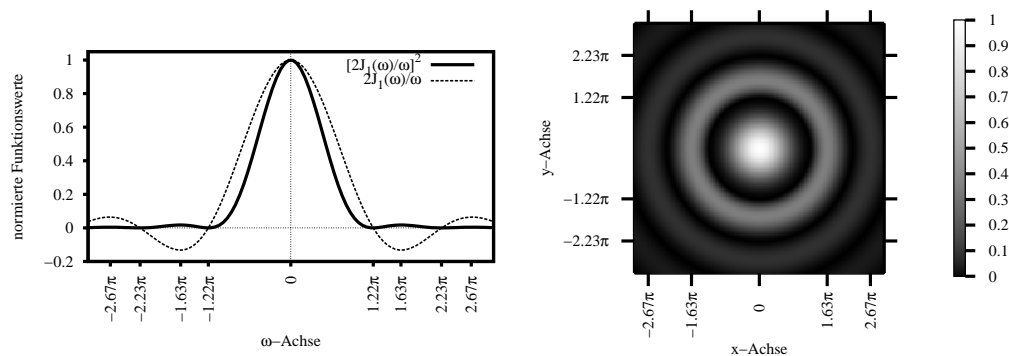


Abbildung 2.5.3: Die BESSEL-Funktionen J_1 und J_1^2 und das AIRY-Scheibchen: Im linken Bild ist der qualitative Verlauf der BESSEL-Funktionen $2J_1(\omega)/\omega$ und $[2J_1(\omega)/\omega]^2$ dargestellt, im rechten Bild ist der zwei-dimensionale Verlauf der quadrierten BESSEL-Funktion J_1^2 gezeigt, der als AIRY-Scheibchen bezeichnet wird. Die Markierungen der x-Achse geben die Positionen der Maxima wieder, die Markierungen der y-Achse dementsprechen die Positionen der Minima. Zudem sind die Funktionswerte außerhalb des ersten Minimums um den Faktor 20 vergrößert, um die Ringe besser sichtbar zu machen.

Der Radius des AIRY-Scheibchens lässt sich berechnen zu:

$$r'_{\text{Airy}} = 0.61\lambda \frac{R'_0}{\tilde{r}_0} = 0.61 \frac{\eta \lambda_0}{N.A. \text{Obj.}} \quad (2.5.8)$$

Für den Ausdruck nach dem zweiten Gleichheitszeichen wurden die Beziehungen $\tilde{r}_0/R'_0 = \sin \theta$ und $N.A. \text{Obj.} = \eta \sin \theta$ benutzt, die zum einen ausdrücken, dass die Blende unter dem halben Öffnungswinkel θ vom Bildpunkt aus gesehen erscheint und zum anderen enthält die Definition der Numerischen Apertur $N.A. \text{Obj.}$, die Aussage, dass die Punktlichtquelle – bei einem Mikroskope die Probe – in einem Medium mit dem Brechungsindex η liegt, während das Bild im Medium Luft mit $\eta = 1$ liegt.

Die zuvor beschriebene Betrachtung hat gezeigt, dass eine Punktlichtquelle durch eine kreisförmige Blende in ein AIRY-Scheibchen statt in einen Punkt abgebildet wird. In einer allgemeineren Formulierung wird einem optischen System, das idealerweise keine Bildfehler aufweist, die Punktantwortfunktion (PSF) zugewiesen, die beschreibt, wie eine Punktlichtquelle durch das optische System in ein beugungsbegrenztes Bild (das AIRY-Scheibchen) abgebildet wird.

Es stellt sich die Frage, welchen minimalen Abstand zwei Punktlichtquellen haben dürfen, damit ihre Bilder, also die beiden AIRY-Scheibchen, noch als getrennt, d. h. aufgelöst, wahrgenommen werden.

Die Lösung ist das RAYLEIGH-Kriterium, nach dem die beiden AIRY-Scheibchen noch als getrennt gelten, wenn bei den Intensitätsverläufen das Maximum des zweiten Scheibchens in das erste Minimum des ersten Scheibchens fällt. Neben dieser Definition eines Auflösungskriteriums gibt es noch Halbwertsbreiten-Kriterium oder auch das SPARROW-Kriterium. Diese Definitionen führen zu anderen Vorfaktoren (Halbwertsbreiten-Kriterium: 0.51 statt 0.61, SPARROW-Kriterium: 0.48 statt 0.61), aber der grundlegende Zusammenhang der Größen ist der gleiche [42]. Die überlagerten Intensitätsprofile beim RAYLEIGH-Kriterium zeigt die folgende Abb. 2.5.4.

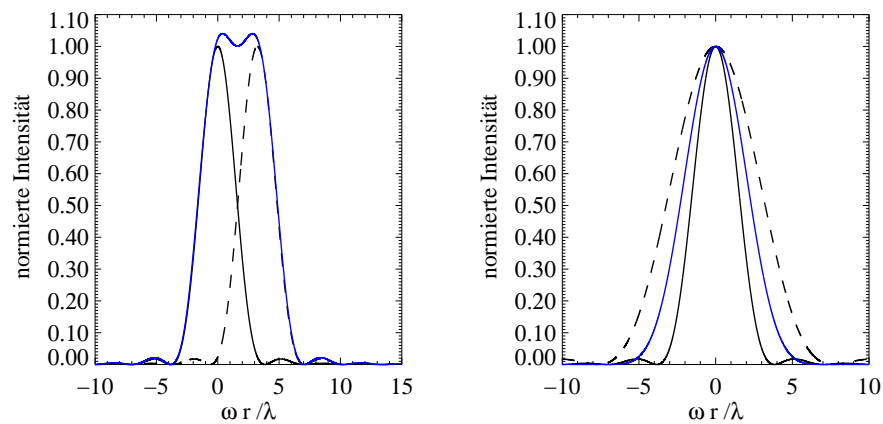


Abbildung 2.5.4: Intensitätsverläufe von AIRY-Scheibchen: Das linke Bild zeigt die Intensitätsverläufe (Profile durch die AIRY-Scheibchen) zweier noch auflösbarer Punktlichtquellen und das Summenprofil (blaue Kurve), das rechte Bild zeigt die Intensitätsprofile der AIRY-Scheibchen mit ihren unterschiedlichen FWHM bei einem CLSM (schwarze Kurve), einem CLSM mit doppelter Wellenlänge, die auch ein TPLSM verwendet (gestrichelte Kurve) und einem TPLSM.

Führt man die zuvor beschriebenen Überlegungen weiter, so findet man für die laterale Auflösung Δx und die axiale Auflösung Δz folgende Beziehungen (vgl. dazu auch J.B. PAWLEY (ED.) [40, Kap. 1]):

$$\Delta x = 0.51 \frac{\lambda_0}{N.A. Obj.} \quad (2.5.9)$$

$$\Delta z = 2\eta \frac{\lambda_0}{(N.A. Obj.)^2} \quad (2.5.10)$$

Die zuvor genannten Gleichungen gelten für Ein-Photonen-LSMs, so dass mit den typischen Werten von $\lambda_0 = 400 \text{ nm}$, $\eta = 1.33$ als Brechungsindex (von Wasser) innerhalb der zu untersuchenden Präparate und $N.A. Obj. = 1.2$ für die numerische Apertur eines Öl-Immersion-Objektives eine theoretischen Auflösung von $\Delta x \approx 0.15 \text{ }\mu\text{m}$ erreicht werden kann. Praktisch wird eine Auflösung von typischerweise $\Delta x \approx 0.3 \text{ }\mu\text{m}$ erreicht.

Laut [40, Kap. 28] ist die bei einem TPLSM erreichte Auflösung fast identisch mit der Auflösung eines CLSM, denn hier wirken sich die nicht-linearen Effekte der Zwei-Photonen-Anregung auch auf die Auflösung aus. Nach den obigen Gleichungen (2.5.9) und (2.5.10) wäre bei der TPLSM aufgrund der verwendeten doppelten Wellenlänge (im Vergleich zum CLSM) eine halb so gute Auflösung zu erwarten, aber es muss beachtet werden, dass bei Zwei-Photonen-Prozessen die PSF quadriert in die Rechnung einbezogen werden muss [41]. Dies verbessert die Auflösung in einem TPLSM von einem doppelten auf einen etwa 1.5-fachen Wert im Vergleich zu einem CLSM. Das Halbwertsbreitenkriterium lautet für ein TPLSM (vgl. mit Gl. (2.5.9) für die beiden Anregungswellenlängen):

$$\Delta x = \frac{0.37\lambda_0}{N.A. Obj.} \quad (2.5.11)$$

In einer exakteren Betrachtung gelangen W.R. ZIPFEL *et al.* [47] bis auf kleine Korrekturen zu dem gleichen Ergebnis.

Im rechten Bild der Abb. 2.5.4 ist dieser Auflösungsunterschied anhand der Intensitätsverläufe der AIRY-Scheibchen zu sehen: die durchgezogene Linie entspricht dem AIRY-Scheibchen im CLSM (Ein-Photonen-Anregung), die gestrichelte Linie entspricht einer Ein-Photonen-Anregung mit doppelter Wellenlänge, während die blaue Linie ein AIRY-Scheibchen im TPLSM (Zwei-Photonen-Anregung mit doppelter Wellenlänge) zeigt.

Der in diesem Abschnitt dargelegte Formalismus lässt sich zur FRESNEL-Beugungstheorie erweitern, die statt der linearen Näherung Gl. (2.5.2) für R und R'

eine quadratische Näherung verwendet und so auch für kleinere Abstände als in der FRAUNHOFER-Bedingung Gl. (2.5.3) gültig wird. Im Rahmen dieses FRESNEL-Formalismus lässt sich auch die Wirkung einer Linse exakter beschreiben, es werden auch die fokussierenden und phasenwirksamen Eigenschaften der Linse in die Transmissionsfunktion mit einbezogen. Auch der FRESNEL-Formalismus führt bei Abbildung einer Punktlichtquelle qualitativ zum AIRY-Scheibchen als Intensitätsverteilung in der Bildebene.

2.5.2 Erreichbare axiale Auflösung

Die Darstellung im vorigen Abschnitt hat die Ausbreitung des elektrischen Feldes betrachtet, wenn das Feld einer Punktlichtquelle unter der FRAUNHOFER-Bedingung durch eine Linse abgebildet wird. Das Ergebnis ist die Intensitätsverteilung in der Brennebene der Linse, die letztendlich zur Beschreibung des lateralen Auflösungsvermögens des abbildenden optischen Systems verwendet werden kann.

In diesem Abschnitt wird gezeigt, wie die elektrische Feldverteilung im gesamten Fokusbereich berechnet werden kann. Diese Erweiterung der Ergebnisse des vorigen Abschnittes 2.5.1, die nur auf die Brennebene beschränkt waren, erlaubt zusammen mit der Anwendung des RAYLEIGH-Kriteriums die Beschreibung der axialen Auflösung eines optischen Systems.

Die Darstellung zur axialen Auflösung in diesem Abschnitt basiert auf den Ideen der FRAUNHOFER- bzw. FRESNEL-Beugung des vorigen Abschnittes 2.5.1. Betrachtet man Abb. 2.5.2, so ist verständlich, dass in beiden Fällen eine Kugelwelle auf den Bildpunkt P' zusammenläuft. Die Entstehung dieser Kugelwelle erklärt sich durch die exakte Rechnung der FRESNEL-Beugung an einer Linse.

Diese Kugelwelle ist der Ausgangspunkt für die Darstellung in BORN & WOLF [46, Kap. 8.8], welche hier zusammengefasst vorgestellt wird.

Vorausgesetzt wird eine Geometrie, die in Abb. 2.5.5 skizziert ist. Die erwähnte Kugelwelle tritt durch die zirkuläre Apertur mit dem Durchmesser $2a$ hindurch und läuft im Fokus im Abstand der Brennweite f zusammen. Der Fokus bildet den Koordinatenursprung O . Ein Punkt P' im Fokusbereich wird durch die Koordinaten (x, y, z) bzw. durch den Ortsvektor \vec{R} beschrieben. Ein Punkt Q auf der Wellenfront W in der Aperturöffnung wird durch die Koordinaten (ξ, η, ζ) beschrieben. Es wird weiter vorausgesetzt, dass die Länge von \vec{R} sowie der Radius a der Apertur klein sind verglichen mit der Brennweite f , die auch dem Radius der zusammenlaufenden Wellenfront der Kugelwelle entspricht. Außerdem ist der Aperturradius viel größer als die Wellenlänge, $a \gg \lambda$.

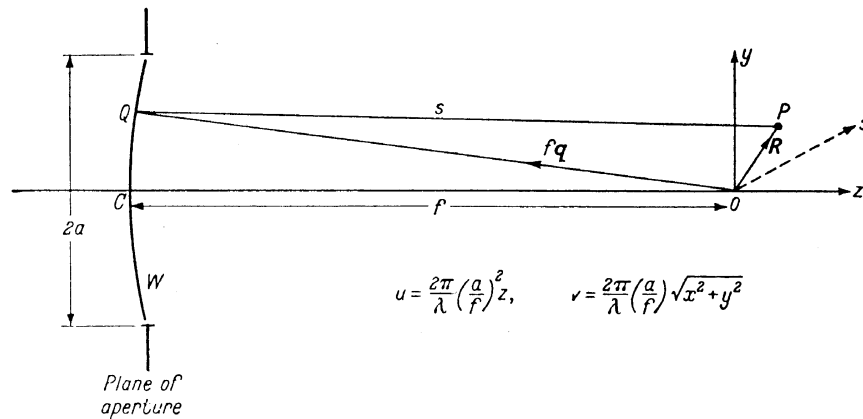


Abbildung 2.5.5: Geometrie für die Berechnung der elektrischen Feldverteilung im Bereich des Fokus bei der Beugung einer zusammenlaufenden sphärischen Welle an einer zirkularen Apertur, aus BORN & WOLF [46]. Der Koordinatenursprung liegt in O im Fokus.

Die zum Fokus hin zusammenlaufende Kugelwelle wird nach dem HUYGENS-FRESNEL-Prinzip beschrieben durch:

$$E'(P') = -\frac{i}{\lambda} \frac{Ae^{-ikf}}{f} \iint_{\sigma_0} \frac{e^{iks}}{s} dS \quad (2.5.12)$$

Dabei ist dS ein Element der Wellenfront W , die durch die Linse bzw. die Blendenöffnung σ_0 mit dem Radius a hindurch propagiert.

Diese Gleichung lässt sich mit der Näherung $s - f = -\vec{q} \cdot \vec{R}$ und der Beziehung $dS = f^2 d\Omega$ in das sogenannte DEBYE-Integral umschreiben. Mit der Einführung von Zylinderkoordinaten für P' und Q und der Definition der dimensionslosen Variablen (u, v, ϕ) , die jetzt die Position von P' beschreiben, lässt sich das DEBYE-Integral in einem Zwischenschritt zunächst in einen Realteil $\mathcal{C}(u, v)$ und einen Imaginärteil $\mathcal{S}(u, v)$ aufspalten. Die in diesen beiden Teilen auftretenden Integrale lassen sich mit Hilfe der LOMMEL-Funktionen lösen, die von E. LOMMEL schon 1885 eingeführt wurden und wiederum die BESSEL-Funktionen enthalten:

$$U_n(u, v) = \sum_{s=0}^{\infty} (-1)^s \left(\frac{u}{v}\right)^{n+2s} J_{n+2s}(v)$$

$$V_n(u, v) = \sum_{s=0}^{\infty} (-1)^s \left(\frac{v}{u}\right)^{n+2s} J_{n+2s}(v)$$

Zur einfacheren Berechnung der $\mathcal{C}(u, v)$ - bzw. $\mathcal{S}(u, v)$ -Funktionen wird noch unterschieden, ob die Variablen (u, v) im geometrischen Schatten, d. h. dem Schattbereich der geometrischen Optik, liegen ($|u/v| < 1$) oder nicht ($|u/v| > 1$).

Diese Lösungen für $\mathcal{C}(u, v)$ und $\mathcal{S}(u, v)$ beschreiben – eingesetzt in das DEBYE-Integral – das elektrische Feld in der Nähe des Fokus. zur Charakterisierung der axialen Auflösung ist der axiale Intensitätsverlauf zu betrachten. Da $I = |E(P')|^2$ ist, gilt für die Intensitätsverteilung im Fokusbereich die Gleichung:

$$I(u, v) = I_0 \cdot \left(\frac{2}{u}\right)^2 [U_1^2(u, v) + U_2^2(u, v)] \quad \text{mit:} \quad I_0 = \left(\frac{\pi a^2 |A|}{f^2 \lambda}\right)^2 \quad (2.5.13)$$

Hierbei ist I_0 die Intensität im Fokus ($u = v = 0$). Eine äquivalente Gleichung lässt sich mit den LOMMEL-Funktionen $V_n(u, v)$ ausdrücken.

Mit dieser Gleichung lässt sich das folgende Bild (Abb. 2.5.6) berechnen, dass die Intensitätsverteilung im Bereich des Fokus anhand von Isophoten, d. h. Linien gleicher Intensität, zeigt. Es ist interessant, aus den obigen Formeln die Intensitätsverteilung in der Fokusebene zu berechnen. Gl. (2.5.13) reduziert sich auf die Beziehung:

$$I(0, v) = 4I_0 \lim_{u \rightarrow 0} \left(\frac{U_1^2(u, v) + U_2^2(u, v)}{u^2} \right) = I_0 \left(\frac{2J_1(v)}{v} \right)^2 \quad (2.5.14)$$

Man sieht, dass sich gerade die Formel für ein AIRY-Scheibchen ergibt, wie sie sich schon als Ergebnis des vorigen Abschnittes 2.5.1 ergeben hat.

Die Intensitätsverteilung entlang der optischen Achse ($v = 0$) ergibt sich aus der zweiten Formulierung der Gl. (2.5.13). Mit $V_0(u, 0) = 1$ und $V_1(u, 0) = 0$ reduziert sie sich zu:

$$I(u, 0) = \frac{4}{u^2} I_0 (2 - 2 \cos(u/2)) = I_0 \left(\frac{\sin(u/4)}{u/4} \right)^2 \quad (2.5.15)$$

Der Verlauf von Gl. (2.5.15) ist in Abb. 2.5.7 dargestellt. Die erste Nullstelle dieses axialen Intensitätsverlaufes liegt bei $z = \pm 2f^2 \lambda' / a^2$ (Koordinatenursprung im Fokus, λ' = Wellenlänge im Medium des Objektes).

Nimmt man die Beziehungen $a/f = \sin \theta$, $N.A._{Obj.} = \eta \sin \theta$ und $\lambda' = \lambda_0 / \eta$ zu Hilfe, so kann man für die Auflösung schreiben:

$$\Delta z = 2\eta \frac{\lambda_0}{N.A._{Obj.}^2} \quad (2.5.16)$$

Diese Gleichung spiegelt das RAYLEIGH-Kriterium wieder, bei dem das Maximum eines zweiten Fokus gerade mit der ersten Minimum des ersten Fokus zusammenfällt.

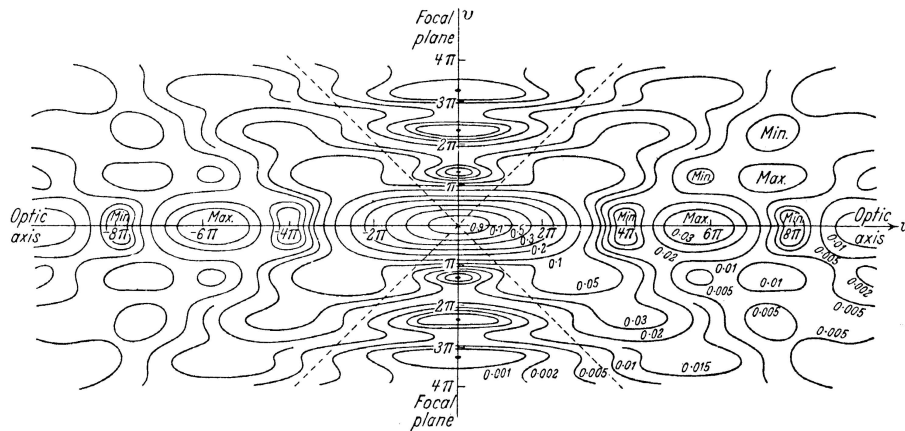


Abbildung 2.5.6: normierte Intensitätsverteilung im Fokusbereich für eine konvergierende sphärische Welle, aus BORN & WOLF [46]: Dargestellt sind die Isoptoten (Konturlinien gleicher Intensität) in einer meridionalen Ebene, die die optische Achse enthält und die Fokusebene schneidet. Die gestrichelten Linien kennzeichnen die Grenzen des geometrischen Schattens. Wird die Abbildung um die optische Achse rotiert, so entsteht die dreidimensionale Intensitätsverteilung im Fokusbereich, die in der Fokusebene das AIRY-Scheibchen mit den umgebenden dunklen Ringen (hier die Minima entlang der v -Achse) wiedergibt.

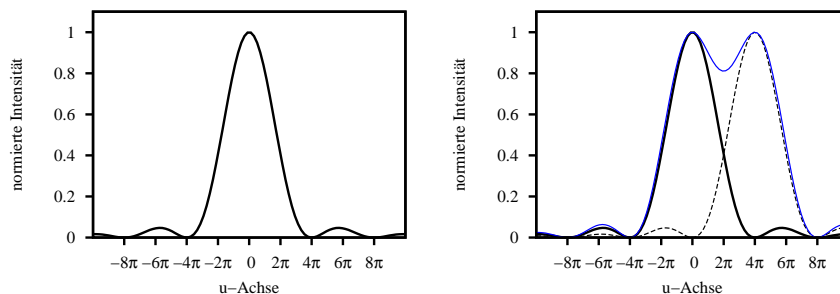


Abbildung 2.5.7: normierter Intensitätsverlauf $((\sin x)/x)^2$ entlang der Optischen Achse und Anwendung des RAYLEIGH-Kriteriums zur Auflösungsbestimmung: Links: Der Intensitätsverlauf entlang der Optischen Achse gemäß Gl. (2.5.15), die x -Achse korrespondiert mit der u -Achse in Abb. 2.5.6 zur besseren Vergleichbarkeit. Rechts: Zwei axiale Intensitätsverläufe und deren Überlagerung. Das Maximum des zweiten Profils fällt in das Minimum des ersten Profils, so dass diese beiden Foki nach dem RAYLEIGH-Kriterium noch als zwei auflösbare Foki gelten.

2.6 GFP – ein natürlicher Farbstoff

In den Messungen, die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführt wurden, wurden verschiedene Fluoreszenzfarbstoffe benutzt. Einer von diesen ist der natürliche Farbstoff GFP, der in diesem Abschnitt etwas genauer beschrieben werden soll.

GFP ist die Abkürzung für grün fluoreszierendes Protein. Dieses Protein ist ein natürlich vorkommendes fluoreszierendes Molekül, das für molekularbiologische Anwendungen sehr interessante Eigenschaften hat.

Das GFP wurde in der Quallenart *Aequorea victoria* entdeckt und erstmals 1962 von O. SHIMOMURA *et al.* [48] als Begleitprotein des ebenfalls fluoreszierenden Proteins Aequorin beschrieben. Diese Gruppe berichtete für GFP erste spektrale Eigenschaften: eine Emissionswellenlänge von 508 nm und eine Anregungswellenlänge im Bereich 470 nm – 475 nm.

Der Beginn des wissenschaftlichen Interesses an GFP war verbunden mit der ersten Klonierung des natürlichen GFPs durch D.C. PRASHER *et al.* [49], denn es konnte gezeigt werden, dass GFP, das in andere Organismen hineinkloniert wurde, in diesen Organismen ebenfalls fluoresziert. Dies bedeutet, dass die Gensequenz des GFP alle Informationen enthält, um das fluoreszierende Protein vollständig zu bilden. Es ist also keine weitere Modifikation des Proteins z. B. durch Enzyme notwendig, um das Protein vollständig funktionsfähig zu machen. Solche eventuell zellspezifischen Prozessierungsschritte wären ein Nachteil, denn z. B. könnten sich Enzyme aus dem Quellorganismus (den Zellen der Quallen), wenn sie hypothetisch zur Bildung des GFP notwendig wären, negativ auf die Zellen des Zielorganismus auswirken. Zudem ist jeder zusätzliche Prozessierungsschritt eine mögliche Fehlerquelle, die das Ausbilden des fluoreszierenden Proteins im Zielorganismus verhindern kann, wenn der Schritt nicht ausgeführt wird. Das Anfärben der Probe wäre dann misslungen.

Die Struktur des GFP wurde durch Kristallstruktur- und Beugungsmusteranalyse erst 1996 unabhängig durch M. ORMÖ *et al.* [50] und F. YANG *et al.* [51] aufgelöst. GFP besteht aus 238 Aminosäuren, aus denen sich elf β -Faltblätter und eine α -Helix ergeben. Die β -Faltblätter bilden einen Zylinder, der die α -Helix umschließt, die entlang der Zylinderachse verläuft. Der Zylinder hat einen Durchmesser von etwa 3 nm und eine Höhe von etwa 4 nm. Die chromophore Gruppe ist an die α -Helix angelagert und besteht aus den Aminosäuren Serin, Tyrosin und Glycin, deren Seitenketten miteinander reagieren und die fluoreszierende chromophore Gruppe bilden. Abb. 2.6.1 zeigt die Zylinderstruktur des GFP.

Wie man in Abb. 2.6.1 erkennen kann, liegt die chromophore Gruppe nahezu perfekt in der Mitte des Zylinders. Dadurch ist die chromophore Gruppe vor äußere-

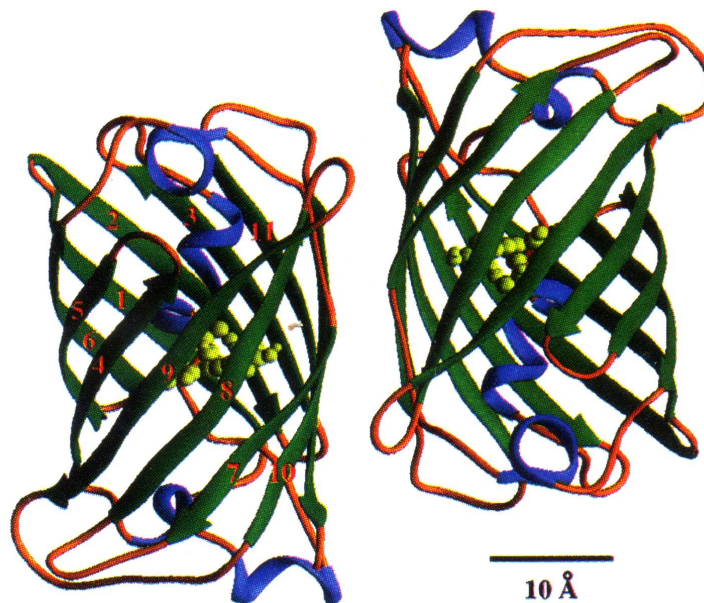


Abbildung 2.6.1: Zwei zueinander gedrehte Gesamtansichten der Tonnenstruktur des GFP (aus F. YANG *et al.* [51]). Zu erkennen sind die elf β -Faltblätter (1 – 11 nummeriert), die die äußere zylinderförmige Struktur dieses Proteins bilden. Das zentral angeordnete Fluorophor ist von oben und unten durch α -Helizes abgedeckt, so dass es von äußeren Einflüssen geschützt ist.

ren Einflüssen, wie z. B. Enzyme, pH-Wert oder fluoreszenzlöschende Prozesse, gut geschützt. Dieser Schutz ist sogar so gut, dass das GFP durch die Behandlung mit Glutaraldehyd und Formaldehyd, wie sie zur Herstellung von histologischen Schnitten notwendig ist, nicht beeinflusst wird [52]. Auf diese Weise kann auch totes Gewebe mit Hilfe der Fluoreszenz untersucht werden.

Die Hauptanwendung von GFP ist dennoch die Untersuchung von lebendem Gewebe. Der Schutz der chromophoren Gruppe ist durch die Tonnenstruktur der β -Faltblätter unter natürlichen Bedingungen sehr gut, lediglich durch sehr hohe (11 – 12) [53,54] oder sehr niedrige pH-Werte (mit pK_a -Werten um 4.5) [55] wird das Anregungsspektrum verändert, aber bei diesen extremen pH-Werten kommt das Protein an die Grenze zur Denaturierung. Auch Temperaturen, die sich deutlich von den natürlichen Bedingungen unterscheiden ($T \geq 65$ °C), lassen das GFP denaturieren [54]. Allerdings gibt es auch Varianten des GFP, die gezielt so verändert wurden, dass der Schutz durch den Zylinder verringert wird und die chromo-

phore Gruppe stärker auf die molekulare Umgebung reagieren kann. Somit erhält man einen umgebungssensitiven Farbstoff. Durch den nicht mehr vorhandenen Schutz der chromophoren Gruppe bei diesen extremen pH-Werten verändert sich auch das Spektrum des GFP [54].

Das Spektrum von natürlich vorkommendem GFP (wtGFP⁴) ist am komplexesten. Für die Anregung hat es ein Hauptmaximum bei 395 nm – 397 nm und ein Nebenmaximum bei 470 nm – 475 nm, wobei die Anregung bei 395 nm zu einer Emission von 508 nm führt, die Anregung mit 475 nm verschiebt die Emission auf 503 nm [56]. Oft wird auch eine wtGFP-Emissionswellenlänge von 504 nm genannt. Das Anregungsspektrum, genauer das Verhältnis der beiden Maxima zueinander ist zudem konzentrationsabhängig [54], es verändert sich mit dem pH-Wert [53–55] und reagiert auf Temperaturänderungen [54]. Auch die längere Anregung mit intensivem UV-Licht verändert die Relation der Maxima zugunsten des Nebenmaximums [57–59].

Es ist interessant, dass das GFP seine Struktur autonom herausbilden kann, die Proteinfaltung kann auch in einem zellfreien *in vitro*-System stattfinden [60]. Die einzige Notwendigkeit bei der Bildung des GFP ist die Anwesenheit von Sauerstoff, der für einen Dehydrierungsschritt bei der Bildung der chromophoren Gruppe benötigt wird [56, 61, 62]. Auf das ausgebildete GFP hat Sauerstoff keinen Einfluss mehr [63]. Inwieweit der Sauerstoffgehalt die Geschwindigkeit des Dehydrierungsschrittes verändert, wurde bisher nicht untersucht [64].

Die Faltung des GFP kann effektiv stattfinden, wenn es bei Raumtemperatur oder darunter expremiert wird, bei höheren Temperaturen nimmt die Effektivität der Faltung deutlich ab [65, 66] – für die Qualle in ihrer natürlichen Umgebung stellt dies aber kein Problem dar. Für die Anwendung des GFP in biologischen Experimenten ist eine höhere Temperatur wünschenswert bis zu der die Faltung effektiv abläuft. Durch eine Dreifach-Mutation konnte eine solche GFP-Variante hergestellt werden, die dennoch die positiven Fluoreszenzeigenschaften des wtGFP besitzt [59, 67].

Mutationen der natürlichen Gensequenz werden auch verwendet, um die chromophore Gruppe zu verändern und so die spektralen Eigenschaften des Proteins zu verändern. Ohne hier auf die chemischen und biologischen Details einzugehen, lassen sich durch diese Mutationen sechs Klassen von fluoreszierenden Proteinen, die auf dem wtGFP (Klasse 1) basieren, herstellen.

Ein Überblick über die Details der Mutationen und die Eigenschaften der GFP-Varianten ist bei R. Y. TSIEN [68] dargestellt.

⁴nach der englischen Bezeichnung: wild-type GFP = wtGFP

In die Klasse 2 fällt das EGFP (enhanced green fluorescent protein), eine ebenfalls grüne Variante des GFP, die aber heller fluoresziert als das wtGFP. Die Klasse 3 stellt Varianten mit veränderten Anregungsspektren gegenüber dem wtGFP zur Verfügung. Klasse 3-GFPs fehlt das 470 nm-Anregungsmaximum. Die Mutationen der Klassen 4, 5 und 6 verändern das Emissionsspektrum der Proteine und man erhält die blau-, cyan- und gelb-fluoreszierenden Varianten des GFP, die entsprechend BFP, CFP und YFP (blue-, cyan-, yellow-fluorescent protein) genannt werden.

GFP wird hauptsächlich eingesetzt, um spezielle Proteine in einem Zielorganismus zu markieren und so beobachtbar zu machen. Dazu wird die Gensequenz des Zielproteins durch die GFP-Sequenz ergänzt und der Zielorganismus produziert Fusionsproteine, bei denen jedes Zielprotein mit genau einem GFP fusioniert, d. h. markiert ist. Ist das Fusionsprotein in der Zelle an einem Ort stark konzentriert, so reichen 300 bis 3000 GFPs aus, um einen kleinen grünen Fleck in der Zelle vor dem Autofluoreszenz-Hintergrund der unmarkierten Zellbereiche zu sehen [69]. Dieser Aspekt, dass relativ wenige Fluoreszenzmoleküle durch starke lokale Konzentration einen hohen Kontrast gegenüber dem Zellhintergrund erzeugen und somit gut beobachtbar werden, wird bestätigt durch die erfolgreichen Messungen von GFP-markierten Vesikeln in lebenden Wurzelzellen, die in Kap. 4.4 beschrieben werden. GFP hat zudem die positive Eigenschaft, dass es in sehr vielen interessanten Fällen die Funktionalität des Zielproteins nicht negativ beeinträchtigt. Somit kann auch die Funktion eines Zielproteins in einem Organismus durch Fluoreszenzmarkierung untersucht werden. Eine Übersicht über die Anwendungsmöglichkeiten findet sich ebenfalls bei R. Y. TSIEN [68, und Referenzen].

Es konnte auch gezeigt werden (wie auch R. Y. TSIEN [68, und Referenzen] wiedergibt), dass das GFP und seine Varianten sich auch mit Hilfe des Zwei-Photonen-Prozesses zur Fluoreszenz anregen lassen und dass die Varianten des wtGFP auch für Experimente benutzt werden können, die den resonanten Energietransfer nach FÖRSTER ausnutzen. Das Potential des Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfers (FRET) war auch eine Motivation zur Entwicklung der spektral veränderten Mutationen des GFP.

FRET kann beispielsweise für kalziumsensitive Messungen verwendet werden: zwei FRET-fähige GFP-Varianten (z. B. CFP und YFP) sind über ein Calmodulin-Molekül (CaM) miteinander verbunden. In einer kalziumfreien Umgebung ist das Calmodulin-Molekül gestreckt. Deshalb ist das CFP vom YFP so weit entfernt ist, dass ein Energieübertrag nicht stattfinden kann. Eine Anregung des CFP führt zu einer Emission des CFP. Bindet Ca^{2+} an das CaM, so ändert

es seine Konformation und winkelt sich ab. Der Abstand zwischen CFP und YFP nimmt deutlich ab und es kann ein Energieübertrag stattfinden. Man beobachtet die YFP-Emission, obwohl weiterhin das CFP angeregt wird. Somit weist die spektrale Änderung durch den FRET eine Veränderung des Ca^{2+} -Niveaus nach.

Eine Kombination der GFP-Fusion mit dem FRET ermöglicht schließlich die dynamische Untersuchung der Interaktion von Proteinen in einer lebenden Zelle. Die Proteine können einzeln durch ihre Farbe in der Zelle beobachtet werden, tritt der FRET auf, weil die Proteine miteinander interagieren und die GFP-Varianten sich deshalb sehr nahe kommen, so kann diese Interaktion durch eine Farbänderung ebenfalls in der Zelle beobachtet werden.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass das GFP viele Vorteile für die Fluoreszenzuntersuchungen bietet. Es ist ein natürlicher Fluoreszenzfarbstoff, der sich auch in vielen weiteren als seinem Stammorganismus exprimieren lässt, es sind keine weiteren Bearbeitungsschritte bei der Erzeugung notwendig (z. B. durch stammorganismusspezifische Enzyme), es wird immer ein Zielprotein mit einem GFP markiert (1:1-Markierung) und das GFP beeinflusst die Funktionalität des Zielproteins in sehr vielen Fällen nicht negativ. Nachteilig ist allerdings die Notwendigkeit der genetischen Veränderung des Zielorganismus, die Gensequenz des GFP muss in die Sequenz des Zielproteins hineinkloniert werden. Dieser Schritt ist aufwendig und kann auch scheitern, z. B. an der Stärke der verwendeten Promotoren. Allerdings ist die alternative, spezifische Anfärbung von Proteinen durch Farbstoff-markierte Antikörper ebenfalls aufwendig, wenn diese Antikörper erst gefunden und hergestellt werden müssen. Auch die Größe des GFP kann nachteilig sein, wenn es z. B. Poren der Kernmembran passieren soll oder die Funktionalität des Zielproteins negativ beeinflusst wird.

Neben dem GFP gibt es auch noch weitere biolumineszente Proteine. Ein GFP-ähnliches Protein mit derselben chromophoren Gruppe wurde in den Korallen *Renilla reniformis* gefunden. Inzwischen sind aber auch eine Vielzahl von weiteren fluoreszierenden Proteinen kommerziell erhältlich, die aus den Riffkorallen *Anthozoa*, *Heteractis crispa* und *Discoma sp.* oder der Quallenart *Aequorea corulascens* stammen. Im Internet findet sich das Angebot dieser oft „Living colors“ genannten fluoreszierenden Proteine.

2.7 Photophysik von Quantendots

Im Rahmen dieser Arbeit sind Experimente mit verschiedenen Fluoreszenzmarkern durchgeführt worden. Zu diesen Markern gehörten auch die sogenannten Quantendots, deren photophysikalischen Eigenschaften sich teilweise deutlich von anderen Farbstoffen unterscheiden. Deshalb soll die Photophysik der Quantendots in diesem Abschnitt genauer beschrieben werden.

Quantendots sind kleine Kristalle aus Halbleitermaterial mit einem Durchmesser D im Bereich von $D \approx 2 \text{ nm} - 10 \text{ nm}$, weshalb sie auch Nanokristalle genannt werden. Abb. 2.7.1 zeigt einen Größenvergleich von Quantendots und anderen vergleichbaren Fluoreszenzproben wie FITC, GFP oder fluoreszierenden Latexkügelchen.

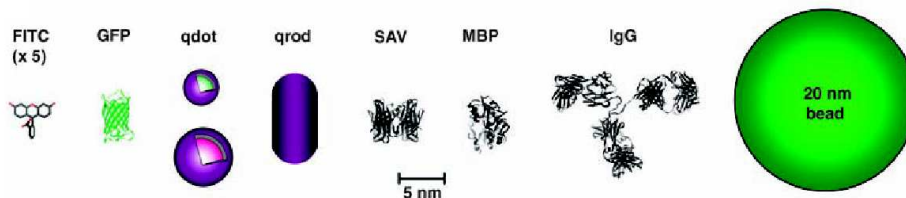


Abbildung 2.7.1: Größenvergleich von Quantendots und vergleichbaren Objekten aus X. MICHALET *et al.* [70].

Die Begrenzung der Ausdehnung des Halbleiters kann in allen drei Dimensionen erfolgen: eine Einschränkung um eine Dimension führt zu einer „quantum well“, eine zweidimensionale Einschränkung ergibt ein „quantum wire“ und eine Einschränkung in drei Dimensionen erzeugt schließlich die sogenannten „quantum dots“, die exakter als Nanokristalle bezeichnet werden.

Im Folgenden werden die wichtigsten photophysikalischen Eigenschaften der Quantendots beschrieben.

Die „Überlagerung“ der atomaren Energieniveaus führt in einem Festkörper zur Bildung der energetischen Bandstruktur. Die für das jeweilige Halbleitermaterial charakteristische Bandlücke besitzt eine energetische Breite im Bereich von einigen Elektronenvolt (eV). Ein typisches Quantendot-Material ist CdSe, also ein Halbleiter aus Materialien der Spalten II+VI des Periodensystems der Elemente.

Für die Beschreibung der photophysikalischen Eigenschaften ist die Berechnung der Energieniveaus der Elektronen im Halbleiter notwendig. Das Ergebnis einer genäherten Rechnung für die quantenmechanische Wellenfunktion der Elek-

tronen ist eine vom Wellenvektor \vec{k} abhängige Beschreibung der kinetischen Energie $E_{kin.}(\vec{k})$ durch

$$E_{kin.} = \frac{\hbar^2 \vec{k}^2}{2m^*(\vec{k})} \quad (2.7.1)$$

wobei der Elektronimpuls \vec{p} durch $\vec{p} = \hbar \vec{k}$ eingegangen ist. Die Funktion $m^*(\vec{k})$ beschreibt die effektive Masse des Elektrons, in die auch der Einfluss des periodischen Potentials auf die Elektronenbewegung eingeht.

In einem Halbleiter reicht die Raumtemperatur mit ihrer Energie von etwa $E_{T,Raum} = 24$ meV aus, um die intrinsische Leitfähigkeit zu erzeugen. Ein angeregtes Elektron hinterlässt ein Loch im Valenzband, das als eigenständiges positiv geladenes Teilchen betrachtet werden kann. Das Elektron und das Loch können sich aber nicht nur durch den Halbleiterkristall bewegen, sondern aufgrund der COULOMB-Wechselwirkung auch miteinander in einen gebundenen Zustand übergehen. Das so entstehende Elektron-Loch-Paar (e^- -h-Paar) ist ein Quasi-Teilchen und wird als Exziton X bezeichnet. Dieses Exziton lässt sich mit einem Wasserstoffatom oder mit Positronium in der Art vergleichen, dass zwei entgegengesetzt geladene Teilchen sich um ihren Schwerpunkt bewegen. Für das Exziton lässt sich ebenso wie für das Wasserstoffatom die e^- -h-Bindungsenergie E_B in verschiedenen Anregungszuständen n berechnen:

$$E_B = \frac{\mu^* e^4}{2(4\pi\epsilon_0\epsilon\hbar)^2 n^2} \quad (2.7.2)$$

Dabei ist n die Hauptquantenzahl des Exzitons und μ^* die reduzierte Masse des e^- -h-Paares. Aufgrund der sehr viel kleineren reduzierten Masse und der höheren Permittivität ϵ im Vergleich zum Wasserstoffatom ist die Bindungsenergie des Exzitons E_B mit typischerweise $E_B < 100$ meV viel kleiner als die Wasserstoffbindungsenergie von $E_{B,H} = 13.6$ eV. Dementsprechend größer ist auch der Radius des Exzitons r_X im Vergleich zum BOHRschen Radius des Wasserstoffatoms ($r_H = 5.29 \times 10^{-11}$ m). Für CuCl beträgt er $r_X = 1.1$ nm, für GaAs erreicht er $r_X = 12.5$ nm gemäß der Gleichung $r_X = \frac{\epsilon}{\mu^*/m_e} r_H$ für den Radius des Exzitons. Die Gesamtenergie des Exzitons ergibt sich zu $E_X = E_g - E_B$ mit der Bandlückenenergie E_g . Aufgrund der kleinen Energie $E_B \approx 100$ meV ist die Exzitonenergie nur geringfügig kleiner als die Bandlückenenergie.

Zu Beginn der 1980er Jahre wurden die ersten Berechnungen für Quantendots gemacht, die die Größe eines Halbleiternanokristalls mit berücksichtigen.

Die Größe eines Nanokristalls liegt mit einigen hundert bis zu wenigen hunderttausend Atomen zwischen dem atomaren Größenbereich und dem Größenbereich eines typischen Festkörpers, so dass anzunehmen ist, dass die Nanokristalle eine Mischung aus atomaren und festkörpertypischen Eigenschaften zeigen, die sich auch in den Ergebnissen der Berechnung der Energieniveaus/Bänder ausdrückt. Besonders interessant wird in diesem Fall die Betrachtung der Exzitonen, deren Durchmesser ähnlich dem der Nanokristalle ist. Unter der Annahme, dass das e^- -h-Paar nur innerhalb des Kristalls existieren kann, stellt die Kristalloberfläche einen unendlich hohen Potentialwall dar, der das Exziton in den Nanokristall einsperrt. So lässt sich das Exziton quantenmechanisch wie ein „Teilchen im Kasten“ beschreiben⁵. Die Lösung der SCHRÖDINGER-Gleichung liefert für die Energieniveaus E_C eines „Teilchens im Kasten“ den Ausdruck:

$$E_C = \frac{h^2}{8\mu^*r^2} \frac{1}{n^2} \quad (2.7.3)$$

wobei n wieder die Hauptquantenzahl ist und r den Abstand zwischen den Begrenzungen des Kastens darstellt, in diesem Fall also den Durchmesser des Nanokristalls. In V.I. KLIMOV [71] findet man die folgende Darstellung, die die Bandlückenbreite des Quantendots $E_g(QD)$ in Bezug zur Bandlücke eines typischen Festkörper-Halbleiters $E_{g,0}$ ausdrückt:

$$E_g(QD) \approx E_{g,0} + \frac{\hbar^2 \pi^2}{2\mu^*r^2} \quad (2.7.4)$$

In dieser Form wird besonders deutlich, dass mit abnehmendem Radius r des Nanokristalls die Bandlücke größer wird. Zudem findet man bei den Nanokristallen anstelle der kontinuierlichen Bänder eine Bandstruktur mit diskreten Niveaus, die allerdings noch nicht den atomaren Niveaus entsprechen. Hier wird die Mischung atomarer und Festkörper-Eigenschaften deutlich, wie es auch in Abb. 2.7.2 skizziert ist.

Diese räumliche Eingrenzung beeinflusst die Energieniveaus des Exzitons. Falls der Kristallradius r ungefähr gleich groß oder auch kleiner als der Exzitonradius r_X ist, wird das Exziton dazu gezwungen die erlaubten Energieniveaus E_C anzunehmen. Aus diesen Betrachtungen ergibt sich für die Nanokristalle die wichtige Erkenntnis, dass die Exzitonenergie durch die Größe des Nanokristalls beeinflusst werden kann. Letztendlich bedeutet dies aufgrund der Veränderung der Bandlückenbreite auch, dass die Emissionswellenlänge der Nanokristalle

⁵im Englischen: confinement = C

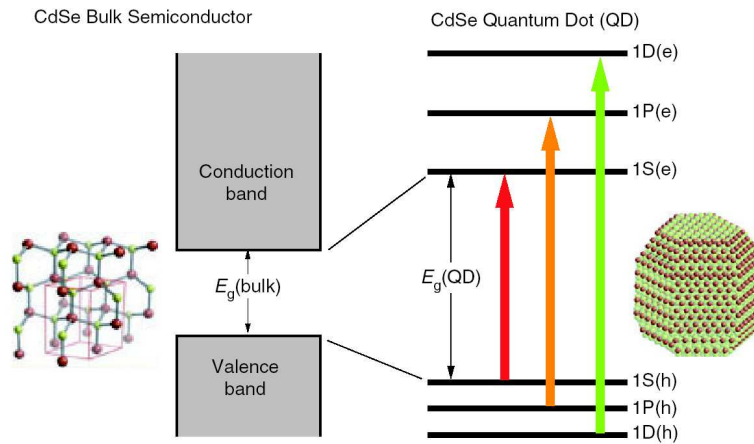


Abbildung 2.7.2: Veränderung der Bandstruktur beim Übergang vom Festkörper (links) zum Nanokristall (rechts) aus V.I. KLIMOV [71]. Beim Nanokristall können die diskreten Energieniveaus innerhalb eines Bandes mit Notationen bezeichnet werden, die ähnlich der atomaren Notationen sind.

durch Veränderung ihrer Größe variiert werden kann. So fluoreszieren die CdSe-Nanokristalle in einem tiefen Rot bei einem Radius von $r = 5$ nm, während sie bei einem Radius von $r = 0.7$ nm blau leuchten. Abb. 2.7.3 zeigt Küvetten, die mit Quantendots unterschiedlicher Größe ($r = 0.9$ nm bis $r = 2.4$ nm) gefüllt sind und aufgrund der Anregung mit UV-Licht in verschiedenen Farben fluoreszieren. Die Quantendots mit einem Radius von $r = 2.4$ nm haben eine Bandlücke von etwa $E_g = 2$ eV und emittieren in Orange, die Quantendots mit einem Radius von $r = 0.9$ nm besitzen eine Bandlücke von etwa $E_g = 2.7$ eV und leuchten dementsprechen blau.

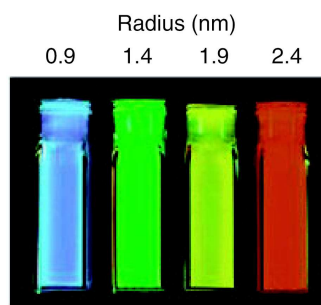


Abbildung 2.7.3: Lösungen von CdSe-Quantendots unterschiedlicher Größe, die unter UV-Beleuchtung in verschiedenen Farben leuchten, aus V.I. KLIMOV [71].

An der Grenzfläche eines Festkörpers zu einem anderen Material oder zum Vakuum verändert sich das periodische Potential der Atomrümpfe des Kristallgitters deutlich im Vergleich zum Inneren des Festkörpers. Durch die veränderte Bandstruktur in der Grenzflächennähe entstehen Energieniveaus, die innerhalb der Bandlücke liegen, und über die die Elektronen sowohl strahlungslos als auch mit Strahlungsemission (sogenannte in-gap „deep-trap“ Emission) relaxieren können. Diese Oberflächendefekte führen zu einem Ladungsträgerverlust und dies beeinträchtigt die gewünschte Emission.

Es hat sich gezeigt, dass eine Umhüllung des Nanokristalls mit einem Material, das eine größere Bandlücke besitzt als das Kernmaterial, die Probleme der chemisch aktiven Oberfläche und der beeinträchtigten Emission beseitigt. Durch die abgedeckten Bindungen des Kernmaterials zum Hüllenmaterial verändert sich die Kern-Bandstruktur nur wenig, so können die Übergänge der angeregten Elektronen zwischen den unveränderten Niveaus der Bänder stattfinden. Zudem bewirkt die Hülle eine Veränderung der Wellenfunktionen des Elektrons und des Loches, die sich positiv auf die elektronische Zugänglichkeit der Niveaus des Kernmaterials und die photochemische Stabilität auswirkt, wodurch der Nanokristall länger im Experiment genutzt werden kann.

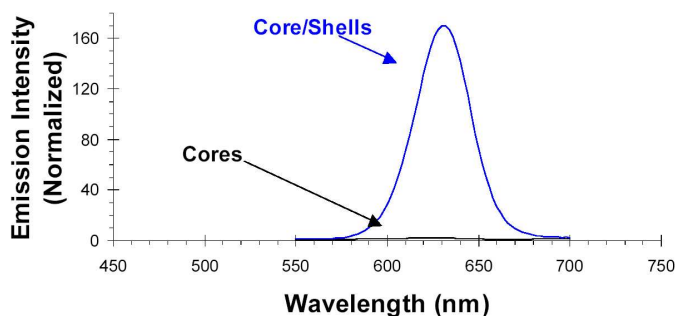


Abbildung 2.7.4: Normierte Emissionsspektren von Kern- und Kern/Hülle-Nanokristallen aus BAROVSKY (QUANTUM DOT CORP.) [72].

Die durch die Umhüllung veränderte Elektron-Wellenfunktion bewirkt eine Rotverschiebung des Absorptionsspektrums im Vergleich zu einem reinen Kern, während die Veränderung der Loch-Wellenfunktion zu der erhöhten Photostabilität führt. Schließlich ist die deutlich erhöhte Quantenausbeute auf den stärkeren Überlapp der beiden Wellenfunktionen durch die Einschränkung auf den Kernbereich zurückzuführen. Die Quantenausbeute steigt um mehr als 50 % bis zu 160 % [72, 73] wie in Abb. 2.7.4 zu sehen ist.

Zu den weiteren Eigenschaften der Quantendots gehört ihr breites Anregungsspektrum und ihre von der Nanokristallgröße abhängige schmale Emissionslinie.

Aufgrund der zuvor beschriebenen Eigenschaften der Nanokristalle bezüglich der Energieniveaus der Exzitonen und eines räumlich eingegrenzten Teilchens könnte man ein Anregungsspektrum mit diskreten Anregungslinien erwarten. Die Ausprägung dieser Linien ist aber von der Kristallgröße abhängig: je größer der Kristall ist, desto mehr verbreitern sich die Linien und das Spektrum „verschmiert“ in Richtung des breiten Anregungsspektrums eines Festkörpers. Aufgrund von Inhomogenitäten der Nanokristalle variiert die Breite der einzelnen Anregungslinien der Quantendots. Zusammen mit den unterschiedlichen Absorptionsquerschnitten ergibt die Überlagerung der verbreiterten Linien das zu beobachtende Anregungsspektrum. Die folgende Abbildung 2.7.5 zeigt beispielhaft die Anregungsspektren für CdSe-Nanokristalle unterschiedlicher Größe.

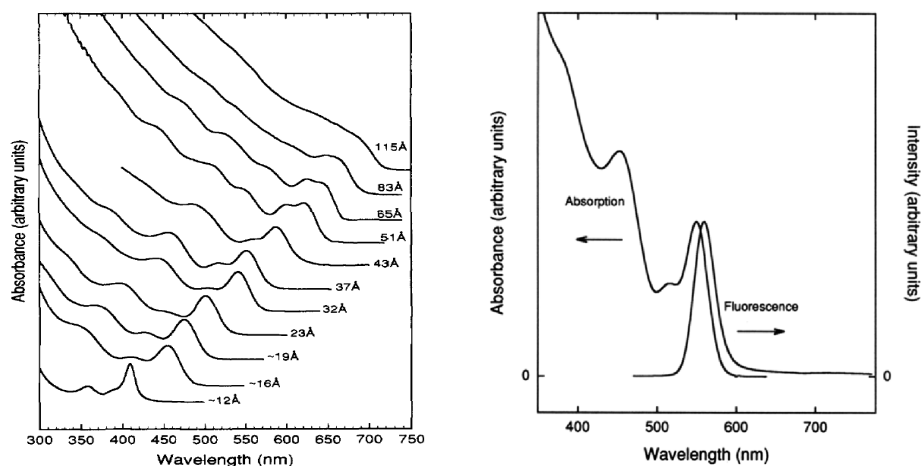


Abbildung 2.7.5: Anregungsspektren von CdSe-Nanokristallen unterschiedlicher Größe, aus C.B. MURRAY *et al.* [74]: (A) zeigt die Absorptionsspektren von CdSe-Nanokristallen verschiedener Größe. Die Nanokristalle haben keine Umhüllung. Je größer der Kristall wird, desto weniger ausgeprägt sind die Strukturen und die erste Anregungsspitze verschiebt sich zu größeren Wellenlängen. (B) zeigt das Absorptions- und das Emissionsspektrum eines Nanokristalls von $D = 3.7$ nm Durchmesser. Die erste Anregungsspitze des Absorptionsspektrums hat die gleiche Form wie das Emissionsspektrum, ist allerdings blauverschoben.

Abb. 2.7.5 A zeigt deutlich, wie das Anregungsspektrum bei Verkleinerung der Kristallgröße zunehmend mehr diskrete Strukturen ausbildet. Die erste Anregungsspitze bei der jeweils größten Wellenlänge verschiebt sich mit abnehmender

Kristallgröße zu kürzeren Wellenlängen, also höheren Energien. Beides lässt sich durch die mit abnehmender Kristallgröße größer werdende Bandlücke und die ebenfalls zunehmenden Abstände der Niveaus in den Bändern der Nanokristalle erklären (vgl. Gl. (2.7.4)). Diese erste Anregungsspitze repräsentiert auch die Grundzustandsenergie des erzeugten Exzitons.

Als eine weitere wichtige Größe der Anregung wird der Absorptionswirkungsquerschnitt angegeben, denn er charakterisiert die Effizienz, mit der ein Atom bzw. Molekül oder eben auch ein Quantendot angeregt werden kann. Die Quantendots, die für die in Kap. 4.1 beschriebenen Experimente verwendet wurden, besitzen einen sehr großen Zwei-Photonen-Absorptionswirkungsquerschnitt von mehr als $\sigma_{\text{QDots}} = 30000 \text{ GM}$ [75].

In Abb. 2.7.5 B ist neben einem Absorptionsspektrum auch das Emissionsspektrum eines Nanokristalls dargestellt. Hier fällt auf, dass der Nanokristall nur eine schmale Emissionslinie zeigt, die zudem bei allen Anregungswellenlängen zu beobachten ist. Um diese Eigenschaft der Nanokristalle zu verstehen, ist es notwendig, neben den atom-ähnlichen Eigenschaften auch die Festkörper-Eigenschaften zu betrachten, die die Nanokristalle trotz ihrer geringen Größe besitzen. Mit ihrer Größe von einigen hundert bis zu wenigen hunderttausend Atomen gehören zu den Festkörper-Eigenschaften noch die Gitterschwingungen, deren Eigenschaften durch das Phononen-Modell beschrieben werden. Für die Quantendots ist die Interaktion des Exzitons mit den Phononen von großer Bedeutung. Nach der Anregung durch ein Photon befinden sich das Elektron und Loch des Exzitons in ihren jeweiligen angeregten Zuständen. Mit Hilfe der Phononen können sie in ihre jeweiligen Grundzustände an der Bandkante relaxieren. Wenn das Elektron und das Loch von diesen Grundzuständen aus rekombinieren, emittieren die Nanokristalle ein Photon mit der definierten Energie der Emissionslinie, die der Bandlückenenergie entspricht.

Diese einfache Beschreibung der Emission eines Nanokristalls wird in der Realität allerdings durch weitere Relaxationspfade komplexer – ein weiterer Pfad beinhaltet einen AUGER-ähnlichen Prozess, der in Quantendots sehr viel wahrscheinlicher ist als in typischen Festkörpern [71].

Insbesondere kann das angeregte Elektron nicht über die Lücke zwischen dem Grund- und ersten angeregten Zustand im Leitungsband mit Hilfe von Ein-Phononen-Prozessen relaxieren. Stattdessen kann das Elektron in einem AUGER-ähnlichen Prozess diese Energie an das Loch abgeben und somit in den Grundzustand übergehen, während das Loch nun aufgrund der geringen Niveauabstände durch Phononen ohne Probleme in seinen Grundzustand relaxieren kann, wie dies in Abb. 2.7.6 skizziert ist.

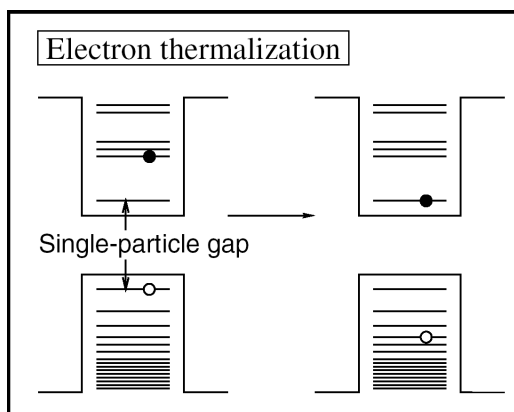


Abbildung 2.7.6: Schematisches Energieniveaudiagramm für Elektronen (oben, schwarze Kreise) und Löcher (unten, weiße Kreise), aus L.W. WANG *et al.* [76]. Aufgrund der geringen effektiven Elektronenmasse sind die Abstände der Energieniveaus des Elektrons deutlich größer als die der Niveaus des Loches.

Die Photophysik der Nanokristalle ist immer noch Gegenstand aktueller Forschung und soll deshalb in diesem Übersichtsabschnitt nicht detaillierter diskutiert werden.

Zu den auffälligsten Phänomenen der Photophysik der Nanokristalle gehört ihre Eigenschaft des „Blinkens“. Darunter versteht man die Eigenart der Quantendots zwischen Zuständen mit hoher und vernachlässigbarer Fluoreszenzemission umzuschalten. Man kann vereinfacht sagen, die Fluoreszenzintensität der Quantendots wird in einem zeitlich zufälligen Muster ein- und ausgeschaltet. Dabei sind die Zeitdauern für die beiden Zustände nicht auf bestimmte Zeitskalen festgelegt, sondern sie folgen einem sogenannten „power law“ für die AN- und AUS-Zustände. Dies bedeutet, dass die Zeitdauern der beiden Zustände direkt mit ihren Wahrscheinlichkeiten des Auftretens verbunden sind:

$$P(\tau_{an/aus}) \propto \frac{1}{\tau_{an/aus}^{1+\alpha}} \quad (2.7.5)$$

Hervorzuheben für das Blinken ist, dass es unabhängig ist von den äußeren Bedingungen wie Temperatur, eingestrahelter Laserleistung oder der molekularen Umgebung. Für die Erklärung des Blinkens existieren mehrere Modelle. Am häufigsten wird angenommen, dass ein Ladungsträger des Exzitons, wahrscheinlich das Elektron aufgrund seiner geringeren effektiven Masse, durch Photonenabsorption in die Umgebung des Nanokristalls abgegeben wird und so ein geladener

Nanokristall zurückbleibt. Der geladene Quantendot kann weiterhin mit Photonen angeregt werden, aber in diesem Fall entsteht ein weiteres e^- - h -Paar zusammen mit dem zurückgebliebenen Ladungsträger. In diesem Drei-Ladungsträger-System wird die Rekombinationsenergie des e^- - h -Paares nicht als Photon abgestrahlt, sondern in einem AUGER-ähnliche Prozess zur Anregung des zurückgebliebenen Ladungsträgers benutzt. Von diesem Anregungszustand kann der zurückgebliebene Ladungsträger durch Phononen-Relaxation in seinen Grundzustand zurückkehren. Dieser Zyklus hat zur Folge, dass trotz der Anregung und der damit verbundenen Erzeugung des e^- - h -Paares keine Emission auftritt – der Quantendot befindet sich im AUS-Zustand. Nach einer gewissen Zeit gelangt der in der Umgebung gefangene Ladungsträger des ersten e^- - h -Paares wieder zurück in den Nanokristall und rekombiniert mit dem zuvor zurückgebliebenen Ladungsträger, diesmal unter Emission eines Photons. Der Quantendot ist wieder im AN-Zustand.

Dies ist eine häufig anzutreffende Erklärung des Blinkens, die allerdings nur mit bestimmten Annahmen das „power law“ erfüllt. Aber nicht nur wegen dieser noch unvollständigen Erklärung ist ein genaues Verständnis des Blinkens wichtig. Das exakte Verständnis der Photophysik des Blinkens kann auch Möglichkeiten zum Verhindern des Blinkens aufzeigen, was im Hinblick auf die Verwendung der Quantendots als Fluoreszenzfarbstoff große Bedeutung hat. Ein langer AUS-Zustand eines Quantendots kann mit einem ausgebleichten Farbstoff verwechselt werden – ganz abgesehen von der Tatsache, dass während des AUS-Zustandes keine Informationen über die markierte Probe aufgenommen werden können.

2.8 Weitere Aspekte der Zwei-Photonen-Laser-Raster-Mikroskopie

In diesem Abschnitt sollen noch weitere Aspekte zur Zwei-Photonen-Mikroskopie erwähnt werden, die nicht im Rahmen der vorigen Kapitel erklärt werden konnten.

2.8.1 Strahlenschädigung und Ausbleichen der Proben

Bei der Auswahl der Laserleistung muss ein Mittelweg gefunden werden zwischen der Signalstärke und der Schädigung der Proben. Nach Gl. (2.1.15) bzw. Gl. (2.1.17) nimmt das Fluoreszenzsignal mit dem Quadrat der Anregungsintensität zu, aber nach K. KÖNIG *et al.* [36] kann schon eine mittlere Strahlleistung von 10 mW dazu führen, dass nach 10 Aufnahmen fast alle untersuchten Zellen (Chinese Hamster Ovary Cells (CHO-Zellen)) gänzlich zerstört sind. Wie auch von D. HELLWEG [37] erwähnt, kommt es wegen der kurzen Pulsdauern im Femtosekundenbereich und der kleinen Fokusgröße zu sehr hohen Spitzenintensitäten, die im TW/cm^2 -Bereich liegen können. Auch wenn die Strahlenschädigungen mit den dazugehörigen zugrundeliegenden Prozessen noch nicht detailliert untersucht wurden, so ist schon deutlich geworden, dass Pulsdauer und Wellenlänge des benutzten Laserlichtes großen Einfluss auf die Stärke der Schädigung haben. Weitere Ausführungen zu diesem Aspekt finden sich z. B. bei K. KÖNIG *et al.* [77, 78]. Es sollte auch nicht außer acht gelassen werden, dass die eingestrahelte Energie zu einer Erwärmung des Zellinneren führen kann [79].

Zusammengefasst kann also die Fokussierung eines Laserstrahls in eine Zelle den Zellmetabolismus verändern; es sind aber Untersuchungen ohne Zellschädigung von 30 Minuten möglich, falls die mittlere Leistung unter 6 mW liegt [36]. In einem Übersichtsartikel wird sogar eine Untersuchung an Embryozellen über einen Zeitraum von 20 Stunden erwähnt [80]. Und auch von R.C. WILLIS [81] und J.M. SQUIRRELL *et al.* [82] wird von deutlich geringeren Strahlenschädigungen bei Untersuchungen mit einem TPLSM berichtet, so dass Embryozellen sich normal entwickeln konnten, nachdem von ihnen über einen Zeitraum von 24 Stunden alle 15 Minuten ein 3D-Bild aus 5 Schichten aufgenommen wurde. Bei einer gleichen Untersuchung mit einem CLSM waren die Zellen schon nach 8 Stunden nicht mehr teilungsfähig. Allerdings wurde auch gezeigt, dass bei einem TPLSM die Photozerstörung im Fokus deutlich größer ist als bei einem CLSM.

Die dennoch geringere Gesamtschädigung der Proben wirkt sich nicht nur po-

sitiv auf das zu untersuchende Präparat aus, sondern auch auf den Gesamtuntersuchungszeitraum des Präparates, der durch die Verwendbarkeitsdauer der Fluoreszenzfarbstoffe, mit denen das Präparat angefärbt wurde, bestimmt wird. Die Farbstoffe können mehrfach zu Fluoreszenzemission angeregt werden. Es sind aber nicht beliebig viele Anregungen möglich, da die Farbstoffe, mit denen die Zellen meist angefärbt werden, nach einer gewissen Anzahl von Anregungen, d. h. von Laserpulsen, zerstört werden. Dies bezeichnet man auch als Ausbleichen des Farbstoffes. In einem konfokalen Mikroskop wird nur das Signal aus dem Fokus detektiert, es findet aber auch außerhalb des Fokus eine Anregung des Farbstoffes statt (vgl. Abb. 2.1.4). Bei einer 3D-Bildaufnahme mit einem CLSM werden somit viele Farbstoffmoleküle angeregt, deren Signal nicht detektiert wird, weil sie außerhalb des Fokus liegen. Diese nicht-notwendige Anregung verringert dann den Gesamtuntersuchungszeitraum, denn bei nachfolgenden Aufnahmen sind die Farbstoffe teilweise ausgebleicht. Es kann auch nicht ausgeschlossen werden, dass die chemischen Fragmente des zerstörten Farbstoffes eine toxische Wirkung auf die Zelle haben.

2.8.2 Farbstoffauswahl, Ausbleichen der Farbstoffe

Um Fluoreszenzmikroskopie betreiben zu können, muss die Probe mit einem Farbstoff markiert werden. An die Farbstoffe werden mehrere Bedingungen gestellt: zum einen müssen sie in ihrem Anregungsspektrum bei der verwendeten Wellenlänge, bzw. dem zweifachen der Anregungslaserwellenlänge, ein Absorptionsmaximum haben, so dass auch noch geringe Farbstoffkonzentrationen in der Probe detektiert werden können. Zum anderen sollten sie nicht toxisch auf die Probe wirken, damit auch Untersuchungen an lebenden Objekten über längere Zeiträume möglich sind. Falls mit den Farbstoffen bestimmte Zellkomponenten gefärbt werden sollen, müssen die Farbstoffe spezifisch an diese Zellkomponenten binden. Für eine effiziente Anregung ist die Größe des Zwei-Photonen-Absorptionsquerschnittes $\sigma^{(2)}$ des Farbstoffes wichtig. Wie in Kap. 2.1 erwähnt, liegt $\sigma^{(2)}$ in der Größenordnung von etwa $10^{-50} \text{ cm}^4\text{s}$. Es gibt aber auch Entwicklungen von neuen, speziell auf die Zwei-Photonen-Mikroskopie abgestimmten Farbstoffen, deren Absorptionsquerschnitt um 3 – 4 Größenordnungen größer ist. Drei dieser Farbstoffe (ASPT, APSS, BBTDOT) werden von J.D. BHAWALKAR *et al.* [83] vorgestellt.

Neben der Fluoreszenz durch explizite Farbstoffe gibt es auch die Autofluoreszenz der Zelle, d. h. einige der Moleküle, die die Zelle aufbauen, können auch zur Fluoreszenz angeregt werden. Eine Auswahl von autofluoreszenten Molekülen

sind z. B. Tryptophan, Kollagen, Elastin, NAD(P)H, FAD, FMN, Porphyrin und das hell fluoreszierende, aber dennoch natürliche GFP (engl.: Green Fluorescent Protein) (siehe folgendes Kap. 2.6) oder auch manipulierte Arten von Zellmolekülen wie z. B. das mantGTP [2, 3, 36, 84, 85]. Die Autofluoreszenz ist allerdings deutlich schwächer als die Farbstofffluoreszenz, laut K. DOWLING *et al.* [86] ergibt sich ein Faktor von ~ 25 im Vergleich zum Farbstoff Coumarin 314. Um diesen Faktor verlängert sich auch die Belichtungszeit einer Aufnahme, wenn die Autofluoreszenz statt der Farbstofffluoreszenz detektiert wird. Derart verlängerte Belichtungszeiten können nicht in jedem Experiment toleriert werden, z. B. bei der Beobachtung schnell ablaufender Prozesse in der Zelle. Zudem kann die Autofluoreszenz meist erst im UV effektiv angeregt werden.

2.8.3 Vorteile der TPLSM aus Sicht der Anwendung

Neben den schon in den vorherigen Abschnitten erwähnten Vorteilen wie geringere Probenschädigung durch Einschränkung der Fluoreszenzanregung auf das Fokusbildvolumen, höheres Signal-Rausch-Verhältnis gegenüber der CLSM gibt es noch weitere Vorteile eines Zwei-Photonen-Mikroskopes, die hier kurz dargestellt werden sollen.

Durch die Verwendung einer größeren Wellenlänge (etwa doppelt so groß wie bei einem CLSM) hat ein TPLSM eine größere Eindringtiefe, wodurch auch tieferliegende Schichten abgebildet werden können, was bei Untersuchungen an Nervenzellen wichtig ist, da die Zellen nahe der Oberfläche sich anders verhalten können als Zellen, die tiefer im Gewebe fester in ihre Umgebung eingebunden sind [13]. Größere Wellenlängen werden auch weniger gestreut, so dass ein TPLSM in stark streuendem Gewebe (z. B. Nervengewebe) bessere Bilder als ein CLSM liefert. Außerdem tragen auch die gestreuten Photonen zum Signal bei, ohne die Auflösung zu verschlechtern. Bei einem TPLSM stammen alle Photonen aus dem Fokus, dessen Größe die Auflösung bestimmt. Bei einem CLSM würden die gestreuten Photonen aufgrund der eingesetzten Lochblende verlorengehen.

Kapitel 3

Versuchsaufbau

In diesem Kapitel werden die Geräte beschrieben, die für den vorliegenden Aufbau des Zwei-Photonen-Laser-Raster-Mikroskopes (TPLSM) im Rahmen dieser Arbeit verwendet wurden, und es werden einige ihrer Eigenschaften dargelegt, die für die Auswertung benötigt werden.

Kap. 3.1 beschreibt das TPLSM im Überblick und zeigt auf, welche Geräte verwendet wurden und wie der generelle Strahlverlauf im TPLSM für die Anregung und die Detektion verläuft. Zudem wird die Steuerung des Aufbaus durch die teilweise selbstprogrammierte Software beschrieben. Kap. 3.2 charakterisiert den verwendeten MaiTai-Laser und dessen Wellenlängenabhängigkeit der Ausgangsleistung. Für einige Experimente wurde noch der vorherigen Versuchsaufbau verwendet, deshalb wird der in diesem vorherigen Aufbau verwendete Vitesse-Laser mit seinen Eigenschaften charakterisiert. In Kap. 3.3 wird das TriM-Scope mit den optischen Komponenten zur Strahlaufbereitung, dem Strahlteiler und der Spiegelrastereinheit beschrieben. Das anschließende Kap. 3.4 geht auf das inverse Mikroskop Olympus IX70 ein, mit dem die Fluoreszenzuntersuchungen gemacht wurden, das aber auch für Durchlichtaufnahmen geeignet ist. In diesem Kapitel werden auch die benutzten Filter zur Selektion der Emissionswellenlängen vorgestellt. Das Kapitel 3.5 geht schließlich auf die Andor iXon EMCCD-Kamera ein, die mit ihrem integrierten Elektronenvervielfacher (electron multiplier, EM) eine neue Art von CCD-Detektor darstellt. Dazu wird die EMCCD-Kamera im Hinblick auf ihre Empfindlichkeit durch Messung einer Konzentrationsreihe charakterisiert.

3.1 Aufbau des multifokalen Zwei-Photonen-Laser-Raster-Mikroskopes im Überblick

Dieses Kapitel beschreibt in einem Überblick den Aufbau des im Rahmen dieser Arbeit realisierten TPLSM in Bezug auf die verwendeten Geräte und den Strahlverlauf sowie die Ansteuerung der Geräte für eine erfolgreiche Datenaufnahme.

Aus dem theoretischen Kapitel 2.3 werden die für ein TPLSM benötigten Geräte ersichtlich. Dazu kommt für das hier realisierte multifokale TPLSM eine Strahlvervielfachereinheit (vgl. Kap. 2.4).

Als Laserquelle dient ein SpectraPhysics Mai-Tai Laser, die Strahlrastereinheit ist zusammen mit dem Strahlteiler Bestandteil des LaVision Biotec TriM-Scope, als Mikroskop wird ein Olympus IX70 verwendet und als Detektor fungiert eine Andor iXon EMCCD-Kamera. Diese Geräte ermöglichen zusammen mit einem selbstgebauten Filterhalter den Aufbau eines Multistrahl-TPLSM. Den Strahlverlauf zwischen genannten wichtigsten Geräte zeigt die folgende Abb. 3.1.1.

An dieser Stelle sei erwähnt, dass ein 3 mm dicker Filter aus BG39-Glas im Mikroskop vor den Okularen zum Schutz der Augen eingebaut ist, der gegebenenfalls Reste des Anregungslasers, die in diese Richtung gelangen, unterdrückt.

In Abb. 3.1.1 (A) ist in einer Übersicht der Strahlverlauf durch die Komponenten des TPLSM dargestellt. Innerhalb des TriM-Scope (Abb. 3.1.1 (B)) durchläuft der Laserstrahl zuerst eine Prismenanordnung zur Dispersionskompensation. Die Dispersionskompensation sorgt dafür, dass die Pulsdauer τ der Laserpulse nicht durch die optischen Komponenten verlängert wird. Danach wird der Laserstrahl in der Strahlvervielfachereinheit in bis zu 64 Strahlen aufgeteilt. Die reale Ausführung wird genauer in Kap. 2.4.2 und Kap. 3.3 dargestellt. Die Linie aus den bis zu 64 Strahlen wird anschließend (Abb. 3.1.1 (C)) von der Spiegelrastereinheit in der x- und y-Richtung abgelenkt, um die Probe in der lateralen x-y-Ebene abzurastern. Eine Teleskopanordnung zwischen dem TriM-Scope und dem Mikroskop – bestehend aus der Rasterlinse und der Tubuslinse – weitet schließlich die erzeugten vielfachen Laserstrahlen auf, so dass die Apertur des Mikroskopobjektives vollständig ausgenutzt wird, um die erreichbare hohe Auflösung nicht zu verringern. Eine genauere Beschreibung des TriM-Scopes findet sich in Kap. 3.3. Abb. 3.1.1 (C) zeigt auch den weiteren Strahlverlauf innerhalb des Mikroskopes. Die aufgeweiteten Laserstrahlen werden vom dichroitischen 45°-Spiegel in Richtung des Objektivs umgelenkt. Die in der Probe entstehende Fluoreszenz wird vom Objektiv aufgenommen und passiert den für die Fluoreszenzwellenlänge hochtransmittierenden Dichroiten. Reste des Anregungslaserlichtes werden von

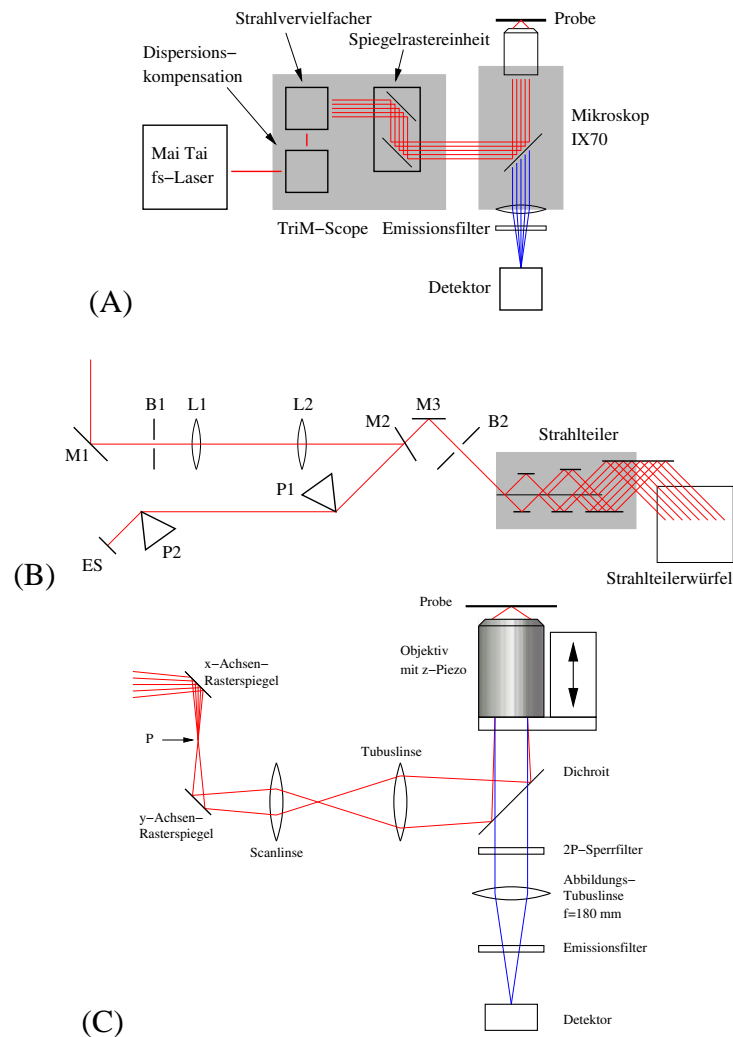


Abbildung 3.1.1: (A) Die wichtigsten Geräte des multifokalen TPLSM-Aufbaus. Zusätzlich ist noch der selbstgebaute Filterhalter für die Emissionsfilter zwischen Mikroskop und EMCCD-Kamera eingezeichnet. (B) Detaillierter Strahlverlauf innerhalb des TriM-Scopes: Blenden B1 und B2 zur Strahljustierung; Spiegel M2 zum Umlenken des Strahles in die Dispersionskompensation aus den Prismen P1 und P2; Endspiegel ES Zur Reflektion des Strahles auf den Spiegel M3 mittels eines Höhenversatzes; Strahlteiler zum Erzeugen der 64 Teilstrahlen. (C) Detaillierter Strahlverlauf innerhalb des Mikroskopes: Am Punkt P konvergieren alle aus dem Strahlteiler kommenden Strahlen und dieser Punkt P wird durch das Teleskop aus Raster- und Tubuslinse in die rückwärtige Apertur des Objektivs abgebildet.

einem Sperrfilter geblockt. Das Fluoreszenzlicht kann innerhalb des Mikroskopes entweder zur Beobachtung ins Okular oder zur Messung auf die EMCCD-Kamera gelenkt werden. Zwischen der abbildenden Tubuslinse des Mikroskopes und der EMCCD-Kamera können in einem selbstkonstruierten Filterhalter verschiedene Emissionsfilter platziert werden. Das Mikroskop mit den genannten optischen Komponenten wird genauer in Kap. 3.4 beschrieben, während die Eigenschaften der EMCCD-Kamera in Kap. 3.5 dargelegt werden.

Die Steuerung des Mikroskopes erfolgte mit Hilfe von drei Computern, da die Integration aller Steuerungen in ein einziges Messprogramm eine zu aufwendige und umfangreiche ergänzende Programmierung des Messprogrammes erfordert hätte. Dennoch konnte ein anwendungsfreundlicher Aufruf von Messroutinen realisiert werden, denn die Spiegelrastereinheit bedarf während einer Messung keiner Änderung der Parameter. So konnte das herstellereigene Steuerungsprogramm des TriM-Scopes (Messprogramm: Inspector, LaVision Biotech) auf einem eigenständigen, ersten PC die Ansteuerung der Spiegelrastereinheit und der TriM-Scope-Schrittmotoren ausführen. Auf dem zweiten PC steuerte das herstellereigene Programm (Andor iXon EMCCD-Kamerasteuerungsprogramm) die Datenaufnahme der EMCCD-Kamera. Dieses Programm wurde mit Kommandos und Messparametern vom dritten PC aus versorgt und angesteuert. Eine der wichtigsten Aktionen war das Starten der Bildaufnahme in einem Synchronisationsmodus, bei dem die eigentliche Aufnahme eines Bildes durch ein externes Synchronisationssignal ausgelöst wurde. Dieses Synchronisationssignal erzeugte der dritte PC, der auch die restliche Steuerung einer Messroutine übernahm (Messprogramm: DaVis, LaVision). Diese beschriebene Synchronisation zwischen den Geräten ist zur Übersicht in der folgenden Abb. 3.1.2 skizziert.

Unter einer Messroutine ist z. B. die Aufnahme eines Bilderstapels aus verschiedenen Tiefen der Probe, die Aufnahme einer Bildreihe zu verschiedenen Anregungswellenlängen oder auch die Aufnahme einer Zeitreihe zur Visualisierung der Dynamik innerhalb einer Zelle zu verstehen. Der dritte PC kontrolliert die Abarbeitung einer Messroutine unter Beachtung der gegebenen Messparameter durch Ansteuerung der einzelnen Geräte einschließlich des Auslösens der Bildaufnahme durch das Senden des oben genannten Synchronisationssignals.

Für die in Kap. 4.5 beschriebenen Zeilenrasterungen wurde die Bildaufnahme in einer direkten Weise mit der Spiegelrastereinheit synchronisiert, wie es in Abb. 3.1.3 skizziert ist. Diese zeitkritische Anwendung hätte mit der softwarebasierten Ansteuerung durch die Messroutinen nicht realisiert werden können. Stattdessen wurde ein Synchronisationssignal der Spiegelrastereinheit verwendet, das jeweils am Anfang einer Rasterzeile ausgesendet wurde.

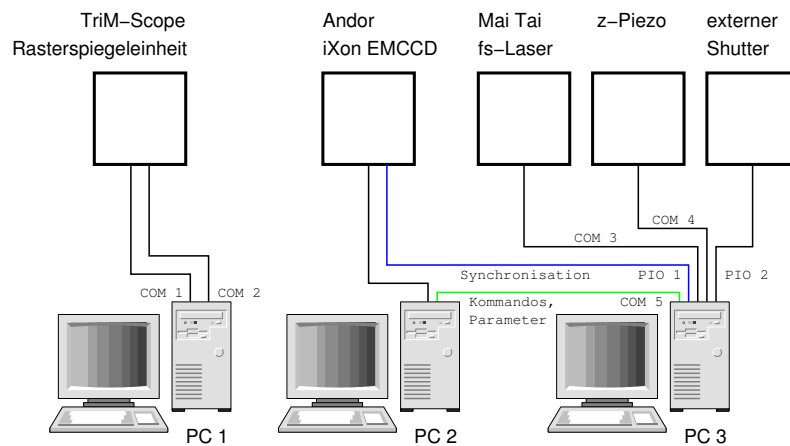


Abbildung 3.1.2: Ansteuerung der Geräte und Synchronisation der Ansteuerung. PC1 steuert das TriM-Scope mit dessen Schrittmotoren und der Spiegelrastereinheit. PC2 steuert die EMCCD-Kamera und bekommt Steuerungskommandos und Parameter von PC3. PC3 steuert den MaiTai-Laser, den z-Piezo, den externen Shutter und gibt das Synchronisationssignal an PC2.

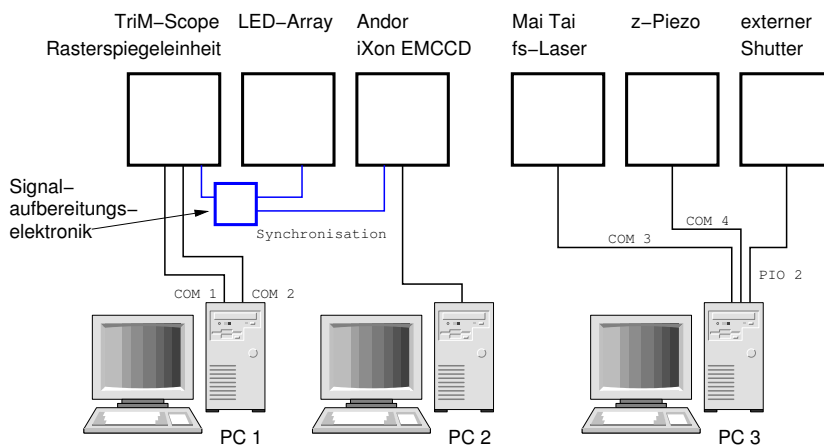


Abbildung 3.1.3: Ansteuerung der Geräte und Synchronisation der Ansteuerung beim Zeilenrasterverfahren. PC1 steuert wiederum das TriM-Scope mit dessen Schrittmotoren und der Spiegelrastereinheit. PC2 steuert die EMCCD-Kamera, die in diesem Fall aber mit einem Synchronisationssignal von der Spiegelrastereinheit gestartet wird. Dieses Signal startet auch über eine Verzögerungsschaltung das LED-Streifenmuster. PC3 steuert wiederum den MaiTai-Laser, den z-Piezo und den externen Shutter.

Dieses Synchronisationssignal löst die Bildaufnahme der EMCCD-Kamera aus, deren Belichtungszeit mit Hilfe der Zeilenfrequenz der Rasterspiegel gerade so gewählt wurde, dass eine definierte Anzahl von gerasterten Zeilen auf dem Bild integriert werden konnte. Zudem konnte über diese festverdrahtete Synchronisation auch die Bewegung des in Kap. 4.5 beschriebenen LED-Streifenmusters nach einer definierten Verzögerung gestartet werden. Der entscheidende Unterschied zum zuvor beschriebenen Messmodus ist der Start der Messroutine durch das Starten der Spiegelrastereinheit und somit des Synchronisationssignals.

3.2 Charakterisierung des SpectraPhysics MaiTai-Lasers

Als Quelle für die zur TPLSM notwendige Laserstrahlung dient in diesem Aufbau der MaiTai Laser von SpectraPhysics. Bei diesem Laser handelt es sich um einen Titan-Saphir-Laser (Ti:Sa-Laser), der eine gepulste infrarote (IR) Laserstrahlung abgibt. Die Spezifikationen der emittierten Strahlung sind in Tab. 3.2.1 zusammengefasst.

Um diese Laserstrahlung zu erzeugen, vereinigt der MaiTai-Laser zwei Laser in einem Gehäuse: zum einen den dioden-gepumpten, frequenzverdoppelten Festkörperlaser, zum anderen einen vom diesem Festkörperlaser gepumpten Ti:Sa-Laser. Diese beiden Laser sind zusammen mit den notwendigen Elementen der Steuerungselektronik im Laserkopf untergebracht. Als eigentliche Strahlungsquelle dient eine Laserdiode, die zwecks einer besseren Temperaturstabilisierung der Diode und des Laserkopfes im Netzteil untergebracht ist.

Ausgangspunkt für die Laserstrahlung ist die Umwandlung elektrischer Energie in Licht, wie sie in der Laserdiode stattfindet. Die Rekombination der Elektronen-Loch-Paare im p-n-Übergang führt zur Emission der Laserstrahlung.

Der Festkörperlaser besteht aus einem Neodym-dotierten Yttrium-Vanadat-Kristall (kurz Nd:YVO₄-Kristall). In dieser Kristallmatrix bilden die Nd³⁺-Ionen das aktive Lasermedium und führen zu einer Emission mit der Wellenlänge von 1064 nm. Die sehr gute Übereinstimmung der Emissionslinie der Laserdiode von 809 nm mit der starken Absorptionslinie des Nd³⁺ führt zu einem effektiven Pumpen des Lasermediums. Dies erklärt auch die Notwendigkeit der Temperaturstabilisierung der Laserdiode, denn mit einer Temperaturänderung verschiebt sich die Emissionswellenlänge der Laserdiode und das Pumpen könnte nicht mehr so effektiv stattfinden.

Um den Ti:Sa-Laser effektiv pumpen zu können, muss die infrarote 1064 nm-Strahlung des Nd:YVO₄-Kristalls in sichtbare 532 nm-Strahlung umgewandelt werden. Diese Frequenzverdopplung geschieht in einem Lithium-Triborat-Kristall (LiB₃O₅, LBO-Kristall). Der LBO-Kristall ist in den Resonator des Nd:YVO₄-Lasers eingebaut.

Durch einen dichroitischen Auskoppelspiegel des Nd:YVO₄-Resonators wird praktisch die gesamte 532 nm-Strahlung mit einer Leistung von 5 W nach außen zur Verfügung gestellt und kann im Laserkopf des Mai-Tai-Lasers zum Pumpen des Ti:Sa-Lasers benutzt werden.

In einem Titan-Saphir-Laser ist das aktive Lasermedium ein mit Ti³⁺-Ionen dotierter Saphir-Kristall. Die Absorption dieses Materials erstreckt sich über einen Bereich von ca. 400 nm bis 600 nm, das nutzbare Emissionsspektrum reicht von etwa 670 nm bis 1000 nm.

Der Ti:Sa-Laser als zweiter Bestandteil des Laserkopfes enthält neben dem Ti:Sa-Kristall einen akusto-optischen Modulator (AOM) für eine regenerative Modenkopplung und Prismen zur Dispersionskontrolle für die Erzeugung kurzer Pulse. Die Emissionswellenlänge wird durch eine Prismensequenz und eine positionierbare Spaltblende eingestellt.

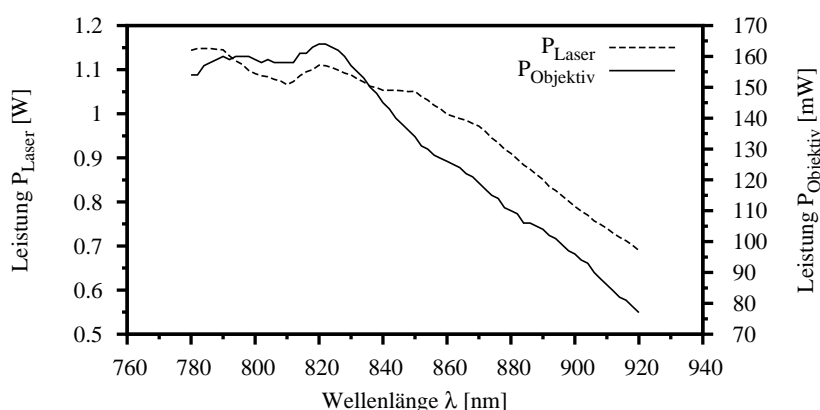


Abbildung 3.2.1: Wellenlängenabhängigkeit der Ausgangsleistung $P_{\text{Laser}}(\lambda)$ des Lasers und der Laserleistung nach dem Objektiv $P_{\text{Obj.}}(\lambda)$.

Für die Auswertung der mit dem TPLSM aufgenommenen Daten ist die Abhängigkeit der Ausgangsleistung – genauer der Leistung nach dem Mikroskopobjektiv $P_{\text{Obj.}}(\lambda)$, d. h. der tatsächlich in der Probe applizierten Leistung – von der eingestellten Wellenlänge wichtig. Abb. 3.2.1 zeigt diese $P_{\text{Obj.}}(\lambda)$ -Abhängigkeit

für den vorliegenden Aufbau. Bei der Messung wurden die Leistungswerte verglichen, wie sie vom MaiTai-Steuerungsprogramm des Herstellers und von einem Leistungsmessgerät (Messgerät: Coherent Fieldmaster GS, Messkopf: Coherent LM-10 HTD Quad Head) aufgenommen wurden.

Man sieht, dass die beiden Kurven $P_{\text{Obj.}}(\lambda)$ und $P_{\text{Software}}(\lambda)$ nicht parallel zu einander verlaufen. Ursache ist die nicht konstante Transmission der optischen Komponenten über den eingestellten Wellenlängenbereich. Mit einer Kalibrierungsmessung lässt sich aber zu jeder Messung die an die Probe gelieferte Leistung berechnen, wenn zu jeder Messung die Laserleistung und die Wellenlänge durch die Messroutine/Steuerungscomputer protokolliert werden.

Zum Abschluss fasst die folgende Tabelle 3.2.1 die wichtigsten technischen Spezifikationen des MaiTai-Lasers zusammen [87].

Tabelle 3.2.1: Ausgewählte Spezifikationen des SpectraPhysics MaiTai-Lasers [87]

SpectraPhysics MaiTai Ti:Sa-fs-Laser	
Wellenlängenbereich $\lambda_{\text{ex.}}$	780 nm – 920 nm
mittlere Leistung P	> 650 mW @ 850 nm
Pulsdauer τ	< 100 fs @ 850 nm
Repetitionsrate ν	80.0 MHz
Stabilität (2 h-Periode, konstante Temperatur ± 1 °C)	< 2%
räumliche Mode	TEM ₀₀
Strahldurchmesser ($1/e^2$ -Punkte)	< 2 mm
Strahldivergenz (voller Winkel)	< 1 mrad
Polarisation	> 500:1 horizontal

Charakterisierung des Coherent *Vitesse* Ti:Sa-fs-Lasers:

Für die Experimente, die in den Kap. 4.2, Kap. 4.3 und Kap. 4.5.1 beschrieben werden, ist noch der vorherige Aufbau des TPLSM verwendet worden. Bei diesem Aufbau fungierte statt des MaiTai-Lasers der Ti:Sa-fs-Laser *Vitesse* der Firma Coherent als Strahlungsquelle.

Der *Vitesse*-Laser arbeitet vom Prinzip her wie der MaiTai-Laser. Es handelt auch um einen Ti:Sa-Oszillator, der von einem dioden-gepumpten Festkörperlaser gepumpt wird. Der *Vitesse*-Laser ist allerdings ein festfrequenter Ti:Sa-Laser,

stattdessen kann seine Ausgangsleistung in einem Bereich, der einen stabilen gepulsten Betrieb erlaubt, geregelt werden.

Die folgende Tabelle 3.2.2 fasst einige Herstellerangaben zu den technischen Daten des Lasers zusammen.

Tabelle 3.2.2: Ausgewählte Herstellerangaben des Coherent *Vitesse* Ti:Sa-fs-Lasers [88], (X bzw. Y bezeichnet die x- bzw. y-Achse im Strahlprofil)

Coherent <i>Vitesse</i> Ti:Sa-fs-Laser	
Wellenlänge λ_{ex} .	800 ± 1 nm
cw-Leistung P	600 – 950 mW
Pulsdauer τ	< 100 fs
Repetitionsrate ν	80.0 ± 0.2 MHz
Stabilität (2 h-Periode, konstante Temperatur ± 1 °C)	< 1%
Strahldurchmesser (am Austrittsfenster)	X: 1.965 mm, Y: 1.326 mm
Strahldivergenz	X: 0.56 mrad, Y: 0.80 mrad
Polarisation	>100:1 horizontal

Zu der Pulsdauer τ des *Vitesse*-Lasers ist zu bemerken, dass sie nach Messungen von D. HELLWEG [37] am Austrittsfenster des Laser 80 fs beträgt und durch Anwendung der Dispersionskompensation des vorherigen TPLSM-Aufbaus auf etwa 42 fs in der Probe reduziert werden kann.

3.3 Charakterisierung des LaVision Biotec TriM-Scope

Das TriM-Scope der Firma LaVision Biotec ist ein kombiniertes Gerät, das alle optischen Komponenten enthält, die in einem TPLSM zwischen dem Laser und dem Mikroskop zur Strahlaufbereitung notwendig sind.

Die Strahlaufbereitung bei einem multi-fokalen Zwei-Photonen-Laser-Raster-Mikroskop – oft auch als Multifocal Multiphoton Microscope (MMM) bezeichnet, woraus sich die Bezeichnung TriM-Scope ableitet – umfasst die folgenden Komponenten: die Dispersionskompensation, den Strahlteiler und die Spiegelrasterereinheit. Dazu kommen noch als hilfreiche Komponenten ein Abschwächer um die Laserleistung zu regulieren und eine Teleskopanordnung zur Reduzierung des Strahldurchmessers. Es lässt sich auch noch eine weitere Teleskopanordnung zwischen den Raster spiegeln und dem Mikroskop dazuzählen, die den Durchmesser der Strahlen wieder aufweitet, um die rückwärtige Apertur des Mikroskopobjektives vollständig auszuleuchten.

Die folgende Abb. 3.3.1 zeigt den Strahlverlauf innerhalb des TriM-Scopes und die wichtigsten Komponenten sind gekennzeichnet.

Im Folgenden werden die wichtigsten Komponenten des TriM-Scopes genauer beschrieben.

Dispersionskompensation: Die Dispersionskompensation besteht aus einer Anordnung von zwei SF10-Prismen mit gefaltetem Strahlengang und einem Endspiegel, der den Laserstrahl zurück zum Anfang der Dispersionskompensation reflektiert, wobei der Strahl aber leicht höhenversetzt ist, um zu den nachfolgenden Komponenten zu gelangen.

Strahlteiler: Das Kernstück eines TPLSM mit Parallel Processing ist der Strahlteiler, der aus dem einen Strahl des Lasers die vielen Strahlen für die Rasterung der Probe erzeugt. Der Strahlteiler basiert auf dem Konstruktionsprinzip des Strahlteilers, der von T. NIELSEN *et al.* [16] entwickelt wurde.

Der Strahlteiler des TriM-Scopes erzeugt 64 Strahlen, die auf einer Linie liegen. Hervorzuheben ist, dass durch dieses Konstruktionsprinzip die Eigenschaften des Eingangsstrahles in allen Teilstrahlen erhalten bleiben. Die Eigenschaften und Vorteile dieser Strahlteilerkonstruktion sind schon detailliert in Kap. 2.4.2 beschrieben worden. Der prinzipielle Aufbau des Strahlteilers ist in Abb. 2.4.2 dargestellt, während Abb. 2.4.3 ein Foto der realen Konstruktion des Strahlteilers im

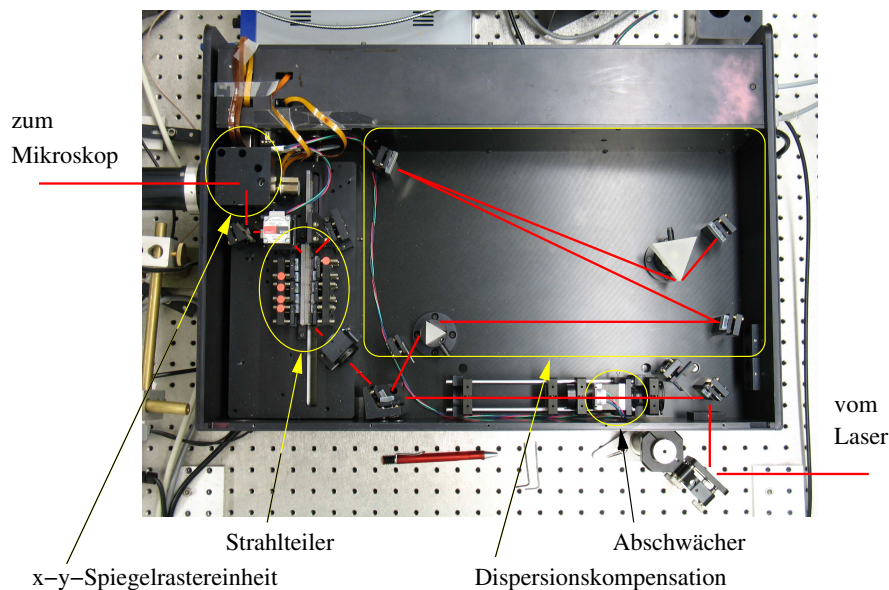


Abbildung 3.3.1: Innenansicht des LaVision Biotec TriM-Scope: der Strahlengang innerhalb des TriM-Scope ist eingezeichnet (rot) und die wichtigsten Komponenten sind gekennzeichnet.

TriM-Scope zeigt. Der theoretische Vorteil des Strahlteilers der leichten Erweiterbarkeit ist im TriM-Scope nicht vorgesehen. Stattdessen kann durch Verschieben des zentralen 50 %-Spiegels und Einführen eines hochreflektierenden Spiegels die Strahlanzahl in mehreren Schritten jeweils halbiert werden. Die übrigen Strahlen enthalten dann jeweils die doppelte Laserleistung.

Der Strahlteiler von T. NIELSEN *et al.* [16] verwendet zwei Stufen des oben beschriebenen Strahlteilers und erzeugt so eine matrixförmige 8×8 -Anordnung der Foki. Die linienförmige Anordnung der 64 Strahlen bietet aber aufgrund der Anwendungsorientierung einige Vorteile von der technischen Ausführung bis zur praktischen Anwendung. So wird nur eine Strahlteilerstufe benötigt, statt zweier Stufen für die matrixförmige Anordnung. Dies ermöglicht einen technisch viel einfacheren Aufbau, denn die Spiegelsubstrate können in ihrer Größe reduziert werden – in der zweiten Strahlteilerstufe der matrixförmigen Anordnung müssen prinzipbedingt deutlich größere Spiegel als in der ersten Stufe verwendet werden. Kleinere Spiegel haben aber den Vorteil, dass sie aufgrund geringerer Unebenheiten eine bessere Qualität haben. Zudem wird die Justierung der Strahlen einfacher, wenn nur ein Strahlteiler vorhanden ist.

Die linienförmige Strahlanordnung ermöglicht auch über einen größeren Bereich ein homogeneres Rastergebiet, d. h. eine gleichmäßigere Verteilung des Anregungslasers über das Rastergebiet. Die ideale matrixförmige Strahlanordnung mit großen Fokiabständen wie in Kap. 2.4.1 lässt sich nur schwer realisieren, dazu kommen unter Umständen größere Probleme in der Bildverarbeitung (vgl. Kap. 2.4.3). Deshalb ist es einfacher, mit einer Matrixanordnung mit kleinen Fokiabständen im 2 μm -Bereich das gesamte Gebiet abzurastern. Dies führt allerdings zu deutlich breiteren inhomogenen Rändern des Rastergebietes. Diese werden mit der Linienanordnung vermieden. Die beiden folgenden Bilder der Abb. 3.3.2 zeigen den Vergleich der Homogenität der Rastergebiete – genauer der Fluoreszenzintensitäten aus einer Rhodamin 6G-Lösung – bei matrixförmiger und linienförmiger Strahlanordnung. In beiden Fällen wird die Strahlanordnung über das gesamte Rastergebiet gerastert. Zu erkennen ist, dass die linken und rechten Ränder der linienförmigen Strahlanordnung schmaler sind. Somit grenzen die Ränder des Rastergebietes die Größe des Rastergebietes in Bezug auf eine homogene Fluoreszenzanregung nicht ein.

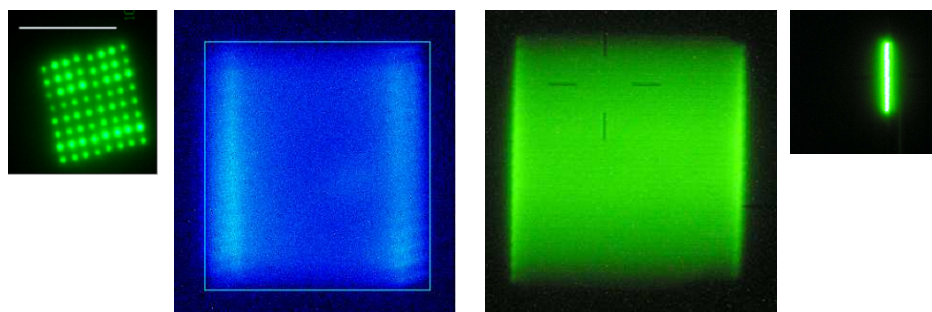


Abbildung 3.3.2: Vergleich der Homogenität der Rastergebiete bei matrixförmiger und linienförmiger Strahlanordnung. Links die Fluoreszenz einer Rhodamin 6G-Lösung bei Verwendung der matrixförmigen Strahlanordnung, die über das gesamte Rastergebiet rastert. Rechts die gleiche Art der Fluoreszenz bei Verwendung der linienförmigen Strahlanordnung. Der Balken im linken kleinen Bild hat eine Länge von 10 μm , im rechten kleinen Bild ist die Linie der 64 Foki etwa 30 μm lang.

Die linienförmige Anordnung der Strahlen erlaubt im non-descanned Modus auch die Verwendung eines Spektrometers als Detektor, denn die Linie der Laserfoki kann bei stehenden Raster spiegeln auf den Eintrittspalt des Spektrometers abgebildet werden. Zudem kann die Linie durch eine y-Rasterung quasi verlängert werden, indem die Foki parallel zur Linie der Foki bewegt werden.

Für ein großes Rastergebiet müssen die Rasterspiegel in x- und y-Richtung bewegt werden. Die reine x-Rasterung, d. h. Bewegung der Foki senkrecht zur Linienanordnung, ermöglicht neben einem sehr homogenen Rastergebiet auch eine sehr schnelle Bildaufnahme, denn die Rasterspiegel können mit einer Frequenz von $v_x = 1$ kHz betrieben werden, so dass die Signalstärke und die Geschwindigkeit der CCD-Kamera die Bildaufnahmegeschwindigkeit bestimmen. Obwohl die Bewegung in der y-Richtung fehlt, hat das Rastergebiet eine große Ausdehnung in y-Richtung von etwa $30 \mu\text{m}$. Legt man die x-Richtung auf $70 \mu\text{m}$ fest, so lassen sich in diesem Rastergebiet problemlos auch große Pflanzenzellen untersuchen, die eben eine solche Größe haben. Dabei ist es unerheblich, ob die Zellen einzeln vorliegen, z. B. als Suspensionszellen, oder sich im Zellverband befinden.

Spiegelrastereinheit: Die Spiegelrastereinheit besteht aus zwei VM500-Spiegelantrieben der Firma GSI Lumonics, die auf zueinander senkrechten Achsen in einem Gehäuse montiert sind. Die zugehörige Steuerungselektronik ist zusammen mit der Stromversorgung des gesamten TriM-Scopes ebenfalls im TriM-Scope untergebracht. Bei den Spiegelrastereinheiten der VM500-Serie handelt es sich um Drehspul-Galvanometer (moving-magnet galvanometer), die durch eine angelegte Spannung den angetriebenen Spiegel verdrehen und so den auf den Spiegel treffenden Laserstrahl ablenken können. Die Tabellen 3.3.2, 3.3.3 und 3.3.4 am Ende dieses Kapitels fassen die wichtigsten technischen Daten zusammen und geben auch die Daten der Ansteuerungselektronik wieder.

Die Ansteuerungselektronik besteht aus der SC2000-Mikrocontroller-Karte und zwei MiniSAX-Treiberkarten, die die Computersteuerung der VM500-Spiegelmotoren ermöglichen. Dabei wandelt die SC2000-Karte die digitalen Befehle des Computers in die Steuerspannungen für die beiden Spiegelmotoren um. Diese Steuerspannung wird von den beiden MiniSAX-Karten aufbereitet und die aufbereiteten Steuerspannungen werden an die VM500-Motoren weitergegeben. Ein Positionsrückmeldungssignal wird von den MiniSAX-Karten aufgenommen und an die SC2000-Karte zur Verarbeitung weitergeleitet.

weitere Komponenten: Die vorigen Abschnitte beschrieben die wichtigsten Komponenten des TriM-Scopes, in diesem Abschnitt sollen noch die weiteren Komponenten des TriM-Scopes erwähnt werden.

Bevor der Laserstrahl in die Dispersionskompensation eintritt, durchläuft er einen Abschwächer zur Regelung der Strahlintensität und eine Teleskopanordnung zur Anpassung des Strahldurchmessers.

Der Abschwächer besteht aus einem $\lambda/2$ -Plättchen und einem nachfolgenden Dünnschichtpolarisator und arbeitet nach dem Prinzip der gekreuzten Polarisatoren. Das $\lambda/2$ -Plättchen kann durch einen Schrittmotor gedreht werden. Der fest eingebaute Dünnschichtpolarisator legt durch seine Ausrichtung die Polarisation für den weiteren Strahlverlauf fest, wobei allerdings diese horizontale Polarisation durch die Eigenschaften der folgenden optischen Komponenten im Gerät schon festgelegt ist und der Dünnschichtpolarisator auf diese horizontale Polarisation einjustiert wird.

Nach dem Abschwächer wird der Durchmesser des Laserstrahles durch eine Teleskopanordnung zweier Linsen reduziert, um den Strahldurchmesser an die Strahlteilerspiegel anzupassen und die Strahldivergenz des Lasers zu kompensieren. Zudem lässt sich so erreichen, dass für verschiedene Objektive deren jeweilige rückwärtige Apertur vollständig ausgeleuchtet wird. Anderenfalls würde die effektive Numerische Apertur und somit auch die erreichbare Auflösung reduziert.

Nachdem der Laserstrahl die Dispersionkompensation und den Strahlteiler durchlaufen hat, treten aus dem Strahlteiler zwei Bündel von je 32 Strahlen aus, die aufgrund des Konstruktionsprinzipes des Strahlteilers die gleichen Eigenschaften wie der Eingangsstrahl haben. Das eine Bündel trifft auf einen Polarisator, der die Polarisation um 90° dreht, das andere Strahlbündel behält seine ursprüngliche Polarisation.

An dieser Stelle des Strahlenganges ist ein Schrittmotor-betriebener Shutter positioniert, mit dem eines dieser beiden Strahlbündel, beide oder auch keines geblockt werden kann.

Anschließend werden die beiden Strahlbündel in einem Polarisationswürfel zusammengeführt, so dass die Strahlen abwechselnd eine der beiden Polarisationen besitzen. Es entsteht so die Linie aus 64 Laserstrahlen mit alternierender Polarisation in den einzelnen Strahlen.

Nachdem die 64 Strahlen die Spiegelrastereinheit durchlaufen haben, wird ihr Strahldurchmesser von einer Teleskopanordnung bestehend aus der Rasterlinse ($f = 50$ mm) und der nachfolgenden Tubuslinse ($f = 180$ mm) um den Faktor $180/50 = 3.6$ aufgeweitet. Diese Aufweitung ist für alle 64 Strahlen notwendig, damit die rückwärtige Apertur des Mikroskopobjektives vollständig ausgenutzt wird, um die höchste Auflösung zu erreichen.

Die folgenden Tabellen [3.3.1](#), [3.3.2](#), [3.3.3](#) und [3.3.4](#) fassen die wichtigsten technischen Daten des TriM-Scopes zusammen, sofern sie nicht in den Spezifikationen der weiteren Geräte genannt werden.

Tabelle 3.3.1: Ausgewählte Spezifikationen des LaVision Biotec TriM-Scope [89]

LaVision Biotec TriM-Scope	
Dispersionskompensation	120 fs in der Objektebene, für eingehende Laserpulslänge von 100 fs, und abhängig vom benutzten Objektiv
Polarisation	500:1 horizontal, eingehender Strahl alternierend s-p-s-p-s-p-..., ausgehende Strahlen
Transmissionsgrad	>70 % @710 nm – 980 nm
Anzahl der Foki	1, 2, 4, 8, 16, 32, 64 per Software einstellbar
zeitlicher Abstand benachbarter Strahlen	~680 fs
Fokusgröße	beugungsbegrenzt, abhängig vom benutzten Objektiv: 300 nm für x63-Objektiv, 1.4 <i>N.A.</i>
maximale Rasterfrequenz	1.2 kHz

Tabelle 3.3.2: Ausgewählte Spezifikationen der GSI Lumonics VM500-Raster-spiegelantriebe [90,91]

GSI Lumonics – Optical Scanners VM500 galvanischer Drehspulmotor mit kapazitiver Positionsrückmeldung	
Spiegelapertur	4–6 mm
maximaler Stellwinkel	±50°
Stellwinkel (typisch)	±6.2°
Rasterfrequenz (typisch)	1.0 kHz

Tabelle 3.3.3: Ausgewählte Spezifikationen der GSI Lumonics MiniSAX-Treiberkarte [92, 93]

GSI Lumonics MiniSAX – Miniature Single Axis Driver
Ansteuerungs-/Treiberelektronik der VM500-Motoren

Eingangsspannung für Steuerbefehle	± 3 V, differentiell für vollen Winkel
Ausgangsspannung zur Motorpositionierung	± 3 V, differentiell für vollen Winkel

Tabelle 3.3.4: Ausgewählte Spezifikationen der GSI Lumonics SC2000-Schnittstellenkarte [94]

GSI Lumonics SC2000 – Two Axis Scan Controller
Schnittstellenkarte zur Steuerung der MiniSAX-Karten,

Ansteuerung	Computergestützt an PC-Schnittstelle über serielles Datenkabel oder elektronisch über Steuersignaleingänge
MiniSAX-Schnittstelle	doppelte D/A-Wandler mit ± 3 V, 16 Bit zur Erzeugung der Steuerspannung für MiniSAX-Karte, dazu 16 Bit-A/D-Wandler für Positionsrückmeldung von MiniSAX-Karte
PC-Schnittstelle	RS232-Schnittstelle mit bis zu 115 kBaud

3.4 Charakterisierung des Olympus IX70-Mikroskopes

In diesem Aufbau wurde als Mikroskop das Olympus IX70 verwendet. Das IX70 ist ein inverses Lichtmikroskop, das sowohl für Durchlicht-/Hellfeld-Mikroskopie als auch für Fluoreszenzmikroskopie verwendet werden kann.

Der inverse Aufbau ermöglicht einen einfachen Zugang zur Probe von oben ohne ein störendes Objektiv, wodurch eventuelle Manipulationen der Probe leicht möglich sind. Auch im Hinblick auf den Aufbau eines TPLSM bietet ein inverses Mikroskop den Vorteil einer einfacheren Strahlführung. Für den Epifluoreszenzbetrieb besitzt das IX70 eine Quecksilberdampflampe (Hg-Lampe) mit zugehörigem Kondensator, die am hinteren Zugang angebracht ist.

Neben einem Binokular ermöglicht ein linksseitiger Ausgang des IX70 den Anschluss eines Detektors, der in der Regel eine Kamera ist, aber auch ein Spektrometer sein kann. In einer Kassette unterhalb des Objektives sind bis zu vier Halterungen für Spiegel und Filter untergebracht. Im vorliegenden Aufbau enthielt die Kassette einen Halter mit dem dichroitischen 45°-Spiegel und darunter dem Zwei-Photonen-Sperrfilter, der die Reflexionsreste des Anregungslichtes aus dem Fluoreszenzsignal herausfiltert. Abb. 3.4.1 zeigt die Transmissionskurven des Dichroiten und des Sperrfilters.

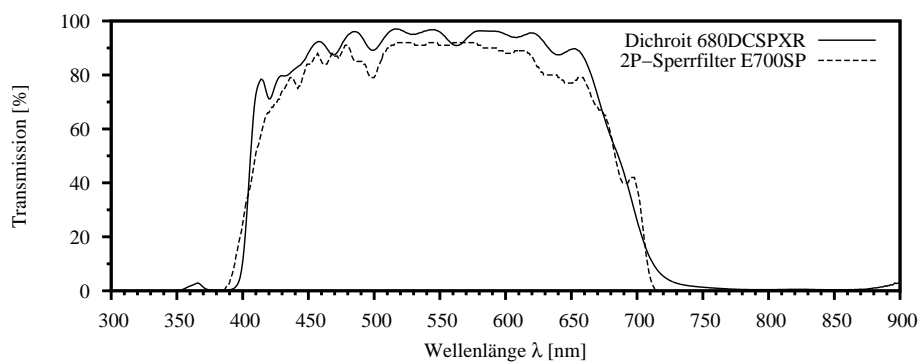


Abbildung 3.4.1: Transmissionskurven des Dichroiten 680DCSPXR und des Zwei-Photonen-Sperrfilters E700SP, beide Filter von AHF Analysentechnik AG

Zu erkennen ist, dass beide Filter in ihrer jeweiligen Funktion für die Anregungswellenlänge hochreflektierend sind bzw. keine Transmission besitzen, und für das Fluoreszenzlicht im VIS-Bereich hochtransparent sind.

Anstelle der Fluoreszenzbeleuchtung mit Hilfe der Hg-Lampe wird im vorliegenden Aufbau der Laserstrahl durch den hinteren Eingang in das Mikroskop eingekoppelt, so dass der Strahlengang für ein TPLSM im descanned Modus, wie in Kap. 2.3.1 beschrieben, realisiert wird. Die in Kap. 3.3 erwähnte Tubuslinse ist im Abstand ihrer Brennweite ($f = 180 \text{ mm}$) von der hinteren Apertur des Objektivs positioniert. Dadurch passieren alle 64 Strahlen, die konvergent aus dem TriM-Scope austreten, vollständig die hintere Apertur.

Für die Messungen wurden drei Objektive verwendet: das Olympus UPlanApo 60x / 1.20W, das Olympus UPlanApo/IR 60x / 1.20W und das Olympus LUMPlanFL/IR 40x / 0.80W. Alle Objektive haben eine große Numerische Apertur, um eine hohe Auflösung zu ermöglichen (vgl. Gl. (2.5.8) auf Seite 53). Die Objektive sind alle Wasserimmersionsobjektive, bei denen ein Tropfen destilliertes Wasser für eine Brechungsindexanpassung zur Probe sorgt. Das x40-Objektiv hat zudem einen großen Arbeitsabstand von $d = 3.4 \text{ mm}$, der insbesondere für die Untersuchungen von Nervenzellen im Gehirn einer lebenden Fliege notwendig ist (vgl. Kap. 4.5).

Für Experimente mit Mehrfachfärbungen der Probe können verschiedene Emissionsfilter in einen selbstkonstruierten Filterhalter eingesetzt werden, der zwischen dem linksseitigen Ausgang des IX70 und der CCD-Kamera positioniert ist.

Die folgenden Tabelle 3.4.1 fasst die wichtigsten Spezifikationen des Olympus IX70-Mikroskopes zusammen.

Zum Schluss zeigt Abb. 3.4.2 die Transmissionskurven der verwendeten Emissionsfilter für CFP, GFP und YFP.

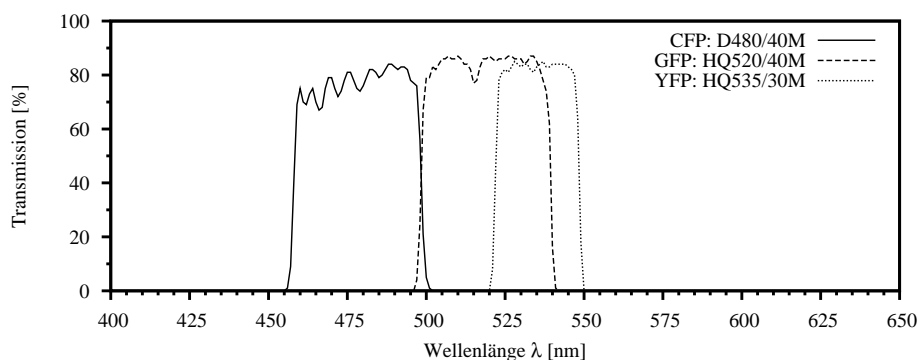


Abbildung 3.4.2: Transmissionskurven der Emissionsfilter für CFP, GFP und YFP, alle drei Filter von AHF Analystechnik AG

Tabelle 3.4.1: Ausgewählte Spezifikationen des Olympus IX70 Mikroskopes [95,96]

Olympus IX70 inverses Lichtmikroskop	
Mikroskopmodell	IX70
Mikroskoptyp	inverses Durchlicht-/Fluoreszenzmikroskop
Lasereinkopplung für TPLSM-Betrieb	rückwärtiger Eingang (eigentlich für Hg-Lampe)
zusätzliche Optik für LSM-Betrieb	dichroitischer 45°-Spiegel: 2P-Strahlteiler 680DCSPXR, Sperrfilter gegen Reste des Anregungslasers: 2P-Sperrfilter E700SP, AHF Analysentechnik AG
Detektoranschluss	linksseitiger Ausgang mit Tubuslinse $f = 180$ mm
Emissionsfilter	D480/40M für CFP HQ520/40M für GFP HQ535/30M für YFP AHF Analysentechnik AG
Objektive mit Arbeitsabstand d	Olympus UPlanApo 60x / 1.20 W, $d = 0.25$ mm Olympus UPlanApo/IR 60x / 1.20 W, $d = 0.28$ mm Olympus LUMPlanFL/IR 40x / 0.80 W, $d = 3.4$ mm

3.4.1 z-Positionierung der Beobachtungsebene

Für dreidimensionale Aufnahmen oder eine exakte Festlegung der Beobachtungsebene innerhalb der Probe ist eine präzise Positionierung der Rasterebene entlang der z-Achse, d. h. der optischen Achse des Objektivs, notwendig.

Diese Positionierung kann durch einen schrittmotorangetriebenen Feintrieb des IX70 realisiert werden oder wie im vorliegenden Aufbau durch ein piezoelektrisches Stellelement (z-Piezotranslator). Der z-Piezotranslator ist ein Modell P-721.10 von PI (Physik Instrumente GmbH) mit dem Steuergerät E-662.LR. Der z-Piezotranslator hat eine Positionsrückmeldung, die die Steuerspannung durch das Steuergerät aktiv so regelt, dass die tatsächliche Position mit der eingestellten Position übereinstimmt.

Nach Kap. 2.5.2 liegt die praktisch erreichbare axiale Auflösung bei $\Delta z = 0.7 \mu\text{m}$, so dass in der Programmierung des TPLSM eine typische kleinste Schrittweite von $\delta z_{\text{Piezo}} = 0.1 \mu\text{m}$ ausreichend ist.

Die folgende Tabelle 3.4.2 fasst die wichtigsten Spezifikationen des Piezotranslators und des Steuergerätes zusammen.

Tabelle 3.4.2: Ausgewählte Spezifikationen des z-Piezotranslators von PI (Physik Instrumente GmbH) [97, 98]

PI Piezotranslator P-721.10	
z-Piezotranslator	Modell P-721.10
Steuergerät	Modell E-662.LR LVPZT Position Servo Controller
Computerschnittstelle	RS-232
D/A-Wandler	12 Bit Auflösung
maximaler Stellweg	100 μm
minimale Schrittweite	0.025 μm
Positionssensor	LVDT

3.4.2 Bestimmung der PSF / Auflösung

Bei der Beschreibung eines Mikroskopes ist die Auflösung eine wichtige Größe. Deshalb zeigt dieser Abschnitt eine Möglichkeit auf, die Auflösung des IX70 zu bestimmen.

Nach Kap. 2.5.1 definiert sich aus der Überlagerung zweier AIRY-Scheibchen der Abstand zweier Punktlichtquellen, die noch als getrennt wahrgenommen werden können. Wird das Halbwertsbreiten-Kriterium zur Definition der Auflösung verwendet, so haben zwei noch als getrennt geltende Punktlichtquellen gerade den Abstand der vollen Halbwertsbreite (FWHM) des Intensitätsprofils eines AIRY-Scheibchens. Dieser Ansatz ermöglicht die Bestimmung der Auflösung, indem der Laserfokus über eine möglichst kleine (d. h. mindestens um den Faktor fünf kleiner als die theoretische Auflösung) Fluoreszenzlichtquelle gerastert und zu jeder Rasterposition die Fluoreszenzintensität gemessen wird, also das Intensitätsprofil des Fokus aufgenommen wird. Dieser Ansatz ist aber im vorliegenden Aufbau nicht realisiert worden, die Spiegelscanner und die CCD-Kamera hätten für diese Aufgabe in einer eigenen Ansteuerung aufwendig neuprogrammiert werden müssen.

Zur Auflösungsbestimmung wurde stattdessen die FWHM des AIRY-Scheibchens/der Punktantwortfunktion (PSF) mittels eines Autokorrelationsalgorithmus aus einer Bildserie von Punktlichtquellen berechnet.

Als Punktlichtquellen wurden Quantendots (Qdot 605 Streptavidin Conjugates, Quantum Dot Corporation) verwendet, die eine intensive Fluoreszenz zeigen und sehr photostabil sind verglichen mit typischen Fluoreszenzfarbstoffmolekülen. Quantendots werden genauer in Kap. 4.1 beschrieben, hier soll die Tatsache ausreichend sein, dass sie als sehr kleine Lichtquellen – quasi als Punktlichtquellen – dienen. Die Bestimmung der PSF stellt eine Anwendung von Quantendots dar und wird deshalb im Detail im Ergebniskapitel Kap. 4.1 beschrieben.

Für das 40x-Objektiv ($N.A. = 0.80$, Wasserimmersion) wurde eine PSF mit einer FWHM von $\Delta x = 560$ nm gemessen. Für das 60x-Objektiv ($N.A. = 1.2$, Wasserimmersion) zusammen mit der internen 1.5-fach Vergrößerung des Olympus IX70-Mikroskopes beträgt die gemessene FWHM der PSF $\Delta x = 350$ nm.

Weitere Details zur Berechnung der PSF werden in Kap. 4.1 dargestellt.

3.5 Charakterisierung der Andor iXon EMCCD-Kamera

Im vorliegenden TPLSM-Aufbau wurde als Detektor eine CCD-Kamera vom Typ iXon EMCCD der Firma Andor verwendet. Bei dieser Kamera handelt es sich um eine neue Generation von sogenannten „back-illuminated electron-multiplying“ CCD-Kameras, die sich durch eine sehr hohe Quanteneffizienz, einen in den CCD-Chip integrierten Elektronenvervielfacher, ein geringes Rauschsignal und eine hohe Bildrate auszeichnet.

Üblicherweise ist auf der Vorderseite des CCD-Chips die Pixelstruktur mit Leiterbahnen und weiteren Komponenten wie z. B. Mikrolinsen aufgebracht und der CCD-Chip wird von der Vorderseite beleuchtet. Bei den back-illuminated CCD-Kameras wird der CCD-Chip von der Rückseite beleuchtet. Weil das Trägermaterial des Chips auf der Rückseite im Bereich der sensitiven Fläche deutlich dünner hergestellt wird, wird eine hohe Quanteneffizienz von $\gamma_{EMCCD} > 90\%$ erreicht.

Die Elektronen-vervielfachende Eigenschaft des CCD-Chips stammt aus einem zwischen dem üblichen Ausleseregister und dem Ausleseverstärker geschalteten Verstärkungsregister. Die Elektronen der einzelnen Pixel durchlaufen die Zellen dieses Schieberegisters und werden dabei durch Stoßionisation vervielfältigt, denn die Zellen des Verstärkungsregisters liegen auf einem deutlich höheren Potential (zwischen 40 V – 60 V), als es zum reinen Transport zwischen den Zellen notwendig wäre. Durch diese Elektronenvervielfachung können auch sehr schwache Signale auf ein Niveau verstärkt werden, das oberhalb des Rauschens der nachfolgenden Ausleseelektronik liegen.

Abb. 3.5.1 skizziert dieses Prinzip der Elektronenvervielfachung. Im linken Teil der Abb. 3.5.1 ist die Ausgangssituation gezeigt: einige Elektronen befinden sich in einer Zelle (R1), deren Potentialtiefe der normalen Taktspannung (normal clocking voltage) entspricht. Im rechten Teil der Abb. 3.5.1 ist der Transfer in die nächste Registerzelle (R3) dargestellt. Dabei liegt diese Zelle auf dem deutlich höheren Verstärkungspotential. Der Verstärkungsfaktor kann durch die softwaregesteuerte Änderung des Verstärkungspotentials variiert werden.

Die Größe des CCD-Chips von 512×512 Pixeln erlaubt bei einer Pixelgröße von $16 \mu\text{m} \times 16 \mu\text{m}$ ein großes Sichtfeld bei einer gleichzeitigen hohen Pixelauflösung. Bei einer Vergrößerung von x40 durch das Objektiv entspricht ein Pixel somit $400 \text{ nm} \times 400 \text{ nm}$ in der Probe, bei einer Vergrößerung von x90 entspricht ein Pixel $177 \text{ nm} \times 177 \text{ nm}$. Diese Pixelauflösung ist besser als die

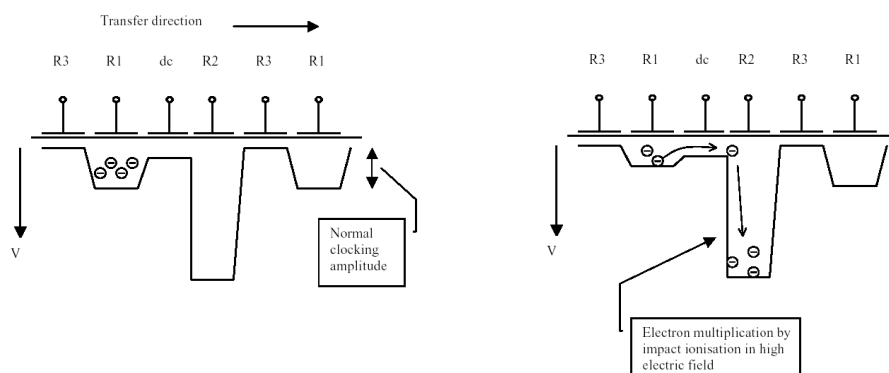


Abbildung 3.5.1: Prinzip des Verstärkungsregisters der EMCCD-Kamera [99]: Links: Ausgangssituation mit einigen Elektronen in der Registerzelle R1. Rechts: Elektronenvervielfachung beim Transport in die nächste Registerzelle R3 durch das hohe Verstärkungspotential, das eine Stoßionisation bewirkt.

beugungsbegrenzte Auflösung der Foki und dennoch umfasst der CCD-Chip eine maximale Fläche von ca. $90 \mu\text{m} \times 90 \mu\text{m}$. Dieses Sichtfeld ist somit immer noch ausreichend, um einzelne Pflanzenzellen zu untersuchen.

Für den empfindlichen Nachweis des Fluoreszenzlichtes ist das Rauschen des Detektors die begrenzendende Größe. Deshalb kann der CCD-Chip der Andor iXon EMCCD-Kamera bis auf $T_{\text{CCD}} = -70 \text{ }^\circ\text{C}$ gekühlt werden (mit angeschlossener Wasserkühlung bis auf $T_{\text{CCD}} = -90 \text{ }^\circ\text{C}$), so dass das thermische Rauschen auf ein Minimum reduziert wird und schwache Signale immer noch oberhalb der Rauschschwelle liegen.

Die hohe Bildrate wird durch die hohe Pixelausleserate von 10 MHz erreicht. Die in einem Experiment erreichbare Bildrate hängt von der tatsächlichen Bildgröße und der Belichtungszeit ab. Es kann mit Binning gearbeitet werden, wobei mehrere Pixel des CCD-Chips zu einem Pixel zusammengefasst und als ein Pixel ausgelesen werden. Es ist auch möglich, nur Teilbereiche des CCD-Chips auszulesen. Die Kamera erlaubt zudem den Frametransfer-Betrieb, bei dem die Belichtungszeit so lang ist, wie es dauert, den CCD-Chip auszulesen. In diesem Frametransfer-Modus erreicht die Kamera eine Bildrate von 144 Bildern pro Sekunde (bei einem 1×4 -Binning und einem 256×256 Pixel großen Teilbild).

Schließlich erlaubt die Digitalisierung der Daten mit 14 Bit einen großen Dynamikbereich der detektierten Signale, d. h. die gemessenen Intensitätswerte können in einem Wertebereich von $I = 0 \dots 16384$ dargestellt werden.

Die folgende Tabelle 3.5.1 fasst die wichtigsten Spezifikationen der Andor iXon EMCCD-Kamera zusammen.

Tabelle 3.5.1: Ausgewählte Spezifikationen der Andor iXon EMCCD-Kamera [100, 101]

Andor iXon EMCCD-Kamera	
Modell	DV887DCS-BV back-illuminated Sensor mit 550 nm Antireflex-Beschichtung
Anzahl Pixel	512 × 512
Pixelgröße	16 μm × 16 μm
Quanteneffizienz (@ $T_{\text{CCD}} = -20 \text{ }^\circ\text{C}$)	>90% @ 500 nm – 650 nm
Rauschen (typisch)	
ohne Verstärkung	100 e ⁻ @ 10 MHz
mit EM-Verstärkung	<1 e ⁻ @ 10 MHz
Ausleserate	10 MHz
Bildrate	32 bps – >200 bps
D/A-Wandler	14 Bit Auflösung
CCD Empfindlichkeit	23 e ⁻ /count
Elektronen-Vervielfältigung	
Verstärkungsfaktor	1 – 1000-fach
typische CCD-Chip Temperatur	$T_{\text{CCD}} = -70 \text{ }^\circ\text{C}$

3.5.1 Empfindlichkeit des TPLSM unter typischen Messbedingungen

Um die Empfindlichkeit der iXon EMCCD-Kamera unter typischen Mikroskopie-Bedingungen zu demonstrieren, wurde eine Konzentrationreihe der beiden Fluoreszenzfarbstoffe CFP und YFP vermessen. Von diesen beiden Lösungen wurde jeweils ein Tropfen von 20 μl auf den Objektträger gegeben und mit den Strahlen in einer reinen Zeilenrasterung mit der Frequenz $\nu_x = 1.011 \text{ kHz}$ abgerastert, so dass eine leuchtende Fläche von 35 μm × 27 μm entstand. Über diese Fläche wurde das mittlere Signal berechnet. Die Belichtungszeit betrug mit

$t_{\text{BLZ,CFP}} = 10$ sec. bei der CFP-Lösung doppelt so lange wie bei der YFP-Lösung ($t_{\text{BLZ,YFP}} = 5$ sec.). Im Detektionsstrahlengang befand sich jeweils der zugehörige Emissionsfilter (CFP: D480/40M, YFP: HQ535/30M).

Die Laserleistung betrug bei der CFP-Probe 157 mW bei einer Anregungswellenlänge von $\lambda_{\text{ex.}} = 830$ nm, bei der YFP-Probe war die Leistung 86 mW bei $\lambda_{\text{ex.}} = 910$ nm. Bei diesen Leistungen liegt die maximale Leistung pro Strahl deutlich unter 10 mW – dem Wert, der für die biologischen Proben noch unschädlich ist (vgl. Kap. 2.8.1).

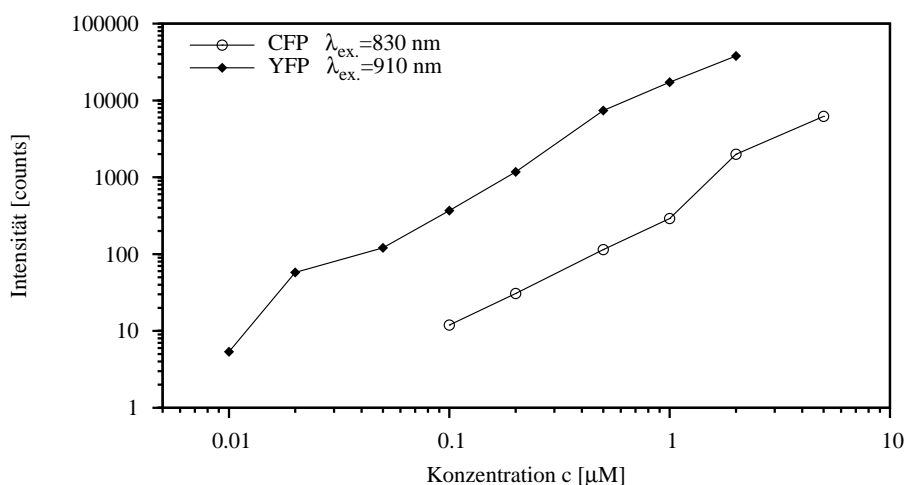


Abbildung 3.5.2: Konzentrationsreihe einer CFP- und einer YFP-Lösung unter typischen Messbedingungen.

Die Abbildung 3.5.2 zeigt, dass CFP bis zu einer Konzentration von $c_{\text{CFP}} = 0.1 \mu\text{M}$ unter den gegebenen typischen Messbedingungen detektiert werden kann. YFP kann sogar bis zu einer Konzentration von $c_{\text{YFP}} = 0.01 \mu\text{M}$ detektiert werden, wobei für beide Lösungen bei der geringsten Konzentration das Signal um einen Faktor 1.4 über dem Rauschen des Dunkelbildes lag. Die Ursache, dass das YFP in einer geringeren Konzentration als das CFP detektierbar ist, dürfte am größeren Zwei-Photonen-Wirkungsquerschnitt gegenüber dem CFP liegen, wie es auch von BD BIOSCIENCES CLONTECH [102] qualitativ durch die Angabe der Helligkeit ausgedrückt wird.

Kapitel 4

Anwendungen der multifokalen Zwei-Photonen- Laser-Raster-Mikroskopie

Die Geräte, die im vorigen Kapitel 3 beschrieben und im vorliegenden TPLSM-Aufbau verwendet wurden, erlauben mit ihrer Empfindlichkeit und Geschwindigkeit die Anwendung der Zwei-Photonen-Laser-Raster-Mikroskopie auf neue Fragestellungen in der Biologie, Chemie und Physik.

Die folgenden Kapitel beschreiben Experimente, die größtenteils mit diesem neuen Aufbau gemacht wurden.

Das erste Kapitel (Kap. 4.1) zeigt die prinzipielle Fähigkeit des Nachweises von Quantendots mit dem Multistrahl-TPLSM. Es können einzelne Quantendots auch noch mit sehr kurzen Belichtungszeiten beobachtet werden. In diesem Kapitel wird auch die Anwendung der Quantendots als Quasi-Punktlichtquelle zur Bestimmung der PSF des Mikroskopes beschrieben, um damit die maximal erreichbare Auflösung des hier realisierten TPLSM-Aufbaus abschätzen zu können.

In Kap. 4.2 wird die Methode der Bildaufnahme ohne Rasterung vorgestellt. Dabei sind die Foki in einer 8×8 -Matrixanordnung so eng benachbart, dass sie eine leuchtende Fläche bilden. Zwar lässt sich auch mit einem einzelnen Strahl ein lateral ebenso großer Fokus erzeugen, aber dabei geht die axiale Auflösung verloren. In der hier beschriebenen Methode einer leuchtenden Fläche bleibt dagegen die axiale Auflösung erhalten, da auch die Schicht der 8×8 anregenden Foki die axiale Ausdehnung eines einzelnen Fokus besitzt.

Kap. 4.3 diskutiert die Anwendung der Multistrahl-TPLSM in der Chemie. Ein neues Untersuchungsgebiet ist die Selbstorganisation anorganischer Materie,

wie sie bei der Schalenbildung biomineralisierender Organismen, z. B. bei Diatomeen (Kieselalgen), vorkommt. Bei der Untersuchung eines biomimetischen Modellsystems zur Schalenbildung konnte auch das Multistrahl-TPLSM erfolgreich bei der Fragestellung nach dem inneren Aufbau des Modellsystems eingesetzt werden.

In der Biologie haben die fluoreszierenden Proteine als Fluoreszenzfarbstoffe eine große Bedeutung gewonnen. In einem mit dem hier realisierten TPLSM-Aufbau durchgeführten Experiment wurden mit GFP fusionierte Proteine zur *in vivo*-Lokalisierung von strukturellen Komponenten der mit dem Golgi-Apparat assoziierten Transportvesikel in Wurzelzellen benutzt. In Kap. 4.4 werden die Messungen beschrieben, die die Untersuchung der Dynamik und der Lokalisierung dieser GFP-markierten Vesikel ermöglichen.

Die hohe Bildrate des hier realisierten Multistrahl-TPLSM erlaubt auch neue Untersuchungsmethoden in der Neurophysiologie. Kap. 4.5 beschreibt die Messungen zur Ausbreitung des Kalzium-Signals in Nervenzellen, wie es nach visueller Stimulation in den richtungs-selektiven Neuronen eines Fliegenhirn entsteht.

4.1 Bestimmung der maximal erreichbaren Auflösung mit Hilfe von Quantendots

Eine wichtige Größe zur Charakterisierung eines Mikroskopes ist die erreichbare Auflösung, die angibt, welchen minimalen Abstand zwei Objekte in der Probe noch haben dürfen, um sie noch als getrennt zu detektieren. Vereinfacht ausgedrückt bestimmt die Auflösung, welche Details in der Probe erkennbar sind. Wie in Kap. 2.5 beschrieben, wird eine Punktlichtquelle durch das optische System des Mikroskopes in ein AIRY-Scheibchen abgebildet. Genauer gilt dies für optische Systeme mit kreisrund begrenzten optischen Komponenten, wie z. B. Lochblenden. Im Allgemeinen führt die Abbildung der Punktlichtquelle durch das optische System zu einer elektrischen Feldverteilung in der Bildebene, die durch die Punktantwortfunktion (PSF¹) beschrieben wird. Für eine Punktlichtquelle besitzt die PSF die kleinste Ausdehnung, so dass die Bestimmung der PSF auch die Bestimmung der maximal erreichbaren Auflösung des betrachteten optischen Systems mit Hilfe z. B. des RAYLEIGH-Kriteriums ermöglicht.

Für die Bestimmung der erreichbaren Auflösung des hier realisierten TPLSM-Aufbaus wurden sogenannte Quantendots als Fluoreszenzlichtquellen verwendet.

¹nach der englischen Bezeichnung: Point Spread Function = PSF

Auch wenn die Quantendots mit ihrem Durchmesser eine vergleichbare Größe wie fluoreszierende Proteine (GFPs) haben und größer als typische Farbstoffmoleküle ($D = 1$ nm) sind, so sind sie dennoch klein genug, um sie im Rahmen dieser Messungen als Punktlichtquellen anzusehen. Dazu kommen die Handhabungsvorteile der Quantendots, insbesondere ihr höherer Zwei-Photonen-Absorptionsquerschnitt, die eine einfachere Messung als mit Einzelmolekülen erlauben.

Der erste Abschnitt dieses Kapitels zeigt zunächst die prinzipielle Anwendbarkeit der Quantendots im TPLSM-Aufbau. Im zweiten Abschnitt wird die Detektionseffizienz des vorliegenden TPLSM-Aufbaus berechnet. Der dritte Abschnitt stellt die Bestimmung der maximal erreichbaren Auflösung des TPLSM mit Hilfe der Quantendots vor.

4.1.1 Grundsätzliche Beobachtbarkeit der Quantendots

In einer ersten Messung wurde untersucht, ob die Quantendots überhaupt mit dem hier realisierten TPLSM-Aufbau beobachtet werden können.

In diesem Experiment sind Quantendots des Typs „Qdot 605 Streptavidin Conjugates“ der Quantum Dot Corporation untersucht worden. Die Quantendots wurden so auf einem Objektträger aufgebracht, dass sie zwar dicht, aber immer noch separiert auf der Oberfläche lagen. Dazu ist der Objektträger zunächst mit einer 2 %-igen teilweise biotinylierten BSA-Lösung behandelt worden, dann wurde ein Tropfen der etwa $c_{\text{QDot}} = 10$ nM Quantendot-Lösung aufgebracht. Nach einer Einwirkzeit von ca. 30 s hatten die Streptavidin-umhüllten Quantendots an das Biotin in der BSA/Biotin-Oberfläche gebunden. Der Rest des Tropfens wurde abgespült und der Objektträger im Luftstrom getrocknet. Von einem Deckglas geschützt konnten die Quantendots dann mit dem TPLSM untersucht werden.

Die Laserleistung, die Helligkeit der Quantendots und die Empfindlichkeit der EMCCD-Kamera erlaubten eine Echtzeitbeobachtung der Quantendots mit einer Belichtungszeit von $t_{\text{BLZ}} = 0.2$ sec und einer Bildrate von etwa $v_{\text{Serie}} = 4$ Hz. Anhand der Bildstruktur und des Blinkens konnten die Quantendots identifiziert und die z-Position so einjustiert werden, dass die Quantendots scharf abgebildet wurden.

Das Ergebnis dieser ersten Messung ist, dass die Quantendots Qdots 605 mit dem hier realisierten TPLSM-Aufbau gut beobachtbar sind. Bei den gegebenen Einstellungen, die auch für typische Zell-Mikroskopieaufnahmen verwendet wurden, sind sogar kurze Belichtungszeiten der EMCCD-Kamera bis herunter zu $t_{\text{BLZ}} = 2$ ms möglich.

Die Bilder wurden bei einer Anregungswellenlänge von $\lambda_{\text{ex.}} = 800 \text{ nm}$ und einer Leistung von $P_{\text{MaiTai}} = 1.074 \text{ W}$ mit dem 40-fach Objektiv (vgl. Tab. 3.4.1) aufgenommen. Die Rasterspiegel wurden nur in der x -Richtung mit einer Frequenz von $\nu_x = 1.011 \text{ kHz}$ angetrieben, so dass ein Rasterbereich mit einer Größe von $30 \mu\text{m} \times 30 \mu\text{m}$ entstand. Bei dieser Rasterbereichsgröße reichte es aus, die Bilder als Teilbilder mit einer Größe von 128×128 Pixeln ohne Binning von der EMCCD-Kamera auszulesen. Die Belichtungszeit der EMCCD-Kamera betrug bei Zell-Mikroskopieaufnahmen typischerweise $t_{\text{BLZ}} = 0.1 \text{ s}$, wodurch sich mit der benötigten Auslesedauer des CCD-Chips eine Bildfrequenz von $\nu_{\text{Serie}} = 8.9 \text{ Hz}$ ergab. Der CCD-Chip war auf $T_{\text{CCD}} = -65 \text{ }^\circ\text{C}$ gekühlt und die interne Verstärkung der EMCCD-Kamera war auf einen Wert von $g_{\text{Software}} = 200$, entsprechend einem realen Verstärkungsfaktor von $g \approx 100$, eingestellt. Mit diesen Parametern wurden 100 Bilder aufgenommen.

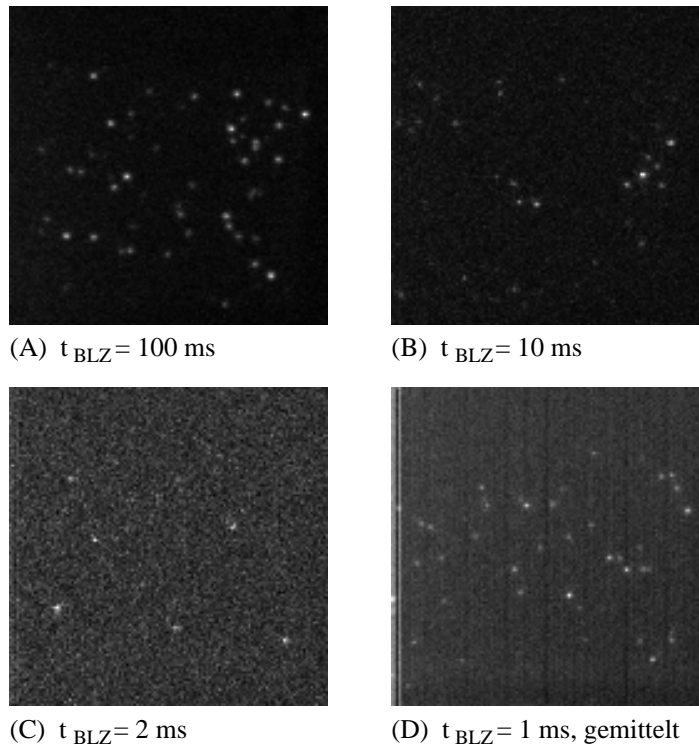


Abbildung 4.1.1: Bilder von Quantendots bei verschiedenen Belichtungszeiten: (A) Einzelbild mit $t_{\text{BLZ}} = 100 \text{ ms}$. (B) Einzelbild mit $t_{\text{BLZ}} = 10 \text{ ms}$. (C) Einzelbild mit $t_{\text{BLZ}} = 2 \text{ ms}$. (D) gemittelttes Bild mit $t_{\text{BLZ}} = 1 \text{ ms}$. Das gemittelte Bild entstand aus den 100 Bildern der aufgenommenen Serie.

Abb. 4.1.1 zeigt Einzelbilder der Quantendots aus den Bildserien mit Belichtungszeiten von 100 ms (A), 10 ms (B) und 2 ms (C). Die Quantendots sind auf diesen ungemittelten Bildern trotz des typischen Rauschens der EMCCD-Kamera bis herunter zu einer Belichtungszeit von $t_{BLZ} = 2$ ms noch gut erkennbar. Sofern das Experiment eine Aufnahmezeit zulässt, um mehrere Bilder mitteln zu können, ist auch eine Belichtungszeit von $t_{BLZ} = 1$ ms erreichbar. Abb. 4.1.1 (D) zeigt ein solches gemitteltes Bild.

Dass sich die Quantendots auch bei solch kurzen Belichtungszeiten beobachten lassen, liegt an ihrem sehr großen Absorptionswirkungsquerschnitt, der sie auch bei einer Zwei-Photonen-Anregung als sehr helle Fluoreszenzobjekte erscheinen lässt.

Dass es sich bei den beobachteten Objekten um Quantendots handelt, ließ sich schon während der Echtzeitbeobachtung mit der EMCCD-Kamera durch das Blinken der Quantendots feststellen. Die folgende Abb. 4.1.2 zeigt beispielhaft die Zeitspuren einiger Quantendots, die im nebenstehenden Bild markiert sind.

Für die Zeitspuren wurde in jedem Bild der Serie ($n = 100$) der Intensitätsmittelwert der kleinen „Region of Interest“ (ROI) um den jeweiligen Quantendot berechnet. Man erkennt in diesen Zeitspuren sowohl schnelles Blinken (Spur ROI 1) als auch lange AUS-Zustände (Spur ROI 2), die man sogar mit einem Ausbleichen verwechseln kann (Spur ROI 3, die sich bis zum Ende im AUS-Zustand befindet).

In den Spuren ist kein binäres Umschalten zwischen zwei definierten Werten zu finden, denn die Übergänge der Quantendots zwischen dem AN- und dem AUS-Zustand erfolgen rein zufällig und sind nicht mit der Belichtungszeit der EMCCD-Kamera synchronisiert. Deshalb registriert man teilbelichtete Bilder, bei denen die Quantendots ihren Zustand z. B. nach $2/3$ der Belichtungszeit wechseln oder vielleicht nur für einen kurzen Augenblick während der Belichtungszeit im AUS-Zustand waren. Diese Bilder zeigen dann Intensitätswerte, die zwischen den beiden Grenzwerten liegen. Der obere Grenzwert, also die maximale Intensität, entsteht für Quantendots, die sich während der Belichtungszeit dauerhaft im AN-Zustand befinden, der untere Grenzwert entsteht dementsprechend für dauerhaft im AUS-Zustand befindliche Quantendots.

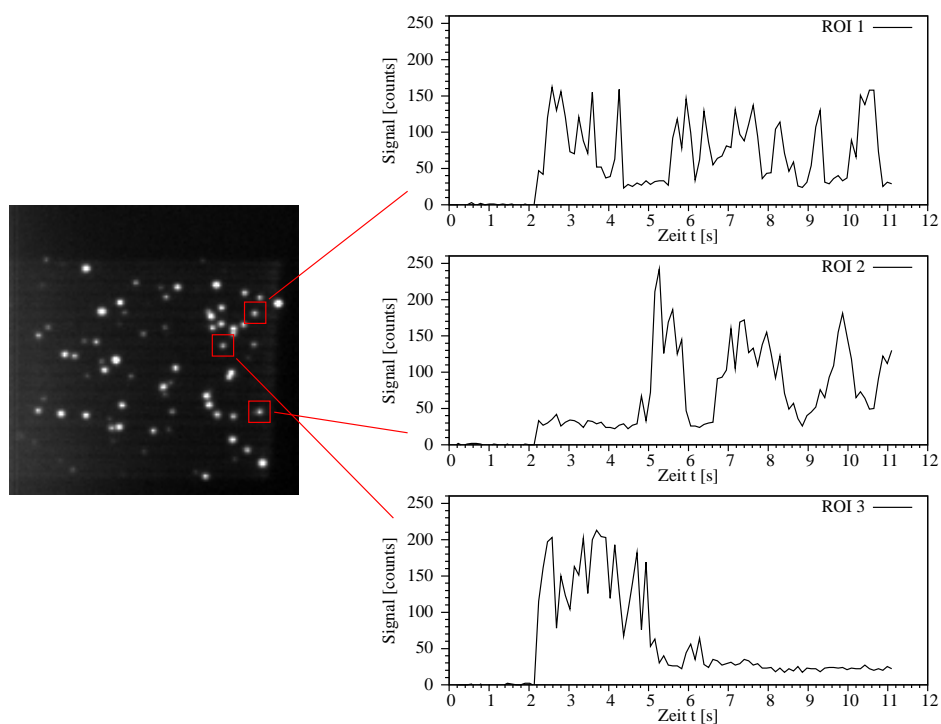


Abbildung 4.1.2: Zeitspuren dreier Quantendots aus Abb. 4.1.1 (A), die ein unterschiedliches Blink-Verhalten zeigen: schnelles Blinken (ROI 1), längere AUS-Zustände (ROI 2) und ein sehr langer AUS-Zustand bis zum Ende der Belichtungszeit (ROI 3). Zur besseren Darstellung der untersuchten Quantendots wurde Abb. 4.1.1 (A) hier aufgehehlt. Während der ersten zwei Sekunden der Belichtungszeit war der Laser aus, so dass kein Signal detektiert werden konnte.

4.1.2 Bestimmung der Detektionseffizienz

Nachdem diese ersten Messungen gezeigt haben, dass die Quantendots mit dem hier realisierten TPLSM beobachtbar sind, wurden weitere Messungen zur Abschätzung der Detektionseffizienz des TPLSM und zur Abschätzung der erreichbaren Auflösung des TPLSM gemacht.

Die Bestimmung der Detektionseffizienz des hier realisierten TPLSMs erfolgt in zwei Schritten: als erstes wird die Photonenemissionsrate berechnet, die unter den gegebenen Bedingungen von den Quantendots ausgesendet wird, als zweites wird aus den aufgenommenen Bildern der EMCCD-Kamera die Rate der detektierten Photonen berechnet. Das Verhältnis der beiden Photonenraten bezeichnet die Detektionseffizienz.

Der sehr große Absorptionswirkungsquerschnitt der verwendeten Quantendots QDots 605 führt bei der verwendeten Laserleistung von $P_{\text{MaiTai}} = 1.074 \text{ W}$ zu einer Anregung der Quantendots oberhalb ihrer Sättigungsgrenze. Aus diesem Grund kann die Photonenemissionsrate mit Hilfe der mittleren Fluoreszenzlebensdauer der Quantendots und der Repetitionsfrequenz des Ti:Sa-Lasers berechnet werden. Vernachlässigt man einige Fluktuationen, so kann die Fluoreszenzlebensdauer von Quantendots mit einem monoexponentiellen Verlauf beschrieben werden [103, 104]. Nach einem ersten Laserpuls befindet zum Zeitpunkt t noch der Bruchteil F der Quantendots im angeregten Zustand gemäß

$$F = e^{-\frac{1}{\tau}t} \quad (4.1.1)$$

und kann ein Fluoreszenzphoton emittieren. Die folgende Abb. 4.1.3 zeigt diesen Funktionsverlauf zusammen mit den im Folgenden verwendeten Intervallen der Laserpulse.

Die in diesem Experiment verwendeten Quantendots „Qdot 605“ emittieren bei der Wellenlänge $\lambda_{\text{em.}} = 605 \text{ nm}$. Die Fluoreszenzlebensdauer τ beträgt für diese Quantendots $\tau = 14.5 \text{ ns}$ [105]. Normiert man die Fläche unter obiger Kurve (Abb. 4.1.3) auf 1, um auszudrücken, dass der Quantendot das Fluoreszenzphoton mit Sicherheit irgendwann emittieren wird, so kann man die Wahrscheinlichkeiten angeben, mit denen diese Emission in einem bestimmten Intervall stattfinden wird. Mit der Intervalllänge $t_p = 12.5 \text{ ns}$, die dem zeitlichen Abstand der Laserpulse entspricht und dem Index $i = 1, 2, 3, \dots$ für die Bezeichnung der Intervalle, berechnen sich die Wahrscheinlichkeiten zu:

$$p_i = \frac{1}{\tau} \int_{(i-1)t_p}^{it_p} e^{-\frac{1}{\tau}t} dt \quad (4.1.2)$$

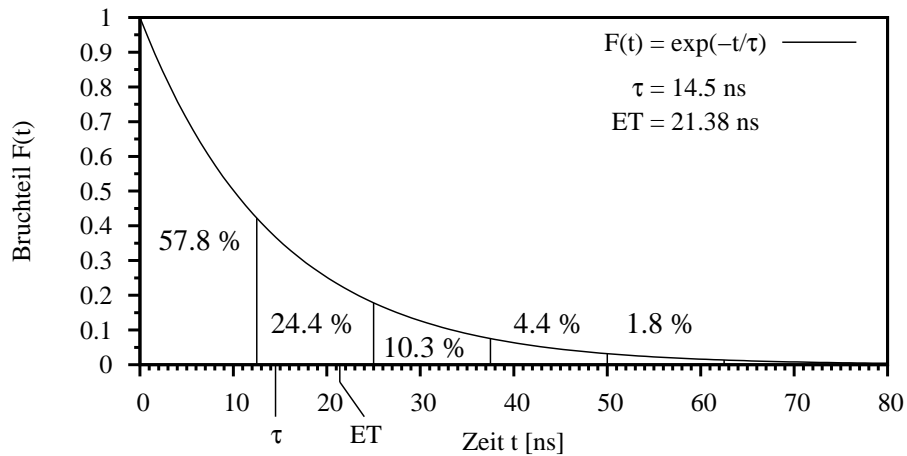


Abbildung 4.1.3: Zeitlicher Verlauf der Wahrscheinlichkeit, mit der sich ein Quantendot im angeregten Zustand befindet. Diese Wahrscheinlichkeit entspricht auch dem Bruchteil einer Menge von Quantendots, die sich nach der Zeit t noch im angeregten Zustand befindet. Zusätzlich sind die Intervalle der Laserrepetitionrate entspricht. Die Prozentzahlen geben die Wahrscheinlichkeit an, dass der Quantendot in dem entsprechenden Intervall sein Fluoreszenzphoton emittiert. τ bezeichnet die Fluoreszenzlebensdauer der Quantendots, ET kennzeichnet den Erwartungswert für den Zeitpunkt einer Fluoreszenzemission.

Nach dieser Gleichung findet eine Fluoreszenzemission innerhalb des ersten Intervalls von 0 ns bis 12.5 ns mit einer Wahrscheinlichkeit von $p_1 = 57.8\%$ statt, für die folgenden sechs Intervalle betragen die Wahrscheinlichkeiten $p_2 = 24.4\%$, $p_3 = 10.3\%$, $p_4 = 4.4\%$, $p_5 = 1.8\%$, $p_6 = 0.78\%$ und $p_7 = 0.33\%$. Für die Photonenemissionsrate wird mit diesen Wahrscheinlichkeiten zunächst der Erwartungswert ET für den Zeitpunkt T der Fluoreszenzemission berechnet:

$$ET = \sum_{i=1}^7 p_i i t_p \quad (4.1.3)$$

Mit den oben genannten Werten für p_i und t_p ergibt sich der Erwartungswert zu $ET = 21.38$ ns. Nach dieser mittleren Zeit ET hat der Quantendot sein Photon emittiert und kann wieder angeregt werden. Das Inverse von ET entspricht somit einer maximalen Anregungsfrequenz der Quantendots von $f_{\text{ex.,max.}} = 46.78$ MHz. Diese maximale Anregungsfrequenz wird durch Quantenausbeute γ auf die tatsächliche Emissionsfrequenz $f_{\text{ex.}} = \gamma f_{\text{ex.,max.}}$ reduziert. Mit $\gamma \approx 40\%$ für die

verwendeten Qdots 605 [105] ergibt sich $f_{\text{em.}} = 18.71$ MHz. Diese Emissionsfrequenz gilt für den Fall, dass der Quantendot kontinuierlich mit dem gepulsten Laser bestrahlt wird. Da aber die Bilder im Multizeilen-Modus mit allen 64 Strahlen aufgenommen wurden (vgl. Kap. 4.5.2), wird ein Quantendot nur während des Bruchteils der Belichtungszeit des Bildes vom Laser bestrahlt, der dem Verhältnis von Fokusgröße zu Rasterzeilenlänge entspricht. In den Messungen wurde das 40x-Objektiv (vgl. Tab. 3.4.1) verwendet, für das sich die FWHM der PSF zu $\Delta x = 560$ nm bestimmt (vgl. folgenden Abschnitt in diesem Kapitel zur Bestimmung der PSF als maximal erreichbare Auflösung). Die Rasterzeilenlänge betrug $l_z = 40$ μm , so dass ein Quantendot im Bruchteil $\beta = 1.4$ % der Belichtungszeit vom Laser getroffen wird. Damit reduziert sich die effektive Photonenemissionsrate $f_{\text{eff.}}$ auf $f_{\text{eff.}} = \beta f_{\text{em.}} = 261.94$ kHz. Innerhalb der kürzesten verwendeten Belichtungszeit der EMCCD-Kamera von $t_{\text{BLZ}} = 5$ ms hat ein Quantendot somit $n_{\text{em.}} = f_{\text{eff.}} t_{\text{BLZ}} = 1310$ Photonen emittiert.

Im zweiten Schritt der Berechnung der Detektionseffizienz wird die Photonendetektionsrate pro Quantendot berechnet, die von der EMCCD-Kamera detektiert wird. Dazu wird nach Abzug des Hintergrundes die Intensität einzelner Quantendots gemittelt. Für $n = 6$ Quantendots ergibt sich eine mittlere Zählrate² von $I_{\text{EMCCD}} = 15250 \pm 2919$ c/s. Durch den auf dem CCD-Chip integrierten Elektronenvervielfacher kann eine Verstärkung des gemessenen Signals erzielt werden, bevor das Signal als Bild mit seiner entsprechenden Zählrate angezeigt wird. In einer Kalibrierungsmessung wurde der Verstärkungsfaktor bestimmt zu $\beta_{\text{EMCCD}} = 75$. Laut den technischen Daten der EMCCD-Kamera entspricht ein Count des A/D-Wandlers 23 Elektronen, die im CCD-Chip erzeugt wurden – man erhält also den Umrechnungsfaktor $\kappa = 23$ e⁻/c. Zusammen mit der Quanteneffizienz des CCD-Chips von $\gamma = 85$ % ergibt sich eine Photonendetektionsrate von $f_{\text{EMCCD}} = 5500 \pm 1053$ Hz. Dies entspricht einer Anzahl von $n_{\text{det.}} = 27.5 \pm 5.3$ Photonen, die innerhalb der kürzesten verwendeten Belichtungszeit von $t_{\text{BLZ}} = 5$ ms detektiert wurden.

Aus der Photonenemissionsrate der Quantendots und der Photonendetektionsrate der EMCCD-Kamera ergibt sich somit die Detektionseffizienz des hier realisierten TPLSM-Aufbaus zu $\varepsilon_{\text{TPLSM}} = f_{\text{EMCCD}}/f_{\text{eff.}} = 0.021$, also

$$\varepsilon_{\text{TPLSM}} = 2.1 \text{ \%}.$$

Ursachen für diese geringe, aber dennoch typische Detektionseffizienz sind die geringe Numerische Apertur des Objektivs von $N.A. = 0.80$ und die Trans-

²gemessen in counts pro Sekunde, c/s

mission des Objektivs von $T_{\text{Obj.}} = 85\%$ bei 500 nm (verfügbare Angabe des Herstellers). Dazu kommen die Transmissionen des Strahlteilers und des Zwei-Photonen-Sperrfilters (vgl. Tab. 3.4.1), die beide bei $T_{\text{Filter}} > 90\%$ bei 500 nm liegen. Schließlich sind innerhalb des Olympus IX70 Mikroskopes noch weitere optische Elemente mit Luft-Glas-Grenzflächen vorhanden, an denen weitere Verluste auftreten.

4.1.3 Bestimmung der PSF als maximal erreichbare Auflösung

Die Anwendung der Quantendots kann weiterhin zur Auflösungsbestimmung benutzt werden, indem die Quantendots als Punktlichtquelle fungieren und so die Bestimmung der Punktantwortfunktion (PSF) als maximal erreichbare Auflösung ermöglichen.

Um die PSF zu bestimmen, wurden Serien von je 100 Bildern der Quantendots aufgenommen. Die 64 Foki der rasternden Linie haben jeweils einen Abstand von etwa $\Delta y_{\text{Zeile}} = 0.5\ \mu\text{m}$ zueinander. Daraus ergibt sich die Frage, ob sich die Foki gegenseitig beeinflussen und so die Auflösung verändern. Deshalb wurden die Quantendots auch in einer zweiten Messung mit nur einem einzelnen Strahl abgerastert. Für die Aufnahmen mit allen 64 Strahlen wurden die Quantendots mit einer Wellenlänge von $\lambda_{\text{ex.}} = 800\ \text{nm}$ und einer Laserleistung von $P_{\text{MaiTai}} = 1.074\ \text{W}$ angeregt. Die Rasterspiegel bewegten sich nur in der x-Richtung mit einer Frequenz von $\nu_x = 1.011\ \text{kHz}$ und erzeugten ein Rastergebiet mit einer Größe von $31.3\ \mu\text{m} \times 25.8\ \mu\text{m}$. Die Fluoreszenz wurde vom x60-Objektiv (vgl. Tab. 3.4.1) aufgenommen und durch die 1.5-fach vergrößernde Zwischenlinse des Mikroskopes mit einer resultierenden 90-fachen Vergrößerung auf die EMCCD-Kamera abgebildet, wobei kein weiterer Emissionsfilter in den Detektionsstrahlengang eingesetzt war. Der CCD-Chip war auf $T_{\text{CCD}} = -60\ \text{°C}$ gekühlt und der interne Verstärkungsfaktor der Kamera betrug $g_{\text{Software}} = 250$, entsprechend einem realen Verstärkungsfaktor von $g \approx 860$. Die Parameter für die Einzelstrahlrasterung wurden derart gewählt, dass das Bild des Rastergebietes in Rhodamin 6G ebenso homogen aussah wie das Bild des mit allen Strahlen gerasterten Gebietes. Damit fanden sich folgende Parameter für die Einzelstrahlrasterung: der Laser regte die Quantendots wiederum mit $\lambda_{\text{ex.}} = 800\ \text{nm}$ bei $P_{\text{MaiTai}} = 1.074\ \text{W}$ an und die Rasterspiegel arbeiteten wieder mit einer Zeilenfrequenz von $\nu_x = 1.011\ \text{kHz}$. Der Strahl bewegte sich in y-Richtung mit einer Schrittweite von $\Delta y_{\text{Schritt}} = 105.4\ \text{nm}$. Der Rasterbereich war allerdings eingeschränkt auf eine Größe von $20.8\ \mu\text{m} \times 16.2\ \mu\text{m}$. Um die geringere Anregung aufgrund des verwendeten Einzelstrahls (anstelle aller 64 Strahlen) auszugleichen,

ist die Belichtungszeit auf $t_{\text{BLZ}} = 5$ s gesetzt worden. Die restlichen Parameter der EMCCD-Kamera blieben unverändert. Eine Aufnahme bestand wie bei der vorigen Multistrahl-Messung aus einer Serie von 100 Bildern.

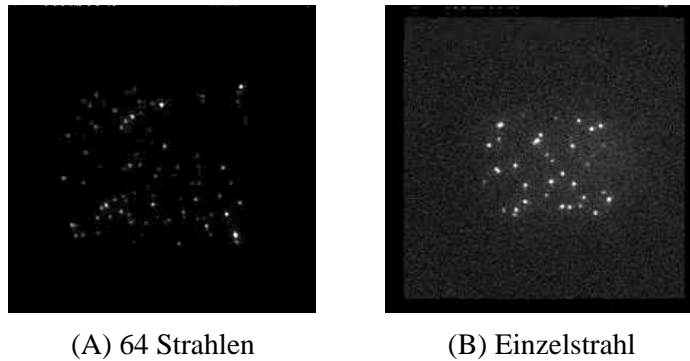


Abbildung 4.1.4: Quantendot-Bilder zur Bestimmung der PSF, aufgenommen im Multistrahl- und Einzelstrahlbetrieb: (A) Bild gerastert mit allen 64 Strahlen, (B) Bild gerastert mit einem Einzelstrahl.

Abb. 4.1.4 zeigt zwei Aufnahmen der Quantendots, die im Multizeilen-Modus mit allen 64 Strahlen bzw. im TPLSM-Modus mit einem Einzelstrahl aufgenommen wurden, um die Beeinflussung der PSF durch die eng benachbarten Foki zu untersuchen.

Die PSF bestimmt sich aus dem Intensitätsprofil eines einzelnen Quantendots und zur Auswertung wurden die im folgenden kurz beschriebenen mathematischen Zusammenhänge benutzt.

Es sei $f(x)$ die PSF. Zu dieser Funktion lässt sich die FOURIER-Transformierte $\mathcal{F}(\omega)$ und die Autokorrelationsfunktion $A(\omega) = (f \otimes f)(\omega)$ berechnen. Dazu erlaubt die folgende Beziehung die Berechnung der PSF aus der Autokorrelation:

$$\mathcal{F}\{A\}(\omega) = \frac{1}{\sqrt{2\pi}} |\mathcal{F}(\omega)|^2 \quad (4.1.4)$$

$$\mathcal{F}^{-1} \left\{ \sqrt{\sqrt{2\pi} \mathcal{F}\{A\}(\omega)} \right\} = f(x) \quad (4.1.5)$$

Die FOURIER-Transformierte der Autokorrelationsfunktion $\mathcal{F}\{A\}$ entspricht also bis auf Faktoren dem Quadrat der FOURIER-Transformierten der PSF \mathcal{F} .

Zu der aufgenommenen Serie von 100 Bildern lässt sich recht einfach das Autokorrelationsbild berechnen und darauf die beiden FOURIER-Transformationen (\mathcal{F} bzw. \mathcal{F}^{-1}) anwenden.

Ein Profil durch das zentrale Maximum des Ergebnisbildes entspricht der gesuchten PSF. Die folgende Abb. 4.1.5 zeigt die beiden PSFs, die mit dem obigen Vorgehen aus den beiden Datensätzen berechnet wurden.

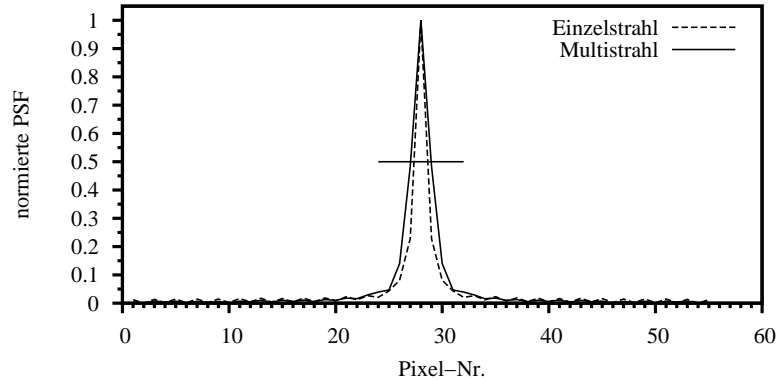


Abbildung 4.1.5: Vergleich der Einzelstrahl- und Multistrahls-PSF, berechnet aus den beiden Bildern der Abb. 4.1.4 mit Hilfe des Autokorrelationsverfahrens. Man erkennt, dass die Multistrahls-PSF eine größere FWHM besitzt als die Einzelstrahl-PSF.

Der Vergleich zwischen der Einzelstrahlmessung und der Messung mit allen 64 Strahlen zeigt, dass die PSF der Einzelstrahlaufnahme etwas schmäler ist als die PSF der Multistrahlaufnahme. Die vollen Halbwertsbreiten (FWHM) betragen bei der Einzelstrahl-PSF 1.3 Pixel, bei der Multistrahls-PSF 1.9 Pixel. Bezieht man die Kantenlänge eines Pixels auf dem CCD-Chip von $16 \mu\text{m}$ und die benutzte Vergrößerung von $\times 90$ ein, so ergibt sich die FWHM der Einzelstrahl-PSF zu $\Delta x_{\text{ES}} = 235 \text{ nm}$ und die FWHM der Multistrahls-PSF zu $\Delta x_{\text{MS}} = 345 \text{ nm}$. Die Foki beeinflussen sich demnach gegenseitig und die PSF verbreitert sich im Multistrahlsbetrieb. Nimmt man die PSF als vergleichbares Maß für die Auflösung, so ist die Auflösung im Multistrahlsbetrieb schlechter, allerdings liegt die Auflösung in diesem Fall immer noch im Bereich der typischen erreichbaren Auflösung eines TPLSM von ca. $\Delta x_{\text{typ.}} = 300 \text{ nm}$ (vgl. Kap. 2.5.1).

Zu beachten ist, dass bei den Messungen festgestellt wurde, dass auch die tatsächliche Pixelgröße der CCD-Kamera eine Rolle spielt. Denn nach W.R. ZIPFEL *et al.* [47] berechnet sich für die theoretische Auflösung die FWHM nach

$$FWHM_{\text{theo.}} = 0.383 \frac{\lambda_{\text{ex.}}}{N.A.^{0.91}}, \quad (4.1.6)$$

wobei diese Formel für eine $N.A. > 0.7$ gilt.

Betrachtet man die Auflösung des x40-Objektives (vgl. Tab. 3.4.1 auf Seite 95), so wird im Vergleich der eventuelle Einfluss der tatsächlichen Pixelgröße auf dem CCD-Chip deutlich. Mit $\lambda_{\text{ex.}} = 820 \text{ nm}$ und $N.A. = 0.80$ erhält man $FWHM_{\text{theo.}} = 382 \text{ nm}$. Die EMCCD-Kamera hat eine Pixelgröße von $16 \mu\text{m} \times 16 \mu\text{m}$, was bei einer 40-fachen Vergrößerung eine effektive Pixelgröße von $400 \text{ nm} \times 400 \text{ nm}$ ergibt, d. h. ein Bereich aus der Probe mit dieser Größe wird auf genau ein Pixel abgebildet. In diesem Fall bestimmt also die Pixelgröße die Auflösung und die theoretische, bessere Auflösung kann nicht erreicht werden.

4.2 Flächige Anregung – Abbilden ohne Rastern

Die TPLSM bietet viele Vorteile für die Fluoreszenzmikroskopie aufgrund der IR-Anregungswellenlänge: eine geringe Streuung, damit verbunden eine große Eindringtiefe, und dazu eine hohe, beugungsbegrenzte räumliche Auflösung.

Ein Nachteil der Laser-Raster-Mikroskope – wie aller Rasterverfahren – ist die niedrige Bildrate aufgrund des zeitaufwendigen, punktwisen Abrasterns der Probe. Zwar lässt sich die Bildrate durch Parallel-Processing und eine kürzere Belichtungszeit pro Pixel deutlich erhöhen. Dennoch wird die Bildrate durch das Prinzip des Rasterverfahrens limitiert. Diese Limitierung wird aufgehoben und die höchste Bildrate wird erreicht, wenn auf das Rasterverfahren verzichtet werden kann und stattdessen alle Punkte der Probe gleichzeitig angeregt und detektiert werden können.

Mit diesem Experiment, das in Zusammenarbeit mit DR. T. NIELSEN durchgeführt wurde, konnte gezeigt werden, dass es möglich ist, eine Bildaufnahme ohne Rastern in einem TPLSM zu realisieren, ohne dabei den Vorteil der hohen axialen Auflösung zu verlieren.

Die hier beschriebenen Messungen wurden noch mit einem früheren Aufbau durchgeführt, der aber prinzipiell dem in Kap. 3 beschriebenen Aufbau entspricht. Der wichtigste Unterschied des früheren Aufbaus zum aktuellen Aufbau besteht im Strahlteiler, dessen Aufbau in T. NIELSEN *et al.* [106] beschrieben ist, und der statt einer Linie aus 64 Foki eine 8×8 -matrixförmige Anordnung der Strahlen erzeugt. Im früheren Aufbau wurde der festfrequente Coherent *Vitesse*-fs-Laser verwendet. Anstelle des TriM-Scopes wurden bis auf die Spiegelrastereinheit noch selbstgefertigte Komponenten (Dispersionskompensation, Teleskop zur Strahlaufweitung) verwendet.

Um die Bildaufnahme ohne Rastern zu realisieren, werden die Abstände zwischen den Foki so weit reduziert, dass die Fokusvolumina anfangen zu überlappen.

Dadurch wird die gesamte Probenfläche im Bereich der Foki zur Fluoreszenz angeregt und das Rasterverfahren ist nicht mehr notwendig. Die Fokiabstände können reduziert werden, indem – nach der geometrischen Optik – die auf das Objektiv zulaufenden Strahlen kleinere Winkel mit der optischen Achse bilden. Als Objektiv wurde das Olympus x60, 1.2 N.A., Wasserimmersions-Objektiv verwendet. Betrachtet man die Durchmesser der Foki von etwa $0.4\ \mu\text{m}$, so ist ein Abstand von etwa $0.5\ \mu\text{m}$ zwischen den Foki sinnvoll, damit die Foki sich zu überlappen beginnen. In einer abschätzenden Rechnung ergibt sich für diesen Fokiabstand und das benutzte Objektiv ein relativer Winkel von $\gamma_i = 166\ \mu\text{rad}$ zwischen den einfallenden Strahlen. Dieser Winkel wird durch das Teleskop zur Strahlaufweitung um den Faktor 3 vergrößert. Bei einem gegebenen Abstand der Strahlen am Ausgang des Strahlteilers von $a_{\text{St.}} \approx 3.3\ \text{mm}$, muss der Abstand zwischen dem Strahlteilerausgang und Teleskop $l = 7\ \text{m}$ betragen, um die berechneten Winkel zu erhalten. Diesen Aufbau mit allen Komponenten zeigt die folgende Abbildung.

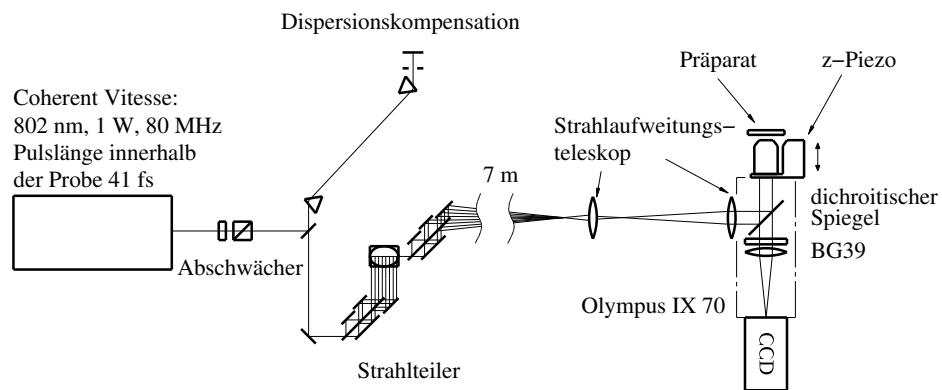


Abbildung 4.2.1: Aufbau des Multistrahl-TPLSM für das Experiment zur Abbildung ohne Rastern.

Die Justierung der Strahlen fand in einer Rhodamin 6G-Lösung statt, und die experimentell gemessenen Abstände betragen $a_x = 0.47\ \mu\text{m}$ in x-Richtung und $a_y = 0.53\ \mu\text{m}$ in y-Richtung bei einem gegebenen Abstand der Strahlen am Strahlteilerausgang von $a_{\text{St.},x} = 3.3\ \text{mm}$ in x-Richtung und $a_{\text{St.},y} = 3.7\ \text{mm}$ in y-Richtung.

Die folgende Abbildung 4.2.2 zeigt im linken Teil die Fluoreszenz einer Rhodamin 6G-Lösung, wie sie von den zur flächigen Anregung justierten 64 Strahlen erzeugt wird. Im rechten Teil sind die Intensitätsprofile aus dem Fluoreszenzbild

gezeigt, die im linken Teil durch die Pfeile markiert sind. Zum Vergleich ist auch das Intensitätsprofil eines Einzelstrahles gezeigt.

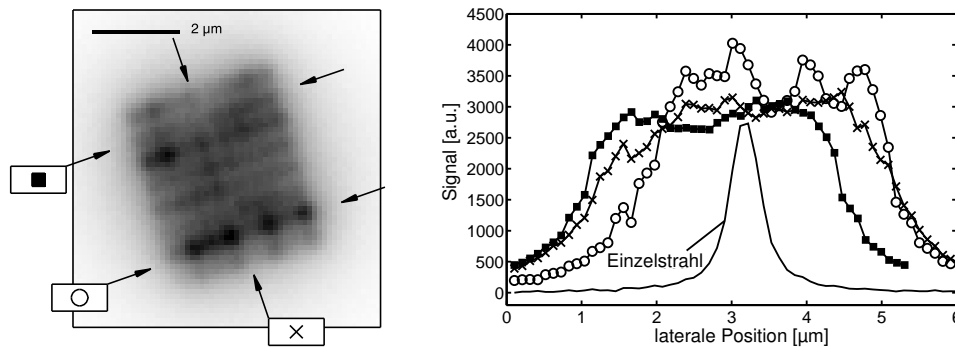


Abbildung 4.2.2: Fluoreszenzbild und Intensitätsprofile bei flächiger Anregung: Links: Fluoreszenzbild einer Rhodamin 6G-Lösung, angeregt von den zur einer leuchtenden Fläche justierten Strahlen. Rechts: Intensitätsprofile aus dem Fluoreszenzbild von den mit den Pfeilen markierten Positionen.

An den Intensitätsprofilen erkennt man eine über einen Bereich von etwa $2.5 \mu\text{m}$ relativ konstante Intensität (Kurven mit den ausgefüllten Quadraten und den Kreuzen) zusammen mit den Flanken, deren Steilheit der der Flanken eines Einzelstrahls entspricht. Das Profil mit den Kreisen zeigt deutlichere Schwankungen, die sich aber durch einen etwas zu großen interfokalen Abstand und durch eine nicht perfekte Justierung des Strahlteilers erklären lassen. Falls der Strahlteiler nicht exakt justiert ist, treffen nicht alle Strahlen in gleicher Weise die rückwärtige Apertur des Objektivs und bekommen so unterschiedliche Intensitäten. Auch die Qualität der Strahlteilerspiegel kann hier zu unterschiedlichen Strahlintensitäten und somit zu Variationen des Fluoreszenzsignals führen. Da diese Unterschiede aber statisch im Aufbau begründet sind, lassen sie sich für eine Messung durch eine Kalibrierung herausrechnen. Aus der Vergrößerung des benutzten Objektivs ($\times 60$, 1.2 N.A. , W) und der Pixelgröße der CCD-Kamera lässt sich die Größe der homogen leuchtenden Fläche zu $3.3 \mu\text{m} \times 3.7 \mu\text{m}$ berechnen.

Als Beispiel für die zwei-dimensionalen Abbildungsfähigkeiten zeigt die folgende Abb. 4.2.3 das Fluoreszenzbild von Latexkugeln (Molecular Probes) mit 400 nm Durchmesser. Die einzelnen separat liegenden Kugeln sind klar voneinander getrennt abgebildet.

Auf eine biologische Anwendung bezogen zeigt die folgende Abb. 4.2.4 das Hellfeld- und das Fluoreszenzbild von drei aneinander liegenden Hefezellen. Da

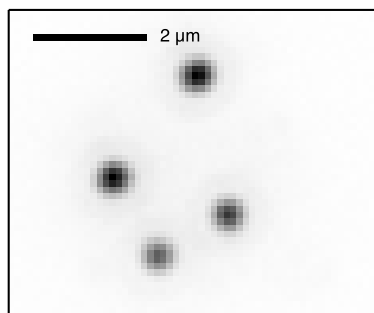


Abbildung 4.2.3: Fluoreszierende Latexkugeln, aufgenommen mit dem Aufbau für die flächige Anregung.

das Hellfeldbild ein größeres Sichtfeld besitzt, zeigt der Rahmen den Bereich an, der von der leuchtenden Fläche angeregt wird. Das Fluoreszenzbild dieser flächigen Anregung ist im rechten Teil der Abb. 4.2.4 gezeigt. Da in dieser Darstellung sich das Hellfeld- und das Fluoreszenzbild zueinander invers verhalten, ist der zellfreie Bereich in der Bildmitte im Hellfeldbild dunkel und im Fluoreszenzbild hell. Man erkennt dennoch die drei von der flächigen Strahlanordnung angeregten Zellen bzw. Teile davon im Fluoreszenzbild.

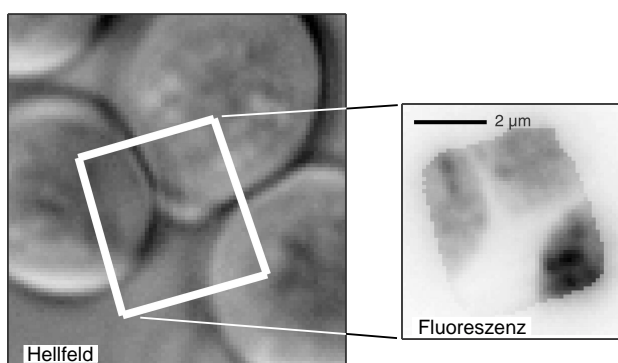


Abbildung 4.2.4: Hellfeld- und Fluoreszenzbild von Rhodamin 6G-gefärbten Hefezellen bei flächiger Anregung: Links im Hellfeldbild ist der Bereich des Fluoreszenzbildes durch den weißen Rahmen markiert. Rechts im Fluoreszenzbild erkennt man die drei Hefezellen und den zellfreien Zwischenraum aus dem linken Hellfeldbild wieder.

Die laterale Ausdehnung lässt sich auch mit einem einzelnen großen Fokus erreichen, aber damit geht die axiale Auflösung verloren. Um zu überprüfen, ob

mit der oben beschriebenen flächigen Anordnung der Strahlen die axiale Auflösung eines Einzelstrahles erhalten bleibt, wurde die so genannte „sea response“-Kurve aufgenommen (vgl. [107]), das ist die Signal-Antwort-Kurve, die man erhält, wenn der Fokus sich von einem nicht-fluoreszierenden Medium (z. B. dem Deckglas) in ein fluoreszierendes Medium (hier die Rhodamin 6G-Lösung) hineinbewegt und das entstehende Fluoreszenzintensitätssignal gegen die jeweilige axiale Position des Fokus aufträgt. Für eine idealisierte punktweise Auflösung würde sich ein senkrechter Anstieg von Null auf die maximale Intensität ergeben. Für reale Auflösungen zeigt die Kurve eine ansteigende Flanke, die umso steiler ist, je besser die Auflösung ist. Aus theoretischen Überlegungen [108] gelangt man zu folgender Gleichung für das Signal, aus der die axiale Auflösung berechnet werden kann.

$$I(z) = \frac{A}{\pi} \left[\frac{\pi}{2} + \arctan\left(\frac{z-z_0}{z_R}\right) + \frac{1}{\frac{z_R}{z-z_0} + \frac{z-z_0}{z_R}} \right] \quad (4.2.1)$$

$$\text{wobei} \quad z_R = 1.169 \left(\frac{n\lambda}{N.A.^2} \right) \quad (4.2.2)$$

Mit den Werten $n = 1.33$, $\lambda = 800 \text{ nm}$ und $N.A. = 1.2$ ergibt sich für die Breite der ansteigenden Flanke ein Wert von $z_r = 0.86 \text{ }\mu\text{m}$. Dieser Wert ist vergleichbar mit den praktischen Werten von $\Delta z = 0.7 \text{ }\mu\text{m}$, die in Kap. 2.5.2 genannt wurden.

Abb. 4.2.5 zeigt im linken Teil die drei Antwort-Kurven, die zum einen der theoretischen Kurve nach Gl. (4.2.1) entsprechen und die sich aus der Messung ergeben, wenn zum Zweiten über alle Strahlen gemittelt oder zum Dritten nur ein einzelner Strahl betrachtet wird. Man erkennt bis auf das Rauschen im Bereich von $z = 10 \text{ }\mu\text{m}$ bis $z = 14 \text{ }\mu\text{m}$ eine sehr gute Übereinstimmung der theoretischen Kurve mit der Kurve eines Einzelstrahles. Die über alle 64 Strahlen bzw. die gesamte angeregte Fläche gemittelte Kurve zeigt dagegen einen nicht so steilen Anstieg der Flanke, die Auflösung ist demnach nicht so gut wie die eines Einzelstrahles. Betrachtet man die Antwort-Kurven aller Strahlen einzeln, so findet man, dass die axialen Positionen der Foki z_0 in Gl. (4.2.1) nicht alle gleich sind, sondern eine Verteilung mit einer Breite von $\sigma_z = 0.2 \text{ }\mu\text{m}$ bilden. Die Breite der ansteigenden Flanke z_R hängt dagegen nicht vom betrachteten Einzelstrahl ab. Mittelt man die Antwort-Kurven aller Einzelstrahlen, so bewirkt die unterschiedliche axiale Position $z_{0,i}$ die beobachtete Verbreiterung der ansteigenden Flanke, wie sie für alle Strahlen gemittelt gemessen wurde. Mögliche Ursachen für die unterschiedlichen axialen Fokuspositionen können Aberrationen in den optischen Komponenten oder Defekte der Strahlteilerspiegel sein.

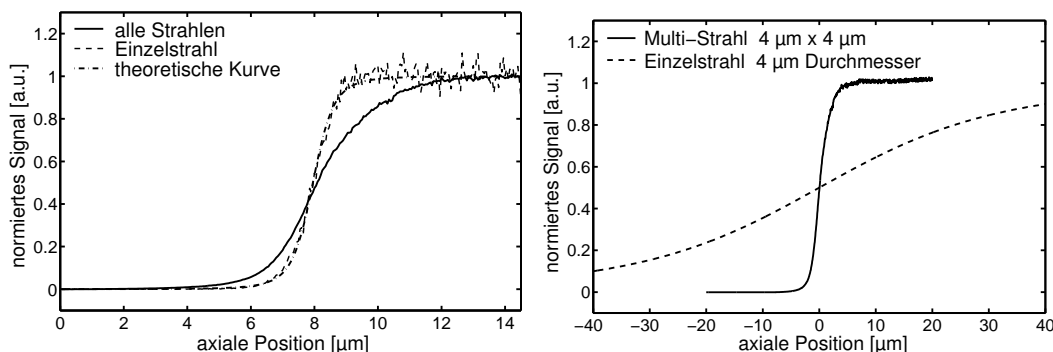


Abbildung 4.2.5: Vergleich der „sea response“ -Kurven bei flächiger Anregung mit der theoretischen Kurve und einem aufgeweiteten Einzelstrahl gleicher Größe: Links ist der Vergleich gezeigt für die „sea response“ -Kurven aller 64 Strahlen, eines Einzelstrahls und der theoretischen Kurve nach Gl. (4.2.1). Rechts ist der Vergleich der „sea response“ -Kurve aller 64 Strahlen mit einer Gesamtfläche von $4 \mu\text{m} \times 4 \mu\text{m}$ mit der „sea response“ -Kurve eines aufgeweiteten Einzelstrahles mit $4 \mu\text{m}$ Durchmesser gezeigt.

Hervorzuheben ist, dass in den Bereichen außerhalb der Flanke die gemessenen Kurven flach verlaufen. Dies bedeutet, dass sich die Strahlen nicht gegenseitig beeinflussen. Obwohl sich die zum Fokus hin konvergierenden Strahlkegel räumlich überlappen, findet in diesen Überlappungsbereichen ober- und unterhalb der Foki keine Zwei-Photonen-Anregung statt, weil durch die Konstruktion des hier verwendeten Strahlteilers ein kleiner zeitlicher Versatz zwischen den einzelnen Strahlen von ~ 680 fs (vgl. Tab. 3.3.1 auf Seite 91) entsteht – die Laserpulse durchlaufen die Strahlkegel also nicht gleichzeitig und können sich nicht gegenseitig beeinflussen. In anderen Experimenten, in denen die „sea response“ -Kurve mit einem multifokalen TPLSM-Aufbau gemessen wurde, führte die Überlagerung der Strahlkegel dagegen aufgrund des fehlenden zeitlichen Versatzes zu einem zusätzlichen Anstieg des Fluoreszenzsignales in den Bereichen außerhalb der Flanke [108]. Dazu kommt, dass dieses unerwünschte Fluoreszenzsignal mit kleiner werdendem Fokiusabstand ansteigt, weil der Überlappungsbereich der Strahlkegel näher an die Foki heranrückt und somit die Zwei-Photonen-Anregungswahrscheinlichkeit nach Gl. (2.1.15) ansteigt.

Der rechte Teil der Abb. 4.2.5 zeigt den Unterschied in den „sea response“ -Kurven zwischen der leuchtenden Fläche aus den 64 Strahlen und einem einzelnen großen Fokus, dessen Durchmesser der Größe der leuchtenden Fläche entspricht. Es ist deutlich zu erkennen, dass die ansteigende Flanke der leuchtenden Fläche

sehr viel steiler ist als die ansteigende Flanke des großen Fokus. Dies bedeutet, dass bei gleicher lateral ausgeleuchteter Fläche die axiale Auflösung der flächigen Anregung deutlich besser ist.

Mit dem vorliegenden Aufbau lässt sich eine Fläche von etwa $4 \mu\text{m} \times 4 \mu\text{m}$ anregen. Obwohl diese Fläche relativ klein ist, lassen sich damit interessante Untersuchungen durchführen: z. B. könnte die Diffusion Fluoreszenz-markierter Moleküle auf einer Membranoberfläche beobachtet werden. Hierbei kommt es auf eine hohe Bildrate bei gleichzeitig großer Anregungsfläche an, um das Molekül über einen längeren Weg verfolgen zu können. Auch die Aufnahme von Stoffen in eine Zelle könnte untersucht werden. Dabei kann mit dem vorliegenden Aufbau ein Bildstapel entlang der z-Achse sehr schnell aufgenommen werden.

Die relativ kleine Fläche des aktuellen Aufbaus könnte mit einem verbesserten Aufbau auf etwa $10 \mu\text{m} \times 10 \mu\text{m}$ vergrößert werden, wenn ein stärkerer Laser und eine bessere Optik mit einer exakteren Einkopplung der Strahlen in die rückwärtige Apertur des Objektivs verwendet werden. Die erhöhte Laserleistung ergibt einen Faktor 2 in der Strahlanzahl und mit der verbesserten Optik sollte die Anzahl der Strahlen um einen Faktor 5 erhöht werden können. Die verbesserte Einkopplung in das Objektiv ermöglicht dann auch eine homogenere Anregung über die gesamte Fläche.

4.3 Selbstorganisation in der Chemie: Morphosynthese sternförmiger Titandioxid/ Siliziumdioxid-Schalen

Kieselalgen, genauer *Bacillariophyta*, sind Hauptbestandteil des Meeresphytoplanktons und sind Hauptprimärproduzenten organischer Stoffe, sie bilden also einen wesentlichen Teil der Basis der Nahrungspyramide. Zudem erzeugen sie als oxygene Phototrophe einen großen Teil des atmosphärischen Sauerstoffes. Kieselalgen, die auch Diatomeen genannt werden, leiten ihren Namen aus ihrer Hülle aus Siliziumdioxid ab, die die Zelle als mineralischer Panzer umgibt und schützt.

Neben den Diatomeen gibt es noch weitere biomineralisierende Organismen, die ebenfalls kompliziert geformte anorganische Gehäuse bilden, die hauptsächlich aus glasartigem Siliziumdioxid bestehen [109, 110]. Erst in jüngerer Zeit wurden Details über den Siliziumstoffwechsel verkieselnder Organismen entdeckt, unter anderem bisher unbekannte Enzymklassen [111, 112], und ein hochspezialisiertes Membrankompartiment, das für die Schalenbildung verantwortlich

ist [113, 114]. Das Membrankompartiment wird „silica deposition vesicle“ (SDV) genannt und findet sich in vielen weiteren einzelligen verkieselnden Lebewesen wieder [115]. Das Verständnis des Schalenbildungsprozesses kann als Vorbild dienen für die Entwicklung biomimetischer Verfahren zur Herstellung komplexer hierarchisch strukturierter Materialien [116].

In der Arbeitsgruppe „Anorganische Chemie I“ an der Fakultät für Chemie der Universität Bielefeld wurde von DR. D. VOLKMER und S. TUGULU ein biomimetisches Modellsystem zur Schalenbildung entwickelt. Das Modellsystem besteht aus einem Öltropfen, der mit Hilfe eines Mikroinjektionssystems in eine wässrige Lösung eingebracht wird. Der Öltropfen enthält eine monomere Metalloxid-Vorstufe und wird durch zusätzliche Tenside stabilisiert. Die Metalloxid-Vorstufe wird in der wässrigen Lösung hydrolytisch zersetzt, so dass sich an der Öl/Wasser-Grenzfläche eine mineralisierte Schale bildet. Dieses Modellsystem zeigt entscheidende charakteristische Ähnlichkeiten mit biologischen Systemen und ist daher für die ersten Untersuchungen gut geeignet. Zu den Ähnlichkeiten gehören die Größe des Öltropfens, der mit einem Durchmesser von $d = 10 \mu\text{m}$ bis $d = 100 \mu\text{m}$ vergleichbar ist mit der Größe eines einzelligen Organismus. Es gibt einen „Silizium-Metabolismus“, der die monomere Kieselsäure aus einer Speicherform freisetzt und die Schalenbildung findet an einer membranartigen Oberfläche statt. Wichtig ist auch die intrinsische Selbstterminierung des Schalenbildungsprozesses, da der Öltropfen nur eine begrenzte Menge der Metalloxid-Vorstufe enthält. Besonders wichtig ist die Eigenschaft des Modellsystems, dass durch den Zusatz von organisch ausgewählten Additiven dynamische Selbstorganisationsprozesse induziert werden können, die zu der Bildung komplex geformter Hohlschalen führen.

Der Versuchsaufbau bestand aus einem Mikroinjektionssystem (bestehend aus einem Eppendorf Mikromanipulator 5171 mit einem Eppendorf Transjektor 5246), durch dessen Glaskapillare mit einem Öffnungsdurchmesser von $d \approx 35 \mu\text{m}$ der Öltropfen in die wässrige Lösung injiziert werden konnte. Die wässrige Lösung befand sich in einer offenen PTFE-Kammer, deren Boden von einem runden Deckglas (Durchmesser $d = 25 \text{mm}$) gebildet wurde und so die mikroskopische Beobachtung im Transmissionsmodus erlaubte. Die videomikroskopische Beobachtung wurde auf einem inversen Mikroskop (Olympus IX70) mit einer am seitlichen Ausgang angeschlossenen CCD-Kamera (Hitachi HV-C20 3CCD RGB-Kamera mit 795×596 Pixeln) durchgeführt.

Die grundlegende Reaktion, die zur Morphosynthese sternförmiger Schalen mit sehr großer Ähnlichkeit zu den Schalen von Radiolarien führt, findet statt,

wenn ein Chlorcyclohexan-Tropfen, der Arachidinsäure in einer Konzentration von $c_T = 42.4 \text{ mM}$ enthält³, in eine wässrige Lösung aus stark verdünntem Cetyltrimethylammoniumbromid (CTAB, Konzentration $c_W = 55.6 \text{ mM}$) eingebracht wird. Dazu wird eine frisch präparierte übersättigte Probe in die Glaskapillare gefüllt und die Kapillare anschließend im Fokus des Objektivs positioniert. Durch leichten Überdruck in der Glaskapillare wird der Tropfen in die wässrige Lösung hineingedrückt, bleibt aber an der Spitze der Kapillare hängen. Auf diese Weise kann der scharf abgebildete Tropfen in einer Zeitserie mit der CCD-Kamera beobachtet werden. Eine weitere Bewegung des Tropfens wird vermieden, um den Emulsionsvorgang nicht zu stören.

Mit Hilfe der Videomikroskopie konnten die folgenden Stadien während einer Zeitserie über 30 Minuten beobachtet werden, die in der folgenden Abb. 4.3.1 zu sehen sind.

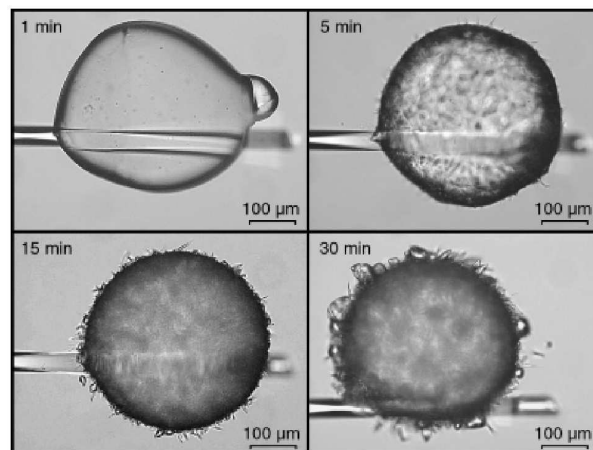


Abbildung 4.3.1: Hellfeldbilder einer Zeitserie der spontanen Emulgierung eines Tropfens Chlorcyclohexan, der Arachidinsäure enthält, nach Mikroinjektion in eine wässrige Lösung von CTAB.

Einige Minuten nach der Mikroinjektion des Öltropfens in die wässrige Lösung bilden sich in einem ersten Stadium wellenförmige Erhebungen auf dem Tropfen. Im zweiten Stadium wachsen von der Oberfläche des Tropfens flüssigkeitsgefüllte Stacheln in die wässrige Lösung hinein, die eine Länge von bis zu $l = 90 \text{ }\mu\text{m}$ und einen typischen Durchmesser von $d = 3 \text{ }\mu\text{m}$ bis $d = 15 \text{ }\mu\text{m}$ erreichen.

³Chlorcyclohexan hat eine spezifische Dichte von $\rho_{\text{CCH}} = 1.0 \text{ g/cm}^3$, so dass ein Tropfenauftrieb in der wässrigen Lösung verhindert wird.

Bei der vorliegenden Zusammensetzung des Öltropfens und der wässrigen Lösung gibt es eine kritische Größe der Stacheln, ab der im dritten Stadium die Stacheln beginnen sich einzuschnüren und sich so eine Korona aus submikroskopischen Öltröpfchen bildet. Die Bildung dieser Mikroemulsionströpfchen setzt sich weiter fort, bis der ursprüngliche Tropfen größtenteils zerfallen ist. Ähnliche dynamische Selbstorganisationsprozesse wurden unter der Bezeichnung „spontane Emulgierung“ schon beschrieben [117–121]. Allerdings findet diese Emulgierung unter den gewählten experimentellen Bedingungen nur dann statt, wenn die Tenside in den beiden Komponenten gegensinnige Ladung besitzen. Dies legt den Schluss nahe, dass die elektrostatische Wechselwirkung zwischen den Tensiden einen großen Anteil an der Triebkraft dieses Vorganges hat [122–124].

Im dritten Stadium zeigte sich mit der gewählten Zusammensetzung zwar die interessierende sternförmige Morphologie, allerdings war dieses Stadium nicht stabil, wenn die typischen Siliziumdioxid-Vorstufen Tetramethoxysilan (TMOS) oder Tetraethoxysilan (TEOS) verwendet wurden. Durch die Verwendung einer Titandioxid- oder einer Titandioxid/Siliziumdioxid-Vorstufe, die eine wesentlich geringere Hydrolysestabilität besitzen, lässt sich das dritte Stadium so stabilisieren, dass sich bei den gegebenen experimentellen Bedingungen (Raumtemperatur, wässrige Lösung mit $\text{pH} \approx 7$) eine robuste verkieselte sternförmige Morphologie ausbilden kann. Frühere Experimente fanden allerdings stets unter stark sauren oder basischen Bedingungen statt [125, 126]. Schließlich ermöglicht die Verwendung von Tetra-*tert*-butylorthotitanat (TBOT) die Bildung robuster mineralisierter Schalen in einem Zeitraum von wenigen Minuten bis Stunden (je nach den gewählten experimentellen Bedingungen). Verändert wurde im Vergleich zum vorigen Experiment noch die Konzentration der wässrigen CTAB-Lösung von $c_W = 0.0556 \text{ mM}$ auf $c_W = 0.556 \text{ mM}$. Abb. 4.3.2 zeigt wieder die vier Stadien bei der Bildung der sternförmigen Morphologie, die auch Stachelbildung genannt werden kann.

Die drei ersten Stadien gleichen denen der spontanen Emulgierung ohne TBOT (vgl. Abb. 4.3.1), vom frisch injizierten Tropfen mit glatter Oberfläche, über das zweite Stadium mit welliger Oberfläche zum dritten Stadium, in dem sich die Stacheln ausbilden. In diesem Fall schnüren sich die Stacheln aber nicht ab, sondern wachsen weiter und bleiben auch nach 50 Minuten noch stabil. Die Stacheln erreichen eine Länge von bis zu $l_S = 100 \text{ }\mu\text{m}$ bei einem durchschnittlichen Durchmesser von $d_S = 1 \text{ }\mu\text{m}$.

Die Stacheln sind in der wässrigen Lösung stabil, allerdings zersetzen sie sich an der Luft relativ schnell. Die rasterelektronenmikroskopischen Aufnahmen in Abb. 4.3.3 an gefriergetrockneten Proben zeigen die mineralisierten Hohlscha-

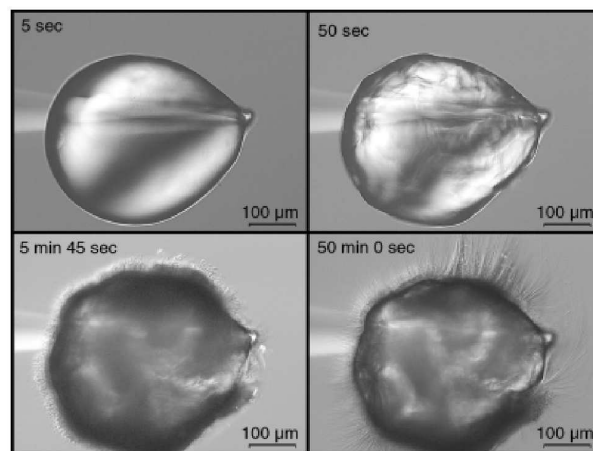


Abbildung 4.3.2: Hellfeldbilder einer Zeitserie der Bildung einer sternförmigen Morphologie an einem Tropfen Chlorcyclohexan, der Arachidinsäure und TBOT enthält, nach Mikroinjektion in eine wässrige Lösung von CTAB. Diese Aufnahmen wurden im Differential-Interferenzkontrastverfahren gemacht.

len mit einer durchschnittlichen Wandstärke von $d_H = 1 \mu\text{m}$, während die Stacheln verschwunden sind. Die Hohlschalen selbst bestehen aus einem mesoporösen Netzwerk von teilweise miteinander vereinigten Titanoxid-Kolloiden. Letztere haben einen typischen Durchmesser von $d_K = 40 \text{ nm}$ bis $d_K = 70 \text{ nm}$. Der Verlust der Stacheln bei der Trocknung deutet auf einen sehr geringen Mineralanteil in den Stacheln hin.

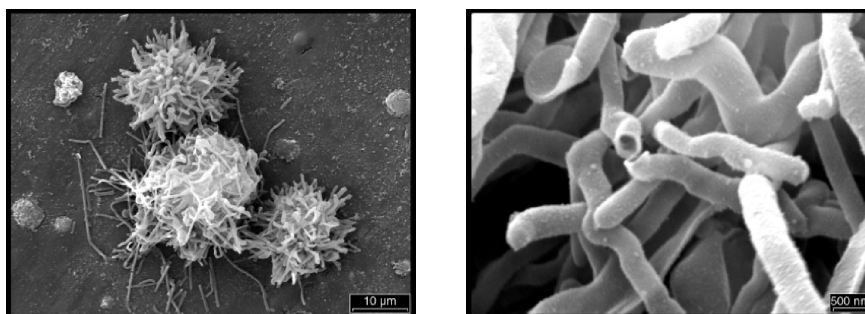


Abbildung 4.3.3: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen von sternförmigen Titandioxid/Siliziumdioxid-Schalen aus einem Mengenansatz. Links: typische Morphologie einer luftgetrockneten Probe robuster mineralisierter Schalen. Rechts: Bruchstellen in der Probe lassen mineralisierte röhrenförmige Stacheln erkennen.

Die typische Größe der Stacheln lässt sich aus diesen Aufnahmen zu einem Durchmesser von etwa $d_S = 400$ nm bis $d_S = 600$ nm bestimmen, bei einer Wandstärke von etwa $w_S = 60$ nm. Eine energiedispersive Röntgenfluoreszenzanalyse (EDX) bestätigte, dass sowohl in den Hohlschalen als auch in den Stacheln Titan und Silizium vorliegen.

Die Bildung der sternförmigen Stacheln aus der Hohlshell heraus ist allerdings stark konzentrationsabhängig. Systematische Variation der Tensid- und Vorstufenkonzentrationen ergaben, dass einheitliche sternförmige Partikel bei einer TBOT-Startkonzentration von 4 Gewichts-% entstehen. Bei einer TBOT-Konzentration von 3 Gew.-% kommt es – wenn auch verlangsamt – wieder zur Bildung der Mikroemulsionstropfen, während bei einer TBOT-Konzentration von 5 Gew.-% sich massiv mineralisierte Schalen ohne radiale Erhebungen oder Stacheln um den Öltropfen herum bilden.

Interessant ist die Frage, wie die Stacheln zusammengesetzt sind, d. h. ob die sich bildenden Stacheln mit der Metalloxid-Vorstufe aus dem Öltropfen gefüllt sind, um daraus Rückschlüsse auf den Bildungsprozess der Stacheln ziehen zu können. Die Fähigkeit eines TPLSM, optische Schnitte aufzunehmen, erlaubt es in die Stacheln hineinzuschauen.

Für die Fluoreszenzmikroskopie wurde die Ölphase mit dem Fluoreszenzfarbstoff Coumarin 153 in einer Konzentration von $c_{C153} = 3.23$ mM (1 mg/mL) angefärbt. Mit der so angefärbten Chlorcyclohexan-Lösung ließ sich die zeitliche und räumliche Entwicklung der Ölphasen-Verteilung im Tropfen und den Stacheln in Echtzeit verfolgen. Da die beiden flüssigen Phasen sich nicht vermischen und der Coumarin-Farbstoff hydrophob ist, stellt die Fluoreszenzintensität ein Maß für die Coumarin-Konzentration dar und zeigt direkt die Verteilung der Ölphase in der wässrigen Lösung an.

Der Aufbau zur Fluoreszenzmikroskopie in diesem Experiment entspricht dem Aufbau des Multistrahl-TPLSM aus Kap. 4.2, also dem Multistrahl-TPLSM, bei dem die Strahlen in der 8×8 -Matrix angeordnet sind und die Komponenten des TriM-Scopes bis auf die Spiegelrastereinheit in Eigenkonstruktion entstanden. Als Laser wurde der Coherent Vitesse benutzt. Die Ausgangsleistung betrug $P_{Vitesse} = 800$ mW, wovon aufgrund der Transmissionsverluste in den optischen Komponenten und eines Abschwächers noch $P_{Probe} = 30$ mW in die Probe gelangten. Als Detektor wurde eine PCO SensiCam CCD-Kamera (1280×1024 Pixel, 12 Bit Graustufen) verwendet, wobei allerdings nur ein interessierender Bereich von 734×575 Pixeln ausgelesen wurde. Somit rasterten die Laserstrahlen eine Fläche in der Probe von $47 \mu\text{m} \times 44 \mu\text{m}$ ab.

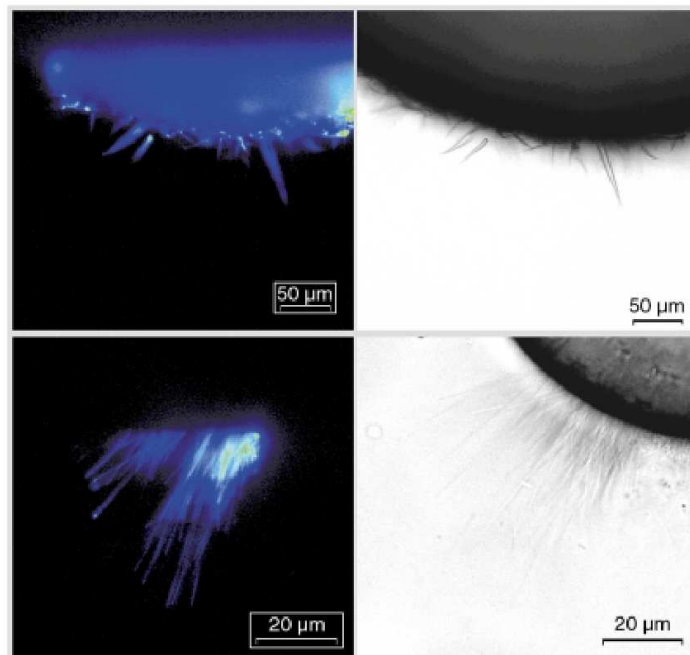


Abbildung 4.3.4: Repräsentative Fluoreszenz- und Hellfeldbilder der Randbereiche der Öltropfen mit den ausgebildeten Stacheln aus dem vorstufenfreien System und dem System mit Titandioxid-Vorstufe. Links sind die Fluoreszenzbilder zu sehen, rechts die Hellfeldbilder. Oben sind die Öltropfen abgebildet, die zum vorstufenfreien System gehören. Zu erkennen ist, dass diese Stacheln nur wenig ausgebildet sind. Unten sind die Öltropfen des Systems mit der Titandioxid-Vorstufe abgebildet. Diese Stacheln sind zahlreicher und deutlicher ausgeprägt, weil sie durch die Titandioxid-Vorstufe stabilisiert werden und deutlich weniger zur Emulgierung neigen.

Abb. 4.3.4 zeigt repräsentative Fluoreszenz- und Hellfeldbilder der Randbereiche von Öltropfen während der Ausbildung der Stacheln.

Die Bilder der oberen Reihe zeigen Öltropfen, die keine Metalloxid-Vorstufe enthalten, die Öltropfen der Bilder der unteren Reihe enthalten dagegen die Titandioxid-Vorstufe zur Stabilisierung. Zu erkennen ist, dass im Hauptteil des Öltropfens und in den Stacheln die Fluoreszenzintensität sehr gleichförmig ist, was auf eine gleichmäßige Verteilung des Lösungsmittels Chlorcylohexan schließen lässt. Es besteht also ein kontinuierlicher Übergang zwischen dem Öltropfen und den Stacheln. Die Stacheln wachsen demnach aus der Oberfläche des Öltropfens heraus und erhalten dabei einen kontinuierlichen Nachschub der Metalloxid-Vorstufe

aus dem Öltropfen, weil sie ja an der Basis eine direkte Verbindung mit dem Hauptteil des Öltropfens besitzen. Diese Eigenschaft des kontinuierlichen Überganges zwischen Öltropfen und Stacheln ist in beiden Systemen, d. h. dem System ohne und dem System mit der Metalloxid-Vorstufe, zu beobachten.

Diese Experimente führen zu dem Schluss, dass die Bildung der Stacheln im vorstufenfreien und vorstufenhaltigen System durch ähnliche Selbstorganisationsprozesse vermittelt wird, was auch eine tensidvermittelte Krümmung der Grenzfläche zwischen den nichtmischbaren Flüssigkeiten einschließt. Es lässt sich auch ausschließen, dass komplexe Tensidaggregate, z. B. multilamellare Stäbchenstrukturen, die u. a. aus hydratisierten Lecithinschichten entstehen [127], an der Bildung der Stacheln beteiligt sind.

Für die am Anfang des Kapitels beschriebene Fragestellung zur Bildung der komplexen Hohlschalen von Kieselalgen ist das vorliegende Experiment nur ein Ansatz, der einige Aspekte des natürlichen Biomineralisierungsprozesses imitiert und so nur einen entfernten Bezug zu den Organismen hat, die im Laufe der Evolution vielfältige, hochspezialisierte makromolekulare Komponenten entwickeln konnten. In dem Sinne eines engeren biologischen Bezuges lässt sich das vorliegende Modellsystem noch verbessern, sobald neue Kenntnisse über den Verkieselungsprozess und die beteiligten zellulären Komponenten gewonnen wurden.

Der Beitrag der Multistrahl-TPLSM lässt sich auch noch verbessern, denn während der Messungen zeigte sich, dass selbst die stabilen Stacheln der Ölphase mit der Metalloxid-Vorstufe ab einer größeren Länge abbrachen, vermutlich unter der Krafteinwirkung der sich bewegenden Foki. Die Verwendung einer empfindlicheren Kamera, z. B. der im aktuellen Aufbau verwendeten Andor iXon EMCCD-Kamera, erlaubt es, die Leistung pro Strahl zu reduzieren und dennoch ein ausreichend hohes Signal zu detektieren, so dass aufgrund der reduzierten Leistung die Kraftwirkung verringert wird und der Rasterungsvorgang weniger oder idealerweise keine zerstörende Wirkung auf die Stacheln hat.

4.4 Lokalisierung struktureller und regulatorischer Komponenten von COP1-umhüllten Vesikeln in lebenden Wurzelzellen

Die Untersuchung des Golgi-Apparates in Pflanzenzellen ist Gegenstand aktueller Forschung, da die genaue Funktionsweise und die Interaktion mit anderen Zellkompartimenten noch nicht vollständig bekannt ist und da die Erkenntnisse über den Golgi-Apparat von Säugetierzellen nicht ohne Weiteres auf Pflanzenzellen übertragen werden können.

Der Golgi-Apparat (GA) ist eine zentrale Organelle des Sekretionspfades einer Zelle. Der GA besteht aus mehreren durch Membranen begrenzten Hohlräumen, die übereinander gestapelt sind und Zisternen genannt werden. Der GA besitzt eine eindeutige Polarität, d. h. die Zisternen unterscheiden sich in ihrer Struktur und Funktion je nach ihrer Lage. Die beiden Pole des Golgi-Apparates bezeichnet man als cis und trans Seite. Die cis-Seite ist die konvexe Seite, die meistens zum Endoplasmatischen Retikulum (ER) und zum Zellkern gewandt ist. Die trans-Seite ist die konkave Seite, die zur Plasmamembran zeigt. Im GA werden Proteine gefaltet und post-translational modifiziert. Glykoproteine erhalten hier ihre Zuckerreste. Neben der Proteinmodifikation werden aber auch Polysaccharide und Lipide im GA gebildet. Dazu gehören ein großer Teil der Zellwand-Polysaccharidketten, Proteoglycane, Membranlipide oder auch Glycolipide, die im Inneren der Zisternen synthetisiert werden.

Der GA steht mit dem Endoplasmatischen Retikulum in Verbindung, indem vom ER Vesikel, die die sekretorischen Proteine zur Weiterverarbeitung enthalten, abgeschnürt und anschließend vom GA aufgenommen werden. In der Regel nimmt die cis-Seite Substanzen in den Golgi-Apparat auf und auf der trans-Seite verlassen sie ihn. Die folgende Abb. 4.4.1 skizziert den Aufbau des Golgi-Apparates und seine Beziehung zum ER.

Die Golgi-Apparate von Säugetieren und Pflanzen unterscheiden sich derart, dass in tierischen Zellen der GA aus mehreren Zisternen-Stapeln besteht, die sich dicht beieinander in der Nähe des Zellkerns und des ER befinden, in pflanzlichen Zellen dagegen besteht der GA aus mehreren Zisternen-Stapeln, die im gesamten Cytoplasma verteilt liegen, und die so einen dispersen Golgi-Apparat ergeben.

In vivo-Untersuchungen mit fluoreszenzmarkierten Proteinen, die den Golgi-Apparat adressieren, zeigten, dass die freibeweglichen GA in Pflanzenzellen Membran-Material und Proteine mit anderen Zellkompartimenten austauschen [128–136]. Beim Vesikeltransport verschmilzt bzw. entsteht die Vesikel-Hülle aus

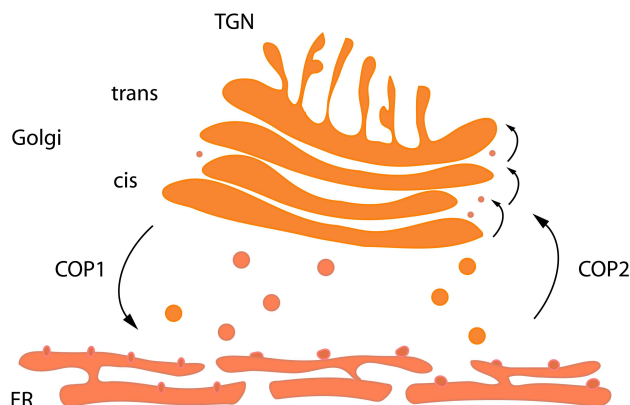


Abbildung 4.4.1: Skizze des Golgi-Apparates, des Endoplasmatischen Retikulums (ER) und der zwischen ihnen ausgetauschten Transportvesikel COP1 und COP2. TGN bezeichnet das Trans-Golgi-Netzwerk.

der GA- bzw. ER-Membran. Ein weithin akzeptiertes Modell besagt, dass die Integrität des GA abhängig ist von einem koordinierten Fluss von Vesikeln zum GA hin bzw. vom GA weg. Bei der anterograden (Vorwärts-) Bewegung werden COP2⁴ umhüllte Vesikel verwendet, bei der retrograden (Rückwärts-) Bewegung werden die Vesikel mit einer Hülle aus COP1 gebildet.

Untersuchungen an Säugetierzellen ergaben [137–139], dass die COP1-umhüllten Vesikel einen Durchmesser von 75 nm und ein Gewicht von ca. 650 kDa bis 700 kDa haben und dass die Hülle dieser Vesikel aus sieben verschiedenen Proteinen besteht: α -COP, β -COP, β' -COP, γ -COP, δ -COP, ε -COP und ζ -COP. Diese liegen als Vorstufen-Komplexe im Cytosol verteilt vor und werden an der GA-Membran durch Aktivierung durch die GTPase Arf1 rekrutiert.

Der anterograde und retrograde Transport findet gleichzeitig statt und muss gut koordiniert sein, um in einem Gleichgewicht zwischen den beiden Transportrichtungen den individuellen Charakter der Golgi-Stapel zu erhalten. Werden die Transporte unterbunden, so wird das Gleichgewicht gestört und die Struktur der Golgi-Stapel bricht zusammen. Zum Beispiel stabilisiert das Pilzgift Brefeldin A die inaktive Form des regulatorischen Proteins Arf1. Die Sekretion wird so verhindert und die Struktur des GA bricht zusammen.

Diese Erkenntnisse lassen sich auch auf Pflanzenzellen übertragen, denn Pflanzen kodieren auch den fundamentalen Satz an Genen, die den COP2-Mechanismus realisieren. So findet sich in Pflanzen die GTPase Sar1p, die die

⁴nach der englischen Bezeichnung: COP = coatomer protein

Vesikelbildung am ER reguliert. Bei Expression der nicht funktionalen Mutante des Sar1p wird die Vesikelbildung geblockt und im ER sammeln sich die zu transportierenden Moleküle an, was mit Hilfe einer GFP-Markierung gezeigt werden konnte [136, 140, 141]. In mehreren Pflanzen wurden auch Homologe für die GTPase Arf1 gefunden, die auf die Existenz von COP1-umhüllten Vesikeln hindeuten [142–144]. In einem weiteren Versuch [145] konnten 21 mögliche Pflanzen-Homologe gefunden werden, die am Membrantransport zwischen ER und GA beteiligt sind. Durch diese Methode wurden einige cDNA-Sequenzen in *Arabidopsis thaliana*, *Oryza sativa*, *Brassica rapa* und *Rhizinus communis* gefunden, die Homologe für COP1-Coatomer-Untereinheiten kodieren. Mit der Veröffentlichung der Genome von *A. thaliana* und *O. sativa* ließen sich auch die Sequenzen finden, die einen kompletten Satz der sieben möglichen Protein-Untereinheiten kodieren, die den pflanzlichen COP1-Coatomer-Komplex bilden.

Weitere Hinweise auf einen COP1-abhängigen Transport im pflanzlichen GA zeigten sich bei der Anwendung des Pilzgiftes Brefeldin A (BFA) auf Pflanzenzellen. Die Ergebnisse eines Verschmelzens⁵ des GA mit dem ER oder die Bildung eines BFA-Komplexes, der aus einer Fusion des BFA mit der trans-Zisterne besteht, deuten auf die Blockierung eines Arf1-abhängigen Transport hin [146, 147]. Mehrere Publikationen beschrieben auch eine Kreuzreaktion von Antikörpern gegen COP1-Komponenten von Säugetieren mit den Proteinen verschiedener Pflanzenspezies [146, 148–150].

Auch wenn diese Ergebnisse auf molekularer Ebene einen gemeinsamen grundlegenden Mechanismus für den Vesikeltransport vermuten lassen und die Integrität des GA deshalb von einem koordinierten Membranfluss abhängig ist, so ist das Wissen über den durch die COP-umhüllten Vesikel vermittelten Membranfluss in Pflanzen noch sehr unvollständig. So deuten verschiedene Tatsachen auf fundamentale Unterschiede in Funktion und Regulation des COP-Vesikel-Transportes zwischen Pflanzen und Säugetieren hin. In Pflanzenzellen befindet sich der bewegliche GA immer in der Nähe des ER und es existiert das für Pflanzenzellen typische ER/Golgi-Zwischenkompartiment (ERGIC, auch bekannt als Vesikel-Tubuli-Cluster, VTC). Diese Unterschiede erfordern eine experimentelle Untersuchung des pflanzlichen Membranflusses.

Für Säugetierzellen, u.a. CHO-Zellen, wurde die Lokalisierung der ϵ -COP- und ζ -COP-Proteine analysiert. Für Pflanzenzellen existieren diese Lokalisierun-

⁵Kommentar: Das „Verschmelzen von ER und GA“ ist nicht wirklich geklärt. Golgi-Zisternen und Trans-Golgi-Netzwerk können offenbar „verschmelzen“. Auch kann sich das ER durch angesammelte Proteine vergrößern; eine komplette Verschmelzung ist aber fraglich.

gen der Coatomer-Proteine noch nicht und werden mit dem hier beschriebenen Experiment zum ersten Mal mit Hilfe von GFP-Fusionsproteinen demonstriert.

Für die im Folgenden beschriebenen Untersuchungen wurde die Modellpflanze *Medicago truncatula* cv. Jemalong gewählt, weil sie eine Symbiose mit dem Stickstoff-fixierenden Bodenbakterium *Sinorhizobium meliloti* und Mykorrhizapilzen eingeht und während der Formierung der Symbiose ein Anstieg des Vesikeltransportes festzustellen ist.

Im Rahmen der biologischen Präparation der Proben hat H. DENSOW aus der Arbeitsgruppe „Molekulare Phytopathologie“ des Lehrstuhls für Genetik in der Fakultät für Biologie der Universität Bielefeld in einem ersten Arbeitsschritt die EST-Datenbank für *M. truncatula* nach Homologen für die Bildung von COP1-Vesikeln durchsucht. Wie im Folgenden noch genauer beschrieben wird, konnten ausgewählte Sequenzen, die die möglichen Coatomer-Untereinheiten und die regulatorische GTPase Arf1 kodieren, aus den *M. truncatula*-cDNA-Bibliotheken isoliert und als GFP-Fusionsproteine expremiert werden. Diese und die übrigen biologischen Arbeiten dieses Experimentes wurden ebenfalls von H. DENSOW durchgeführt.

Die *in vivo*-Lokalisierung der GFP-Fusionsproteine wurde mit Hilfe der konfokalen und der Zwei-Photonen-Laser-Raster-Mikroskopie untersucht. Die konfokale Mikroskopie wurde an einem Leica DMRE (SDK)-Mikroskop durchgeführt, das mit einer TCA-SP2 Konfokalen Raster-Einheit ausgestattet war. Die Fluoreszenz wurde mit dem Leica 63x HCX PIAPO Ölimmersionsobjektiv ($N.A. = 1.32$) aufgenommen. Das GFP ist mit einer Wellenlänge von $\lambda_{ex.} = 488$ nm angeregt und im Bereich $\lambda_{em.} = 500$ nm bis $\lambda_{em.} = 600$ nm detektiert worden. Bei den im Folgenden noch beschriebenen Versuchen, die die Farbstoffe MitoTracker Orange oder FM4-64 verwenden, wurde zusätzlich die Anregungswellenlänge $\lambda_{ex.} = 543$ nm eingestrahlt. Bei diesen Doppelfärbungen wurde die GFP-Emission im Bereich $\lambda_{em.} = 500$ nm bis $\lambda_{em.} = 540$ nm, die Farbstofffluoreszenz im Bereich von $\lambda_{em.} = 580$ nm bis $\lambda_{em.} = 670$ nm registriert. Die Zwei-Photonen-Laser-Raster-Mikroskopie wurde mit dem im Kap. 3 beschriebenen Aufbau durchgeführt, wobei das Olympus 40x LUMPlanFL/IR Wasserimmersionsobjektiv ($N.A. = 0.80$) benutzt wurde. Im Detektionsstrahlengang befand sich der schmalbandige GFP-Emissionsfilter HQ520/40M, und das GFP wurde mit $\lambda_{ex., TPLSM} = 860$ nm angeregt. Die Bildaufnahme erfolgte mit einer Bildrate von $v_{Serie} = 1$ Hz bei einer Belichtungszeit von $t_{BLZ} = 0.5$ s. Um die Auflösung der Bilder zu erhöhen, sind die Bilder mit der Dekonvolutions-Software Huygens Essential (Scientific Volume Imaging b.v., Niederlande) bearbeitet worden, wobei vier Iterationen mit einem Hintergrund im Bereich 20 bis 120 eingestellt wurden.

Die Suche in der EST-Datenbank identifizierte mögliche Homologe für die sieben Coatmer-Proteine, die an der Vesikelbildung beteiligt sind, und es konnten Gensequenzen für zwei Isoformen der ζ -COP-Untereinheit sowie die kleine regulatorische GTPase MtArf1 aus den cDNA-Bibliotheken für *Medicago truncatula* isoliert werden. Zudem konnten dominant aktive Mutationen (Q71L) der GTPase und dominant inaktive Mutanten (T31N) hergestellt werden (Bezeichnung MtArf1-Q71L bzw. MtArf1-T31N). Für die fluoreszenzmikroskopischen Untersuchungen wurden schließlich von den Kollegen aus der Fakultät für Biologie die mGFP6-Fusionen MtArf1::GFP, Mt ζ -COP1::GFP und Mt ζ -COP2::GFP in *M. truncatula* expremiert, wobei anstelle des originalen eGFP das modifizierte GFP mGFP6 Verwendung fand [151–157].

Wie die folgenden Abschnitten noch ausführlicher beschreiben, zeigten die GFP-Fusionsproteine eine Lokalisierung in kleinen Strukturen in den Zellen. Diese kleinen Strukturen wandern in einer Actin-abhängigen Weise entlang des ER-Netzwerkes und reagieren auf die Behandlung mit dem Inhibitor Brefeldin A.

Die GFP-Fusionsproteine sind im „hairy root“-Verfahren erzeugt worden [158]. Der Erfolg der Fusion zeigte sich in der GFP-Kontrolle, bei der die GFP-Fluoreszenz nicht an spezifischen Strukturen beobachtet werden konnte, sondern die Fluoreszenz verteilte sich gleichmäßig im Cytoplasma, wie in der folgenden Abb. 4.4.2 A zu sehen ist.

In Abb. 4.4.2 A ist erkennbar, dass das Cytoplasma der ausgewachsenen Wurzelzellen als dünnes Band zwischen der zentralen Vakuole und der Zellwand sichtbar wird. Die Vakuole nimmt wie bei den meisten Pflanzenzellen den größten Raum ein, hier bis zu 95 %. Weder in der Vakuole noch in der Zellwand ist eine GFP-Fluoreszenz detektierbar, wie im eingesetzten Teilbild der Abb. 4.4.2 zu sehen ist. Die Kontrolle zeigt also für das GFP keine spezifische Lokalisierung innerhalb der *M. truncatula*-Wurzelzellen.

Bei den Wurzelzellen, die mit den GFP-Fusionsproteinen MtArf1::GFP, Mt ζ -COP1::GFP und Mt ζ -COP2::GFP transformiert waren, zeigte sich auch diese GFP-Fluoreszenz, aber zusätzlich traten noch zahlreiche helle Punkte auf. Die Punkte hatten einen Durchmesser von etwa $d = 1 \mu\text{m}$ und schienen zufällig im Cytoplasma verteilt zu sein. Diese Art der Lokalisierung konnte für alle Fusionsproteine beobachtet werden, wie in Abb. 4.4.2 B (für MtArf1::GFP), C (für Mt ζ -COP1::GFP) und D (für Mt ζ -COP2::GFP) zu sehen ist.

Es konnte aber eine starke Variation der Anzahl der fluoreszierenden Strukturen beobachtet werden. Diese Variation hängt von der Lokalisierung der Zellen innerhalb der Wurzel ab. So zeigt Abb. 4.4.2 E Zellen von der Wurzelspitze, die klein und plasmareich sind und bei denen fast das gesamte Cytoplasma mit den

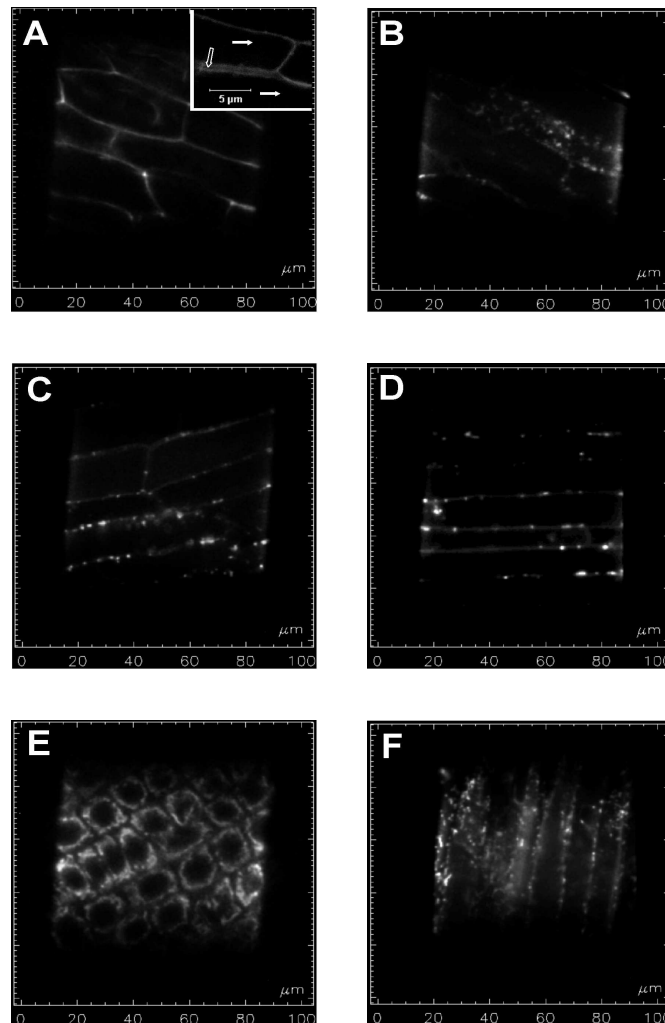


Abbildung 4.4.2: TPLSM-Bilder der *in vivo*-Lokalisierung von Komponenten der COPI-umhüllten Vesikel in *Medicago truncatula*-Wurzelzellen. Die Wurzelzellen waren mit MtArf1::GFP, Mt ζ -COP1::GFP bzw. Mt ζ -COP2::GFP transformiert. A: Die GFP-Kontrolle zeigte keine spezifische Lokalisierung der Fluoreszenzverteilung im Cytoplasma. Ausschnittbild: keine Fluoreszenz in der Zellwand (offener Pfeil) und in der Vakuole (geschlossener Pfeil). B: Lokalisierung von MtArf1::GFP auf kleinen Strukturen, die durch das Cytoplasma strömen. C: gleiche Beobachtung wie B für Mt ζ -COP1::GFP. D: gleiche Beobachtung wie B für Mt ζ -COP2::GFP. E, F: kontinuierliche Abnahme der Anzahl fluoreszierender Strukturen von der Wurzelspitze (E), über einen Bereich ca. 1 cm hinter der Spitze (F) bis zu den Bereichen reifer Wurzelzellen (B,C,D).

fluoreszierenden Strukturen gefüllt ist. Abb. 4.4.2 F dagegen zeigt schon ältere Teile der Wurzel, die ungefähr 1 cm von der Wurzelspitze entfernt sind. In diesen Zellen, die in die Länge zu wachsen beginnen, ist die Anzahl fluoreszierender Strukturen kleiner als an der Wurzelspitze, aber noch höher als in den ausgereiften und langgestreckten Zellen, die noch älter und noch weiter von der Wurzelspitze entfernt sind (Abb. 4.4.2 B, C und D).

Die Beobachtung der gleichartigen Lokalisierung der drei verschiedenen GFP-fusionierten Proteine MtArf1::GFP, Mt ζ -COP1::GFP und Mt ζ -COP2::GFP in den Zellen ist schon für sich eine wertvolle Erkenntnis, aber die Untersuchungen erlaubten auch die Messung von Veränderungen im zeitlichen Verlauf. Und dieser zeitliche Verlauf zeigte, dass die fluoreszierenden Strukturen aller drei GFP-Fusionsproteine sich auf eine typische Weise im Cytoplasma bewegten. Dabei gibt es Phasen, in denen sich die Strukturen bewegen, unterbrochen von Phasen, in denen die Strukturen an einer Position verharren. Diese Strukturen zittern dann allerdings noch aufgrund der BROWNSchen Molekularbewegung. Wie die aufgenommenen Zeitreihen zeigen, stoppen die fluoreszierenden Strukturen an definierten Positionen, wobei sich auch mehrere Strukturen an einer Position ansammeln und zu einer erhöhten Fluoreszenz führen können. Trotzdem behalten die Strukturen ihren individuellen Charakter und wandern nach dem Stop gelegentlich in unterschiedlichen Richtungen auseinander, wie in Abb. 4.4.3 zu sehen ist.

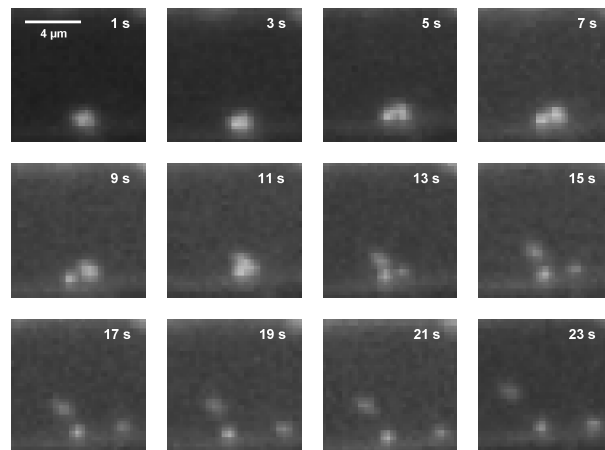


Abbildung 4.4.3: Zeitserie dreier fluoreszierender Strukturen (sehr wahrscheinlich Golgi-Stapel) in einem Ausschnitt einer mit Mt ζ -COP2::GFP transformierten *Medicago truncatula*-Wurzelzelle. Nach einem Stop an einer definierten Position strömen die drei Strukturen in verschiedene Richtungen, was die Individualität der Strukturen demonstriert.

Eine quantitative Auswertung ergab, dass verschiedene fluoreszierende Strukturen zu einem Beobachtungszeitpunkt mit unterschiedlichen Geschwindigkeiten durch das Cytoplasma strömen. Die maximale Strömungsgeschwindigkeit betrug dabei $v_{\max.} = 2.3 \mu\text{m/s}$. Die Auswertung zeigte weiterhin, dass in Intervallen von 20 s ein Verhältnis von 40 % strömenden zu 60 % nicht strömenden Strukturen für alle drei GFP-Fusionskonstrukte besteht. Dieses Verhältnis bleibt während der ersten 60 s erhalten, nach 80 s steigt der Anteil der nicht-strömenden Strukturen auf 71.7 % an, nach 100 s beträgt dieser Anteil 74.5 %. Das bedeutet, dass immer mehr Strukturen immobil werden. Ursache für die Abnahme der Beweglichkeit ist die kontinuierliche Bestrahlung der Zellen mit dem Laser, der mit den in den vorigen Kapiteln genannten mikroskopietyptischen Parametern betrieben wurde. Diese andauernde Anregung führt nicht nur zu einem Ausbleichen der GFP-Fluoreszenz, sondern auch zu einer Probenschädigung, die sich in Form der reduzierten Beweglichkeit ausdrückt. Um die Auswirkung dieser Strahlenschäden auf die Ergebnisse zu vermeiden, dauerten die meisten Messungen $t_{\text{Messung}} = 120 \text{ s}$ und die Bilder wurden in $t_{\text{Serie}} = 1 \text{ s}$ Intervallen aufgenommen.

Für eine genauere Untersuchung des Bewegungsverhaltens der fluoreszierenden Strukturen wurden in den Zeitreihenaufnahmen die Strukturen analysiert, die sich möglichst lange in der Rasterebene aufhielten und einige Bewegung zeigten. Abb. 4.4.4 zeigt fünf verschiedene Quantifizierungen, deren Bewegungsmuster ausgewertet wurden und in der folgenden Tabelle 4.4.1 aufgelistet sind.

Die Daten der fünf Quantifizierungen aus Tab. 4.4.1 verdeutlichen das irreguläre Strömungsverhalten der fluoreszierenden Strukturen, das sich durch einen Wechsel von Strömungsphasen und Stopps an einzelnen Positionen mit unterschiedlichen Zeitdauern auszeichnet. Dabei variiert die Zeitdauer der einzelnen Phasen in sehr großen Bereichen: die Strömungsphasen hatten eine Dauer von 2 s bis 53 s, die Stopps dauerten von 2 s bis 127 s. Entsprechend dieser Variationen zeigt auch die Geschwindigkeit der Strukturen in den Bewegungsphasen eine große Variation. Die maximale gemessene Geschwindigkeit betrug $v_{\max.} = 2.3 \mu\text{m/s}$.

Zusammengenommen zeigen die aufgenommenen Zeitreihenbilder und die Quantifizierungen, dass es sich bei den sich bewegenden Strukturen um Golgi-Stapel handelt, da die fluoreszierenden GFP-Fusionsproteine gerade die Golgi-Stapel als Ziel adressieren.

Unterstützt wird diese Aussage insbesondere für das in diesen Messungen als Kontrolle verwendete MtArf1 durch die Untersuchungen von M.H. LEE *et al.* [159] und M. TAKEUCHI *et al.* [160], die in *Arabidopsis thaliana* gezeigt haben, dass fluoreszenzmarkiertes Arf1 ebenfalls in kleinen punktförmigen

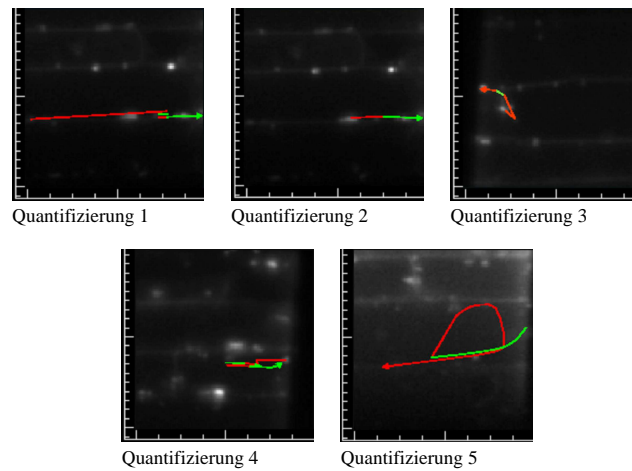


Abbildung 4.4.4: Bewegungsmuster individueller fluoreszierender Strukturen im Cytoplasma der *M. truncatula*-Wurzelzellen. Zurückgelegte Entfernungen und Zeitdauern wurden für die verschiedenen Strukturen quantifiziert. Das Strömungsverhalten der einzelnen Strukturen zeigte aber kein definiertes Muster.

gen Strukturen in *Arabidopsis*-Protoplasten lokalisiert ist. Desweiteren haben auch A. NEBENFÜHR *et al.* [131] und P. BOEVINK *et al.* [128] in ihren *in vivo*-Untersuchungen gezeigt, dass an den Golgi-Stapeln angesiedelte GFP-markierte Zuckertransferasen als kleine sich bewegende Strukturen im Cytoplasma der transformierten Zellen (Tabak-BY2-Suspensionszellen bzw. Blattzellen von *Nicotiana glauca*) zu beobachten sind und ein typisches Bewegungsmuster zeigen. Wiederum gibt es Phasen mit aktiver Strömung, die von Pausen unterbrochen werden, und wiederum bewegten sich die verschiedenen GAs mit unterschiedlichen Geschwindigkeiten und einzelne GA hatten unterschiedliche Geschwindigkeiten während ihrer Bewegungsphasen. P. BOEVINK *et al.* [128] konnte auch eine maximale Geschwindigkeit von $v_{\max.} = 2.2 \mu\text{m/s}$, ähnlich wie der hier bestimmte Wert, finden. Auch die Abnahme der Anzahl der fluoreszierenden Strukturen in den älteren Bereichen der Wurzel deutet auf eine Lokalisierung an den Golgi-Stapeln hin, denn generell verändert sich die Anzahl der Golgi-Stapel pro Zelle in Abhängigkeit von den physiologischen Bedingungen [161], was sich auch in der Abnahme der Anzahl der Golgi-Stapel in reifen Zellen widerspiegelt. In Wurzelspitzenzellen steigt die Anzahl der Golgi-Stapel am Beginn der Sekretionsphase auf 300 bis 600 GAs an [162], was die hohe metabolische Aktivität ausdrückt, wenn z. B. Maiswurzelspitzenzellen große Mengen an Mukopolysacchariden produzieren.

Tabelle 4.4.1: Quantifizierungen der Bewegungsmuster der fünf ausgewählten fluoreszierenden Strukturen aus Abb. 4.4.4.

Quantifizierung 1	Zeitdauer [s]	24	4	19	2	9	11	6	4			
	Entfernung [μm]	28	1.8	Stop	1.3	Stop	7.5	Stop	1			
	Geschwindigkeit [$\mu\text{m/s}$]	1.16	0.45	—	0.65	—	0.68	—	0.25			
Quantifizierung 2	Zeitdauer [s]	9	4	9								
	Entfernung [μm]	6	Stop	8								
	Geschwindigkeit [$\mu\text{m/s}$]	0.67	—	0.89								
Quantifizierung 3	Zeitdauer [s]	9	65	7	7	9						
	Entfernung [μm]	7.5	Stop	1.4	Stop	2.3						
	Geschwindigkeit [$\mu\text{m/s}$]	0.83	—	0.2	—	0.26						
Quantifizierung 4	Zeitdauer [s]	14	18	2	2	2	96	4	16	15	23	12
	Entfernung [μm]	6.3	Stop	0.7	Stop	2	Stop	3	Stop	5.5	Stop	6.7
	Geschwindigkeit [$\mu\text{m/s}$]	0.45	—	0.35	—	1.0	—	0.75	—	0.39	—	0.56
Quantifizierung 5	Zeitdauer [s]	31	16	53	127							
	Entfernung [μm]	19	Stop	51.1	Stop							
	Geschwindigkeit [$\mu\text{m/s}$]	0.61	—	0.96	—							

Um die Lokalisierung der drei Konstrukte MtArf1::GFP, Mt ζ -COP1::GFP und Mt ζ -COP2::GFP weiter zu untersuchen, wurden verschiedene Inhibitoren und Farbstoffe angewendet.

Auch die Mitochondrien zeigen ein aktives Strömungsverhalten. Nach der Anfärbung der Mitochondrien in den transformierten Zellen mit dem Farbstoff Mitotracker fand sich keine Kollokalisierung der GFP-fluoreszierenden Strukturen und der Mitochondrien, wie in Abb. 4.4.5 zu sehen ist.

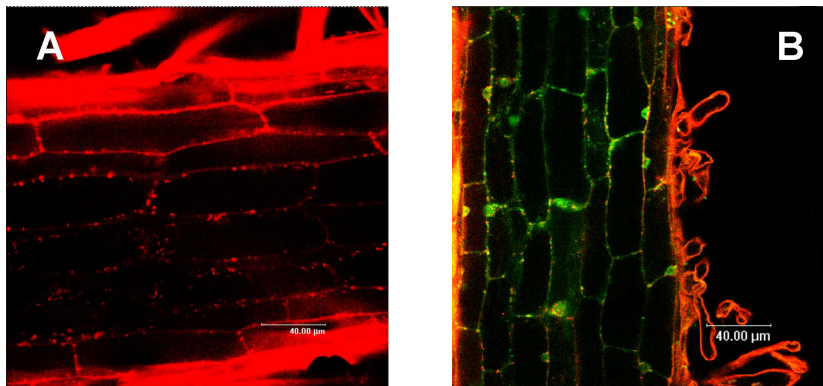


Abbildung 4.4.5: CLSM-Fluoreszenzaufnahmen der Doppelfärbung mit Mitotracker von MtArf1::GFP-transformierten *M. truncatula*-Wurzelzellen, um die Mitochondrien sichtbar zu machen. A: Mitochondrien sind in großer Anzahl vorhanden und zeigen intensive Strömungsaktivität. B: Die mit MtArf1::GFP-markierten fluoreszierenden Strukturen sind deutlich von den mit Mitotracker gefärbten Mitochondrien unterscheidbar.

Der Membran-spezifische Farbstoff FM4-64 färbt in einem zeitabhängigen Verhalten die Endomembranen in der Zelle an. Nach der Aufnahme des Farbstoffes in die Zelle wird zuerst die Plasmamembran angefärbt, danach konzentriert sich der Farbstoff in möglichen endozytischen intermediären Strukturen und schließlich wird der Farbstoff zu prävakuolären Kompartimenten, der Vakuole und dem Golgi-Apparat transportiert. Die Farbstoffaufnahme erfolgt letztendlich durch eine Art Vesikeltransport, denn von der Plasmamembran werden angefärbte Teile als Vesikel abgeschnürt und ins Zellinnere zu ersten Zielkompartimenten transportiert. Durch einen anhaltenden Transport gelangt ein größer werdender Teil des Farbstoffes zu den ersten Zielkompartimenten. Von diesen aus erfolgen Vesikeltransporte zu weiteren Kompartimenten, wobei jetzt die schon angefärbten Membranteile für die Vesikel verwendet werden. Durch diesen „stufenweisen“ Transport gelangt der Membranfarbstoff zu immer weiter im Inneren der Zelle lie-

genden Membranen. Das ER und die Hülle des Zellkernes werden dagegen vom FM4-64-Farbstoff nicht angefärbt. Aus diesem Färbeverhalten erklärt sich die Beobachtung, dass erst nach einer langzeitigen siebenstündigen Inkubation des FM4-64-Farbstoffes eine Kolokalisierung mit den GFP-markierten Strukturen zu sehen ist, während bei einer nur kurzzeitigen 15-minütigen Inkubation keine Kolokalisierung zu beobachten ist. Abb. 4.4.6 zeigt Aufnahmen der kurzzeitigen und der langzeitigen Inkubation.

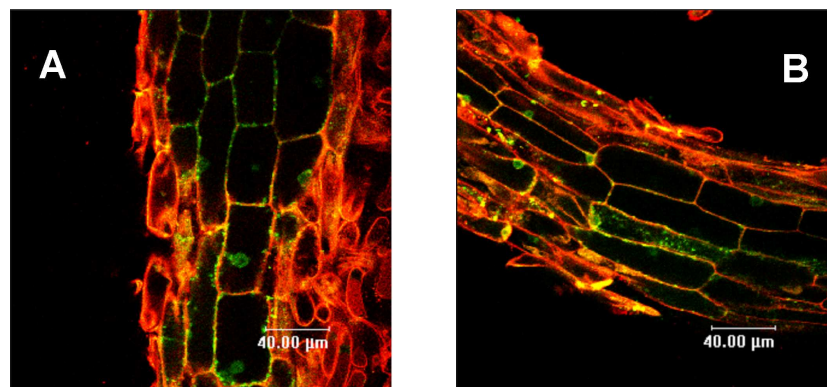


Abbildung 4.4.6: CLSM-Fluoreszenzaufnahmen der Doppelfärbung mit FM4-64 von MtArf1::GFP-transformierten *M. truncatula*-Wurzelzellen, um die Endomembranen sichtbar zu machen, bei einer kurzzeitigen und einer langzeitigen Inkubation. A: Kurzzeitige Inkubation über 15 min. mit FM4-64 führt zu einer intensiven Färbung der Plasmamembran, aber die GFP-markierten Strukturen werden nicht mit angefärbt. B: Langzeitige Inkubation über 7 Std. führt zu einer Doppelfärbung der GFP-markierten Strukturen mit dem Membranfarbstoff FM4-64, d. h. es kommt zu einer Kolokalisierung des FM4-64 an den GFP-markierten Strukturen.

Zu diesen ersten beiden Ergebnissen der Lokalisierung der GFP-Fusionsproteine an den Golgi-Stapeln und der Analyse des Bewegungsmusters kommt als drittes Ergebnis, dass die Bewegung der Mt ζ -COP-markierten Strukturen entlang der ER-Tubuli Actin-abhängig ist, was sich durch Untersuchungen mit Inhibitoren bestätigen ließ. Zudem lieferten die Inhibitor-Untersuchungen eine weitere Unterstützung für die These, dass die Fusionskonstrukte Mt ζ -COP1::GFP und Mt ζ -COP2::GFP an den Golgi-Stapeln lokalisiert sind, wie im Folgenden bei der Beschreibung der Untersuchungen mit dem Inhibitor Brefeldin A deutlich wird.

Es ist bekannt, dass die Bewegung des Golgi-Apparates vom Actin-Filamentensystem und nicht vom Mikrotubuli-System der Zelle abhängt. Untersuchungen

von A. NEBENFÜHR *et al.* [131] und P. BOEVINK *et al.* [128] beschrieben eine Unterbrechung der Golgi-Strömung nach einer Behandlung mit den Actin-Cytoskelett zerstörenden Substanzen Cytochalasin D und Latrunculin A.

In den hier durchgeführten Messungen führte die Inkubation mit Latrunculin B (2 $\mu\text{g/ml}$ für 7 Std.) zu einer kompletten Unterbrechung der Strömung (vgl. Abb. 4.4.7 A). Die Strömung setzt aber zumindest mit reduzierter Intensität wieder ein, wenn das Latrunculin B über Nacht ausgewaschen wird (vgl. Abb. 4.4.7 B).

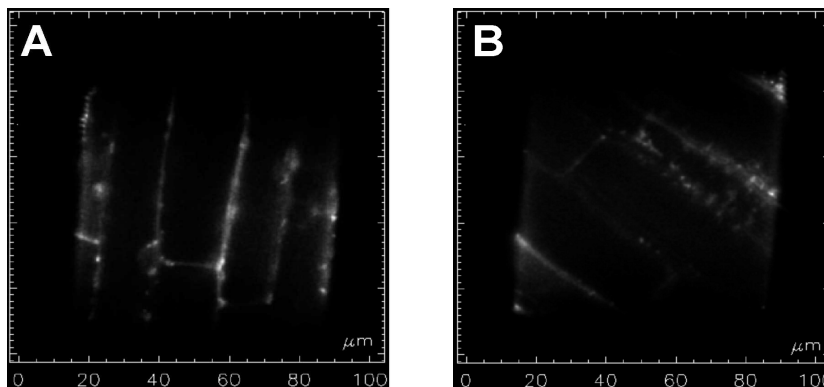


Abbildung 4.4.7: Wirkung von Latrunculin B als Inhibitor auf Mt ζ -COP1::GFP-transformierte *M. truncatula*-Wurzelzellen. A: Latrunculin B zerstört das Actin-Filament und lässt die Strömung der fluoreszierenden Strukturen vollständig verschwinden. B: Der Effekt von Latrunculin B ist reversibel. Nach dem Auswaschen des Inhibitors setzt die Strömung wieder ein.

Im Gegensatz zu den Actin-Filament zerstörenden Substanzen haben die Substanzen Nocodazol, Colchicin und Propyzamid, die alle auf die Mikrotuboli eine zerstörende Wirkung haben, keinen stoppenden Einfluss auf die Bewegung der Golgi-Stapel [131].

Allgemein ist bekannt, dass die Golgi-Stapel in Pflanzenzellen eng mit dem ER-Netzwerk verbunden sind. Bei Anwendung des ER-färbenden Fluoreszenzfarbstoffes DiOC₅ zeigte sich in den hier durchgeführten Messungen, dass die mit GFP-Fusionsproteinen markierten fluoreszierenden Strukturen sich entlang von ER-Tuboli bewegten, wie in der folgenden Abb. 4.4.8 A zu sehen ist. Dies wurde auch durch Experimente von P. BOEVINK *et al.* [128] und C.M. SAINT-JORE *et al.* [135] bestätigt, die zeigten, dass sich einzelne Golgi-Stapel entlang des ER-Netzwerkes bewegen.

Als weiterer Inhibitor wurde das Pilzgift Brefeldin A (BFA) angewendet. In einer Konzentration von $c_{\text{BFA}} = 100 \mu\text{g/ml}$ wurde seine Wirkung auf die mit den GFP-Fusionskonstrukten transformierten Wurzelzellen untersucht. BFA verändert die Morphologie der pflanzlichen Golgi-Stapel [163], und so fanden sich auch in den hier durchgeführten Messungen sehr deutliche Veränderungen in der Morphologie und dem Strömungsverhalten der mit den GFP-Fusionsproteinen markierten Strukturen. Dies ist in Abb. 4.4.8 B gezeigt.

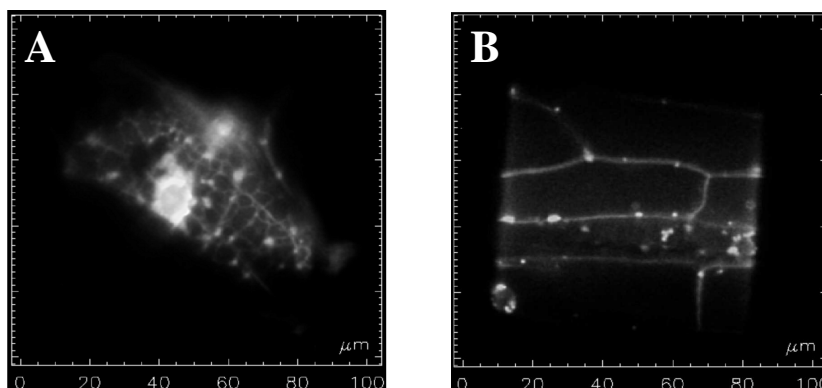


Abbildung 4.4.8: Bewegung entlang des ER-Netzwerkes durch Anfärbung des ER mit dem Farbstoff DiOC₅ und Strömungsinhibierung durch Brefeldin A. A: Der Farbstoff DiOC₅ offenbart durch ER-Anfärbung, dass die Bewegung der fluoreszierenden Strukturen entlang des ER-Netzwerkes stattfindet. B: Das Pilzgift Brefeldin A reduziert die Strömungsaktivität deutlich, stattdessen akkumulieren große fluoreszierende Aggregate um den Zellkern und im Cytosol.

Lässt man BFA über Nacht einwirken, so reduziert sich die Gesamtanzahl der fluoreszierenden Strukturen in der Zelle und es bilden sich einige große Aggregate mit einem Durchmesser von $d_A = 3 \mu\text{m}$ bis $d_A = 4 \mu\text{m}$. Einige dieser Aggregate fanden sich in der Nähe des Zellkernes und zeigten keine Strömungsaktivität, andere Aggregate waren im Cytoplasma verteilt und nur einige wenige Strukturen behielten ihre ursprüngliche Größe von etwa $d = 1 \mu\text{m}$. Auch wenn sich noch einige wenige fluoreszierende Strukturen im Cytoplasma bewegten, war die generelle Strömungsaktivität sehr stark reduziert.

Allerdings variiert die Rate der aufeinanderfolgenden morphologischen Veränderung nach BFA-Zugabe von Zelle zu Zelle und sogar – wenn auch in geringerem Ausmaß – innerhalb einer Zelle von Golgi-Stapel zu Golgi-Stapel, wie C. RITZENTHALER *et al.* [146] an Tabak-BY2-Suspensionszellen beobachtete. In Wurzelzellengewebe ist die Situation aufgrund eines Inhibitor-Gradienten durch

Diffusion im Gewebe komplexer und führt zu unterschiedlichen Reaktionen der einzelnen Golgi-Stapel. Die Wirkung von BFA in Pflanzenzellen ist zudem immer noch Gegenstand aktueller Diskussionen.

In Säugetierzellen bewirkt BFA eine Zerstörung des Golgi-Apparates zusammen mit einer Verschmelzung der cis-Zisterne mit dem ER und der Bildung des so genannten BFA-Kompartimentes aus der trans-Zisterne [164].

In den hier durchgeführten Messungen konnte dagegen keine Fusion der Golgi-Stapel mit dem ER bei BFA-Zugabe beobachtet werden. Stattdessen fanden sich BFA-Kompartimente, die als große fluoreszierende Aggregate im Cytosol und in Kernnähe sichtbar waren. Dies stimmt mit Beobachtungen im Mais-Wurzelzellen und anderen Wurzelzellen überein, in denen ebenfalls eine Aggregation der Golgi-Stapel im Cytosol und eine Formierung der BFA-Kompartimente beobachtet werden konnte [132, 150, 165, 166]. Mögliche Erklärungen für diese unterschiedlichen Ergebnisse können sein, dass BFA in einer gewebespezifischen Art und Weise wirkt oder dass die Wirkung des BFA von den Fluoreszenzmarkerproteinen abhängt, die die Golgi-Stapel adressieren [163]. Bei Verwendung von Fluoreszenzmarkerproteinen, die sich in der cis-Zisterne befinden, beobachtet man ein Verschmelzen der Golgi-Stapel mit dem ER, bei Verwendung von Fluoreszenzmarkerproteinen, die die trans-Zisterne adressieren, findet man dagegen die Bildung der BFA-Kompartimente. Die Beobachtung fluoreszierender BFA-Kompartimente in den hier durchgeführten Experimenten legt die Interpretation nahe, dass die GFP-Fusionskonstrukte MtArf1::GFP, Mt ζ -COP1::GFP und Mt ζ -COP2::GFP alle die trans-Zisterne adressieren. Allerdings wird diese Vermutung nicht unterstützt durch die Untersuchungen von P. PIMPL *et al.* [149], die bei Anwendung von Antisera gegen *A. thaliana* γ -COP, *Zea mays* δ -COP und *Zea mays* ϵ -COP zeigten, dass diese COP1-Untereinheiten und Arf1p überwiegend in den cis-Zisternen der Golgi-Stapel der Mais- bzw. *Arabidopsis*-Wurzelzellen zu finden sind. Die in den hier durchgeführten Messungen gefundene Konzentration der Fluoreszenz in den beobachteten BFA-Kompartimenten lässt somit Raum für Spekulationen.

Eine weitere Wirkung des BFA ist das schnelle Ablösen der Coatomer-Untereinheiten von den Golgi-Stapeln, das allgemein als erster Effekt einer BFA-Anwendung auf Säugetierzellen angesehen wird. In IdIF-Zellen zeigte sich mit Hilfe von FRET-Messungen, dass sich Arf1::CFP und ϵ -COP::YFP nach BFA-Zugabe schon nach 15 s bis 30 s vom Golgi-Apparat lösten und ins Cytosol wanderten [167]. Ähnliche Ergebnisse wurden für Tabak-BY2-Zellen gefunden, hier dissoziierten At γ -COP und Arf1 innerhalb von 5 min. vom Golgi-Apparat. In den hier durchgeführten Messungen konnte diese Beobachtung allerdings nicht bestä-

tigt werden. Stattdessen blieben die Coatomer-Untereinheiten Mt ζ -COP1::GFP und Mt ζ -COP2::GFP, sowie das regulatorische Protein MtArf1::GFP mit den gebildeten BFA-Kompartimenten assoziiert. Es wurde keine wesentliche Ausschüttung ins Cytosol registriert. Diese Beobachtung ist auch in Mais-Wurzelzellen gemacht worden bei der Untersuchung des BFA-Effektes auf die Lokalisierung von Arf1p, β -COP, β' -COP und γ -COP [150]. Diese Proteine blieben ebenfalls weiterhin am BFA-Kompartiment. Für Arf1p lässt sich diese Beobachtung erklären, da in weiteren Untersuchungen gezeigt werden konnte, dass Arf1p-GDP mit einem p23-Rezeptorprotein auf der Golgi-Membran interagiert [29, 168, 169].

Die Interpretation der Ergebnisse führt allerdings zu der Annahme, dass noch andere Mechanismen für den Verbleib der Coatomer-Proteine am BFA-Kompartiment zuständig sind und wieder ist die Situation in Wurzelzellen anders als in Tabak-BY2-Zellen. Mit den Ergebnissen der hier durchgeführten Messungen kann der Aussage von A. NEBENFÜHR *et al.* [163] nicht zugestimmt werden, dass das schnelle Ablösen der Coatomer-Proteine von den Golgi-Stapeln ins Cytosol bei BFA-Behandlung eine universelle Eigenschaft aller eukaryontischen Zellen ist. Die Effekte von BFA hängen vom untersuchten Pflanzentyp ab. Dies bedeutet nicht, dass die Wirkungsweise von BFA in Wurzelzellen sich von der in BY2- oder tierischen Zellen unterscheidet, aber die COP1-Proteine haben wahrscheinlich noch weitere Interaktionen mit Proteinen des Golgi-Apparates, die sie in der Nähe der Bereiche der Golgi-Stapel halten, die für die Vesikelbildung verantwortlich sind.

Bei der Untersuchung der Lokalisierung der Coatomer-Untereinheiten sollten eigentlich auch einige COP1-umhüllte Vesikel sichtbar sein. Die Vesikel sind zwar zu klein, um sie mit Hilfe der TPLSM oder der CLSM direkt beobachten zu können, aber es kann angenommen werden, die Vesikel als eine Art Hintergrund in der Nähe der Golgi-Stapel zu finden. Die aufgenommenen Bilder zeigten aber keine Anzeichen für die Präsenz irgendwelcher Vesikel. Die fluoreszenzmarkierten Vesikel waren – wenn überhaupt – nur in einer sehr geringen Anzahl vorhanden. Deshalb wurden zwei Mutanten des regulatorischen Proteins MtArf1 erzeugt [170]: die dominant inaktive Form T31N mit einer kleinen Affinität zu GTP, und die dominant aktive Form Q71L mit einer reduzierten GTPase-Aktivität. Beide Formen wurden wiederum mit GFP fusioniert. Die Messungen mit MtArf1-T31N::GFP zeigten keine spezifischen Lokalisierungen im Vergleich zu der GFP-Kontrolle, in beiden Fällen war die Fluoreszenz gleichmäßig im Cytoplasma verteilt, wie in Abb. 4.4.9 A zu sehen ist. Nur gelegentlich fand sich eine Lokalisierung fluoreszierender Strukturen vergleichbar mit der von Arf1.

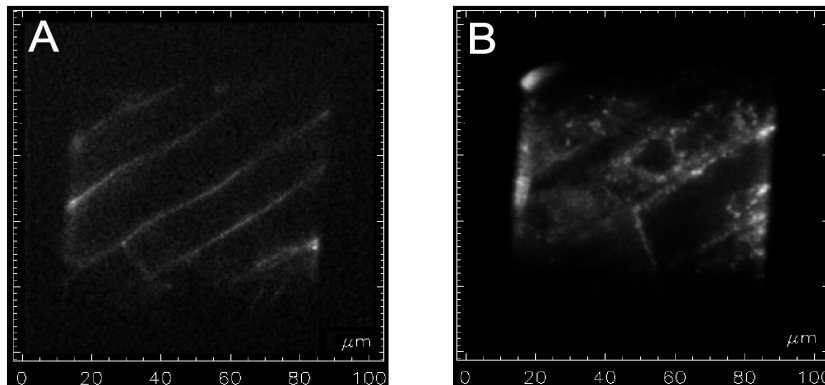


Abbildung 4.4.9: Lokalisierung der dominant inaktiven und dominant aktiven MtArf1::GFP-Mutanten in *M. truncatula*-Wurzelzellen. A: Die Fluoreszenz der dominant inaktiven Form MtArf1-T31N::GFP ist gleichmäßig im Cytosol verteilt und zeigt keine spezifische Lokalisierung. B: Die dominant aktive Form MtArf1-Q71L führt dagegen zu einem hohen Hintergrund an kleinen granularen fluoreszierenden Strukturen.

Diese Beobachtung stimmt mit der von C. VASUDEVAN *et al.* [171] zur cytoplasmatischen Verteilung von T31N-Arf1-GFP in HIRc-Zellen überein. Im Gegensatz dazu berichten M.H. LEE *et al.* [159] und M. TAKEUCHI *et al.* [160] von einer Aufnahme der Golgi-Membran ins ER in *Arabidopsis*-Protoplasten bzw. einer Umverteilung des Markerproteins AtErd2::GFP in Tabak-BY2-Zellen. Trotzdem bildeten sich für zwei weitere Konstrukte (AtRer1B::GFP und AtSed5::GFP) keine ER-Golgi-Hybridkompartimente bei der Expression von Arf1-T31N. Die Wirkung von Arf1-T31N kann also unterschiedlich sein.

Die Lokalisierung der dominant aktiven Form MtArf1-Q71L::GFP in *Medicago*-Wurzelzellen offenbarte einen komplett unterschiedlichen Phänotyp als für die dominant inaktive Form MtArf1-T31N::GFP. Dieses Konstrukt ist wie die Wildtyp-Form MtArf1 an den Golgi-Stapeln lokalisiert, aber zusätzlich ist in Abb. 4.4.9 B ein starker Hintergrund von kleinen granularen fluoreszierenden Strukturen zu sehen, die sich im Cytoplasma, aber besonders in der Nähe des Zellkernes befinden. Die Vermutung liegt nahe, dass es sich bei diesen granularen Strukturen zumindest teilweise um COP1-umhüllte Vesikel handelt, denn die dominant aktive Form des Arf1-Proteins führt dazu, dass die Morphologie des Golgi-Apparates zerstört wird und deshalb auch die Vesikelhülle nicht abgebaut werden kann und so die Vesikel nicht mit den Zielmembranen fusionieren können.

Die dominant aktive Form MtArf1-Q71L::GFP führt somit zu einem Anstieg der Anzahl der COP1-umhüllten Vesikel.

Dem gegenüber steht die Tatsache, dass in Wurzelzellen, die mit MtArf1::GFP, Mt ζ -COP1::GFP oder Mt ζ -COP2::GFP transformiert wurden, keine COP-Vesikel gefunden werden konnten. Für diese Beobachtung gibt es mehrere Erklärungen:

1. Das Auflösen der Vesikelhülle findet in einem anderen Bereich der Zeitskala statt. Aus *in vitro*-Studien an Liposomen [172] ist bekannt, dass die Coatomer-Untereinheiten für etwa 120 s an der Vesikeloberfläche verbleiben. Daraus ergibt sich die Annahme, dass auch in transformierten *Medicago*-Wurzelzellen COP1-umhüllte Vesikel beobachtet werden können, denn diese Zeitdauer sollte ausreichend sein, um die Markierung der Vesikel mit den GFP-Konstrukten zu zeigen. Allerdings gibt es keine *in vivo*-Informationen über die Kinetik des Auflösens der Vesikelhülle. Die Ergebnisse der *in vitro*-Messungen können deshalb nicht direkt auf die *in vivo*-Situation übertragen werden.
2. Der Raum zwischen dem ER und den Golgi-Stapeln kann von den Vesikeln sehr schnell überbrückt werden. Die Elektronenmikroskopie konnte zeigen, dass die pflanzlichen Golgi-Stapel sehr nahe am ER liegen [173, 174]. Obwohl der Membranproteintransport zwischen dem ER und dem GA nicht an das Cytoskelett gebunden ist [174], können die Vesikel aufgrund der Nähe der Golgi-Stapel zum ER diese Lücke sehr schnell durchqueren, so dass es keine Möglichkeit gibt, die Vesikel *in vivo* zu beobachten.
3. Der Transport zwischen ER und Golgi-Stapeln kann durch direkte Verbindungen in Form von kleinen dünnen Tubuli erfolgen, wie elektronenmikroskopischen Untersuchungen vermuten lassen [174]. Dabei ist aber unklar, ob diese Verbindungen permanent oder nur temporär sind. In einem alternativen Modell kommt es durch das kontinuierliche Binden und Ablösen der Coatomere zur Bildung spezialisierter Domänen an den Golgi-Stapeln. Dieses Modell schließt die Bildung von COP1-umhüllten Vesikeln nicht aus, aber der retrograde Transport kann auch durch spezielle Extrusionen zwischen dem ER und den Golgi-Stapeln erfolgen.

Aber nicht nur die Art des Transportes, sondern auch das Ziel der Vesikel-Fusion bleibt ungeklärt. Für den anterograden Transport existieren Export-Domänen im

ER, die sich zusammen mit den Golgi-Stapeln bewegen [136]. Für den retrograden Transport kann ein vergleichbarer Mechanismus vermutet werden. Die Beobachtung, dass keine COP1-umhüllten Vesikel im Cytoplasma der *Medicago truncatula*-Wurzelzellen gefunden wurden, deutet darauf hin, dass Import-Domänen im ER in enger Nachbarschaft zu den sich bewegenden Golgi-Stapeln existieren. Es ist möglich, dass bindende Faktoren, die für die Vesikel-Fusion verantwortlich sind, auch in speziellen Bereichen des ER vorhanden sind. Für Untersuchungen in dieser Richtung könnte ein Markierungsprotein für den retrograden Transport, wie z. B. Erd2, zusammen mit Mt ζ -COP1 oder Mt ζ -COP2 expremiert werden.

Die Ergebnisse der in diesem Experiment durchgeführten Messungen zeigen deutlich, dass die GFP-Fusionskonstrukte MtArf1::GFP, Mt ζ -COP1::GFP und Mt ζ -COP2::GFP an den Golgi-Stapeln lokalisiert sind und sich mit diesen Strukturen durch das Cytoplasma bewegen. Außerdem zeigen sie, dass COP1-umhüllte Vesikel – wenn überhaupt – nur in sehr geringer Anzahl vorhanden sind, aber ihre Anzahl durch die dominant aktive Form MtArf1-Q71L deutlich vergrößert werden kann. Das Ergebnis der Lokalisierung der Coatomer-Untereinheiten an den Golgi-Stapeln stimmt mit den Ergebnissen von I. COUCHY *et al.* [150] und C. RITZENTHALER *et al.* [146] überein, die mit Antikörpern gegen β -COP aus Säugtieren und γ -COP aus *Arabidopsis thaliana* eine Kreuzreaktion gegen Epitope auf den Golgi-Stapeln nachweisen konnten. Dennoch gibt es einige fundamentale Unterschiede, die die unterschiedliche Organisation oder molekulare Zusammensetzung des Golgi-Apparates in verschiedenen Pflanzentypen widerspiegeln könnten. In mehreren Untersuchungen werden die Golgi-Stapel als torusförmige Strukturen beschrieben und fluoreszenzmarkierte Proteine konzentrierten sich an den äußeren Rändern der Golgi-Stapel. In den hier durchgeführten Messungen mit MtArf1::GFP, Mt ζ -COP1::GFP und Mt ζ -COP2::GFP fanden sich in keiner Messung torusförmige Strukturen und die Golgi-Stapel erschienen immer als kompakte Punkte mit einer gleichmäßigen Fluoreszenzverteilung. In den anderen Messungen wurden allerdings Tabak-BY2-Suspensionszellen oder epidermische Tabak-Blattzellen untersucht, so dass sich wahrscheinlich die gefundenen Unterschiede in der Erscheinung der Golgi-Stapel und deren Reaktion auf Inhibitoren auf die unterschiedlichen biologischen Systeme zurückführen lassen.

In den hier durchgeführten Messungen hat sich die TPLSM als besonders brauchbar erwiesen, denn aufgrund der IR-Anregungswellenlänge konnte das Gewebe bis in eine Tiefe von etwa $z_{\text{TPLSM}} = 100 \mu\text{m}$ untersucht werden, mit dem blauen VIS-Anregungslaser eines CLSM konnten nur bis in eine Tiefe von etwa $z_{\text{CLSM}} = 40 \mu\text{m}$ Bilder aufgenommen werden.

Außerdem sind die Ausbleicheffekte beim IR-Anregungslaser eines TPLSM geringer im Vergleich zum VIS-Anregungslaser eines CLSM. Obwohl die Wurzelzellen einer kontinuierlichen Rasterung mit dem IR-Laser ausgesetzt waren, blieben die Zellen mehrere Minuten lang aktiv und es konnte ebenso lang die Bewegung der Golgi-Apparate beobachtet werden. Eine Photoschädigung ist aber dennoch nicht vollständig zu vermeiden. Nach etwa einer Minute fällt die Gesamtströmungsaktivität ab. Die Fluoreszenzanregung erfolgte allerdings kontinuierlich, also auch dann, wenn keine Bilder aufgenommen wurden. Die Installation eines Verschlusses, der nur während der Bildbelichtungszeit den Anregungslaser zur Probe gelangen lässt, verringert die Strahlenschädigung entsprechend dem Verhältnis von Belichtungszeit zur Bildrate. Der für die hier durchgeführten Messungen realisierte Aufbau kombinierte den Vorteil der geringeren Photoschädigung der TPLSM mit dem Vorteil einer schnellen Bildaufnahme bei guter Bildqualität.

4.5 Neurobiologie: Optische Kalzium-Messung in Nervenzellen

Eine der herausforderndsten Aufgaben in der Biologie ist die Untersuchung von Nervenzellen, die auf Umweltreize reagieren, um zu verstehen, wie die Vielzahl von neuronalen Prozessen reguliert wird. Ein wichtiger Schritt bei diesen Untersuchungen ist das genaue Verständnis der Dynamik von Kalzium-Ionen in den Nervenzellen, denn Änderungen in der cytosolischen Ca^{2+} -Konzentration regulieren die Signalverarbeitung über die Synapsen der Nervenzellen. Die bisherigen Untersuchungen zeigen, dass das Kalzium als sekundärer Botenstoff seine Funktion in einer stark lokalisierten und sehr dynamischen Art und Weise ausübt.

Um die Kalzium-Konzentration in einer Nervenzelle zu untersuchen, verwendet man die Elektrophysiologie und optische Bildgebungsverfahren, wobei letztere mit Ca^{2+} -sensitiven Fluoreszenzfarbstoffen, wie z. B. Fluo-4 oder Oregon-Green 488 BAPTA-1, arbeiten. Bei diesen Farbstoffen erhöht sich die Fluoreszenzintensität, wenn in der molekularen Umgebung Kalzium vorhanden ist. Für fundierte Rückschlüsse auf die funktionale Relevanz der gemessenen Signale ist eine hohe räumliche und zeitliche Auflösung erforderlich, damit der Ort einer solchen Transmitter-Ausschüttung – z. B. in einem Axon oder einem kleinen Seitenzweig – und der Zeitpunkt der Ausschüttung – z. B. in Abhängigkeit einer äußeren Stimulation oder in der Reihenfolge einer verketteten Reaktion mehrerer Zellen – exakt bestimmt werden können. Die konventionelle Epifluoreszenzmikroskopie wird hierbei durch die besonders in Nervengewebe auftretende Streuung in der räumlichen Auflösung stark beeinträchtigt. Ein weiterer Vorteil der TPLSM macht sich bemerkbar, wenn die neuronale Funktion des visuellen Systems untersucht werden soll. Die verwendeten Anregungswellenlängen der Epifluoreszenzmikroskopie oder der konfokalen LSMs liegen in dem Bereich, in dem auch die Photorezeptoren des visuellen Systems empfindlich sind. Dadurch kann es zu einer ungewollten visuellen Stimulation kommen, die die Interpretation der aufgenommenen Daten sehr erschwert. Trotz der hohen zeitlichen und räumlichen Auflösung hat das Zeilenrasterverfahren den Nachteil, dass die aufgenommenen Daten auf die räumliche Dimension und Position der Rasterzeile beschränkt sind. Ein Vergleich verschiedener Untersuchungspositionen, z. B. im Hauptteil des Axons, an einer Verzweigung der Zelle und an einer Synapse, oder der Vergleich zweier benachbarter Zellen wird dadurch sehr schwierig, denn die Rasterzeile wird nicht alle interessierenden Positionen überstreichen und deshalb müssen die Daten nacheinander an den verschiedenen Positionen aufgenommen werden.

Die Auswertung dieser nacheinander aufgenommenen Daten erlaubt aber nur indirekte Rückschlüsse auf die Funktionalität der Zelle, da die Nervenzellen eine sehr große Reaktionsvariabilität von Versuch zu Versuch aufweisen – die Zellen reagieren also bei den aufeinanderfolgenden Messungen nicht immer gleichartig.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden zwei Experimente durchgeführt, die zeigen, dass zum einen die TPLSM prinzipiell anwendbar ist für die Untersuchung von Nervenzellen des visuellen Systems einer Fliege, und zum anderen, dass der Aufbau eines Multizeilen-TPLSM ebenfalls für die *in vivo*-Untersuchung von Nervenzellen anwendbar ist. Die Präparation der Fliegen und die weiteren biologische Arbeiten wurden von J. KALB und DR. R. KURTZ durchgeführt.

Der Multizeilen-TPLSM-Aufbau stellt eine Möglichkeit dar, eine hohe räumliche und hohe zeitliche Auflösung in einem Aufbau zu erreichen und dies zu kombinieren mit der gleichzeitigen Messung an mehreren Probenpositionen – unter passenden Bedingungen also eine quasi bildgebende Messung durchzuführen. Somit lässt sich die Lücke zwischen dem schnellen, aber räumlich beschränkten Zeilenrasterverfahren und dem langsamen, aber bildgebenden Epifluoreszenzverfahren schließen.

In beiden Experimenten wurden *in vivo*-Untersuchungen an den sogenannten VS-Neuronen einer ein- bis zwei Tage alten weiblichen Fliege (*Calliphora vicina*) durchgeführt. Der Bereich des Gehirns einer Fliege, der für die Verarbeitung visueller Bewegungseindrücke zuständig ist – die *Lobula*-Schicht – besteht aus etwa 60 großen, einzeln identifizierbaren Nervenzellen. Diese Nervenzellen werden Tangentialzellen (TCs) genannt. Abb. 4.5.1 zeigt überblicksartig die Lage der VS-Neuronen im Fliegenkopf/-gehirn.

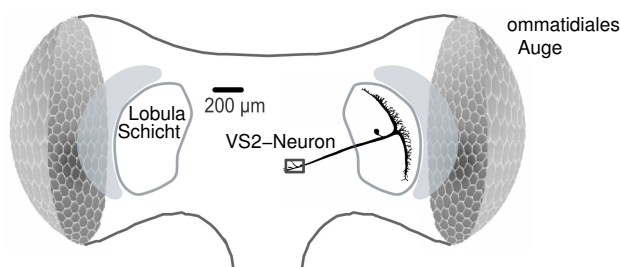


Abbildung 4.5.1: Schematische Darstellung des Kopfes einer Fliege (caudale Ansicht). Die Neuronen des Vertikalen Systems (VS-Neuronen), eine Ansammlung von 10 Zellen, gehören zu den bewegungssensitiven Tangentialzellen (TC) im Fliegengehirn.

Durch elektrophysiologische und konventionell mikroskopische Experimente konnte gezeigt werden, dass die Tangentialzellen selektiv auf die verschiedenen Bewegungsrichtungen reagieren, die über das visuelle System aufgenommen werden. Dabei extrahieren verschiedene Gruppen von TCs verschiedene Informationen der Flugbewegung, die durch dynamische Bewegungsmuster auf den Augen der Fliege erzeugt werden. Die VS-Neuronen gehören zu der Gruppe der Tangentialzellen, die überwiegend auf vertikale Bewegungen reagieren, wobei die VS2-Neuronen die ipsilateralen Abwärtsbewegungen selektieren. Die Reaktion der Zelle besteht in einer graduellen Depolarisation des Membranpotentials, die von Spitzen unterschiedlicher Amplitude überlagert ist. Während der ipsilateralen Aufwärtsbewegungen dagegen hyperpolarisiert das Membranpotential.

Mit dieser Reaktion der Zelle ist eine Änderung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration verbunden, die mit Hilfe der kalziumsensitiven Farbstoffe Fluo-4 (im ersten Experiment) und Oregon Green 488 (im zweiten Experiment) als ein mit der Kalzium-Konzentration korreliertes Fluoreszenzsignal sichtbar gemacht werden kann. Der membran-impermeable, kalziumsensitive Farbstoff konnte in die Zelle eingebracht werden, nachdem bei der Probenpräparation ein einzelnes VS2-Neuron im Fliegenhirn exponiert wurde. Bei der Präparation wurde genau eine einzelne Zelle mit dem Farbstoff gefüllt.

Damit die Nervenzellen eine Reaktion zeigen können, müssen sie einen definierten Reiz des visuellen Systems erhalten. Dies geschieht durch eine Leiterbahnenplatte, die mit 48×30 LEDs bestückt ist. Die rechteckige LED-Anordnung hat eine Größe von $14.9 \text{ cm} \times 11.5 \text{ cm}$ und befindet sich in einem Abstand von etwa 16 cm oberhalb des Objektivs bzw. der Fliege. Die LEDs können so geschaltet werden, dass die abwechselnd hellen und dunklen Streifen eine Rechteckwelle bilden, die über das LED-Feld wandert. Die räumliche Wellenlänge der Rechteckwelle beträgt $\omega = 32^\circ$ und bewegt sich mit einer Frequenz von $v_{\text{Reiz}} = 8 \text{ Hz}$. Durch die Computersteuerung kann die Bewegung des Streifenmusters zu definierten Zeitpunkten ein- und ausgeschaltet werden.

Für ein ergänzendes Verständnis der nachfolgend beschriebenen Experimente seien noch kurz einige neurophysiologische Aspekte beschrieben. Die folgende Abb. 4.5.2 zeigt den typischen Aufbau einer Nervenzelle.

In einer Nervenzelle findet ein gerichteter Informationstransport statt. Die Zelle nimmt ein Signal von anderen Zellen an ihren Dendriten, die aus dem Zellkörper heraus verzweigen, auf. Sobald die von anderen Zellen eingehenden Reize einen bestimmten Schwellwert überschreiten, wird die Zelle selbst aktiv und sendet einen Reiz über das Axon zu den axonalen Endverzweigungen, die mit anderen Nervenzellen oder auch mit Muskelzellen verbunden sind.

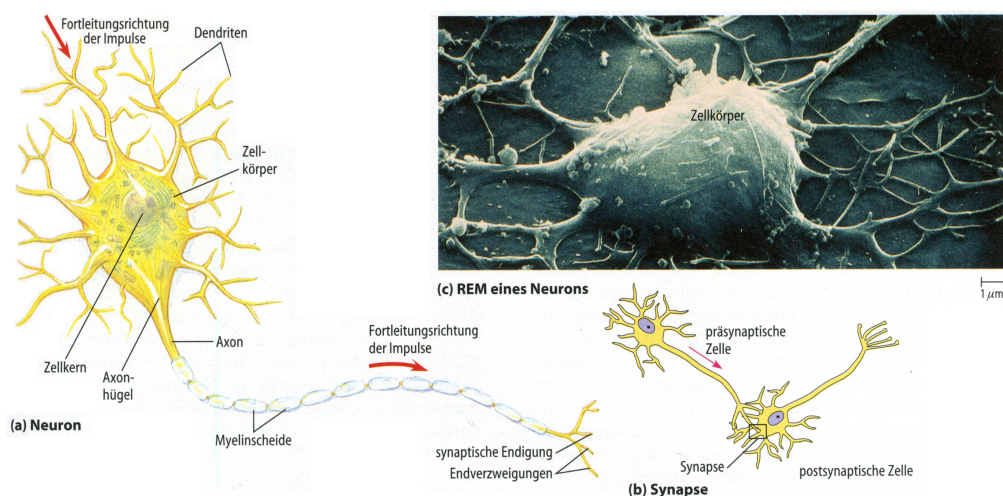


Abbildung 4.5.2: Typischer Aufbau einer Nervenzelle, aus N.A. CAMPBELL & J.B. REECE [175].

Die Reizleitung in einer Nervenzelle erfolgt durch einen elektrischen Impuls. Jede Zelle besitzt eine elektrisch polarisierte Plasmamembran. Durch eine höhere Konzentration von Anionen befindet sich die Innenseite der Zellmembran auf einem negativen Potential von etwa -70 mV gegenüber der Außenseite der Zellmembran. Nervenzellen und Muskelzellen besitzen die Fähigkeit dieses Ruhepotential aktiv zu verändern. Diese Potentialänderungen führen zu den Nervenimpulsen. Die Elektrophysiologie benutzt Mikroelektroden in der Zelle oder auf der Membran, um die Potentialänderungen zu messen. Die an den Dendriten aufgenommenen Reize können exzitatorische oder inhibitorische Wirkung besitzen. Exzitatorische Reize führen zu einem Anstieg des Membranpotentials (Depolarisation), indem Ionenkanäle geöffnet werden, durch die Kationen in die Zelle strömen. Inhibitorische Reize senken dagegen das Membranpotential ab (Hyperpolarisation). In diesem Fall werden Ionenkanäle für Anionen geöffnet.

Eine Nervenzelle steht mit vielen anderen Nervenzellen in Verbindung und nimmt Reize von diesen auf bzw. gibt Reize an andere Zellen weiter. Die Schnittstellen zwischen den Nervenzellen werden Synapsen genannt. Eine postsynaptische Nervenzelle integriert die eingehenden Reize der präsynaptischen Zellen. Dabei haben dendritische Synapsen, die sich näher am Axonhügel befinden, normalerweise einen größeren Anteil an der Veränderung des Gesamtpotentials als weiter entfernt liegende Synapsen.

Wenn die eingehenden hyperpolarisierenden und depolarisierenden Reize das Gesamtpotential auf das Schwellenpotential von etwa -50 mV anheben, wird die postsynaptische Zelle aktiv und generiert das Aktionspotential. Das Aktionspotential kehrt kurzzeitig die Polarität der Zellmembran auf etwa +40 mV um. Diese starke Depolarisation des Aktionspotential dauert etwa zwei Millisekunden, daran schließt sich die Refraktärzeit von etwa zwei Millisekunden an, während der die Zellmembran hyperpolarisiert ist und kein weiteres Aktionspotential erzeugen kann.

Das Axon ist von myelinisierenden SCHWANN-Zellen umgeben, die eine elektrische Isolierung gegen den extrazellulären Raum bewirken. Die SCHWANN-Zellen sind durch RANVIER-Schnürringe voneinander getrennt und bewirkt quasi eine Einteilung des Axon in viele Abschnitte. Wenn die Nervenzellen einen Impuls aussendet, wandert dieser in einer Art Dominoeffekt das Axon entlang. Das Aktionspotential in einem Abschnitt ist so stark, dass es im folgenden Abschnitt das Membranpotential über das Schwellenpotential depolarisiert. Dadurch wird im folgenden Abschnitt das Aktionspotential ausgelöst. Der Nervenimpuls als Abfolge der Aktionspotentiale in den einzelnen Axonabschnitten kann sich nur vom Axonhügel zu den endterminalen Axonverzweigungen hin ausbreiten, da die einzelnen Abschnitte während der Refraktärzeit hyperpolarisiert sind. Das Aktionspotential kann somit das Membranpotential des vorigen Abschnittes nicht über das Schwellenpotential depolarisieren. Der Aufbau des Axons mit den isolierenden SCHWANN-Zellen bewirkt zudem eine hohe Ausbreitungsgeschwindigkeit des Nervenimpulses von bis zu 150 m/s. In unmyelinisierten Nervenzellen liegt die Ausbreitungsgeschwindigkeit dagegen nur bei etwa 3 m/s.

Die Signalübertragung zwischen Nervenzellen findet wie erwähnt an den Synapsen statt. Dabei wird zwischen elektrischen und chemischen Synapsen unterschieden. Elektrische Synapsen ermöglichen den direkten Übergang des Aktionspotentials vom prä- zum postsynaptischen Neuron. In den Zellmembranen der beiden Neuronen befinden sich Ionenkanäle, durch die die Ionenströme, die im Verlauf des Aktionspotentials entstehen, direkt zwischen den Neuronen fließen können. Dadurch können Nervenimpulse ohne Zeitverzögerung und ohne Verlust an Signalstärke zwischen den Neuronen übertragen werden.

Weitaus häufiger sind allerdings die chemischen Synapsen zu finden. Bei diesen trennt ein enger Spalt – der synaptische Spalt – die beiden Nervenzellen. Für die Reizübertragung wird das präsynaptische Aktionspotential in ein chemisches Signal umgewandelt. Dieses chemische Signal überbrückt den synaptischen Spalt und wird von der postsynaptische Nervenzelle wieder in ein elektrisches Signal umgewandelt.

Im Cytosol des Endbereiches der endterminalen Axonverzweigung, dem sogenannten Endknöpfchen, befinden sich zahlreiche synaptische Vesikel, die angefüllt sind mit Neurotransmittermolekülen. Wenn das Aktionspotential der präsynaptischen Zelle in diesem Endbereich ankommt, depolarisiert es die Zellmembran und spannungsabhängige Ionenkanäle für Ca^{2+} -Ionen öffnen sich. Der Anstieg des cytosolischen Ca^{2+} löst die Fusion der synaptischen Vesikel mit der Zellmembran aus und die Neurotransmitter werden in den synaptischen Spalt freigesetzt. Die Neurotransmitter diffundieren über den synaptischen Spalt zur postsynaptischen Zellmembran. Rezeptoren auf der postsynaptischen Zellmembran reagieren selektiv auf die Neurotransmitter und öffnen ebenso selektiv bestimmte Ionenkanäle. Die so ausgelösten Ionenströme führen zu einer Depolarisation oder Hyperpolarisation der Zellmembran des postsynaptischen Dendriten. Die postsynaptische Nervenzelle hat den Reiz aufgenommen und kann ihrerseits mit der Veränderung ihres Gesamtpotentials reagieren. Die ausgeschütteten Neurotransmitter werden sehr schnell abgebaut oder von den Zellen wieder aufgenommen, so dass eine kurze und präzise Reizübertragung erzielt wird und weitere Reize verarbeitet werden können.

Für die Untersuchung der Reizübertragung ist ein exaktes Verständnis der synaptischen Vorgänge notwendig und dabei besitzen die Kalzium-Ionen eine große Bedeutung. Es ist demnach wichtig, die Änderungen der Ca^{2+} -Konzentration gerade in den Endbereichen der endterminalen Axon-Verzweigungen zu messen. Die kleine räumliche Ausdehnung dieser Endbereiche und die schnelle Änderung der Ca^{2+} -Konzentration erfordert somit eine hohe räumliche und zeitliche Auflösung. Hier bietet die TPLSM große Vorteile gegenüber der Epilumineszenzmikroskopie.

4.5.1 Prinzipieller Nachweis der Anwendbarkeit eines TPLSM zur *in vivo*-Kalzium-Messung

Im ersten Experiment wurde der Aufbau verwendet, der schon in Kap. 4.2 und Kap. 4.3 beschrieben wurde. Den Aufbau aus den selbstgefertigten Komponenten gibt die folgende Abb. 4.5.3 wieder, die auch die wichtigste Modifikation für das erste Experiment zeigt: die Avalanche-Photodiode (APD) zur Detektion des Fluoreszenzlichtes, wenn das Multistrahl-TPLSM im descanned Modus betrieben wird.

Da dieses Experiment dem prinzipiellen Nachweis der Anwendbarkeit der TPLSM zur *in vivo*-Kalzium-Untersuchung diente, wurde mit nur einem einzel-

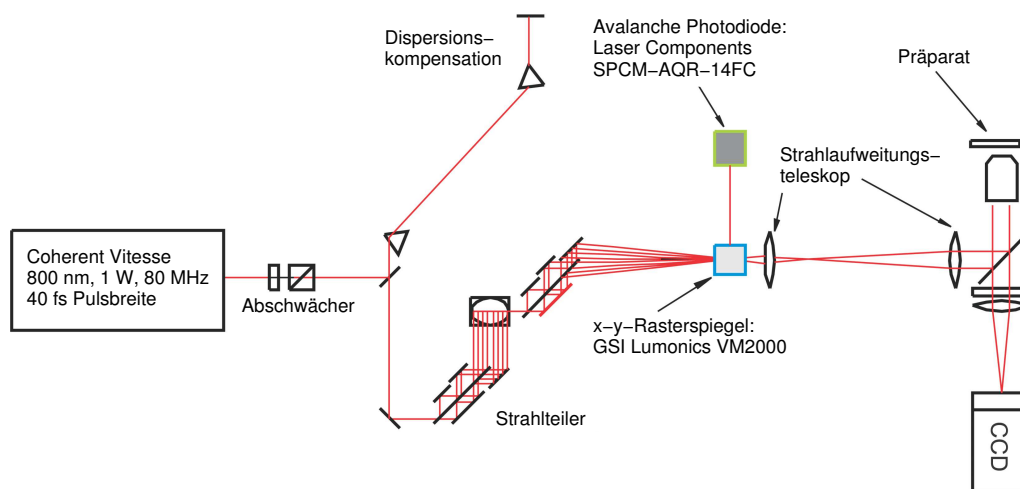


Abbildung 4.5.3: Aufbau des TPLSM für das erste Experiment zur *in vivo*-Untersuchung von fluoreszenzmarkierten Nervenzellen.

nen Laserstrahl gearbeitet. Im Strahlteiler wurden deshalb alle Strahlen außer dem Zentralstrahl geblockt, so dass eine Zeilenrasterung mit einer einzelnen Linie durchgeführt werden konnte, deren Signal von der Avalanche-Diode registriert wurde. Als Laserquelle wurde ein Coherent Vitesse Ti:Sa-Laser verwendet. Die Leistung konnte durch einen Abschwächer – bestehend aus einem $\lambda/2$ -Plättchen und einem Polarisationsfilter – so eingestellt werden, dass die Leistung des Strahles in der Probe $P_{\text{Probe}} = 10 \text{ mW}$ nicht überschritt, denn ab dieser Leistung kommt es zu einer Schädigung der Probe [176, 177]. Die Dispersionskompensation reduziert die Länge der Laserpulse auf $\tau_{\text{Probe}} \approx 45 \text{ fs}$, um eine hohe Zwei-Photonen-Anregungswahrscheinlichkeit und somit ein hohes Signal zu erzielen. Für den descanned Modus wird der dichroitische 45° -Spiegel zwischen Tubuslinse und Objektiv durch einen hochreflektierenden Spiegel ersetzt, was mit Hilfe einer Drehkassette, die die Spiegelhalter enthielt, realisiert wurde. Dadurch konnte auch auf einfache Weise zwischen dem descanned Modus und dem Epifluoreszenz-Modus umgeschaltet werden, um vergleichende Aufnahmen machen zu können. Als Objektiv wurde das Olympus LUMPlanFL x40/IR, 0.8 W verwendet (vgl. Tab. 3.4.1), das mit seinem großen Arbeitsabstand von $d = 3.4 \text{ mm}$ eine Abbildung der Nervenzellen in der präparierten Fliege erlaubte. Die Zeilenrasterung wurde umgesetzt durch die Spiegelrastereinheit bestehend aus den galvanischen Spiegelantrieben der Serie VM2000 der Firma GSI Lumonics, sowie der zugehörigen Ansteuerungselektronik der Serie SC2000. Als Detektor für den

descanned Modus wurde das Einzel-Photonen-Zählmodul SPCM-AQR-14-FC – basierend auf einer Silizium-Avalanche-Photodiode – zusammen mit der Puls-Zählkarte PMM328 verwendet. Das temperaturstabilisierte Photonenzählmodul erzeugt für jedes detektierte Photon einen TTL-Ausgangspuls mit einer Amplitude von mindestens $U_{\text{Puls}} = 2.5 \text{ V}$ und einer Pulsdauer von $\tau_{\text{Puls}} = 35 \text{ ns}$, so dass das Modul eine Geschwindigkeit von mehr als 10 Millionen Pulsen (counts) pro Sekunde erreicht (10 Mc/s). Diese Pulse werden dann von der Computerschnittstellenkarte PMM328 gezählt. Diese Karte erreicht eine Zählrate von über $\nu_{\text{PMM328}} = 120 \text{ MHz}$, wobei die Pulse bis zu $\tau_{\text{PMM328}} = 1.5 \text{ ns}$ (FWHM) kurz sein dürfen. Die folgenden Tabellen 4.5.1 und 4.5.2 fassen die Spezifikationen des Detektorsystems zusammen.

Das TPLSM konnte aber nicht nur im descanned Modus arbeiten, sondern bei Verwendung des dichroitischen 45° -Spiegels vor dem Objektiv war auch eine bildgebende Detektion im non-descanned Modus möglich. In diesem Fall wurde das Fluoreszenzsignal von einer CCD-Kamera registriert. Der non-descanned Modus ist sinnvoll, um die Position der Rasterzeile relativ zur untersuchten Zelle und zur gesamten neuronalen Struktur zu kontrollieren. Die Fluoreszenz konnte deshalb auch nicht nur mit dem Laser durch Zwei-Photonen-Absorption angeregt werden, sondern auch durch eine Quecksilberdampflampe, wodurch das Mikroskop im klassischen Epifluoreszenz-Modus arbeitete.

Als kalziumsensitiver Fluoreszenzfarbstoff wurde Fluo-4 Penta-Kalium Salz verwendet, dessen Anregungs- und Emissionsspektrum in Abb. 4.5.4 dargestellt wird.

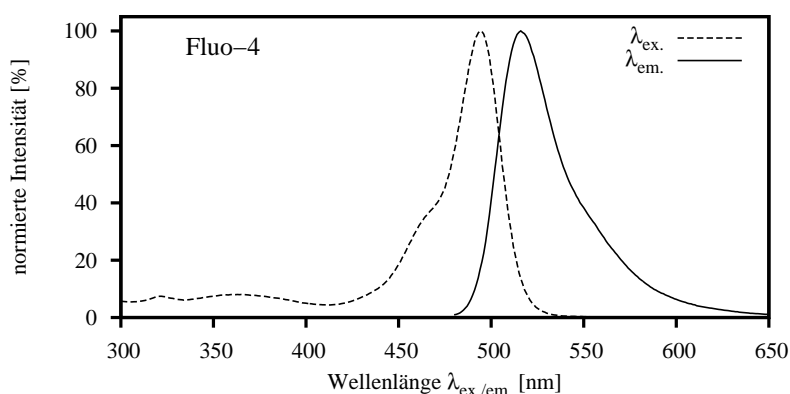


Abbildung 4.5.4: Anregungs- und Emissionsspektrum des kalziumsensitiven Fluoreszenzfarbstoffes Fluo-4 Penta-Kalium Salz von Molecular Probes [180].

Tabelle 4.5.1: Ausgewählte Spezifikationen des Einzel-Photonen-Zählmoduls von LaserComponents GmbH [178]

LaserComponents Einzel-Photonenzählmodul SPCM	
Modell	SPCM-AQR-14-FC mit Lichtleiteranschluss (Hersteller PerkinElmer)
Detektortyp	Silizium Avanzlanche Photodiode
Aktive Sensorfläche	175 µm Durchmesser
maximale Quanteneffizienz	65 % @ 650 nm
maximale Ausgangszählrate	10 Mc/s ^a
Totzeit zwischen Pulsen	50 ns
Dunkelzählrate	< 100 c/s ^b
Ausgangssignal	TTL-Puls min. 2.5 V, 35 ns
maximale Lichtintensität	10 ⁴ Photonen pro Puls (< 1 ns)

^aMc/s: Megacounts/second^bc/s: counts/second**Tabelle 4.5.2:** Ausgewählte Spezifikationen der Puls-Zählkarte PMM328 von Becker & Hickl GmbH [179]

Becker & Hickl Puls-Zählkarte PMM328	
Modell	PMM-328 8 Kanal Photonenzählkarte mit schaltbaren Eingängen
Zählrate	> 120 MHz
Eingangspuls	Amplitude: 20 mV – 1 V Pulsbreite: > 1.5 ns FWHM
Auflösung des Zählers	16 Bit
weitere Eigenschaften	Trigger-Eingang einstellbarer Schwellwert für Eingangspulse beigefügte Software für Einbindung in eigene Messprogramme

Zwar ist der Anregungsabsorptionsquerschnitt mit effektiv $\lambda_{\text{ex.}} = 400$ nm nach Abb. 4.5.4 recht gering, aber Abb. 4.5.4 zeigt die Spektren für die Ein-Photonen-Anregung, die sich unter Umständen deutlich von denen der Zwei-Photonen-Anregung unterscheiden können. Die experimentellen Erfahrungen ergaben aber, dass mit der verwendeten Anregungswellenlänge trotzdem ein ausreichendes Signal für die Untersuchungen gemessen werden konnte.

Für die Datenaufnahme der Zeilenrasterung wurde die PMM-328 Zählkarte durch eine eigene Programmierung in das Mess- und Steuerprogramm des TPLSM integriert. Als Mess- und Steuerungsprogramm wurde das Programm DaVis (LaVision GmbH, Göttingen) in der Version 6.2.0 verwendet, das die grundlegenden Funktionen für die Ansteuerung einer CCD-Kamera, anderer PC-Messkarten, sowie zur Bildauswertung zur Verfügung stellt. Durch eine selbstgeschriebene DLL wurde auch die PMM-328 Zählkarte in DaVis eingebunden und über ein Triggersignal wurde die Datenaufnahme mit der Zeilenrasterung synchronisiert.

Für die punktweise Datenaufnahme mit dem TPLSM im descanned Modus, die auch bei einer Zeilenrasterung vorliegt, könnte eine Ansteuerung programmiert werden, die den Raster Spiegel in Einzelschritten zu jedem Messpunkt bewegt, und bei jedem Einzelschritt die Zählkarte ausliest. Das würde aber einen Geschwindigkeitsverlust bedeuten, da die Daten zu jedem Messpunkt von der Zählkarte in den Speicher des Computers transferiert werden müssten. Deshalb wurde für diese Messungen eine andere Programmierung gewählt: bei einer gleichmäßigen linearen Bewegung des Laserstrahles wurden kurze Zeitintervalle definiert und das Signal in diesen Intervallen gemessen. Zwar bewegt sich der Laser während des Intervalls, aber die Intervalle lassen sich in Abhängigkeit von der Rasterfrequenz so kurz wählen, dass der Laser nur einen Weg zurücklegen kann, der im Rahmen der lateralen Auflösung liegt. So lässt sich das gemessene Signal trotz der Bewegung einem Messpunkt mit der Größe der lateralen Auflösung zuordnen; eine wesentlich feinere Zuordnung ist wegen der gegebenen Auflösung nicht notwendig.

Mit diesen Überlegungen wurde der annähernd lineare Bereich der sinusförmigen Strahlbewegung auf 88 % der Amplitude festgelegt. Da die Länge dieses linearen Bereiches $l_{\text{linear}} = 10$ μm betragen sollte, war die tatsächlich von dem Laserstrahl überstrichene Linienlänge $l_{\text{voll}} = 11.36$ μm lang. Die Länge/Größe eines Messpunktes wurde zu $l_{\text{Messpunkt}} = 0.1$ μm gewählt, so dass trotz der Bewegung des Laserstrahles noch eine hohe Pixelauflösung von etwa einem Drittel der lateralen Auflösung des Lasers erreicht wurde. Eine Rasterzeile besteht

somit aus 100 Messpunkten, die typischerweise mit einer Zeilenfrequenz von $v_{\text{Zeile}} = 200$ Hz abgerastert wurden, ein einzelner Datenpunkt hatte somit eine Belichtungszeit von $t_{\text{BLZ, Messpunkt}} = 2.5$ ms. Die Datenpunkte lassen sich zu einem Fluoreszenzintensitätsprofil der Zeile zusammensetzen und die aufeinanderfolgenden Profile zeigen so den Zeitverlauf des Kalziumsignals mit der eingestellten Zeilenfrequenz von $v_{\text{Zeile}} = 200$ Hz. Mit diesen Parametern ist die Annahme gerechtfertigt, dass der Laserfokus während der Datenaufnahmezeit quasi stillsteht. Für einen stehenden Fokus erreicht der TPLSM-Aufbau eine laterale Auflösung von $\Delta x_{\text{TPLSM}} = 0.4 \mu\text{m}$ und eine axiale Auflösung von $\Delta z_{\text{TPLSM}} = 1.0 \mu\text{m}$. Diese Werte wurden in einer wässrigen Lösung gemessen. Die Auflösung in Nervengewebe wird allerdings aufgrund der Streuung im Gewebe etwas geringer sein.

Es wurden Zeilenrasterungen an unterschiedlich dicken Axon-Verzweigungen aufgenommen, um die Kalzium-Dynamik in diesen Verzweigungen zu vergleichen. Die folgende Abb. 4.5.5 zeigt eine Epifluoreszenzaufnahme der Axon-Verzweigungen mit den eingezeichneten Positionen der Zeilenrasterungen in einer dicken und einer dünnen Verzweigung.

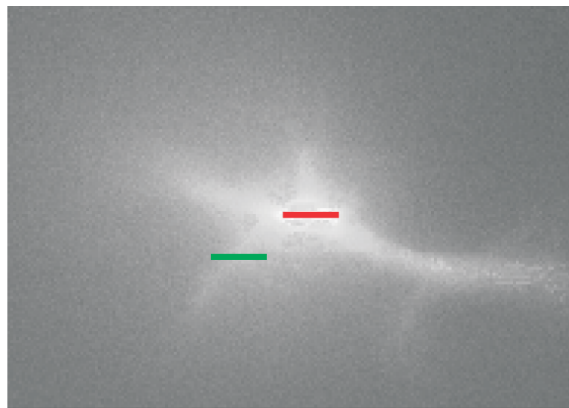


Abbildung 4.5.5: Epifluoreszenzaufnahme der endterminalen Axon-Verzweigungen des untersuchten VS2-Neurons. Die eingezeichneten Balken zeigen die Positionen der Zeilenrasterungen.

Bei den Untersuchungen wurden Zeilenrasterungen an verschiedenen Stellen der axonalen Verzweigungen aufgenommen (vgl. Abb. 4.5.5). Eine Messung dauerte sieben Sekunden und bestand aus der Sequenz, dass das Streifenmuster drei Sekunden lang stillstand, sich dann eine Sekunde lang bewegte und danach wieder drei Sekunden lang stillstand. Die Bewegung des Streifenmusters während der vierten Sekunde der Messung übt einen Reiz auf das visuelle System der Fliege

aus. Die Nervenzelle reagiert mit einer Änderung der Ca^{2+} -Konzentration und dies wiederum führt zu einer Änderung der Fluoreszenzintensität des kalziumsensitiven Farbstoffes.

Für die Auswertung der zeitlichen Dynamik des Ca^{2+} -Signales wurde aus den Zeilenprofilen einer Messposition in einem interessierenden Gebiet (ROI) der Zeile das Signal extrahiert, um das Dunkelbildsignal der CCD-Kamera korrigiert und in die relative Fluoreszenzänderung $\Delta F/F_0$ umgerechnet. Die Basisfluoreszenz F_0 wurde aus den Daten der ersten 100 Millisekunden der Messung berechnet. Die Datenpunkte der relativen Fluoreszenzänderung sind schließlich gegen die Zeitpunkte der einzelnen aufeinander folgenden Rasterzeilen aufgetragen worden. Die Datenpunkte haben also einen zeitlichen Abstand von $\Delta t_{\text{Messpunkt}} = 5 \text{ ms}$ bei einer Zeilenfrequenz von $\nu_{\text{Zeile}} = 200 \text{ Hz}$.

Bei den Zeilenraasterungen wurde auch ein Ausbleichen des Farbstoffes beobachtet, was auf die andauernde Bestrahlung der Zeile mit einer Laserleistung von bis zu $P_{\text{Probe}} = 10 \text{ mW}$ zurückzuführen ist. Diese andauernde Bestrahlung und die Laserleistung sind notwendig, um ein ausreichend hohes Signal für die hohe zeitliche Auflösung erreichen zu können. Zwar könnte das Signal durch eine noch höhere Laserleistung deutlich erhöht werden, denn die Zwei-Photonen-Anregung hängt quadratisch von der Laserleistung ab (vgl. Gl. (2.1.13)), aber bei Laserleistungen von mehr als $P_{\text{Probe}} = 10 \text{ mW}$ konnten bei anhaltender Zeilenraasterung (über einen Zeitraum von $t_{\text{Messung}} = 20 \text{ min.}$) Strahlenschäden in Form von hellen Fluoreszenzblitzen und Blasenbildung der Zellmembran beobachtet werden. Das Ausbleichen des Farbstoffes konnte in den Signalen der Zeilenraasterungen korrigiert werden, indem eine Zeilenraasterung ohne visuelle Stimulation aufgenommen wurde. Das Fluoreszenzsignal, das eigentlich konstant sein sollte, zeigte eine Abnahme, die mit den Parametern einer monoexponentialen Funktion angepasst werden konnte. Mit der so erhaltenen Ausbleich-Funktion ließen sich die Signale der Zeilenraasterungen in Bezug auf das Ausbleichen des Farbstoffes korrigieren.

Die folgende Abbildung 4.5.6 zeigt die aufgenommenen zeitlichen Dynamiken im dicken Hauptzweig des Axons (linkes Bild, rot markierte Rasterzeile in Abb. 4.5.5) und im dünnen Seitenzweig (mittleres Bild, grün markierte Rasterzeile in Abb. 4.5.5). Der rechte Graph in Abb. 4.5.6 zeigt schließlich den Vergleich der beiden Dynamiken.

Das linke und mittlere Bild zeigen jeweils die aufgenommenen Daten (grüne bzw. rote Kurve) zusammen mit den geglätteten Daten (schwarze Kurve), die durch Mittelung von je 20 Datenpunkten entstand, also zeitlich tiefpass-gefiltert ist. Das rechte Bild zeigt den Vergleich der roten und grünen Kurve, die beide auf 10 Hz geglättet und normiert wurden. Man erkennt deutlich, dass das Ca^{2+} -Signal

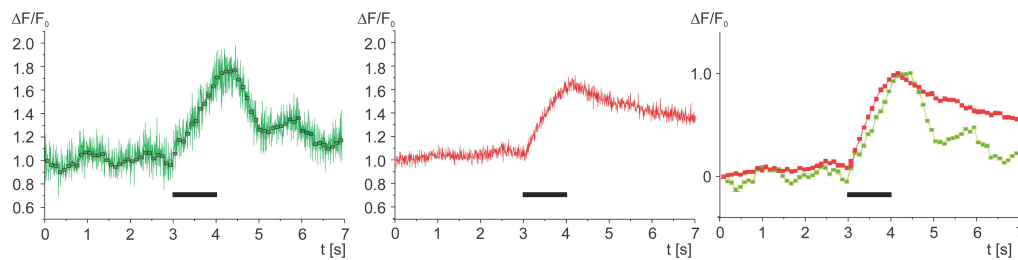


Abbildung 4.5.6: Zeitverlauf der relativen Fluoreszenzänderung $\Delta F/F_0$ aus den Zeilenrasterungen der zwei in Abb. 4.5.5 markierten Positionen. Links: Zeitverlauf der grünen Linie. Mitte: Zeitverlauf der roten Linie. Rechts: Vergleich der beiden Zeitverläufe mit geglätteten und normierten Daten. Der schwarze Balken zeigt die visuelle Stimulation der Zelle an.

im dünnen Seitenzweig des Axons (grüne Kurve) schneller abklingt als im dicken Hauptzweig des Axons (rote Kurve). Eine erste vorsichtige Erklärung für dieses vom Durchmesser der Axonverzweigungen abhängige Verhalten ist, dass die Kalzium-Konzentration durch den Transport durch die äußere Membran geregelt wird. Dies führt zu einer schnelleren Ca^{2+} -Regulation in den dünnen Verzweigungen, die ein größeres Oberflächen-zu-Volumen-Verhältnis besitzen. Diese Interpretation wird auch durch Messungen bestätigt, denen zufolge der Ca^{2+} -Abbau in dünnen TC-Neuriten schneller erfolgt als in dicken Neuriten, wenn deponiertes Kalzium durch Blitzlicht-Photolyse homogen freigesetzt wird [181].

Dieses Ergebnis des unterschiedlichen Abklingens in den unterschiedlich dicken Axon-Verzweigungen demonstriert auch die Leistungsfähigkeit der TPLSM im Vergleich zur Epifluoreszenzmikroskopie, denn mit Hilfe der konventionellen Epifluoreszenzmikroskopie konnte zwar schon festgestellt werden, dass die cytosolische Ca^{2+} -Konzentration in den synaptischen Ausgangsregionen der bewegungssensitiven VS-Neuronen durch visuelle Stimulation in der bevorzugten Richtung ansteigt, aber aufgrund der begrenzten räumlichen und zeitlichen Auflösung der Epifluoreszenzmikroskopie lassen sich nur indirekte Rückschlüsse auf die Bedeutung des Ca^{2+} für die synaptische Reizübertragung ziehen. Die so gemessenen Ca^{2+} -Signale spiegeln nur die gesamte cytosolische Kalziumkonzentration wieder und nicht die Änderungen der Ca^{2+} -Konzentration nahe der Zellmembranoberfläche, die direkt relevant sind für die Neurotransmitter-Ausschüttung. Deshalb sind auch die Ca^{2+} -Änderungen in den feinen Axon-Verzweigungen von großem Interesse. In der Epifluoreszenzmikroskopie werden diese Untersuchungen aber bei der gegebenen großflächigen Anregung gestört durch die Streuung

des Fluoreszenzlichtes aus der Umgebung in das interessierende Gebiet hinein. Die TPLSM erlaubt dagegen aufgrund der höheren Auflösung eine genauere Analyse dieser Kalzium-Signale.

Um die Ergebnisse der mit dem TPLSM durchgeführten Zeilenrasterungen mit den Ergebnissen der konventionellen Epifluoreszenzmikroskopie vergleichen zu können, konnte der Aufbau auch im Epifluoreszenzmodus durch Umschalten vom descanned Modus in den non-descanned Modus mit einer Quecksilberdampfampe betrieben werden. Dazu wurden der hochreflektierende und der dichroitische Spiegel, die beide in einer Drehkassette eingesetzt waren, getauscht und das Fluoreszenzlicht wurde von einer CCD-Kamera detektiert. Die Anregung der Fluoreszenz geschah im Epifluoreszenzmodus durch die großflächige Beleuchtung der Probe mit der Quecksilberdampfampe. Die Fluoreszenz ließ sich auch im non-descanned Modus weiterhin mit dem Laser anregen. In diesem Fall zeigt das Bild der wieder als Detektor fungierenden CCD-Kamera das Fluoreszenzsignal der Rasterlinie auf ihrer ganzen Länge. In beiden Fällen unterdrückt ein BG39-Filter Reste des Laseranregungslichtes, für die Quecksilberdampfampe wurde ein Filterset, bestehend aus einem Anregungsfilter BP420–480 und einem Sperrfilter BA515 (beide Filter von Olympus Optics Co. (Europa) GmbH), verwendet. Die Tabelle 4.5.3 fasst die wichtigsten Daten der CCD-Kamera zusammen.

Tabelle 4.5.3: Ausgewählte Spezifikationen der Imager3-CCD-Kamera [182]

LaVision Imager3 CCD-Kamera	
Modell	Imager3
Hersteller	PCO Computer Optics GmbH
Modell des Herstellers	SensiCam 370 LS double shutter, monochrom
Anzahl der Pixel	1280 × 1024 Pixel (h×v)
Pixelgröße	6.7 μm × 6.7 μm
Chip-Temperatur	-12 °C
Dynamikbereich	12 Bit
Auslesefrequenz	12.5 MHz
Ausleserauschen	7 - 8 Elektronen
A/D-Umwandlungsfaktor	5 e ⁻ /count
weitere Eigenschaften	Trigger-Eingang für externe Steuerung der Belichtungszeit

Auf dem CCD-Chip wurde für die Epifluoreszenzaufnahmen ein Teilbild mit 128×128 Pixeln festgelegt, um die Bildrate so weit wie möglich zu erhöhen, indem die auszulesenden Daten auf das notwendige Maß begrenzt wurden. Auf ein Binning wurde verzichtet, so dass mit dem verwendeten 40-fach Objektiv eine Pixelauflösung von $\Delta x_p = 1.3 \mu\text{m}/\text{Pixel}$ erreicht wurde. Die tatsächlich erreichte Auflösung für diesen Epifluoreszenzmodus wird aber wahrscheinlich eher durch die Streuung im Nervengewebe anstatt durch die Pixelauflösung bestimmt, insbesondere weil mit der halben Wellenlänge wie in einem TPLSM gearbeitet wird, und diese im sichtbaren Bereich liegende Wellenlänge im Nervengewebe stärker streut als die infrarote Wellenlänge eines TPLSM. Bei der verwendeten Bildgröße konnte die CCD-Kamera Bilder mit einer Rate von $v_{\text{Serie}} = 14 \text{ Hz}$ liefern. Die folgende Abbildung 4.5.7 zeigt eine Bildserie der Axon-Verzweigungen vor, während und nach der visuellen Stimulation.

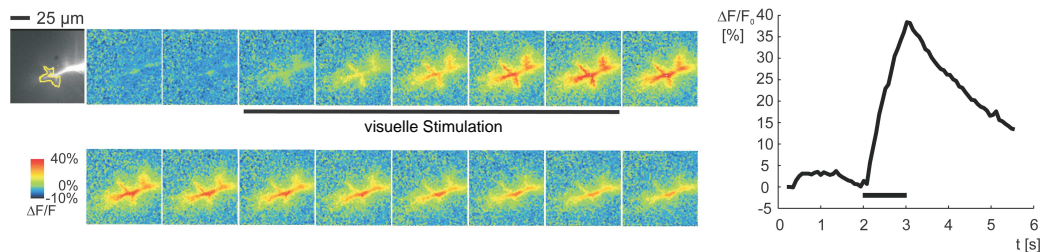


Abbildung 4.5.7: Links: Zeitreihe von Epifluoreszenzaufnahmen des selben VS2-Neurons wie in Abb. 4.5.5 (nur jedes dritte Bild der Zeitreihe ist dargestellt). Der schwarze Balken unter der oberen Reihe zeigt die visuelle Stimulation der Zelle an. Rechts: Zeitverlauf der relativen Fluoreszenzänderung $\Delta F/F_0$ aus dem gelb markierten Bereich der Epifluoreszenzaufnahmen.

Das obere linke Bild zeigt in einem Falschfarben-kodierten Rohdatenbild die axonalen Verzweigungen des selben VS2-Neurons, das in Abb. 4.5.6 gezeigt ist und zuvor im TPLSM-Modus untersucht wurde. Zudem ist der Bereich markiert (gelbe Umrandung), der für die Auswertung der relativen Fluoreszenzänderung $\Delta F/F_0$ verwendet wurde. Der Zeitverlauf der relativen Fluoreszenzänderung ist im rechten Teil der Abb. 4.5.7 dargestellt.

Der Vergleich der Zeitverläufe der relativen Fluoreszenzänderung $\Delta F/F_0$ zeigt bei den Zeilenrasterungen im TPLSM-Modus des Mikroskopes das gleiche Verhalten, das im Epifluoreszenz-Modus beobachtet werden konnte. In beiden Fällen steigt die Kalzium-Konzentration während der 1 sec. dauernden visuellen Stimulation kontinuierlich an. Die Zunahme liegt bei 40 % bis 80 % des Fluoreszenz-

basissignals F_0 . Nach der Stimulation sinkt die Kalzium-Konzentration in allen drei Messungen wieder, wobei die Zeilenrasterungen zeigen, dass das Abklingen des Ca^{2+} -Signale in den dünnen Axon-Verzweigungen schneller erfolgt als in den dickeren Verzweigungen.

Mit diesem Experiment konnte demonstriert werden, dass auch mit einer Zwei-Photonen-Anregung Zeilenrasterungen in Nervenzellen möglich sind und *in vivo*-Messungen der Ca^{2+} -Konzentration während visueller Stimulation erlauben. Im konventionellen Epifluoreszenzmodus konnte das Mikroskop Daten aufnehmen, die als Referenz dienen für den Vergleich mit den Daten, die im TPLSM-Modus aufgenommen wurden. Hervorzuheben ist, dass mit diesem Aufbau sehr einfach zwischen den beiden Modi umgeschaltet werden kann, denn jeder Modus hat seine eigenen Vor- und Nachteile. Der Epifluoreszenzmodus liefert Bilder der räumlichen Verteilung der Kalziumkonzentration, allerdings mit niedriger Frequenz ($v_{\text{Serie}} = 14 \text{ Hz}$) und aufgrund der Streuung mit eingeschränkter räumlicher Auflösung. Im TPLSM-Modus wird kein Bild aufgenommen, sondern es werden nur eindimensionale Daten entlang einer (kurzen) Linie registriert. Die Datenaufnahme erfolgt dafür aber sehr schnell ($v_{\text{Serie}} = 200 \text{ Hz}$) und erlaubt auf diese Art neue Rückschlüsse über den genauen zeitlichen Verlauf der Änderungen der Ca^{2+} -Konzentration. Dazu erreicht der TPLSM-Modus eine hohe räumliche Auflösung von etwa $\Delta x = 0.4 \text{ }\mu\text{m}$ lateral und etwa $\Delta z = 1.0 \text{ }\mu\text{m}$ axial. Die Wahl des Modus hängt also von der Information ab, die man aus den Messungen gewinnen möchte: der Epifluoreszenzmodus erlaubt die räumliche Darstellung der Ca^{2+} -Konzentration, der TPLSM-Modus dient der Darstellung des zeitlichen Verlaufes der Ca^{2+} -Konzentration.

Beide Modi lassen keine Schädigung der Probe erkennen, solange die Leistung des Anregungslaser unter $P_{\text{Probe}} = 10 \text{ mW}$ bleibt. In diesem Fall zeigen die Neuronen auch im TPLSM-Modus das gleiche funktionale Verhalten, das im konventionellen Epifluoreszenzmodus beobachtet werden kann.

Im Epifluoreszenzmodus wird eine Anregungsintensität verwendet, bei der nicht nur keine Probenschädigung, sondern auch kein Ausbleichen des Fluoreszenzfarbstoffes auftritt. Der TPLSM-Modus verwendet eine etwas höhere Laserleistung, die nicht zu einer Probenschädigung führt, aber trotzdem ein ausreichend hohes Signal ermöglicht, um die hohe zeitliche Auflösung zu erreichen. Das Ausbleichen des Farbstoffes im TPLSM-Modus wurde ohne visuelle Stimulation, d. h. ohne Änderung des Farbstoffverhaltens, für die beiden hier vermessenen Positionen bestimmt. Die monoexponentiell bestimmte Abklingzeit betrug in der dicken axonalen Verzweigung (rote Markierung) $\tau_{\text{rot}} = 15.2 \text{ sec.}$ und in der dünnen axonalen Verzweigung (grüne Markierung) $\tau_{\text{gruen}} = 6.8 \text{ sec.}$ Dieses Ausbleichen

kann aber durch eine Messung bestimmt und als Korrektur in die Ergebnisdigramme eingebracht werden. Das Problem des Ausbleichens lässt sich aber auch durch die Verwendung eines empfindlicheren Detektors, der eine geringere Anregungslaserleistung erlaubt, oder durch die Verwendung eines stabileren Fluoreszenzfarbstoffes reduzieren.

Auch wenn der TPLSM-Modus keine Bilder, sondern nur Intensitätsprofile entlang der Rasterlinie liefert, so gibt es dennoch einige Aspekte, die den TPLSM-Modus vorteilhafter erscheinen lassen als den konventionellen Epifluoreszenzmodus.

Der erste Vorteil des TPLSM-Modus liegt in der verwendeten IR-Anregungswellenlänge, denn das in der konventionellen Fluoreszenzmikroskopie verwendete Licht im VIS- oder UV-Spektralbereich reizt die Photorezeptoren der Fliege stark. Obwohl die VS-Neuronen eigentlich sehr spezifisch auf Bewegung reagieren, werden sie auch durch starke Kontraständerungen gereizt, wie sie das VIS- oder UV-Licht bewirkt. Dies macht sich auch in Abb. 4.5.7 am Beginn des Zeitverlaufes durch einen Anstieg der Ca^{2+} -Konzentration bemerkbar.

Der zweite Vorteil des TPLSM-Modus ist die bessere räumliche Auflösung im Vergleich mit dem Epifluoreszenzmodus. Die Auflösung ist aber im Zusammenhang mit der Interpretierbarkeit der aufgenommenen Bilder nicht der einzige zu beachtende Aspekt. Wichtiger für den Vergleich der Kalzium-Signale aus verschiedenen Regionen der Nervenzelle ist das Übersprechen des Fluoreszenzsignals zwischen benachbarten Zellbereichen bei der Epifluoreszenzmikroskopie. Deshalb ist anzunehmen, dass das Fluoreszenzsignal dünner Neuriten einen nicht zu vernachlässigenden Anteil der Fluoreszenz aus benachbarten, dickeren und stärker angefärbten Neuriten enthält. Im TPLSM-Modus stammt das Fluoreszenzsignal nur aus dem Fokusvolumen und deshalb kann das Signal auch genau der gerade vom Fokus gerasterten Struktur in der Zelle zugeordnet werden. Somit lassen sich auch benachbarte Strukturen in der Zelle, deren Bild im Epifluoreszenzmodus durch die Streuung verschmiert wird, im TPLSM-Modus deutlich trennen.

Nachdem mit diesem Experiment demonstriert werden konnte, dass die TPLSM grundsätzlich in der Neurobiologie anwendbar ist und auch Vorteile gegenüber der konventionellen Epifluoreszenzmikroskopie besitzt, ist ein Mikroskopaufbau wünschenswert, der die Vorteile beider Modi vereinigt, also mit hoher zeitlicher und räumlicher Auflösung nicht nur einzelne Zeilen, sondern ganze Bilder aufnehmen kann. Einen Schritt in Richtung eines derartigen Aufbaus wird mit den im folgenden Kapitel 4.5.2 beschriebenen Experimenten vorgestellt.

4.5.2 Multizeilen-TPLSM zur *in vivo*-Kalzium-Untersuchung

Der TPLSM-Aufbau, der im vorigen Kap. 4.5.1 beschrieben wurde, zeigte die prinzipielle Anwendbarkeit der TPLSM in der Neurobiologie. Allerdings blieb das Problem bestehen, dass auf der einen Seite ein bildgebendes, aber langsames Verfahren und auf der anderen Seite ein schnelles, aber nicht-bildgebendes Verfahren (Punktrasterverfahren) existiert und beide nicht zu einem schnellen und bildgebenden Verfahren vereinigt werden konnten.

Mit dem in diesem Experiment realisierten Aufbau wird diese Diskrepanz durch paralleles Arbeiten mit mehreren Rasterzeilen und einer CCD-Kamera als Detektor verringert und unter bestimmten Bedingungen teilweise aufgehoben.

Es ist auch möglich, die einzelnen Rasterzeilen so dicht zusammen zu bringen, dass es keine Lücken zwischen ihnen gibt. Diese Art einer Multi-Zeilenraasterung ist dann ein bildgebendes Verfahren, das zugleich die hohe zeitliche Auflösung der Zeilenraasterung realisiert. Dabei kann aber die räumliche Auflösung aufgrund der Streuung im Gewebe reduziert werden. Dieser Schritt der Multi-Zeilenraasterung ist im vorliegenden Experiment aber noch nicht realisiert worden, sondern es wurde das parallele Arbeiten mit acht deutlich separierten Rasterzeilen demonstriert.

Gegenstand der Untersuchungen in diesem Experiment sind wiederum die VS-Neuronen in der *Lobula*-Schicht der TC-Neuronen (vgl. Abb. 4.5.1).

Der Aufbau des Multizeilen-TPLSM entspricht der Beschreibung aus Kap. 3, mit den hervorzuhebenden Komponenten des Strahlteilers im TriM-Scope, der die bis zu 64 Strahlen erzeugt, und der EMCCD-Kamera als Detektor. Die Kamera ist als flächiger Detektor notwendig, da der Aufbau nur im non-descanned Modus betrieben werden kann. Zur visuellen Stimulation ist wiederum die LED-Leiterplatte oberhalb des Objektivs im Sichtbereich der Fliege angebracht.

Aufgrund fehlender technischer Möglichkeiten war die bildgebende TPLSM (im non-descanned Modus) bisher auf Anwendungen beschränkt, die ein starkes Fluoreszenzsignal lieferten oder bei denen die temporale Auflösung keine Rolle spielte, so dass die Bilder lange belichtet werden konnten [183]. Diese Einschränkung konnte durch die Verwendung der Andor iXon EMCCD-Kamera aufgehoben werden. Abb. 4.5.8 skizziert den in diesem Experiment verwendeten Aufbau.

Mit diesem Aufbau konnte das Multizeilen-Rasterverfahren auf zwei Arten realisiert werden: als Bildraastermodus und als Multizeilenmodus.

Im Bildraastermodus wird die ganze Linie mit den 64 Foki sowohl in der x- als auch in der y-Richtung bewegt. Auf diese Weise entsteht eine homogen angeregte Fläche in der Fokusebene, deren Fluoreszenz auf die EMCCD-Kamera abgebildet wird und ohne Nachbearbeitung als Fluoreszenzbild ausgelesen werden kann.

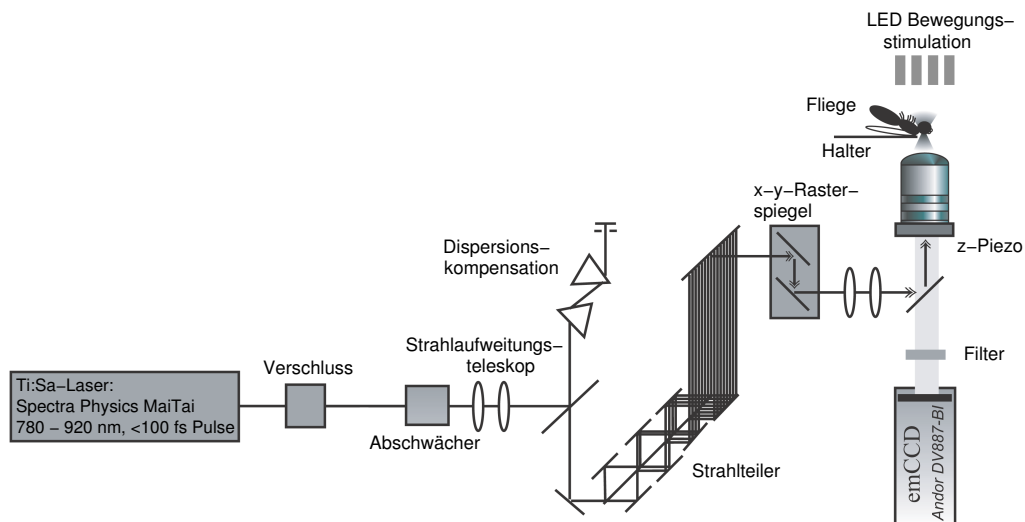


Abbildung 4.5.8: Multizeilen-TPLSM-Aufbau für das zweite Experiment zur *in vivo*-Untersuchung von fluoreszenzmarkierten Nervenzellen.

Voraussetzung für eine homogene Anregung ist eine nicht zu grobe Rasterschrittweite, die deshalb typischerweise unter $\Delta x_{\text{Schritt}} = 400 \text{ nm}$ lag.

Der Multizeilenmodus realisiert die im vorigen Experiment (siehe Kap. 4.5.1) angedachte parallele mehrfache Zeilenrasterung im non-descanned Modus. Es werden mehrere Zeilen gleichzeitig gerastert und die Fluoreszenz wird auf den CCD-Chip abgebildet. Es wird zwar auch wieder ein Bild vom CCD-Chip ausgelesen, aber dieses zeigt ohne Nachbearbeitung die Intensitätsverläufe aller parallel betrachteten Rasterzeilen. Um das Auslesen zu beschleunigen, kann mit Binning gearbeitet werden. Wird das Binning senkrecht zu den Rasterlinien eingestellt, so kann man idealerweise abwechselnd Pixelreihen mit Signal und Reihen ohne Signal zur Trennung der einzelnen Zeilen erhalten. Da parallel zu den Rasterzeilen nicht gebinnt wird, bleibt die Pixelauflösung entlang dieser Achse erhalten. Eine Rasterzeile wird typischerweise auch kürzer sein als eine Seitenlänge des Bildes im Bildrastermodus, so dass auch durch Verkleinerung des auszulesenden Bereiches des CCD-Chips die Datenmenge reduziert und somit die Bildrate der Kamera erhöht werden kann.

Die folgende Abbildung 4.5.9 zeigt eine Sequenz von Bildern der präsynaptischen Region eines VS-Neurons während der visuellen Stimulation mit dem in der Vorzugsrichtung bewegten Streifenmuster. Die Bilder wurden im Bildrastermodus (BRM) mit einer Frequenz von $\nu_{\text{Serie, BRM}} = 8.2 \text{ Hz}$ aufgenommen.

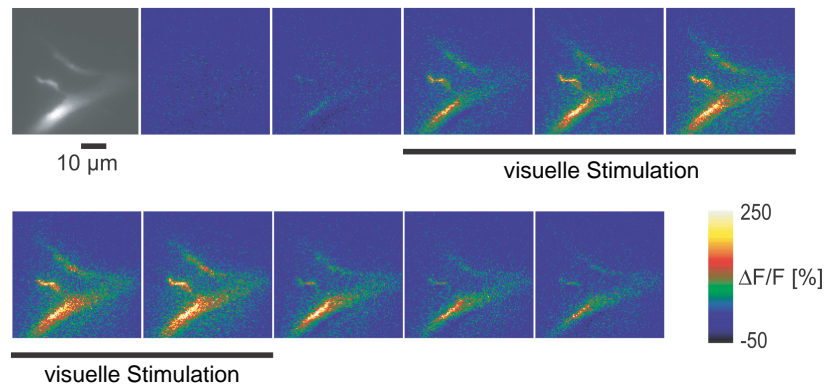


Abbildung 4.5.9: Bildsequenz der präsynaptischen Region eines VS-Neuron während visueller Stimulation (von links nach rechts verlaufend). Nur jedes vierte Bild ist dargestellt. Der schwarze Balken zeigt den Zeitbereich der visuellen Stimulation an.

Die Bilder hatten eine Größe von 128×128 Pixeln und die Farbkodierung zeigt in den gelben und roten Farben den Anstieg der relativen Fluoreszenz $\Delta F/F_0$ des kalzium-sensitiven Farbstoffes an. Der Fluoreszenzanstieg spiegelt somit den lokalen Anstieg der freien intrazellulären Kalziumkonzentration wider. Als Farbstoff wurde in diesem Fall eine Mischung der beiden kalziumsensitiven Farbstoffe Oregon-Green 488 BAPTA 1 Hexa-Kalium Salz und Fluo-4 Penta-Kalium Salz verwendet. Dies ermöglichte es, die geringe Basisfluoreszenz des Fluo-4-Farbstoffes zu umgehen und dennoch zu einem gewissen Grad den großen Dynamikbereich des Fluo-4-Farbstoffes auszunutzen. Die Anregung erfolgte bei $\lambda_{\text{ex.}} = 820$ nm. Man erkennt in den Bildern während der visuellen Stimulation einen deutlichen Anstieg der relativen Fluoreszenz $\Delta F/F_0$, die nach der Stimulation wieder abnimmt.

Im Bildrastermodus kann eine Bildrate von bis zu $v_{\text{Serie}} = 20$ Hz erreicht werden, sofern die Farbstoffkonzentration in der Zelle ausreichend hoch ist, um ein Signal zu liefern, das oberhalb der Rauschgrenze liegt. Für die detaillierte Untersuchung der Kalziumdynamik ist diese zeitliche Auflösung allerdings nicht ausreichend. Im Multizeilenmodus ließ sich eine Bildrate von $v_{\text{Serie}} = 89.3$ Hz erreichen, dieser Modus ist also um einen Faktor 4.5 schneller als der Bildrastermodus. Im Multizeilenmodus wurden in diesem Experiment nur acht der 64 Zeilen gleichzeitig gerastert, wobei die Zeilen einen Abstand von etwa $\Delta y_{\text{Zeile}} = 7 \mu\text{m}$ hatten, um ein Übersprechen des Fluoreszenzsignals zwischen den Zeilen zu verhindern.

Abb. 4.5.10 zeigt eine Gegenüberstellung des Bildrastermodus und des Multizeilenmodus. Vier der acht Rasterzeilen treffen die endterminalen Axon-Verzweigungen, wie im rechten Bild des Multizeilenmodus am Fluoreszenzsignal zu sehen ist. Die Positionen dieser Zeilen sind im linken Bild des Bildrastermodus markiert und nummeriert.

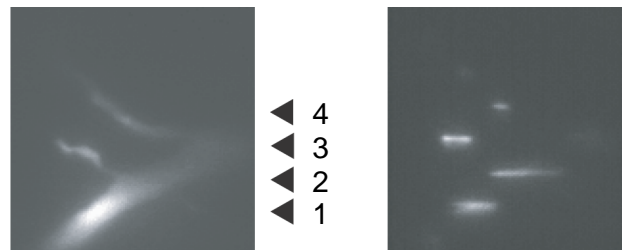


Abbildung 4.5.10: Gegenüberstellung von Bildrastermodus und Multizeilenmodus bei Abbildung einer endterminalen Axon-Verzweigung: Links: Endterminale Axon-Verzweigung im Bildrastermodus, markiert und nummeriert sind die Positionen, die im Multizeilenmodus gerastert wurden. Rechts: Dieselbe axonale Verzweigung im Multizeilenmodus, vier der acht Rasterzeilen treffen die fluoreszenzmarkierten Neuriten.

Die Auswertung der im Multizeilenmodus aufgenommenen Daten erfolgt in gleicher Art und Weise, wie es im vorigen Kap. 4.5.1 für den descanned Modus des TPLSM beschrieben wurde. In den Rasterzeilen wird der interessierende Bereich markiert – auch in einer Rasterzeile kann im Querschnitt des Neuriten ein interessanter Bereich festgelegt werden –, das Signal berechnet und als zeitlicher Verlauf dargestellt. Für die vier Rasterzeilen aus Abb. 4.5.10, die einen Neuriten treffen, ist der jeweilige zeitliche Verlauf in der folgenden Abb. 4.5.11 zusammen mit einem Übersichtsbild der Rasterpositionen dargestellt.

Man erkennt an den Abbildungen 4.5.9, 4.5.10 und 4.5.11 (oben), dass die Neuriten nicht mit einer einzelnen Zeilenrasterung hätten untersucht werden können, weil sie zu weit auseinander liegen, um von einer einzigen Rasterzeile getroffen zu werden. Der Multizeilenmodus erlaubt also die gleichzeitige Untersuchung der Kalziumsignale in den interessierenden Neuriten mit der hohen temporalen Auflösung des Multizeilenmodus. Die zeitlichen Verläufe in Abb. 4.5.11 (oben) zeigen, dass im dickeren Neuriten (Nr. 1) die Kalziumkonzentration langsamer ansteigt als in den dünneren Neuriten (Nr. 3) – dieses Ergebnis fand sich auch schon in den Experimenten mit dem Einzelstrahl-TPLSM (vgl. Kap. 4.5.1). Zum Vergleich wurde die gleiche Messung auch im Bildrastermodus durchgeführt und

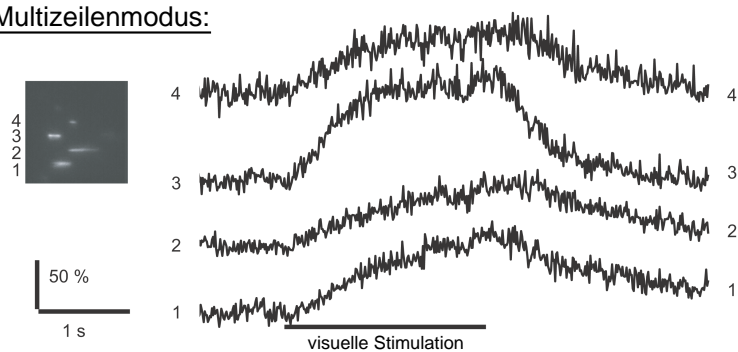
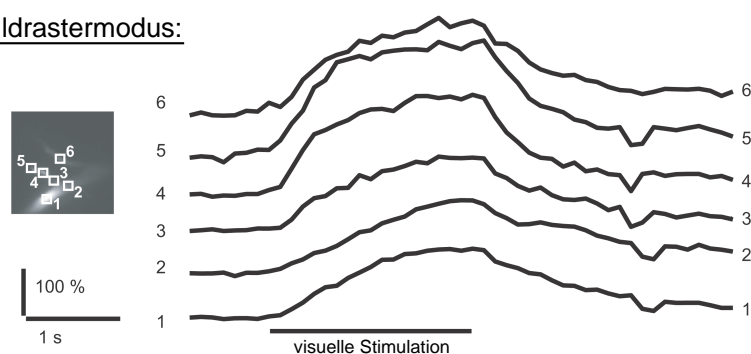
Multizeilenmodus:Bildrastermodus:

Abbildung 4.5.11: Zeitlicher Verlauf der Kalziumkonzentration aufgenommen im Multizeilenmodus (oben) und im Bildrastermodus (unten). Der schwarze Balken unter den Zeitverläufen zeigt den Zeitpunkt der visuellen Stimulation an.

zur Auswertung wurden in den Bildern wieder interessante Bereiche markiert und ihr Signal wie zuvor ausgewertet. Die zeitlichen Verläufe sind in Abb. 4.5.11 (unten) dargestellt. Der zeitliche Verlauf der im Bildrastermodus aufgenommenen Daten zeigt das gleiche Verhalten wie die Multizeilenmodus-Daten, wenn auch die temporale Auflösung im Bildrastermodus kleiner ist.

Beide Modi bestätigen also das Verhalten, dass die Kalziumkonzentration in den dünneren Neuriten schneller ansteigt und nach der Stimulation auch wieder schneller absinkt als in den dickeren Neuriten. Als Teil der Ursache für dieses Verhalten nennt [181] die Unterschiede im Oberfläche-zu-Volumen-Verhältnis zwischen diesen Neuriten. Eine mögliche funktionelle Bedeutung der schnellen Kalziumdynamiken kann in ihrem Beitrag liegen, die Neurotransmitterausschüttung in den präsynaptischen Enden der axonalen Verzweigungen schneller zu kontrollieren [184–186].

Mit Hilfe der TPLSM und der hier nicht beschriebenen CLSM konnten auch kleine neuritische Ausstülpungen in der axonalen Endregion des VS-Neurons beobachtet werden, die bisher noch nicht Gegenstand funktionaler Untersuchungen waren. Bei diesen Ausstülpungen, die an die dendritischen Dornen kortikaler Neuronen von Säugetieren erinnern, ist noch unbekannt, ob sie prä- oder postsynaptische Funktion haben. Da aber gerade die unterschiedliche Kalziumregulation in den Dornen und den Dendriten, von denen sie abstammen, eine wichtige Rolle bei den kortikalen Dornen spielt, wurde auch die Kalziumdynamik in den Dornen der VS-Neuronen und dem anschließenden axonalen Strang untersucht. In Pyramidalneuronen von Säugetieren zeigte sich in den Dornen eine schnellere Kalziumdynamik als in den zugehörigen Dendriten [187, 188]. Im Gegensatz dazu wurde in den VS-Neuronen keine offensichtlich unterschiedliche Kalziumdynamik zwischen den Dornen und dem zugehörigen axonalen Strang bzw. zwischen den einzelnen Dornen beobachtet, wie die zeitlichen Verläufe der Kalziumkonzentration in Abb. 4.5.12 zeigen.

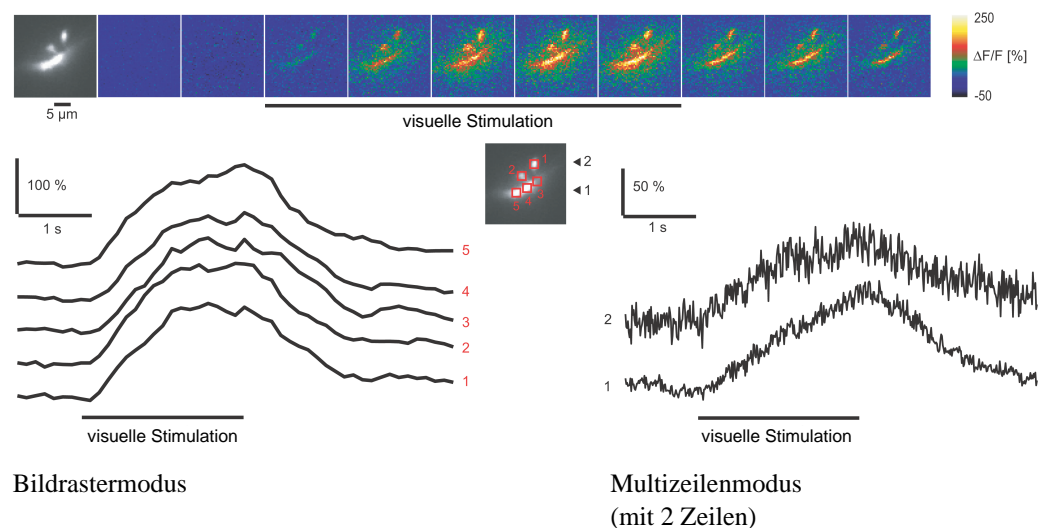


Abbildung 4.5.12: Zeitlicher Verlauf der Kalziumkonzentration in den Dornen und dem zugehörigen axonalen Strang. Der schwarze Balken unter den Zeitverläufen zeigt jeweils den Zeitpunkt der visuellen Stimulation an. Links unten der zeitliche Verlauf berechnet aus dem Bildrastermodus, rechts unten der zeitliche Verlauf berechnet aus dem Multizeilenmodus (mit zwei Zeilen).

Der TPLSM-Aufbau in diesem Experiment konnte in zwei verschiedenen Modi betrieben werden: dem Bildrastermodus und dem Multizeilenmodus.

Der Bildrastermodus ist vergleichbar mit dem Epifluoreszenzmodus, der in Kap. 4.5.1 beschrieben wurde. Auch hier zeigt sich, dass der Bildrastermodus mit einer Bildfrequenz bis zu $v_{\text{Serie}} = 20$ Hz die geringste temporale Auflösung besitzt. Demgegenüber steht der TPLSM-Modus (descanned Modus mit Punktrasterverfahren, vgl. Kap. 4.5.1), mit dem eine temporale Auflösung von $v_{\text{Serie}} = 200$ Hz erzielt werden kann. Die räumliche Auflösung ist im TPLSM-Modus aufgrund des Punktrasterverfahrens am besten, da das Fluoreszenzsignal selbst bei Streuung im Gewebe eindeutig dem Rasterpunkt zugeordnet werden kann. Bei den bildgebenden Verfahren – dazu gehören auch der Einzel- und Multizeilenmodus mit der Detektion durch eine CCD-Kamera – überlagern sich dagegen die Signale benachbarter Rasterpunkte auf dem flächigen Detektor und das gesamte Bild erscheint unscharf. Die dritte Art der Detektionsmodi sind schließlich die Zeilenmodi, deren Einschränkung liegt in dem auf die Zeile beschränkten Untersuchungsbereich. In diesem Vergleich der Modi füllt der Multizeilenmodus die Lücke zwischen dem Bildrastermodus und dem Einzelzeilenmodus. Der Multizeilenmodus ist schneller als der Bildrastermodus und zeigt einen größeren Untersuchungsbereich als der Einzelzeilenmodus, er reicht aber jeweils nicht an die jeweiligen einzelnen Vorteile der beiden anderen Modi heran.

Für eine detailliertere Beschreibung des Multizeilenmodus wurde auch die Auflösung untersucht. Zunächst ist festzustellen, dass der Vorteil der Zwei-Photonen-Anregung – die Beschränkung der Anregung auf das Fokusbereich – hier in allen Modi erhalten bleibt, die mit der Zwei-Photonen-Anregung arbeiten. Die Verschlechterung der Auflösung findet im Detektionsstrahlengang statt, wenn ein flächiger Detektor verwendet wird. Im Bildrastermodus wirkt sich die Auflösungsver schlechterung entlang beider Achsen des Bildes aus, beim Multizeilenmodus nur entlang der Achse, die parallel zur Rasterzeile verläuft – sofern der Abstand der Rasterzeilen ausreichend groß ist, um ein Übersprechen der Signale zwischen den Rasterzeilen zu verhindern.

4.5.3 Auswirkung der Streuung auf die Auflösung

Um die Auswirkung der Streuung im Gewebe auf die Auflösung zu untersuchen, wurde mit dem Aufbau dieses Experimentes neben dem Bildraster- und dem Multizeilenmodus auch der TPLSM-Modus realisiert. Dazu wurden kurze Rasterzeilen (Länge $l_z = 15 \mu\text{m}$) mit möglichst kleiner Frequenz ($v_{\text{Zeile}} = 2$ Hz) gerastert, während die Bildaufnahme mit möglichst hoher Frequenz ($v_{\text{Serie}} = 97$ Hz) erfolgte. Dieses Verfahren ist vergleichbar mit dem Detektionsschema, dass im TPLSM-Modus des vorigen Experimentes angewendet wurde (vgl. Kap. 4.5.1).

Im TPLSM-Modus wurde die APD als Detektor mit so hoher Frequenz ausgelesen, dass die Raster Spiegel trotz ihrer hohen Zeilenfrequenz ($v_x = 200$ Hz) den Fokus quasi nicht in seiner Rasterposition veränderten. Mit den in diesem Experiment benutzten Einstellungen wurde das Signal aus einem 313 nm langen Bereich der Zeile aufgenommen, also einem Bereich, der der theoretischen Auflösung entspricht, wie sie sich nach Gl. (4.1.6) berechnet bzw. wie sie als typischer praktischer Wert erreicht wird (vgl. Kap. 2.5.1).

Für die vergleichende Auflösungsbestimmung wurden Neuronen untersucht, die alle in einer Tiefe von $z = 30 \mu\text{m}$ bis $z = 60 \mu\text{m}$ unter der Gewebeoberfläche liegen. Die aufgenommene Zeitreihe zeigt auf den Bildern der CCD-Kamera einen Fluoreszenzpunkt, der sich auf der Rasterzeile entlang bewegt. In der ersten Möglichkeit der Auswertung kann aus dieser Zeitreihe nun aus jedem Bild die Fluoreszenzintensität berechnet und in einem Intensitätsprofil der zugehörigen Rasterposition zugeordnet werden, so dass ein räumliches Intensitätsprofil der Rasterzeile wie im TPLSM-Modus (Punktrasterverfahren) entsteht. In der zweiten Möglichkeit der Auswertung können die Bilder der Zeitreihe auch alle überlagert werden, so dass sich ein Bild wie im Multizeilenmodus ergibt. Hervorzuheben ist, dass beide Bilder die gleiche zelluläre Struktur mit der exakt gleichen Reaktion der Zelle auf die visuelle Stimulation zeigen – für den Vergleich der Auflösung konnte also nicht nur die gleiche Probe, sondern sogar der gleiche Datensatz verwendet werden. Die unterschiedliche Auswertung ermöglicht es, für diesen Datensatz räumliche Intensitätsprofile zu erhalten, die im ersten Fall nicht von der Streuung im Gewebe beeinflusst sind, im zweiten Fall dagegen den Einfluss der Streuung enthalten. Die folgende Abbildung 4.5.13 zeigt die räumlichen Intensitätsprofile eines einzelnen Neuriten im Teil (A), im Teil (B) sind die Intensitätsprofile eines Neuriten mit ungleichmäßiger Intensitätsverteilung dargestellt.

In beiden Graphen der Abb. 4.5.13 zeigt die dicke, durchgezogene Linie das Profil, das aus einem Streifen der hellsten zehn Zeilen gemittelt wurde. Die dünne, durchgezogene Linie gibt das Profil der hellsten Linie im CCD-Bild wieder. Die gestrichelte Linie zeigt das Profil, das aus den einzelnen Intensitätswerten der Zeitreihe des TPLSM-Modus als Punktrasterverfahren zusammengesetzt wurde.

Man erkennt in Abb. 4.5.13 (A), dass der Neurit etwas schmaler erscheint und das Profil steilere Flanken hat, wenn er im TPLSM-Modus aufgenommen wurde. Der einzelne Neurit in Abb. 4.5.13 (A) hat im TPLSM-Modus eine Breite (FWHM) von $b_{\text{TPLSM}} = 2.80 \mu\text{m}$ (gestrichelte Linie), im Multizeilenmodus beträgt die Breite (FWHM) dagegen $b_{\text{Multi}} = 3.90 \mu\text{m}$ (dünne durchgezogene Linie). Der Unterschied zum über 10 CCD-Zeilen gemittelten Profil mit einer Breite (FWHM) von $b_{\text{gemitt.}} = 3.95 \mu\text{m}$ ist gering.

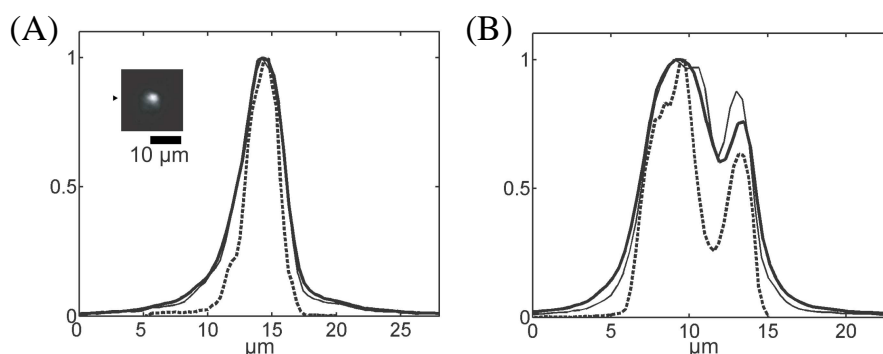


Abbildung 4.5.13: Vergleich der räumlichen Fluoreszenzintensitätsprofile eines einzelnen Neuriten an Stellen mit homogener und inhomogener Fluoreszenzverteilung. (A): Neuriten mit homogener Fluoreszenzverteilung. Die beiden durchgezogenen Linien wurden im Multizeilenmodus aufgenommen, die gestrichelte Linie im Punktrastermodus. (B): Gleicher Vergleich der Intensitätsprofile an einer Neuritenstelle mit inhomogener Fluoreszenzverteilung.

Mehrere Messungen ($n = 7$) am Neuriten aus Abb. 4.5.13 (A) ergeben bezogen auf die FWHM einen Unterschied zwischen dem TPLSM-Modus und dem Einzelzeilenprofil von $\Delta b_{\text{TPLSM:EZP}} = 0.88 \pm 0.47 \mu\text{m}$. Wird das über 10 CCD-Zeilen gemittelte Profil zum Vergleich herangezogen, so beträgt der Unterschied $\Delta b_{\text{TPLSM:gemitt.}} = 1.02 \pm 0.32 \mu\text{m}$. Bestätigt wird diese Messung durch Messungen an zwei weiteren einzelnen Neuriten. Bei diesen betrug der Breitenunterschied zum TPLSM-Modus $\Delta b_{\text{TPLSM:EZP}} = 0.44 \pm 0.34 \mu\text{m}$ bzw. $\Delta b_{\text{TPLSM:EZP}} = 0.92 \pm 0.31 \mu\text{m}$. Wird wieder über einen 10 Zeilen breiten Streifen gemittelt, beträgt der Breitenunterschied zum TPLSM-Modus $\Delta b_{\text{TPLSM:gemitt.}} = 0.92 \pm 0.47 \mu\text{m}$ bzw. $\Delta b_{\text{TPLSM:gemitt.}} = 1.22 \pm 0.30 \mu\text{m}$.

Dies bedeutet, dass die bildgebenden Verfahren (Multizeilenmodus, Einzelzeilenmodus und Bildrastermodus) eine schlechtere räumliche Auflösung besitzen, als der TPLSM-Modus als Punktrasterverfahren. Durch Mittelung mehrerer Zeilen der CCD-Kamera kann sich die Auflösung noch weiter reduzieren.

An den Intensitätsprofilen in Abb. 4.5.13 (B) ist zu erkennen, dass mit dem TPLSM-Modus (gestrichelte Linie) der nicht-fluoreszente Bereich zwischen den beiden fluoreszierenden Bereichen des Neuriten deutlicher hervortritt als in den bildgebenden Verfahren (durchgezogene Linien). Aufgrund der schlechteren räumlichen Auflösung der bildgebenden Verfahren kann die Lücke nicht so exakt abgebildet werden und erscheint daher verschmiert.

Zusammengefasst zeigen die beiden in diesem Kapitel 4.5 beschriebenen Experimente, dass die Anwendung der Zwei-Photonen-Laser-Raster-Mikroskopie in der Neurobiologie für *in vivo*-Untersuchungen möglich ist und zudem wichtige Vorteile bietet. Dazu wurde im ersten Experiment die prinzipielle Anwendbarkeit der TPLSM in einem Aufbau nachgewiesen, der den TPLSM-Modus als Punktrasterverfahren mit einer APD als schnellem Detektor realisiert. Im zweiten Experiment wurde der Aufbau zum Multizeilenmodus erweitert. Dabei wurde eine neuartige, sehr empfindliche und schnelle CCD-Kamera als Detektor verwendet. Für die Realisierung des Multizeilenmodus ist das Prinzip der Erzeugung multipler Strahlen von T. NIELSEN *et al.* [16] angewendet worden.

Die Auflösung definiert sich durch die Fokusgröße bei der Anregung, eine anschließende weitere Verschlechterung der Auflösung durch Streuung des Fluoreszenzlichtes auf dem Weg zum Detektor kann durch Anwendung des TPLSM-Modus als Punktrasterverfahren vermieden werden. Somit wird die IR-Laserstrahlung bei der Anregung weniger gestreut als die VIS-/UV-Strahlung und die Anregungsauflösung ist tiefer im Gewebe besser als bei CLSMs/Epifluoreszenzmikroskopen.

Für die Neurobiologie mit ihren Untersuchungen am visuellen System bietet die IR-Strahlung den weiteren wichtigen Vorteil, dass die Photorezeptoren vieler Präparate nicht auf die IR-Strahlung reagieren und so eine ungewollte Stimulation des visuellen Systems verhindert wird. Die aufgenommenen Daten werden durch das nur zur Datenaufnahme benötigte Laserlicht nicht verfälscht.

Die TPLSM kann Bilder liefern, die vergleichbar sind mit den Bildern von Epifluoreszenzmikroskopen. Um eine möglichst hohe temporale Auflösung (dies entspricht auch einer hohen Bildrate v_{Serie}) zu erreichen, wird mit einer möglichst hohen Laserleistung gearbeitet, bei der aber noch keine Schädigung der Probe auftritt. In den hier durchgeführten Experimenten konnte eine Laserleistung von bis zu $P_{\text{Probe}} = 10 \text{ mW}$ pro Strahl verwendet werden und die untersuchten Nervenzellen blieben vital und zeigten die aus anderen Experimenten bekannten Reaktionen bei visueller Stimulation. Bei der verwendeten Laserleistung kam es aber zu einem Ausbleichen der Fluoreszenzfarbstoffe, mit denen die Nervenzellen angefärbt waren. Dieses Ausbleichen kann in einer Referenzmessung ohne visuelle Stimulation untersucht werden und die eigentlichen Messungen können anschließend mit dieser Referenz korrigiert werden. Das Ausbleichen stellt also kein prinzipielles Hindernis für die Anwendung der TPLSM in der Neurobiologie dar. Zudem könnte die Laserleistung und somit auch das Ausbleichen reduziert werden, wenn ein Aufbau mit größerer Detektionseffizienz und stabilere Farbstoffe verwendet werden.

Die beiden Aufbauten in den Experimenten erlaubten jeweils mehrere Betriebsmodi, die sich in Bezug auf die räumliche und temporale Auflösung zum Teil deutlich unterscheiden, und die teilweise auch so realisiert werden können, dass eine Mischform zweier Modi entsteht. Mit beiden Aufbauten war ein Bildrastermodus möglich, bei dem die Laserstrahlen ein Gebiet in der Probe rasterterten und ein Bild auf der CCD-Kamera erzeugten (non-descanned Modus, vgl. Kap. 2.3.1). Die Bildrate betrug im ersten Aufbau mit der damals typischen und dem Stand der Technik entsprechenden CCD-Kamera nur $v_{\text{Serie}} = 14$ Hz, die im zweiten Experiment verwendete derzeit modernste EMCCD-Kamera erreichte Bildraten von bis zu $v_{\text{Serie}} = 20$ Hz. Ursache für diese geringe Bildrate ist jeweils der große Bildbereich, der für die Raster Spiegel eine Bewegung entlang der x- und y-Achse erfordert. Der Multizeilenmodus bietet hier einen Ausweg, denn er kann nicht nur wie zuvor beschrieben mit acht weit separierten Zeilen realisiert werden, sondern es können auch alle 64 Strahlen benutzt werden, die ein Bild erzeugen, wenn die Rasterzeilen direkt aneinander angrenzen. Der Bildbereich ist zwar kleiner als im Bildrastermodus, weil die Bildhöhe (y-Achse) durch die Länge der Linie der 64 Foki auf $l_{\text{Foki}} = 30 \mu\text{m}$ beschränkt ist. Dafür kann die Bildrate auf etwa $v_{\text{Serie}} = 100$ Hz erhöht werden, wie es zuvor für den Multizeilenmodus mit acht Rasterzeilen beschrieben wurde. Die Auflösung wird allerdings so gering sein wie im Bildrastermodus, der Vorteil der hohen Auflösung senkrecht zu den separierten Rasterzeilen geht zugunsten der erhöhten Bildrate verloren.

Im ersten Aufbau (vgl. Kap. 4.5.1) konnte der TPLSM-Modus angewendet werden, der als Punktrasterverfahren eine einzelne Zeile abrasterte und durch die Verwendung einer APD als Detektor sowohl eine hohe räumliche als auch eine hohe temporale Auflösung erreicht. Die räumliche Auflösung ist in Oberflächennähe beugungsbegrenzt und erreicht Werte von $\Delta x = 0.4 \mu\text{m}$ (lateral), und ist somit äquivalent zur Auflösung kommerzieller CLSMs. In nicht-streuendem Gewebe gilt dies auch für den Bildrastermodus. Die temporale Auflösung des TPLSM-Modus liegt typischerweise bei $v_{\text{Serie}} = 200$ Hz, kann aber auch bis zu $v_{\text{Serie}} = 400$ Hz erreichen.

Im zweiten Aufbau konnte ebenfalls ein TPLSM-Modus realisiert werden, der allerdings nur für vergleichende Zwecke der Auflösungsbestimmung angewendet wurde. Als Detektor wurde die EMCCD-Kamera verwendet, von der die Bilder mit dem „Datenpunkt“ ausgelesen wurden. Dennoch konnte auch mit diesem Punktrasterverfahren eine temporale Auflösung von knapp $v_{\text{Serie}} = 100$ Hz erzielt werden. Da dieser Modus für Vergleiche mit dem Multizeilenmodus benutzt wurde, war die Konfiguration der EMCCD-Kamera noch nicht optimal. Ein Binning parallel zur Rasterzeile kann die Bildrate noch erhöhen. Sofern der auszulesende

Teilbereich des CCD-Chips nicht auf eine einzelne Zeile beschränkt wird – dies würde auch die Bildrate erhöhen – ist dieser Multizeilen-Modus eine Erweiterung des bisherigen Einzelzeilen-Modus aus dem ersten Aufbau. Der TPLSM-Modus hat in beiden Aufbauten als Punktrasterverfahren den Nachteil, dass nur ein ein-dimensionales Fluoreszenzintensitätsprofil entlang der Rasterzeile und kein zwei-dimensionales Bild wie im Bildrastermodus aufgenommen wird. Der Vorteil des TPLSM-Modus liegt aber in beiden Aufbauten in der optimalen Ausnutzung der räumlichen Auflösung.

Der Multizeilenmodus mit klar separierten Rasterzeilen schließt die Lücke zwischen dem Bildrastermodus und dem TPLSM-Modus, die beide jeweils nur einen von zwei Vorteilen realisieren können: entweder die Bildgebung oder die hohe temporale Auflösung. Zwar liefert der Multizeilenmodus keine vollständigen zweidimensionalen Bilder, aber die separierten Rasterzeilen erlauben eine simultane Untersuchung auch weiter von einander entfernter Strukturen des Präparates. Dennoch geben die Multizeilenbilder, die man auch als „interlaced“ Bilder bezeichnen kann, einen groben Eindruck der zweidimensionalen Struktur wieder, abhängig von der Anzahl und dem Abstand der Rasterzeilen. Falls der Multizeilenmodus mit allen 64 aneinander angrenzenden Strahlen verwendet wird, erhält man sogar wieder einen bildgebenden Modus mit erhöhter Bildrate, aber reduzierter räumlicher Auflösung. So lässt sich die Lücke zwischen dem Bildrastermodus und dem TPLSM-Modus schließen.

In Bezug auf die Auflösung, besitzt der TPLSM-Modus als Punktrasterverfahren die beste räumliche und temporale Auflösung, sofern als Detektor eine APD verwendet wird. Auf diese Weise hat die Streuung im Gewebe keine negative Auswirkung. Falls die EMCCD-Kamera als Detektor im TPLSM-Modus verwendet wird, geht die hohe temporale Auflösung verloren – die Bildrate reduziert sich auf einige Hz –, aber es bleibt der Vorteil der hohen räumlichen Auflösung erhalten. Dies gilt auch, falls mit mehreren Rasterpunkten, die deutlich voneinander separiert sind, gearbeitet wird. Dieser Multizeilen-TPLSM-Modus ist im zuvor beschriebenen Experiment allerdings nicht realisiert worden. Die deutliche Trennung benachbarter Rasterzeilen/Rasterpunkte ist notwendig, denn bei den bildgebenden Verfahren führt die Streuung im Gewebe dazu, dass sich die Signale benachbarter Rasterpunkte auf dem Detektor gegenseitig beeinflussen/überlagern und im entstehenden Bild somit Details verloren gehen. Aus diesem Grund ist auch die Separation der Rasterzeilen im Multizeilenmodus wichtig, wenn die hohe räumliche Auflösung senkrecht zu den Rasterzeilen erhalten bleiben soll. Verringert man den Abstand der Rasterzeilen, wird die räumliche Auflösung immer

schlechter, bis sie der Auflösung des Bildrasterverfahrens entspricht, wenn die Rasterzeilen aneinander angrenzen.

Der im zweiten Experiment realisierte Aufbau bietet auch den Vorteil, dass zwischen den verschiedenen Modi sehr einfach umgeschaltet werden kann, ohne dass das Präparat dabei mit verändert werden muss.

Der Aufbau des zweiten Experimentes ist optimiert auf eine hohe Empfindlichkeit, indem die EMCCD-Kamera als Detektor mit einer aktuell höchsten Quanteneffizienz von $\gamma > 90\%$ verwendet wird. Da bei Laserleistungen oberhalb von $P_{\text{Probe}} = 10\text{ mW}$ eine Schädigung des Präparates auftritt, kann die Empfindlichkeit des Aufbaus im Hinblick auf die zeitliche Auflösung nicht durch eine Erhöhung der Laserleistung erreicht werden, es ist daher der empfindlichere Nachweis des Fluoreszenzsignals durch einen empfindlicheren Detektor notwendig.

Die Erweiterung des ersten Aufbaus auf den Multizeilenmodus ist einer der größten Vorteile des zweiten Aufbaus, denn der Multizeilenmodus erlaubt die gleichzeitige Untersuchung weiter auseinanderliegender Strukturen einer Nervenzelle für vergleichende Studien. Auch in vielen anderen Anwendungsgebieten, aber insbesondere in der Neurobiologie, kann der Multizeilenmodus deutliche Vorteile liefern. So ist beispielsweise bei der Untersuchung von Plastizitäts-bezogenen Prozessen in den Dornen der kortikalen Neuronen von Säugetieren oft der Vergleich der Kalziumsignale an der Dornenspitze, dem Dornenansatz und des zugehörigen Dendriten während der synaptischen Aktivität notwendig [189, 190]. Die Anwendung des Multizeilenmodus erlaubt für diese Vergleiche und auch für die Vergleiche von benachbarten Dornen direktere Rückschlüsse aus den Daten, als es bei der Verwendung des Einzelstrahl-TPLSM-Modus möglich wäre.

Kapitel 5

Diskussion und Ausblick

Im Rahmen dieser Arbeit konnten die vielfältigen Anwendungsmöglichkeiten der Zwei-Photonen-Laser-Raster-Mikroskopie in den Bereichen der Physik, Biologie und Chemie gezeigt werden. Hierzu wurde ein weiterentwickelter Aufbau mit verbesserten Detektionseigenschaften in Bezug auf Aufnahme­geschwindigkeit und Empfindlichkeit erfolgreich eingesetzt.

Bestimmung der maximal erreichbaren Auflösung mit Hilfe von Quantendots

In Kap. 4.1 wurde die erfolgreiche prinzipielle Anwendung von Halbleiter-Nano­kristallen, auch Quantendots genannt, demon­striert. Als erstes Ergebnis ist zu nennen, dass Quantendots sich auch mit einem Zwei-Photonen-Anregungsprozess zur Fluoreszenz anregen lassen und ihr Einsatz in einem TPLSM somit prinzipiell möglich ist.

In den ersten Messungen mit Quantendots konnte auch gezeigt werden, dass der hier realisierte TPLSM-Aufbau so empfindlich ist, dass eine Belichtungszeit von bis zu $t_{BLZ} = 2$ ms ausreicht, um einzelne Quantendots abzubilden.

Bei diesen ersten aufgenommenen Bildserien zeigten die Quantendots auch bei einer Zwei-Photonen-Anregung die für sie typische Eigenschaft des Blinkens, wodurch sie in den Bildserien zu identifizieren waren. In den aufgenommenen Zeitspuren ließen sich die typischen längeren und kürzeren AN- und AUS-Zustände beobachten, die teilweise sogar fast die gesamte Beobachtungszeit andauerten.

In einer ersten Anwendung wurden die Quantendots zur Bestimmung der Detektionseffizienz des hier realisierten TPLSM-Aufbaus benutzt. Der Vorteil der Quantendots gegenüber anderen Fluoreszenzfarbstoffen ist ihre Photostabilität

und Helligkeit. Aus den bekannten photophysikalischen Eigenschaften der verwendeten Geräte und der Quantendots ließ sich die Photonenemissionsrate der Quantendots und die Photonendetektionsrate der EMCCD-Kamera berechnen. Daraus ergab sich eine Detektionseffizienz von $\varepsilon_{\text{TPLSM}} = 2.1 \%$, die typisch für einen Mikroskopaufbau ist. Begründen lässt sich die Detektionseffizienz durch die Transmissionen der optischen Komponenten und die Numerische Apertur des benutzten Objektivs.

In einer zweiten Anwendung wurde mit Hilfe der Quantendots die maximal erreichbare Auflösung des hier realisierten TPLSMs bei Verwendung einer 90-fachen Vergrößerung bestimmt. Die maximale Auflösung entspricht der Punktantwortfunktion (PSF) des TPLSM-Aufbaus, die angibt, wie groß das Bild einer Punktlichtquelle auf dem Detektor ist. Da die Quantendots einen Durchmesser von wenigen Nanometern haben, konnten sie für diese Untersuchungen als Punktlichtquelle angesehen werden.

Im Zusammenhang mit dieser Messung ist auch die Frage beantwortet worden, ob die enge Benachbarung der 64 Foki im Multistrahlbetrieb des TPLSM zu einer Reduzierung der lateralen Auflösung führt. Bei den Messungen wurden Bildserien aufgenommen, die das Rastergebiet mit den Quantendots zum einen im Einzelstrahlbetrieb, zum anderen im Multistrahlbetrieb mit allen 64 Strahlen abbildeten. Zur Auswertung ist ein Autokorrelationsalgorithmus verwendet worden. Die FWHM der berechneten und normierten PSF entspricht der maximal erreichbaren lateralen Auflösung. Die Messungen zeigen, dass im Multistrahlbetrieb die laterale Auflösung $\Delta x_{\text{MS}} = 345 \text{ nm}$ beträgt, während sie im Einzelstrahlbetrieb mit $\Delta x_{\text{ES}} = 235 \text{ nm}$ um etwa 30 % besser ist. Dies bestätigt die Vermutung, dass die enge Benachbarung der Strahlen in der Fokulinie des Multistrahlbetriebes zu einem Überlapp der Fokivolumina führt, wodurch sich die laterale Auflösung verringert.

Flächige Anregung - Bildaufnahme ohne Rastern

Die Zwei-Photonen-Laser-Raster-Mikroskopie hat wie alle Rasterverfahren den Nachteil, dass das zu untersuchende Gebiet in einem zeitaufwendigen Prozess punktweise abgerastert werden muss. Dabei ist es auch unerheblich, ob die Detektion mit einem schnellen Punktdetektor (APD, Photomultiplier, descanned Modus des TPLSM) oder mit einem flächigen, bildgebenden Detektor (CCD-Kamera, non-descanned Modus des TPLSM) erfolgt. Das parallele Arbeiten mit mehreren Laserstrahlen (Parallel Processing) reduziert (eventuell mit einem weiteren Entwicklungsschritt) die Aufnahmezeit um zwei Größenordnungen und ermöglicht

es, neue Zeitskalen von biologischen Prozessen zugänglich zu machen, wobei das grundlegende Problem des Rasterverfahrens bestehen bleibt.

Einen Ausweg bietet die gleichzeitige Anregung der Fluorophore des gesamten Untersuchungsgebietes, also die flächige Anregung des Rastergebietes, wie sie in einem Epifluoreszenzmikroskop realisiert ist. Die Detektion muss verständlicherweise ebenfalls flächig erfolgen, also mit einem bildgebenden Detektor.

Epifluoreszenzmikroskope haben allerdings Nachteile bezogen auf die verwendete Anregungswellenlänge wie ein CLSM. Die Fluoreszenz wird auch außerhalb des Fokus erzeugt und das dabei entstehende Störsignal führt nicht nur zu einer erhöhten Probenschädigung, sondern wird auch (unscharf) mit auf den Detektor abgebildet wie in einem Transmissionsmikroskop – letztendlich wird die Auflösung und die Bildqualität mit den erkennbaren Probendetails reduziert.

Ein TPLSM dagegen bietet die Möglichkeit der Optischen Schnitte. Durch die Anregungswellenlänge des TPLSM, die typischerweise im IR liegt und doppelt so groß ist wie die Anregungswellenlänge eines CLSM, entsteht das Fluoreszenzsignal nur im Fokus und somit erhält ein TPLSM quasi die intrinsische Eigenschaft zu Optischen Schnitten, die allerdings erst durch das Rastern des/der Fokus/Foki zustandekommen.

Bei den Optischen Schnitten entsteht außerdem kein Störsignal in den umgebenden Schichten und der Farbstoff in den umgebenden Schichten bleicht auch nicht aus. So können die einzelnen Schichten der Probe in aufeinander folgenden Messungen mit gleicher Qualität aufgenommen werden. Durch die IR-Anregungswellenlänge des TPLSM wird zudem die Detektion des Fluoreszenzsignals vereinfacht, denn es kann eine größere Auswahl an Filtern zur Trennung von Anregungs- und Fluoreszenzlicht verwendet werden. Beispielsweise müssen die Kanten der Sperrfilter nicht so steil sein wie bei einem CLSM. Ein weiterer Vorteil ist der größere Abstand zwischen Anregungs- und Detektionswellenlänge, der es erlaubt, die Anregungswellenlänge über einen größeren Bereich zu variieren, ohne dass der Dichroit ausgetauscht werden muss.

In Kap. 4.2 ist gezeigt worden, dass der neue technologische Aspekt der flächigen Anregung in einem TPLSM realisiert werden kann, der eine Abbildung ohne Rastern ermöglicht. Dabei erfolgte die Anordnung der 64 Laserstrahlen, die im Strahlteiler erzeugt wurden, in einer 8×8 -Matrix. Die einzelnen Strahlen bildeten durch den großen Abstand zwischen Strahlteiler und Objektiv die nach der geometrischen Optik notwendigen kleinen Winkel zueinander. Dadurch grenzten die einzelnen Foki direkt aneinander, so dass es in der gebildeten Fläche keine unbeleuchteten Bereiche gab. Die von den Foki beleuchtete Fläche A hatte eine Größe von etwa $A = 2.5 \times 2.5 \mu\text{m}^2$.

Intensitätsprofile durch das Fluoreszenzbild der beleuchteten Fläche zeigten ein deutlich erkennbares Plateau, das sich vom Hintergrundsignal absetzt. Die Seitenkanten des Plateaus – erkennbar in den Flanken der Intensitätsprofile – besaßen die gleiche Steilheit wie die Flanken, genauer der radiale Intensitätsverlauf, eines einzelnen Fokus. An den Intensitätsprofilen war allerdings erkennbar, dass die Intensität innerhalb des Plateaus nicht einen konstanten Wert annahm, wie es für eine beleuchtete Fläche wünschenswert wäre. Diese Inhomogenitäten bei der Anregung innerhalb der beleuchteten Fläche lassen sich durch Variationen in der Reflektivität der Spiegel erklären, die im Strahlteiler verwendet wurden. Die Variationen führten durch das Konstruktionsprinzip des Strahlteilers zu Intensitätsschwankungen zwischen den einzelnen Strahlen. Somit lassen sich die Inhomogenitäten der beleuchteten Fläche durch die Verwendung höherwertiger optischer Komponenten und eine noch präzisere Justierung des Strahlverlaufes beseitigen. Danach noch verbleibende Inhomogenitäten lassen sich durch eine Kalibrierungsmessungen erfassen und aus den Messungen herausrechnen.

Eine gleich große Fläche lässt sich auch mit einem einzelnen Fokus beleuchten, allerdings hat ein solcher Fokus eine derart große axiale Ausdehnung (im Bereich von etwa $\Delta z \approx 80 \mu\text{m}$), die für praktische Anwendungen nicht geeignet ist. Mit dem hier realisierten Aufbau zur flächigen Anregung bleibt die axiale Auflösung wie bei einem Einzelfokus eines TPLSM erhalten. Nachgewiesen wurde die axiale Auflösung des Aufbaus zur flächigen Anregung durch die Messung der so genannten „sea response“-Kurve. Hierbei ergab sich, dass die „sea response“-Kurve eines Einzelstrahls mit der theoretisch berechneten Kurve übereinstimmt und eine Auflösung von $\Delta z = 0.86 \mu\text{m}$ erreicht wird. Die Messung der „sea response“-Kurve der gesamten angeregten Fläche ergab eine etwas schlechtere axiale Auflösung von $\Delta z \approx 3 \mu\text{m}$, die sich durch die leicht unterschiedlichen axialen Positionen der einzelnen Foki erklären lässt. Durch eine verbesserte Justierung und bessere optische Komponenten wird sich diese Streuung der axialen Positionen aller Strahlen reduzieren lassen, womit auch die axiale Auflösung der gesamten Fläche als Überlagerung der axialen Streuung aller Einzelstrahlen verbessert werden kann.

Nach dem Nachweis der Realisierbarkeit einer flächigen Anregung wurde die praktische Anwendung an zwei Beispielen demonstriert. Zum einen konnten kleine Latexkügelchen (mit 400 nm Durchmesser), die eng benachbart, aber dennoch separiert waren, abgebildet werden. Zum anderen ließ sich in einer Gruppe von angefärbten Hefezellen ein Optischer Schnitt durch die aneinandergrenzenden Zellen abbilden, der im Fluoreszenzbild die gleiche Struktur zeigt wie das zugehörige Hellfeldbild.

Mit dieser technologischen Verbesserung sind neue Fragestellungen denkbar, die mit bisherigen Techniken nicht zugänglich waren. So könnte bei einer flächigen Anregung die Molekülbewegung auf einer Membranoberfläche beobachtet werden – ein schnellablaufender Vorgang, der aufgrund der Bewegung eine große Beobachtungsfläche benötigt. Theoretisch kann mit jedem Laserpuls ein Bild der gesamten Fläche aufgenommen werden, sofern ein flächiger Detektor angewendet wird, dessen Quanteneffizienz sehr groß ist, um das geringe Signal zu detektieren und der schnell genug ist, da aktuelle Laser mit Repetitionsraten von $v_{\text{Laser}} = 80$ MHz arbeiten. Praktisch ermöglichen eine hohe Empfindlichkeit und eine große Geschwindigkeit eine hohe zeitliche Auflösung, die für deartige Experimente notwendig ist.

Selbstorganisation in der Chemie: Morphosynthese sternförmiger Titandioxid-/Siliziumdioxid-Schalen

Die Anwendungsmöglichkeit der Zwei-Photonen-Mikroskopie in der Grundlagenforschung der Chemie zeigte das Kapitel 4.3 am Beispiel der Biomineralisation. Ausgangspunkt war hierbei die Fragestellung, wie Kieselalgen ihre harte kristallisierte Schale bilden. Für den dynamischen Selbstorganisationsprozess konnte ein Modellsystem realisiert werden, das große Ähnlichkeit mit dem natürlichen System hat und ein grundlegendes Verständnis der komplexen natürlichen Prozesse erlaubt. Damit können dann auch neuartige chemische biomimetische Verfahren entwickelt werden, die sich zur Bildung komplexer hierarchisch strukturierter Materialien nutzen lassen.

Das Modellsystem bestand aus einem Öltropfen (Durchmesser $d = 10$ μm bis $d = 100$ μm), der in eine wässrige Lösung eingebracht wurde. Die in dem Öltropfen enthaltene Metalloxid-Vorstufe wurde in der wässrigen Lösung zersetzt und bildete an der Öl/Wasser-Grenzschicht eine mineralisierte Schale. Für ein sinnvolles Modellsystem ist die Ähnlichkeit zu den biologischen Systemen entscheidend, die in diesem Fall in der Größe der Öltropfen, der Umsetzung der Kieselsäure aus einer Speicherform und der intrinsischen Selbstterminierung des Schalenbildungsprozesses bestand. Dazu kam die Tatsache, dass die Schalenbildung an einer membranartigen Oberfläche stattfand und dass der Selbstorganisationsprozess durch den Zusatz von Additiven dynamisch induziert werden konnte.

Die grundlegende Reaktion fand statt, wenn ein Arachidinsäure enthaltender Chlorcyclohexan-Tropfen in eine stark verdünnte wässrige Lösung von Cetyltrimethylammoniumbromid eingebracht wurde. Über einen Zeitraum von 30 min. konnte eine „spontane Emulgierung“ beobachtet werden, bei der der Öltropfen in

Mikroemulsionströpfchen zerfiel. Das interessante Stadium, in dem sich die sternförmige Morphologie ausbildete, war allerdings nicht stabil, wenn als Metalloxid-Vorstufen Tetramethoxysilan oder Tetraethoxysilan verwendet wurden. Die Verwendung einer Titandioxid- oder Titandioxid-/Siliziumdioxid-Vorstufe führte dagegen zur Bildung einer robusten verkieselten sternförmigen Morphologie. Bei Verwendung von Tetra-*tert*-butylorthotitanat entstanden schließlich sogar robuste mineralisierte Schalen. Die Zeitdauer dieses Schalenbildungsprozesses lag je nach Wahl der experimentellen Bedingungen im Bereich von Minuten bis Stunden. Die im Stadium der sternförmigen Morphologie entstandenen Stacheln blieben auch nach 50 min. noch stabil und hatten eine Länge l_S von bis zu $l_S = 100 \mu\text{m}$ bei einem Durchmesser d_S von $d_S = 1 \mu\text{m}$.

An gefriergetrockneten Proben zeigte sich, dass die Stacheln von den Hohlshalen verschwunden waren. Für die noch vorhandenen mineralisierten Hohlshalen konnte eine Wandstärke d_H von $d_H = 1 \mu\text{m}$ bestimmt werden. Die energiedispersive Röntgenfluoreszenzanalyse zeigte, dass die Hohlshalen und auch die Stacheln Titan und Silizium enthielten.

Die Bildung der sternförmigen Stacheln aus der Hohlshale heraus war zudem stark von der Vorstufenkonzentration abhängig. Eine zu geringe Konzentration von $c = 3 \text{ Gew.-%}$ führte wieder zu der – stark verlangsamten – spontanen Emulgierung. Bei einer zu hohen Konzentration von $c = 5 \text{ Gew.-%}$ dagegen bildeten sich massiv mineralisierte Schalen ohne Stacheln.

Die Vorteile der Anwendung der TPLSM konnten bei weiteren Untersuchungen vollständig genutzt werden, denn als Fluoreszenzverfahren erlaubte sie die Farbstoffmarkierung und damit die Sichtbarmachung des Inneren des untersuchten Öltropfens bzw. seiner Schale und der Stacheln. Die Fähigkeit des TPLSM zu Optischen Schnitten ermöglichte die Aufnahme von Querschnittsbildern durch den Öltropfen. Die jeweiligen Entwicklungszustände des Öltropfens können für andere Mikroskopieverfahren nicht in Schnittpräparaten fixiert werden. Zudem hat die TPLSM den Vorteil, dass es kein Streusignal aus benachbarten Schichten gibt, das die Auflösung der Optischen Schnitte reduziert, was bei einem CLSM die Qualität der Aufnahmen beeinträchtigen kann.

Somit ließ sich mit Hilfe der TPLSM die interessante Frage nach der Zusammensetzung der Stacheln beantworten, wodurch Rückschlüsse auf den Bildungsprozess der Stacheln gezogen werden konnten.

Für die Fluoreszenzmarkierung wurde die Ölphase mit dem Farbstoff Coumarin 153 angefärbt. Die beiden flüssigen Phasen des Modellsystems vermischten sich nicht und da der Farbstoff hydrophob ist, zeigte die Fluoreszenzintensität direkt die Verteilung der Ölphase in der wässrigen Lösung an. Die aufgenommenen

Fluoreszenzbilder zeigten eine gleichmäßige Intensität, was auf eine gleichmäßige Verteilung des Chlorcyclohexan im Tropfen schließen lässt. Somit besteht ein kontinuierlicher Übergang zwischen dem Öltropfen und den Stacheln. Die Stacheln wachsen demnach aus dem Öltropfen heraus und erhalten dabei einen kontinuierlichen Nachschub der Metalloxid-Vorstufe aus dem Öltropfen. Die gleiche Beobachtung konnte auch am Vorstufen-freien Modellsystem gemacht werden.

Die durchgeführten Messungen führen zu der Erkenntnis, dass die Bildung der Stacheln im vorstufenfreien und vorstufenhaltigen System durch ähnliche Selbstorganisationsprozesse, inklusive einer tensidvermittelten Krümmung der Flüssigkeitsgrenzfläche, zustande kommt. Es ist auch auszuschließen, dass komplexe Tensidaggregate an der Bildung der Stacheln beteiligt sind.

Für die Fragestellung nach der Bildung der komplexen Schalen von Kieselalgen ist dieses Modellsystem ein erster Ansatz, der nur einen entfernten Bezug zu den hochspezialisierten biologischen Organismen hat, der aber durch die Erforschung des natürlichen Biomineralisierungsprozesses und der beteiligten zellulären Komponenten noch verbessert werden kann.

Bei den Untersuchungen konnte beobachtet werden, dass die Stacheln abbrachen, sobald sie eine größere Länge erreicht hatten. Ursache hierfür wird die Kraftwirkung der Foki auf die Stacheln sein, die anderenfalls für eine Optische Pinzette genutzt werden kann. Mit einem optimierten Aufbau, der eine höhere Detektionseffizienz besitzt, ließe sich die Laserleistung und somit die Kraftwirkung auf die Stacheln reduzieren, um die beobachtete Probenschädigung zu vermindern.

Lokalisierung struktureller und regulatorischer Komponenten von COP1-umhüllten Vesikeln in lebenden Wurzelzellen

Kap. 4.4 demonstrierte die Anwendung des natürlichen Farbstoffs GFP in lebenden Wurzelzellen. Untersuchungsgegenstand waren in diesem Experiment die Transportphänomene von Vesikeln, die zwischen dem Golgi-Apparat (GA) und dem Endoplasmatischen Retikulum (ER) in Pflanzenzellen ausgetauscht werden.

Für die Untersuchungen wurden die Wurzelzellen derart transformiert, dass die Hüllenproteine (COPs) der Vesikel mit GFP als natürlichem Farbstoff fusioniert wurden. Durch die geringe Probenschädigung der TPLSM konnten die Wurzelzellen über einen langen Zeitraum von typischerweise zwei Minuten problemlos untersucht werden.

Für die Untersuchungen wurden die für den retrograden und anterograden Transport benutzten Vesikelhüllenproteine Mt ζ COP1 und Mt ζ COP2, sowie das

zugehörige regulatorische Protein MtArf1 als GFP-Fusionsproteine in den *Medicago truncatula*-Wurzelzellen expremiert. Mit dem TPLSM sind dann die Bilder und Zeitreihen der GFP-Fluoreszenz aufgenommen worden.

Die Messungen zeigten die gleichartige Lokalisierung der GFP-Fusionsproteine innerhalb der Zellen. Dies spricht auch für die gleichartige Funktionalität der Proteine. Sie sind alle drei am Vesikeltransport zwischen den Golgi-Apparaten und dem ER beteiligt. Die Zeitserienaufnahmen und die Quantifizierungen der Bewegungsmuster zeigten weiterhin, dass es sich bei den beobachteten Strukturen tatsächlich um Golgi-Apparate handelt. Die Quantifizierung offenbarte das irreguläre Strömungsverhalten der Golgi-Apparate in der Zelle. Die gemessene maximale Geschwindigkeit von $v_{\max.} = 2.3 \mu\text{m/s}$ passt zu den Ergebnissen anderer Forschungsgruppen für die maximale Geschwindigkeit [128].

Die Zugabe verschiedener Inhibitoren zeigte, dass die Bewegung der Golgi-Apparate entlang des Actin-Filamentsystems des ER erfolgt. Die Anwendung der Substanzen Nocodazol, Colchicin und Propyzamid, die alle das Microtuboli-System der Zellen zerstören, hatte keinen stoppenden Einfluss auf die Bewegung der Golgi-Apparate [131]. Ebenfalls bekannt ist, dass die Actin-Filamente zerstörende Substanzen Cytochalasin D und Latrunculin A die Bewegung der Golgi-Apparate unterbinden. Mit den Messungen in dem hier durchgeführten Experimenten konnte diese Bewegungshemmung auch für Latrunculin B angewendet auf die *Medicago truncatula*-Zellen bestätigt werden. Die vollständige Unterbrechung der Strömungsaktivität war teilweise reversibel, wenn das Latrunculin B über Nacht ausgewaschen wurde.

Zudem zeigte auch die Anfärbung des ER-Netzwerkes mit dem Farbstoff DiOC₅, dass sich die mit den GFP-Fusionskonstrukten markierten Golgi-Apparate entlang des ER bewegten.

Des Weiteren wurde die Auswirkung des Pilzgiftes Brefeldin A untersucht. Brefeldin A verändert die Morphologie der Golgi-Apparate, indem die Anordnung der Golgi-Stapel zerstört wird. In Säugetierzellen verschmilzt die cis-Zisterne mit dem ER, während sich aus der trans-Zisterne das BFA-Kompartiment bildet. Die BFA-Kompartimente konnten auch in den hier verwendeten Pflanzenzellen als große fluoreszierende Aggregate im Cytosol und in Kernnähe beobachtet werden. Zu den weiteren deutlichen Änderungen in den Fluoreszenzbildern gehörte auch, dass die Gesamtanzahl der fluoreszierenden Strukturen abnahm und die Gesamtströmungsaktivität sehr stark reduziert war.

Die Beobachtung der großen fluoreszierenden BFA-Kompartimente in den hier durchgeführten Messungen legt die Vermutung nahe, dass die GFP-Fusionskonstrukte die trans-Zisterne der Golgi-Stapel adressieren. Untersuchungen ande-

rer Gruppen zeigen dagegen die Adressierung der cis-Zisterne [149], allerdings sind dabei auch andere Pflanzenarten untersucht worden. Zur Klärung dieser widersprüchlichen Aussage sind deshalb weitere Untersuchungen notwendig.

Neurobiologie: Optische Kalzium-Messung in Nervenzellen

Kapitel 4.5 demonstrierte als weitere Anwendung der Zwei-Photonen-Laser-Raster-Mikroskopie in der Biologie die neurophysiologischen Untersuchungen an Nervenzellen in einem lebenden Fliegenhirn, wobei die Nervenzellen des visuellen Systems auf äußere optische Reize reagieren.

Ziel der Versuche war es, Unterschiede in der Kalzium-Dynamik in verschiedenen Bereichen des Axons und dessen dünnen Verzweigungen zu detektieren. Die hochauflösende Untersuchung der Kalziumdynamik ist deshalb von Bedeutung, da durch sie ein besseres Verständnis der Neurotransmitterausschüttung in den Synapsen erzielt werden kann.

Die Arbeiten unterteilten sich in zwei Abschnitte, von denen der erste die prinzipielle Anwendbarkeit der TPLSM in der Neurobiologie demonstriert, während der zweite eine technologische Weiterentwicklung des ersten Aufbaus vorstellt, mit der die Messmöglichkeiten des ersten Aufbaus markant erweitert werden konnten.

Der Aufbau des zweiten Experimentes war optimiert auf eine hohe Empfindlichkeit, indem die EMCCD-Kamera als Detektor mit einer aktuell höchsten Quanteneffizienz von $\gamma > 90\%$ verwendet wurde. Wegen der möglichen Probenschädigung und des deshalb begrenzten Fluoreszenzsignals war es nur so möglich, die zeitliche Auflösung zu erhöhen.

Zusammengefasst zeigen die beiden in Kapitel 4.5 beschriebenen Experimente, dass die Anwendung der Zwei-Photonen-Laser-Raster-Mikroskopie in der Neurobiologie für *in vivo*-Untersuchungen möglich ist und zudem wichtige Vorteile gegenüber den bisherigen Messmethoden bietet.

In den hier durchgeführten Experimenten konnte eine Laserleistung von bis zu $P_{\text{Probe}} = 10\text{ mW}$ pro Strahl verwendet werden, um ein möglichst hohes Signal zu erhalten und dennoch keine Probenschädigung zu erzeugen. Die untersuchten Nervenzellen blieben vital und zeigten die aus anderen Experimenten bekannten Reaktionen bei visueller Stimulation. Das beobachtete Ausbleichen des Farbstoffes konnte durch eine Referenzmessung korrigiert werden. Dennoch empfiehlt sich die Optimierung des Aufbaus bezüglich der Detektionseffizienz und die Verwendung stabilerer Farbstoffe, um die Laserleistung und somit auch das Ausbleichen weiter reduzieren zu können.

In Bezug auf die Untersuchung der Kalziumdynamik konnte das Mikroskop des ersten Aufbaus im konventionellen Epifluoreszenzmodus Daten aufnehmen, die als Referenz dienten für den Vergleich mit den Daten, die im TPLSM-Modus aufgenommen wurden. Die Messung im TPLSM-Modus zeigte ein schnelles Abklingen des Kalziumsignals in den dünnen Axon-Verzweigungen und ein langsames Abklingen im dickeren Axon-Strang. In den Messungen mit dem zweiten Aufbau konnte diese Kalziumdynamik wieder beobachtet werden – der Schwerpunkt lag aber in der technologischen Umsetzung des Multizeilen-Modus, um den bisherigen TPLSM-Aufbau zu erweitern. Dabei wurde eine neuartige, sehr empfindliche und schnelle CCD-Kamera als Detektor verwendet. Für die Realisierung des Multizeilen-Modus ist das Prinzip der Erzeugung multipler Strahlen von T. NIELSEN *et al.* [16] angewendet worden.

Die Auflösung definiert sich durch die Fokusgröße bei der Anregung. Da bei Verwendung von IR-Strahlung sich der Fokus durch Streuung weniger vergrößert als bei Verwendung von VIS-/UV-Strahlung, ist die Anregungsauflösung tiefer im Gewebe bei TPLSMs besser als bei CLSMs/Epifluoreszenzmikroskopen. Zudem findet die Anregung eines Fluorophors nur im Fokus statt - im TPLSM-Modus kann also das Fluoreszenzlicht eindeutig der jeweiligen Rasterposition zugeordnet werden. Im Epifluoreszenzmodus dagegen kommt es zu einem Übersprechen des Fluoreszenzsignals auf dem Detektor. Benachbarte Zellstrukturen, deren Bild im Epifluoreszenzmodus durch die Streuung verschmiert wird, lassen sich im TPLSM-Modus deutlich voneinander trennen. Für die Neurobiologie mit ihren Untersuchungen am visuellen System eines Präparates bietet die IR-Strahlung den weiteren wichtigen Vorteil, dass eine ungewollte Stimulation des visuellen Systems verhindert wird.

Die beiden Aufbauten in den Experimenten erlaubten jeweils mehrere Betriebsmodi, die sich in Bezug auf die räumliche und zeitliche Auflösung zum Teil deutlich unterscheiden.

Mit beiden Aufbauten war ein Bildrastermodus anwendbar. Dabei rasterten die Foki das Untersuchungsgebiet sowohl in x- als auch in y-Richtung ab und lieferten ein vollständiges Bild des Untersuchungsgebietes. Beide Aufbauten realisierten zudem den TPLSM-Modus als Punktrasterverfahren, bei dem nur eine einzelne Rasterlinie untersucht wurde. Der erste Aufbau verwendete hierbei eine APD als Detektor, während der zweite Aufbau die EMCCD-Kamera benutzte. Im zweiten Aufbau diente der TPLSM-Modus allerdings nur Vergleichszwecken. Als dritter Modus stand in beiden Aufbauten auch der Epifluoreszenzmodus zur Verfügung. Dieser Modus diente im zweiten Aufbau nur als Hilfe bei der Probenpräparation, so dass es ausreichte, das Licht der Hg-Lampe über eine Glasfaser zur Probe zu

bringen. Der zweite Aufbau realisierte schließlich noch den Multizeilen-Modus mit deutlich separierten Rasterzeilen.

Das Umschalten zwischen den verschiedenen Modi konnte in beiden Aufbauten auf einfache Weise lediglich durch Änderung der Datenaufnahmetechnik erfolgen, ohne dabei das Präparat oder seine Position ändern zu müssen. Dadurch lassen sich jeweils die speziellen Vor- und Nachteile der einzelnen Modi ausnutzen.

Im Epifluoreszenzmodus und im Bildrastermodus werden die Bildpunkte der einzelnen Rasterpositionen auf dem Detektor während der Belichtungszeit gesammelt und können sich, eventuell durch die Streuung im Gewebe vergrößert, auch überlagern. Die von der CCD-Kamera kommenden Bilder haben somit eine räumliche Auflösung, die durch die Vergrößerung des Objektivs und die Pixelgröße des CCD-Chips gegeben ist – wenn man den Einfluss der Streuung im Gewebe auf die Auflösung vernachlässigt, die ansonsten die räumliche Auflösung weiter einschränkt. Für den ersten Aufbau betrug die Auflösung $\Delta x = 1.3 \mu\text{m}/\text{Pixel}$. In beiden Modi definiert die Bildrate die zeitliche Auflösung. Mit dem ersten Aufbau wurde eine Bildrate von $v_{\text{Serie}} = 14 \text{ Hz}$ erreicht, die im zweiten Aufbau auf $v_{\text{Serie}} = 20 \text{ Hz}$ gesteigert werden konnte.

Der Vorteil des Epifluoreszenzmodus liegt in der Bildgebung. Er liefert Bilder der räumlichen Verteilung der Kalziumkonzentration im gesamten Rastergebiet (non-descanned Modus, vgl. Kap. 2.3.1). Der Nachteil ist allerdings, dass im Vergleich mit den anderen Modi die räumliche und zeitliche Auflösung des Bildrastermodus in beiden Aufbauten am schlechtesten ist.

Im TPLSM-Modus werden dagegen keine Bilder aufgenommen, sondern nur Intensitätsprofile entlang der Rasterlinie. Die Datenaufnahme erfolgt dafür aber im ersten Aufbau (TPLSM-Modus mit APD, vgl. Kap. 4.5.1) sehr schnell mit einer Bildrate von typischerweise $v_{\text{Serie}} = 200 \text{ Hz}$. Die Bildrate kann aber auch bis zu $v_{\text{Serie}} = 400 \text{ Hz}$ erreichen und erlaubt auf diese Art neue Rückschlüsse über den genauen zeitlichen Verlauf der Änderungen der Ca^{2+} -Konzentration. Im zweiten Aufbau konnte ebenfalls ein TPLSM-Modus realisiert werden (TPLSM-Modus mit EMCCD), der aber nur die Einzelstrahl-Variante des eigentlichen Multizeilen-Modus mit deutlich separierten Rasterzeilen darstellt. Zudem wurde quasi zu jeder Rasterposition ein Kamerabild ausgelesen, um den TPLSM-Modus mit APD zu imitieren. Dieser TPLSM-Modus mit EMCCD des zweiten Aufbaus wurde allerdings nur für vergleichende Zwecke der Auflösungsbestimmung angewendet. Die EMCCD-Kamera als Detektor erzielte eine zeitliche Auflösung von knapp $v_{\text{Serie}} = 100 \text{ Hz}$. Diese Bildrate könnte noch erhöht werden, da die Konfiguration des Aufbaus nicht optimiert war. Die räumliche Auflösung erreicht in Oberflächennähe Werte von $\Delta x = 0.4 \mu\text{m}$ lateral und etwa $\Delta z = 1.0 \mu\text{m}$ axial, und ist

somit equivalent zur Auflösung kommerzieller CLSMs. Diese räumliche Auflösung wird vom TPLSM-Modus mit EMCCD allerdings nur erreicht, wenn von der Kamera zu jeder Rasterposition ein Bild ausgelesen wird. Es ist aber auch möglich, die gesamte Rasterzeile auf die Kamera abzubilden (Multizeilen-Modus mit Einzelstrahl). In diesem Fall reduziert sich die räumliche Auflösung parallel zur Rasterlinie auf die Pixelauflösung der Kamera, denn die Abbildung der gesamten Rasterlinie kann wie ein eindimensionaler Bildrastermodus verstanden werden. Die vergleichende Auflösungsbestimmung mit diesen beiden Varianten des TPLSM-Modus im zweiten Aufbau zeigte, dass der TPLSM-Modus mit EMCCD eine bessere Auflösung besitzt als der Multizeilen-Modus mit Einzelstrahl. Die tatsächliche Auflösung konnte nicht bestimmt werden, da im Nervengewebe keine Objekte vorhanden waren, die als Punktlichtquellen dienen konnten und deren PSF hätte vermessen werden können. Für die vergleichenden Messungen wurden deshalb kleine Strukturen der Nervenzellen in beiden Modi abgebildet. Der Durchmesser eines einzelner Neuriten war im TPLSM-Modus mit EMCCD geringer als im Multizeilen-Modus mit Einzelstrahl. Die aufgrund der Streuung im Gewebe im Vergleich zur PSF vergrößerten Bildpunkte der einzelnen Rasterpositionen überlagern sich auf dem CCD-Chip zum verbreiterten Bild des Neuriten. Im TPLSM-Modus mit EMCCD wirkt sich die Vergrößerung der Bildpunkte dagegen nicht aus, so dass trotz der Streuung aus dem Signal der Rasterpositionen das Bild der Rasterlinie berechnet werden kann und einen kleineren Neuriten-Durchmesser zeigt. Der TPLSM-Modus mit EMCCD hat somit eine bessere Auflösung. Dies wird ebenfalls bei der Abbildung einer Neuriten-Verzweigung deutlich. Der kleine Spalt zwischen den Zweigen des Neuriten ist im Multizeilen-Modus mit Einzelstrahl weniger deutlich erkennbar, da er von den durch die Streuung vergrößerten Bildpunkten der Ränder der Neuritenzweige überdeckt wird. Der Spalt ist im TPLSM-Modus mit EMCCD dagegen deutlicher abgebildet. Dies spricht wiederum für die bessere Auflösung des TPLSM-Modus mit EMCCD, da mehr Details aus der Probe erkennbar sind.

Der TPLSM-Modus hat in beiden Aufbauten als Punktrasterverfahren den Nachteil einer sehr eingeschränkten Ortsinformation, da nur ein eindimensionales Fluoreszenzintensitätsprofil entlang der Rasterzeile und kein zweidimensionales Bild wie im Bildrastermodus aufgenommen wird. Der Vorteil des TPLSM-Modus liegt aber bei Verwendung der APD als Detektor in der optimalen Ausnutzung der räumlichen und zeitlichen Auflösung. Bei Verwendung der EMCCD-Kamera im TPLSM-Modus reduziert sich allerdings die zeitliche Auflösung.

Die Verwendung der EMCCD-Kamera bietet aber als Ausblick die Möglichkeit der Erweiterung des bisherigen einzeiligen TPLSM-Modus zum Multizeilen-

TPLSM-Modus, da es die Kamera als flächiger Detektor erlaubt, weitere Rasterpunkte simultan zu detektieren. Diese Rasterpunkte/-zeilen sollten aber deutlich separiert sein, um den Vorteil der hohen räumlichen Auflösung ausnutzen zu können. Der Nachteil der geringen zeitlichen Auflösung des TPLSM-Modus mit EMCCD bleibt allerdings bestehen. Dies ist aber nicht überzubewerten, da der TPLSM-Modus mit EMCCD und der Multizeilen-TPLSM-Modus nur für Vergleichszwecke gedacht sind. Für einen effektiven Multizeilen-TPLSM-Modus wird sinnvollerweise eine Anordnung mehrerer APDs verwendet.

Die Wahl des Modus hängt in beiden Aufbauten davon ab, auf welche Information der Schwerpunkt gelegt wird: der Epifluoreszenz- bzw. Bildrastermodus erlaubt die räumliche Darstellung der Ca^{2+} -Konzentration, der TPLSM-Modus dient der Darstellung des zeitlichen Verlaufes der Ca^{2+} -Konzentration.

Der im zweiten Aufbau entwickelte Multizeilen-Modus mit separierten Rasterzeilen schließt die Lücke zwischen dem Bildrastermodus und dem TPLSM-Modus. Als Detektor fungierte wiederum die EMCCD-Kamera, die eine Bildrate von bis zu $v_{\text{Serie}} = 100$ Hz erreichen kann. Die räumliche Auflösung des Multizeilen-Modus entspricht parallel zu den Rasterlinien der Auflösung des Bildrastermodus, senkrecht zu den Rasterlinien ist die Auflösung vergleichbar mit der Auflösung des TPLSM-Modus. Zwar liefert der Multizeilen-Modus mit separierten Rasterzeilen keine vollständigen zweidimensionalen Bilder, aber die separierten Rasterzeilen erlauben eine simultane Untersuchung auch weiter voneinander entfernter Strukturen des Präparates. Mit dem bisherigen TPLSM-Modus war dies nicht möglich. Zudem geben die Bilder des Multizeilen-Modus bei Verwendung vieler weniger separierter Strahlen einen groben Eindruck der zweidimensionalen Struktur wieder.

Die Vor- und Nachteile des Multizeilen-Modus sind eine Kombination der Vor- und Nachteile des Bildrastermodus und des TPLSM-Modus. Die räumliche und zeitliche Auflösung liegt jeweils zwischen den Werten der beiden anderen Modi. Als Vorteil ist aber aus Sicht der Neurobiologie zu bewerten, dass auch weiter voneinander entfernte Bereiche des Neurons in einer einzigen Messung mit relativ hoher zeitlicher Auflösung untersucht werden können, so dass die immer auftretenden Schwankungen der neuronalen Antwort bei ansonsten sukzessiven Messungen der interessierenden Bereiche sich nicht mehr auswirken.

Der Multizeilen-Modus mit separierten Rasterzeilen kann zu einem bildgebenden Multizeilen-Modus erweitert werden, wenn bei Verwendung aller 64 Strahlen die Rasterzeilen direkt aneinander angrenzen. Der bildgebende Multizeilen-Modus ist dann vergleichbar mit dem Bildrastermodus. Die Bildhöhe ist in diesem Fall durch die Länge der Linie der 64 Foki auf $l_{\text{Foki}} = 30 \mu\text{m}$ beschränkt. Dafür

kann die Bildrate auf etwa $v_{\text{Serie}} = 100$ Hz erhöht werden. Die räumliche Auflösung wird allerdings so gering sein wie im Bildrastermodus, da die Foki beginnen, sich gegenseitig zu beeinflussen.

Die Erweiterung des ersten Aufbaus auf den Multizeilen-Modus stellt den größten Vorteil des zweiten Aufbaus dar, denn der Multizeilen-Modus erlaubt die gleichzeitige Untersuchung weiter auseinanderliegender Strukturen einer Nervenzelle für vergleichende Studien. Derartige Untersuchungen sind mit dem Einzelstrahl-TPLSM-Modus oder dem Epifluoreszenzmodus aufgrund der genannten Nachteile nicht möglich.

Zusammengefasst haben diese Experimente gezeigt, dass die TPLSM prinzipiell in der Neurobiologie anwendbar ist und Vorteile gegenüber den bisherigen Fluoreszenzverfahren bietet in Bezug auf die räumliche und zeitliche Auflösung, sowie in Bezug auf die Probenbeeinflussung durch eine unerwünschte visuelle Stimulation. Die Ergebnisse der bisherigen Verfahren zur Kalziumdynamik konnten mit der TPLSM bestätigt und verbessert werden. Der erstmal realisierte Multizeilen-Modus mit seinen Varianten (Multizeilen-Modus mit separierten Rasterzeilen, bildgebender Multizeilen-Modus, Multizeilen-TPLSM-Modus) schließt die Lücke zwischen dem langsamen, nicht hochauflösenden Bildrastermodus und dem hochauflösenden, aber nicht bildgebenden TPLSM-Modus, wobei der Multizeilen-Modus mit seiner erreichbaren Auflösung zwischen den Auflösungswerten der beiden anderen Modi liegt, dafür aber die Vorteile des auf eine Rasterzeile beschränkten TPLSM-Modus auf ein großes Untersuchungsgebiet ausdehnt.

Die Anwendungsvielfalt der TPLSM ist im Rahmen dieser Arbeit an einigen exemplarischen Experimenten aus den Bereichen der Physik, Biologie und Chemie erfolgreich demonstriert worden. Dennoch lassen sich mit wenigen Ergänzungen des aktuellen Aufbaus noch viele weitere Fragestellungen untersuchen.

Der z-Piezo diente bisher zur exakten Einstellung der Beobachtungsebene in der Probe. Wird die Ansteuerung des z-Piezo in die Messroutine integriert, so können Bilder aus verschiedenen Tiefen der Probe in schneller Folge aufgenommen werden. Diese Bilder können anschließend mit einer entsprechenden Software in eine dreidimensionale Volumendarstellung umgerechnet werden. Die Kombination dieser 3D-Aufnahmen mit einer Zeitreihenmessung erlaubt die Untersuchung und Darstellung der Dynamik von Prozessen, die im vollständigen Zellvolumen ablaufen. Die dreidimensionale Darstellung ermöglicht somit eine exaktere Lokalisierung der ablaufenden Prozesse. Wird eine Mehrfachfärbung der Probe verwendet, so lassen sich auch assoziierte Prozesse, die z. B. in weiter entfernten

Zellbereichen ablaufen könnten, simultan mit untersuchen. In Kap. 4.4 war diese Darstellung der Dynamik noch auf eine Einfachfärbung und eine einzelne Ebene beschränkt.

Die Mehrfachfärbung der Probe erfordert die Trennung der verschiedenen Emissionswellenlängen. Hierzu bietet sich ein motorisiertes Filterrad an, dessen Ansteuerung ebenfalls in die Messroutinen integriert wird, um wiederum eine schnelle Bildaufnahme zu ermöglichen. Zur Unterscheidung der Fluoreszenzfarbstoffe ist auch ein geteilter Detektionsstrahlengang („double view“-Aufbau) denkbar, der – versehen mit verschiedenen Filtern für die Farbstoffe – das Fluoreszenzlicht auf getrennte Bereiche des CCD-Chips lenkt. Dies erlaubt eine schnellere Messung im Vergleich zum Filterrad, erfordert aber eine aufwendigere Konstruktion des Detektionsstrahlenganges. Neben der gleichzeitigen Detektion und Lokalisierung verschiedener Zellkomponenten kann die Mehrfachfärbung zusammen mit einer Zeitreihenmessung auch zur Untersuchung der Dynamik von selektiven Protein-Protein-Wechselwirkungen in lebenden Zellen angewendet werden, indem der Energietransfer zwischen zwei Farbstoffen (z. B. CFP und YFP) ausgenutzt wird, mit denen die interessierenden Proteine angefärbt/fusioniert wurden. Auch diese Untersuchung kann mit einer dreidimensionalen Aufnahme kombiniert werden.

Eine weitere wichtige Information über die Probe ist in der Fluoreszenzlebensdauer enthalten. Wird ein schneller Bildverstärker (z. B. der Kentech HRI (High Rate Imager)) vor die EMCCD-Kamera in den Detektionsstrahlengang eingebaut, so lassen sich Fluoreszenzlebensdauern auf einfache Weise messen. Der Kentech HRI erlaubt es, ein Zeitfenster mit einer Breite von 200 ps bis 1000 ps zu definierten Zeitpunkten nach dem Anregungslaserpuls zu öffnen und den zu diesem Zeitpunkt gehörenden Anteil des Fluoreszenzlichtes zu registrieren. Das Zeitfenster wird dabei synchron zu jedem Laserpuls, d. h. mit $\nu_{\text{Laser}} = 80 \text{ MHz}$, geöffnet.

Alle genannten erweiterten Messmöglichkeiten erfordern die Aufnahme von mehr Bildern im Vergleich zu den bisherigen Messmöglichkeiten. Dadurch reduziert sich die zeitliche Auflösung, mit denen die erweiterten Messmöglichkeiten arbeiten können. Aus diesem Grund ist die Verbesserung der Detektionseffizienz ein wichtiger Aspekt, damit die interessierende Dynamik der in der Zelle ablaufenden Prozesse auch mit ausreichender zeitlicher Auflösung verfolgt werden kann.

Kapitel 6

Zusammenfassung

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit konnte ein schnelles und hochsensitives multifokales Zwei-Photonen-Laser-Raster-Mikroskop realisiert werden, dessen vielfältige Anwendungsmöglichkeiten in einigen exemplarischen Experimenten aus den Bereichen der Physik, Biologie und Chemie demonstriert werden konnten.

Der Aufbau besteht aus einem Titan-Saphir-Femtosekundenlaser mit durchstimmbarer Anregungswellenlänge, dem TriM-Scope als kombiniertes Gerät mit den notwendigen Komponenten zur Strahlaufbereitung, dem Strahlteiler zur Strahlvervielfachung und der Spiegelrastereinheit, die mit typischen Zeilenfrequenzen von 1 kHz arbeitet. Die erzeugten 64 Strahlen werden im Mikroskop vom Objektiv in die Probe fokussiert und erzeugen das Fluoreszenzsignal. Dieses wird vom Objektiv aufgenommen und auf eine neue moderne CCD-Kamera mit integriertem Elektronenvervielfacher abgebildet. Diese EMCCD-Kamera erlaubt eine schnelle Bildaufnahme von etwa 100 Hz bei einer Quanteneffizienz von mehr als 90 %. Mit diesen modernen Geräten eröffnen sich neue Untersuchungsgebiete in der Biologie, Chemie und Physik.

Halbleiter-Nanokristalle (Quantendots) gewinnen aufgrund ihrer besonderen Fluoreszenzeigenschaften zunehmend Bedeutung als Fluoreszenzmarker für die zu untersuchenden Präparate. Deshalb sind die Quantendots in einem ersten Experiment zur Bestimmung der Detektionseffizienz und der Auflösung des hier realisierten TPLSM angewendet worden. Als erstes Ergebnis ist zu nennen, dass sich die Quantendots auch in einem Zwei-Photonen-Anregungsprozess zur Fluoreszenz anregen lassen. Ihr hoher Zwei-Photonen-Absorptionsquerschnitt erlaubte zusammen mit der hohen Empfindlichkeit der EMCCD-Kamera Belichtungszeiten von bis zu $t_{BLZ} = 2$ ms, um einzelne Quantendots abzubilden. Die Detektionseffizienz bestimmte sich zu einem typischen Wert von $\epsilon_{TPLSM} = 2.1$ %.

Die Quantendots konnten aufgrund ihrer geringen Größe für die Auflösungsbestimmung als Punktlichtquellen angesehen werden. Dabei stellte sich die Frage, ob sich die 64 in einer Linie angeordneten Foki gegenseitig beeinflussen und so die Auflösung reduzieren. Die Auswertung von Bildern, die im Multistrahlbetrieb aufgenommen wurden, ergab eine laterale Auflösung von $\Delta x = 345$ nm, während sich für den Einzelstrahlbetrieb eine laterale Auflösung von $\Delta x = 235$ nm ergab. Die enge Benachbarung der Foki bewirkt demnach eine Verschlechterung der Auflösung, die aber dennoch im Bereich der typischen, oft zitierten, Werte von $\Delta x = 300$ nm liegt.

Alle Rasterverfahren besitzen den Nachteil, dass sie das Untersuchungsgebiet in einem zeitaufwendigen Prozess punktweise abrastern müssen. Die Strahlervielfachung auf 64 Strahlen bietet hier einen Ausweg für kleine Untersuchungsgebiete von etwa $4 \mu\text{m} \times 4 \mu\text{m}$, denn in einem zweiten Experiment konnte gezeigt werden, dass die 8×8 -Matrixanordnung bei lückenlosem Aneinandergrenzen der Strahlen eine flächige Anregung ermöglicht. Der Vorteil dieser Matrixanordnung der Strahlen ist, dass bei optimaler Justierung die axiale Auflösung der TPLSM erhalten bleibt. Diese flächige Anregung mit der axialen Ausdehnung eines Einzelfokus repräsentiert die Fähigkeit eines TPLSM zu Optischen Schnitten, die ein Einzelstrahl-TPLSM erst durch Rastern des Strahles erreicht. Die praktische Anwendung dieser flächigen Anregung wurde demonstriert durch die Abbildung kleiner Latexkügelchen (400 nm Durchmesser), die eng benachbart, aber dennoch separiert waren. In einer zweiten praktischen Anwendung konnten auch aneinanderhängende, fluoreszenzmarkierte Hefezellen mit der flächigen Anregung abgebildet werden, wobei die Strukturen des Fluoreszenzbildes denen des Hellfeldbildes entsprachen.

Die berührungslosen und nicht-destruktiven Eigenschaften der TPLSM konnten in einem Experiment zur Biomineralisation, wie sie bei der Schalenbildung verkieselnder Organismen stattfindet, erfolgreich eingesetzt werden. In diesem Experiment wurde ein Modellsystem entwickelt, bei dem ein Öltropfen mit einer Metalloxid-Vorstufe in eine wässrige Lösung eingebracht wurde. An der membranartigen Grenzschicht der beiden Flüssigkeiten findet die grundlegende Reaktion statt, bei der sich eine robuste mineralisierte Schale bildet. Aus der Schale wachsen zudem Stacheln mit einer Länge von $100 \mu\text{m}$ und einem Durchmesser von $1 \mu\text{m}$ heraus. Die Vorstufenkonzentration in beiden flüssigen Phasen ist bei der Bildung der Stacheln von entscheidender Bedeutung und sollte optimal bei 4 Gew.-% liegen. Die in diesem Experiment untersuchten flüssigen Phasen können nicht für andere Mikroskopieverfahren zu stabilen Präparaten fixiert werden. Deshalb bietet sich die TPLSM als optisches Verfahren zur Untersuchung der Fra-

gestellung an, wie die Stacheln aufgebaut und zusammengesetzt sind. Die Fluoreszenzmarkierung der Ölphase mit dem hydrophoben Farbstoff Coumarin 153 zeigte in den aufgenommenen TPLSM-Bildern, dass die Stacheln aus dem Öltropfen herauswachsen und einen kontinuierlichen Nachschub der Metalloxid-Vorstufe aus dem Öltropfen erhalten. Die durchgeführten Messungen führen zu dem Ergebnis, dass die Bildung der Stacheln durch Selbstorganisationsprozesse zustande kommt.

Als eine Anwendung in der Biologie wurde die TPLSM zur Lokalisierung von GFP-markierten Strukturen in lebenden Wurzelzellen eingesetzt. In diesem Experiment sollten die Transportphänomene von Vesikeln, die zwischen dem Golgi-Apparat (GA) und dem Endoplasmatischen Retikulum (ER) ausgetauscht werden, untersucht werden. Dazu wurden die Hüllenproteine (COPs) der Vesikel mit GFP fusioniert. Die geringe Probenschädigung des realisierten TPLSM-Aufbaus erlaubte eine Langzeitbeobachtung der Dynamik der fluoreszierenden Strukturen in der Zelle über einen Zeitraum von typischerweise zwei Minuten. Die beiden markierten Hüllenproteine und das zugehörige markierte regulatorische Protein zeigten alle eine gleichartige Lokalisierung an den Golgi-Apparaten. Dies spricht für ihre gleichartige Funktionalität und Beteiligung am Vesikeltransport. Die beobachteten Strukturen zeigten ein irreguläres Strömungsverhalten, wobei eine maximale Geschwindigkeit von $2.3 \mu\text{m/s}$ gemessen werden konnte. Die Zugabe verschiedener Inhibitoren offenbarte, dass die Bewegung der Golgi-Apparate entlang des Actin-Filamentsystems des ER erfolgt. Und auch die zusätzliche Anfärbung des ER-Netzwerkes zeigte, dass die Bewegung der mit den GFP-Fusionskonstrukten markierten Golgi-Apparate entlang des ER erfolgt. Eine zu den Ergebnissen anderer Forschungsgruppen widersprüchliche Beobachtung ergab sich bei der Anwendung des Pilzgiftes Brefeldin A (BFA). BFA zerstört die Morphologie der Golgi-Apparate, und es bilden sich die sogenannten BFA-Kompartimente, bestehend aus der trans-Zisterne des GA und dem BFA. Die Beobachtung der fluoreszierenden BFA-Kompartimente legt die Vermutung nahe, dass die GFP-fusionierten Hüllenproteine die trans-Zisterne adressieren, während von anderen Forschungsgruppen die Adressierung der cis-Zisterne beobachtet wurde.

In einer zweiten biologischen Anwendung konnten die Vorteile der multifokalen TPLSM erfolgreich in der Neurobiologie eingesetzt werden. Ziel dieses Experimentes war die optische *in vivo*-Messung der Kalziumdynamik in Nervenzellen des visuellen Systems einer Fliege, wenn diese durch optische Reize stimuliert wird. Da in neurophysiologischen Experimenten eine hohe Zeitauflösung erforderlich ist, werden häufig Zeilenrasterungen einer interessierenden Stelle der Nervenzelle durchgeführt.

In einem ersten Aufbau mit einer APD als Detektor zeigte die TPLSM die gleichen Ergebnisse zur Kalziumdynamik, wie sie schon von epifluoreszenzmikroskopischen Untersuchungen her bekannt sind. Die TPLSM konnte diese Ergebnisse aber in Hinblick auf die räumliche und zeitliche Auflösung verbessern, so dass Unterschiede der Kalziumdynamik zwischen dem axonalen Hauptstrang und dessen dünnen Verzweigungen deutlich erkennbar wurden: in den dünnen Verzweigungen klingt die Kalziumkonzentration schneller ab als in den dickeren Bereichen des Axons. Die zeitliche Auflösung dieses ersten Aufbaus betrug typischerweise 200 Hz bis maximal 400 Hz. Die räumliche Auflösung lag bei 0.4 μm lateral und 1.0 μm axial und war somit equivalent zur Auflösung kommerzieller CLSMs. Die Anwendung der TPLSM führte zu keiner Strahlenschädigung der Probe. Der Nachteil dieses ersten TPLSM-Aufbaus mit einer APD ist allerdings die in den Zeilenrasterungen fehlende Ortsinformation. Zwar können mit diesem TPLSM-Modus auch zweidimensionale Bilder aufgenommen werden, aber dies bedeutet den Verlust der zeitlichen Auflösung. Für eine exaktere Untersuchung der Vorgänge in einer Nervenzelle ist aber der Vergleich der Kalziumdynamik in verschiedenen Bereichen der Zelle von Bedeutung und dies erfordert eine Ausdehnung des Untersuchungsgebietes.

In einem zweiten Aufbau wurde deshalb der bisherige einzeilige TPLSM-Modus zum Multizeilen-Modus mit separierten Rasterzeilen erweitert. Die Rasterzeilen mit einem Abstand von etwa 7 μm erlaubten die gleichzeitige Untersuchung von Zellbereichen, die von einer einzelnen Rasterzeile nicht abgedeckt werden können. Die separierten Rasterzeilen ermöglichten zudem einen groben räumlichen Eindruck des Untersuchungsgebietes, auch wenn der Multizeilen-Modus noch kein bildgebendes Verfahren ist. Der Multizeilen-Modus mit der EMCCD-Kamera als Detektor erreichte eine zeitliche Auflösung von 100 Hz, die allerdings noch nicht optimiert war. Die räumliche Auflösung lag parallel zu den Rasterlinien aufgrund der kontinuierlichen Bewegung der Strahlen bei der Pixelauflösung von etwa 1.3 μm /Pixel (bei Verwendung des 40-fach Objektivs). Senkrecht zu den Rasterlinien blieb die hohe Auflösung des TPLSM-Modus erhalten, sofern die Rasterzeilen deutlich voneinander separiert waren und die Fluoreszenzsignale sich nicht gegenseitig beeinflussten. Der im zweiten TPLSM-Aufbau realisierte Multizeilen-Modus verwendete acht separierte Rasterzeilen, um die räumliche Auflösung nicht zu sehr einzuschränken. Es ist aber auch die Erweiterung zu einem bildgebenden Multizeilen-Modus mit allen 64 eng benachbarten Strahlen denkbar. In diesem Fall zeigen die Aufnahmen ein vollständiges Bild des Untersuchungsgebietes mit einer räumlichen Auflösung entsprechend der Pixelauflösung und einer dem Multizeilen-Modus entsprechenden zeitlichen Auflösung.

Mit beiden TPLSM-Aufbauten konnte auch ein Bildrastermodus realisiert werden, der ein vollständiges Bild des Untersuchungsgebietes mit einer räumlichen Auflösung entsprechend der Pixelauflösung der Kamera und einer zeitlichen Auflösung von maximal 20 Hz lieferte. Der im zweiten Aufbau entwickelte Multizeilen-Modus schließt die Lücke zwischen dem Bildrastermodus und dem zeilenrasternden TPLSM-Modus. Dementsprechend liegen auch die Werte für die räumliche und zeitliche Auflösung zwischen den Werten der Auflösung des Bildraster- und TPLSM-Modus. Die Wahl des Aufnahmemodus in einem konkreten Experiment hängt davon ab, auf welche Information der Schwerpunkt gelegt wird: der Bildrastermodus gibt die räumliche Verteilung der Kalziumkonzentration wieder, der TPLSM-Modus stellt den zeitlichen Verlauf der Kalziumkonzentration an einem bestimmten Ort der Probe dar und der Multizeilen-Modus erlaubt die gleichzeitige Darstellung beider Information, wenn auch mit geringerer Auflösung. Ein gemeinsamer Vorteil beider Aufbauten ist, dass aufgrund der IR-Wellenlänge des TPLSM eine unerwünschte visuelle Stimulation der Nervenzellen vermieden wird.

Zusammengefasst lässt sich sagen, dass die Zwei-Photonen-Laser-Raster-Mikroskopie für die Anwendung in vielen Forschungsgebieten der Physik, Biologie und Chemie geeignet ist und den Experimentatoren viele Vorteile bietet, die mit anderen Messmethoden nicht erreicht werden können.

In diesem Sinne wird die Zwei-Photonen-Laser-Raster-Mikroskopie sicherlich noch viele weitere Anwendungsgebiete erschließen und zum wissenschaftlichen Fortschritt beitragen, damit man mit FAUSTscher Neugierde auch in Zukunft in das Innerste hineinschauen und neue Erkenntnisse gewinnen kann.

Literaturverzeichnis

- [1] HOOKE, ROBERT: *Micrographia, or some physiological descriptions of minute bodies made by magnifying glasses with observations and inquiries thereupon*. London, 1665.
- [2] ANDERSSON-ENGELS, STEFAN, CLAES AF KLINTEBERG, K. SVANBERG und S. SVANBERG: *In vivo fluorescence imaging for tissue diagnostics*. *Physics in Medicine and Biology*, 42(5):815–824, 1997.
- [3] YANG, Y., A. KATZ, F. J. CELMER, M. ZURAWSKA-SZCZEPANIAK und R. R. ALFANO: *Optical Spectroscopy of Benign and Malignant Breast Tissues*. *Lasers in the Life Sciences*, 7(2):115–127, 1996.
- [4] PORWOL, T., A.-R. STROHMAIER, E. SPIESS und H. ACKER: *Microscopical Tomography in Three Dimensions*. *European Microscopy and Analysis*, Seiten 21–23, July 1997.
- [5] MURATA, SHIN ICHI, PETR HERMAN, MASANORI IWASHINA, KUNIO MOCHIZUKI, TADAO NAKAZAWA, TETSUO KONDO, NOBUKI NAKAMURA, JOSEPH R. LAKOWICZ und RYOHEI KATOH: *Application of microscopic Forster resonance energy transfer to cytological diagnosis of the thyroid tumors*. *J Biomed Opt*, 10(3):034008, 2005.
- [6] SCHNEIDER, M., K. TEUCHNER und D. LEUPOLD: *Two-photon fluorescence of ocular melanomas. Studies on a new diagnostic method*. *Ophthalmologie*, 102(7):703–707, Jul 2005.
- [7] WILDER-SMITH, PETRA, KATHRYN OSANN, NEVINE HANNA, NAGLAA EL ABBADI, MATT BRENNER, DIANA MESSADI und TATIANA KRASIEVA: *In vivo multiphoton fluorescence imaging: a novel approach to oral malignancy*. *Lasers Surg Med*, 35(2):96–103, 2004.

- [8] HAUGLAND, RICHARD P.: *Handbook of Fluorescent Probes and Research Chemicals*. Molecular Probes, 7. Auflage, 1999. CDROM-Ausgabe.
- [9] TINNEFELD, PHILIP und MARKUS SAUER:
Branching out of single-molecule fluorescence spectroscopy: challenges for chemistry and influence on biology.
Angew Chem Int Ed Engl, 44(18):2642–2671, Apr 2005.
- [10] BETZIG, ERIC, GEORGE H. PATTERSON, RACHID SOUGRAT, O. WOLF LINDWASSER, SCOTT OLENYCH, JUAN S. BONIFACINO, MICHAEL W. DAVIDSON, JENNIFER LIPPINCOTT-SCHWARTZ und HARALD F. HESS:
Imaging intracellular fluorescent proteins at nanometer resolution.
Science, 313(5793):1642–1645, Sep 2006.
- [11] LACOWICZ, J. R.: *Principles of Fluorescence Spectroscopy*. Plenum Press, New York, 1983.
- [12] PISTON, DAVID W., MARK S. KIRBY, HEPING CHENG, W. J. LEDERER und WATT W. WEBB: *Two-photon-excitation fluorescence imaging of three-dimensional calcium-ion activity*.
Applied Optics, 33(4):662–669, 1994.
- [13] DENK, WILFRIED: *Two-photon Excitation in Functional Biological Imaging*. Journal of Biomedical Optics, 1(3):296–304, July 1996.
- [14] DENK, WINFRIED, JAMES H. STRICKLER und WATT W. WEBB: *Two-Photon Laser Scanning Microscopy*. Science, 248:73–76, 1990.
- [15] SO, P. T. C., T. FRENCH, W. M. YU, K. M. BERLAND, C. Y. DONG und E. GRATTON: *Time-resolved fluorescence microscopy using two-photon excitation*. Bioimaging, 3:49–63, 1995.
- [16] NIELSEN, TIM: *Zeitaufgelöste Laserspektroskopie*.
Doktorarbeit, Universität Bielefeld – Fakultät für Physik, 1999.
- [17] SCHENKE-LAYLAND, K., O. VASILEVSKI, F. OPITZ, K. KÖNIG, I. RIEMANN, K. J. HALBHUBER, TH WAHLERS und U. A. STOCK:
Impact of decellularization of xenogeneic tissue on extracellular matrix integrity for tissue engineering of heart valves.
J Struct Biol, 143(3):201–208, Sep 2003.

- [18] SUN, S., I. TITUSHKIN und M. CHO: *Regulation of mesenchymal stem cell adhesion and orientation in 3D collagen scaffold by electrical stimulus*. *Bioelectrochemistry*, 69(2):133–141, 2006.
- [19] FOSTER, KELLEY A., FRANCESCA GALEFFI, FLORIAN J. GERICH, DENNIS A. TURNER und MICHAEL MÜLLER: *Optical and pharmacological tools to investigate the role of mitochondria during oxidative stress and neurodegeneration*. *Prog Neurobiol*, 79(3):136–171, Jun 2006.
- [20] SCHENKE-LAYLAND, KATJA, IRIS RIEMANN, ODILE DAMOUR, ULRICH A. STOCK und KARSTEN KÖNIG: *Two-photon microscopes and in vivo multiphoton tomographs—powerful diagnostic tools for tissue engineering and drug delivery*. *Adv Drug Deliv Rev*, 58(7):878–896, Sep 2006.
- [21] SUN, Y., W. LO, W.-L. CHEN, S.-W. TENG, H.-Y. TAN und C.-Y. DONG: *In vitro characterization of corneal wound healing using multiphoton autofluorescence and second harmonic generation (SHG) microscopy [6138-65]*. *PROCEEDINGS- SPIE THE INTERNATIONAL SOCIETY FOR OPTICAL ENGINEERING*, 6138:61381U–, 2006.
- [22] SUN, Y., W. LO, S.-J. LIN, W.-C. LIN, S.-H. JEE, H.-Y. TAN und C.-Y. DONG: *Multiphoton fluorescence and second harmonic generation microscopy for imaging keratoconus [6138-22]*. *PROCEEDINGS- SPIE THE INTERNATIONAL SOCIETY FOR OPTICAL ENGINEERING*, 6138:61380N–, 2006.
- [23] SUN, Y., W. LO, R.-J. WU, S.-J. LIN, W.-C. LIN, S.-H. JEE, H.-Y. TAN und C.-Y. DONG: *Multiphoton microscopy for imaging infectious keratitis: demonstration of the pattern of microbial spread in an experimental model [6138-66]*. *PROCEEDINGS- SPIE THE INTERNATIONAL SOCIETY FOR OPTICAL ENGINEERING*, 6138:61381V–, 2006.
- [24] GARCIA-ALLOZA, M., S. A. DODWELL und B. J. BACSKAI: *Direct Evaluation of Alzheimer's Disease-Specific Oxidative Stress with Multiphoton Microscopy*. *OXIDATIVE STRESS AND DISEASE*, 22:27–42, 2006.

- [25] EGNER, A., V. ANDRESEN und S. W. HELL: *Comparison of the axial resolution of practical Nipkow-disk confocal fluorescence microscopy with that of multifocal multiphoton microscopy: theory and experiment.* J Microsc, 206(Pt 1):24–32, Apr 2002.
- [26] LIU, L., J. QU, Z. LIN, L. WANG, Z. FU, B. GUO und H. NIU: *Simultaneous time- and spectrum-resolved multifocal multiphoton microscopy.* Applied Physics B: Lasers and Optics, 84(3):379–383, September 2006.
- [27] STRAUB, M., P. LODEMANN, P. HOLROYD, R. JAHN und S. W. HELL: *Live cell imaging by multifocal multiphoton microscopy.* Eur J Cell Biol, 79(10):726–734, Oct 2000.
- [28] MAJOUL, IRINA, MARTIN STRAUB, RAINER DUDEN, STEFAN W. HELL und HANS-DIETER SÖLING: *Fluorescence resonance energy transfer analysis of protein-protein interactions in single living cells by multifocal multiphoton microscopy.* J Biotechnol, 82(3):267–277, Jan 2002.
- [29] MAJOUL, I., M. STRAUB, S. W. HELL, R. DUDEN und H. D. SÖLING: *KDEL-cargo regulates interactions between proteins involved in COPI vesicle traffic: measurements in living cells using FRET.* Dev Cell, 1(1):139–153, Jul 2001.
- [30] GÖPPERT-MAYER, MARIA: *Über Elementarakte mit zwei Quantensprüngen.* Annalen der Physik, 5(9):273–294, 1931.
- [31] KLEIN, MILES V. und THOMAS E. FURTAK: *Optik, <dt.>.* Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, 1988.
- [32] HECHT, EUGENE und ALFRED ZAJAC: *Optics.* Addison-Wesley Publishing Company, Inc., Reading (Massachusetts, U.S.A.), 2. Auflage, 1974.
- [33] BOYD, ROBERT W.: *Nonlinear Optics.* Academic Press, Inc., San Diego, 1992.
- [34] BERGMANN, SCHAEFER: *Lehrbuch der Experimentalphysik, Optik, Band 3, Kapitel 8, Nichtlineare Optik.* Walter de Gruyter, Berlin, New York, 1993.

- [35] DEMTRÖDER, WOLFGANG:
Laserspektroskopie, Grundlagen und Techniken.
Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, 3. Auflage, 1993.
- [36] KÖNIG, K., P. T. C. SO, W. W. MANTULIN, B.J. TROMBERG und
E. GRATTON: *Two-Photon excited lifetime imaging of autofluorescence in
cells during UVA and NIR photostress.*
Journal of Microscopy, 183(3):197–204, September 1996.
- [37] HELLWEG, DIRK: *Dispersionskompensation und Charakterisierung von
Femtosekundenpulsen in der 2-Photonen-Laserscanningmikroskopie.*
Diplomarbeit, Universität Bielefeld, 1999.
- [38] ROBINSON, MICHAEL K.: *Multiphoton Microscopy Expands Its Reach.*
Biophotonics International, 4(5):38–45, 1997.
- [39] BRANSDEN, BRIAN HAROLD und CHARLES JEAN JOACHAIN: *Physics
of Atoms and Molecules.* Longman Group, Ltd., London, New York, 1983.
- [40] PAWLEY, JAMES B. (Herausgeber): *Handbook of Biological Confocal
Microscopy.* Plenum Press, New York, 2. Auflage, 1995.
- [41] WOKOSIN, DAVID L., VICTORIA CENTONZE, JOHN G. WHITE, DAVID
ARMSTRONG, GORDON ROBERTSON und ALLISTER I. FERGUSSON:
*All-Solid State Ultrafast Lasers Facilitate Multiphoton Excitation
Fluorescence Imaging.* IEEE Journal of Selected Topics in Quantum
Electronics, 2(4):1051–1065, 1996.
- [42] HELLMUTH, THOMAS: *Neuere Methoden in der konfokalen Mikroskopie.*
Physikalische Blätter, 49(6):489–494, 1993.
- [43] BUIST, A. H., M. MÜLLER, J. SQUIER und G. J. BRAKENHOFF:
Real time two-photon absorption microscopy using multi point excitation.
Journal of Microscopy, 192(2):217–226, November 1998.
- [44] BEWERSDORF, JÖRG, RAINER PICK und STEFAN W. HELL: *Multifocal
multiphoton microscopy.* Optics Letters, 23(9):655–657, May 1998.
- [45] FRICKE, MATTHIAS: *Parallel-Processing in der
Zwei-Photonen-Laser-Raster-Mikroskopie – Anwendung in der Praxis und
3D-Visualisierung biologischer Zellen.*
Diplomarbeit, Universität Bielefeld, Fakultät für Physik, Juni 2000.

- [46] BORN, MAX und EMIL WOLF: *Principles of Optics*. Pergamon Press, Ltd., 6. Auflage, 1980.
- [47] ZIPFEL, WARREN R., REBECCA M. WILLIAMS und WATT W. WEBB: *Nonlinear magic: multiphoton microscopy in the biosciences*. Nat Biotechnol, 21(11):1369–1377, Nov 2003.
- [48] SHIMOMURA, O., F. H. JOHNSON und Y. SAIGA: *Extraction, purification and properties of aequorin, a bioluminescent protein from the luminous hydromedusan, Aequorea*. J Cell Comp Physiol, 59:223–239, Jun 1962.
- [49] PRASHER, D. C., V. K. ECKENRODE, W. W. WARD, F. G. PRENDERGAST und M. J. CORMIER: *Primary structure of the Aequorea victoria green-fluorescent protein*. Gene, 111(2):229–233, Feb 1992.
- [50] ORMÖ, M., A. B. CUBITT, K. KALLIO, L. A. GROSS, R. Y. TSIEN und S. J. REMINGTON: *Crystal structure of the Aequorea victoria green fluorescent protein*. Science, 273(5280):1392–1395, Sep 1996.
- [51] YANG, F., L. G. MOSS und G. N. PHILLIPS JR. Nature Biotechnology, 14:1246–1251, 1996.
- [52] CHALFIE, M., Y. TU, G. EUSKIRCHEN, W. W. WARD und D. C. PRASHER: *Green fluorescent protein as a marker for gene expression*. Science, 263(5148):802–805, Feb 1994.
- [53] BOKMAN, S. H. und W. W. WARD: *Renaturation of Aequorea gree-fluorescent protein*. Biochem Biophys Res Commun, 101(4):1372–1380, Aug 1981.
- [54] WARD, W. W., H. J. PRENTICE, A. F. ROTH, C. W. CODY und S. C. REEVES. Photochem. Photobiol., 35:803–808, 1982.
- [55] PATTERSON, G. H., S. M. KNOBEL, W. D. SHARIF, S. R. KAIN und D. W. PISTON: *Use of the green fluorescent protein and its mutants in quantitative fluorescence microscopy*. Biophys J, 73(5):2782–2790, Nov 1997.
- [56] HEIM, R., D. C. PRASHER und R. Y. TSIEN: *Wavelength mutations and posttranslational autoxidation of green fluorescent protein*. Proc Natl Acad Sci U S A, 91(26):12501–12504, Dec 1994.

- [57] CHATTORAJ, M., B. A. KING, G. U. BUBLITZ und S. G. BOXER:
Ultra-fast excited state dynamics in green fluorescent protein: multiple states and proton transfer.
Proc Natl Acad Sci U S A, 93(16):8362–8367, Aug 1996.
- [58] CUBITT, A. B., R. HEIM, S. R. ADAMS, A. E. BOYD, L. A. GROSS und R. Y. TSIEN: *Understanding, improving and using green fluorescent proteins.* Trends Biochem Sci, 20(11):448–455, Nov 1995.
- [59] YOKOE, H. und T. MEYER: *Spatial dynamics of GFP-tagged proteins investigated by local fluorescence enhancement.*
Nat Biotechnol, 14(10):1252–1256, Oct 1996.
- [60] KAHN, T. W., R. N. BEACHY und M. M. FALK: *Cell-free expression of a GFP fusion protein allows quantitation in vitro and in vivo.*
Curr Biol, 7(4):R207–R208, Apr 1997.
- [61] INOUE, S. und F. I. TSUJI: *Evidence for redox forms of the Aequorea green fluorescent protein.* FEBS Lett, 351(2):211–214, Sep 1994.
- [62] REID, B. G. und G. C. FLYNN: *Chromophore formation in green fluorescent protein.* Biochemistry, 36(22):6786–6791, Jun 1997.
- [63] SWAMINATHAN, R., C. P. HOANG und A. S. VERKMAN:
Photobleaching recovery and anisotropy decay of green fluorescent protein GFP-S65T in solution and cells: cytoplasmic viscosity probed by green fluorescent protein translational and rotational diffusion.
Biophys J, 72(4):1900–1907, Apr 1997.
- [64] HEIM, R., A. B. CUBITT und R. Y. TSIEN: *Improved green fluorescence.*
Nature, 373(6516):663–664, Feb 1995.
- [65] KAETHER, C. und H. H. GERDES: *Visualization of protein transport along the secretory pathway using green fluorescent protein.*
FEBS Lett, 369(2-3):267–271, Aug 1995.
- [66] LIM, C. R., Y. KIMATA, M. OKA, K. NOMAGUCHI und K. KOHNO:
Thermosensitivity of green fluorescent protein fluorescence utilized to reveal novel nuclear-like compartments in a mutant nucleoporin NSP1.
J Biochem (Tokyo), 118(1):13–17, Jul 1995.

- [67] CRAMERI, A., E. A. WHITEHORN, E. TATE und W. P. STEMMER: *Improved green fluorescent protein by molecular evolution using DNA shuffling*. Nat Biotechnol, 14(3):315–319, Mar 1996.
- [68] TSIEN, R. Y.: *The green fluorescent protein*. Annu Rev Biochem, 67:509–544, 1998.
- [69] SHELBY, R. D., K. M. HAHN und K. F. SULLIVAN: *Dynamic elastic behavior of alpha-satellite DNA domains visualized in situ in living human cells*. J Cell Biol, 135(3):545–557, Nov 1996.
- [70] MICHALET, X., F. F. PINAUD, L. A. BENTOLILA, J. M. TSAY, S. DOOSE, J. J. LI, G. SUNDARESAN, A. M. WU, S. S. GAMBHIR und S. WEISS: *Quantum dots for live cells, in vivo imaging, and diagnostics*. Science, 307(5709):538–544, Jan 2005.
- [71] KLIMOV, VICTOR I.: *Nanocrystal Quantum Dots – From fundamental photophysics to multicolor lasing*. Los Alamos Science, (28):214–220, 2003.
- [72] BAROVSKY (QUANTUM DOT CORPORATION) : *Illuminating the Path*. Presentation on Nanotechnology Symposium, February 12, 2003, February 2003. Address: 26118 Research Road, 94545 Hayward CA, United States of America.
- [73] PENG, XIAOGANG, MICHAEL C. SCHLAMP, ANDREAS V. KADAVANICH und A. P. ALIVISATOS: *Epitaxial Growth of Highly Luminescent CdSe/CdS Core/Shell Nanocrystals with Photostability and Electronic Accessibility*. J. Am. Chem. Soc., 119(30):7019–7029, 1997.
- [74] MURRAY, C. B., D. J. NORRIS und M. G. BAWENDI: *Synthesis and characterization of nearly monodisperse CdE (E = sulfur, selenium, tellurium) semiconductor nanocrystallites*. Journal of the American Chemical Society, 115:8706–8715, 1993.
- [75] LARSON, DANIEL R., WARREN R. ZIPFEL, REBECCA M. WILLIAMS, STEPHEN W. CLARK, MARCEL P. BRUCHEZ, FRANK W. WISE und WATT W. WEBB: *Water-soluble quantum dots for multiphoton fluorescence imaging in vivo*. Science, 300(5624):1434–1436, May 2003.

- [76] WANG, LIN-WANG, MARCO CALIFANO, ALEX ZUNGER und ALBERTO FRANCESCHETTI:
Pseudopotential theory of Auger processes in CdSe quantum dots. Phys Rev Lett, 91(5):056404, Aug 2003.
- [77] KÖNIG, K., P. T. C. SO, W. W. MANTULIN und E. GRATTON:
Cellular response to near-infrared femtosecond laser pulses in two-photon microscopes. Optics Letters, 22(2):135–136, January 1997.
- [78] KÖNIG, K., T. W. BECKER, P. FISCHER, I. RIEMANN und K.-J. HALBHUBER: *Pulse-length dependence of cellular response to intense near-infrared laser pulses in multiphoton microscopes.* Optics Letters, 24(2):113–115, January 1999.
- [79] SCHÖNLE, ANDREAS und STEFAN W. HELL:
Heating by absorption in the focus of an objective lens. Optics Letters, 23(5):325–327, March 1998.
- [80] GURA, TRISHA: *Biologists Get up Close and Personal With Live Cells.* Science, 276:1988–1990, June 1997.
- [81] WILLIS, RANDALL C.: *Examining Live Embryos Nondestructively.* Biophotonics International, Seiten 42–44, November/December 1999.
- [82] SQUIRRELL, JAYNE M., DAVID L. WOKOSIN, JOHN G. WHITE und BARRY D. BAVISTER: *Long-term two-photon fluorescence imaging of mammalian embryos without compromising viability.* Nature Biotechnology, 17(8):763–767, August 1999.
- [83] BHAWALKAR, J. D., A. SHIH, S. J. PAN, W. S. LIOU, J. SWIATKIEWICZ, B. A. REINHARDT, P. N. PRASAD und P. C. CHENG: *Two-photon laser scanning fluorescence microscopy – from a fluorophore and specimen perspective.* Bioimaging, 4(3):168–178, 1996.
- [84] SCHOMACKER, KEVIN T., JOAN K. FRISOLI, CAROLYN C. COMPTON, THOMAS J. FLOTTE, JAMES M. RICHTER, NORMAN S. NISHIOKA und THOMAS F. DEUTSCH: *Ultraviolet Laser-Induced Fluorescence of Colonic Tissue: Basic Biology and Diagnostic Potential.* Lasers in Surgery and Medicine, 12:63–78, 1992.

- [85] KÖHLER, RAINER H., JUN CAO, WARREN R. ZIPFEL, WATT W. WEBB und MAUREEN R. HANSON: *Exchange of Protein Molecules Through Connections Between Higher Plant Plastids*. Science, 276:2039–2042, June 1997.
- [86] DOWLING, K., M. J. DAYEL, M. J. LEVER, P. M. W. FRENCH, J. D. HARES und A. K. L. DYMOKE-BRADSHAW: *Fluorescence lifetime imaging with picosecond resolution for biomedical applications*. Optics Letters, 23(10):810–812, March 1998.
- [87] SPECTRA-PHYSICS, INC., 1330 Terra Bella Avenue, M/S 15 – 50 Post Office Box 7013, Mountain View, CA 94043, U.S.A.: *Mai Tai Diode-Pumped, Mode-Locked Ti:sapphire Laser User's Manual*, Part Number 0000-284A, Rev. F, February 2002.
- [88] COHERENT, INC. LASER GROUP, 5100 Patrick Henry Drive, Santa Clara, CA 95054, U.S.A.: *Coherent Operator's Manual Vitesse Diode-Pumped Laser*, Rev. A, February 1999.
- [89] LAVISION BIOTEC GMBH, Meisenstr. 65, D-33607 Bielefeld, Germany: *TriM-Scope Specifications*, 2003.
- [90] GSI LUMONICS, INC., 39 Manning Road, Billerica, MA 01821, U.S.A.: *VM Series Moving Magnet Optical Scanners – VM500, VM1000 & VM1500 User's Manual*, P/N: 7OM-028, Rev D, 2001.
- [91] GSI LUMONICS, INC., 39 Manning Road, Billerica, MA 01821, U.S.A.: *VM Series Moving Magnet Optical Scanners – VM 500/1000/2000 Specifications*, September 2002.
- [92] GSI LUMONICS, INC., 39 Manning Road, Billerica, MA 01821, U.S.A.: *MiniSAX Specifications*, March 2003.
- [93] GSI LUMONICS, INC., 39 Manning Road, Billerica, MA 01821, U.S.A.: *MiniSAX User Manual*, P/N: 176-25016, Rev E, 2004.
- [94] GSI LUMONICS, INC., 39 Manning Road, Billerica, MA 01821, U.S.A.: *SC2000 Scan Controller User Manual*, P/N 7OM-015, Rev 1.2, October 1999.

- [95] OLYMPUS OPTICAL CO. (EUROPA) GMBH, Wendenstraße 14 – 16, D-20097 Hamburg, Germany: *Olympus Instructions IX50/IX70 Inverted System Microscope*, February 1999.
- [96] OLYMPUS OPTICAL CO. (EUROPA) GMBH, Wendenstraße 14 – 16, D-20097 Hamburg, Germany: *Olympus UIS Objectives for Life Science*, 2006.
- [97] PI PHYSIK INSTRUMENTE GMBH & CO. KG, Polytec Platz 1 – 7, D-76337 Waldbronn, Germany: *Operating Manual PZ 73E, E-662 LVPZT Position Servo Controller*, Release 1.20, September 1997.
- [98] PI PHYSIK INSTRUMENTE GMBH & CO. KG, Polytec Platz 1 – 7, D-76337 Waldbronn, Germany: *PZT Performance Test Document, für P-721.10*, Juli 2002.
- [99] DENVIR, DONAL J. und EMER CONROY: *Electron Multiplying CCDs*. Technischer Bericht, Andor Technology Ltd. UK, 2003.
- [100] ANDOR TECHNOLOGY LTD., 9 Millennium Way, Springvale Business Park, Belfast BT12 7AL, Northern Ireland: *A User's Guide to Andor iXon Electron Multiplying CCD*, Version 1A, 2004.
- [101] ANDOR TECHNOLOGY LTD., 9 Millennium Way, Springvale Business Park, Belfast BT12 7AL, Northern Ireland: *System Performance, Performance Booklet*, Issue 1, Rev. 0, February 2004.
- [102] BD BIOSCIENCES CLONTECH, 1020 East Meadow Circle, Palo Alto, CA 94303-4230, U.S.A., 2003: *BD Living Colors Fluorescent Proteins – Investigate biological events in living cells*.
<http://www.bdbiosciences.com/clontech>
<http://www.clontech.com/clontech/gfp/index.shtml>.
- [103] BIEBRICHER, ANDREAS: *Development and investigation of probes for high-resolution colocalization microscopy*.
Doktorarbeit, Universität Bielefeld – Fakultät für Physik, Mai 2006.
- [104] SCHLEGEL, GERMAR, JOLANTA BOHNENBERGER, INGA POTAPOVA und ALF MEWS: *Fluorescence decay time of single semiconductor nanocrystals*. *Phys Rev Lett*, 88(13):137401, Apr 2002.

- [105] BIEBRICHER, DR. ANDREAS, DR. CHRISTIAN MÜLLER, DR. HABIL. PHILIP TINNEFELD und PROF. DR. MARKUS SAUER. persönliche Kommunikation, 2005.
- [106] NIELSEN, T., M. FRICKE, D. HELLWEG und P. ANDRESEN: *High efficiency beam splitter for multifocal multiphoton microscopy*. J Microsc, 201(Pt 3):368–376, Mar 2001.
- [107] HELL, S. W., G. REINER, C. CREMER und E. H. K. STELZER: *Aberations in confocal fluorescence microscopy induced by mismatches in refractive index*. J. Microscopy, 169:391–405, 1993.
- [108] BUIST, A. H., M. MÜLLER, J. SQUIER und G. J. BRAKENHOFF: *Real time two-photon absorption microscopy using multi point excitation*. J. Microscopy, 192:217–226, 1998.
- [109] PERRY, C. C. und T. KEELING-TUCKER: *Biosilicification: the role of the organic matrix in structure control*. J Biol Inorg Chem, 5(5):537–550, Oct 2000.
- [110] SIMPSON, T. L. und B. E. VOLCANI (Herausgeber): *Silicon and Siliceous Structures in Biological Systems*. Springer, New York, 1981.
- [111] CHA, J. N., K. SHIMIZU, Y. ZHOU, S. C. CHRISTIANSEN, B. F. CHMELKA, G. D. STUCKY und D. E. MORSE: *Silicatein filaments and subunits from a marine sponge direct the polymerization of silica and silicones in vitro*. Proc Natl Acad Sci U S A, 96(2):361–365, Jan 1999.
- [112] SHIMIZU, K., J. CHA, G. D. STUCKY und D. E. MORSE: *Silicatein alpha: cathepsin L-like protein in sponge biosilica*. Proc Natl Acad Sci U S A, 95(11):6234–6238, May 1998.
- [113] VOLKMER, DIRK: *Von Biomineralien zu biomimetischen Materialien: Der Weg ist das Ziel*. Chemie in unserer Zeit, 33(1):6–19, 1999.
- [114] VRIELING, ENGEL G., WINFRIED W. C. GIESKES und THEO P. M. BEELEN: *Silicon Deposition in Diatoms: Control by the pH inside the Silicon Deposition Vesicle*. J. Phycol., 35(3):548–559, June 1999.

- [115] ANDERSON, O. R.: *Cytoplasmic origin and surface deposition of siliceous structures in Sarcodina*.
Protoplasma, 181(1 – 4):61–77, March 1994.
- [116] VRIELING, ENGEL G., THEO P. M. BEELEN, RUTGER A. VAN SANTEN und WINFRIED W. C. GIESKES: *Diatom silicon biomineralization as an inspirational source of new approaches to silica production*.
J. Biotechnol., 70(1 – 3):39–51, April 1999. Biotechnological Aspects of Marine Sponges.
- [117] SHAHIDZADEH, NOUSHINE, DANIEL BONN, JACQUES MEUNIER, MINOU NABAVI, MARC AIRIAU und MIKEL MORVAN: *Dynamics of Spontaneous Emulsification for Fabrication of Oil in Water Emulsions*.
Langmuir, 16(25):9703–9708, 2000.
- [118] NISHIMI, TAISEI und CLARENCE A. MILLER: *Spontaneous Emulsification of Oil in Aerosol-OT/Water/Hydrocarbon Systems*.
Langmuir, 16(24):9233–9241, October 2000.
- [119] MILLER, CLARENCE A.: *Spontaneous Emulsification Produced by Diffusion – A Review*. Colloids Surf., 29(1):89–102, 1988.
- [120] RANG, M. J. und C. A. MILLER: *Spontaneous Emulsification of Oils Containing Hydrocarbon, Nonionic Surfactant, and Oleyl Alcohol*.
J Colloid Interface Sci, 209(1):179–192, Jan 1999.
- [121] GRANER, R., R. C. BALL und M. E. CATES: *Dynamics of spontaneous emulsification*. J. Phys. II France, 3:829–849, June 1993.
- [122] KALER, E. W., A. K. MURTHY, B. E. RODRIGUEZ und J. A. ZASADZINSKI: *Spontaneous vesicle formation in aqueous mixtures of single-tailed surfactants*. Science, 245(4924):1371–1374, Sep 1989.
- [123] SAFRAN, S. A., P. PINCUS und DAVID ANDELMAN: *Theory of Spontaneous Vesicle Formation in Surfactant Mixtures*.
Science, 248(4953):354–356, April 1990.
- [124] TONDRE, C. und C. CAILLET: *Properties of the amphiphilic films in mixed cationic/anionic vesicles: a comprehensive view from a literature analysis*. Adv Colloid Interface Sci, 93(1-3):115–134, Oct 2001.

- [125] SCHACHT, S., Q. HUO, I. G. VOIGT-MARTIN, G. D. STUCKY und F. SCHÜTH: *Oil-Water Interface Templating of Mesoporous Macroscale Structures*. *Science*, 273(5276):768–771, Aug 1996.
- [126] FOWLER, C. E., D. KHUSHALANI und S. MANN: *Interfacial synthesis of hollow microspheres of mesostructured silica*. *Chem Commun (Camb)*, (19):2028–2029, Oct 2001.
- [127] FUHRHOP, JÜRGEN HINRICH und WOLFGANG HELFRICH: *Fluid and solid fibers made of lipid molecular bilayers*. *Chem. Rev.*, 93(4):1565–1582, June 1993.
- [128] BOEVINK, P., K. OPARKA, S. SANTA CRUZ, B. MARTIN, A. BETTERIDGE und C. HAWES: *Stacks on tracks: the plant Golgi apparatus traffics on an actin/ER network*. *Plant J*, 15(3):441–447, Aug 1998.
- [129] BOEVINK, PETRA, BARRY MARTIN, KARL OPARKA, SIMON SANTA CRUZ und CHRIS HAWES: *Transport of virally expressed green fluorescent protein through the secretory pathway in tobacco leaves is inhibited by cold shock and brefeldin A*. *Planta*, 208(3):392–400, May 1999.
- [130] ESSL, D., D. DIRNBERGER, V. GOMORD, R. STRASSER, L. FAYE, J. GLÖSSL und H. STEINKELLNER: *The N-terminal 77 amino acids from tobacco N-acetylglucosaminyltransferase I are sufficient to retain a reporter protein in the Golgi apparatus of Nicotiana benthamiana cells*. *FEBS Lett*, 453(1-2):169–173, Jun 1999.
- [131] NEBENFÜHR, A., L. A. GALLAGHER, T. G. DUNAHAY, J. A. FROHLICK, A. M. MAZURKIEWICZ, J. B. MEEHL und L. A. STAEHELIN: *Stop-and-go movements of plant Golgi stacks are mediated by the acto-myosin system*. *Plant Physiol*, 121(4):1127–1142, Dec 1999.
- [132] BALDWIN, T. C., M. G. HANDFORD, M. I. YUSEFF, A. ORELLANA und P. DUPREE: *Identification and characterization of GONST1, a golgi-localized GDP-mannose transporter in Arabidopsis*. *Plant Cell*, 13(10):2283–2295, Oct 2001.

- [133] DIRNBERGER, DIETMAR, PETER BENCÚR, LUKAS MACH und HERTA STEINKELLNER: *The Golgi localization of Arabidopsis thaliana beta1,2-xylosyltransferase in plant cells is dependent on its cytoplasmic and transmembrane sequences*. *Plant Mol Biol*, 50(2):273–281, Sep 2002.
- [134] NEBENFÜHR, A., J. A. FROHLICK und L. A. STAEHELIN: *Redistribution of Golgi stacks and other organelles during mitosis and cytokinesis in plant cells*. *Plant Physiol*, 124(1):135–151, Sep 2000.
- [135] SAINT-JORE, CLAUDE M., JANET EVINS, HENRI BATOKO, FEDERICA BRANDIZZI, IAN MOORE und CHRIS HAWES: *Redistribution of membrane proteins between the Golgi apparatus and endoplasmic reticulum in plants is reversible and not dependent on cytoskeletal networks*. *Plant J*, 29(5):661–678, Mar 2002.
- [136] DASILVA, LUIS L. P., ERIK L. SNAPP, JÜRGEN DENECKE, JENNIFER LIPPINCOTT-SCHWARTZ, CHRIS HAWES und FEDERICA BRANDIZZI: *Endoplasmic reticulum export sites and Golgi bodies behave as single mobile secretory units in plant cells*. *Plant Cell*, 16(7):1753–1771, Jul 2004.
- [137] MALHOTRA, V., T. SERAFINI, L. ORCI, J. C. SHEPHERD und J. E. ROTHMAN: *Purification of a novel class of coated vesicles mediating biosynthetic protein transport through the Golgi stack*. *Cell*, 58(2):329–336, Jul 1989.
- [138] WATERS, M. G., T. SERAFINI und J. E. ROTHMAN: *'Coatomer': a cytosolic protein complex containing subunits of non-clathrin-coated Golgi transport vesicles*. *Nature*, 349(6306):248–251, Jan 1991.
- [139] KREIS, T. E., M. LOWE und R. PEPPERKOK: *COPs regulating membrane traffic*. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 11:677–706, 1995.
- [140] ANDREEVA, A. V., H. ZHENG, C. M. SAINT-JORE, M. A. KUTUZOV, D. E. EVANS und C. R. HAWES: *Organization of transport from endoplasmic reticulum to Golgi in higher plants*. *Biochem Soc Trans*, 28(4):505–512, 2000.

- [141] TAKEUCHI, M., T. UEDA, K. SATO, H. ABE, T. NAGATA und A. NAKANO: *A dominant negative mutant of sar1 GTPase inhibits protein transport from the endoplasmic reticulum to the Golgi apparatus in tobacco and Arabidopsis cultured cells.* Plant J, 23(4):517–525, Aug 2000.
- [142] MEMON, A. R., G. B. CLARK und G. A. THOMPSON: *Identification of an ARF type low molecular mass GTP-binding protein in pea (Pisum sativum).* Biochem Biophys Res Commun, 193(3):809–813, Jun 1993.
- [143] REGAD, F., C. BARDET, D. TREMOUSAYGUE, A. MOISAN, B. LESCURE und M. AXELOS: *cDNA cloning and expression of an Arabidopsis GTP-binding protein of the ARF family.* FEBS Lett, 316(2):133–136, Jan 1993.
- [144] SZOPA, JAN und BERND MÜLLER-RÖBER: *Cloning and expression analysis of an ADP-ribosylation factor from Solanum tuberosum L.* Plant Cell Reports, 14(2-3):180–183, December 1994.
- [145] ANDREEVA, A. V., M. A. KUTUZOV, D. E. EVANS und C. R. HAWES: *Proteins involved in membrane transport between the ER and the Golgi apparatus: 21 putative plant homologues revealed by dbEST searching.* Cell Biol Int, 22(2):145–160, 1998.
- [146] RITZENTHALER, CHRISTOPHE, ANDREAS NEBENFÜHR, ALI MOVAFEGHI, CHRISTIANE STUSSI-GARAUD, LEILA BEHNIA, PETER PIMPL, L. ANDREW STAEHELIN und DAVID G. ROBINSON: *Reevaluation of the effects of brefeldin A on plant cells using tobacco Bright Yellow 2 cells expressing Golgi-targeted green fluorescent protein and COPI antisera.* Plant Cell, 14(1):237–261, Jan 2002.
- [147] SATIAT-JEUNEMAITRE, BÉATRICE und CHRIS HAWES: *The distribution of secretory products in plant cells is affected by brefeldin A.* Cell Biol Int, 17(2):183–194, February 1993.
- [148] MOVAFEGHI, A., N. HAPPEL, P. PIMPL, G. H. TAI und D. G. ROBINSON: *Arabidopsis Sec21p and Sec23p homologs. Probable coat proteins of plant COP-coated vesicles.* Plant Physiol, 119(4):1437–1446, Apr 1999.

- [149] PIMPL, P., A. MOVAFEGHI, S. COUGHLAN, J. DENECKE, S. HILLMER und D. G. ROBINSON: *In situ localization and in vitro induction of plant COPI-coated vesicles*. *Plant Cell*, 12(11):2219–2236, Nov 2000.
- [150] COUCHY, ISABELLE, SUSANNE BOLTE, MARIE-THERESE CROSNIER, SPENCER BROWN und BEATRICE SATIAT-JEUNEMAITRE: *Identification and localization of a beta-COP-like protein involved in the morphodynamics of the plant Golgi apparatus*. *J Exp Bot*, 54(390):2053–2063, Sep 2003.
- [151] VOIGT, BORIS, ANTONIUS C. J. TIMMERS, JOZEF SAMAJ, ANDREJ HLAVACKA, TAKASHI UEDA, MARY PREUSS, ERIK NIELSEN, JAIDEEP MATHUR, NEIL EMANS, HARALD STENMARK, AKIHIKO NAKANO, FRANTISEK BALUSKA und DIEDRIK MENZEL: *Actin-based motility of endosomes is linked to the polar tip growth of root hairs*. *Eur J Cell Biol*, 84(6):609–621, Jun 2005.
- [152] CHO, S. H., Y. S. CHUNG, S. K. CHO, Y. W. RIM und J. S. SHIN: *Particle bombardment mediated transformation and GFP expression in the moss Physcomitrella patens*. *Mol Cells*, 9(1):14–19, Feb 1999.
- [153] FALCÓN-PÉREZ, JUAN M., RAMIN NAZARIAN, CHIARA SABATTI und ESTEBAN C. DELL' ANGELICA: *Distribution and dynamics of Lamp1-containing endocytic organelles in fibroblasts deficient in BLOC-3*. *J Cell Sci*, 118(Pt 22):5243–5255, Nov 2005.
- [154] KANG, SEOCK, HO BANG KIM, HYOUNGSEOK LEE, JIN YOUNG CHOI, SUNGGI HEU, CHANG JAE OH, SOON IL KWON und CHUNG SUN AN: *Overexpression in Arabidopsis of a plasma membrane-targeting glutamate receptor from small radish increases glutamate-mediated Ca²⁺ influx and delays fungal infection*. *Mol Cells*, 21(3):418–427, Jun 2006.
- [155] LIU, YUEYONG, YONG LI, LIYUE LIU, XUEBO HU und BINGSHENG QIU: *Design of vectors for efficient integration and transformation in Hansenula polymorpha*. *Biotechnol Lett*, 27(19):1529–1534, Oct 2005.
- [156] RICHARDS, D. A., V. DE PAOLA, P. CARONI, B. H. GÄHWILER und R. A. MCKINNEY: *AMPA-receptor activation regulates the diffusion of a membrane marker in parallel with dendritic spine motility in the mouse hippocampus*. *J Physiol*, 558(Pt 2):503–512, Jul 2004.

- [157] TAMAMAKI, N., K. NAKAMURA, K. OKAMOTO und T. KANEKO: *Radial glia is a progenitor of neocortical neurons in the developing cerebral cortex*. *Neurosci Res*, 41(1):51–60, Sep 2001.
- [158] QUANDT, HANS JOACHIM, ALFRED PÜHLER und INGE BROER: *Transgenic Root Nodules of Vicia hirsuta: A Fast and Efficient System for the Study of Gene Expression in Indeterminate-Type Nodules*. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 6(6):699–706, Nov./Dec. 1993.
- [159] LEE, MI HEE, MYUNG KI MIN, YONG JIK LEE, JING BO JIN, DONG HAN SHIN, DAE HEON KIM, KWANG-HEE LEE und INHWAN HWANG: *ADP-ribosylation factor 1 of Arabidopsis plays a critical role in intracellular trafficking and maintenance of endoplasmic reticulum morphology in Arabidopsis*. *Plant Physiol*, 129(4):1507–1520, Aug 2002.
- [160] TAKEUCHI, MASAKI, TAKASHI UEDA, NATSUKO YAHARA und AKIHIKO NAKANO: *Arf1 GTPase plays roles in the protein traffic between the endoplasmic reticulum and the Golgi apparatus in tobacco and Arabidopsis cultured cells*. *Plant J*, 31(4):499–515, Aug 2002.
- [161] IJIMA, MORIO und YASUHIRO KONO: *Development of Golgi Apparatus in the Root Cap Cells of Maize (Zea mays L.) as Affected by Compacted Soil*. *Annals of Botany*, 70(3):207–212, September 1992.
- [162] MOLLENHAUER, H. H. und D. J. MORRÉ: *Structure of Golgi apparatus*. *Protoplasma*, 180(1–2):14–28, March 1994.
- [163] NEBENFÜHR, ANDREAS, CHRISTOPHE RITZENTHALER und DAVID G. ROBINSON: *Brefeldin A: Deciphering an Enigmatic Inhibitor of Secretion*. *Plant Physiol*, 130(3):1102–1108, November 2002.
- [164] KLAUSNER, R. D., J. G. DONALDSON und J. LIPPINCOTT-SCHWARTZ: *Brefeldin A: insights into the control of membrane traffic and organelle structure*. *J Cell Biol*, 116(5):1071–1080, Mar 1992.
- [165] WEE, E. G., D. J. SHERRIER, T. A. PRIME und P. DUPREE: *Targeting of active sialyltransferase to the plant Golgi apparatus*. *Plant Cell*, 10(10):1759–1768, Oct 1998.

- [166] JIN, J. B., Y. A. KIM, S. J. KIM, S. H. LEE, D. H. KIM, G. W. CHEONG und I. HWANG: *A new dynamin-like protein, ADL6, is involved in trafficking from the trans-Golgi network to the central vacuole in Arabidopsis*. *Plant Cell*, 13(7):1511–1526, Jul 2001.
- [167] PRESLEY, JOHN F., THERESA H. WARD, ANDREA C. PFEIFER, ERIC D. SIGGIA, ROBERT D. PHAIR und JENNIFER LIPPINCOTT-SCHWARTZ: *Dissection of COPI and Arf1 dynamics in vivo and role in Golgi membrane transport*. *Nature*, 417(6885):187–193, May 2002.
- [168] GOMMEL, D. U., A. R. MEMON, A. HEISS, F. LOTTSPREICH, J. PFANNSTIEL, J. LECHNER, C. REINHARD, J. B. HELMS, W. NICKEL und F. T. WIELAND: *Recruitment to Golgi membranes of ADP-ribosylation factor 1 is mediated by the cytoplasmic domain of p23*. *EMBO J*, 20(23):6751–6760, Dec 2001.
- [169] CONTRERAS, INMACULADA, ELENA ORTIZ-ZAPATER und FERNANDO ANIENTO: *Sorting signals in the cytosolic tail of membrane proteins involved in the interaction with plant ARF1 and coatomer*. *Plant J*, 38(4):685–698, May 2004.
- [170] PIMPL, PETER, SALLY L. HANTON, J. PHILIP TAYLOR, LUIS L. PINTO-DASILVA und JÜRGEN DENECKE: *The GTPase ARF1p controls the sequence-specific vacuolar sorting route to the lytic vacuole*. *Plant Cell*, 15(5):1242–1256, May 2003.
- [171] VASUDEVAN, C., W. HAN, Y. TAN, Y. NIE, D. LI, K. SHOME, S. C. WATKINS, E. S. LEVITAN und G. ROMERO: *The distribution and translocation of the G protein ADP-ribosylation factor 1 in live cells is determined by its GTPase activity*. *J Cell Sci*, 111 (Pt 9):1277–1285, May 1998.
- [172] BIGAY, JOËLLE, PIERRE GOUNON, SYLVIANE ROBINEAU und BRUNO ANTONNY: *Lipid packing sensed by ArfGAP1 couples COPI coat disassembly to membrane bilayer curvature*. *Nature*, 426(6966):563–566, Dec 2003.
- [173] DUPREE, P. und D. J. SHERRIER: *The plant Golgi apparatus*. *Biochim Biophys Acta*, 1404(1-2):259–270, Aug 1998.

- [174] BRANDIZZI, FEDERICA, ERIK L. SNAPP, ALISON G. ROBERTS, JENNIFER LIPPINCOTT-SCHWARTZ und CHRIS HAWES: *Membrane protein transport between the endoplasmic reticulum and the Golgi in tobacco leaves is energy dependent but cytoskeleton independent: evidence from selective photobleaching*. Plant Cell, 14(6):1293–1309, Jun 2002.
- [175] CAMPBELL, NEIL A. und JANE B. REECE: *Biologie*, Kapitel 48, Seiten 1223–1262. Spektrum Akademischer Verlag GmbH Heidelberg Berlin, 6. Auflage, 2003. ISBN 3-8274-1352-4.
- [176] HOPT, A. und E. NEHER: *Highly nonlinear photodamage in two-photon fluorescence microscopy*. Biophys J, 80(4):2029–2036, Apr 2001.
- [177] KOESTER, H. J., D. BAUR, R. UHL und S. W. HELL: *Ca²⁺ fluorescence imaging with pico- and femtosecond two-photon excitation: signal and photodamage*. Biophys J, 77(4):2226–2236, Oct 1999.
- [178] LASER COMPONENTS GMBH, Werner-von-Siemens-Str. 15, D-82140 Olching Germany: *Datasheet Single Photon Counting Module SPCM-AQR Series*, 08/04 /V7 /HW Auflage, 2004.
- [179] BECKER & HICKL GMBH, Nahmitzer Damm 30, D-12277 Berlin, Germany: *Operating Manual PMM-328 8 Channel Gated Photon Counter/Multiscaler*, August 2001.
- [180] MOLECULAR PROBES, INVITROGEN: *Spectra – Fluo-4/Ca²⁺*, Catalog Number: F14200, Messwerte als Tabelle. Quelle: Internet: <http://probes.invitrogen.com/media/spectra/data/14200ca.txt>, Oktober 2006.
- [181] KURTZ, RAFAEL: *Ca²⁺ clearance in visual motion-sensitive neurons of the fly studied in vivo by sensory stimulation and UV photolysis of caged Ca²⁺*. J Neurophysiol, 92(1):458–467, Jul 2004.
- [182] PCO COMPUTER OPTICS GMBH, Ludwigsplatz 4, D-93309 Kelheim, Germany: *SensiCam Bedienungsanleitung – Specifications and typical values*, SensiCam-D-11/96, November 1996.
- [183] BEWERSDORF, JÖRG, RAINER PICK und STEFAN W. HELL: *Multifocal multiphoton microscopy*. Optics Letters, 23(9):655–657, May 1998.

- [184] CALLAWAY, J. C., N. LASSER-ROSS, A. E. STUART und W. N. ROSS: *Dynamics of intracellular free calcium concentration in the presynaptic arbors of individual barnacle photoreceptors.* J Neurosci, 13(3):1157–1166, Mar 1993.
- [185] MACLEOD, G. T., M. HEGSTRÖM-WOJTOWICZ, M. P. CHARLTON und H. L. ATWOOD: *Fast calcium signals in Drosophila motor neuron terminals.* J Neurophysiol, 88(5):2659–2663, Nov 2002.
- [186] REGEHR, W. G. und P. P. ATLURI: *Calcium transients in cerebellar granule cell presynaptic terminals.* Biophys J, 68(5):2156–2170, May 1995.
- [187] HOLTHOFF, KNUT, DAVID TSAY und RAFAEL YUSTE: *Calcium dynamics of spines depend on their dendritic location.* Neuron, 33(3):425–437, Jan 2002.
- [188] MAJEWSKA, A., E. BROWN, J. ROSS und R. YUSTE: *Mechanisms of calcium decay kinetics in hippocampal spines: role of spine calcium pumps and calcium diffusion through the spine neck in biochemical compartmentalization.* J Neurosci, 20(5):1722–1734, Mar 2000.
- [189] MÜLLER, W. und J. A. CONNOR: *Dendritic spines as individual neuronal compartments for synaptic Ca²⁺ responses.* Nature, 354(6348):73–76, Nov 1991.
- [190] SABATINI, BERNARDO L., THOMAS G. OERTNER und KAREL SVOBODA: *The life cycle of Ca(2+) ions in dendritic spines.* Neuron, 33(3):439–452, Jan 2002.

Publikationen mit eigener Beteiligung

in chronologischer Reihenfolge:

1. TIM NIELSEN, MATTHIAS FRICKE, DIRK HELLWEG, PETER ANDRESEN
„*High efficiency beam splitter for multifocal multiphoton microscopy*“
Journal of Microscopy 201(3), 2001, S. 368 – 376
2. TIM NIELSEN, MATTHIAS FRICKE
„*Multi-Focal Laser Scanning Microscopy Using Two-Photon Excitation*“
GIT Verlag, Imaging & Microscopy 2, 2001, S. 43
3. DIRK VOLKMER, STEFANO TUGULU, MATTHIAS FRICKE, TIM NIELSEN
„*Morphosynthesis of Star-Shaped Titania-Silica Shells*“
Angewandte Chemie Int. Ed. 42(1), 2003, S. 58 – 61
4. MARTINA BRECHT, KATHERINA SEWALD, KARIN SCHIENE,
GUNNAR KEEN, MATTHIAS FRICKE, MARKUS SAUER,
KARSTEN NIEHAUS
„*The use of surface plasmon resonance (SPR) and fluorescence resonance
energy transfer (FRET) to monitor the interaction of the plant G-proteins
Ms-Rac1 and Ms-Rac4 with GTP*“
Journal of Biotechnology 112, 2004, S. 151 164
5. JULIA KALB, TIM NIELSEN, MATTHIAS FRICKE, MARTIN EGELHAAF,
RAFAEL KURTZ
„*In vivo two-photon laser-scanning microscopy of Ca²⁺ dynamics in visual
motion-sensitive neurons*“
Biochemical and Biophysical Research Communications 316, 2004,
S. 341 – 347

6. MATTHIAS FRICKE, TIM NIELSEN
„*Two-dimensional imaging without scanning by multifocal multiphoton microscopy*“
Applied Optics 44(15), 2005, S. 2984 – 2988
7. HOLGER DENSOW, MATTHIAS FRICKE, MARKUS SAUER,
KARSTEN NIEHAUS
„*Localization of structural and regulatory components of COPI-coated vesicles in Medicago truncatula cv. Jemalong root cells*“
The Plant Journal Microscopy, 2005, eingereicht
8. RAFAEL KURTZ, MATTHIAS FRICKE, JULIA KALB, PHILIP TINNEFELD,
MARKUS SAUER
„*Application of Multiline Two-Photon Microscopy to Functional In Vivo Imaging*“
Journal of Neuroscience Methods 151, 2006, S. 276 – 286

Danksagung

Zum Abschluss dieser Arbeit möchte ich mich bei allen Kollegen und Freunden bedanken, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Die vorliegende Arbeit entstand am Lehrstuhl für Angewandte Laserphysik und Laserspektroskopie an der Fakultät für Physik der Universität Bielefeld im Rahmen des Sonderforschungsbereiches 613 Teilprojekt D5, der von der Deutschen Forschungsgemeinschaft finanziert wird. Die Arbeitsgruppe steht unter der Leitung von Prof. Dr. Markus Sauer, dem ich für die interessante Aufgabenstellung, die reichhaltige experimentelle Ausstattung, sein beständiges Interesse am Fortgang der Arbeit und die vielen hilfreichen Diskussionen danke. Ebenso danke ich Dr. Philip Tinnefeld für seine stets freundliche, hilfbereite und sehr kompetenten Hilfestellungen in zahlreichen Diskussionen, die ebenfalls zum Erfolg der Arbeit beigetragen haben.

Durch ihr beständiges Interesse an interdisziplinären Arbeiten haben Markus Sauer und Philip Tinnefeld viele Kooperationen mit anderen Arbeitsgruppen etabliert und so gilt mein Dank auch Priv.-Doz. Dr. Karsten Niehaus, Dr. Holger Densow und Dipl.-Biol. Martina Brecht vom Lehrstuhl für Genetik an der Fakultät für Biologie der Universität Bielefeld. Sie stellten mir im Rahmen der Versuche zur GFP-Visualisierung die für die Untersuchungen notwendigen Zellen zur Verfügung und waren stets offen für Fragen und ausführliche Erklärungen zu biologischen Aspekten. Zudem zeigten sich in den Diskussionen mit ihnen weitere biologische Fragestellungen, die mit Anwendung des multifokalen Zwei-Photonen-Laser-Raster-Mikroskopes untersucht werden können, so dass in der Zukunft eine weitere interessante Zusammenarbeit möglich ist.

Für die Zusammenarbeit bei der Fragestellung der Selbstorganisation in der Chemie danke ich Prof. Dr. Dirk Volkmer und Dr. Stefano Tugulu.

Für die Arbeiten zur Kalzium-Visualisierung danke ich Dr. Rafael Kurtz und Dipl.-Biol. Julia Kalb für die Zusammenarbeit an dieser neurobiologischen Fragestellung.

Dr. Rudolph Böttner, Dr. Gerd Wiebusch, Dipl. Ing. Stefan Wörmer und Reinhold Pätzmann danke ich für ihre Hilfe in organisatorischen und verwaltungstechnischen Fragen.

Für die angenehme Büroatmosphäre bedanke ich mich bei meinen Kollegen Dr. Chrisitan Müller, Dr. Mike Heilemann, Dipl.-Phys. Achim Donnermeyer und Daniel Fetting. Und auch allen anderen Mitarbeitern der Etage D3 danke ich für das angenehme Arbeitsklima.

Bei den Mitarbeitern der mechanischen und elektronischen Werkstatt bedanke ich mich für die gute und sorgfältige Ausführung sämtlicher Arbeiten und die geduldige Beratung bei technischen Fragen.

Mein besonderer Dank gilt meinen Eltern, die mir während meiner Promotion immer zur Seite standen und mich auf alle erdenkliche Weise unterstützt haben.

Und schließlich danke ich allen meinen Freunden, die mich teilweise seit dem ersten Semester begleitet haben, für die vielen lustigen Stunden, die ich – auch außerhalb der Uni – mit ihnen erleben konnte.

Eidesstattliche Erklärung

Ich versichere hiermit an Eides statt, die vorliegende Arbeit bis auf die dem Aufgabensteller bekannten Hilfen selbständig angefertigt und alle benutzten Hilfsmittel unter Angabe der Literaturstellen kenntlich gemacht zu haben.

Bielefeld, im April 2007

Matthias Fricke