

Institut für Physik und Astronomie

---

Nichtlineare Mikroskopie und  
 Bilddatenverarbeitung zur biochemischen  
 Analyse synchronisierter *Chlamydomonas*-Zellen

Dissertation  
 zur Erlangung des akademischen Grades  
 „doctor rerum naturalium“  
 (Dr. rer. nat.)  
 in der Wissenschaftsdisziplin Biophotonik

eingereicht an der  
 Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät  
 der Universität Potsdam

von  
 Andreas Garz  
 geboren am 17.08.1980 in Potsdam

Potsdam, den 03.03.2013

Online veröffentlicht auf dem  
Publikationsserver der Universität Potsdam:  
URL <http://opus.kobv.de/ubp/volltexte/2013/6690/>  
URN <urn:nbn:de:kobv:517-opus-66904>  
<http://nbn-resolving.de/urn:nbn:de:kobv:517-opus-66904>

# Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis.....	I
Abkürzungsverzeichnis .....	V
1 Einleitung .....	1
2 Physikalische Grundlagen der nichtlinearen Mikroskopie .....	3
2.1 Wechselwirkung von Licht mit Materie.....	3
2.2 Lineare und nichtlineare Absorption.....	4
2.2.1 Einphotonenabsorption und linearer Absorptionsquerschnitt .....	4
2.2.2 Mehrphotonenabsorption und nichtlineare Absorptionsquerschnitte.....	5
2.3 Optische Effekte höherer Ordnung – Erzeugung der Zweiten Harmonischen .....	7
2.4 Auflösungsvermögen optischer Systeme .....	8
2.4.1 Beschreibung der Abbildungseigenschaften eines optischen Systems.....	9
2.4.2 Abschätzung des Fluoreszenzphotonenflusses unter den experimentellen Bedingungen der Laser-Scanning-Mikroskopie.....	13
2.4.3 Sättigungs- und Ausbleicheffekte der Fluorophore bei hohen Anregungsintensitäten .....	14
2.4.4 Bildkontrast und Signalverarbeitung.....	14
3 Methoden der Mikroskopie .....	17
3.1 Weitfeldmikroskopie .....	17
3.2 Laser-Scanning-Mikroskopie .....	18
3.3 Superresolution-Mikroskopie.....	19
3.4 Nichtlineare Mikroskopie .....	20
3.4.1 Nichtlineare Fluoreszenzmikroskopie .....	21
3.4.2 SHG-Mikroskopie .....	23
3.4.3 Einfluss der Dispersion auf die Signalgebung .....	25
4 Optische Signalquellen wachstumsabhängiger Zellparameter.....	26
4.1 Endogene Signalquellen.....	27

4.2	Exogene Signalquellen.....	27
5	Biochemisch relevante Modellorganismen und weitere biologische Proben.....	28
5.1	Die niedere Pflanze <i>Chlamydomonas reinhardtii</i> .....	28
5.2	Die höhere Pflanze <i>Arabidopsis thaliana</i> .....	30
5.2.1	Mesophyllprotoplasten von <i>Arabidopsis thaliana</i> .....	30
5.3	Die höhere Pflanze <i>Lysimachia nummularia</i> .....	31
5.4	Native Stärke.....	31
6	Beschreibung der Mikroskopieplattform (experimenteller Aufbau).....	32
7	Methoden der Zellimmobilisierung.....	34
7.1	Adhäsionsobjektträger .....	35
7.2	Optische Pinzette.....	36
7.3	Patch-Clamp-Methode .....	38
7.4	Mikrofluidik.....	39
8	Nachweis der Diversität zellulärer Parameter einer synchronisierten <i>Chlamydomonas</i> -Kultur unter Anwendung der PAM-Fluorimetrie.....	41
8.1	Beschreibung der PAM-Messapparatur .....	43
8.2	Ermittlung der optimalen Geräteeinstellungen .....	44
8.3	Präparation und Immobilisierung einzelner <i>Chlamydomonas</i> -Zellen.....	45
8.4	Effizienz des Photosystems II – Messung des Quotienten $F_v/F_m$ – an <i>Chlamydomonas reinhardtii</i> .....	45
8.5	Effizienz des Photosystems II – Interpretation der Messergebnisse.....	50
9	Nichtlineare Mikroskopie und Bilddatenanalyse zur <i>In-vitro</i> -Erfassung von wachstumsabhängigen zellulären Parametern.....	52
9.1	Rechnergestützte Bilddatenanalyse und -auswertung.....	53
9.1.1	Beschreibung der Auswerteroutinen zur Objekterkennung.....	54
9.1.2	Statistische Datenanalyse .....	58
9.2	Die Laser-Scanning-Mikroskopie als bildgebendes Verfahren zur parallelen Erfassung subzellulärer Parameter.....	59

9.2.1	Beschreibung des experimentellen Aufbaus des Laser-Scanning-Mikroskops.....	59
9.2.2	Vergleich von Ein- und Zweiphotonenmikroskopie am Beispiel von fluoreszierenden Proteinen in Mesophyllprotoplasten .....	62
9.2.3	Messung der Verteilung von Fusionsproteinen am Beispiel der Phosphorylierung von Stärke .....	67
9.3	Diskussion – lokale Verteilung von Proteinen .....	69
9.4	Fixierung von <i>Chlamydomonas</i> -Zellen.....	70
9.5	Einfluss der Geräteparameter auf die Bildgebung und Geräteeinstellungen .....	71
9.6	Validierung der Messmethode.....	72
9.6.1	Probenbeschaffenheit und Signalgebung .....	72
9.6.2	Probenpräparation zur DNA- bzw. Stärkequantifizierung .....	76
9.6.3	Validierung der SHG-Mikroskopie im Vergleich zu einem enzymatischen Test .....	77
10	Quantifizierung des wachstumsabhängigen zellulären Stärkegehalts von <i>Chlamydomonas</i> -Zellen .....	78
10.1	Volumenverteilung der <i>Chlamydomonas</i> -Zellen.....	79
10.2	Heterogenität des zellulären Stärkegehalts .....	80
10.3	Verteilungsfunktion der zellulären Stärkedichte und Modellierung der Rate des Stärkeabbaus .....	81
10.4	Diskussion der Ergebnisse .....	83
11	Quantifizierung des zellulären Stärkegehalts in Chloroplasten der Pflanze <i>Arabidopsis thaliana in-vitro</i> .....	86
11.1	Präparation von Blättern der Pflanze <i>Arabidopsis thaliana</i> und Versuchsbeschreibung.....	87
11.2	Ergebnisse – Stärkegehalt der Chloroplasten und Anzahl der Stärkegranula .....	88
12	Quantifizierung des wachstumsabhängigen zellulären DNA-Gehalts von <i>Chlamydomonas</i> -Zellen .....	90
12.1	Präparation und Versuchsbedingungen .....	90
12.2	Volumenverteilung der <i>Chlamydomonas</i> -Zellen.....	91

12.3 Heterogenität des zellulären DNA-Gehalts.....	93
12.4 Verteilungsfunktion der zellulären Parameter.....	96
12.5 Nucleäre DNA – Zellteilung .....	97
13 Zusammenfassung und Ausblick.....	99
14 Literatur.....	102
15 Anhang.....	109
Selbständigkeitserklärung .....	VII
Danksagung.....	IX

## Abkürzungsverzeichnis

A/D	Analog/Digital
AP	Anregungsphoton
APF	Anregungsphotonenfluss
CARS	Coherent Antistokes Raman Scattering (kohärente Anti-Stokes-Raman-Streuung)
CCD	Charged Coupled Device
CSD	Cellular Starch Density (zelluläre Stärkedichte)
cw	continuous wave (Dauerstrich)
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EET	Excitation Energy Transfer (Anregungsenergietransfer)
FP	Fluoreszenzphotonen
[F]PALM	[Fluorescence] Photoactivated Localization Microscopy (photoaktivierte [Fluoreszenz]-Lokalisationsmikroskopie)
FPF	Fluoreszenzphotonenfluss
FWHM	Full Width at Half Maximum (Halbwertsbreite)
GFP	Green Fluorescent Protein (grün fluoreszierendes Protein)
GWD	Glucan-Wasser-Dikinase
IC	Internal Conversion (interne Konversion)
ISC	Intersystemcrossing
ISW	Intensitätsschwellwert
KK	Korrelationskoeffizient
Laser	Light Amplification by Stimulated Emission of Radiation (Lichtverstärkung durch stimulierte Lichtemission)
LED	Light Emitting Diode (lichtemittierende Diode)
LSM	Laser-Scanning-Mikroskopie
MPM	Mehrphotonenmikroskopie
N.A.	Numerische Apertur
NPQ	nichtphotochemisches Quenchen
OD	optische Dichte
PAM	Puls-Amplituden-Modulation
PDF	Probability Density Function (Wahrscheinlichkeitsdichteverteilung)
PDMS	Polydimethylsiloxan
PMMA	Polymethylmethacrylat
PMT	Photomultipliertube (Sekundärelektronenvervielfältiger)
PS	Photosystem
PSF	Point Spread Function (Punktbilfunktion)

RCSC	Relative Cellular Starch Content (relativer zellulärer Stärkegehalt)
SD	Standardabweichung
SHG	Second Harmonic Generation (Erzeugung der Zweiten Harmonischen)
SIM	Structured Illumination Microscopy (strukturierte Beleuchtungsmikroskopie)
SNOM	Scanning Nearfield Optical Microscopy (Optische Rasternahfeldmikroskopie)
SNR	Signal to Noise Ratio (Signal-zu-Rausch-Verhältnis)
SPA	Single Photon Absorption (Einphotonenabsorption)
STED	Stimulated Emission Depletion
STORM	Statistical Optical Reconstruction Microscopy (statistische optische Rekonstruktionsmikroskopie)
THG	Third Harmonic Generation (Erzeugung der Dritten Harmonischen)
TPA	Two Photon Absorption (Zweiphotonenabsorption)
TPFM	Two Photon Fluorescence Microscopy (zweiphotonenangeregte Fluoreszenzmikroskopie)
YFP	Yellow Fluorescent Protein (gelb fluoreszierendes Protein)

# 1 Einleitung

In den letzten Jahren wurde verstärkt die computergestützte Katalogisierung und funktionale Analyse der Genome und Proteome von Einzelzellen und vielzelligen Organismen weiterentwickelt. Diese Arbeitsrichtung nutzt umfangreiche quantitative Messdaten von Metaboliten, Lipiden, Proteinen und Transkripten, die die empirische Grundlage der modelltheoretischen Beschreibungen komplexer zellulärer bzw. interzellulärer Prozesse bilden. Häufig werden für diese Untersuchungen Modellorganismen ausgewählt, die eine Vielfalt biologischer Eigenschaften und/oder Fähigkeiten aufweisen, jedoch möglichst einfach aufgebaut sind und/oder andere praktische Vorteile besitzen. Ein, bei Untersuchungen von Photosynthesemechanismen und photosyntheseabhängigen Wachstumsprozessen häufig verwendeter, Modellorganismus ist die eukaryotische einzellige Grünalge *Chlamydomonas reinhardtii*, die photoautotroph kultiviert werden kann. Diese Alge ist transformierbar und besitzt ein vollständig sequenziertes Genom. Sie kann sich praktisch unbegrenzt vegetativ vermehren, aber auch sexuell fortpflanzen und bietet somit die Möglichkeit, klassisch-genetische Analysen durchzuführen.

Leicht kultivierbare photoautotrophe Algen werden außer in der Grundlagenforschung, auch in biotechnologischen Anwendungen – z.B. im Bereich der biologischen Energiewandlung – verwendet. Sie werden häufig in Bioreaktoren angezogen, in denen physikalische und chemische Bedingungen über einen weiten Bereich kontrolliert und optimiert werden können. Unter geeigneten Wachstumsbedingungen weisen Algenkulturen oft eine größere Produktivität der Zellen auf, als sie bei höheren Pflanzen zu beobachten ist. *Chlamydomonas*-Zellen sind vergleichsweise klein; so beträgt das Zellvolumen während des vegetativen Zellzyklus etwa 50–3500  $\mu\text{m}^3$ . Im Vergleich zu höheren Pflanzen ist in einer Algensuspension die Konzentration der Biomasse allerdings gering. So enthält beispielsweise 1 ml einer üblichen Konzentration zwischen  $10^6$  und  $10^7$  Algenzellen. Quantifizierungen von Metaboliten oder Makromolekülen, die zur Modellierung von zellulären Prozessen genutzt werden, werden meist im Zellensemble vorgenommen. Tatsächlich unterliegt jedoch jede Algenzelle einer individuellen Entwicklung, die die Identifizierung charakteristischer allgemeingültiger Systemparameter erschwert. Durch bestimmte Verfahren, wie Synchronisierung, ist es möglich, die Entwicklungszyklen der einzelnen Algenzellen zu koordinieren. In einer solchen Synchronkultur kann der höchstmögliche Grad an Homogenität in Bezug auf zelluläre Parameter erreicht werden. Jedoch ist auch bei der Synchronisierung nicht davon auszugehen, dass zu beliebigen Zeitpunkten eine komplette Einheitlichkeit aller Zellen vorliegt. Unabhängig von

den Aufzuchtbedingungen sind die Messdaten jedoch stets das Ergebnis von Ensemblemessungen, sofern Beobachtung bzw. Signalgewinnung nicht an einzelnen Zellen erfolgt.

An einer statistisch relevanten Anzahl von Einzelzellen können beispielsweise durch etablierte fluoreszenzspektroskopische Methoden wie der Durchflusszytometrie zu einem bestimmten Entwicklungszeitpunkt wichtige Zellparameter charakterisiert werden. Einige biochemisch relevante Daten sind jedoch nur durch Verfahren messbar, deren Messdauer die Dynamik zellulärer Prozesse deutlich übersteigt. Für derartige Messungen ist die Zellfixierung Voraussetzung, durch die alle metabolischen Prozesse im Zellensemble unmittelbar gestoppt werden. Hierbei muss allerdings sichergestellt werden, dass die Fixiermethode selbst die Messgröße nicht verändert.

Ziel dieser Arbeit ist es, biochemisch relevante Messgrößen *in-vivo* und *in-vitro* mit Hilfe optischer Verfahren zu identifizieren und zu quantifizieren.

Zunächst wird ein Messplatz zur Analyse der durch äußere Faktoren beeinflussbaren Chlorophyllfluoreszenz einzelner lebender *Chlamydomonas*-Zellen beschrieben. Der Aufbau dieses Messplatzes umfasst die Etablierung einer empfindlichen Messtechnik und die Entwicklung einer geeigneten Immobilisierungsmethode. Mit den gemessenen wachstumsabhängigen Daten können Aussagen über den Photosyntheseapparat bzw. den Zustand einzelner Zellen getroffen werden.

Im zweiten Teil der Arbeit werden die bildgebende konfokale und die nichtlineare Mikroskopie angewendet. Die nichtlineare Mikroskopie hat den Vorteil einer höheren Ortsauflösung. Es besteht neben der Signalgebung durch Fluoreszenzanregung die Möglichkeit der Erzeugung der Zweiten Harmonischen (SHG) an biophotonischen Strukturen, wie der zellulären Stärke. Durch geeignete Bilddatenanalyse werden anhand einer statistisch relevanten Zahl von Einzelzellmessungen wachstumsabhängige Zellparameter quantifiziert und deren Verteilung im Zellensemble bestimmt. Anhand dieser Verteilungen können mit Hilfe von modelltheoretischen Ansätzen Parameter des Stärkemetabolismus ermittelt werden, die messtechnisch unmittelbar nicht zugänglich sind. Da die Bilddatenanalyse eine simultane Messung mehrerer Zellparameter erlaubt, können diese auf Einzelzellebene korreliert werden. Analysiert werden die Volumina der Zellen und die Volumina subzellulärer Strukturen, wie Nuclei, extranucleäre DNA und Stärkegranula. Des Weiteren ermöglicht die Bilddatenanalyse die relative Konzentrationsbestimmung von zellulären Komponenten, wie der DNA bzw. Stärke. Durch die statistische Analyse der Messwerte wird gezeigt, dass viele zelluläre Eigenschaften, wie das Volumen und der zelluläre DNA- bzw. Stärkegehalt, einer Lognormalverteilung mit wach-

tumsabhängiger Parametrisierung entsprechen. So ist erstmalig die Verteilung des zellulären Stärkegehalts in einer *Chlamydomonas*-Population in der Wachstumsphase bzw. nach induziertem Stärkeabbau verfolgt worden [1].

## 2 Physikalische Grundlagen der nichtlinearen Mikroskopie

Ernst Abbe [2] lieferte die theoretischen Grundlagen der modernen Optik für die Konstruktion von Linsensystemen mit geringer sphärischer und chromatischer Aberration. In Zusammenarbeit mit Carl Zeiss und Otto Schott konnte die Qualität der optischen Elemente soweit verbessert werden, dass sie nicht mehr der limitierende Faktor für das Auflösungsvermögen eines optischen Systems waren, sondern die physikalischen Eigenschaften des Lichts selbst. Im folgenden Abschnitt wird auf die fundamentalen Prozesse der Wechselwirkung von Licht und Materie eingegangen und die grundlegenden physikalischen Eigenschaften optisch abbildender Systeme werden erläutert. Für weiterführende Betrachtungen wird auf die entsprechende Fachliteratur verwiesen.

### 2.1 Wechselwirkung von Licht mit Materie

Die Wechselwirkung zwischen Materie und elektromagnetischen Wellen wird durch die Maxwellgleichungen beschrieben. Basierend auf diesen Gleichungen wird der Zusammenhang zwischen dem elektrischen Feld  $\vec{E}$  und der im Material induzierten Polarisation  $\vec{P}$  hergestellt:

$$\vec{P} = \varepsilon_0 \chi^{(1)} \otimes \vec{E}_1 + \varepsilon_0 \chi^{(2)} \otimes \vec{E}_1 \cdot \vec{E}_2 + \varepsilon_0 \chi^{(3)} \otimes \vec{E}_1 \cdot \vec{E}_2 \cdot \vec{E}_3 + \dots \quad (2.1)$$

Dabei ist  $\varepsilon_0$  die elektrische Feldkonstante und  $\chi^{(m)}$  der frequenzabhängige elektrische Suszeptibilitätstensor mit dem Grad  $m$ . Die Suszeptibilität  $\chi$  charakterisiert die Antwortfunktion der Materie bei der Wechselwirkung mit dem elektrischen Feld. Für schwache Strahlungsfelder ist der erste Term in Gleichung (2.1) dominant und es besteht ein linearer Zusammenhang zwischen Polarisation und elektrischem Feld. Der Suszeptibilitätstensor  $\chi^{(1)}$  beschreibt beispielsweise die Einphotonenabsorption und die Reflexion. Bei höheren elektrischen Feldstärken (typischerweise  $> 10^8$  V/m) treten zunehmend anharmonische Elektronenbewegungen im Material auf, sodass die Terme höherer Ordnung ( $m > 1$ ) in Gleichung (2.1) an Relevanz gewinnen. Beispielsweise beschreiben  $\chi^{(2)}$  die Summen- und Differenzfrequenzmischung (parametrische Verstärkung) bzw. als Spezialfall die Generation der Zweiten Harmonischen

(SHG) und  $\chi^{(3)}$  die Zweiphotonenabsorption, die Erzeugung der Dritten Harmonischen (THG), die kohärente Anti-Stokes-Ramanstreuung (CARS), die Selbstphasenmodulation, die Selbstfokussierung und die Vierwellenmischung. Meist sind die Komponenten des Suszeptibilitätstensors komplexe Größen. Eine makroskopische Beschreibung des frequenzabhängigen Verhaltens von Materialien wird durch die komplexe Brechzahl  $n$  gegeben. Im Bereich schwacher Absorption kann der imaginäre Anteil vernachlässigt werden.

$$n = \sqrt{1 + \chi_{real} - i\chi_{imag}} = n_{real} - in_{imag} \quad (2.2)$$

## 2.2 Lineare und nichtlineare Absorption

Gleichung (2.1) beschreibt die Wechselwirkung von Licht und Materie. Im Bereich niedriger Lichtintensitäten ist die vorherrschende Form der Wechselwirkung die Einphotonenabsorption. Bei zunehmenden Feldstärken ist die Mehrphotonenabsorption möglich.

### 2.2.1 Einphotonenabsorption und linearer Absorptionsquerschnitt

Atome oder Moleküle besitzen eine Vielzahl von Energiezuständen zwischen denen ein Absorptionsprozess stattfinden kann. Befindet sich das Molekül in einem angeregten Zustand, besteht die Möglichkeit strahlend oder strahlungslos zu relaxieren.

Solange es im Ergebnis der Absorption zu keiner wesentlichen Besetzung höherer Anregungszustände kommt, gilt das Lambert-Beer'sche Gesetz, welches das Verhältnis von einfallendem  $I_0$  zu transmittiertem Photonenfluss  $I$  beschreibt.

$$OD = -\log\left(\frac{I}{I_0}\right) = c \cdot \varepsilon_\lambda \cdot l \quad (2.3)$$

Hierbei ist  $OD$  die optische Dichte,  $l$  die Schichtdicke des Mediums,  $c$  die Absorberkonzentration und  $\varepsilon_\lambda$  der molare Extinktionskoeffizient bei der Wellenlänge  $\lambda$ .

Im Modell des klassischen Oszillators ist die Oszillatorstärke  $f_{ik}$  ein Maß für die Übergangswahrscheinlichkeit eines Atoms bzw. Moleküls zwischen den beiden Energiezuständen  $E_i$  und  $E_k$ . Äquivalente Größen sind das Übergangsdipolmoment  $\mu$ , der Einsteinkoeffizient  $B$  und der Absorptionswirkungsquerschnitt  $\sigma_\lambda$ . Der Zusammenhang zwischen  $f$  und  $\sigma_\lambda$  ist gegeben durch [3]:

$$f_{ik} = \frac{4m_e \varepsilon_0 c_0^2}{e_e^2} \int_{band} \frac{1}{\lambda^2} \sigma_\lambda d\lambda \cong 1,2958 \cdot 10^{14} \left[ \frac{1}{m} \right] \cdot \int_{band} \frac{1}{\lambda^2} \sigma_\lambda d\lambda \quad (2.4)$$

mit der Elektronenmasse  $m_e$ , der Elektronenladung  $e_e$  und dem Integral über die spektrale

Bandbreite des Absorptionsbandes. Unter Annahme der maximalen Übergangswahrscheinlichkeit ( $f_{ik} = 1$ ) kann in Abhängigkeit von der Absorptionsbandbreite eine Abschätzung der Größenordnung von  $\sigma_\lambda$  zu  $10^{-17} \leq \sigma_\lambda \leq 10^{-16} \text{ cm}^2$  erfolgen. Zwischen dem molaren Extinktionskoeffizienten  $\varepsilon_\lambda$  und dem Absorptionswirkungsquerschnitt  $\sigma_\lambda$  besteht der Zusammenhang:

$$\varepsilon_\lambda = \sigma_\lambda \frac{N_A}{\ln(10)} \quad (2.5)$$

$N_A$  bezeichnet hierbei die Avogadrokonstante.

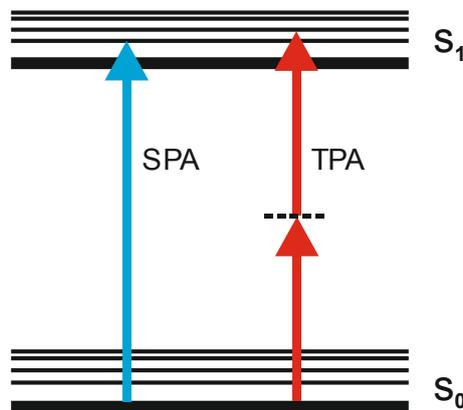
### 2.2.2 Mehrphotonenabsorption und nichtlineare Absorptionsquerschnitte

Die Besetzung eines Energiezustandes durch eine Mehrphotonenabsorption kann über eine nichtsimultane stufenweise Anregung realer Zwischenniveaus oder durch eine simultane Anregung über virtuelle Niveaus erfolgen (Abb. 1). Die Wahrscheinlichkeit der Anregung über reale Niveaus ist größer als über virtuelle Niveaus.

Im Jahre 1931 entwickelte Maria Göppert-Mayer die theoretische Beschreibung, dass zwei Photonen mit geeigneten Energien ein Molekül oder Atom simultan anregen können [4]. Kurz nach Entwicklung der ersten Laser gelang Kaiser und Garrett im Jahre 1961 an einem  $\text{CaF}_2:\text{Eu}^{2+}$ -Kristall der experimentelle Nachweis der simultanen Zweiphotonenabsorption (TPA) [5]. Die TPA in einem organischen Molekül wurde 1966 durch Schäfer und Schmidt am Rhodamin B nachgewiesen [6]. Eine erste Abschätzung des Dreiphotonenabsorptionsquerschnitts für Naphthalen- und Anthrazen-Kristalle wurde 1964 durch Singh und Bradley gegeben [7].

Bei der TPA muss die Summe der Energie beider Photonen dem Energieabstand zwischen Grund- und angeregtem Niveau entsprechen (Abb. 1). Gegenüber der Einphotonenabsorption gelten bei der TPA andere quantenmechanische Auswahlregeln [8]. Es können energetische Zustände besetzt werden, für die ein Einphotonenübergang bzw. eine Einphotonenabsorption (SPA) quantenmechanisch „verboten“ ist („optisch dunkle Zustände“). Ein Beispiel hierfür sind die Carotinoide, die im Lichtsammelkomplex LHC II der Photosynthese vorkommen. In solchen symmetrischen Molekülen (mit Inversionszentrum), muss der einphotoneninduzierte Übergang zwischen Zuständen verschiedener Parität verlaufen. Ein optischer Übergang vom Grundzustand  $S_0$  in den angeregten Zustand  $S_1$  ist in Carotinoiden nicht möglich, da beide Zustände gleiche Parität besitzen. Bei der TPA wird ein virtuelles Zwischenniveau angenommen (Abb. 1). Auch hier ändert sich bei jedem Übergang die Parität. Da dies zweimal

geschieht, bleibt die Parität insgesamt erhalten. Bei größeren Molekülen verlieren die Auswahlregeln, beispielsweise durch eine zusätzliche Spin-Bahnkopplung, an Stringenz. Eigenzustände, deren Besetzungen ursprünglich nur im Ergebnis eines Einphotonenabsorptionsprozesses möglich waren, sind jetzt auch im Rahmen eines simultanen Zweiphotonenabsorptionsprozesses erreichbar. Daraus können differierende Linienformen der Ein- und Zweiphotonenabsorptionsspektren resultieren. Beispielsweise zeigt Rhodamin B bei der TPA eine Blauverschiebung der Absorptionsbanden bzw. bildet sich eine Absorptionsbande um 400 nm heraus, die bei der SPA nicht zu beobachten ist [9].



**Abb. 1: Termschema der Anregung eines Moleküls.** Der angeregte Zustand kann sowohl über Einphotonenabsorption (SPA) als auch über simultane Zweiphotonenabsorption (TPA) erreicht werden. Die energetischen Zustände bei der SPA und TPA sind aufgrund der Auswahlregeln voneinander verschieden.

Agieren mehrere Photonen simultan miteinander, so muss diese Interaktion innerhalb der Lebenszeit des virtuellen Niveaus erfolgen. Die Lebensdauer dieses Niveaus lässt sich aus der Heisenberg'schen Unschärferelation abschätzen.

$$\Delta E \cdot \Delta t \geq \hbar \text{ bzw. } \Delta \frac{c}{\lambda} \cdot \Delta t \geq \frac{1}{2\pi} \quad (2.6)$$

Hier ist  $E$  die Energie,  $t$  die Zeit und  $\hbar = h/2\pi$  mit der Planck-Konstante  $h$ . Für sichtbares Licht beträgt die Zeitunschärfe  $\Delta t \approx 10^{-15}$  s. Hierbei steht  $c$  für die Lichtgeschwindigkeit und  $\lambda$  für die halbe Wellenlänge des für den Übergang benötigten Photons.

In erster Näherung kann der Zweiphotonenabsorptionsquerschnitt  $\sigma_{2P}$  als das Quadrat des Einphotonenabsorptionsquerschnitts  $\sigma_{1P}$  multipliziert mit der Lebensdauer  $\Delta t$  des virtuellen

Niveaus abgeschätzt werden:  $\sigma_{2P} = \sigma_{1P}^2 \Delta t$  [4]. Dementsprechend ergibt sich der Dreiphotonenabsorptionsquerschnitt als Produkt der dritten Potenz von  $\sigma_{1P}$  und dem  $\Delta t$  von zwei virtuellen Niveaus:  $\sigma_{3P} = \sigma_{1P}^3 \Delta t^2$ . Die Absorptionsquerschnitte besitzen folgende Einheiten und Größenordnungen<sup>1</sup>:

$\sigma_{1P}$	$\sigma_{2P}$	$\sigma_{3P}$
$10^{-16} \frac{\text{cm}^2}{\text{Photon} \cdot \text{Molekül}}$	$10^{-50} \frac{\text{cm}^4 \text{s}}{\text{Photon} \cdot \text{Molekül}}$	$10^{-82} \frac{\text{cm}^6 \text{s}^2}{\text{Photon}^2 \cdot \text{Molekül}}$

**Tabelle 1: Größenordnung und Einheiten von Ein- und Mehrphotonenabsorptionsquerschnitten.**

Typische Anregungsleistungen für Anwendungen in der Laser-Scanning-Mikroskopie (LSM) sind für die Einphotonenanregung  $\approx 100 \mu\text{W}/\text{cm}^2$  und für die Mehrphotonenmikroskopie (MPM)  $10^6$ – $10^9 \text{W}/\text{cm}^2$  (Abschnitt 3.4).

### 2.3 Optische Effekte höherer Ordnung – Erzeugung der Zweiten Harmonischen

Als Spezialfall der parametrischen Verstärkung wird bei der Generation der Zweiten Harmonischen (SHG) die Grundwelle in eine Signalwelle der doppelten Frequenz umgesetzt. Für die SHG ist der zweite Term aus Gleichung (2.1) von Relevanz:

$$\vec{P}^{(2)} = \varepsilon_0 \chi^{(2)} \otimes \vec{E}_1(r) \cdot \vec{E}_2(r) \quad (2.7)$$

Die Suszeptibilität  $\chi^{(2)}$  zweiter Ordnung ist ein Tensor dritter Stufe mit  $3 \times 3 \times 3 = 27$  Einträgen, welche die Wechselwirkung von Materie und Licht charakterisieren. Durch Symmetrieüberlegungen kann die Anzahl unabhängiger Tensorelemente auf  $6 \times 3 = 18$  reduziert werden [10]. Weitere Symmetrieüberlegungen führen zu dem Ergebnis, dass ein SHG-Signal nur an Materialien beobachtet werden kann, die keine Inversionssymmetrie aufweisen [10, 11].

Deutlich wird dies bei räumlicher Inversion der Koordinaten  $r$  in Gleichung (2.7):

$$\vec{P}^{(2)} = \varepsilon_0 \chi^{(2)} \otimes \vec{E}_1(r) \cdot \vec{E}_2(r) \xrightarrow{r \rightarrow -r} -\vec{P}^{(2)} = \varepsilon_0 \chi^{(2)} \otimes [-\vec{E}_1(r)] \cdot [-\vec{E}_2(r)] \quad (2.8)$$

---

<sup>1</sup> Zu Ehren von Maria Göppert-Mayer gilt:  $1 \text{ GM} \equiv 10^{-50} \frac{\text{cm}^4 \text{s}}{\text{Photon} \cdot \text{Molekül}}$

Diese ist nur noch erfüllt, wenn  $\chi^{(2)} \equiv 0$  [11]. In diesem Fall ist jedoch auch die induzierte Polarisation gleich null, und folglich resultiert auch kein SHG-Signal.

Eine Betrachtung zum Entstehungsprozess eines SHG-Signals kann auf atomarer Ebene erfolgen. Innerhalb der Wechselwirkung mit einem elektromagnetischen Feld verhält sich jedes Atom wie ein oszillierender Dipol und strahlt bestimmte Frequenzen ab. Wenn die Strahlungsfelder von fundamentaler Wellenlänge und induzierter Dipolstrahlung so angepasst sind, dass sie über eine große Anzahl von Atomabständen konstruktiv interferieren, wird als Spezialfall der Summenfrequenzbildung Strahlung der doppelten Frequenz in Ausbreitungsrichtung des einfallenden Lichtfeldes emittiert. Aus Gründen der Impulserhaltung gilt, dass die Phasendifferenz zwischen ein- und ausfallender Welle gleich null ist [12]:

$$\Delta k = |k_2| - |2k_1| = 0 \quad (2.9)$$

Hier beschreibt  $|k| = n\omega/c$  den Wellenvektor, wobei  $n$  der Brechungsindex,  $\omega$  die Kreisfrequenz und  $c$  die Lichtgeschwindigkeit ist. Aufgrund der Dispersion im Material gilt im Allgemeinen die Beziehung:  $n(2\omega) \neq n(\omega)$ . Die Dispersion kann unter Ausnutzung des Effekts der Doppelbrechung kompensiert werden [10]. Je besser die Phasenanpassungsbedingung erfüllt ist, desto mehr Energie der fundamentalen Wellenlänge wird in das SHG-Signal konvertiert.

## 2.4 Auflösungsvermögen optischer Systeme

Eine Punktlichtquelle strahlt isotrop in alle Raumrichtungen Licht ab. Mit Hilfe eines optischen Elements kann davon jedoch nur ein Bruchteil erfasst werden. Der Sinus des halben Öffnungswinkels  $\alpha$  des optischen Elements multipliziert mit der Brechzahl  $n$  des umgebenden Mediums wird als numerische Apertur ( $N.A.$ ) bezeichnet:

$$N.A. = n \sin \frac{\alpha}{2} \quad (2.10)$$

Wird die Punktlichtquelle mit Hilfe des optischen Elements, welches typischerweise kreisförmig ist, auf einen Schirm abgebildet, ist ein kreisförmiges Airy-Beugungsbild zu beobachten. Dieses besteht aus einem zentralen hellen Spot (Maximum) gefolgt von alternierenden konzentrischen dunklen (Minima) und hellen (Maxima) Ringen (Abb. 2 und 3).

Der Radius  $r_{Airy}$  des ersten Minimums hängt von der Wellenlänge des Lichts und der  $N.A.$  des Objektivs ab:

$$r_{Airy} = d = 0.61 \frac{\lambda_0}{N.A.} \quad (2.11)$$

Nach dem Rayleigh-Kriterium können zwei benachbarte Strukturen gleicher Intensität dann noch lateral aufgelöst werden, wenn das Hauptmaximum der einen Struktur mit dem ersten Intensitätsminimum der anderen Struktur zusammenfällt. Der Abstand beider Objekte darf folglich nicht geringer als  $d$  sein. Gleichung (2.11) gilt für Objekte, die mit inkohärentem Licht beleuchtet werden. Für mit kohärentem Licht bestrahlte Objekte vergrößert sich das Auflösungslimit auf [13]:

$$d = 0.82 \frac{\lambda_0}{N.A.} \quad (2.12)$$

Neben den Hell-Dunkel-Kontrasten in lateraler Ausdehnung sind diese auch in axialer Richtung zu beobachten. Die daraus resultierende axiale Auflösung kann über die Betrachtung des dreidimensionalen Beugungsmusters der Punktlichtquelle definiert werden.

Das erste axiale Minimum  $z_{min}$  wird beobachtet bei:

$$z_{min} = \frac{2\lambda_0 n}{(N.A.)^2} \quad (2.13)$$

Zu beachten ist, dass die Tiefenauflösung linear vom Brechungsindex  $n$  des Immersionsmediums zwischen Objektiv und Probe und quadratisch vom Kehrwert der  $N.A.$  des Objektivs abhängig ist. Das Verhältnis von lateraler zu axialer Auflösung beträgt:

$$\frac{z_{min}}{r_{Airy}} = \frac{3,28 n}{N.A.} \quad (2.14)$$

Diese Werte gelten für ein ideales optisches System. Die in der Realität erreichbare Auflösung ist abhängig von der Qualität der optischen Komponenten, dem Bildkontrast und den Eigenschaften der Probe. Einfluss haben hier die Aberration, die Art der Beleuchtung bzw. die Anzahl der Signalphotonen und die Streuung des Signal- bzw. des Anregungslichts [14].

#### 2.4.1 Beschreibung der Abbildungseigenschaften eines optischen Systems

Die Abbildungseigenschaften eines optischen Systems können mit Hilfe der Punktbildfunktion  $h(\vec{x})$  („Point Spread Funktion“, PSF) quantifiziert werden. Es werden Effekte wie Beugung an Aperturen bzw. die Aberration an abbildenden Komponenten berücksichtigt.

Für Berechnungen von Beugungserscheinungen im Rahmen der klassischen Optik vereinfacht sich die PSF unter Annahme der folgenden Näherungen. In der Kirchoff'schen Näherung wird angenommen, dass das Feld vor und in der Apertur nicht veränderlich ist [15]. In der paraxia-

len Näherung werden nur kleine Abstände bzw. kleine Winkel zur optischen Achse zugelassen ( $\sin\alpha \cong \alpha$ ). In der Debye-Näherung werden nur geometrische Strahlengänge betrachtet. Insbesondere werden Beugungseffekte vernachlässigt. Im Folgenden soll unter Anwendung dieser Näherungen die räumliche Intensitätsverteilung der Abbildung einer Punktlichtquelle durch ein optisches System berechnet werden. Aufgrund der zylindrischen Symmetrie in einem solchen System ist ein Wechsel des Bezugssystems vorteilhaft. In den dimensionslosen Zylinderkoordinaten  $u$  und  $v$  kann die laterale Koordinate  $v$  geschrieben werden als:

$$v = \frac{2\pi}{\lambda} n \cdot \sin \frac{\alpha}{2} \sqrt{x^2 + y^2} = \frac{2\pi}{\lambda} N.A. \cdot r \quad (2.15)$$

Hierbei ist  $r = \sqrt{x^2 + y^2}$  der Abstand zur optischen Achse.

Die axiale Koordinate  $u$  mit  $z$  als Abstand zum Brennpunkt kann geschrieben werden als:

$$u = \frac{2\pi}{\lambda} n^2 \cdot \sin^2 \frac{\alpha}{2} z = \frac{2\pi}{\lambda} \frac{(N.A.)^2}{n} z \quad (2.16)$$

Damit ist die aktuelle Feldverteilung im Fokalvolumen gegeben durch [13]:

$$h(u, v, \Psi) = A \cdot \exp \left[ \frac{i u}{4 \sin \frac{2\alpha}{2}} \int_0^1 \int_0^{2\pi} P(\rho, \Theta) \times \exp \left( -i \left( v \rho \cos(\Theta - \Psi) + \frac{u \rho^2}{2} \right) \right) \rho d\rho d\Theta \right] \quad (2.17)$$

Mögliche Aberrationen des optischen Systems werden durch die komplexe Pupillenfunktion  $P(\rho, \Theta)$  berücksichtigt ( $\rho$  entspricht der radialen Koordinate in der Pupillenebene und  $\Theta$  dem Azimut) [13]. Für den aberrationsfreien Fall ist  $P = 1$  und Gleichung (2.17) vereinfacht sich zu [16]:

$$h(u, v) = 2\pi \cdot A \cdot \exp \left[ \frac{i u}{4 \sin \frac{2\alpha}{2}} \int_0^1 \exp \left( -i \frac{u \rho^2}{2} \right) J_0(v\rho) \rho d\rho \right] \quad (2.18)$$

Hierbei ist

$$J_m(v) = \frac{i^{-m}}{2\pi} \int_0^{2\pi} \exp(i(m\Theta + v \cos \Theta)) d\Theta \quad (2.19)$$

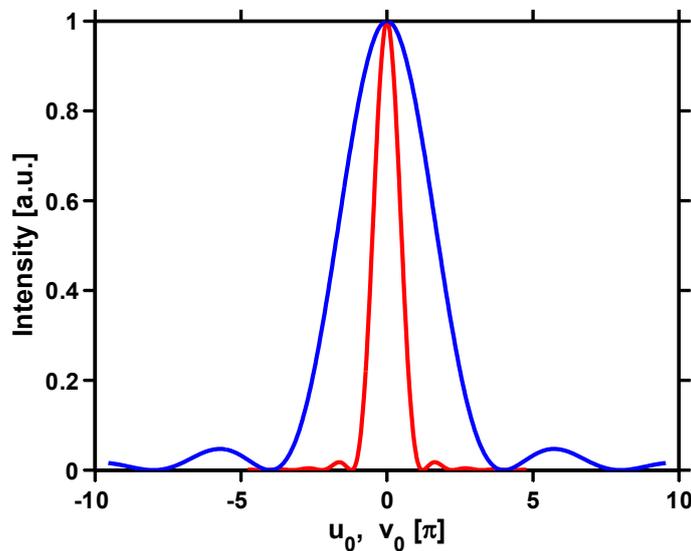
die Besselfunktion  $m$ -ter Ordnung.

Um das Zentrum des Fokalvolumens ergeben sich dann die Intensitätsverteilungen in lateraler und axialer Richtung [13]:

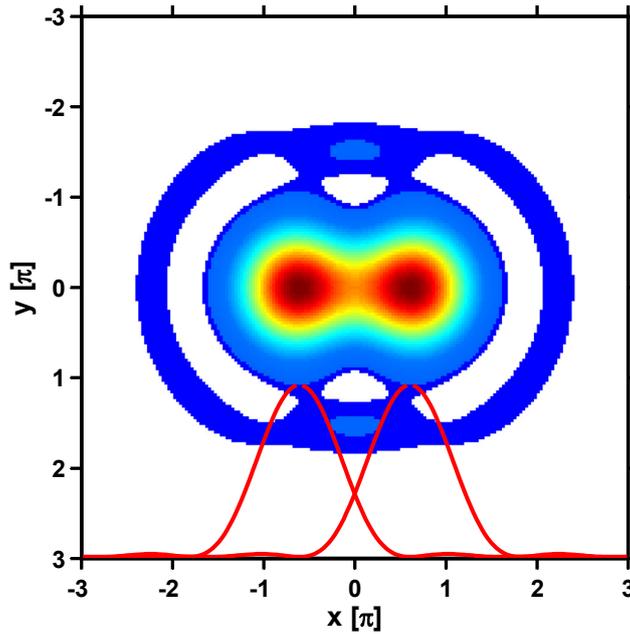
Laterale Komponente: 
$$I(0, v) = \left( \frac{2J_1(v)}{v} \right)^2 I_0 \quad (2.20)$$

Axiale Komponente: 
$$I(u, 0) = \left( \frac{4 \sin\left(\frac{u}{4}\right)}{u} \right)^2 I_0 \quad (2.21)$$

In Abb. 2 sind die nach Gleichung (2.20) und (2.21) berechneten Intensitätsverteilungen dargestellt. Sie zeigen ein typisches Beugungsbild mit einem zentralen Maximum und mehreren benachbarten lokalen Extrema. Die laterale Verteilung hat das erste lokale Minimum an der Stelle  $v_0(\pi) = 1,22\pi$ . Mit Gleichung (2.15) wird der Zusammenhang zum in Gleichung (2.11) aufgeführten lateralen Auflösungsvermögen hergestellt. Die axiale Verteilung hat das erste lokale Minimum an der Stelle  $u_0(\pi) = 4\pi$ . Mit Gleichung (2.16) ergibt sich das in Gleichung (2.13) definierte axiale Auflösungsvermögen. Zwei Punktlichtquellen sind gerade dann noch auflösbar, wenn das Intensitätsmaximum der einen mit dem ersten Minimum der anderen Lichtquelle zusammenfällt (Abb. 3).



**Abb. 2: Berechnete laterale (rot) bzw. axiale (blau) Intensitätsverteilung in Abhängigkeit der Ortskoordinate als Vielfaches von  $\pi$ .** Das erste Minimum der lateralen Verteilung befindet sich an der Position  $v_0(\pi) = 1,22\pi$ , das der axialen Verteilung an der Position  $u_0(\pi) = 4\pi$ .



**Abb. 3:** Nach Gleichung (2.20) berechnetes Beugungsbild mit dem Abstand  $\Delta\nu = 1,22\pi$ , bzw.  $r_0$ . In Falschfarben dargestellt sind die berechneten Intensitätswerte, blau: niedrige Intensitäten, rot: hohe Intensitäten. Als Schnittbild ist die Intensität in Abhängigkeit der Ortskoordinate  $x$  eingezeichnet (rot).

Für ein reales optisches System ist die vorhergehende Betrachtung jedoch nur innerhalb der angegebenen Näherungen gültig. Weiterhin ist die Annahme einer Punktlichtquelle unzutreffend. Im Allgemeinen wird in einem optischen Mikroskop das Objekt beleuchtet. Die gesamten Abbildungseigenschaften des optischen Systems ergeben sich daher aus dem Produkt der PSF des beleuchtenden und der PSF des abbildenden Systems  $PSF_{Ges}(x,y,z) = PSF_{Bel}(x,y,z) \cdot PSF_{Abb}(x,y,z)$ .

In einem Laser-Scanning-Mikroskop beschreibt die  $PSF_{Bel}$  die Lichtverteilung des Laserspots. Die  $PSF_{Bel}$  ist abhängig von der Wellenlänge des Anregungslichts, der  $N.A.$  des Mikroskopobjektivs, der Beugung des Anregungslichts an der Objektivpupille, den im optischen System hervorgerufenen Aberrationen und den Probeneigenschaften. Mit zunehmender Eindringtiefe und in Abhängigkeit der Streueigenschaften der Probe bzw. des umgebenden Mediums werden die  $PSF_{Bel}$  und  $PSF_{Abb}$  verformt [17].

Bei der Streuung kann zwischen der Rayleigh- und der Mie-Streuung unterschieden werden. Die Rayleigh-Streuung erfolgt an Objekten (Streuzentren), deren geometrische Ausdehnung im Vergleich zur Wellenlänge des verwendeten Lichtes sehr viel kleiner ist. Die Intensität des

Streusignale sind proportional zum Kehrwert der vierten Potenz der Wellenlänge:  $I \propto 1/\lambda^4$ . Die Mie-Streuung ist weniger stark von der Wellenlänge abhängig und tritt an Objekten auf, die größer als ein Zehntel der verwendeten Wellenlänge sind. In der Mikroskopie von biologischen Proben dominiert die Rayleigh-Streuung.

#### 2.4.2 Abschätzung des Fluoreszenzphotonenflusses unter den experimentellen Bedingungen der Laser-Scanning-Mikroskopie

Die Bildqualität in der Laser-Scanning-Mikroskopie hängt neben dem Auflösungsvermögen wesentlich von der Anzahl der zur Verfügung stehenden Signalphotonen ab.

Die Zahl der innerhalb des Anregungsvolumens pro Zeit erzeugten Fluoreszenzphotonen  $FP$  ergibt sich zu:

$$FP = \eta \int_V d^3r C \sigma_{IP} I(\vec{r}, t) \quad (2.22)$$

Es beschreiben  $\eta$  die Fluoreszenzquantenausbeute,  $\sigma_{IP}$  den Absorptionsquerschnitt,  $I(\vec{r}, t)$  den Anregungsphotonenfluss und  $C = c(\vec{r}, t)N_A$  die Zahl der Moleküle innerhalb des Fokaltvolumens. Hierbei sind  $c$  die Stoffkonzentration und  $N_A$  die Avogadrokonstante. Unter Berücksichtigung der Detektionseffizienz  $\phi$  des gesamten Detektorsystems (Raumwinkel des Objektivs, Transmissionsverluste) ergibt sich die Zahl der nachweisbaren Signalphotonen zu  $p = \phi \cdot FP$ .

Ein typisches Beispiel ist die Mikroskopie einer mit Fluoreszein angefärbten biologischen Probe ( $c = 1\text{--}10$  nMol/l). Die Anregungsleistungen in einem konfokalen Laser-Scanning-Mikroskop (siehe Abschnitt 3) variieren um eine Größenordnung und liegen im Bereich von  $100 \mu\text{W}$ – $1$  mW [18, 19]. Bei einer Wellenlänge von  $488$  nm entspricht der Fokaldurchmesser in etwa dem Durchmesser des Beugungsscheibchens  $2r_{\text{Airy}}$  von  $0,5 \mu\text{m}$ . Das Anregungsfokaltvolumen beträgt demnach  $\approx 1 \cdot 10^{-15}$  l und enthält  $C = 6$  Fluorophormoleküle. Mit einem Anregungsphotonenfluss von  $I = 6,34 \cdot 10^{23}$  Photonen/cm<sup>2</sup>s und einem Absorptionsquerschnitt von  $\sigma_{IP} = 2,55 \cdot 10^{-16}$  cm<sup>2</sup> werden demnach  $1 \cdot 10^9$  Photonen/s absorbiert. Bei einer Integrationszeit pro Bildpixel von  $2 \mu\text{s}$ , einer Fluoreszenzquantenausbeute  $\eta = 0,8$  und der Detektionseffizienz  $\phi = 0,2$  erreichen nur  $p \approx 400$  Photonen/Pixel den Photomultiplier (PMT). Mit einer Quanteneffizienz des Photomultipliers von  $10\%$  stehen  $\approx 40$  Signalelektronen pro Pixel an der Photokathode zur Verfügung. Dieses Ergebnis entspricht in etwa den Verhältnissen, wie sie bei einer qualitativ guten biologischen Probe herrschen. Im realen Experiment hängt das Ergebnis von vielen Faktoren ab. Zu nennen sind hier die Konzentration und die

Verteilung der Fluorophore, aber auch deren photophysikalische Eigenschaften. Nicht zuletzt spielen natürlich auch Qualität und Eignung der optischen Komponenten bzw. Anregungsquellen eine entscheidende Rolle [18]. Letztlich kann festgestellt werden, dass in den meisten Anwendungen der konfokalen Mikroskopie mit einer sehr geringen Zahl ( $p < 1000$ ) von Signalphotonen pro Pixel zu rechnen ist. Der Fluoreszenzphotonenfluss skaliert zunächst linear mit dem Anregungsphotonenfluss. Bei hohen Anregungsphotonenflüssen müssen jedoch farbstoffspezifische Sättigungs- und Ausbleicheffekte berücksichtigt werden.

### 2.4.3 Sättigungs- und Ausbleicheffekte der Fluorophore bei hohen Anregungsintensitäten

Die Emissionsrate eines Fluorophors ist durch die Zahl von möglichen Anregungs- und Relaxationsprozessen pro Zeiteinheit definiert. Die maximale Emissionsrate ist daher durch die Lebensdauer der beteiligten angeregten Zustände festgelegt. Für Fluoreszein mit einer Fluoreszenzlebensdauer von  $\approx 4,4$  ns ergibt sich eine maximale Emissionsrate von  $FP_{max} = 2,27 \cdot 10^8$  Photonen/s. Dieser Wert wird unter den im vorherigen Abschnitt definierten experimentellen Bedingungen bei dem maximalen Anregungsphotonenfluss von  $1,3 \cdot 10^{24}$  Photonen/cm<sup>2</sup>s bzw. einer Anregungsleistung von 1 mW erreicht [19]. Eine weitere Erhöhung der Anregungsleistung führt nicht zu einem höheren Fluoreszenzsignal, da der Grundzustand des Fluorophors zunehmend entleert wird. Fluoreszenzsättigung tritt folglich verstärkt bei hohen Anregungsphotonenflüssen bzw. bei Farbstoffen mit hohem Absorptionsquerschnitt und langer Fluoreszenzlebensdauer auf.

Ein Farbstoffmolekül kann ohne zu dissoziieren nur eine endliche Zahl  $z$  von Fluoreszenzzyklen durchlaufen. Diese ergibt sich aus dem Quotienten der Fluoreszenzquantenausbeute  $\eta$  und der Quanteneffizienz  $Q_e$  zu  $z = \eta/Q_e$ . Die Lebensdauer des Moleküls  $t$  wird durch den Quotienten aus der Zahl der Fluoreszenzzyklen und der maximalen Emissionsrate zu  $t = z/FP_{max}$  beschrieben.

Das Fluoreszeinmolekül ( $\eta = 0,8$  und  $Q_e = 2,7 \cdot 10^{-5}$ ) wird bei dem oben angegebenen maximalen Anregungsphotonenfluss  $z \approx 26.000$  Fluoreszenzzyklen durchlaufen und nach einer Dauer von  $t \approx 115$   $\mu$ s zerfallen [19]. Längere Integrationszeiten werden demnach in der Mikroskopie nicht zu einer Verbesserung des Signals führen.

### 2.4.4 Bildkontrast und Signalverarbeitung

Neben den optischen Limitierungen durch das Auflösungsvermögen wird die Abbildungsqualität in Abhängigkeit der Nachweismethode durch systemeigene Rauschquellen begrenzt.

Insbesondere bei der digitalen Signalverarbeitung hat die geringe Zahl der Signalphotonen ( $p < 1000$ ) Konsequenzen. In diesem Abschnitt erfolgt ein Überblick über den Einfluss dieser Faktoren. Weiterführende Betrachtungen sind gegeben in [19-21].

Die Erfassung der Informationen einer mikroskopischen Abbildung kann unter Verwendung des menschlichen Auges oder eines elektronischen Geräts, wie beispielsweise eines Photomultipliers (PMT) bzw. einer Charged Coupled Device-(CCD-)Kamera, vorgenommen werden. Eine parallele Abtastung einer Weitfeldabbildung kann mit Hilfe einer CCD-Kamera erfolgen, dabei müssen Größe und Anzahl der Pixel optimal gewählt werden (parallele Datenerfassung). Das punktweise Abtasten und Digitalisieren von Strukturen in der Laser-Scanning-Mikroskopie (LSM) erfordert eine Anpassung der Anzahl der Abtastpunkte (serielle Datenerfassung). Bei der LSM wird das Signallicht häufig mit Photomultipliern (PMT) detektiert. Diese wandeln die auftreffenden Photonen in einen elektrischen Strom um. Hierbei sind die Orts- und Zeitkoordinate des kontinuierlich über die Probe geführten Anregungsstrahls bekannt. Das analoge Signal des PMT wird mit einem Analog/Digital-(A/D-)Wandler digitalisiert. Es können hier zwei Arten der Signalgewinnung unterschieden werden. Bei der Punktabtastung („Sampling“) ist die Dauer der Messwerterfassung klein gegenüber der Verweildauer des Anregungsstrahls im Bildpixel. Folglich kann eine hohe Ortsauflösung erreicht werden. Demgegenüber steht die Integration, bei der das Messsignal proportional zu den in der Pixelverweildauer des Anregungsstrahls erzeugten Signalphotonen ist. Aufgrund der Strahlbewegung führt dies jedoch zu einem Verlust von Ortsinformationen. Da im Allgemeinen nur wenige Signalphotonen pro Bildpixel zur Verfügung stehen (siehe Abschnitt 2.4.2), wird bei der LSM meist mit dem Integrationsverfahren gearbeitet.

Entsprechen dem Nyquist-Shannon-Abtasttheorem muss für eine optimale Bilddatenqualität die kleinste aufzulösende Probenstruktur auf 2,3–4 Pixel abgebildet werden [19, 21]. Ist die Anzahl der Abtastpunkte kleiner, gehen Strukturinformationen verloren. Dieser Umstand wird als Unterabtastung bezeichnet. Eine größere Anzahl von Abtastpunkten bedeutet hingegen eine größere Anzahl von Messwerten ohne zusätzlichen Informationsgewinn. Bei sonst konstanten Einstellungen wird hierbei die Verweildauer des Anregungslichts pro Pixel reduziert. Resultierend kommt es zum Verlust von Signalphotonen und der Erhöhung des Bildrauschens. Bildrauschen und Kontrast sind eng miteinander verknüpft. Unter dem Kontrast wird das Verhältnis zwischen dem Signalwert eines Bildpunktes und den Signalwerten der umliegenden Bildpunkte verstanden. Nach dem Rose-Kriterium muss das Signal-zu-Rausch-Verhältnis (*SNR*) mindestens fünf zu eins betragen, damit die Bilddetails physiologisch differenziert

wahrgenommen werden können [22]. Die Quellen des Signalrauschens in der LSM sind vor allem statistischer Natur wie das Detektorrauschen (Dunkelrauschen, Sekundäremissionsrauschen), das Rauschen der Anregungslichtquelle und das Schrotrauschen. Weiterhin besteht die Möglichkeit, dass der Abbildung systematisches Rauschen aufgeprägt wird, dessen Ursache beispielsweise mechanische Schwingungen der optischen Komponenten sind.

Das Detektorrauschen wird durch die Erzeugung von thermischen Dunkelektronen  $N_d$  im PMT verursacht und schwankt statistisch um  $\sqrt{N_d}$ . Das Dunkelrauschen eines PMT ist für die Beschleunigungsspannung von 1000 V definiert und verliert mit abnehmender Spannung an Bedeutung. Durch Kühlung des PMT kann das Dunkelrauschen weiter minimiert werden.

Das Rauschen der Anregungsquelle ist relevant im Bereich hoher Photonenzahlen ( $p < 10000$ ).

Das Schrotrauschen beschreibt die durch die Poisson-Statistik limitierte Möglichkeit des quantitativen Nachweises von Photonen, die auf der Interaktion von Quantenobjekten mit einem Messgerät beruht. Hier ist das Verhältnis von Signal und Rauschen als  $SNR = \sqrt{p}$  definiert. Für eine Photonenzahl  $p < 1000$  muss die Signalemission nicht mehr als kontinuierlicher, sondern als stochastischer Prozess betrachtet werden. Das Auflösungsvermögen des optischen Systems wird nun von zufälligen Ereignissen abhängig. Daraus folgend können bei der Messung nicht alle Strukturdetails der Probe aufgelöst werden. Es ist daher sinnvoll, anstelle von Auflösung von der Auflösungswahrscheinlichkeit zu sprechen [19]. Der Einfluss des Schrotrauschens nimmt mit größerer Anzahl zu detektierender Photonen ab. Das gesamte  $SNR$  ergibt sich zu [19]:

$$SNR = \sqrt{\frac{N^2}{se^2(N + N_d)(1 + q^2)}} \quad (2.23)$$

Hierbei ist  $N$  die Photoelektronenzahl und  $N_d$  die Dunkelektronenzahl innerhalb der Messzeit in einem Pixel. Weiterhin ist  $se$  ein multiplikativer Rauschfaktor der Sekundäremission des PMT und  $q$  die Peak-zu-Peak-Stabilität der Anregungslichtquelle (Laser).

Um ein hohes  $SNR$  zu realisieren, sollten Fluorophore mit einem hohen Absorptionsquerschnitt, einer hohen Quantenausbeute und einer hohen Photostabilität verwendet werden.

Eine Verbesserung des  $SNR$  einer mikroskopischen Abbildung kann auch erfolgen, indem eine Integration des Signals über mehrere Messungen durchgeführt wird. Alternativ kann die

Pixelverweilzeit erhöht werden. Hierbei ist im Allgemeinen der Integration der Vorzug zu geben, da Bleich- und Sättigungseffekte der Fluorophore eher vermieden werden [19].

Im Experiment sind jedoch die einsetzbaren Anregungsintensitäten bzw. die verfügbare Aufnahmezeit limitiert. Neben der Photostabilität der Fluorophore spielen probenschädigende Faktoren, wie die Probenerwärmung oder photophysikalische Veränderungen (bspw. die Bildung von Zellgiften), eine Rolle. Insbesondere bei Messungen *in-vivo* muss die Vitalität der Proben über den Messzeitraum sichergestellt sein. Weiterhin muss die Probe frei von Vibrationen oder Bewegungen sein. Daher werden in der LSM kurze Belichtungszeiten von wenigen Mikrosekunden pro Bildpunkt verwendet. Das bedeutet, dass nur eine geringe Zahl von Signalphotonen zur Verfügung steht. Ein Mikroskopsystem muss folglich so optimiert werden, dass es unter den gegebenen Randbedingungen möglichst viele Signalphotonen detektiert.

### **3 Methoden der Mikroskopie**

Das Auflösungsvermögen eines optischen Systems hängt von der Wellenlänge des verwendeten Lichts ab. Im Folgenden wird die Lichtmikroskopie im sichtbaren Spektralbereich angewandt. Für die Beleuchtung bzw. Signaldetektion gibt es verschiedene Konfigurationen des Mikroskopaufbaus. Erfolgen Beleuchtung und Signaldetektion aus derselben Richtung mit nur einem Objektiv, wird von der Epi-Detektionsgeometrie gesprochen. Alternativ wird das Signal nach Transmission durch die Probe detektiert (Transmissionsgeometrie).

Mikroskopiesysteme können in zwei Klassen aufgeteilt werden, die Weitfeldmikroskopie und die scannende Mikroskopie.

#### **3.1 Weitfeldmikroskopie**

In der Weitfeldmikroskopie wird ein bestimmter Bereich eines Probenobjekts unter Verwendung eines Objektivs vergrößert abgebildet. Zur Signalgebung können beispielsweise die Fluoreszenz oder durch veränderliche Lichttransmission hervorgerufene Hell-Dunkel-Kontraste dienen.

Das laterale Auflösungsvermögen in der Weitfeldmikroskopie kann durch Verfahren wie die strukturierte Beleuchtungsmikroskopie („Structured Illumination Microscopy“, SIM) gesteigert werden. Hierbei wird das Anregungslicht durch das Einbringen eines Gitters in den Anregungsstrahlengang oder durch Interferenz zweier kohärenter Laserstrahlen räumlich moduliert. Durch rechentechnische Auswertung der entsprechend modulierten Fluoreszenzab-

bildungen kann die erreichbare laterale Auflösung maximal um den Faktor zwei gesteigert werden. Aufgrund des Geschwindigkeitsvorteils gegenüber der konfokalen Mikroskopie ist diese Methode insbesondere für Lebendzellanwendungen geeignet [23]. In der Weitfeldmikroskopie können die Untersuchungsobjekte im Allgemeinen nur mit geringer Tiefenauflösung und oberflächennah betrachtet werden.

### **3.2 Laser-Scanning-Mikroskopie**

In der scannenden Mikroskopie wird das Bild sequentiell aus einzelnen Bildpunkten zusammengesetzt. Eine häufige Anwendung ist die Analyse von Fluoreszenzsignalen. Hier werden zur Fluoreszenzanregung innerhalb eines geringstmöglichen Fokalvolumens meist gut fokussierbare Lichtquellen, wie z.B. Laser, eingesetzt. Durch Platzierung einer Lochblende im Emissionsstrahlengang kann die räumliche Auflösung in der Lasers-Scanning-Mikroskopie (LSM) gesteigert werden, da störendes „Out of Focus“-Licht unterdrückt wird. Es muss hierbei die Balance zwischen einem möglichst geringen Lochblendendurchmesser und einer ausreichenden Anzahl detektierbarer Signalphotonen gefunden werden, da das Auflösungsvermögen von der Bildqualität bzw. dem Kontrastverhältnis bestimmt wird (siehe Abschnitt 2.4.4). In der Entwicklung der LSM haben sich zwei Möglichkeiten für die Positionierung des Fokalvolumens in der Probe etabliert. Eine Möglichkeit besteht darin, die Probe zum örtlich fixierten Fokalvolumen zu bewegen. Aufgrund der mechanischen Trägheit des Probenhaltungssystems benötigt dieses Verfahren relativ viel Zeit für die Messwertgewinnung. Wesentlich schneller ist es, die Probe zu fixieren und die Position des Fokalvolumens zu variieren. Mit galvanischen Spiegeln wird der Anregungsstrahl unter veränderlichem Winkel zur optischen Achse des Objektivs über das Bildfeld geführt. Diese Methode stellt jedoch höhere Anforderungen an die Bildfeldkorrektur und ist erst mit modernen Hochleistungsobjektiven anwendbar geworden. Eine Erhöhung der Bildaufnahmegeschwindigkeit kann durch Parallelisieren der Bildpunkterfassung unter Verwendung von Mikrolinsen-Arrays in Verbindung mit Vielkanaldetektoren erreicht werden. Durch die Auswahl eines geeigneten Lochblendendurchmessers kann bei linearen Anregungsbedingungen eine maximale laterale bzw. axiale Auflösung erreicht werden, die der Beugungsgrenze (Abbe-Limit) entspricht [16].

Als Variante der konfokalen Mikroskopie bietet die 4Pi-Mikroskopie die Möglichkeit, die axiale Auflösung etwa um den Faktor vier bis fünf auf 100–150 nm zu erhöhen [24]. Hierbei werden zwei gegenüberliegende Objektive mit hoher numerischer Apertur auf der optischen Achse angeordnet. Durch Interferenz der beiden Anregungsfoci wird das effektive Fokalvolumen reduziert. Weiterhin kann das von der Probe emittierte Licht in einem größeren

Raumwinkel detektiert werden. Neben dem komplexen apparativen Aufbau hat diese Methode den Nachteil, dass die Schichtdicke der zu untersuchenden Probe gering sein muss.

Die nichtlineare LSM, bekannt als Mehrphotonenmikroskopie (MPM; Zwei- oder Dreiphotonen-, SHG-Prozesse), bietet die Möglichkeit, in axialer Richtung die Auflösung signifikant zu erhöhen. Dabei kann auf die Verwendung einer Lochblende im Strahlengang verzichtet werden. Die MPM ist von zentraler Bedeutung für diese Arbeit und wird im Abschnitt 3.4 detailliert betrachtet.

Alle bis hier vorgestellten Methoden sind prinzipiell beugungsbegrenzt, und es gelten die in Gleichung (2.11) und (2.12) definierten Auflösungsgrenzen.

### **3.3 Superresolution-Mikroskopie**

Bei der Betrachtung von Mikroskopiemethoden, die das Auflösungsvermögen signifikant steigern, ist eine Unterscheidung zwischen Anwendungen im Nah- bzw. Fernfeld sinnvoll. Für das optische Nahfeld soll als ein Beispiel die optische Rasternahfeldmikroskopie („Scanning Nearfield Optical Microscopy“, SNOM) ausführlicher dargestellt werden. Hierbei wird nach dem Prinzip des Rasterkraftmikroskops eine Sonde im Abstand des optischen Nahfeldes über die Probe geführt. Abhängig von der Sondengeometrie können laterale Auflösungen bis zu 30 nm erreicht werden [25]. Nachteilig sind die speziellen Anforderungen an die Probenpräparation und die vergleichsweise langen Messzeiten. Da die Bildqualität auch von der exakten Abstandspositionierung der Sonde zur Probe abhängt, ist die Wahrscheinlichkeit von Messartefakten relativ groß. Die Auflösung der Probenstrukturen in axialer Richtung ist nicht möglich. Für eine Anwendung des optischen Nahfeldes im sichtbaren Spektralbereich in der Weitfeldmikroskopie gibt es neben einigen theoretischen Konzepten [26, 27] bereits erste experimentelle Ansätze [28].

Aufgrund der einfacheren experimentellen Gegebenheiten verwenden Mikroskopiesysteme meist das optische Fernfeld zur Bildgebung. Die „Stimulated Emission Depletion“- (STED-) Mikroskopie ist ein scannendes Verfahren, in dem die gezielte Fluoreszenzlöschung eines Fluorophors durch ein zweites Strahlungsfeld geeigneter Energie ausgenutzt wird. Ein Anregungsstrahl mit gaußförmigem Strahlprofil wird zur Fluoreszenzanregung der Probe verwendet. Der fluoreszierende Bereich kann verkleinert werden, wenn zusätzlich ein ringförmiger („Donut-Mode“) Laserstrahl geeigneter Wellenlänge zur Fluoreszenzlöschung auf den gleichen Bildpunkt gerichtet wird. In Abhängigkeit von der Intensität des ringförmigen „Abregungsstrahls“ kann der verbleibende Fluoreszenzbereich theoretisch beliebig klein wer-

den. Begrenzend wirken hier die Fluorophoreigenschaften, die idealerweise eine hohe Photostabilität aufweisen bzw. viele Anregungszyklen ermöglichen sollten. Das STED-Konzept ist analog der konfokalen Mikroskopie parallelisierbar und kann zur Erhöhung der axialen Auflösung auf die 4Pi-STED-Konfiguration erweitert werden.

Eine weitere Möglichkeit zur Mikroskopie im Weitfeldmodus weit unterhalb des Beugungslimits wurde 2006 parallel von drei Gruppen entwickelt. Dieses Verfahren wird als photoaktivierte [Fluoreszenz]-Lokalisationsmikroskopie („[Fluorescence] Photoactivated Localization Microscopy“, [F]PALM) [29, 30] oder als statistische optische Rekonstruktionsmikroskopie („Statistical Optical Reconstruction Microscopy“, STORM) bezeichnet [31]. Das Funktionsprinzip basiert auf örtlich separierten Fluorophoren, die aufgrund externer Einflüsse bzw. statistischen Verhaltens zwischen dem fluoreszierenden und nichtfluoreszierenden Zustand wechseln. Der Wechsel des Fluorophorzustandes kann zum Beispiel durch zwei chemische Zustände bzw. Verwendung von Licht zweier Spektralbereiche erreicht werden. Durch die Kenntnis, dass lediglich vereinzelte Moleküle mit einem Abstand größer dem klassischen Auflösungsvermögen (Abschnitt 2.4) in den fluoreszierenden Zustand versetzt werden, kann deren Ort durch mathematische Algorithmen bestimmt werden. Durch sequenzielles Wiederholen der Prozedur können die Ortsinformationen der separierten Fluorophore nacheinander zu einem Gesamtbild zusammengesetzt werden. Die erreichbare laterale Auflösung liegt im Größenordnungsbereich von  $\approx 10$  nm. Prinzipiell ist das Verfahren auch in axialer Richtung mit einer Auflösung bis zu 50 nm anwendbar [32].

Die hier vorgestellten Methoden zur hochauflösenden Mikroskopie setzen teilweise anspruchsvolle technische Ausstattungen, Fluorophore mit besonderen Eigenschaften oder aufwendige Probenaufbereitung voraus. Im Vorgriff auf die nachfolgenden Kapitel wurde die Mehrphotonenmikroskopie als die mit der besten Eignung in Bezug auf Signalgebung, Analysegeschwindigkeit, Probenpräparation und erreichbarer Ortsauflösung identifiziert.

### **3.4 Nichtlineare Mikroskopie**

Die am meisten genutzten Methoden der nichtlinearen Mikroskopie sind die zweiphotonenangeregte Fluoreszenzmikroskopie (TPFM) und die SHG-Mikroskopie. In beiden Fällen kommen zur Signalerzeugung hohe elektromagnetische Feldstärken zum Einsatz. Diese werden durch starke Fokussierung eines Laserstrahls mit hochaperturigen Objektiven im Fokolvolumen erreicht. Ausschließlich dort findet die Erzeugung des Signallichts statt und im Gegensatz zur konfokalen Mikroskopie kann bei hohem Kontrastverhältnis auf den Einsatz einer konfokalen Blende verzichtet werden. Dies führt zu einem Signalgewinn, da alle, auch

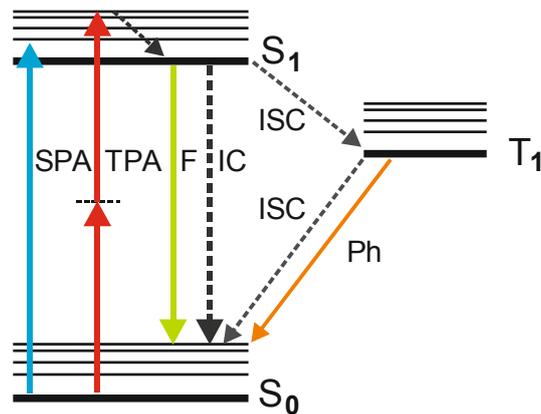
mehrfachgestreute Signalphotonen, zur Bilderzeugung genutzt werden können. Die Anwendung von Lichtpulsen im Femtosekundenbereich senkt den mittleren Energieeintrag bei gleichzeitiger Beibehaltung der für die nichtlineare Wechselwirkung benötigten hohen Feldstärken. Nichtlineare Sekundäreffekte, wie Photoschädigung oder Plasmabildung, werden durch die Begrenzung der maximalen Anregungsleistungen  $\leq 10^6\text{--}10^9\text{ W/cm}^2$  vermieden [33, 34]. Im Folgenden werden die TPFM und die SHG-Mikroskopie vorgestellt, anschließend wird der Einfluss der Dispersion der optischen Komponenten auf die Laserpulse bzw. die Signalgebung betrachtet.

### 3.4.1 Nichtlineare Fluoreszenzmikroskopie

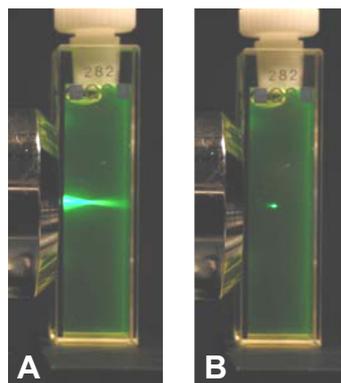
Im Gegensatz zur linearen konfokalen Mikroskopie erfolgt bei der zweiphotonenangeregten Fluoreszenzmikroskopie (TPFM) die Anregung mit Strahlungsfeldern im roten bzw. nahen infraroten Spektralbereich (Abb. 4). Dies führt zunächst zu einem schlechteren Auflösungsvermögen (Abschnitt 2.4). Aufgrund des gesteigerten Kontrastverhältnisses wird jedoch bei der Abbildung eines realen biologischen Systems meist eine vergleichbare laterale Auflösung erreicht. Die axiale Auflösung und die Eindringtiefe können gegenüber der konfokalen Mikroskopie erheblich gesteigert werden, da außerhalb des Fokalvolumens keine signifikante Absorption bzw. Fluoreszenz zu erwarten ist. In Abb. 5 ist die höhere axiale Auflösung in einem Vergleich des Fluoreszenzvolumens einer Coumarin-47-Lösung nach erfolgter Ein- und Zweiphotonenabsorption (TPA) illustriert. Ein weiterer Vorteil der nichtlinearen Mikroskopie ist die verminderte Streuung des Anregungslichts. Im Vergleich zur linearen konfokalen Mikroskopie werden daher hohe Eindringtiefen erreicht. Abhängig von den Streueigenschaften der Probe bzw. der Qualität der verwendeten Optiken liegen die Eindringtiefen bei der nichtlinearen Mikroskopie im Bereich von 5–60  $\mu\text{m}$  [35] bis hin zu einigen 100  $\mu\text{m}$  [36]. Aufgrund der geringen Absorption in biologischem Gewebe und der geringen Beeinflussung durch Streuung wird der zwischen 750 nm und 1100 nm liegende Spektralbereich als „optisches Fenster“ bezeichnet.

In der TPFM werden diverse Anregungsquellen und Detektoren eingesetzt [37]. Hervorragend eignen sich spektral durchstimmbare Titan-Saphir-Femtosekunden-(Ti:Sa-fs-)Laser [34], wobei gepulste Lasersysteme mit Pulswiederholraten im MHz-Bereich von Vorteil sind, da hier der zeitliche Abstand zweier Laserpulse größer als die Fluoreszenzlebensdauer ist und die maximal mögliche Emissionsrate erreicht wird. Die Zweiphotonenabsorptionsquerschnitte  $\sigma_{2p}$  der verwendeten Fluorophore liegen im Bereich von 1–300 GM [9, 38]. Interessant für Anwendungen in den Biowissenschaften sind das grün fluoreszierende Protein (GFP) und

seine für verschiedene Spektralbereiche modifizierten Versionen ( $1 \text{ GM} < \sigma_{2P} < 200 \text{ GM}$ ) [34]. Besonders große Zweiphotonenabsorptionsquerschnitte besitzen wasserlösliche Quantenpunkte, wie CdSe-ZnS mit  $\sigma_{2P} < 50.000 \text{ GM}$  [39]. Wohingegen endogene Fluorophore wie beispielsweise NADH nur sehr kleine Querschnitte  $\sigma_{2P} < 10^{-4} \text{ GM}$  aufweisen [9, 34, 40], welche jedoch für die Bildgebung bereits ausreichend sind [41, 42].



**Abb. 4: Termschema eines Moleküls: Anregung und mögliche Relaxationskanäle.** Nach erfolgter Einphotonenabsorption (SPA) bzw. nach simultaner Zweiphotonenabsorption (TPA) kann das Molekül strahlend (F) bzw. strahlungslos durch interne Konversion (IC) relaxieren. Weiterhin besteht die Möglichkeit, durch Intersystemcrossing (ISC) einen Tripletzustand zu bevölkern und von dort strahlend durch Phosphoreszenz (Ph) bzw. strahlungslos durch ISC zu relaxieren.



**Abb. 5: Lokalisation der Fluoreszenz einer Coumarin-47-Lösung nach A) Einphotonen (SPA)- und B) Zweiphotonenabsorption (TPA).** Deutlich ist die verminderte axiale Ausdehnung des Signalvolumens im Ergebnis der TPA zu beobachten.

Die Anzahl der im Experiment absorbierten Photonenpaare  $Q_{abs}$  pro Laserpuls kann unter der Annahme der paraxialen Näherung und Vernachlässigung möglicher Sättigungseffekte abgeschätzt werden [43]:

$$Q_{abs} \approx \frac{P^2 \sigma_{2P}}{f^2} \frac{\pi^2 N.A.^4}{(hc\lambda)^2} \quad (3.1)$$

Hierbei bezeichnet  $\lambda$  die Wellenlänge,  $h$  die Planck-Konstante und  $c$  die Lichtgeschwindigkeit. Weiterhin skaliert  $Q_{abs}$  mit der mittleren Anregungsleistung  $P$ , dem Zweiphotonenabsorptionsquerschnitt  $\sigma_{2P}$ , der numerischen Apertur  $N.A.$  und mit dem Kehrwert der Pulsbreite  $\tau$  und dem Quadrat der Puls wiederholrate  $f$ . Folglich müssen zum Erreichen einer möglichst effizienten Fluoreszenzanregung bei gleicher mittlerer Leistung Fluorophore mit einem möglichst hohen  $\sigma_{2P}$  eingesetzt werden. Für das Erreichen hoher Anregungsintensitäten kommen Objektive mit einem hohen Raumwinkel und Laser mit möglichst kurzen Anregungspulsen zum Einsatz.

### 3.4.2 SHG-Mikroskopie

Neben der Fluoreszenz kann in der nichtlinearen Mikroskopie auch die SHG des Anregungsstrahlungsfeldes als Signalquelle genutzt werden. Ein SHG-Signal ist nur an Systemen beobachtbar, welche kein Inversionszentrum besitzen bzw. nicht zentrosymmetrisch sind (siehe Abschnitt 2.1).

Die ersten Realisierungen der SHG-Mikroskopie wurden unter Verwendung von Nd:Yag-Lasern an anorganischen Materialien wie Zinnselenit-, Lithiumniobat-, Kaliumhydrogenphosphat-(KDP-), Zinkoxid- und Quarzkristallen demonstriert [44, 45]. Nachfolgend wurde unter Einsatz von Nanosekundenpulsen die Erzeugung von SHG-Signalen in organischen Strukturen (Kollagenfasern in Rattenschwanzsehnen) nachgewiesen [46].

Die SHG kann nur an Strukturen beobachtet werden, die einen gewissen intra- bzw. intermolekularen Ordnungsgrad aufweisen. Biologische Strukturen, die ein SHG-Signal erzeugen, werden als biophotonische Kristalle bezeichnet. In Pflanzen bzw. Algen sind das beispielsweise zelluläre Strukturen wie Zellwände, Membranstapel und Stärke [47]. In tierischem Gewebe gilt das Kollagen als dominante Quelle für SHG-Signale [46, 48-50]. Die Phasenanpassung bzw. das resultierende SHG-Signal sind vom Polarisationszustand des eingestrahnten Lichts und von der molekularen Ausrichtung abhängig. Ein von der molekularen Orientierung unabhängiges SHG-Signal kann durch Anwendung von zirkular polarisiertem Licht erhalten werden. Umgekehrt ist es möglich, unter Kenntnis des Polarisationszustandes durch Untersu-

chungen der Polarisationsanisotropie strukturelle Informationen, wie beispielsweise Kristallorientierung bzw. Kristallfehlstellen, zu erhalten [37].

Innerhalb der pflanzlichen zellulären Strukturen sind Stärkegranula die Hauptquelle von SHG-Signalen. Die Granula bestehen aus zwei makromolekularen Bestandteilen; der Amylose und dem Amylopektin. Amylose hat eine amorphe Struktur und trägt nicht zum SHG-Signal bei. Amylopektin kann in verschiedenen strukturellen Anordnungen (den sogenannten Allomorphen der Stärke) vorkommen.

Der strukturelle Aufbau der Stärkegranula ist nicht abschließend aufgeklärt und die Beschreibung der räumlichen Amylopektinanordnung erfolgt in zwei Modellen unterschiedlicher Größenordnung [37]:

Das Amylopektin tritt in Form einer lamellenartigen, aus Nanoschichten bestehenden Struktur auf, die effektiv in sphärischen Blöcken und relativ großen konzentrischen Ringen organisiert ist [47]. Es gibt kristalline Lamellen aus Seitenketten, die in einer doppelhelikalen Struktur angeordnet sind, und eine größtenteils amorphe Lamellenkonfiguration, die aus vielen ineinander verzweigten Amylopektinbereichen besteht. Die Größe der so gebildeten Cluster ist variabel und beträgt im Mittel  $10 \times 10 \times 100 \text{ nm}^3$ .

In der übergeordneten Betrachtung bestehen die Stärkekörner aus einer Abfolge von kristallinen Bereichen hoher Dichte und stärker ungeordneten Schichten, die enzymatischen Angriffen besser zugänglich sind und Ausmaße von hunderten von Nanometern annehmen können. Diese alternierenden kristallinen und semikristallinen Ringe besitzen räumlich modulierte, nichtlineare Eigenschaften und können so als dreidimensionale biophotonische Strukturen fungieren [51, 52].

Im Gegensatz zur Fluoreszenz ist die SHG ein parametrischer Prozess. In der SHG-Mikroskopie sind daher Photoschädigungen, wie sie bei der linearen konfokalen Mikroskopie bzw. der MPM auftreten, praktisch nicht zu beobachten [53]. Potenzielle Schädigungen sind auf in der Probe enthaltene endogene Fluorophore bzw. auf nichtlineare Effekte höherer Ordnung, wie z.B. Plasmabildung, zurückzuführen. Wie bei der TPFM werden bei der SHG-Mikroskopie Strahlungsfelder im roten und infraroten Spektralbereich eingesetzt, die eine hohe Eindringtiefe ermöglichen. Zusätzlich zur Absorption und Streuung muss der Einfluss der Doppelbrechung auf die Anregungsintensität berücksichtigt werden.

### 3.4.3 Einfluss der Dispersion auf die Signalgebung

Das Spektrum der enthaltenen Frequenzen ist umso breiter, je kürzer ein Lichtpuls ist. Da die Gruppengeschwindigkeit eine Funktion der Wellenlänge ist, kommt es in einem dispersiven Medium zu einem zeitlichen spektralen Auseinanderlaufen der einzelnen Frequenzanteile. Bei positiver Dispersion laufen die spektral langwelligen Anteile des Pulses vor. Für einen simultanen Zweiphotonenprozess ist es jedoch notwendig, dass die Summe der Energien der beiden beteiligten Photonen innerhalb des durch die Heisenberg'sche Unschärferelation festgelegten Zeitfensters von  $\Delta t \approx 10^{-15}$  s (Gleichung (2.6)) interagieren.

Nach Durchgang durch ein dispersives Medium ändert sich die ursprüngliche Impulsbreite  $\tau_{in}$  (FWHM) zu [33, 34]:

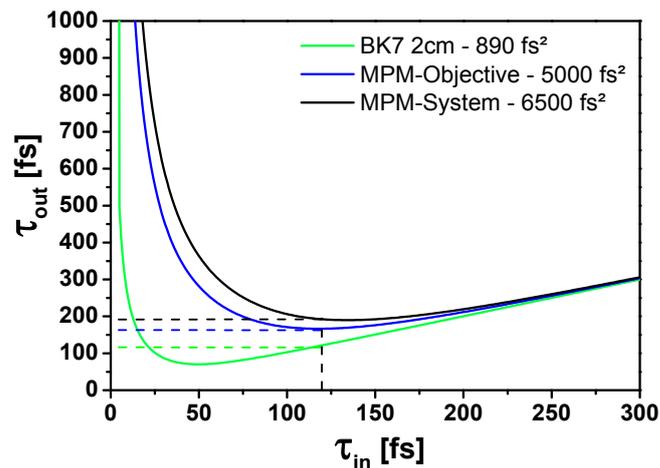
$$\tau_{out} = \sqrt{(1 + (4 \cdot \ln 2 \cdot S)^2)} \tau_{in} \quad (3.2)$$

Dabei beschreibt  $\tau_{out}$  die Ausgangspulsbreite und  $S = DL/\tau_{in}^2$  die Verbreiterung des Pulses. Hierbei ist  $D$  der Gruppengeschwindigkeitsdispersionswert und eine Materialkonstante;  $L$  ist die Länge des dispersiven Mediums.

Zum Beispiel betragen bei einer Wellenlänge von 800 nm die Dispersionswerte  $D$  für die optischen Materialien CaF<sub>2</sub> 251 fs<sup>2</sup>/cm, BK7 445 fs<sup>2</sup>/cm und SF10 1600 fs<sup>2</sup>/cm. Ein in der nichtlinearen bzw. Mehrphotonenmikroskopie (MPM) eingesetztes Objektiv hat einen  $DL$ -Wert von  $\approx 5000$  fs<sup>2</sup> [33]. Weitere im System enthaltene Linsen, Umlenkprismen und Filter vergrößern diesen Wert auf  $DL \geq 6500$  fs<sup>2</sup>. In Abb. 6 sind die nach Gleichung (3.2) berechneten Verbreiterungen des Laserimpulses nach Durchgang eines MPM-Objektivs (grün) bzw. eines MPM-Systems (schwarz) dargestellt. Erfährt ein 120-fs-Laserimpuls bei Transmission durch zwei Zentimeter BK7 lediglich eine vernachlässigbare Impulsverbreiterung von 2 fs ( $\tau_{out} = 122$  fs), so ergeben sich für ein MPM-Objektiv oder ein MPM-System Impulsverbreiterungen von 47 fs ( $\tau_{out} = 167$  fs) bzw. 72 fs ( $\tau_{out} = 192$  fs). Dies führt zu einer Verminderung der Absorptionsrate um 28 % bzw. 37,5 % (Gleichung (3.1)). Für eine optimale Signalerzeugung ist demnach ein möglichst kurzer Laserpuls am Probenort von Vorteil. Ultrakurze Laserpulse können, beispielsweise durch die Verwendung zweier Prismen so vorkompensiert werden, dass sie nach Durchlaufen der dispersiven Elemente am Probenort eine nahezu unveränderte Pulsbreite besitzen.

In der MPM werden meist Lasersysteme, mit einer Pulsbreite  $> 100$  fs (FWHM) verwendet. Da auch bei dieser Pulsbreite der Einfluss der dispersiven Elemente nicht zu vernachlässigen

ist, müssen in MPM-Systemen grundsätzlich die geringstmögliche Anzahl von Optiken verwendet werden. Die resultierende Pulsverbreiterung am Probenort hervorgerufen durch ein MPM-Objektiv bzw. ein um zusätzliche Komponenten (z.B. Umlenkprismen) ergänztes MPM-System, beträgt etwa 30 fs (siehe Abb. 6). Dies bedeutet unter sonst gleichen Messbedingungen einen Signalverlust von 15 %.



**Abb. 6:** In Abhängigkeit der eingehenden Pulsbreite sind die resultierenden Pulsbreiten nach Transmission der optischen Komponenten dargestellt. Nach Transmission durch BK7-Glas (2 cm, grün), einem typischen MPM-Objektiv (blau) und einem MPM-System (schwarz) wurden die Ausgangspulsbreiten nach Transmission berechnet. Für Eingangspulsbreiten < 200 fs muss im Experiment die Pulsverbreiterung berücksichtigt werden. Bei der verwendeten Pulsbreite von 120 fs erfolgt eine Pulsverbreiterung nach Durchlaufen des MPM-Systems auf 192 fs.

## 4 Optische Signalquellen wachstumsabhängiger Zellparameter

Das Ziel dieser Arbeit ist die Quantifizierung biochemisch relevanter Parameter auf Einzelzellebene mit Hilfe optischer Methoden und die Bestimmung ihrer Verteilungsfunktionen im Zellensemble.

In den Biowissenschaften ist die Fluoreszenz von Fluorophoren ein häufig verwendetes Messsignal zur Objektcharakterisierung. Neben der Fluoreszenz können auch Streuprozesse (z.B. Ramanstreuung) und nichtlineare Prozesse, wie die Erzeugung der optischen Harmonischen zur Signalgewinnung, genutzt werden. Es ist bekannt, dass bestimmte zelluläre Strukturen in

der Lage sind, in Wechselwirkung mit einem starken Strahlungsfeld ein SHG-Signal zu erzeugen.

In dieser Arbeit werden sowohl die Fluoreszenz als auch die SHG als Signalquellen verwendet, um die zellulären Parameter zu messen. Für die statistische Analyse bzw. für modelltheoretische Ansätze werden diese zellulären Parameter in Form des zellulären Zustandsvektors  $\vec{z} = \{v, p_1, \dots, p_N\}$  zusammengefasst. In diesem Vektor sind das Zellvolumen  $v$  – als unmittelbare Konsequenz des Zellwachstums – separat und alle weiteren die Zelle charakterisierenden Parameter durch  $p_N$  enthalten.

In den folgenden Abschnitten werden die Fluoreszenzparameter des zellulären Photosyntheseapparats, der zelluläre, nucleäre und extranucleäre DNA-Gehalt und die Anzahl der in der Zelle enthaltenen Nuclei bzw. extranucleären DNA-Bestandteile analysiert. Weiterhin werden der zelluläre Stärkegehalt und die Anzahl der zellulären Stärkegranula quantifiziert.

#### **4.1 Endogene Signalquellen**

Abhängig vom Organismus sind in biologischen Objekten endogene Fluorophore in unterschiedlichen Konzentrationen enthalten. Für die in dieser Arbeit relevanten Objekte sind es vor allem Chlorophylle bzw. Carotinoide, die ein Fluoreszenzsignal liefern. Die enthaltene Stärke ermöglicht aufgrund ihrer biophotonischen Struktur die Erzeugung von SHG-Signalen.

#### **4.2 Exogene Signalquellen**

Neben Nutzung der endogenen Fluorophore besteht die Möglichkeit, bestimmte Zielmoleküle – wie z.B. Desoxyribonukleinsäure (DNA) – mit einem zugeführten Fluorophor zu markieren. Hierfür eignet sich der Fluorophor Propidiumiodid, der durch Diffusion in die ggf. vorbehandelte Zelle gelangt und sich dort selektiv an die DNA bindet. Ein Großteil der in der Biologie verwendeten Markerfluorophore ist für den lebenden Organismus toxisch und wird daher im Allgemeinen nur *in-vitro* angewandt. Eine interessante Alternative bietet die Gentechnik. Ein fluoreszierendes Protein (z.B. GFP) kann durch geeignete Verfahren in die Zelle eingeschleust und dort anschließend durch zelleigene Prozesse synthetisiert werden. Das zunächst als distinktes Molekül innerhalb der Zelle vorliegende Protein kann weiterhin genspezifisch mit einem Zielprotein zu einem Fusionsprotein fusioniert werden. Das grün fluoreszierende Protein (GFP) ist ein in der Qualle *Aequorea victoria* natürlich vorkommendes Protein. Seit seiner Entdeckung 1961 [54, 55] wurden verschiedene Varianten des Proteins mit veränderten spektralen Eigenschaften erzeugt. In dieser Arbeit wird neben GFP das gelb fluoreszierende YFP eingesetzt.

## 5 Biochemisch relevante Modellorganismen und weitere biologische Proben

Alle biochemischen Prozesse photoautotropher Organismen sind direkt oder indirekt mit der photosynthetischen CO<sub>2</sub>-Fixierung und der daraus resultierenden Reduzierung von Kohlenstoffverbindungen verbunden. Der Aufbau photoautotropher Organismen kann in der Komplexität variieren. Höhere Pflanzen bestehen sowohl aus photosynthetisch aktiven als auch aus heterotrophen Zellen. Letztere bilden Gruppen von funktionell und morphologisch verschiedenen Zellen, die komplexe Interaktionen mit den photosyntheseaktiven Zellen eingehen. Einzellige photoautotrophe Algen bilden ein überschaubares biologisches System, das in der Erforschung von Photosynthese- und Biosyntheseprozessen viele Vorteile gegenüber höheren Pflanzen aufweist. Im Folgenden werden die Alge *Chlamydomonas reinhardtii* und als Vertreter der höheren Pflanzen *Arabidopsis thaliana* und *Lysimachia nummularia* vorgestellt. Weiterhin werden die in verschiedenen Experimenten verwendeten nativen Stärkegranula betrachtet.

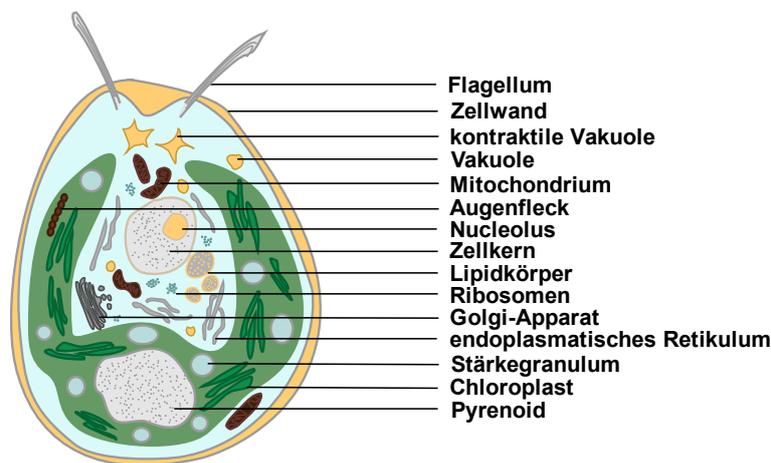
### 5.1 Die niedere Pflanze *Chlamydomonas reinhardtii*

*Chlamydomonas reinhardtii* ist eine eukaryotische einzellige Grünalge, die in vielen zellulären Eigenschaften mit höheren Pflanzen übereinstimmt. Sie besitzt die Möglichkeit der vegetativen Vermehrung (Mitose) und der sexuellen Fortpflanzung (Meiose), kann jedoch beliebig lange im vegetativen Modus verweilen. *Chlamydomonas reinhardtii* bildet unter geeigneten Aufzuchtbedingungen bei hoher Reproduktionsrate genetisch gleiche Individuen. Unter experimentell steuerbaren Bedingungen produzieren die entsprechenden Stämme der haploiden Alge zwei Typen von Gameten, welche als „mt+“ und „mt-“ Typ bezeichnet werden. Die sexuelle Fortpflanzung ermöglicht die Kreuzung von genetisch verschiedenen Individuen. Die Verfügbarkeit zahlreicher zellwandloser Mutanten erleichtert das Einbringen definierter genetischer Informationen in das Genom oder Plastom des Organismus (Kern- oder Plastidentransformation). Aus diesem Grund findet die Alge *Chlamydomonas* in der biologischen Grundlagenforschung als Modellorganismus vielfältige Verwendung [56].

Im photoautotrophen Zustand besitzt die Alge einen Chloroplasten pro Zelle, der etwa zwei Drittel des Zellvolumens einnimmt. Der Nucleus mit dem Großteil der zellulären DNA nimmt hingegen nur einen relativ kleinen zellulären Volumenanteil ein. Je nach Wachstumsstadium beträgt das Zellvolumen zwischen 50–3500 µm<sup>3</sup>. Die Algen (Wildtyp) werden durch die Zellwand begrenzt. Die Alge verfügt über zwei Flagellen, die die aktive Fortbewegung in

flüssiger Umgebung ermöglichen und auch bei der geschlechtlichen Fortpflanzung von Bedeutung sind. Abb. 7 zeigt eine schematische Darstellung einer *Chlamydomonas*-Zelle.

Photoautotrophe Algen können im Labor unter relativ einfachen Bedingungen mit einer hohen Produktivität kultiviert werden. Sie liegen als Suspension vor, deren Zellkonzentration experimentell festgelegt werden kann. Eine geeignete Konzentration erfüllt folgende Kriterien: Jede Alge kann als isoliertes System betrachtet werden, welches nahezu den gleichen Aufzuchtbedingungen unterliegt. Externe Faktoren, wie Licht, Nährstoffangebot und Temperatur, sind gleich. Weiterhin sind zelluläre Interaktionen vernachlässigbar, wie z.B. die Aufnahme von Stoffwechselprodukten und/oder Signalstoffen benachbarter Algen. Durch die Synchronisierung kann ein Höchstmaß an Homogenität der Zellkultur erreicht werden.



**Abb. 7:** Schematische Darstellung der Grünalge *Chlamydomonas reinhardtii*.

Die Synchronisierung (d.h. die Angleichung des Zellzyklus) kann durch geeignete Randbedingungen erfolgen. Photoautotrophe Zellen, wie beispielsweise einzellige Algen, werden häufig durch eine Kombination einiger Randbedingungen konditioniert. Hierfür wird oft der natürliche Tag-Nacht-Zyklus unter Nutzung des ubiquitären 24-Stundenrhythmus imitiert [57-59]. Eine tägliche Verdünnung der Suspension mit frischem Nährmedium und die stetige Begasung mit atmosphärischer Luft, die in der Regel mit CO<sub>2</sub> angereichert ist, sorgen für einen Nährstoffüberschuss und eine konstante Produktivität der Zellen über viele Zellzyklen [60]. Eine kontinuierliche Durchmischung der Suspension stellt homogene Aufzuchtbedingungen sicher, sodass alle Zellen den gleichen Wachstumsparametern ausgesetzt sind. Der Zellzyklus wird so angeglichen, dass die Zellen etwa zum Ende der täglichen Lichtphase oder in der

Dunkelphase innerhalb eines kurzen Zeitfensters die Tochterzellen freisetzen. Zu Beginn jeder Lichtphase sind in der Suspension folglich nur junge Zellen vorhanden, die die bestmögliche Übereinstimmung aller biochemischen Parameter besitzen. Das Zellwachstum, hervorgerufen durch die photosynthetische Biosynthese einer Vielzahl zellulärer Bestandteile, führt schließlich zur Zellteilung.

Synchronisationsverfahren existieren für diverse Zell- und Gewebetypen, z.B. für Prokaryoten [61], eukaryotische Algen [62, 63], Pflanzenzellen und Gewebe [64, 65], niedere heterotrophe Eukaryoten [66], Säugetierzellen [67, 68] und eukaryotische Parasiten von Säugetierzellen [69, 70].

## **5.2 Die höhere Pflanze *Arabidopsis thaliana***

*Arabidopsis thaliana* wird ebenfalls als Modellorganismus in der Biologie verwendet. Sie ist leicht kultivierbar und repräsentiert sehr gut viele Aspekte der Physiologie höherer Pflanzen. Ihre Wuchshöhe beträgt nur wenige Zentimeter. In der Landwirtschaft gilt die Pflanze als Unkraut und ist auch unter dem Namen Acker-Schmalwand bekannt. *Arabidopsis* besitzt nur ein relativ kleines Genom von 125 Megabasen, das bereits im Jahr 2000 vollständig sequenziert wurde [71]. Der Generationszyklus vom Keimen des Samens bis zur erneuten Samenreife beträgt etwa vier bis sechs Wochen. Eine Vielzahl von Mutanten ist frei verfügbar. Die Pflanze bietet die Möglichkeit, genetische Manipulationen (Transformationen) relativ leicht durchzuführen.

### **5.2.1 Mesophyllprotoplasten von *Arabidopsis thaliana***

Durch das Fehlen einer Zellwand können Protoplasten sehr gut DNA aufnehmen. Deshalb sind sie als Ausgangsmaterial zur Herstellung transgener Pflanzen geeignet. Aufgrund ihrer geringen Größe ( $\varnothing \approx 50 \mu\text{m}$ ) ist es möglich, viele gleichartige Protoplasten aufzukonzentrieren und messtechnisch besser zugänglich zu machen. Protoplasten werden beispielsweise durch enzymatische Behandlung aus einem Pflanzenzellverbund gewonnen. Hierbei lösen Enzyme, wie Cellulasen oder Pektinasen, die pflanzlichen Zellwände auf, während die intrazellulären Bestandteile – wie etwa der Nucleus, das Cytoplasma oder die Zellmembran – vollständig intakt bleiben. Die so verbleibenden zellwandlosen „Zellen“ (Protoplasten) nehmen eine Kugelform an (siehe Abschnitt 7.4, Abb. 10). Protoplasten haben gegenüber intakten Pflanzen mehrere Vorteile. Da sie separiert in Lösung vorliegen, entfallen die im Zellverbund vorhandenen interzellulären Transportprozesse. Andererseits können alle Protoplasten einer Suspension direkt zugesetzte Substanzen aufnehmen. Damit kann eine große Anzahl von Zel-

len zeitgleich biochemisch und/oder physiologisch beeinflusst werden. Nachteilig wirkt sich das Fehlen der Zellwand auf die mechanische Stabilität aus. Ein Platzen der Protoplasten muss durch die Aufbewahrung in einem Medium mit gleichem Wasserpotenzial (osmotischer Druck) verhindert werden.

Eine große Anzahl von Protoplasten kann vor allem aus dem Mesophyll eines Blattes isoliert werden. Die in dieser Arbeit verwendeten Mesophyllprotoplasten wurden nach der in [72] beschriebenen Methode präpariert.

### **5.3 Die höhere Pflanze *Lysimachia nummularia***

Zur Optimierung und Kalibrierung der in Abschnitt 8.1 vorgestellten Messapparatur für die Puls-Amplituden-Modulation-(PAM-)Fluorimetrie wird die in wässriger Umgebung kultivierbare Pflanze *Lysimachia nummularia* verwendet. Sie besitzt eine geringe Wuchshöhe von nur 5 cm; dabei variieren Länge und Breite der Blätter zwischen 1,5 und 2,5 cm.

### **5.4 Native Stärke**

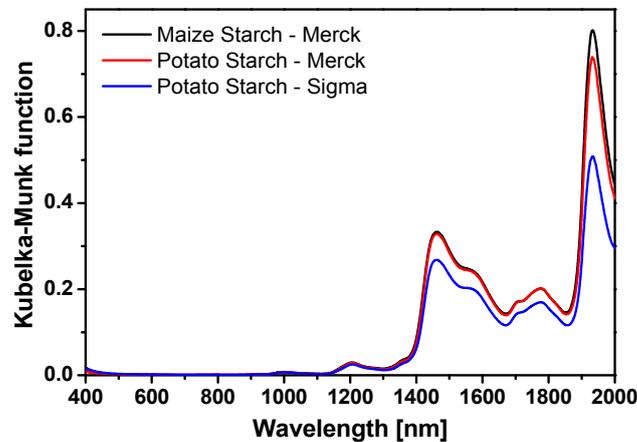
Stärkegranula sind ein Stoffwechselprodukt und können aus Algen bzw. Pflanzen isoliert werden. Vor der Verwendung im Experiment müssen die Stärkegranula auf mögliche Verunreinigungen durch (endogene) Fluorophore analysiert werden. Da die Stärkegranula in fester Form als Pulver vorliegen, erfolgt die Aufnahme der Absorptionsspektren in Reflexion. Als Vergleich dient ein Weißstandard. Der gemessene Reflexionsgrad  $R$  steht in einem proportionalen Verhältnis zur Konzentration des Fluorophors. Neben der diffusen Reflexion können zusätzliche Phänomene wie Totalreflexion, Einfach- und Mehrfachstreuung das Messergebnis beeinflussen. Unter der Voraussetzung, dass die Streuung  $S$  gegenüber der Absorption  $A$  deutlich überwiegt, können experimentell ermittelte Reflexionsspektren mit der Kubelka-Munk-Funktion  $KMF$  korrigiert werden [73]:

$$KMF(R_{\infty}) = \frac{A}{S} = \frac{(1 - R_{\infty})^2}{2R_{\infty}} \quad (5.1)$$

Im Experiment wurden mit einem Zweistrahlenspektrometer (V-670, JASCO) und einer mit Bariumsulfat beschichteten Ulbrichtkugel die Reflexionsspektren in einem Bereich von 400–2000 nm aufgenommen und mit der  $KMF$  korrigiert. Als Weißstandard wurde Magnesiumoxid (ABCR, 99,95%, Karlsruhe, Deutschland) verwendet.

Bei den untersuchten Kartoffel- und Maisstärkegranula (Merck, Darmstadt; Sigma-Adrich, Seelze, Deutschland) ist im Spektralbereich von 400–900 nm keine Absorption zu beobachten

(Abb. 8). Im nahen Infrarotbereich (1000–2000 nm) sind Obertonschwingungen erkennbar, die dem mit den Granula assoziierten Wasser zugeordnet werden können. Besonders intensiv ist die Absorptionsbande bei 1940 nm [74].



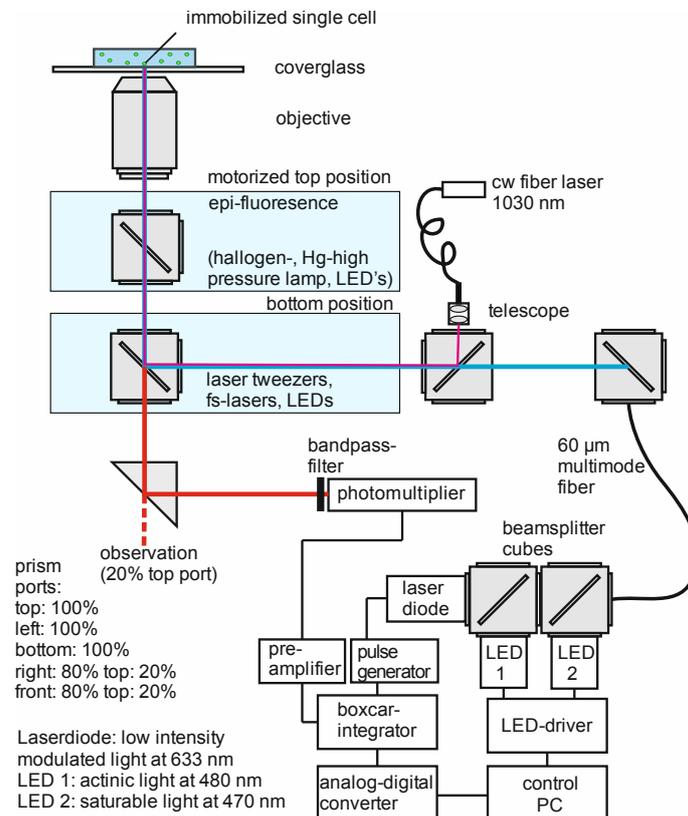
**Abb. 8: Absorptionsspektren von drei untersuchten Stärkearten.** Im Spektralbereich von 400–900 nm sind keine signifikanten Absorptionen potenzieller Verunreinigungen vorhanden (korrigiert mit der Kubelka-Munk-Funktion).

## 6 Beschreibung der Mikroskopieplattform (experimenteller Aufbau)

Die Basis für die experimentellen Aufbauten bildete ein inverses konfokales Laser-Scanning-Mikroskop (Nikon TE2000, Eclipse C1+). Das Mikroskop bot die Möglichkeit, die Probe sowohl in Transmission als auch in Epi-Detektionsgeometrie zu untersuchen. Oberhalb der Probenposition befand sich ein Kondensator ( $N.A. = 0,52$ ) bzw. wahlweise ein Mikroskopobjektiv. Je nach Anwendung konnten eine Halogenlampe zur Probenbeleuchtung und ein Photomultiplier (PMT) zur Signaldetektion ausgewählt werden.

Mit einem motorisierten Verschiebetisch konnte die Probe relativ zur optischen Achse des Objektivs positioniert werden. Die Proben befanden sich in speziellen Kammern, die Beobachtungen über einen Zeitraum von mehreren Stunden ermöglichten. Verwendet wurde eine Probenkammer (MiniCeM, Jenlab), die aus zwei Deckgläschen ( $\varnothing = 40$  mm) und einem zwischenliegenden gasdurchlässigen Silikonring bestand. Das Probenkammervolumen betrug 3 ml. Wenn nur ein Deckglas verwendet wurde, konnte die Probenkammer durch einen Temperaturregeleinsatz und einen sekundären Wasserkreislauf temperiert werden. Das hierfür

verwendete Wasser wurde in einem externen 5 l fassenden Behälter mit Hilfe eines Thermostaten (E5s, Medingen) auf  $\pm 1$  K temperiert. Das effektive Probenkammervolumen reduzierte sich in diesem Fall auf 1 ml. Weiterhin konnten zur Immobilisierung einzelner Zellen verschiedene Immobilisierungsverfahren implementiert werden (Abschnitt 7).



**Abb. 9: Messplatz für die Fluoreszenzmessung an einzelnen Zellen.**

Unterhalb der Probenposition befand sich ein motorisierter automatischer Revolver mit sechs Objektiven, deren Abstand zur Probe mit einer Genauigkeit von 50 nm eingestellt werden konnte. Das Mikroskop besaß eine sogenannte „unendliche Optik“. Das bedeutet, dass der Strahlengang quasiparallel verläuft und das Objektiv erst nach der Tubuslinse ein reelles Zwischenbild erzeugt. Die Brennweite der Tubuslinse betrug 200 mm, sodass für das Ein- bzw. Auskoppeln von Licht in drei Ebenen ausreichend Platz zur Verfügung stand. Die oberen zwei Ebenen konnten mit je sechs Filtersätzen bestückt werden. Ein Filtersatz bestand typischerweise aus einer Kombination von je einem Bandpassfilter für das Emissions- und das Anregungslicht und einem dichroitischen Strahlteiler. Die erste obere Ebene wurde für die

konventionelle Weitfeldmikroskopie mit den wählbaren Anregungslichtquellen Quecksilberhochdrucklampe bzw. Halogenlampe oder „Light Emitting Diodes“ (LED) genutzt.

In der zweiten Ebene ermöglichte ein extern angebrachtes modulares Filtersystem, das Licht mehrerer Quellen gleichzeitig einzukoppeln (z.B. für den Betrieb der „optischen Pinzette“ in Kombination mit Fluoreszenzanregung).

Die dritte Ebene diente der Messwerterfassung und dem Anschluss der konfokalen Laser-Scanner-Einheit. Hier konnte über Prismen bzw. Strahlteiler das von der Probe emittierte Licht auf verschiedene Ports gelenkt werden (Abb. 9). An den „Top“-Port war das Okular bzw. wahlweise eine CCD-Kamera (DS-Qi1Mc, Nikon) angeschlossen. Der „Front“-Port konnte für den Anschluss einer Kamera verwendet werden. Der „Left“-Port wurde zur integralen Fluoreszenzdetektion mit einem PMT belegt. Der „Bottom“-Port enthielt keine optischen Komponenten und war deswegen insbesondere für Anwendungen interessant, bei denen die Dispersion ein kritischer Faktor ist. Daher wurde hier die konfokale Einheit (Eclipse C1+, Nikon) des Mikroskops angeschlossen.

In Abb. 9 ist der experimentelle Aufbau dargestellt, der zur Charakterisierung des Photosyntheseapparats einzelner Zellen angewendet wurde (Abschnitt 8). Für die Laser-Scanning-Mikroskopie wurde der Aufbau entsprechend den experimentellen Erfordernissen modifiziert (Abschnitt 9.2).

## **7 Methoden der Zellimmobilisierung**

Es werden sowohl Untersuchungen *in-vivo* als auch an fixierten Organismen vorgenommen. Diese sind zum einen *Chlamydomonas*-Zellen, zum anderen Gefrierschnitte und Mesophyllprotoplasten aus Blättern der Pflanze *Arabidopsis thaliana*.

Eine Einbringung der Blätter bzw. der Gefrierschnitte zwischen zwei Deckgläsern ist unproblematisch. Protoplasten und Algenzellen müssen dagegen für Untersuchungen immobilisiert werden. Die Immobilisierung von lebenden *Chlamydomonas*-Zellen ist erforderlich, da sich dieser Organismus mithilfe seiner Flagellen fortbewegen kann. Auch *in-vitro* wirkt sich die Brown'sche Molekularbewegung in der umgebenden Flüssigkeit auf die *Chlamydomonas*-Zellen und Mesophyllprotoplasten aus und stört die Messung.

Problemrelevante Methoden zur Zellimmobilisierung sind die Verwendung von Adhäsionsobjektträgern, die „optische Pinzette“ („Optical Tweezers“), die Patch-Clamp-Methode und die

Mikrofluidik. Da für diese Arbeit die Immobilisierungsmethoden von grundlegender Bedeutung sind, werden sie jeweils vorgestellt, die Vor- und Nachteile erläutert und die Implementierung in den apparativen Aufbau beschrieben. Eine Übersicht der Immobilisierungszeiten der einzelnen Methoden ist in Tabelle 2 gegeben.

<b>Probe</b> <b>Immobilisierungsmethode</b>	<i>Chlamydomonas</i> -Zelle		<b>Mesophyllprotoplast</b>
	<i>In-vivo</i>	<i>In-vitro</i>	
Adhäsionsobjektträger			
Poly-L-Lysin	< 15 s	< 30 min	-
Vectabond	< 30 s	3–5 h	> 1 h
Optische Pinzette	20 s–1 h	-	> 10 min
Patch Clamp	> 6 h	-	> 10 min
Mikrofluidik	-	-	> 23 h

**Tabelle 2: Zusammenstellung der durchschnittlichen Immobilisierungszeiten der Proben bei verschiedenen Immobilisierungsmethoden.**

In Abhängigkeit der messtechnischen Erfordernisse ist es unter Umständen sinnvoll, mehrere Methoden zu kombinieren. Vorteilhaft ist hier beispielsweise die Möglichkeit, Kontrollexperimente durchzuführen. So können die unterschiedlichen Einflüsse – beispielsweise mechanische bzw. thermische Belastungen – der jeweiligen Methode auf die Probe bestimmt werden. Mögliche Artefakte, die durch die Art der Immobilisierung hervorgerufen werden, können so ausgeschlossen werden. Weiterhin ist es möglich Immobilisierungsmethoden, wie die Patch-Clamp-Methode bzw. die Nutzung mikrofluidischer Strukturen, die keine gezielte Auswahl von Zellen zulassen, durch die Anwendung der „optischen Pinzette“ zu ergänzen. Hierdurch können mehrere Zellen gezielt ausgewählt und im Beobachtungsfeld des Mikroskops untersucht werden. Eine Kombination aus drei Methoden zur Zellmanipulation ist beschrieben in [75].

### **7.1 Adhäsionsobjektträger**

Modifizierung der physikalischen Eigenschaften der Glasoberfläche oder spezielle Beschichtungen können die Adhäsion und damit die Immobilität der zu untersuchenden Objekte an der Objektträgeroberfläche erhöhen (Adhäsionsobjektträger). Wichtig dabei ist, dass es zu keiner messverfälschenden Wechselwirkung zwischen dem Untersuchungsobjekt und dem Objektträger kommt.

Im Experiment wurden die zu untersuchenden Proben über einen Zeitraum von mehreren Stunden in wässriger Umgebung bei definierter Temperatur gemessen. Eine geeignete Zellkulturkammer (MiniCeM) wurde in Abschnitt 6 dargestellt. Sie hat allerdings den Nachteil, dass nur ein bestimmter Deckglastyp mit einem Durchmesser von 40 mm zur Anwendung kommen kann. Kommerziell erhältliche Adhäsionsobjektträger haben meist ein Standardformat von  $75 \times 25$  mm. Daher werden die in dieser Arbeit verwendeten Deckgläser ( $d = 0,17$  mm,  $\varnothing = 40$  mm) eigenständig präpariert. Zur Anwendung kommen eine Poly-L-Lysin-Lösung (0,01 %, P4707 Sigma-Aldrich, Deutschland) und die Vectabond-Reagenz (SP-1800, Vector Laboratories, Burlingame, USA); dabei werden die von den Herstellern empfohlenen Protokolle eingehalten (Anhang A1.1). Die mit Vectabond behandelten Adhäsionsobjektträger wiesen ein höheres Immobilisierungsvermögen und eine längere Wirkung auf (Tabelle 2). Deshalb wurde diese Präparationsmethode zur Herstellung der Adhäsionsobjektträger verwendet. Die jeweils in geringen Mengen ( $\approx 40$  Stück pro Messserie) präparierten Deckgläser wurden bis zur Verwendung aber maximal 14 Tage staubfrei bei Raumtemperatur bevorratet.

Adhäsionsobjektträger weisen gegenüber den nachfolgend aufgeführten Methoden ein relativ schwaches Immobilisierungsvermögen auf. Dies ist insbesondere durch die sphärische Geometrie der Untersuchungsobjekte bedingt. Dadurch besteht nur eine vergleichsweise geringe Wechselwirkungszone zwischen der Oberfläche des Adhäsionsobjektträgers und der Probe. Die Methode kann daher nicht für *In-vivo*-Anwendungen an *Chlamydomonas*-Zellen verwendet werden. Für *In-vitro*-Anwendungen ist sie dagegen hervorragend geeignet (Tabelle 2). Mit der Mikroskopie können in einem Bildfeld von  $200 \times 200$   $\mu\text{m}$  etwa 200 Zellen gleichzeitig über einen Zeitraum von mehreren Stunden analysiert werden (Abschnitt 10 ff.).

## 7.2 Optische Pinzette

Experimentelle Anordnungen, die unter der Einwirkung von starken Lichtfeldern zur Manipulation dielektrischer Materie in der Lage sind, werden „optische Fallen“ bzw. „optische Pinzetten“ genannt. Als dielektrisch werden alle nichtmetallischen Stoffe bezeichnet, deren Ladungsträger nicht frei beweglich sind. Daher sind solche Stoffe nur sehr schwach oder gar nicht elektrisch leitend. Die physikalischen Grundlagen einer „optischen Pinzette“ können im Wellen- und im Teilchenbild diskutiert werden [76-80]. Im Wellenbild wird die Fokussierung eines Laserstrahls als eine ortsabhängige Verteilung des elektrischen Feldes mit einem starken Intensitätsgradienten in Richtung des Zentrums des Fokalvolumens beschrieben. In einem sich im Fokus befindlichen Partikel wird durch das elektrische Feld ein Dipolmoment indu-

ziert, das mit zunehmender Feldstärke größer wird. Diese Wechselwirkung führt zu einer Kraft in Richtung des Ortes maximaler Lichtintensität. Im Teilchenbild kann jedem Photon ein Impuls zugeordnet werden. Bei der Reflexion bzw. Brechung eines Lichtstrahls kommt es so zu einem Impulsübertrag auf das Partikel. Die daraus resultierende Kraft ist zum Ort höchster Laserintensität gerichtet (Anhang A1.2, Abb. 1).

„Optische Pinzetten“ werden in der Wissenschaft vielfältig eingesetzt. Gegenüber anderen Verfahren zur Manipulation oder Immobilisierung von Zellen besitzen sie den Vorteil, dass sie ein vollständig steriles Arbeiten erlauben. Die experimentellen Anordnungen von „optischen Pinzetten“ können sehr komplex sein. Angefangen bei Anwendungen mit nur einem Fokus werden auch Pinzetten mit mehreren separat steuerbaren Foci angewendet [81]. Im Experiment wird die Wellenlänge des Lichtes so gewählt, dass das betreffende Objekt möglichst keine Absorption aufweist. Insbesondere für biologische Anwendungen sind Laser im infraroten Spektralbereich mit einer Ausgangsleistung von wenigen Milliwatt bis hin zu einigen Watt gebräuchlich. Je nach Probenbeschaffenheit wird die maximal einsetzbare Leistung durch die verbleibenden Absorber und damit einhergehender Probenerwärmung beschränkt. Bei Auswertung von Fluoreszenzsignalen muss eine mögliche Zweiphotonenabsorption der endogenen Fluorophore berücksichtigt werden [82].

Die in dieser Arbeit verwendete „optische Pinzette“ nutzt einen Dauerstrich- („cw“-)Faserlaser (YLM-5-LP-SC, IPG Laser) bei einer Wellenlänge  $\lambda = 1030$  nm und einer Ausgangsleistung von 5 W. Im Allgemeinen sind Mikroskopobjektive für diesen Wellenlängenbereich nicht mehr geeignet. Sie weisen eine deutliche Fehlanpassung in Entspiegelung, Transmission und vor allem in der sphärischen Aberration auf. Bei gleichen Strahlparametern befinden sich die Foci von sichtbarem und infrarotem Licht nicht mehr in einer Ebene. Eine Teleskopanordnung bietet die Möglichkeit, die Fokalebene zu variieren und gleichzeitig die Eingangspupille des Objektivs optimal auszuleuchten. Durch Vorexperimente mit Polystyrenkugeln ( $\varnothing = 2 \mu\text{m}$  und  $\varnothing = 25 \mu\text{m}$ ; PPs-2, PPs-25 Surface plain, Kisker; Anlage A1.2, Abb. 2), wurde eine zweifache Vergrößerung als die optimale Teleskopkonfiguration ermittelt. Mit einem speziell aufeinander abgestimmten Linsenpaar (BE02M-B, Thorlabs) wurde eine sehr geringe Wellenfrontverzerrung von nur  $0,00113\lambda$  erreicht.

Die Kräfte, die eine „optische Pinzette“ auf die Partikel ausübt, liegen im Bereich von wenigen Pico- bis hin zu einigen Nanonewton. Das erlaubt die Manipulation von Objekten mit einem Durchmesser von 5–50  $\mu\text{m}$  [83]. In dieser Größenordnung liegen auch *Chlamydomonas*- bzw. Protoplastenzellen.

Die in dieser Arbeit aufgebaute und verwendete „optische Pinzette“ ist in der Lage, vitale *Chlamydomonas*-Zellen zu immobilisieren (Tabelle 2). Die Kraft, die zur Immobilisierung dieser Zellen aufgebracht werden muss, liegt im Bereich von 35 pN [84]. Die von der „optischen Pinzette“ ausgeübten Kräfte sind räumlich nicht isotrop verteilt. Abhängig von der verwendeten Strahlgeometrie ist in Richtung der optischen Achse eine verminderte „Immobilisierungskraft“ vorhanden. Dies führt dazu, dass bei zu geringen Feldstärken die Algen aufgrund ihrer aktiven Bewegung entlang der optischen Achse den Fokusbereich verlassen können. Einer beliebigen Feldstärkenenerhöhung stehen jedoch folgende Tatsachen entgegen. Der zelluläre Aufbau einer Alge ist sehr inhomogen, sodass Organelle oder andere Strukturen innerhalb der Zelle verschoben werden können. Dies kann zu Stress bis hin zum Tod der Alge führen. Weiterhin verursacht die im infraroten Spektralbereich verbleibende Absorption des Wassers und der endogenen Pigmente eine Erwärmung des Organismus.

Unter den im Experiment gegebenen Strahlgeometrien waren bis zu einer Leistung von 300 mW keine Schädigungen oder Veränderungen der Zellen bzw. keine signifikante Temperaturerhöhungen ( $< 0,01$  K/min) des umgebenden Mediums zu beobachten. Bei diesen Leistungen gelang es den Zellen, sich erst nach wenigen Sekunden bis zu einigen Minuten zu befreien. Unter Anwendung der doppelten Leistung von 600 mW konnte eine Temperaturerhöhung des umgebenden Mediums von etwa 0,2 K/min festgestellt werden. Nach einer Zeit von 5–10 s war der Zelltod zu beobachten, der meist von einem plötzlichen Aufreißen der Zellwand begleitet wurde.

Der Vorteil gegenüber den anderen vorgestellten Methoden ist, dass ein gezieltes Auswählen und Manipulieren einzelner Zellen ermöglicht wird. Aus diesem Grund kann die optische Pinzette mit einer Leistung  $< 300$  mW als unterstützende Methode zur Zellselektion bei Anwendung der Patch-Clamp-Methode und der Mikrofluidik eingesetzt werden.

### **7.3 Patch-Clamp-Methode**

Eine weitere Methode ist die Immobilisierung der Zellen durch eine Mikropipette. Diese bestehen meist aus gezogenen Glaskapillaren, deren Öffnungen zur Vermeidung scharfer Kanten poliert sind. Über einen flexiblen Schlauch werden die Pipetten mit einem Mikromanipulator (CellTram Air, Eppendorf) verbunden, mit dessen Hilfe der Ansaugdruck variiert wird (Anhang A1.3, Abb. 4). Die Pipette konnte über einen Verschiebetisch in alle Raumrichtungen positioniert werden (Anhang A1.3, Abb. 3).

Zur Vermeidung von mechanischem Stress kommt es bei dieser Methode neben dem korrekt einzustellenden Ansaugdruck sehr auf die Wahl des richtigen Kapillardurchmessers an. Die Pipetten (Typ II, Eppendorf) haben an der probenseitigen Öffnung einen Außendurchmesser von 65–95  $\mu\text{m}$  und einen Innendurchmesser von 3,5–15  $\mu\text{m}$ . Sie sind damit an die Größe der *Chlamydomonas*-Zellen bzw. Mesophyllprotoplasten angepasst (Anhang A1.3, Abb. 5). Die kritische Phase der Immobilisierung ist das Ansaugen der Zellen und Protoplasten an die Pipette. Bei den mechanisch stabileren *Chlamydomonas*-Zellen hat die Patch-Clamp-Methode den Vorteil, dass die Zellen über einen Zeitraum von mehreren Stunden weitgehend unbeeinflusst immobilisiert werden können (Tabelle 2).

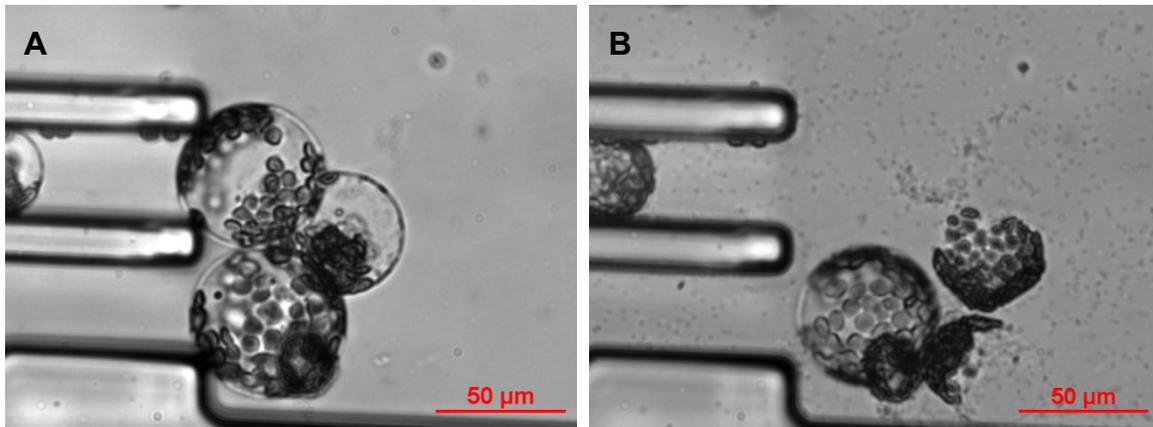
In einem Experiment wurde eine einzelne *Chlamydomonas*-Zelle immobilisiert und die Freisetzung der Tochterzellen über einen Zeitraum von 3,5 h beobachtet (Abschnitt 8.4). Die Immobilisierung der zellwandlosen, mechanisch instabilen Protoplasten gelang weniger häufig. Nur etwa 10 % der Versuchsobjekte konnten ohne Schädigung erfolgreich immobilisiert werden. Nachteilig bei der Patch-Clamp-Methode war der relativ große experimentelle Aufbau in der Nähe der Probe. Weiterhin war jede Pipette lediglich einmal und mit besonderer Vorsicht zu benutzen. Da die Probenkammer äußerlich zugänglich sein musste, war es notwendig bei Langzeitmessungen einem Verlust bzw. einer Konzentrationsänderung des Nährmediums oder Temperaturschwankungen durch entsprechende Maßnahmen entgegenzuwirken.

## **7.4 Mikrofluidik**

Der Vorteil bei mikrofluidischer Zellimmobilisierung ist ein permanenter Austausch des Nährmediums. Somit wird eine genaue Kontrolle bzw. Manipulation der Umweltfaktoren ermöglicht. Im Rahmen der Mikrofluidik können räumliche Strukturen zur Objektimmobilisierung relativ einfach hergestellt werden. Die gewünschte Struktur wird am Computer entworfen und mit einem hochauflösenden Drucker auf eine Folie oder auf ein Glassubstrat übertragen. In einem photochemischen Prozess wird mit Hilfe eines lichtempfindlichen Lacks auf einem Siliziumwafer ein „Positivstempel“ erzeugt. Dieser Stempel wird anschließend mit einem flüssigen Polymer (z.B. PDMS, bei biologischen Anwendungen) übergossen. Nach Aushärtung wird die enthaltende dreidimensionale Struktur mit einem Plasmaverfahren an ein Deckglas gebunden (Anhang A1.1, Abb. 6).

Die so erzeugten Mikrostrukturen enthielten in ausgewählten Bereichen parallel nebeneinander angeordnete Mikrokanäle. Die gewählte Größe der Mikrokanäle war vor allem für die Immobilisierung von Protoplasten geeignet. Ein Kanal war 50  $\mu\text{m}$  breit und die gesamte Brei-

te aller Kanäle betrug  $500\ \mu\text{m}$ . Zellen mit einem Durchmesser von  $\geq 60\ \mu\text{m}$  wurden am Kanaleinlass immobilisiert. Kleinere Objekte immobilisierten sich auch an den Kanalbiegungen (Anhang A1.3, Abb. 7).



**Abb. 10: Mit einer mikrofluidischen Struktur immobilisierter Mesophyllprotoplast.** **A)** Unmittelbar nach der Isolation und **B)** nach 23 h. Zwar wurde ein Großteil der Protoplasten innerhalb dieser Zeitspanne zerstört, jedoch blieb mindestens ein Protoplast der beobachteten Population intakt. Die in (B) zu beobachtenden schwarzen Punkte sind Bakterien, die aufgrund von nicht-axenischen Bedingungen während des Experiments gewachsen sind.

Es zeigte sich, dass die Mikrofluidik schonender als die Patch-Clamp-Methode war, sodass auch die mechanisch instabilen Mesophyllprotoplasten immobilisiert werden konnten. In einem Experiment wurde die Langzeitauswirkung bei mikrofluidischer Zellimmobilisierung untersucht. Hierfür wurden Mesophyllprotoplasten zwei Stunden nach der Isolation verwendet und am Einlass eines Mikrokanals immobilisiert. Die Strömungsgeschwindigkeit des Mediums innerhalb der Kanäle betrug  $\approx 100\ \mu\text{m/s}$ . Der auch nach 23-stündiger Beobachtungszeit noch intakte Protoplast ist in Abb. 10 gezeigt. Da in diesem Experiment auf axenische Bedingungen verzichtet wurde, sind die in diesem Zeitraum im umgebenden Medium gewachsenen Bakterien als schwarze Punkte erkennbar.

## **8 Nachweis der Diversität zellulärer Parameter einer synchronisierten *Chlamydomonas*-Kultur unter Anwendung der PAM-Fluorimetrie**

Die Chlorophyllfluoreszenz liefert Informationen sowohl über den physiologischen Zustand photoautotropher Organismen als auch über ablaufende Photosynthesereaktionen [85].

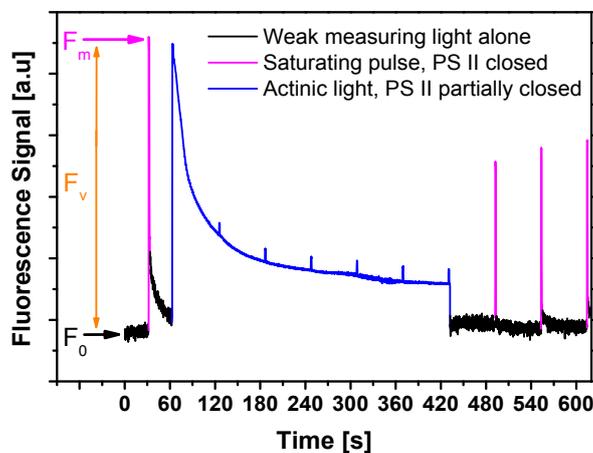
Durch Vergleichsmessungen der sich in den definierten Situationen ändernden Chlorophyllfluoreszenz können Informationen zum Zustand bestimmter Bereiche des Photosyntheseapparats, beispielsweise des Photosystems II (PS II), gewonnen werden. Zur Charakterisierung des Photosyntheseapparats ist die Puls-Amplituden-Modulation-(PAM-) Fluorimetrie weit verbreitet [86, 87].

Nach erfolgter Absorption befinden sich die Antennenpigmente (Chlorophyll a und b, Carotinoide) des PS II in höheren elektronisch angeregten Zuständen. Neben dem Anregungsenergieübertrag (EET) kann jedes Pigment des Antennensystems über strahlende oder strahlungslose Deaktivierungskanäle in den Grundzustand relaxieren. Ein schneller EET ( $10^{13} \text{ s}^{-1}$ ) zum bzw. über das Reaktionszentrum P680 ist die treibende Kraft der weiteren photochemischen Prozesse bei der Photosynthese.

Im photophysikalisch dunkeladaptierten Zustand des Photosystems sind die Reaktionszentren P680 „offen“. Im „offenen“ Zustand ist der Quinonakzeptor  $Q_A$  vollständig oxidiert und die Reaktionszentren wirken als Senke für die über den EET einlaufende Anregungsenergie. In dieser Situation ist der EET der dominierende Relaxationskanal und Ursache dafür, dass die Zahl der fluoreszierenden Pigmente und das Fluoreszenzsignal  $F_0$  des Antennensystems jeweils ein Minimum erreichen. Bei großen Anregungsintensitäten ( $\approx 10^{18} \text{ Photonen/cm}^2\text{s}$ ) werden die Reaktionszentren „geschlossen“, da der Quinonakzeptor  $Q_A$  vollständig reduziert wird. Sie können über den EET keine Anregungsenergie mehr aufnehmen, und ihre Funktion als Senke geht verloren. Die Anregungsenergie verbleibt im Antennensystem, mit dem Ergebnis, dass die Zahl der strahlend relaxierenden Pigmente ebenso wie das Fluoreszenzsignal  $F_m$  des Antennensystems jeweils ein Maximum erreichen. Durch Messung der Fluoreszenz ( $F_0$ ,  $F_m$ , etc.) in unterschiedlichen physiologischen Situationen des Photosyntheseapparats ist es also möglich, Informationen über Ratenverhältnisse der einzelnen Relaxationskanäle und letztendlich über aktuelle strukturelle und biochemische Eigenschaften des Photosyntheseapparats zu gewinnen.

Ein typischer Verlauf einer Messsequenz unter Verwendung eines kommerziellen Fluorimeters (FMS2; Hansatech Instruments) ist in Abb. 11 gezeigt.

In einer dunkeladaptierten Pflanze (*Arabidopsis thaliana*) sind zunächst sämtliche Reaktionszentren geöffnet. Erfolgt eine intensitätsschwache Anregung (Messlicht  $< 1.9 \cdot 10^{-2} \text{ W/m}^2$ ) mit dem Ergebnis, dass die Zahl der angeregten Zustände im Antennensystem sehr viel kleiner als die Zahl der Reaktionszentren ist, wird nur ein vernachlässigbarer Teil der Reaktionszentren in den geschlossenen Zustand übergehen; die Ratenverhältnisse der einzelnen Relaxationskanäle bleiben ungestört. Die beobachtete Chlorophyllfluoreszenz hat ein Minimum und es wird der minimale Fluoreszenzwert  $F_0$  gemessen.



**Abb. 11: Typische Fluoreszenzsignale bei einer Messroutine an einem Blatt der Pflanze *Arabidopsis thaliana*.** Erläuterungen siehe Text. Messdaten sind [88] entnommen.

In dieser Situation erfolgt eine weitere Anregung des Photosyntheseapparats mit einem so intensiven, sättigenden Lichtpuls ( $\approx 2500 \text{ W/m}^2$ ), dass sämtliche Reaktionszentren geschlossen werden. Es wird ein maximaler Fluoreszenzwert  $F_m$  gemessen. Die Differenz zwischen  $F_0$  und  $F_m$  ist der variable Fluoreszenzwert  $F_v$ . Dieser ist proportional zum Anteil der absorbierten Lichtenergie, die bei der Photosynthese genutzt wird, wenn sich alle Reaktionszentren im geöffneten Zustand befinden. Der Quotient  $F_v/F_m$  ist ein Maß für die maximale photochemische Effizienz und quantifiziert den Anteil des von den Antennensystemen des PS II absorbierten Lichts zur Reduktion des  $Q_A$  [87]. Die im Anschluss an den sättigenden Lichtpuls unter alleiniger Verwendung des schwachen Messlichts gemessene exponentielle Abnahme des Fluoreszenzsignals erlaubt die Abschätzung der maximalen Elektronentransportrate.

Der Photosyntheseapparat kann weiterhin mit kontinuierlichem aktinischem Licht konstanter Intensität stimuliert werden ( $\approx 245 \text{ W/m}^2$ ), das gleichzeitig zum schwachen Anregungslicht eingesetzt wird. Dies hat eine teilweise Schließung des PS II bzw. die Anpassung der Relaxationskanäle für eine Dauer im Bereich mehrerer Minuten zur Folge. Bei Zugabe der sättigenden Lichtpulse steigt dann das Fluoreszenzsignal nur noch leicht an [87].

Nach Abschalten des aktinischen Lichts wird unmittelbar wieder das minimale Fluoreszenzlevel  $F_0$  gemessen. Bei Zugabe der sättigenden Lichtpulse können wiederum die maximalen Fluoreszenzsignale  $F_m$  erreicht werden. Diese Signalintensitäten sind im Vergleich zu dem an der dunkeladaptierten Pflanze gemessenen Wert zunächst geringer und steigen im Verlauf der Zeit wieder an. Der Parameter  $F_m$  reagiert also sensitiv auf äußere Einflüsse.

Untersuchungen der Photosyntheseaktivität von pflanzlichem Material auf zellulärer Ebene liegen bereits vor [89, 90]. Die biologischen Proben wurden jedoch nur im Zellverbund (Blattmaterial) oder als bewegungsunfähige Alge mit einem Durchmesser von 600–800  $\mu\text{m}$  untersucht. Im Rahmen dieser Arbeit wurden *Chlamydomonas*-Zellen *in-vivo* analysiert, die mit einem Zelldurchmesser von 10–25  $\mu\text{m}$  vergleichsweise klein sind und sich durch ihre Flagellen selbstständig fortbewegen können. Die Messung der Chlorophyllfluoreszenz an einzelnen *Chlamydomonas*-Zellen erfordert daher die Kombination eines effizienten Immobilisierungsverfahrens mit einer sehr empfindlichen Nachweismöglichkeit der sehr schwachen Fluoreszenzsignale. Ein Ziel dieser Arbeit ist es, zunächst die einwandfreie Funktionsfähigkeit der Messapparatur nachzuweisen. Das Potenzial der Methode wird bei der Ermittlung und Verfolgung der Variabilität des zellulären Parameters  $F_v/F_m$  in einer synchronisierten *Chlamydomonas*-Kultur über den Zeitbereich verschiedener Wachstumsstadien demonstriert.

Die Messapparatur ist im Rahmen eines interdisziplinären Verbundprojekts realisiert worden und wird in der Folge der Klärung weiterer biochemische Fragestellungen bzw. der Messung von Chlorophyllfluoreszenz-Parametern und deren Interpretation dienen.

## **8.1 Beschreibung der PAM-Messapparatur**

Das Fluoreszenzsignal  $F_0$  ist relativ schwach ( $\approx 5 \cdot 10^4$  Photonen/s, siehe Abschätzung Anhang A3). Zur Verbesserung des Signal-zu-Rausch-Verhältnisses bei der Messung derartiger Signale eignen sich phasenempfindliche Nachweismethoden (Lock-In-Technik oder Boxcar-Integration). In dieser Arbeit wurde unter den vorhandenen experimentellen Bedingungen der Boxcar-Integration mit festem Abtastzeitpunkt der Vorzug gegeben. Aussagekräftige Messer-

gebnisse konnten mit einer Pulsfolgefrequenz der Anregungslichtquelle von 300 Hz bei einer Pulsbreite von 15  $\mu$ s erzielt werden.

Für die Messung von  $F_0$  wurde als Anregungslichtquelle eine Laserdiode (ML520G54-01, Mitsubishi Electric) bei einer Wellenlänge von 637 nm eingesetzt. Das aktinische Licht bzw. die sättigenden Lichtpulse  $F_m$  lieferten zwei LEDs (M490L1, Thorlabs). Die Intensitäten und Dauer der Emission wurden durch je ein Treibermodul (LED DA1, Thorlabs) gesteuert.

Das Licht wurde über eine Anordnung von Strahlteilern (Deckglas bzw. Pellicle) und einer Linse ( $f=30$  mm) in eine Multimode-Lichtleitfaser (M14L, Thorlabs) mit einem Kerndurchmesser von 50  $\mu$ m eingekoppelt. Anschließend wurde es mit Hilfe einer Asphäre ( $f=15$  mm) kollimiert und unter Verwendung eines dichroitischen Spiegels (SP725, Semrock) zusammen mit dem Licht der „optische Pinzette“ in den zweiten Port des Mikroskops eingekoppelt. Ein weiterer dichroitischer Spiegel (488-F2, AHF) transmittierte ausschließlich das Fluoreszenzlicht. Die in der Fokalebene ausgeleuchtete Fläche hatte einen Durchmesser von 20  $\mu$ m. So wurde sichergestellt, dass jeweils nur die immobilisierte Zelle angeregt wurde. Das Fluoreszenzsignal wurde mit einem PMT (R1463, C7319 Hamamatsu) aufgenommen (Abb. 9), dem Signaleingang des Boxcarintegrators (SRS, 250) zugeführt und über zehn Messungen gemittelt. Das analoge Boxcarsignal wurde digitalisiert (RedLab 1208FS, Meilhaus) und vom in LabVIEW (National Instruments) geschriebenen Messprogramm ausgewertet. Die Überwachung und Stabilisierung der Anregungsintensitäten erfolgte mit Hilfe von Siliziumphotodioden (PDA10A, Thorlabs). Vor Beginn jeder Messung wurden die Intensitäten der Lichtquellen am Probenort mit einem Leistungsmessgerät (Nova 2, Ophir) bestimmt und die Parameter des Messprogramms entsprechend kalibriert. Nach jeder Messung wurden neben dem Zeitstempel und dem Fluoreszenzsignal auch die bereits errechneten  $F_v/F_m$ -Werte abgespeichert. Der apparative Fehlerbereich, verursacht durch Schwankungen der Anregungsintensitäten und der Signaldetektion, wurde auf weniger als  $\pm 2$  % minimiert.

## 8.2 Ermittlung der optimalen Geräteeinstellungen

Die Optimierung der Messapparatur erfolgte mit Hilfe von Blattproben der Wasserpflanze *Lysimachia nummularia*. Mögliche Beeinflussungen durch das im Experiment genutzte Immobilisierungsverfahren wurden so ausgeschlossen (Anhang A4). Nachdem die optimalen Geräteeinstellungen identifiziert wurden, konnte die einwandfreie Funktionsfähigkeit der Apparatur anhand von Langzeitexperimenten demonstriert werden. Hierbei war es möglich,  $F_v/F_m$  über einen Zeitraum von  $> 24$  h erfolgreich auf zellulärer Ebene zu bestimmen. Das in der Literatur bekannte zeitabhängige Verhalten des  $F_v/F_m$ -Wertes unter verschiedenen Start-

lichtbedingungen bzw. unterschiedlichem Lichtstress konnte nachgewiesen werden ([87, 91], Anhang A4, Abb. 11). Bei stärkerer Beleuchtung wird ein weiterer Relaxationskanal, das nichtphotochemische Quenchen (NPQ), verstärkt geöffnet und die Fluoreszenzabstrahlung vermindert. Dieser Effekt kann mehrere Stunden andauern; deshalb ist u.a. eine absolute Quantifizierung der Effizienz des PS II nicht ohne Weiteres möglich [87]. Unter gleichen Startbedingungen ist  $F_v/F_m$  jedoch ein guter Wert, um relative Veränderungen im PS II zu quantifizieren. Die im Experiment ermittelten  $F_v/F_m$ -Werte liegen zwischen 0,65–0,75 leicht unterhalb des als optimal geltenden Bereichs von 0,79–0,84. Ursache hierfür können neben den Lichtverhältnissen vor Beginn der Messungen auch weitere Faktoren sein. Beispielsweise wurde die Pflanze in einem Volumen von nur 3 ml vermessen, sodass Nährstoffmangel insbesondere CO<sub>2</sub>-Mangel von Relevanz sein könnte.

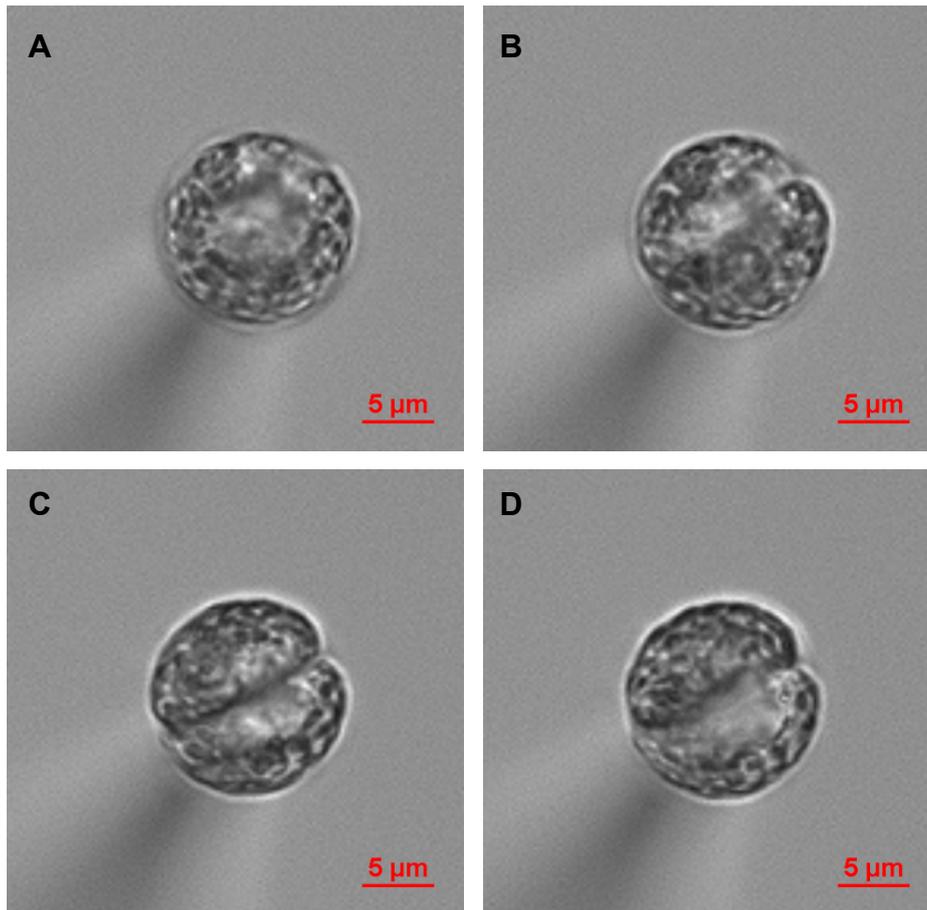
### **8.3 Präparation und Immobilisierung einzelner *Chlamydomonas*-Zellen**

Die Algen wurden einer unter definierten Bedingungen in einem Lichtthermostaten wachsenden Synchronkultur entnommen [1]. Die Lichtphase hatte eine Dauer von 12 h. Zu jedem Messzeitpunkt wurden der Kulturröhre  $\approx$  10 ml Algensuspension entnommen und in völliger Dunkelheit zum Messplatz transportiert. In einem Teil der Experimente wurden die Messungen der Suspension bei Lichtthermostatterperatur (34 °C), im anderen Teil bei Raumtemperatur (21 °C) durchgeführt. Am Messplatz wurde nach der Dunkeladaption von 20 min ein Teil der Algensuspension mit Nährlösung auf eine Konzentration von  $\approx$  100 Algen/ml verdünnt und in die temperierte Probenkammer (MiniCeM) eingesetzt.

Für die Immobilisierung der Algen erwies sich die Patch-Clamp-Methode am geeignetsten. Im Experiment wurde eine Mikropipette (Typ II, Eppendorf, Deutschland) mit 3,5  $\mu$ m Innendurchmesser verwendet. Da diese Methode eine offene Probekammer voraussetzt, wurde der durch Verdunstung bedingte Wasserverlust durch Zugabe der entsprechenden Menge destillierten Wassers alle 30 min kompensiert.

### **8.4 Effizienz des Photosystems II – Messung des Quotienten $F_v/F_m$ – an *Chlamydomonas reinhardtii***

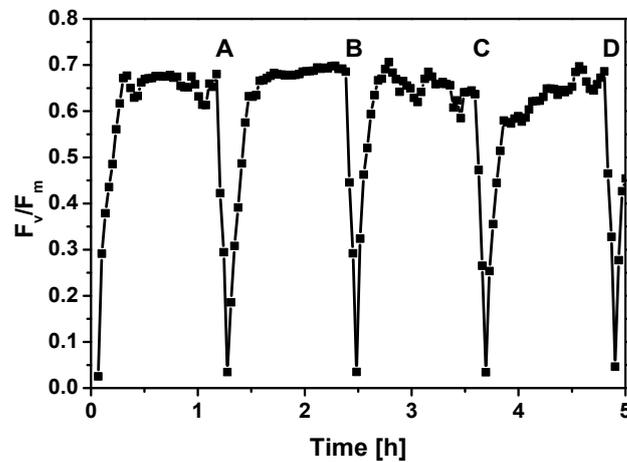
Um das Potenzial und die Zuverlässigkeit der Messapparatur zu demonstrieren, wurde an einer einzelnen Alge der  $F_v/F_m$ -Wert über einen Zeitraum von 5 h bestimmt. Die Alge wurde der Synchronkultur 12 h nach Beginn der Lichtphase entnommen, in der auf 21 °C temperierten Probenkammer immobilisiert und dann vermessen.



**Abb. 12: Entwicklung einer über die Dauer von fünf Stunden immobilisierten *Chlamydomonas*-Zelle.** A–D) Die Teilabbildungen wurden im Abstand von 75 min aufgenommen. In C und D ist eine binäre Zellteilung zu erkennen.

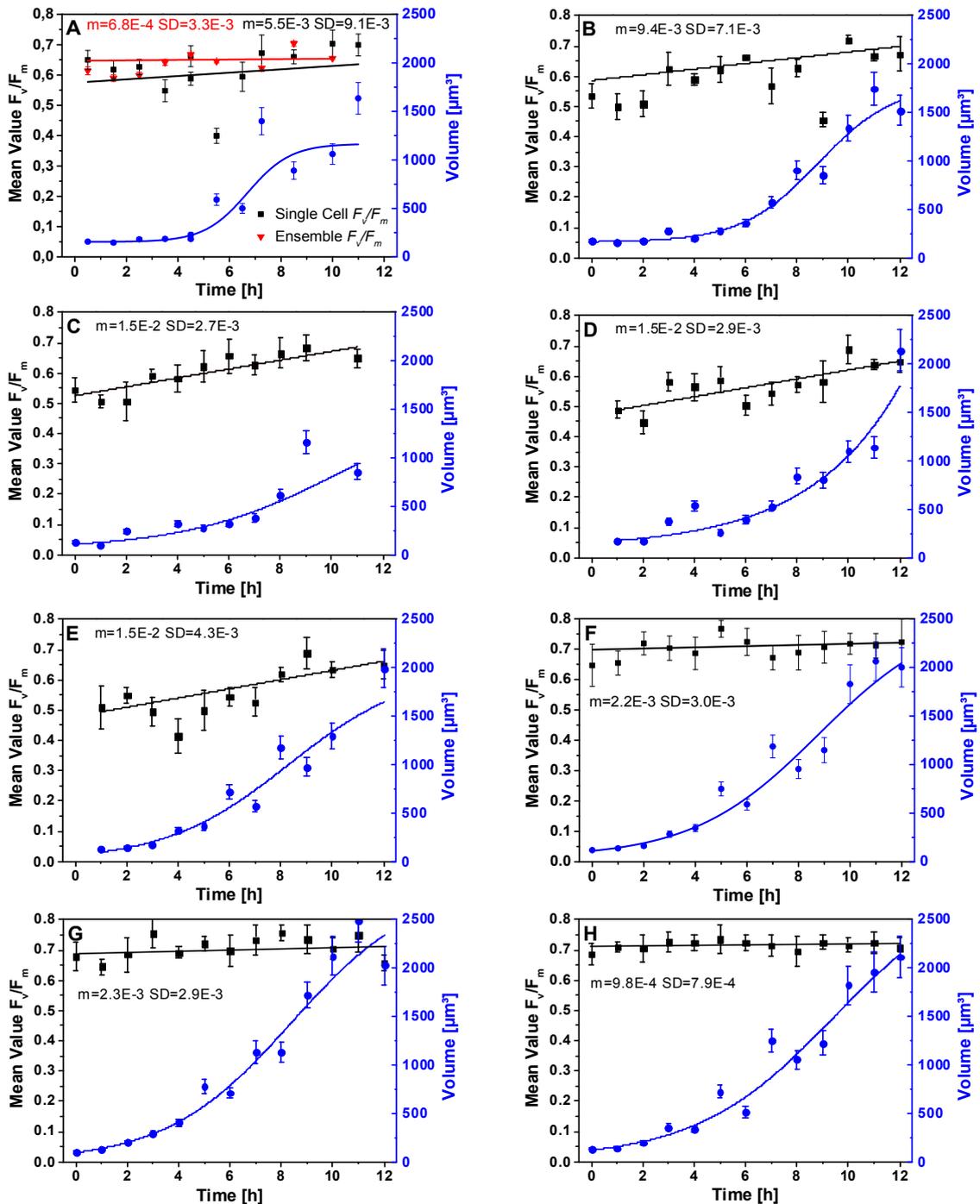
Zu Beginn der Messung, und nachfolgend im Abstand von 75 min, war die Alge ( $\varnothing \approx 14 \mu\text{m}$ ) für 30 s dem Starklicht einer Halogenlampe ( $I = 0,65 \text{ W/cm}^2$ ) ausgesetzt. Während der Belichtungsphase erfolgte jeweils eine Weitfeldaufnahme (Abb. 12). Unmittelbar nach der Halogenlampenbestrahlung sind alle Reaktionszentren geschlossen und der Quotient  $F_v/F_m$  nimmt einen Minimalwert an. Innerhalb eines Zeitraums von 15 min werden die Reaktionszentren des PS II wieder geöffnet und  $F_v/F_m$  steigt auf Werte im Bereich von 0,65–0,7 an (Abb. 13). Im ersten Teil der Messung ( $t < 1 \text{ h}$ ) sind im Gegensatz zu den Messungen an Blättern intakter Pflanzen (vgl. Anhang A4, Abb. 12) stärkere Fluktuationen des  $F_v/F_m$ -Werts zu beobachten, welche auf Befreiungsversuche der Alge zurückzuführen sind. Die in der zweiten Messhälfte ( $t > 2,5 \text{ h}$ ) verstärkt auftretenden Schwankungen sind auf Veränderungen innerhalb der Zellstruktur zurückzuführen, die durch den beginnenden Zellteilungsprozess ausgelöst werden (Abb. 12, B–D). Nach der Halogenlampenbestrahlung

und der anschließenden Öffnung des PS II innerhalb von 15 min bzw. dem Erreichen eines  $F_v/F_m$ -Werts im Bereich von 0,65–0,7 ist eine tendenzielle Erhöhung von  $F_v/F_m$  zu beobachten.



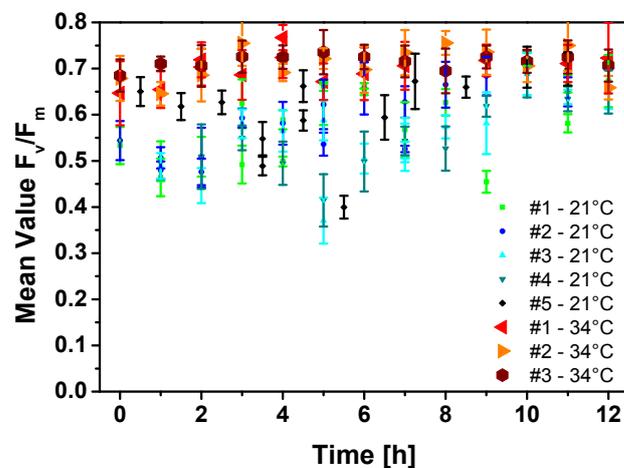
**Abb. 13:** Die  $F_v/F_m$ -Werte einer *Chlamydomonas*-Zelle, die mit der Patch-Clamp-Methode immobilisiert wurde. Die Umgebungstemperatur betrug 21 °C. An den Positionen A–D) wurden die in Abb. 12 gezeigten Weitbildaufnahmen gemacht. Während eines Messzeitraums von 5 h wurde  $F_v/F_m$  bestimmt. In dieser Zeit wurde die Alge im Abstand von 75 min mit einer Halogenlampe ( $I = 0,65 \text{ W/cm}^2$ ) bestrahlt. Nach ca. 3 h sind verstärkte Fluktuationen von  $F_v/F_m$  zu beobachten. Die Ursache hierfür sind strukturelle Veränderungen innerhalb der Zelle, erzeugt durch den Zellteilungsprozess (Vgl. Abb. 12, C–D). Der zelluläre Parameter  $F_v/F_m$  reagiert sensitiv auf äußere Einflüsse, wie Lichtveränderungen und intrazelluläre Prozesse (z.B die Zellteilung).

Um die Wachstumsabhängigkeit des Zellvolumens und des  $F_v/F_m$ -Wertes zu untersuchen, wurde an acht Tagen jeweils mit Beginn der Lichtphase jede Stunde eine nach dem Zufallsprinzip selektierte Zelle immobilisiert und der  $F_v/F_m$ -Wert über einen Zeitraum von 30–45 min gemessen. Nach einer Wartezeit von 10 min wurden ein mittlerer  $F_v/F_m$ -Wert und die zugehörige Schwankungsbreite berechnet. Die Messungen erfolgten bei Temperaturen von 21 °C (Abb. 14, A–E) und 34 °C (Abb. 14, F–H). Parallel wurde das Zellvolumen gemessen. Hierzu sind die entsprechenden Weitfeldaufnahmen ausgewertet worden, in denen die Halbachsen ( $a$ ,  $b$ ) der ellipsenförmigen Zellen bestimmt wurden. Das Zellvolumen berechnet sich dann zu  $V = 4/3 \cdot \pi \cdot a \cdot b^2$ . Das Zellvolumen nimmt im Tagesverlauf zu und kann durch eine Boltzmann-Wachstumsfunktion beschrieben werden. Die Messwerte streuen jedoch stark um diese Fitfunktion.



**Abb. 14: Wachstumsabhängiger mittlerer Quotient  $F_v/F_m$  und Zellvolumen.**  $F_v/F_m$  (linke Ordinate) wurde jeweils stündlich in einem Zeitraum von > 30 min, nach Immobilisierung mittels Patch-Clamp-Methode, gemessen. Nach einer Wartezeit von 10 min wurde das arithmetische Mittel gebildet. Die Messwerte streuen stark um die über den Tagesgang ermittelte Regressionsgrade. Der ermittelte Anstieg  $m$  liegt zwischen  $2,7 \cdot 10^{-3}$  und  $7,7 \cdot 10^{-3}$  ( $21^\circ\text{C}$ ; A–E) und  $27,9 \cdot 10^{-4}$  und  $3 \cdot 10^{-3}$  ( $34^\circ\text{C}$ ; F–H). Als Maß für die Streuung ist die Standardabweichung ( $SD$ ) angegeben. Das Zellvolumen (rechte Ordinate) entspricht einer Boltzmann-Wachstumsfunktion. Ein zusätzlich zur Einzelzellanalyse im Zellensemble mit Hilfe eines kommerziellen PAM-Fluorimeters gemessener Datensatz belegt die einwandfreie Funktion der Messapparatur (A).

Zu Bestätigung der Funktionsfähigkeit der Messapparatur wurde  $F_v/F_m$  parallel an einem Zellensemble mit dem kommerziellen PAM-Fluorimeter (FMS2) gemessen (Abb. 14, A). Um eine ausreichende Signalqualität zu erreichen, musste die aus dem Lichtthermostat stammende Algensuspension durch Zentrifugieren (50g) aufkonzentriert werden. Die Messsignale repräsentieren folglich einen Mittelwert aus  $7 \cdot 10^6$  Algenzellen. Es ist deutlich zu erkennen, dass ein Großteil der  $F_v/F_m$ -Werte sowohl bei den Einzelzellanalysen als auch bei den Ensemblemessungen im gleichen Bereich von 0,6–0,7 liegt, wobei von Beginn bis zum Ende der Lichtphase ein leichter Anstieg zu verzeichnen ist. Der Anstieg der Regressionsgeraden variiert zwischen  $2,7 \cdot 10^{-3}$ – $7,7 \cdot 10^{-3}$  bei einer Umgebungstemperatur von 21 °C (A–E) sowie zwischen  $7,9 \cdot 10^{-4}$  und  $3 \cdot 10^{-3}$  bei 34 °C (F–H). In allen Messserien streuen die Messwerte stark um die Regressionsgerade (Abb. 14, A–H). Die Heterogenität der Parameter Volumen und  $F_v/F_m$  wird auch bei den Messungen an unterschiedlichen Zellen aber gleichem zellulärem Entwicklungsstadium festgestellt. Für die gemessenen  $F_v/F_m$ -Werte wird dies in Abb. 15 deutlich. Hier werden die in Abb. 14 einzeln dargestellten acht Messtage in einer Grafik zusammengefasst.



**Abb. 15:**  $F_v/F_m$ -Werte aus Abb. 14. Klar erkennbar ist die starke Heterogenität, der zu jeder Stunde gemessenen  $F_v/F_m$ -Werte. Weiterhin ist eine Variabilität im Tagesgang zu beobachten. Auffällig ist, dass die Zellen bei einer Temperatur von 34 °C höhere Werte bzw. eine größere Zellfitness aufweisen als die Zellen die bei 21 °C gemessen wurden.

Der Parameter  $F_v/F_m$  zeigt während der Wachstumsphase eine leichte Zunahme, die von der Umgebungstemperatur abhängig ist. Mit Ende der Lichtphase bzw. beginnender Zellteilungs-

phase (12 h) ist jedoch wiederum eine leichte Abnahme zu beobachten. Zellen bei höherer Umgebungstemperatur (34 °C) weisen generell höhere  $F_v/F_m$ -Werte auf.

## 8.5 Effizienz des Photosystems II – Interpretation der Messergebnisse

Bei der Photosynthese wird Lichtenergie mit Hilfe von katalytischen Prozessen in chemische Energie umgewandelt [91]. Mehrere regulative Prozesse sorgen für eine optimale Anpassung an die Umgebungsbedingungen, wie beispielsweise Licht- und Nährstoffangebot [91]. Informationen über den physiologischen Zustand photoautotropher Organismen, wie auch über ablaufende Photosynthesereaktionen können durch Vergleichsmessungen der sich ändernden Chlorophyllfluoreszenz erhalten werden. Der  $F_v/F_m$ -Wert ist eine empirische Größe und beschreibt, in welchem Ausmaß das von den Antennensystemen des Photosyntheseapparats (PS II) absorbierte Licht zur Reduktion des Quinonakzeptors  $Q_A$  verwendet wird. Eine absolute Quantifizierung des Photosyntheseapparats ist mit diesem Parameter ohne Berücksichtigung einiger Randbedingungen nicht möglich. Der  $F_v/F_m$ -Wert kann jedoch als relativer Parameter dazu dienen, die Effizienz des PS II zu charakterisieren [87].

Ein  $F_v/F_m$ -Wert im Bereich von 0,79–0,84 gilt für viele Pflanzen als optimal und entspricht der maximalen Effizienz des Photosyntheseapparats. Biotische und abiotische Umwelteinflüsse auf den photoautotrophen Organismus, wie z.B. Nährstoff- und Lichtangebot, Schädlingsbefall, Temperatur und pH-Wert, können geringere  $F_v/F_m$ -Werte bewirken [92, 93]. Die Alge *Chlamydomonas reinhardtii* wird in Laborkulturen in einem Ensemble aus mehreren tausend Individuen pro Milliliter Nährlösung kultiviert. Es ist daher eine plausible Annahme, dass durch die Konkurrenz um Umweltressourcen der Organismus bzw. der Photosyntheseapparat beeinträchtigt wird. Da der Chloroplast etwa zwei Drittel des Zellvolumens einnimmt und ein zentrales Organell des Primärstoffwechsels ist, ist es eine berechnete Annahme, dass der Quotient  $F_v/F_m$  den Gesamtzustand bzw. die Zellfitness beschreibt.

Die innerhalb kurzer Zeiträume (30 min–1 h) und bei konstanten Umweltbedingungen gemessenen maximalen  $F_v/F_m$ -Werte liegen im Bereich von 0,4–0,8 (Abb. 14) und somit unterhalb der als optimal geltenden Werte von 0,79–0,84. Es wird eine starke Heterogenität der zellulären Messwerte  $F_v/F_m$  und Zellvolumina während der Wachstumsphase und zu definierten Zellentwicklungsstadien beobachtet. Qualitativ kann die Zunahme des Zellvolumens durch eine Boltzmann-Wachstumsfunktion und die Zunahme des Quotienten  $F_v/F_m$  durch eine line-

re Regression beschrieben werden. Die Messwerte streuen jedoch stark um die Fitfunktionen (Abb. 14). Für die Zellvolumina ist dies zu erwarten, da diese im Ensemble zu jedem Zeitpunkt der Wachstumsphase durch eine Lognormalverteilung beschrieben werden können [94], die gemessenen Zellen jedoch aus der gesamten Größenverteilung zufällig ausgewählt wurden. Während das Zellvolumen sicher und direkt gemessen werden kann, wird der zelluläre Parameter  $F_v/F_m$  vielfältig beeinflusst.

Nach Immobilisierung und fortlaufender Messung ist, wie auch bei den höheren Pflanzen, eine Zunahme der  $F_v/F_m$ -Werte zu beobachten (Abb. 13). Die Ursache hierfür ist wahrscheinlich, dass die Algen in einem Lichtthermostat bei relativ hohen Lichtintensitäten (in Abhängigkeit der wachstumsabhängigen Zelldichte  $I = 130\text{--}300 \text{ W/m}^2$ ) aufgezogen wurden. Es ist daher nicht auszuschließen, dass die Dunkeladaption über einen Zeitraum von 20 min nicht ausreichend ist, um den Quinonakzeptor  $Q_A$  vollständig zu oxidieren. Im Lichtthermostaten gibt es in Abhängigkeit von der Zelldichte bzw. der lokalen Position unterschiedliche Beleuchtungsstärken. Es ist daher möglich, dass die gemessene Heterogenität der  $F_v/F_m$ -Werte in jeweils verschiedenen Entwicklungsstadien teilweise von diesen Lichtbedingungen abhängig ist (Abb. 14). Dem steht jedoch die Tatsache gegenüber, dass die Algensuspension im Lichtthermostaten kontinuierlich durchmischt wird und folglich alle Algen gleichermaßen von den wechselnden Lichtintensitäten betroffen sein sollten. Auch müsste die Heterogenität verstärkt zum Ende des Lichtzyklus auftreten, da hier die optische Dichte der Algensuspension aufgrund des größeren Zellvolumens zunimmt. Es ist daher davon auszugehen, dass die Starklichtbedingung im Lichtthermostaten eine systematische Verminderung der  $F_v/F_m$ -Werte, aber keinen größeren Einfluss auf die festgestellte Heterogenität zur Folge hat.

Eine weitere Beeinträchtigung der  $F_v/F_m$ -Werte bzw. der Zellfitness wird durch die Immobilisierung der Zelle gegeben. Während der Immobilisierung einzelner *Chlamydomonas*-Zellen sind leichte Bewegungen und vereinzelt stärkere Befreiungsversuche der jeweiligen Zelle zu beobachten. Diese führten dazu, dass die unter diesen Umständen gemessenen  $F_v/F_m$ -Werte (z.B. Abb. 13,  $\Delta \pm 8 \%$ ) stärker schwanken als die im intakten Zellverbund gemessenen (Anhang A4, Abb. 12,  $\Delta \pm 2 \%$ ). Diese Schwankungen werden bei der Angabe der in Abb. 14 aufgeführten Mittelwerte durch Angabe des Fehlerbereichs berücksichtigt und liegen deutlich über dem messtechnisch bedingten Fehler.

Anzunehmen ist, dass kleine Zellen, wie sie zu Beginn der Lichtphase vorliegen, stärker durch die Immobilisierung beeinflusst werden als größere Zellen zum Ende der Wachstumsphase. Dies deckt sich zunächst mit den  $F_v/F_m$ -Messwerten. Diese zeigen bei einer

Umgebungstemperatur von 21 °C und über den Zellentwicklungszyklus einen Anstieg der linearen Regression. Diese Zunahme der Zellfitness deutet darauf hin, dass die größeren Zellen weniger stark durch die Immobilisierung beeinflusst worden sind (Abb. 14, A–E). Jedoch ist bei einer Umgebungstemperatur von 34 °C nur noch ein sehr schwacher Anstieg der  $F_v/F_m$ -Werte während der Entwicklungsperiode festzustellen (Abb. 14, F–H). Hieraus kann geschlossen werden, dass die Immobilisierung zwar potentiell einen Einfluss auf die  $F_v/F_m$ -Werte bzw. die Zellfitness hat, dieser jedoch nicht von der Zellgröße abhängig ist und folglich nicht die Ursache für die gemessene Heterogenität ist.

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass die Zellfitness durch äußere Umwelteinflüsse, beispielsweise Lichtangebot und Umgebungstemperatur bzw. physiologische Prozesse innerhalb der Zellen, wie die Zellteilung beeinflusst wird. Die hier vorgestellte Methode ermöglicht prinzipiell die parallele Erfassung von fluoreszenzspektroskopischen und morphologischen Parametern an einzelnen lebenden Algenzellen über lange Zeiträume. Mit diesem Ansatz wurde u.a. festgestellt, dass der Photosyntheseapparat durch den Zellteilungsprozess beeinträchtigt wird und eine Heterogenität der Zellfitness im Zellensemble zu bestimmten Entwicklungsstadien existiert. Die Ursache hierfür kann im Rahmen dieser Arbeit nicht vollständig geklärt werden. Möglich ist beispielsweise eine Zell-zu-Zell-Heterogenität der Photosynthese. Da die Photosynthese die Grundlage für das zelluläre Wachstum ist, hat eine mögliche Heterogenität zwangsläufig auch Auswirkungen auf wachstumsbezogene zelluläre Parameter, wie z.B. den zellulären DNA- und Stärkegehalt im Zellensemble.

## **9 Nichtlineare Mikroskopie und Bilddatenanalyse zur *In-vitro*-Erfassung von wachstumsabhängigen zellulären Parametern**

Statistisch gesicherte Aussagen über die Verteilung biochemischer Parameter bzw. über die Homogenität oder Heterogenität einer Zellkultur sind nur möglich, wenn zu einem Zeitpunkt Messwerte einer statistisch relevanten Anzahl von Zellen bestimmt werden können. Eine Möglichkeit bieten die Bilddatenanalyse und ihre Anwendung in der Laser-Scanning-Mikroskopie.

## 9.1 Rechnergestützte Bilddatenanalyse und -auswertung

Die Bilddatenanalyse bezeichnet einen Prozess, bei dem quantitative, strukturelle und funktionelle Messungen an einem Bild vorgenommen werden [95]. Für die Erfassung spezifischer Messparameter bei ausreichend statistischer Datensicherheit ist es häufig sinnvoll, bestimmte Auswerteroutinen zu automatisieren. Hier wird unterschieden zwischen der mit dem Messvorgang parallel ablaufenden Bildanalyse und der Nachbearbeitung der Bilddaten.

Die zur Auswertung eingesetzte Rechentechnik ist derzeit noch nicht in der Lage, alle möglichen Artefakte zu erkennen. Aus diesem Grund ist die Probenpräparation mit größerer Präzision vorzunehmen, als es bei der manuellen Bilddatenanalyse notwendig wäre. Während des Messzeitraums ist sicherzustellen, dass die Messbedingungen konstant bleiben. Gegebenenfalls sind mögliche Veränderungen zu protokollieren und in der Datenauswertung zu berücksichtigen. Generell ist bei der automatischen Bilddatenanalyse die bestmögliche Bildqualität anzustreben [95].

Die Bilddatenanalyse ist in die Abschnitte Bilddatenaufbereitung, Bilddatensegmentierung, die quantitative Messdatenerfassung und Datenanalyse sowie -ausgabe untergliedert.

In der Bilddatenaufbereitung werden Algorithmen zur Erhöhung des Bildkontrasts bzw. zur Rauschreduktion genutzt. Für konzentrationsabhängige Analysen muss sichergestellt sein, dass die originären Messwerte durch die Bilddatenanalyse nicht verfälscht werden. Oftmals ist hier die Duplizierung des Bilddatensatzes sinnvoll, um in einem Datensatz bei verbessertem Kontrast die strukturellen bzw. morphologischen Analysen – beispielsweise die Zellerkennung – durchzuführen und dann mit diesen Bildkoordinaten in dem unveränderten Datensatz die zur Signalintensität proportionalen Stoffkonzentrationen zu bestimmen.

Die Bilddatensegmentierung identifiziert bestimmte Areale unter Verwendung von Segmentierungsmethoden bzw. Objekterkennungsalgorithmen. Diese werden in die drei Gruppierungen „Bottom-up“- , „Top-down“- und Hybrid-Methoden unterteilt. Das Bild wird zunächst größtmöglich segmentiert und anschließend nach Ähnlichkeiten untersucht, um bestimmte Objekte in Klassen zusammenfassen zu können. Die einfachste Art der Segmentierung basiert auf der Festlegung eines statisch oder dynamisch angepassten Intensitätsschwellwertes [96]. Voraussetzung dafür ist, dass sich das zu erkennende Objekt deutlich vom Hintergrundrauschen abhebt. Weiterhin gibt es sogenannte regionenbasierte Segmentierungsmethoden, deren Grundlage die Annahme ist, dass benachbarte Pixel bzw. die dreidimensionalen Äquivalente, Voxel, in Bezug auf eine Messgröße ähnlich sind. Die Basis

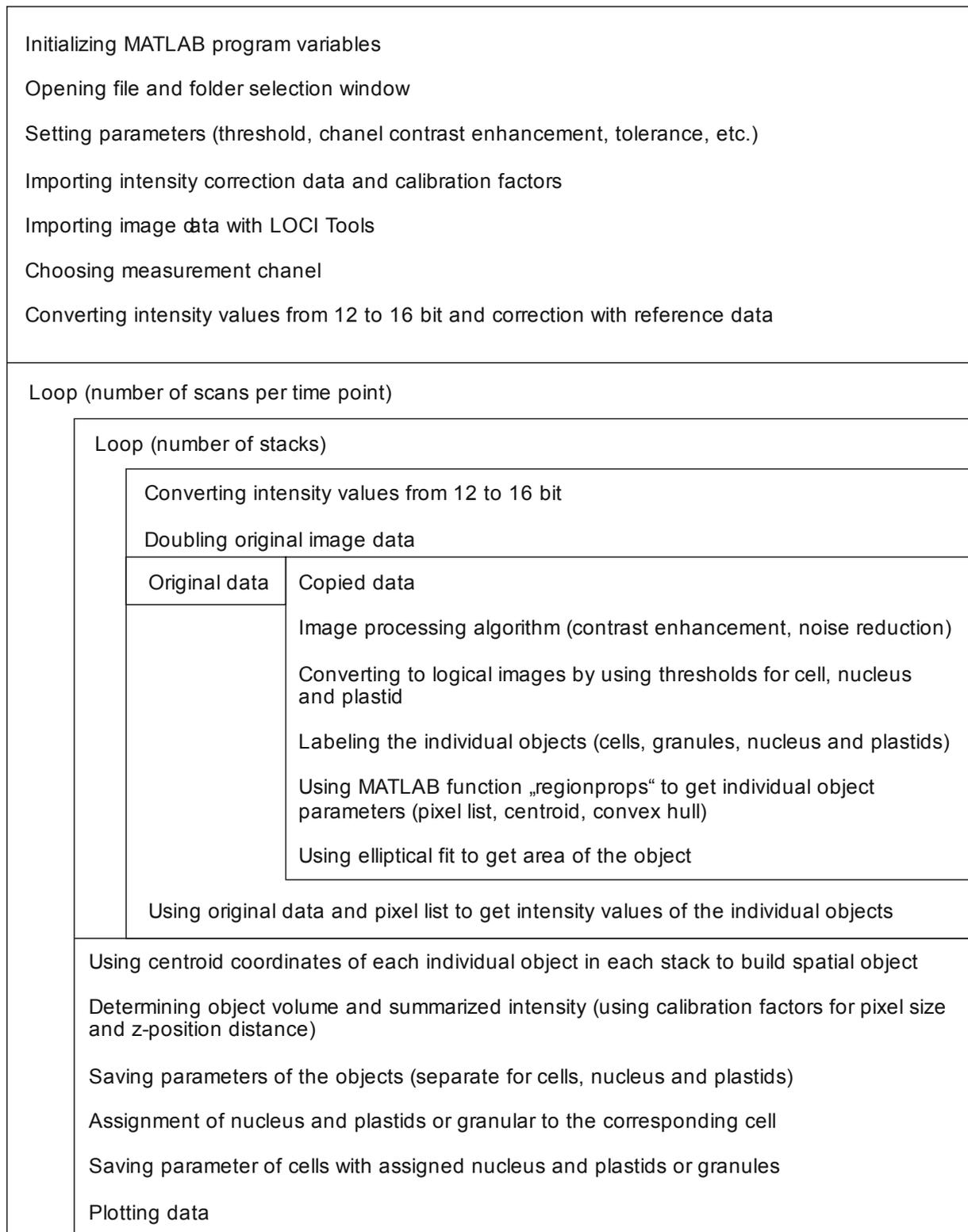
der hier verwendeten Algorithmenklasse wird als „Split and Merge“ bezeichnet [20]. Die fortschreitende Leistungsfähigkeit der Rechentechnik erlaubt es seit den 1990er Jahren, mehrere Methoden zu parallelisieren. Diese Parallelisierung wird als integrierte Segmentierung bezeichnet. Hier ist der morphologische „Watershed“-Algorithmus eines der am meisten benutzten Verfahren zur Objekterkennung [97]. Die „Top-down“-Segmentierungsmethoden sind den menschlichen kognitiven Fähigkeiten nachempfunden. Das bedeutet, dass bestimmte Modellannahmen in die Algorithmen implementiert werden. Beispielsweise sind das Annahmen zu Form oder Häufigkeit der zu identifizierenden Objekte. Die Anpassungen der Algorithmen wird prinzipiell in mehreren Iterationsschritten vorgenommen, wie es beispielsweise auch beim menschlichen Lernprozess der Fall ist. Für eine detaillierte Übersicht der verwendeten Methoden und Algorithmen siehe z.B. [95, 98].

### 9.1.1 Beschreibung der Auswerteroutinen zur Objekterkennung

Die zur Analyse der Bilddaten verwendeten Auswerteroutinen gliederten sich in zwei Teile. Basierend auf den im Programmablaufplan beschriebenen Prozeduren, wurden die Objekte (Zellen, Nuclide, extrazelluläre DNA, Stärkegranula, Chloroplasten, Protoplasten) identifiziert bzw. die dem Messsignal proportionalen Stoffkonzentrationen (DNA, Stärke) ermittelt (Abb. 16). Alle Messdaten wurden zusammen mit Parametern, die ein Maß für die Güte der automatisierten Erkennung sind, abgespeichert. In einem zweiten Auswerteschritt wurden die Messdaten unter Berücksichtigung der Güteparameter und der statistischen Analysen grafisch aufbereitet. Weiterhin konnten die Messdaten auf Korrelationen zueinander analysiert werden.

Vor Beginn der automatisierten Bilddatenanalyse mussten bestimmte Programmparameter empirisch ermittelt werden. Hierzu zählten die Intensitätsschwellwerte bzw. die Kalibrierung der Auswertealgorithmen in der Objekterkennung. Die Robustheit der Objekterkennungsprozedur wurde in dieser Phase manuell überwacht, bewertet und durch Variation der Programmparameter gezielt verbessert.

Nach Ermittlung der optimalen Programmparameter wurde die im Programmablaufplan (Abb. 16) beschriebene automatisierte Bilddatenanalyse gestartet. Mit Hilfe einer grafischen Benutzeroberfläche konnte ein erster, dreidimensionaler Bilddatensatz ausgewählt werden. In einer Programmschleife wurden dann nacheinander alle verbleibenden Datensätze eingelesen und verarbeitet. Als Schnittstelle zwischen dem Rohdatensatz und MATLAB wurde das frei verfügbare Programm „LOCI Tools“ verwendet [99]. Neben den Bilddaten wurden auch weitere relevante Parameter, wie die Wahl des Farbkanals, die Kalibrierfaktoren in lateraler und axialer Richtung und die Intensitätskorrekturwerte, eingelesen.



**Abb. 16: Programmablaufplan der Bilddatenanalyse.** Erläuterung siehe Text.

Da viele MATLAB-Routinen zur Bildbearbeitung eine Tiefe von 16 Bit voraussetzen, wurden die 12-Bit-Bilddatensätze entsprechend angepasst. Anschließend wurde der Datensatz zum

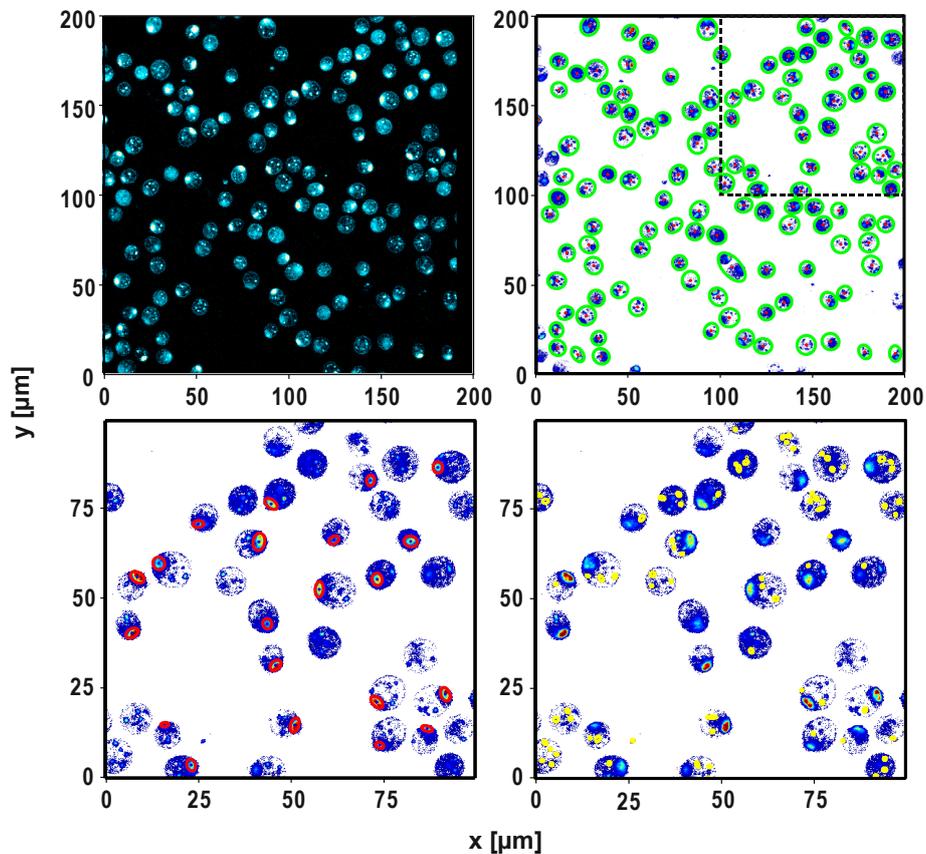
weiteren Informationsgewinn dupliziert. Ein Datensatz wurde optimiert, um eine optimale Bilddatensegmentierung sicherzustellen. Die auf diesem Weg ermittelten Bildkoordinaten der identifizierten Zielobjekte wurden genutzt, um im zweiten unveränderten Datensatz die Stoffkonzentrationen zu bestimmen. Die Identifizierung der Objekte bzw. der Stoffkonzentrationen erfolgte in einer Schleife für jede Schnittebene separat.

Das MATLAB-Skript erlaubte die Definition von drei Intensitätsschwellwerten. Dies ermöglichte neben der Identifizierung von größeren Objekten, die einen niedrigen Signalpegel aufwiesen, auch die Erkennung von darin enthaltenden kleineren Objekten, wie die Nuclei oder Stärkegranula, die ein stärkeres Signal lieferten (Abb. 17). Zur Unterstützung der Bilddatensegmentierung wurden sinnvolle morphologische Annahmen getroffen. So war es nützlich, eine Zelle durch eine ellipsoide Form zu beschreiben. Die Zentrumskoordinaten dieser Ellipsen wurden anschließend verwendet, um aus den zweidimensionalen Objekten der Bildebene und dem gegebenen Bildebenenabstand die dreidimensionalen Objekte des Bildstapels zu konstruieren. Die Koordinaten der Ellipsen ermöglichten darüber hinaus eine Zuordnung der Zellen bzw. Protoplasten zu den darin enthaltenen Objekten, wie Nucleus, extranucleäre DNA oder Stärkegranula.

Neben der vollautomatisierten Objekterkennung bestand die Möglichkeit, Teilroutinen manuell abzarbeiten. Insbesondere bei Analysen des intakten Zellverbundes von Blättern war eine automatisierte Erkennung nicht zielführend, da hier die Objektdichte (Chloroplasten) zu groß war. Eine einfachere Lösung war es, zunächst die Chloroplasten manuell zu markieren und diese anschließend automatisch auf enthaltende Objekte, wie z.B. Granula, zu untersuchen.

Abhängig von der Datenqualität und der Objektdichte (Zelldichte im Untersuchungsvolumen) bzw. des Abstandes zwischen zwei Objekten waren fehlerhafte Objekterkennungen nicht vollständig ausgeschlossen. Daher wurden entsprechende Filteralgorithmen implementiert bzw. Parameter protokolliert, die die Güte der Objekterkennung qualifizieren und quantifizieren. In den zweidimensionalen Schnittbildern lieferten morphologische Kriterien Hinweise auf Fehlerkennungen. Eine große Exzentrizität des Ellipsenfits deutete z.B. auf mehrere sehr dicht gepackte Objekte hin, die als nur ein Objekt erkannt wurden. Die Zusammenführung der in den zweidimensionalen Schnittebenen identifizierten Objekte zu je einem dreidimensionalen Objekt erfolgte anhand der Zentrumskoordinaten der gefitteten Ellipsen. Wichen hierbei die Koordinaten zwischen den Bildebenen um mehr als 5 % voneinander ab, wurden diese Objekte verworfen. Aufgrund der ellipsoiden Form der Zellen kam es meist nur in den Bildebenen mit der größten Annäherung der Zellen zueinander zu Fehlerkennungen. Im Fall einer derarti-

gen Fehlererkennung, wurden die Objektparameter dieser Bildebene anhand der fehlerfreien benachbarten Ebenen extrapoliert und das Ereignis protokolliert.



**Abb. 17: Mit dem LSM aufgenommenes Schnittbild von mit Propidiumiodid gefärbten Zellen. A)** Falschfarbendarstellung des TPF-Signals. **B)** Die mit dem niedrigsten Intensitätsschwellwert (ISW) 1, automatisch identifizierten Zellen wurden mit einer Ellipse gefittet (grün umrandet). Die Zentrumskoordinaten sind mit einem roten Punkt gekennzeichnet. **C)** Mit Hilfe des größeren ISW 2 wurden die Nuclei identifiziert (rote Ellipsen). **D)** Durch ISW 3 und einer Größeneinschränkung identifizierte extranucleäre DNA. Es gilt  $ISW\ 1 < ISW\ 2 \leq ISW\ 3$ . In (C) und (D) ist der in (B) gekennzeichnete Bildausschnitt dargestellt.

Aufgrund des begrenzten Dynamikbereiches der Detektion kann in der Messung der proportionale Zusammenhang zwischen Signalintensität und Stoffkonzentration verloren gehen. Intensitätswerte, die in der Sättigung lagen, wurden durch einen zweidimensionalen Gaußfit extrapoliert. Für alle Filter- bzw. Extrapolationsalgorithmen konnten während der Zellerkennung und/oder in der Nachbearbeitung Schwellwerte angegeben werden, sodass beispielsweise Objekte, die nicht die Mindestanzahl oder zu viele als fehlerhaft erkannte Bildebenen aufwie-

sen, verworfen wurden. Jegliche Art der Datenaufbereitung wurde protokolliert, sodass eine spätere Wichtung des Einflusses auf das Messergebnis möglich war. Für die hier beschriebenen Routinen zur Datenauswertung und -aufbereitung wurde das Programm MATLAB (The MathWorks, Inc. USA) verwendet.

### 9.1.2 Statistische Datenanalyse

Im Anschluss an die Objekterkennungsprozedur erfolgte die Anwendung weiterer Routinen zur statistischen Auswertung und grafischen Aufarbeitung.

Ein Ziel der statistischen Analyse ist es, die Häufigkeitsverteilungen der zellulären Parameter im Zellensemble zu beschreiben.

Eine gängige Methode ist die Einteilung der Messwerte in äquidistante Klassen, die als Histogramm grafisch dargestellt werden können. Hierbei stellt der Flächeninhalt jedes Rechtecks die Klassenhäufigkeit dar. Die Höhe jedes Rechtecks entspricht der Häufigkeitsdichte (Häufigkeit dividiert durch Klassenbreite). Bei unbekannter Verteilungsform wird die Wahl der Klassenbreite zunächst willkürlich vorgenommen. Ein guter Startwert ist, den  $n$ -dimensionalen Datensatz in  $\sqrt{n}$ -Teile zu separieren.

Für bestimmte Verteilungen der Messdaten, wie beispielsweise der Normal- bzw. der Lognormalverteilung, kann die Aufteilung der Klassenbreite nach der Scott'schen Regel erfolgen [100]. Die Verteilungsdichte  $\Psi(x)$  einer Lognormalverteilung ist bestimmt durch die beiden Parameter  $\sigma$  und  $\mu$ :

$$\Psi(x) = \frac{1}{x\sigma\sqrt{2\pi}} \exp\left(\frac{-(\ln x - \mu)^2}{2\sigma^2}\right) \quad (9.1)$$

Zwischen den beiden Parameter  $\sigma$  und  $\mu$  besteht der Zusammenhang zur Standardabweichung  $SD$ :

$$SD = \sqrt{Var(x)} = \exp\left(\mu + \frac{1}{2}\sigma^2\right) \sqrt{\exp(\sigma^2) - 1} \quad (9.2)$$

Der Erwartungswert bzw. der arithmetischen Mittelwert  $E(x)$  ergibt sich zu:

$$E(x) = \exp(\mu + 0.5\sigma^2) \quad (9.3)$$

Die Lognormalverteilung ist mit der Standardabweichung und dem arithmetischen Mittelwert vollständig charakterisiert.

Neben der Häufigkeitsverteilung ist auch die Korrelation zwischen den Messdaten von Relevanz. Eine erste Einschätzung kann hier die grafische Veranschaulichung in Form eines Streudiagramms geben. Ein gravierender Nachteil dieser Darstellungsform ist jedoch, dass mehrmals auftretende Wertepaare nicht mehr unterschieden werden können. Diesem Problem kann durch eine zusätzliche Wertung – beispielsweise durch eine Farbkodierung – der im Streudiagramm auftretenden Messwertdichte entgegengewirkt werden. (siehe z.B. Abb. 30).

Quantifizierbar ist die Korrelation zwischen zwei Messwerten durch den Rangkorrelationskoeffizienten. Als dimensionslose Größe liegt sein Wertebereich zwischen null (korreliert nicht) und dem Betrag von eins (korreliert). Es wurden der Spearman- und der Pearson-Rangkorrelationskoeffizient ermittelt. Diese Verfahren werden im Folgenden als Spearman- bzw. Pearson-Test bezeichnet. Im Unterschied zum Spearman-Test fordert der Pearson-Test, dass es eine lineare Abhängigkeit zwischen den zwei untersuchten Variablen gibt.

## **9.2 Die Laser-Scanning-Mikroskopie als bildgebendes Verfahren zur parallelen Erfassung subzellulärer Parameter**

Die Laser-Scanning-Mikroskopie (LSM) ist ein geeignetes Werkzeug, um eine oder mehrere biologische Probe(n) auf subzellulärer Ebene dreidimensional abzubilden. Im Folgenden wird zunächst der apparative Messaufbau zur Datenerfassung mittels LSM beschrieben und eine physikalische Begründung der gewählten Geräteeinstellungen gegeben. Anschließend wird auf die Eignung der linearen konfokalen bzw. nichtlinearen zweiphotonenangeregten Fluoreszenzmikroskopie (TPMF) eingegangen.

### **9.2.1 Beschreibung des experimentellen Aufbaus des Laser-Scanning-Mikroskops**

Für das Mikroskop standen mehrere Lichtquellen zur linearen und nichtlinearen Anregung zur Verfügung. Für die lineare Fluoreszenzanregung waren drei parallel in eine Lichtleitfaser eingekoppelte Laser mit einer Ausgangsleistung  $< 5$  mW, ein Halbleiterlaser (408 nm), ein Argon-Ionen-Laser (488 nm) und zwei Helium-Neon-(HeNe-)Laser (532 nm bzw. 633 nm) verfügbar. Die nichtlineare Anregung erfolgte mit Hilfe eines Titan-Saphir-Femtosekunden-(Ti:Sa-fs-)Lasers (Tsunami, Spektra Physics) der direkt eingekoppelt wurde. Die in den Experimenten zur Anwendung kommenden Anregungsleistungen wurden über Neutralglasfilter eingestellt.

Der Femtosekundenlaser hatte eine mittlere Leistung von 500 mW bei einer Repetitionsrate von 80 MHz und einem spektralen Durchstimmbereich von 720–850 nm. Das Laserlicht war

linear polarisiert ( $> 500:1$ ) und die Polarisationssebene parallel zum optischen Tisch orientiert. Das Strahlprofil des Lasers war leicht elliptisch. Die Hauptachse verlief senkrecht zum optischen Tisch und hatte am Laserausgang einen Durchmesser von 2 mm ( $1/e^2$ ). Der Laserstrahl zeigte ein „Beamsteering“. Wurde der Strahl mit einem Objektiv in die Bildebene des Mikroskops fokussiert, beschrieb die Bewegung des Fokus einen Kreis mit dem Durchmesser von etwa 20  $\mu\text{m}$ . Ein voller Umlauf erfolgte innerhalb von 2 h. Für eine dreidimensionale LSM-Aufnahme mit einer Gesamtaufnahmedauer für alle Bildebenen von 1 min musste daher mit einer lateralen Verschiebung zwischen der ersten und letzten Bildebene von  $\approx 0,5 \mu\text{m}$  gerechnet werden.

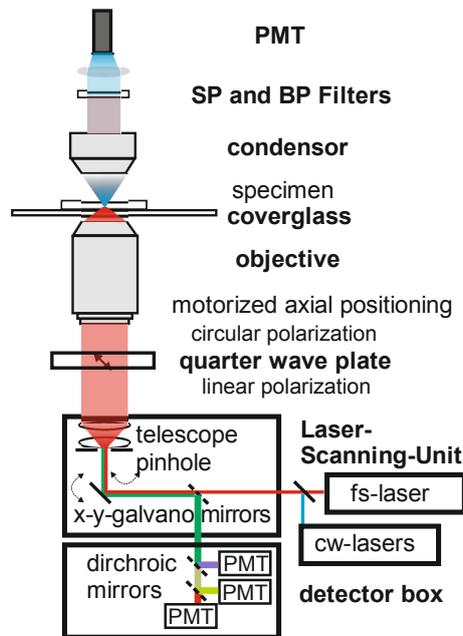
Die Ausgangsleistung des Ti:Sa-fs-Lasers war stark von der Justage und dem Raumklima abhängig. Zur Verbesserung wurde der Laser gegen Luftströmungen gekapselt und kontinuierlich mit  $\text{N}_2$  gespült. Hierdurch konnte die mittlere Laserleistung auf  $\pm 5 \%$  stabilisiert werden. Innerhalb der für die Messungen relevanten Dauer von  $\approx 1 \mu\text{s}$  betragen die Intensitätsschwankungen weniger als 10 %.

Am Ausgang des Lasers betrug die Pulsbreite der Lichtimpulse 120 fs (FWHM). Sie wurde mit einem Autokorrelator (Typ 409-08, Spectra Physics) gemessen. Auf dem Weg zum Probenort bewirkt die Dispersion der im Strahlengang befindlichen optischen Bauelemente eine zeitliche Verbreiterung der Pulse („Chirp“). Solche Pulsverbreiterungen können durch Einbringung eines Prismenpaares in den optischen Strahlengang kompensiert werden (Vorkompensation). Im Experiment ist dann immer noch die tatsächliche Pulsbreite am Probenort zu bestimmen [101]. In der Praxis reicht es aber meist aus, vor jeder Messserie die Vorkompensation mit Hilfe der Maximierung eines der Pulsdauer entsprechenden Referenzsignals einzustellen. Dies kann beispielsweise ein SHG-Signal sein, das in einem am Probenort befindlichen Kaliumdihydrogenphosphat-(KDP-)Kristall erzeugt wird.

Aus Platzgründen wird in der Standardkonfiguration der meisten Laser-Scanning-Mikroskope das Licht über ein Umlenkprisma in die konfokale Laser-Scanning-Einheit des Mikroskops eingekoppelt. Die Anpassung des experimentellen Aufbaus mit der Konsequenz, dass kein Prisma für die Kopplung notwendig war, führte aufgrund der verringerten Dispersion zu einer Verbesserung der Gesamtsystemleistung und insbesondere zu einer Signalverbesserung von 20 %.

Vor Beginn jeder Messung wurde die mittlere Leistung am Laserausgang mit einem Leistungsmessgerät (LD10, Lasermate A, Coherent) gemessen. Für die Strahldiagnostik wurden über zwei Pellicle-Strahlteiler (BP108, Thorlabs) zwischen 4–8 % des Lichts ausgekoppelt.

Alle 10 s wurden die mittlere Leistung (S302C, Thorlabs) bei einer Integrationszeit von 100 ms gemessen und das Spektrum bestimmt. Für letzteres wurde das Licht nach einem Diffusor aus Teflon in eine 200  $\mu\text{m}$  Multimodefaser eingekoppelt, die mit einem Spektrometer (OSM2-400DUV, Newport) verbunden war. Die im Experiment von Bildpunkt zu Bildpunkt schwankenden Signalintensitäten wurden mit Hilfe eines Referenz-SHG-Signals korrigiert.



**Abb. 18: Prinzipskizze des Laser-Scanning-Mikroskops.** Zur Anregung standen wahlweise das Licht der cw-Laser oder des Femtosekundenlasers zur Verfügung. Der Polarisationszustand konnte durch eine  $\lambda/4$ -Verzögerungsplatte von linear zu zirkular polarisiertem Licht gewandelt werden. Messsignale konnten sowohl in Epi-Detektions- als auch Transmissionsgeometrie detektiert werden.

In Abb. 18 ist der modulare Aufbau des verwendeten Laser-Scanning-Mikroskops dargestellt. Die Laser-Scanning-Einheit bestand aus einem kompakten Gehäuse und enthielt alle notwendigen Komponenten, wie fasergekoppelte Ein- und Auskoppelports, ein Teleskop zur Strahlaufweitung des Anregungslichts, einen dichroitischen Spiegel zur spektralen Selektion von Anregungs- und Emissionslicht, zwei galvanische Spiegel zur x- und y-Ablenkung und vier Lochblenden (33,3  $\mu\text{m}$ ; 61,5  $\mu\text{m}$ ; 102,6  $\mu\text{m}$ ; 153,8  $\mu\text{m}$ ) zur räumlichen Filterung des in Epi-Geometrie erfassten Signallichts. Über eine fasergekoppelte Detektorbox konnten nach einer spektralen Separation bis zu drei Messsignale mit PMTs (R928, Hamamatsu) parallel detektiert werden. Zwischen Scannereinheit und Objektiv (40  $\times$ ,  $N.A. = 1,3$ ; CFI Plan Fluor, Nikon) bestand die Möglichkeit, optional eine Verzögerungsplatte zur Manipulation des Pola-

risationsstatus des Anregungslichts einzubringen. Das Signallicht konnte sowohl in Epi- als auch in Transmissionsgeometrie detektiert werden. Im letzteren Fall wurde das Signallicht unter Verwendung des Kondensors (Nikon,  $N.A. = 0,52$ ) bzw. des Mikroskopobjektivs ( $20\times$ ,  $N.A. = 0,75$ ; CFI Plan Fluor, Nikon) in Kombination mit einer Linse (LA1131-A,  $f = 50$  mm, Thorlabs) auf den PMT (R1463; Hamamatsu) abgebildet. Die spektrale Selektion erfolgte über Kurz- bzw. Bandpassfilter.

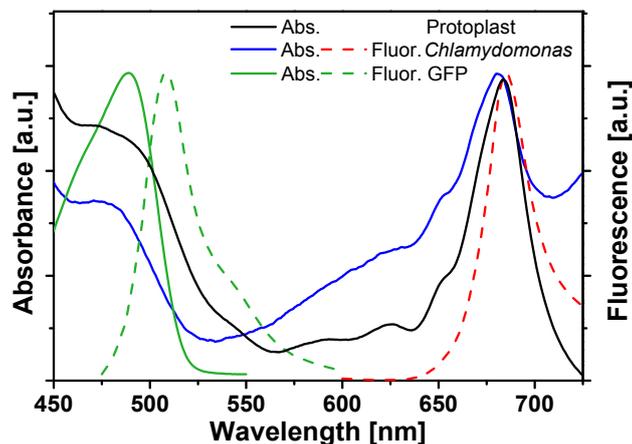
### 9.2.2 Vergleich von Ein- und Zweiphotonenmikroskopie am Beispiel von fluoreszierenden Proteinen in Mesophyllprotoplasten

Prinzipiell eignen sich für die quantitative Analyse von auf Fluoreszenzsignalen basierenden Messgrößen sowohl die lineare konfokale Mikroskopie als auch die nichtlineare Mehrphotonenmikroskopie (MPM). Für die dreidimensionale Bilddatenanalyse ist eine sehr gute Bilddatenqualität mit hoher lateraler und axialer Auflösung notwendig. Ein realistischer Vergleich der Möglichkeiten von Ein- und Zweiphotonenmikroskopie erfolgte in einem Vorversuch an Mesophyllprotoplasten, die in ihren optischen Eigenschaften *Chlamydomonas*-Zellen gleichen, aber eine stabilere Genexpression zulassen. Mesophyllprotoplasten haben einen Durchmesser von  $\approx 50$   $\mu\text{m}$  und sind etwa zwei- bis fünfmal größer als die Algenzellen. Trotzdem treffen die hier an Mesophyllprotoplasten gewonnenen Erkenntnisse in Bezug auf die optische Auflösung auch für Messungen an *Chlamydomonas*-Zellen zu.

Eine interessante Anwendung der Fluoreszenzmikroskopie ist die Visualisierung der subzellulären Verteilung von Enzymen, die am Stärkemetabolismus beteiligt sind. Beispielsweise spielt das Enzym DPE2 („Disproportionating Isozyme 2“) beim cytosolischen Metabolismus des durch den plastidären Stärkeabbau entstehenden Disaccharids Maltose eine wesentliche Rolle. Für das Experiment wurden zunächst Mesophyllprotoplasten aus *Arabidopsis thaliana* isoliert [72] und anschließend mit einem Vektor, der ein DPE2-GFP-Konstrukt kodiert, transient transformiert. Das GFP war C-terminal mit dem DPE2-Protein fusioniert. Die so vorbehandelten Protoplasten enthielten als fluoreszierende Komponenten GFP, Chlorophylle und Carotinoide. Immobilisiert wurden die Protoplasten mit Hilfe der Mikrofluidik.

Chlorophylle (a und b) haben im sichtbaren Spektralbereich eine breite Absorption im Bereich der  $Q_y$ -Bande 600–720 nm und in der Soret-Region bei  $\lambda \leq 480$  nm. Carotinoide absorbieren im Spektralbereich  $\lambda \leq 520$  nm. Im Spektralbereich zwischen 500 und 600 nm zeigen beide eine verminderte Absorption. Dieser Bereich wird als Grünücke bezeichnet (siehe Anhang A2, Abb. 8). Das genaue stöchiometrische Verhältnis der Chlorophylle und Carotinoide vari-

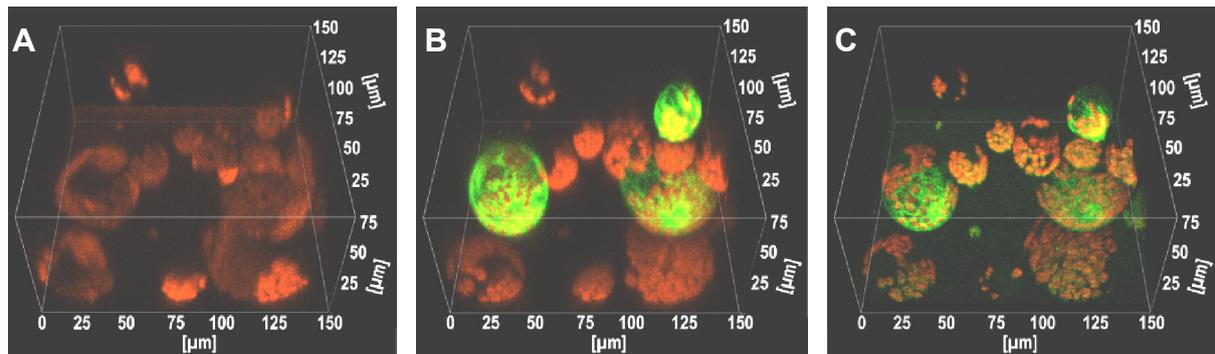
iert in Abhängigkeit vom Photosyntheseapparat (z.B. Pflanzen und Algen). In Abb. 19 sind die normierten (680 nm), bezüglich der Streuung nicht korrigierten, Absorptionsspektren der Protoplasten- und *Chlamydomonas*-Suspensionen dargestellt. Sie weisen nur geringe qualitative Unterschiede in ihrer Linienform auf. Die scheinbar erhöhte Absorption der *Chlamydomonas*-Suspension im Wellenlängenbereich  $> 550$  nm ist das Ergebnis der zunehmenden Mie-Streuung. Die Fluoreszenz beider Proben entstammt maßgeblich dem PS II mit dem Ergebnis, dass Linienform und Maximum der Fluoreszenzemission nahezu identisch sind. Die Absorption und Fluoreszenz des GFP liegen spektral zu großen Teilen im Bereich der Soret-Region der Chlorophylle bzw. der  $S_2$ -Absorption der Carotinoide. Dies verhindert die alleinige Anregung des GFP. Zudem wird das vom GFP emittierte Fluoreszenzlicht teilweise reabsorbiert (Abb. 19).



**Abb. 19: Absorptions- und Fluoreszenzspektren von GFP im Vergleich zu Mesophyllprotoplasten- und *Chlamydomonas*-Suspension.** Absorption und Fluoreszenz des GFP liegen zu großen Teilen im Absorptionsbereich der Chlorophylle und Carotinoide, sodass eine separate Anregung und ein ungestörter Nachweis der Fluoreszenz des GFP nicht möglich sind. Aus Gründen der Übersicht wurde nur das Fluoreszenzspektrum der *Chlamydomonas*-Suspension dargestellt (siehe Text).

Mit der Laser-Scanning-Mikroskopie (LSM) wurden Fluoreszenzaufnahmen der Protoplasten nach Ein- und Zweiphotonenanregung erstellt. Die Aufnahmen erfolgten jeweils in Epi-Detektion unter Verwendung eines Ölimmersionsobjektivs ( $40\times$ ,  $N.A. = 1,3$ ; CFI Plan Fluor, Nikon). Das Beobachtungsvolumen betrug  $150 \times 150 \times 70 \mu\text{m}^3$  (Abb. 20). Benachbarte Pixel hatten einen Abstand in lateraler Richtung von  $0,29 \mu\text{m}$ . Der Abstand der Bildebenen betrug

1  $\mu\text{m}$ . Bei Verwendung eines konfokalen „Pinholes“ mit einem Durchmesser von 62,5  $\mu\text{m}$  betrug die Belichtungszeit pro Bildpixel 1,68  $\mu\text{s}$ . Für die spektrale Selektion der Chlorophyll- und GFP-Fluoreszenz wurden Bandpassfilter (GFP 515/50 nm und Chlorophyll 697/75 nm) genutzt. Die Detektion der Fluoreszenzsignale erfolgte parallel mit zwei Photomultipliern (PMT) unter vergleichbaren Geräteeinstellungen.

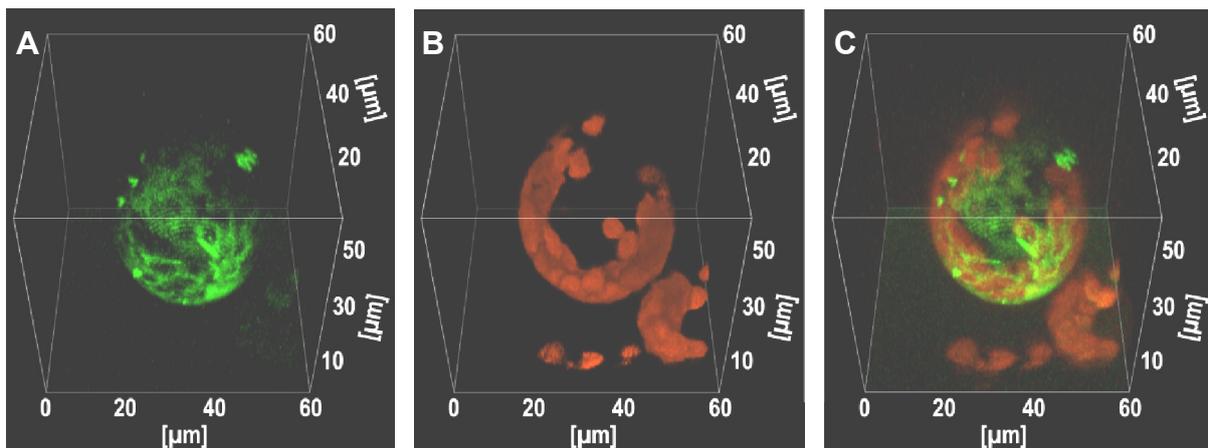


**Abb. 20: Dreidimensionale LSM-Aufnahmen der Fluoreszenz von Mesophyllprotoplasten nach Einphotonen- (632,8 und 488 nm) und Zweiphotonenanregung (800 nm).** Grün dargestellt ist die GFP-Fluoreszenz. Rot zeigt die Chlorophyllfluoreszenz. **A)** Einphotonenanregung bei 632,8 nm. Es ist ausschließlich Chlorophyllfluoreszenz zu beobachten. **B)** Einphotonenanregung bei 488 nm: Chlorophyll und GFP wurden simultan angeregt. An der GFP-Fluoreszenz ist deutlich zu erkennen, dass nicht an allen Protoplasten die Expression des DPE2-GFP-Fusionsproteins erfolgreich war. Die einzelnen Chloroplasten sind axial nur schwer zu unterscheiden. **C)** Zweiphotonenanregung bei 800 nm. Im Vergleich zur Einphotonenanregung ist das höhere axiale Auflösungsvermögen zu beobachten. Die subzellulären Verteilungen der DPE2-GFP- bzw. Chlorophyll-Komponenten ist besser unterscheidbar. Aufgrund der lokalisierten Anregung ist trotz der Reabsorption durch die Carotinoide und das Chlorophyll die GFP-Fluoreszenz in mehreren Protoplasten zu beobachten.

Bei der Einphotonenanregung leuchtet das Anregungslicht die Probe in axialer Richtung über mehrere Mikrometer aus. In Vorversuchen wurde ermittelt, dass bei den verwendeten experimentellen Bedingungen die Anregungsleistungen von 3,8  $\mu\text{W}$  (488 nm) bzw. 14  $\mu\text{W}$  (632 nm) nicht überschritten werden dürfen. Höhere Leistungen führen zu einer Beschädigung der Protoplasten. Bei der Anregungswellenlänge 632,8 nm werden ausschließlich die Chlorophyllen angeregt (Abb. 20, A). Erfolgt die Anregung bei der Wellenlänge 488 nm, werden sowohl Chlorophyll als auch GFP angeregt (Abb. 20, B). Die erfolgreiche Expression des GFP in den Protoplasten ist, trotz der Reabsorption der GFP-Fluoreszenz durch die Carotinoide und das Chlorophyll zu beobachten. Die Zweiphotonenanregung erfolgte mit dem Ti:Sa-fs-Laser bei

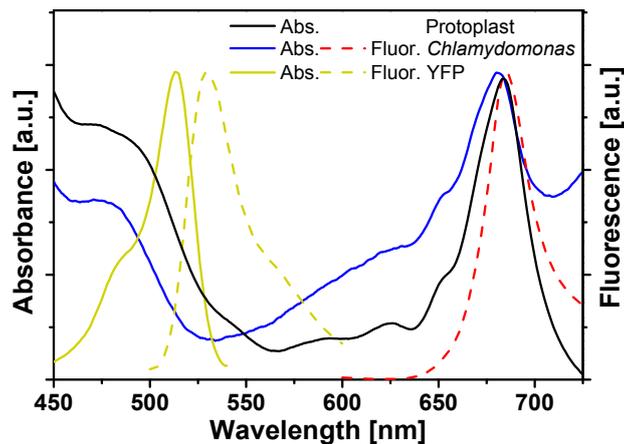
einer Zentralwellenlänge von 800 nm. Die maximal zulässige Anregungsleistung betrug 7,3 mW. Zur Unterdrückung im Detektionsstrahlengang wurde ein zusätzlicher Kurzpassfilter (SP720, Semrock) eingebracht. Es wurde der größtmögliche Durchmesser (154  $\mu\text{m}$ ) des konfokalen Pinholes verwendet. Sowohl Chlorophyll- als auch GFP-Fluoreszenz werden beobachtet (Abb. 20, C). Die lokale Verteilung des mit GFP markierten Proteins ist mit der TPFM wesentlich besser auflösbar und an einer größeren Anzahl Protoplasten zu beobachten (Abb. 20, B–C).

Aufgrund der lokaleren Anregung werden bei der TPFM die Fluorophore (hier das GFP) im Vergleich zur linearen konfokalen Mikroskopie weniger belastet bzw. bleichen weniger stark aus. Noch deutlicher wird dieser Effekt bei den Einzelaufnahmen sichtbar (Abb. 21). Das Beobachtungsvolumen hat eine Größe von  $60 \times 60 \times 55 \mu\text{m}^3$ . Der laterale Pixelabstand beträgt 0,08  $\mu\text{m}$  und der Bildebenenabstand 1  $\mu\text{m}$ . Die Aufnahmen sind bei einer Anregungsleistung von 3 mW und einer Pixelbelichtungszeit von 3,36  $\mu\text{s}$  entstanden.



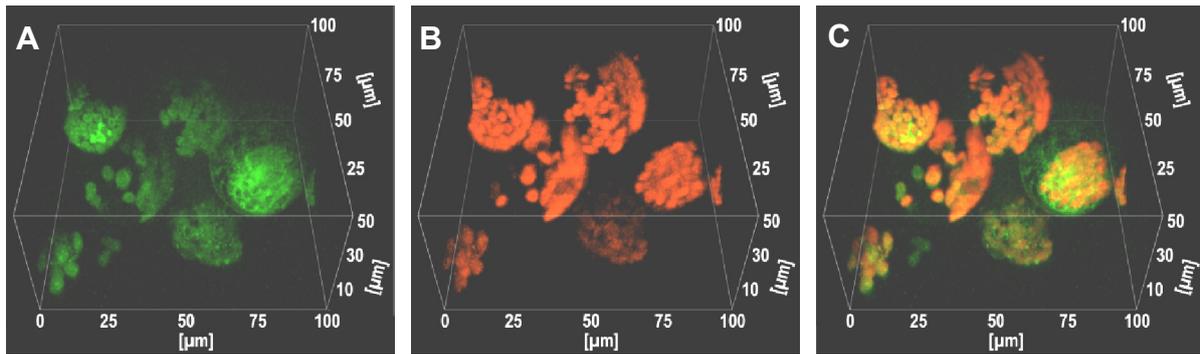
**Abb. 21: Lokale GFP- und Chlorophyllfluoreszenz in einem einzelnen Protoplasten nach Zweiphotonenanregung. A) TPF-Signale von DPE2-GFP. B) TPF-Signale von Chlorophyll. C) Die räumlich kombinierten Fluoreszenzsignale.**

Die Verwendung von GFP als Marker in Geweben von photoautotrophen Pflanzen ist aufgrund des spektralen Überlapps mit der Absorption und Fluoreszenz der endogenen Fluorophore nur bedingt sinnvoll (Abb. 19). YFP dagegen ist ein Protein, dessen Absorptions- und Fluoreszenzbande (Max: 515 nm und 530 nm) sich im Bereich der Grünlücke befindet (Abb. 22).



**Abb. 22: Vergleich der Absorptions- und Fluoreszenzspektren von YFP einer Protoplasten- und *Chlamydomonas*-Suspension.** Absorption und Fluoreszenz des YFP liegen zu großen Teilen im Spektralbereich der Grünleuchte.

Die exogenen Fluorophore GFP und YFP sind große und kompliziert aufgebaute Moleküle. Zusätzliche Störungen (z.B. Spin-Bahn-Wechselwirkungen) können dazu führen, dass das quantenmechanische Verbot der parallelen Ein- und simultaner Zweiphotonenabsorption an Stringenz verliert. Im Experiment bietet dies die Möglichkeit, das Strahlungsfeld der Zweiphotonenanregung spektral so zu platzieren, dass im Ergebnis der Absorption ein strahlend relaxierendes Niveau der Fluorophore erreicht wird. Bei größeren Molekülen ist es meist möglich, das Zweiphotonenabsorptionsspektrum anhand des Einphotonenabsorptionsspektrums abzuschätzen. Ideale Anregungswellenlängen für eine Zweiphotonenanregung liegen aufgrund der Lage der ( $S_0-S_1$ )-Absorption für GFP im Bereich um 980 nm und für YFP um 1030 nm. Beide Proteine besitzen weiterhin im Bereich von 370 nm eine schwache Einphotonenabsorption, was eine Zweiphotonenanregung bei 740 nm ermöglichen sollte. Während beim GFP bei einer Anregungswellenlänge von 800 nm eine ausreichende Zweiphotonenabsorptionen bzw. ein gutes Fluoreszenzsignal zu beobachten war, lieferte YFP bei der minimal zur Verfügung stehenden Anregungswellenlänge des Ti:Sa-fs-Lasers von 740 nm nur ein schwaches Signal. Trotzdem ist die erfolgreiche Expression des YFP in den Protoplasten nachweisbar und es ist eine räumliche Differenzierung von YFP- und Chlorophyllfluoreszenz erkennbar (Abb. 23).



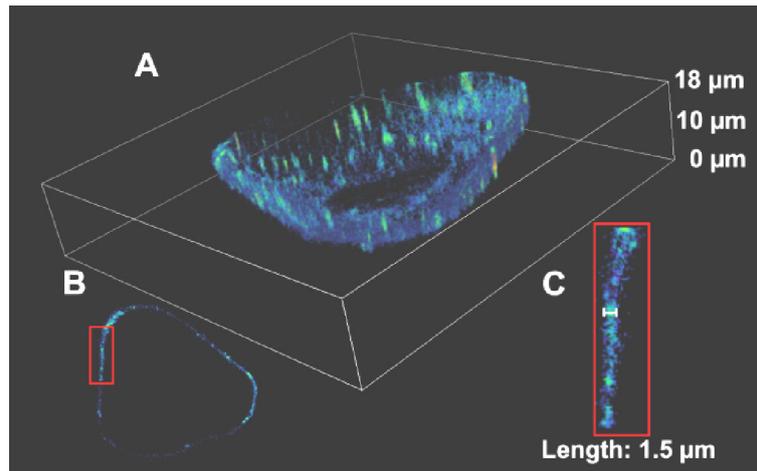
**Abb. 23: Dreidimensionale LSM-Bilder von Mesophyllprotoplasten.** Dargestellt ist das TPF-Signal von **A)** YFP in grün und **B)** von Chlorophyll in rot. **C)** Die Überlagerung beider Fluoreszenzsignale zeigt eine örtliche Differenzierung der Fluorophore.

### 9.2.3 Messung der Verteilung von Fusionsproteinen am Beispiel der Phosphorylierung von Stärke

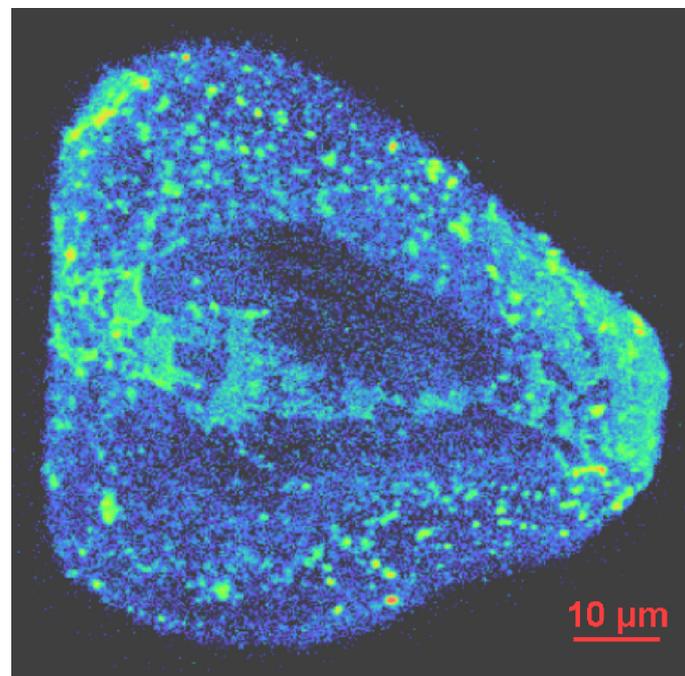
Ein wichtiger regulatorischer Prozess in einer Zelle ist die Phosphorylierung, bei der die reversible Ausbildung von Phosphatesteren z.B. an bestimmten Proteinen erfolgt. Die Phosphorylierung von Stärke durch die Glucan-Wasser-Dikinase (GWD) ist ein essentieller Schritt bei der Einleitung des Stärkeabbaus. GWD vermittelt eine Phasentransition der Glucane im Stärkegranulum, die die anschließende Aktion hydrolytischer Enzyme an der Granulumboberfläche erleichtert [102]. In diesem Zusammenhang ist die Verteilung von GWD auf der Granulumboberfläche von besonderem Interesse.

Ein einzelnes natives Stärkegranulum (Kartoffel, Wildtyp) wurde auf einem Adhäsionsobjektträger in wässriger Umgebung immobilisiert. Anschließend wurde die Lösung eines Fusionsproteins aus GWD und GFP (0,1  $\mu\text{g/ml}$ ) hinzugegeben. Das Stärkegranulum wurde mit Hilfe der zweiphotonenangeregten Fluoreszenzmikroskopie (TPFM) in einem Bereich von  $100 \times 100 \times 18 \mu\text{m}^3$  bildgebend dargestellt. Der laterale Abstand zweier benachbarter Pixel betrug  $0,2 \mu\text{m}$  und der axiale Abstand zweier Bildebenen  $0,5 \mu\text{m}$ . Es wurde eine Anreizleistung von 10 mW bei einer Zentralwellenlänge von 800 nm eingesetzt; dabei wurde eine Belichtungszeit von  $19,92 \mu\text{s/Pixel}$  gewählt. Zur Verbesserung des Signal-zu-Rausch-Verhältnisses wurden die Fluoreszenzsignale jeder Schnittebene aus dem Mittelwert von sechs Messungen bestimmt.

In einer orts aufgelösten dreidimensionalen Darstellung des Fluoreszenzsignals (490–540 nm) ist klar zu erkennen, dass das GWD auf der gesamten Granulumboberfläche verteilt ist, wobei es jedoch in einigen „Hotspots“ höher konzentriert ist (Abb. 24).



**Abb. 24: Verteilung des Fusionsproteins GWD plus GFP auf einem Stärkegranulum.** **A)** Das gezeigte Bildvolumen hat eine laterale bzw. axiale Ausdehnung von  $100 \times 100 \times 18 \mu\text{m}^3$ . In der dreidimensionalen Darstellung sind vereinzelt „Hotspots“ des Proteins an der Oberfläche erkennbar. **B)** Bildebene bei der axialen Position  $17 \mu\text{m}$ . Deutlich zu erkennen ist, dass sich das Fusionsprotein lediglich an der Oberfläche des Stärkegranulums anlagert. **C)** Dargestellt ist der in (B) gekennzeichnete Bildausschnitt. Das Fusionsprotein kann auf der Granuloberfläche über eine Länge von etwa  $1,5 \mu\text{m}$  nachgewiesen werden.



**Abb. 25: Verteilung des Fusionsproteins GWD plus GFP auf der Oberfläche des Stärkegranulums in der Projektion des Fluoreszenzsignals (Schichtdicke  $18 \mu\text{m}$ ).** Neben einer fast homogenen Verteilung sind weiterhin „Hotspots“ mit einer erhöhten Konzentration des Proteins zu beobachten. Der Durchmesser des nativen Stärkegranulums beträgt etwa  $70 \mu\text{m}$ .

Deutlicher ist dies in einer Intensitätsprojektion des gesamten 18 µm dicken Bildvolumens auf die laterale x-y-Bildebene zu erkennen (Abb. 25). Die Eindringtiefe des Fusionsproteins in das Stärkegranulum kann am besten in einer Bildebene ermittelt werden, in der die Granulomoberfläche in etwa parallel zur optischen Achse liegt (Bildebene bei 17 µm axialer Position, Abb. 24, B). In dieser Position konnte die Eindringtiefe mit dem höheren lateralen Auflösungsvermögen ermittelt werden. Das Protein wurde an dieser Stelle innerhalb einer Dicke von 1,5 µm nachgewiesen (Abb. 24, C).

### **9.3 Diskussion – lokale Verteilung von Proteinen**

Eine zentrale Aufgabe bei der Erforschung des zentralen Kohlenstoffmetabolismus ist die Klärung der Frage, inwiefern dieser durch die dynamische Verteilung von Enzymen innerhalb eines Kompartiments beeinflusst wird. Die Eigenschaften der Enzyme können hierbei durch Genmanipulation gezielt beeinflusst werden. Durch Fusion mit fluoreszierenden Proteinen (GFP bzw. YFP) ist es möglich, Mutanten mit spektroskopischen Methoden zu charakterisieren. Definierte metabolische Einflüsse können beispielsweise durch Licht-Dunkel- oder Dunkel-Lichtübergänge oder durch Zugabe bestimmter Komponenten aus dem zentralen Kohlenstoffmetabolismus (Glucose, Sucrose oder andere Zuckerderivate) erzeugt werden.

In Vorexperimenten wurde gezeigt, wie leistungsfähig die Mehrphotonenmikroskopie bei der Analyse und Lokalisierung von für den Stärkemetabolismus wichtigen Proteinen auf Einzelzellebene ist. Es wurde ein Fusionsprotein aus dem DPE2-Protein und GFP erzeugt und die spezifische örtliche Verteilung innerhalb eines aus der Pflanze *Arabidopsis thaliana* isolierten Mesophyllprotoplasten analysiert. Im Stärkemetabolismus ist das Disaccharid Maltose ein Abbauprodukt, das im Cytosol der Zelle weiter metabolisiert wird. Hierbei hat das DPE2-Protein eine zentrale, nicht zu ersetzende Funktion. Seine Lokalisation innerhalb des Cytosols ist von besonderem Interesse, weil je nach metabolischer Situation die Kohlenstoffflüsse entweder von den Chloroplasten in das Cytosol führen oder – bei Applikation von exogenen Kohlenhydraten – stärker vom Medium in das Cytosol gerichtet sind.

Trotz der hohen mechanischen Instabilität der Protoplasten und der beträchtlichen Fluoreszenzreabsorption durch die endogenen Pigmente ist es gelungen, ein für die Messung ausreichend hohes Signal-zu-Rausch-Verhältnis zu realisieren. Für eine möglichst unbeeinflusste Untersuchung an photoautotrophen Organismen eignet sich jedoch aufgrund seiner spektralen Eigenschaften YFP als Fluorophor besser als GFP.

Ist die Photosynthese nicht aktiv, ist bei vielen Pflanzenarten der Stärkeabbau wesentlich für Stoffwechsel und Wachstum verantwortlich. Er regelt die intrazellulären Kohlenstoffflüsse, sodass ein zellulärer Kohlenstoffmangel verhindert wird [103]. Bei dem Wechsel von Licht zu Dunkel wechselt die Funktion der plastidären Stärke von einer Senke zu einer Quelle des reduzierten Kohlenstoffs. Eine weitere wichtige zelluläre Senke ist die Biosynthese der Zellwandmaterialien, ohne die Zellwachstum und Zellteilung nicht möglich sind.

Ein wichtiger regulatorischer Prozess innerhalb des Stärkemetabolismus ist die Glucan-Phosphorylierung, bei der reversibel Phosphatester gebildet werden. In diesem Zusammenhang ist die Verteilung der Glucan-Wasser-Dikinase (GWD) von besonderem Interesse. Ein Fusionsprotein aus GWD und GFP in Lösung (0,1 µg/ml) wurde mit Stärkegranula inkubiert und anschließend dreidimensional mit Hilfe der MPM abgebildet. Es wurde festgestellt, dass das GWD auf der Oberfläche des Stärkegranulums nachweisbar ist. In einigen Regionen konnte ein verstärktes Fluoreszenzsignal beobachtet werden. Aufgrund der hochkonzentrierten Proteinlösung kann Aggregation nicht vollständig ausgeschlossen werden. Dies ist jedoch unwahrscheinlich, da die „Hotspots“ – wie auch die schwächeren Fluoreszenzregionen – immer mit der gleichen Dicke von 1,5 µm auf bzw. innerhalb der Granulumboberfläche nachweisbar sind. Weniger wahrscheinlich ist es, dass die Proteine derartig große Aggregate bilden. Somit ist davon auszugehen, dass die Proteine bis zu dieser Tiefe in das Granulum eindringen und sich bevorzugt an bestimmten Regionen des Stärkepartikels binden.

#### **9.4 Fixierung von *Chlamydomonas*-Zellen**

Die innerhalb einer Zelle enthaltenen Fluorophore können beispielsweise über charakteristische optische Parameter, wie z.B. die Fluoreszenzlebensdauer differenziert werden. Alternativ besteht die Möglichkeit, alle störenden Fluorophore aus der Zelle zu extrahieren ohne die Zielsubstanzen (d.h. die eigentlichen Signalquellen) zu verändern. Die Extraktion der Pigmente ist allerdings unvermeidbar mit der Abtötung der Zellen verbunden (Übergang von dem *In-vivo*- in den *In-vitro*-Zustand). Als sehr effiziente und einfache Methode erwies sich die Behandlung vitaler *Chlamydomonas*-Zellen mit einer Ethanol-Wasser-Lösung [1]. Diese Methode hat neben der Entfernung der endogenen Fluorophore auch die positiven Eigenschaften, dass alle metabolischen Prozesse sofort gestoppt werden und die Zellen in diesem Zustand bei 4 °C mehrere Tage haltbar sind. Dies ist von Vorteil, da die typische Messzeit für den Datensatz einer statistisch relevanten Zahl von Einzelzellen ( $\geq 5000$ ) bei  $> 4$  h lag.

## 9.5 Einfluss der Geräteparameter auf die Bildgebung und Geräteeinstellungen

Zur Maximierung des Auflösungsvermögens in der Laser-Scanning-Mikroskopie muss das Fokalvolumen minimal sein. Weiterhin wird die Bildqualität durch die Größe des betrachteten Bildausschnitts, die Anzahl der Bildpixel, den Abstand der Bildebenen, die Verweildauer des Anregungslichts im jeweiligen Pixel und die Verstärkung des Signallichts bestimmt. Die Ansteuerung der konfokalen Laser-Scanning-Einheit erfolgte mit der Software Nikon EZ-C1 V3.8. Diese ermöglichte es, alle anregungsspezifischen und die in der Epi-Detektionsgeometrie notwendigen Geräteeinstellungen zu spezifizieren. Lediglich für die Signaldetektion in Transmission mussten die Betriebsspannung des PMT und die elektronische Nachverstärkung manuell eingestellt werden.

Aufgrund der Forderung nach einem minimalen Fokalvolumen und eines großen Raumwinkels bei der Erfassung des Signallichts wurde ein Objektiv mit hoher *N.A.* gewählt ( $40\times$ , *N.A.* = 1,3; CFI Plan Fluor, Nikon). Um im Untersuchungsvolumen möglichst viele Zellen betrachten zu können, musste der verwendete Bildausschnitt größtmöglich gewählt werden. Mit zunehmender Vergrößerung kam es jedoch in den Randbereichen des Bildausschnitts aufgrund von Abbildungsfehlern zu einer Verschlechterung der Strahl- bzw. Abbildungsqualität. Hieraus resultiert eine verminderte Anregungs- bzw. Signalintensität. Bei einer zulässigen Abnahme des Signallichts von maximal 10 % wurde der verfügbare Bildausschnitt experimentell ermittelt. Hierfür wurde das zweiphotonenangeregte Fluoreszenzsignal einer Coumarin-120-Lösung über einen Bildausschnitt von  $300 \times 300 \mu\text{m}^2$  analysiert und ein zentrierter Bildausschnitt von  $200 \times 200 \mu\text{m}^2$  als Beobachtungsfeld ausgewählt.

Die Anzahl der Bildpunkte wurde auf  $1024 \times 1024$  Pixel begrenzt. Dies entspricht einer theoretischen lateralen Auflösung von  $0,2 \mu\text{m}/\text{Pixel}$ . Entsprechend dem Abtasttheorem von Nyquist und Shanon sind unter diesen Bedingungen laterale Strukturen größer als  $0,7 \mu\text{m}$  sicher auflösbar. Der Abstand zwischen den einzelnen Bildebenen wurde auf  $0,5 \mu\text{m}$  festgelegt. Wegen des hohen Datenaufkommens war eine größere axiale Auflösung nicht sinnvoll.

Die zweiphotonenangeregte Fluoreszenzmikroskopie (TPFM) erfolgte bei einer Anregungsleistung von 8 mW, die SHG-Mikroskopie bei 10 mW. Die Belichtungsdauer pro Pixel („Pixel Dwell Time“) wurde der Empfindlichkeit der Detektoren und dem Dynamikbereich des A/D-Wandlers angepasst. Je nach Signalstärke der zu untersuchenden Probe lag die Belichtungszeit im Bereich von  $0,9\text{--}30 \mu\text{s}/\text{Pixel}$ . Zur Verbesserung des Signal-zu-Rausch-Verhältnisses

wurden die Signale jeder Bildebene aus dem Mittelwert zweier Messungen bestimmt. Die Linearität der Messwerterfassung wurde in Kontrollexperimenten mit Hilfe des Fluoreszenzsignals einer Coumarin-120-Lösung (1  $\mu\text{mol/ml}$ ) überprüft.

Typische Messzeiten für die Aufnahme eines dreidimensionalen Bildstapels betragen  $\approx 10$  min. Die Bilddaten besaßen einen Dynamikbereich von 12 Bit je Farbkanal und wurden im „Image Cytometry Standard“ (ICS) abgespeichert.

## **9.6 Validierung der Messmethode**

Aufgrund der komplexen Struktur der Untersuchungsobjekte kann das Messsignal von einer Vielzahl von Störungen begleitet sein. Zusätzliche lineare Absorptionen, Reabsorptionen, Lichtstreuung und im Ergebnis nichtlinearer Wechselwirkung sich ausbildende Störquellen können das eigentliche Messsignal spektral oder zeitlich überlagern. In der nichtlinearen Mikroskopie wird durch diese Prozesse das Auflösungsvermögen verschlechtert und der einfache Zusammenhang zwischen Stoffkonzentration und Signallicht geht verloren. Die Aussagekraft und Gültigkeit der verwendeten Untersuchungsmethode ist also erst nach einer Untersuchung der einzelnen, die Messung überlagernden bzw. beeinflussenden Prozesse, bewertbar.

### **9.6.1 Probenbeschaffenheit und Signalgebung**

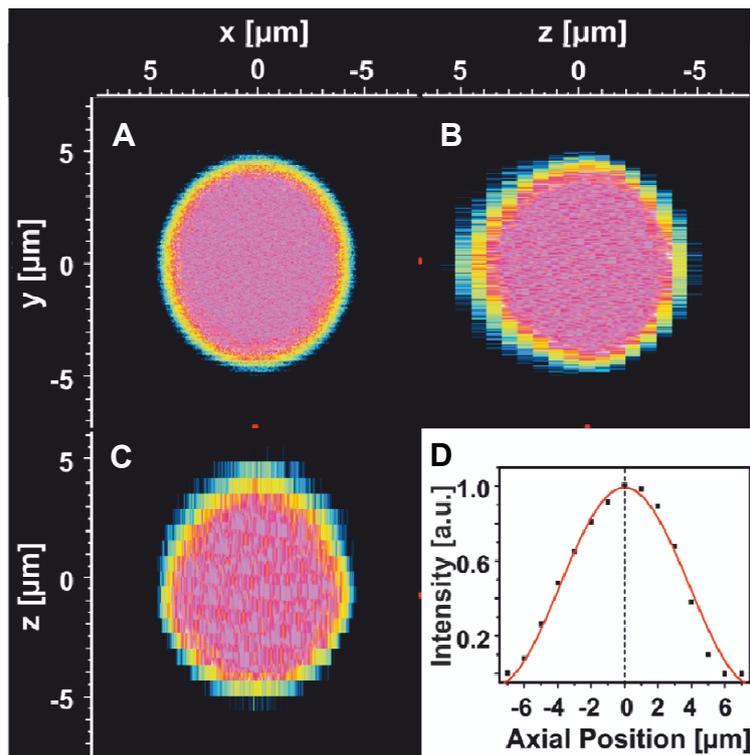
Die unter nichtlinearen Anregungsbedingungen gewonnenen Messsignale, sind unter folgenden experimentellen Bedingungen zu bewerten bzw. zu prüfen:

- I. Alle Störsignale nehmen mit zunehmender Wegstrecke des Anregungslichts durch das Probenmaterial zu.
- II. Eine Absorption und nichtlineare Wechselwirkung des Anregungslichts außerhalb des Fokalvolumens kann vernachlässigt werden.
- III. Die Reabsorption des Signallichts durch endogene Fluorophore ist aufgrund der Probenpräparation (siehe Abschnitt 9.4) vernachlässigbar. In der TPFM ist jedoch eine Reabsorption des TPF-Signals durch den Markerfluorophor zu erwarten.
- IV. Bei der SHG-Mikroskopie sind die Auswirkungen der Doppelbrechung auf das Signallicht zu berücksichtigen.
- V. Unter nichtlinearen Anregungsbedingungen ist der Einfluss der Streuung des Anregungslichts geringer. Trotzdem ist aufgrund von Streuung und Polarisierungseffekten ein Verlust der Anregungsleistung zu erwarten.

Der Einfluss von Streuung und Reabsorption auf das TPF-Signal wurde in einem Vorexperiment untersucht. Hierzu wurde eine mit dem Fluorophor Fluoreszein homogen durchgefärbte Mikrokugel, die in ihrer Größe mit den biologischen Proben vergleichbar war, als Modellsystem genutzt (MF-FITC,  $\varnothing = 10 \mu\text{m}$ , Microparticles). Die Größe des Beobachtungsfeldes des LSM betrug  $15 \times 15 \mu\text{m}$ , die laterale Auflösung  $0,03 \mu\text{m}/\text{Pixel}$  und der Bildebenenabstand  $1 \mu\text{m}$ . Bei einer Belichtungszeit von  $1,68 \mu\text{s}$  wurde eine Anregungsleistung von  $\approx 10 \text{ mW}$  eingesetzt. Die Detektion erfolgte in Epi-Geometrie unter Verwendung eines Bandpassfilters ( $515/30 \text{ nm}$ ).

In Abb. 26 ist die Fluoreszenzverteilung auf den Kugelschnittflächen der orthogonalen Großkreise dargestellt. Im x-y-Schnittbild ist zu erkennen, dass die Kugelfläche im Zentrum nahezu homogen fluoresziert. Zu den Randbereichen nimmt das Fluoreszenzsignal ab, da das Fokolvolumen nicht mehr vollständig innerhalb der Kugel liegt. Die Schnittbilder in axialer Richtung zeigen mit zunehmender Eindringtiefe eine leichte Deformation der Kreisscheibe, was mit dem Verlust des Auflösungsvermögens einhergeht. Ursache hierfür ist die Streuung und Reabsorption des Anregungs- bzw. Signallichts (Abb. 26, B, C). Für eine qualitative Abschätzung der Beeinflussung durch diese Effekte werden die jeweiligen Signalintensitäten der im Bildebenenabstand aufgenommenen Kreisscheiben aufsummiert und dargestellt. Es wird eine leichte Abweichung vom idealen Verlauf der Signalintensität (ohne Beeinflussung) entsprechend einer zum Kugelzentrum symmetrischen Sinusquadratfunktion (Anhang A5) festgestellt (Abb. 26, D). Aufgrund dieser Ergebnisse und der Tatsache, dass *Chlamydomonas*-Zellen nicht im gesamten Volumen den Fluorophor enthalten, ist auszuschließen, dass bei Objektgrößen von  $\approx 10 \mu\text{m}$  eine signifikante Verfälschung des TPF-Signals mit zunehmender Eindringtiefe erfolgt.

Im Gegensatz zum TPF- ist das SHG-Signal in optisch anisotropen Medien stark von der Orientierung der wechselwirkenden Materie zur Polarisationsrichtung des eingestrahltten Lichts abhängig. Stärke ist doppelbrechend und folglich existieren für unterschiedliche Polarisationsrichtungen des Anregungsstrahlungsfeldes verschiedene Brechungsindizes  $n$ . Im einfachsten Fall gilt für die Doppelbrechung  $D = |n_e - n_o|$ . Die Indizes  $e$  und  $o$  bezeichnen die Brechzahlen des außerordentlichen bzw. ordentlichen Strahls im doppelbrechenden Medium. Ist das Anregungsstrahlungsfeld zirkular polarisiert, bewirkt die Doppelbrechung mit zunehmender Eindringtiefe ein geometrisches Auseinanderlaufen der verschiedenen Polarisationsanteile. Dies führt zur Aufweitung des Fokolvolumens, resultierend in der Abnahme der Anregungsintensität und einem schwächeren SHG-Signal.



**Abb. 26: Das TPF-Signal einer homogen gefärbten Mikrokugel in Falschfarbendarstellung.** Warme Farben entsprechen hohen, kalte Farben niedrigen Signalpegeln. **A)** Querschnitt in der x-y-Ebene. Die Kugelfläche fluoresziert im Zentrum nahezu homogen. In den Randbereichen ist eine Signalabnahme zu beobachten, da das Fokalvolumen hier nicht mehr vollständig innerhalb der Kugel ist. **B)** und **C)** Projektion in z-Richtung (Deckglas bei  $z = -6 \mu\text{m}$ ). Mit zunehmender Eindringtiefe ist eine leichte Verschlechterung der Auflösung zu beobachten. **D)** Der Verlauf der Signalintensität in axialer Richtung ist annähernd symmetrisch zu einer im Kugelzentrum zentrierten Sinusquadratfunktion.

Eine weitere Störung der Messung kann durch erhöhte Streuung in der Probe erfolgen. Im Experiment haben das erzeugte SHG-Signal und die Grundwelle die gleiche Ausbreitungsrichtung (z-Richtung) [12]. Mit zunehmender Streuung verliert jedoch das SHG-Signal seine ursprüngliche Richtcharakteristik und ein in Epi-Geometrie detektiertes SHG-Signal gewinnt an Intensität. Ein quantitativer Vergleich beider Signale ermöglichte es, den Streuverlust des SHG-Signals in z-Richtung abzuschätzen. Unter Berücksichtigung der Detektionseffizienzen wird bei den verwendeten Proben festgestellt, dass die Epi-Detektionskomponente des SHG-Signals mehr als 250-mal schwächer ist, als die in z-Ausbreitungsrichtung. Die Verluste des in der Messung genutzten SHG-Signals durch Streuung sind somit vernachlässigbar [1, Supporting Materials].

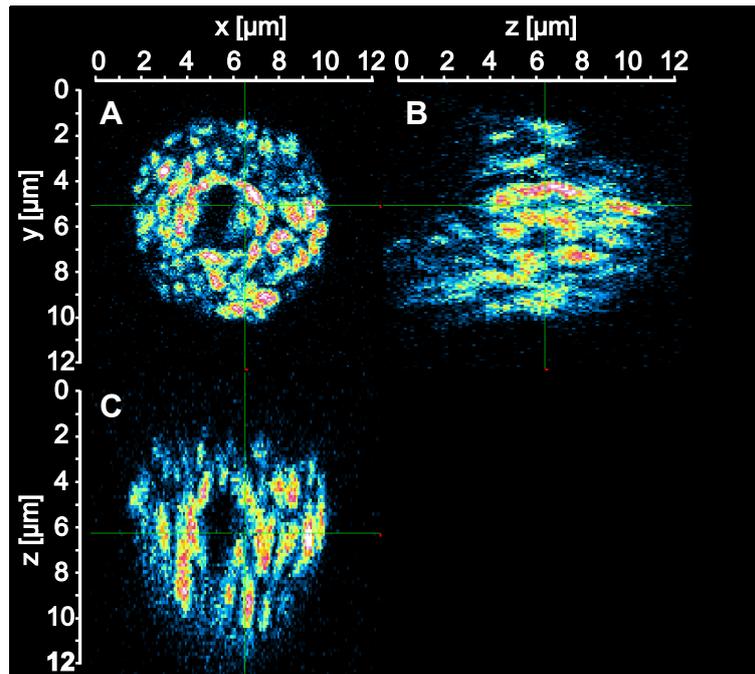
Für einen proportionalen Zusammenhang von SHG-Signal und Stoffkonzentration müssen in der Messung folgende Randbedingungen erfüllt sein:

- I. Es dürfen keine Fluorophore in der Probe enthalten sein, die das eingestrahlte Licht bzw. das SHG-Signal absorbieren.
- II. Die zu untersuchende Probe darf nicht streuen.
- III. Die Eindringtiefe des Anregungslichts im doppelbrechenden Material darf einen bestimmten Wert nicht überschreiten.

Die Beeinträchtigung des SHG-Signals durch Doppelbrechung kann für Stärke mit Hilfe der Brechzahldifferenz für den außerordentlichen bzw. ordentlichen Strahl  $|n_e - n_o| = 0,0106 - 0,0080$  abgeschätzt werden [104]. Unter Zulassung eines Gangunterschieds der Polarisationsanteile von  $< \lambda/10 = 80$  nm resultiert eine maximale Materialdicke von 10  $\mu\text{m}$ , bei der die Aufweitung des Fokalvolumens bzw. die destruktive Interferenz das SHG-Signal nur unwesentlich beeinflussen. Unter Verwendung der Brechzahlen eines Beta-Bariumborat-(BBO-)Kristalls wurde diese Abschätzung im Experiment verifiziert [1, Supporting Materials].

Für unterschiedliche native Stärkegranula (Merck, Sigma, native Kartoffelstärke) wurde im Experiment bei Eindringtiefen von 8–15  $\mu\text{m}$  eine Abschwächung des SHG-Signals um 5 % festgestellt. Hieraus folgt, dass für Zelldurchmesser bis zu 20  $\mu\text{m}$  die quantitative Stärkebestimmung mittels SHG-Mikroskopie nicht kritisch ist, da *Chlamydomonas*-Zellen maximal einen Stärkeanteil von 30 % der Gesamtbiomasse aufweisen [1, Supporting Materials]. Dieses Ergebnis ist im Experiment qualitativ bestätigt worden. In Abb. 27 ist die Stärkeverteilung einer Einzelzelle als laterales und axiales Schnittbild gezeigt. Bis zu einer Eindringtiefe von 12  $\mu\text{m}$  ist keine Abschwächung des SHG-Signals zu beobachten.

Die Hauptbestandteile von Stärke sind Amylose und Amylopektin. Dabei trägt nur das Amylopektin zum SHG-Signal bei [105]. Dies konnte auch aus der Untersuchung von drei verschiedenen Maisstärken mit unterschiedlichem Gehalt an hochgeordnetem Amylopektin bestätigt werden. Erwartungsgemäß zeigte die Stärke mit dem höchsten Anteil an Amylopektin das größte SHG-Signal [1].



**Abb. 27: Falschfarbendarstellung der SHG-Signale einer Einzelzelle.** Die Farbe Rot zeigt eine hohe Signalintensität und repräsentiert einen hohen Stärkegehalt. Die Farbe Blau entspricht einer schwachen Signalintensität. Die Zelle entstammt einer synchronisierten Kultur nach 6 h Belichtung. Deutlich ist die Verteilung der Stärkegranula zu erkennen. **A)** Querschnitt in der x-y-Ebene. **B)** und **C)** Projektion in z-Richtung. Auch mit zunehmender Eindringtiefe ist keine Abschwächung des an den Stärkegranula erzeugten SHG-Signals zu beobachten.

### 9.6.2 Probenpräparation zur DNA- bzw. Stärkequantifizierung

Für die DNA-Quantifizierung wurde die Fluoreszenz eines exogenen Fluorophors und für die Stärkequantifizierung das SHG-Signal der Stärkegranula analysiert. In jedem Fall mussten die endogenen Fluorophore aus den biologischen Proben entfernt werden (Abschnitt 9.4). Diese Probenpräparation kann potentiell Einfluss auf die Morphologie der Untersuchungsobjekte haben oder chemische Veränderungen der Zielmoleküle hervorrufen. Bei dem etablierten quantitativen Nachweis der DNA mit Propidiumiodid wirkt die Probepräparation bzw. Zellfixierung hingegen unterstützend. Hier werden durch die Extraktion der endogenen Pigmente die Membraneigenschaften derart verändert, dass es zu einer erhöhten Aufnahme des Fluorophors in den Zellen kommt. Der quantitative Nachweis der in den Zellen intrinsisch enthaltenen Stärke mit Hilfe der SHG-Mikroskopie ist jedoch ein neues Verfahren. Es musste daher sichergestellt werden, dass es im Ergebnis der Probenpräparation (Fixierung) zu keiner das SHG-Signal beeinflussenden strukturellen Veränderung der Stärke kommt. Ein direkter

Vergleich der Quantität des SHG-Signals von fixierten und unbehandelten Zellen ist aufgrund der in den unbehandelten Zellen enthaltenen endogenen Fluorophore nicht möglich. Jedoch können für diesen Zweck kommerzielle native Stärkegranula (Mais-Wildtyp) verwendet werden, die in wässriger Umgebung immobilisiert werden. Die in den Granulavolumina gemessenen SHG-Signale vor und nach der Zugabe von Ethanol (Endkonzentration 70 % [v/v]) zeigen eine Übereinstimmung von > 98 %, woraus geschlossen werden kann, dass diese Methode der Zellfixierung keine das SHG-Signal beeinflussenden Veränderungen der zellulären Stärke verursacht [für Details siehe 1].

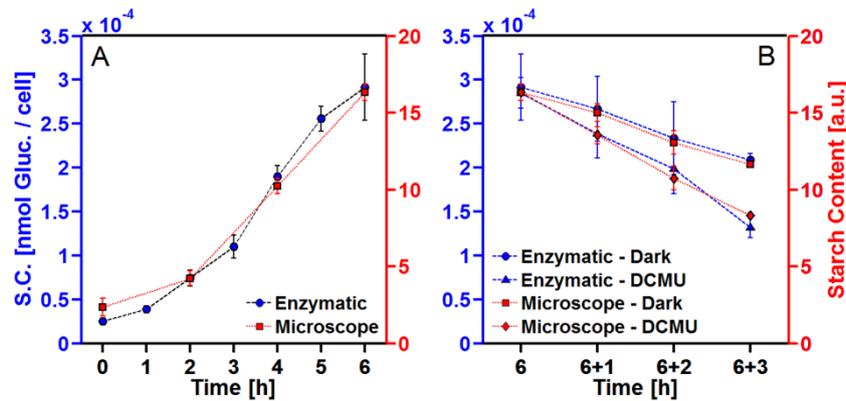
### 9.6.3 Validierung der SHG-Mikroskopie im Vergleich zu einem enzymatischen Test

In zwei weiteren Experimenten wurde der mit Hilfe der SHG-Mikroskopie und anschließender Bilddatenanalyse gemessene mittlere zelluläre Stärkegehalt einer Synchronkultur von *Chlamydomonas*-Zellen mit den Ergebnissen eines etablierten enzymatischen Tests verglichen [1]. Bei der enzymatischen Stärkequantifizierung wird die aus der Stärke hydrolytisch freigesetzte Glucosemenge bestimmt. In der SHG-Mikroskopie ist dagegen ausschließlich der hochgeordnete Amylopektinanteil die Quelle des SHG-Signals.

Zunächst wurde der mittlere zelluläre Stärkegehalt während der ersten Hälfte der Wachstumsphase zu den Zeitpunkten 0 h, 2 h, 4 h und 6 h mit dem biochemischen Verfahren und der SHG-Mikroskopie gemessen. Die Zellen wurden für die Messung jeweils fixiert (Abschnitt 9.4). Für die mikroskopische Analyse wurde die Immobilisierung mit Adhäsionsobjektträgern in der wässrigen Umgebung einer Zellkulturkammer (MiniCeM) vorgenommen. Die Messung erfolgte an mindestens 4000 Einzelzellen pro Messzeitpunkt [1]. Die Beschränkung auf die erste Hälfte der Wachstumsphase hat den Vorteil, dass in dieser Situation keine Zellteilungen stattfinden. Zellteilungen würden die Zellerkennungsprozedur erschweren und die Analyse intrazellulärer Kohlenstoffflüsse komplizieren. Neben der möglichen Beeinflussung durch die Probenpräparation wird daher auch eine vom Wachstumsstadium abhängige Veränderung der Stärkestruktur ausgeschlossen. Die SHG-Mikroskopie und die enzymatische Stärkequantifizierung ergaben für Form und Verlauf der Stärkeakkumulation qualitativ vergleichbare Ergebnisse (Abb. 28, A).

Diese Ergebnisse wurden bestätigt durch ein Experiment zum Stärkeabbau. Nach 6 h Lichtphase wurde der Stärkeabbau unter zwei Bedingungen induziert: Die Zelle wurden abgedunkelt oder bei unveränderter Belichtung mit Dichlorphenyldimethylharnstoff (DCMU), einem Inhibitor des photosynthetischen Elektronentransports, behandelt [1]. Die Abbaurate

der Stärke ist bei Behandlung der Algenzellen mit DCMU gegenüber den abgedunkelten Algen größer. In beiden Fällen liefern die Methoden übereinstimmende Ergebnisse (Abb. 28, B).



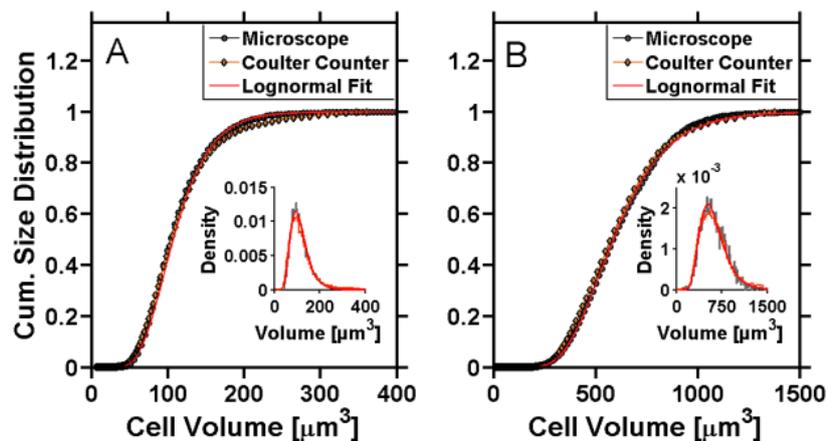
**Abb. 28: Stärkeakkumulation (A) und -degradation (B) in synchronisierten *Chlamydomonas*-Zellen.** **A)** Mittlerer zellulärer Stärkegehalt einer Zellsuspension während 6 h Belichtung. Die Messwerte wurden mit zwei Methoden ermittelt, der SHG-Mikroskopie (Quadrate, rechte Ordinate) und einem enzymatischen Test (Kreise, linke Ordinate). **B)** Mittlerer zellulärer Stärkegehalt einer Zellsuspension während eines durch Verdunklung der Zellen bzw. Zugabe von DCMU induzierten Stärkeabbaus. Die Messwerte wurden entsprechend mit den zwei Methoden SHG-Mikroskopie (Quadrate und Diamanten, rechte Ordinate) und enzymatischem Test (Kreise und Dreiecke, linke Ordinate) ermittelt. Da die SHG-Mikroskopie nur relative Messwerte zulässt, wurde der zelluläre Stärkegehalt auf den 6 h-Wert normiert. Die Werte wurden jeweils als Mittelwert aus zwei unabhängigen Messungen bestimmt.

## 10 Quantifizierung des wachstumsabhängigen zellulären Stärkegehalts von *Chlamydomonas*-Zellen

Enzymatische Tests sind klassische Methoden der quantitativen Stärkemessung. Aufgrund ihrer geringen Sensitivität sind die ermittelten Messwerte jedoch immer das Ergebnis einer Messung an einem nicht differenzierbaren Zellensemble. Mit der SHG-Mikroskopie und anschließender Bilddatenanalyse konnte erstmalig die direkte Quantifizierung des zellulären Stärkegehalts einzelner Zellen für eine statistisch relevante Anzahl unter gleichzeitiger Korrelation zum Zellvolumen demonstriert werden.

## 10.1 Volumenverteilung der *Chlamydomonas*-Zellen

*Chlamydomonas*-Zellen bestehen zu einem großen Anteil aus Wasser. Ethanol besitzt in hohen Konzentrationen hygroskopische Eigenschaften. Daher ist bei der Fixierung der Zellen ein teilweiser Wasserentzug und eine Volumenschrumpfung zu erwarten. Da das Zellvolumen eine wichtige Messgröße ist, und insbesondere als Bezugsgröße für den zellulären Stärkegehalt dient, muss sichergestellt werden, dass die Schrumpfung für alle Zellen systematisch erfolgt.



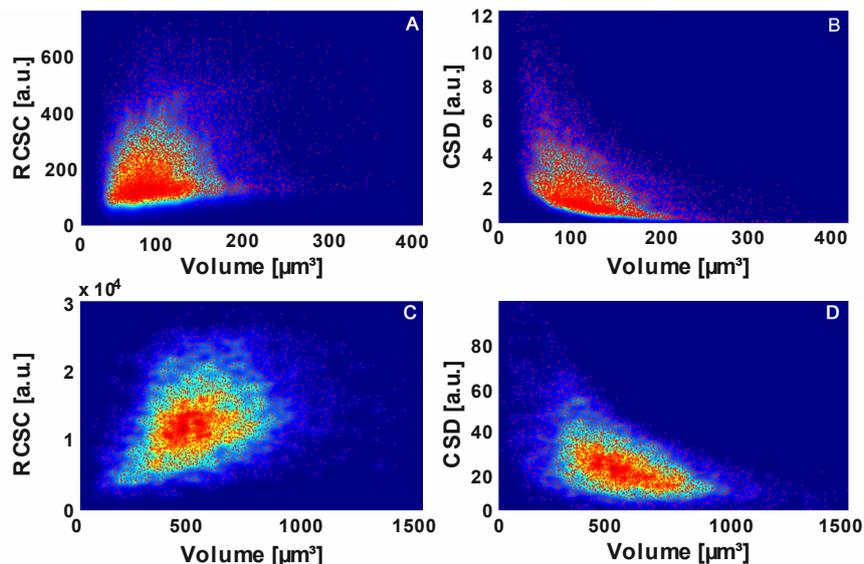
**Abb. 29:** Experimentell ermittelte Volumenverteilung von lebenden und entfärbten *Chlamydomonas*-Zellen. Neben der kumulativen Darstellung ist im „Inset“ die Wahrscheinlichkeitsdichteverteilung (PDF, kurz: Density) dargestellt. Diese entspricht einer Lognormalverteilung. Lebende und fixierte Zellen wurden mit einem Coulter-Counter bzw. der SHG-Mikroskopie gemessen. Die Zellen wurden jeweils einer Synchronkultur zum Zeitpunkt **A**) 0 h Licht und **B**) 6 h Licht entnommen.

Die Verteilung der Zellvolumina in synchronisierten *Chlamydomonas*-Kulturen folgt einer Lognormalverteilung [94]. Für den Fall fixierter bzw. lebender *Chlamydomonas*-Zellen wurde unter Anwendung der SHG-Mikroskopie bzw. eines „Coulter Counter“ (Beckman Coulter) die Verteilungsfunktion ihrer Zellvolumina bestimmt. Dabei konnte für die fixierten Zellen eine systematische Zellschrumpfung von  $\approx 30\%$  festgestellt werden. Mit den daraus folgenden Korrekturfaktoren wurde eine hohe Übereinstimmung ( $> 99\%$ ) der mit beiden Methoden gemessenen, lognormalverteilten, Zellvolumina erreicht (Abb. 29).

## 10.2 Heterogenität des zellulären Stärkegehalts

Ein herausragender Vorteil der SHG-Mikroskopie ist die Möglichkeit der parallelen Messung von Volumen und relativem Stärkegehalt (RCSC) an einer Vielzahl vereinzelter Zellen.

Exemplarisch wurden Volumen und relativer Stärkegehalt (RCSC) zu Beginn (0 h) und im mittleren Bereich (6 h) der Wachstumsphase dargestellt (Abb. 30). In Abb. 30, A und C sind der RCSC und das korrespondierende Zellvolumen in einem Streuplot dargestellt. Die Ereignishäufigkeit ist durch Farbgebung gekennzeichnet. Zu Beginn der Wachstumsphase (0 h) besitzen die Zellen ein Volumen im Bereich von 40–160  $\mu\text{m}^3$  und einen RCSC im Bereich von 80–400. Nach 6 h Belichtung kann eine Zunahme des Volumens auf 200–900  $\mu\text{m}^3$  und des RCSC auf 400–2500 festgestellt werden.



**Abb. 30:** Streudiagramme des relativen zellulären Stärkegehalts (RCSC) und der auf das jeweilige Zellvolumen bezogenen Stärkedichte (CSD). A) und B) Der RCSC bzw. CSD zu Beginn der Lichtperiode (0 h). C) und D) Zeitpunkt nach 6 h Belichtung. Warme und kalte Farben repräsentieren hohe bzw. geringe Zelldichten.

Die annähernd kreisförmige Verteilung von zellulärem Volumen und RCSC im Streudiagramm zeigt, dass keine signifikante Korrelation zwischen beiden zellulären Parametern vorhanden ist. Dies wird auch durch die ermittelten niedrigen Korrelationskoeffizienten 0,08 (0 h) und 0,30 (6 h) bestätigt [siehe auch 1, Supporting Material]. Qualitativ gleiche Aussagen konnten auch für die zellulären Entwicklungszeitpunkte 2 h und 4 h getroffen werden (Daten

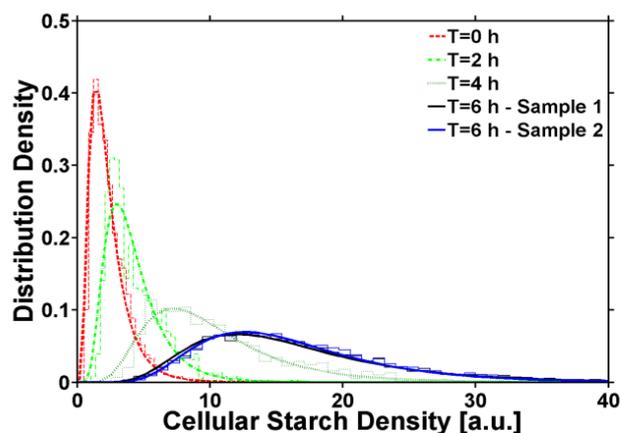
nicht gezeigt). Die Messungen belegen, dass innerhalb einer synchronisierten *Chlamydomonas*-Kultur während der Wachstumsphase eine Heterogenität der zellulären Parameter Volumen und RCSC vorliegt.

Aussagen über die Verteilung der Stärke innerhalb des Zellensembles können mit Hilfe der zellulären Stärkedichte (CSD), als Quotienten aus RCSC und Zellvolumen, getroffen werden (Abb. 30, B und D). Unabhängig vom zellulären Entwicklungsstand besitzen kleinere Zellen tendenziell eine höhere Stärkedichte.

### 10.3 Verteilungsfunktion der zellulären Stärkedichte und Modellierung der Rate des Stärkeabbaus

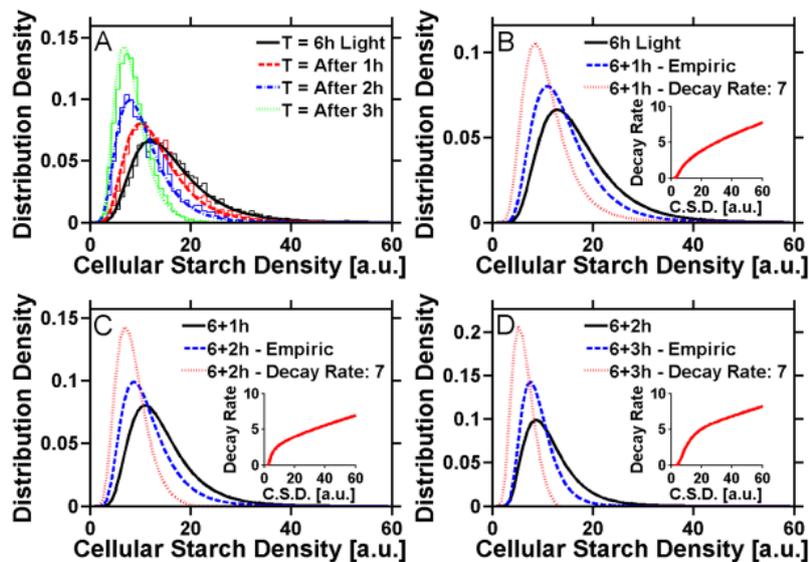
Die Verteilung der zellulären Stärkedichte (CSD) im Zellensemble ist mit einer Lognormalverteilung beschreibbar.

In Abb. 31 sind die gemessenen Wahrscheinlichkeitsdichteverteilungen (PDF) der CSD zu verschiedenen Phasen des Zellwachstums dargestellt. Mit zunehmenden Wachstum bzw. fortschreitender Stärkeakkumulation wird die Verteilung breiter und der arithmetische Mittelwert nimmt zu. Für den Fall des Stärkeabbaus ist ein entgegengesetztes Verhalten festzustellen (Abb. 32, A).



**Abb. 31: Zelluläre Stärkedichte (CSD).** Wahrscheinlichkeitsdichteverteilung (PDF; kurz: Distribution Density) der CSD während der Stärkeakkumulation. *Chlamydomonas*-Zellen wurden alle 2 h aus einer synchronisierten Kultur geerntet und mittels SHG-Mikroskopie untersucht. Es wird zu jedem Zeitpunkt eine hohe Übereinstimmung von Histogramm und der Lognormalverteilung festgestellt. Mit zunehmender Wachstumsphase wird die PDF breiter und der arithmetische Mittelwert verschiebt sich zu höheren Werten.

Nach einer sechsständigen Wachstumsphase wurde der Stärkeabbau durch Zugabe von DCMU (unter Aufrechterhaltung der Beleuchtung) eingeleitet. Der gleiche Effekt konnte auch bei Verdunklung der Zellkultur beobachtet werden ([1], Anhang A7, Abb. 14). Mit fortschreitendem Stärkeabbau wird der arithmetische Mittelwert kleiner und die Wahrscheinlichkeitsdichteverteilung (PDF) der CSD schmaler.



**Abb. 32: Gemessene Wahrscheinlichkeitsdichtefunktionen der zellulären Stärkedichten (CSD) und berechnete Abbauraten („Inlet“).** **A)** Zum Zellentwicklungsstand nach 6 h Belichtung und nach Zugabe von DCMU wurde im Abstand von 1 h die PDF gemessen. Wie auch in Abb. 31 beschreiben die Messwerte zu jedem Zeitpunkt eine Lognormalverteilung, jedoch nehmen arithmetischer Mittelwert bzw. die Breite der PDF mit zunehmendem Stärkeabbau ab. **B –D)** Theoretische und empirische Analyse des Stärkeabbaus nach 1 h (B), 2 h (C) und 3 h (D). Im „Inlet“ ist die jeweilig berechnete Abbaurrate der Stärke zwischen zwei aufeinanderfolgenden Messzeitpunkten dargestellt. Schwarz: PDF der CSD zum Ausgangszeitpunkt; Blau: PFD der CSD zum darauffolgenden Messzeitpunkt; Rot: PDF der CSD unter der Annahme einer konstanten Abbaurrate.

Unter Anwendung eines einfachen Ratengleichungsmodells besteht die Möglichkeit, aus den Verteilungsfunktionen der CSD die Rate des zellulären Stärkeabbaus (in Abhängigkeit des CSD) zwischen aufeinanderfolgenden Messzeitpunkten zu ermitteln. Die Population wird hierfür in  $N$  äquidistante Klassen bzw. Subpopulationen der zellulären Stärkedichte eingeteilt. Ausgehend von der Mastergleichung (10.1) wird die Umschichtung dieser Subpopulationen zwischen zwei aufeinanderfolgenden Zeitpunkten beschrieben:

$$\frac{dn_k(t)}{dt} = -\beta(k)n_k(t) + \beta(k+1)n_{k+1}(t) \quad (10.1)$$

Der Term  $n_k$  beschreibt hierbei die Besetzungszahl der Subpopulation an der Stelle  $k$ . Es gilt  $k < (N - 1)$ . Die Veränderung der Besetzungszahl zu zwei sukzedanen Zeitpunkten wird durch die Ratenfunktion  $\beta(k)$  beschrieben, die von der zellulären Stärkedichte abhängig ist.

Die ermittelte Abbaurrate der zellulären Stärkedichte ist in den „Inlets“ der Abb. 32, B–D dargestellt. Es kann festgestellt werden, dass die Abbaurrate mit der zellulären Stärkedichte zunimmt. Zur Verifizierung des Modells wurde eine für alle Zellen konstante Abbaurrate von  $\beta = 7$  angenommen und die zum jeweiligen Folgezeitpunkt zu erwartende CSD berechnet (Abb. 32, B–D rot gepunktet). Der Vergleich mit der experimentell ermittelten CSD (blau gestrichelt) zeigt keine Übereinstimmung und beweist, dass  $\beta$  keine Konstante ist.

## 10.4 Diskussion der Ergebnisse

Die Anwendbarkeit der SHG-Mikroskopie und anschließender Bilddatenanalyse zur Untersuchung des zellulären Stärkegehalts wurde durch verschiedene Ansätze verifiziert [1]. Zunächst wurde der mittlere zelluläre Stärkegehalt durch etablierte enzymatische Analysen quantifiziert und die Ergebnisse mit denen der SHG-Mikroskopie verglichen; dabei stimmten die Ergebnisse beider Methoden in hohem Maße überein.

Während der Photosynthese speichert ein photoautotropher Organismus die aufgenommene Energie vor allem in Stärke. Innerhalb der sechsständigen Wachstumsphase wird eine Zunahme des zellulären Stärkegehalts beobachtet. In der Dunkelheit nutzt die Zelle die gespeicherte Energie, um ihren Metabolismus und ihre Biosynthesefunktionen aufrecht zu erhalten. Der damit verbundene Stärkeabbau kann durch Zugabe von DCMU bei eingeschaltetem Licht oder durch Verdunklung der Zellen initiiert werden (Abb. 28).

Die Stärke ist in den *Chlamydomonas*-Zellen (50–1000  $\mu\text{m}^3$ , Abb. 29) in granularer Form enthalten. Das Volumen eines Stärkegranulums ist etwa zwei Größenordnungen kleiner als das Zellvolumen. Das Volumen aller Granula pro Zelle beträgt  $< 30\%$  des Zellvolumens. Die Beeinflussung des zur Bestimmung des Stärkegehalts genutzten SHG-Signals durch sekundäre Prozesse, wie Doppelbrechung, Streuung und Absorption, wurde diskutiert, theoretisch abgeschätzt und experimentell eingegrenzt. Bei Einhaltung der sich daraus ergebenden experimentellen Bedingungen konnte die Beeinträchtigung des SHG-Signals durch sekundäre Effekte auf unter  $10\%$  realisiert werden.

Eine relevante Strukturänderung der Stärkegranula und eine daraus resultierende Beeinflussung des SHG-Signals durch die Vorbehandlung der *Chlamydomonas*-Zellen mit einer Ethanol-Wasser-Lösung konnten anhand von Kontrollexperimenten ausgeschlossen werden. Es wurde jedoch eine systematische Schrumpfung der *Chlamydomonas*-Zellen um  $\approx 30\%$  festgestellt und die Volumenangaben wurden entsprechend korrigiert.

Die SHG-Mikroskopie mit anschließender Bilddatenanalyse wurde erstmalig zur quantitativen Stärkeanalyse auf Einzelzellebene angewendet und musste dementsprechend validiert werden. Die Anzahl der untersuchten Zellen betrug pro Messzeitpunkt mehr als 4000, sodass eine statistische Analyse möglich war. Es konnte festgestellt werden, dass sowohl das zelluläre Volumen als auch der Stärkegehalt einer Lognormalverteilung mit einer vom Wachstumsstadium abhängigen Parametrisierung folgen. Die arithmetischen Mittelwerte dieser Verteilungen zeigen sehr gute Übereinstimmungen mit den Ergebnissen eines etablierten enzymatischen Verfahrens (Abb. 28). Die Analyse von drei kommerziellen Stärkeproben (Wildtyp und zwei Stärkemutanten) ergab, dass die hochgeordneten Strukturen des Amylopektins die wesentliche Signalquelle der SHG sind. Beide Messmethoden stimmen in den Phasen der Stärkeakkumulation und dem induzierten Stärkeabbau in ihren Ergebnissen überein. Dies lässt folgende Schlussfolgerungen zu:

Das an den fixierten *Chlamydomonas*-Zellen innerhalb der sechsständigen Wachstumsphase und nach induziertem Stärkeabbau gemessene SHG-Signal korreliert mit der im enzymatischen Test ermittelten Glucosemenge. Hieraus folgt, dass die physikalische Ordnung der Stärkegranula während der Stärkeakkumulation und -degradation unverändert bleibt und dass das Amylopektin als einzige relevante biophotonische Struktur zum SHG-Signal beiträgt. Eine (qualitative) Auswertung der während der Wachstumsphase aufgenommenen Bilddaten ergibt keinen Hinweis auf eine signifikante Zunahme des SHG-Signals aus anderen Bereichen außerhalb der Stärkegranula. Letztlich konnte gezeigt werden, dass ausgehend vom sechsständigen Entwicklungszustand und anhaltender Abdunkelung der Zellen sowohl die enzymatische Stärkequantifizierung als auch die SHG-Signallintensitäten übereinstimmend bis zur Nachweisgrenze abnehmen [1].

Auf Einzelzellniveau zeigen das Volumen und der Stärkegehalt (RCSC) der Zellen für alle Messzeitpunkte eine große Variabilität. Während der sechsständigen Wachstumsphase des Zellzyklus ist keine Plastiden- oder Zellteilung zu beobachten und die gemessene Heterogenität kann ausschließlich den ungeteilten Organellen und Zellen zugeschrieben werden. Ferner ist der zelluläre Stärkegehalt während dieser Wachstumsphase gering und sekundäre optische

Einflüsse wie Streuung und Doppelbrechung demzufolge minimal. Da die automatische Zellidentifikation nur Zellen berücksichtigt, die ein messbares SHG-Signal aufweisen, könnte zu Beginn der Wachstumsphase die stärkebezogene Zellheterogenität sogar unterbestimmt sein.

Für die zellulären Parameter Volumen und Stärkegehalt werden der Spearman- und Pearson-Korrelationskoeffizient ermittelt. Der Pearstest setzt einen linearen Zusammenhang beider Messgrößen voraus. Dieser konnte auf der Basis der Lognormalverteilung hergestellt werden. Zwischen zellulärem Volumen und Stärkegehalt besteht keine Korrelation. Der ermittelte Korrelationskoeffizient liegt zwischen 0,08 und 0,30. Da die zelluläre Stärkedichte eine Funktion des Volumens ist, weist der Korrelationskoeffizient erwartungsgemäß höhere Werte auf (0,37–0,67) [1].

Es wurde festgestellt, dass große Zellen eine geringere zelluläre Stärkedichte aufweisen als kleine Zellen. Dies bedeutet, dass während des photosynthesegetriebenen Wachstums die Rate der Stärkeanreicherung von kleinen zu großen Zellen abnimmt.

In einer weiteren Versuchsreihe wurde nach einer Wachstumsphase von 6 h der Abbau der Stärke induziert. Für den induzierten Abbau wurden die zellulären Verteilungen der Stärkedichte (CSD) mit einem einfachen Ratengleichungsmodell beschrieben. Es konnte gezeigt werden, dass die Abbaurate für Zellen mit hoher Stärkedichte größer als für Zellen mit geringer Stärkedichte ist. Eine Korrelation zwischen Abbaurate und zellulärem Stärkegehalt konnte nicht nachgewiesen werden.

Der Stärkemetabolismus soll anhand zweier Extremfälle betrachtet werden. Im ersten Fall ist die Abbaurate der Stärke auf Einzelzellebene einheitlich und unabhängig vom zellulären Stärkegehalt. Mechanistisch kann diese Art des Stärkeabbaus durch ein sequentielles Modell beschrieben werden, bei dem der Chloroplast mindestens zwei Granula, d.h. je ein metabolisch aktives und inaktives Granulum, besitzt. Bei einer größeren Anzahl von Granula, sind zwei Granulapopulationen zu unterscheiden. Die Abbaurate der Stärke wird durch das metabolisch aktive Granulum bestimmt. Die alternative Hypothese lautet, dass die Abbaurate und der zelluläre Stärkegehalt vollständig miteinander korrelieren. Mechanistisch steht dieses Modell im Einklang mit einem hochsynchronisierten Abbau des gesamten zellulären Stärkevorrats. Die hier präsentierten Daten (Abb. 32 und Anhang A7, Abb. 14) unterstützen jedoch keinen der beiden Modi. Eindeutig widerlegt werden kann die erste Hypothese, da die Abbaurate keinesfalls konstant ist (Abb. 32 und Anhang A7, Abb. 14). Die Daten deuten vielmehr auf einen komplexeren Abbaumodus hin, der durch einen weitgehend unbekanntem Regulationsmechanismus gesteuert wird. Dieser Mechanismus erlaubt es der Zelle, innerhalb eines

einzelnen Chloroplasten, den Stärkeabbau an bestimmten Stärkegranula mit variablen Abbauraten zu initiieren.

Die Biosynthese von Stärke deckt zwei verschiedene biochemische Prozesse ab: die Vergrößerung existierender Granula und die Neuformierung von Stärkepartikeln. Die Initiierung der Bildung von Stärkegranula leitet sich von der normalen *De-novo*-Biosynthese des Glycogen ab, wobei viele biochemische Details nach wie vor unklar sind [106-108]. Das Granulawachstum verläuft nach einigen, eng miteinander verknüpften Reaktionen. Hierzu gehören die Verlängerung der Glucanketten, die Umwandlung linearer in verzweigte Polyglucanketten, die lokale Wechselwirkung von  $\alpha$ -Glucanen passender Größe, welche in der Bildung von Doppelhelices resultieren und die Ausrichtung der Doppelhelices, die schließlich zur Bildung eines definierten Stärkeallomorphs führt. In rasch wachsenden Systemen, wie der kultivierten *Chlamydomonas*-Zelle, nehmen sowohl Anzahl als auch Größe der Stärkegranula zu. Im Gegensatz zu den Mesophyllzellen von *Arabidopsis* besitzen ungeteilte *Chlamydomonas*-Zellen nur einen einzigen Chloroplasten, daher ist davon auszugehen, dass die zelluläre Stärkedichteverteilung (CSD) auf die Heterogenität einer einzelnen Zelle hindeutet. Derzeit kann noch keine Aussage darüber getroffen werden, ob der unterschiedliche, zelluläre Stärkegehalt einen stark veränderten intrazellulären Kohlenstofffluss oder verschiedene Raten der photosynthetischen CO<sub>2</sub>-Fixierung widerspiegelt.

## **11 Quantifizierung des zellulären Stärkegehalts in Chloroplasten der Pflanze *Arabidopsis thaliana* *in-vitro***

Auch der Stärkemetabolismus höherer Pflanzen kann mit Hilfe der SHG-Mikroskopie untersucht werden. Diese Technik erlaubt es, Organelle – wie z.B. Chloroplasten – *in-situ*, also im intakten Zellverbund eines Blatts, zu analysieren.

Einzelne Chloroplasten der Pflanze *Arabidopsis thaliana* wurden auf ihre Stärkekonzentration und die in ihnen enthaltenen Stärkegranula untersucht. Hierfür wurden der Wildtyp und eine Mutante (SEX1-8), bei der der Stärkeabbau während der Dunkelphase stark vermindert ist, verwendet.

## 11.1 Präparation von Blättern der Pflanze *Arabidopsis thaliana* und Versuchsbeschreibung

Für die Analyse des zellulären Stärkegehalts von Blattmaterial gelten die gleichen einschränkenden Bedingungen wie bei der Untersuchung von Algenzellen. Ein Blatt der Pflanze *Arabidopsis* besteht aus mehreren Zellschichten, der oberen und unteren Epidermis, dem Mesophyll und ggf. dem Leitbündel. Von Relevanz ist die Region des Mesophylls, da sich dort ein Großteil der Chloroplasten mit der granularen Stärke befindet. Die interessierenden Teile des Blattes können als zellwandlose Mesophyllprotoplasten isoliert werden, welche jedoch mechanisch sehr instabil sind. Die notwendige Extraktion der endogenen Fluorophore erwies sich hier als nicht praktikabel. Deshalb wurden die interessierenden Blattbestandteile im intakten Zellverbund analysiert.

Eine geeignete Methode, blattartiges Pflanzenmaterial für die quantitative SHG-Mikroskopie zu präparieren, ist das Anfertigen von Gefrierschnitten. Das jeweils in ein Quadratzentimeter große Stücke geschnittene Blattmaterial wurde zunächst in gleicher Weise wie die *Chlamydomonas*-Zellen mit einer 70 % [v/v] Ethanol-Wasser-Mischung behandelt und anschließend in Formaldehyd (4 % [v/v]) fixiert. Aus dem entfärbten Blattmaterial wurden orthogonal zur Blattoberfläche Gefrierschnitte des Mesophylls mit einer Schichtdicke von  $\approx 30 \mu\text{m}$  angefertigt, die in feuchter Umgebung auf einem Deckglas präpariert wurden.

Apparativ wurden die gleichen Mikroskopieeinstellungen wie bei der Analyse der *Chlamydomonas*-Zellen verwendet (Abschnitt 9.5). Aufgrund des schwächeren Signalpegels wurde jedoch eine Integrationszeit pro Pixel von  $2,64 \mu\text{s}$  für die stärkereiche Mutante (SEX1-8) und  $12,72 \mu\text{s}$  für den Wildtyp gewählt. Die Verbesserung des Signal-zu-Rausch-Verhältnisses gelang durch Verwendung eines Mikroskopobjektivs ( $20 \times \text{MI}$ ,  $N.A. = 0,75$ ; S-Fluor, Nikon) im Detektionsstrahlengang.

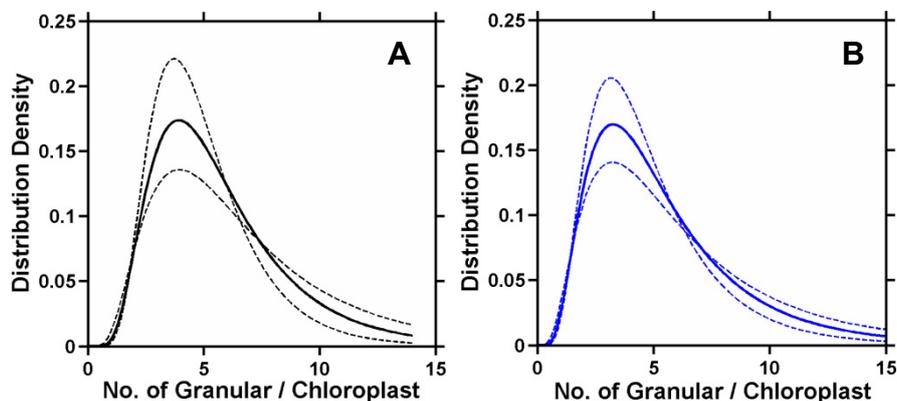
Die mikroskopischen Bilddaten der Gefrierschnitte zeigten die im intakten Zellverbund befindlichen Chloroplasten. Da diese nicht vereinzelt vorlagen, war eine automatische morphologische Identifizierung nicht sinnvoll. Die Auswerteroutinen wurden so angepasst, dass die einzelnen dreidimensionalen Chloroplasten manuell markiert werden konnten. Unter Verwendung dieser Ortskoordinaten wurden die Chloroplasten anschließend in Bezug auf Anzahl der Granula pro Chloroplast, Granulavolumina und zugehörigem Stärkegehalt bzw. granuläre Stärkedichte analysiert. Die nachfolgend aufgeführten Ergebnisse beruhen auf der

Analyse von 119 Chloroplasten der SEX1-8-Mutante mit 651 enthaltenen Granula und 70 Chloroplasten des Wildtyps mit 399 Granula.

## 11.2 Ergebnisse – Stärkegehalt der Chloroplasten und Anzahl der Stärkegranula

Aus Analysen, die mit Hilfe von elektronenmikroskopischen Aufnahmen an nicht-wachsenden Blättern von *Arabidopsis* durchgeführt wurden, ist bekannt, dass im Mittel vier bis sechs Stärkegranula pro Chloroplast enthalten sind [109]. Dieses Ergebnis konnte anhand der SHG-Mikroskopie bestätigt werden. Darüber hinaus wurde festgestellt, dass die Verteilungsfunktion der in den Chloroplasten enthaltenen Stärkegranula einer Lognormalverteilung entspricht (Abb. 33). Hierbei wurden keine signifikanten Unterschiede zwischen dem Wildtyp und der Mutante (SEX1-8) festgestellt. Der arithmetische Mittelwert liegt bei 5,8 (-0,85; +1,15) für den Wildtyp und 5,6 (-0,77; +1,01) für die Mutante (SEX1-8). (Der Fehlerbereich ist in Klammern angegeben.)

Die Volumenverteilungen der Chloroplasten des *Arabidopsis*-Wildtyps und der Mutante entsprechen ebenfalls einer übereinstimmenden Lognormalverteilung (Abb. 34, A); gleiches gilt für die in den Chloroplasten enthaltenden Stärkegranula (Abb. 34, B).

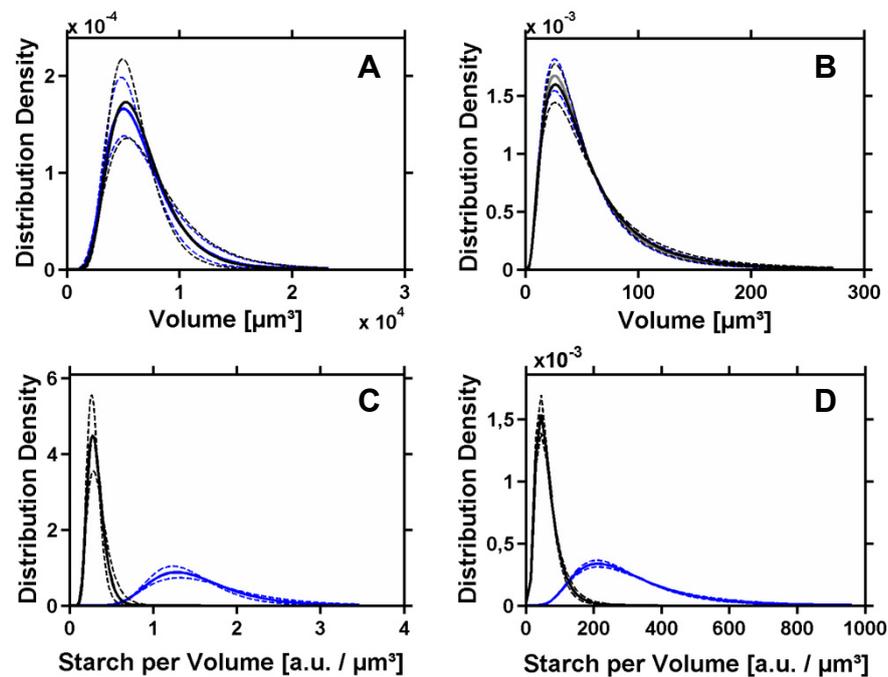


**Abb. 33: Anzahl der Stärkegranula.** Wahrscheinlichkeitsdichteverteilung und Vertrauensintervall von 95 % (gestrichelt) der Anzahl der Granular pro Chloroplast, **A)** Wildtyp **B)** SEX1-8-Mutante. Der arithmetische Mittelwert liegt in beiden Fällen im Bereich 5,6–5,8.

Aus enzymatischen Messungen ist bekannt, dass der mittlere Stärkegehalt der SEX1-8-Mutante etwa sechsmal höher ist, als der des Wildtyps [110]. Das SHG-Signal reagiert sensitiv auf strukturelle Veränderungen des Amylopektins. Folglich ist nur bei gleichbleibender

Struktur eine relative Messung der Stärkekonzentrationen möglich und aus dem Quotienten von Stärkekonzentration und Volumen die Stärkedichte ermittelbar.

Mit der SHG-Mikroskopie wurde festgestellt, dass die Verteilungen der Stärkedichten der Chloroplasten (Abb. 34, C) und der Stärkegranula (Abb. 34, D) durch eine Lognormalverteilung beschrieben wird. Aus dem Vergleich der arithmetischen Mittelwerte bzw. der Verteilungsbreiten kann geschlossen werden, dass die SEX1-8-Mutante eine etwa fünfmal höhere Stärkekonzentration aufweist (Anhang A8, Tabelle 3). Da dieses Ergebnis mit den im enzymatischen Test gemessenen Werten übereinstimmt, wurde gefolgert, dass die Dichten der Stärkegranula bei Wildtyp und Mutante deutlich verschieden sind.



**Abb. 34: Volumen- und CSD-Wahrscheinlichkeitsdichteverteilung** (PDF, kurz: Distribution Density) und Vertrauensintervall von 95 % (gestrichelt): Volumenverteilung von **A**) Chloroplasten und **B**) Stärkegranula. Als Quotient aus Stärkegehalt und Volumen berechnete Stärkedichte: **C**) Chloroplasten; **D**) Stärkegranular. Alle zellulären Parameter werden durch eine Lognormalverteilung beschrieben. **A–B**) Es ist eine gute Übereinstimmung der Chloroplasten- bzw. Granulavolumenverteilung zwischen Wildtyp (schwarz) und SEX1-8-Mutante (blau) zu beobachten. **C–D**) Die Stärkedichte ist bei der SEX1-8-Mutante etwa fünfmal höher als beim Wildtyp.

Im Gegensatz zu den rasch wachsenden *Chlamydomonas*-Zellen, besitzen die untersuchten Mesophyllzellen von ausgewachsenen Blättern der Pflanze *Arabidopsis thaliana* über den

Verlauf eines Hell-Dunkel-Zyklus eine weitgehend konstante Anzahl von Stärkegranula, wobei am Ende des Lichtzyklus der Gesamtstärkegehalt 40-fach höher liegt. Daher verläuft der Stärkemetabolismus größtenteils, wahrscheinlich sogar ausschließlich, über alternierende Perioden zunehmender und abnehmender Granulavolumina. Auch hier variiert der Stärkegehalt pro Chloroplast stark. Bezogen auf das Chloroplastenvolumen beschreibt die Stärkedichte eine Lognormalverteilung.

## **12 Quantifizierung des wachstumsabhängigen zellulären DNA-Gehalts von *Chlamydomonas*-Zellen**

Die Messung von Fluoreszenzsignalen ermöglicht es, Stoffkonzentrationen auf zellulärer Ebene mit sowohl linearen als auch nichtlinearen optischen Methoden zu bestimmen. In der Durchflusszytometrie werden bei einem hohen Durchsatz vereinzelte Zellen angeregt und das zur Anzahl der Zielmoleküle proportionale Fluoreszenzsignal gemessen. Unter linearen Anregebungsbedingungen kommt es mit zunehmender Zellgröße bzw. Fluorophorgehalt verstärkt zu Reabsorption und Streuung. Besondere Komplikationen liegen vor, wenn sich Größe und Gestalt der Zellen im Untersuchungszeitraum ändern. Dann ist durch die gegenseitige Beeinflussung von Stoffkonzentration und Objektvolumen keine eindeutige Korrelationsanalyse möglich. Die Coulter-Counter-Methode nutzt als Messsignal die größenabhängige Veränderung des elektrischen Potentials beim Eintreten des Objekts in ein elektrisches Feld.

Im Allgemeinen werden derartige Methoden unabhängig voneinander eingesetzt und lassen keine gleichzeitige Messung von Stoffkonzentration und Objektvolumen auf zellulärem Niveau zu. Die gleichzeitige quantitative Bestimmung von Stoffkonzentration und Objektvolumen ermöglicht hingegen die nichtlineare Fluoreszenzmikroskopie mit der anschließenden Bilddatenanalyse. Durch die Auswertung der morphologischen Bild- und Intensitätsinformationen ist eine parallele und unabhängige Bestimmung von Volumen und Stoffkonzentration möglich. Dies ist u.a. bei der Erforschung von Synthesegeschwindigkeiten, etwa bei Biopolymeren wie der DNA, relativ zur Volumenzunahme von Interesse.

### **12.1 Präparation und Versuchsbedingungen**

Um DNA fluoreszenzspektroskopisch nachzuweisen, musste diese mit einem geeigneten Fluorophor markiert werden. Die fixierten Zellen (Abschnitt 9.4) wurden hierzu zweimal in kalter PBS-Pufferlösung gewaschen und für 3 h bei 4 °C mit RNAse A (Endkonzentration

10 µg/ml; Sigma) und Propidiumiodid (2,5µg/ml, Sigma) inkubiert [111, 112]. Bis zur Messung wurden die Zellen in Dunkelheit bei 4 °C aufbewahrt.

Die Zellen wurden in fünf Entwicklungsstadien untersucht. Dabei wurden neben den Volumina der Zellen, der Nuclei und der extranucleären DNA auch die in jedem Kompartiment vorliegende DNA-Konzentration bestimmt (Abschnitt 9.1.1, Abb. 17). Weiterhin wurden in Abhängigkeit des zellulären Entwicklungsstadiums innerhalb einer Zelle die Anzahl der Nuclei und der extranucleären DNA ermittelt.

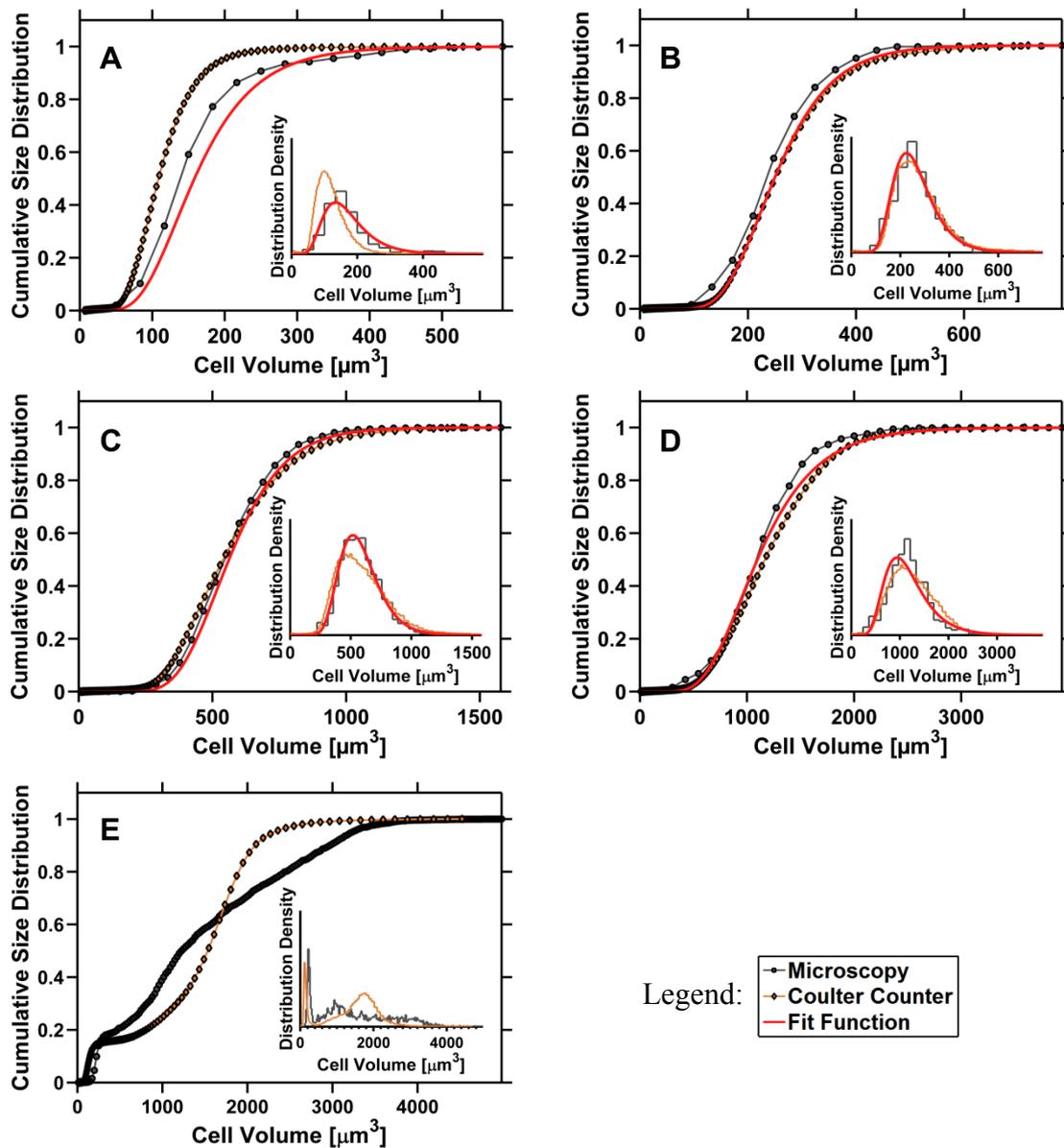
## **12.2 Volumenverteilung der *Chlamydomonas*-Zellen**

Es wurde erneut bestätigt, dass das zelluläre Volumen während der Wachstumsphase bis zum Einsetzen der Zellteilungsphase durch eine Lognormalverteilung beschrieben wird. Im Vergleich zu den mit der Coulter-Counter-Methode an lebenden Zellen gemessenen Zellvolumina wurde an den zu den Messezeitpunkten 0 h, 3 h, 6 h, 9 h und 12 h fixierten und untersuchten Zellen eine systematische Zellschrumpfung von  $\approx 30\%$  festgestellt. Dieses Ergebnis stimmt überein mit den Resultaten der SHG-Mikroskopie (vgl. Abschnitt 10.1, Abb. 29).

Die mit Hilfe der Fluoreszenzmikroskopie *in-vitro* und der Coulter-Counter-Methode *in-vivo* gemessenen Größenverteilungen sind in Abb. 35 dargestellt. Hierbei zeigen die Größenverteilungen zu den Messzeitpunkten 3 h, 6 h, und 9 h nach Beginn der Wachstumsphase für beide Methoden eine gute Übereinstimmung. Abweichungen sind bei sehr kleinem Zellvolumen (0 h) und während der beginnenden Zellteilungsphase (12 h) zu beobachten. Vermutlich wurden einige Zellen zum Beginn der Wachstumsphase nicht ausreichend immobilisiert, sodass aufgrund der Brown'schen Molekular- bzw. Zellbewegung ein scheinbar größeres Volumen gemessen wurde.

In der Teilungsphase können mit beiden Nachweismethoden zwei Maxima in der Volumenverteilung identifiziert werden (Abb. 35, E). Die Häufung der Zählereignisse bei Zellvolumina  $< 150\ \mu\text{m}$ , ist hierbei übereinstimmend den bereits freigesetzten Tochterzellen zuzuordnen. Die ermittelten Volumina der Mutterzellen ( $> 150\ \mu\text{m}$ ) weisen jedoch Unterschiede auf. Bei Anwendung der Mikroskopie und der Bilddatenanalyse sind diese deutlich zu kleineren Werten verschoben. In der Teilung befindliche Zellen sind nicht mehr als Ellipsoid beschreibbar, sondern bestehen aus mehreren, voneinander abgegrenzten Objekten. Mit fortschreitendem Teilungsstadium bilden sich zunehmend Hohlräume zwischen den Tochterzellen (siehe Anhang A6, Abb. 13). Einerseits ist es möglich, dass bei der Messung der Zellvolumina mittels Coulter-Counter hierdurch ein scheinbar zu großes Volumen gemessen wird. Anderer-

seits ist die hier verwendete Bilddatenanalyse nicht in der Lage, alle Zellen eindeutig zu identifizieren. Fehlerhaft erkannte Zellen werden in der Häufigkeitsverteilung nicht berücksichtigt. Hier ist eine methodische Weiterentwicklung der Zellerkennungsprozedur unter Verwendung morphologischer Merkmale notwendig.



**Abb. 35: Kumulative Volumenverteilungen** („Inlet“: Wahrscheinlichkeitsdichteverteilung PDF; kurz: Distribution Density) der entfärbten und mit Propidiumiodid markierten *Chlamydomonas*-Zellen zu den Entwicklungsstadien **A)** 0 h, **B)** 3 h, **C)** 6 h, **D)** 9 h und **E)** 12 h nach Beginn der Lichtphase. Die Größenverteilungen des Coulter-Counters (vitale Zellen) und der Mikroskopieanalyse zeigen nach systematischer Korrektur eine gute Übereinstimmung. Lediglich im Bereich kleiner Zellvolumina (A) und in der Zellteilungsphase (E) sind Abweichungen zu beobachten.

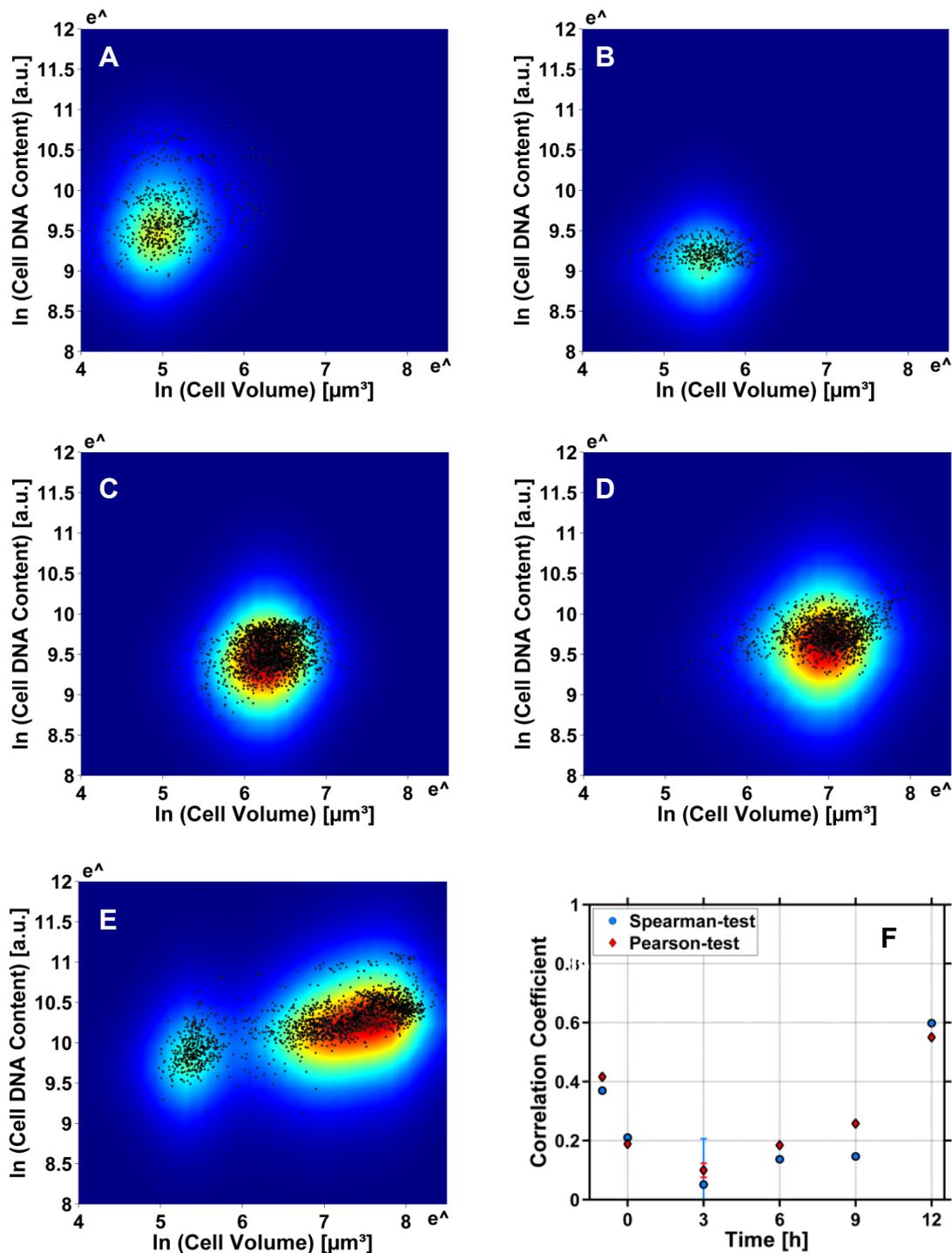
### 12.3 Heterogenität des zellulären DNA-Gehalts

Exemplarisch für die mit Hilfe der nichtlinearen Fluoreszenzmikroskopie und anschließender Bilddatenanalyse gemessenen zellulären Parameter sind in einem doppellogarithmischen Streudiagramm das Zellvolumen, der zelluläre DNA-Gehalt (Abb. 36) bzw. die Volumina von Zelle und Nucleus (Abb. 37) und die ermittelten Korrelationskoeffizienten (KK) dargestellt.

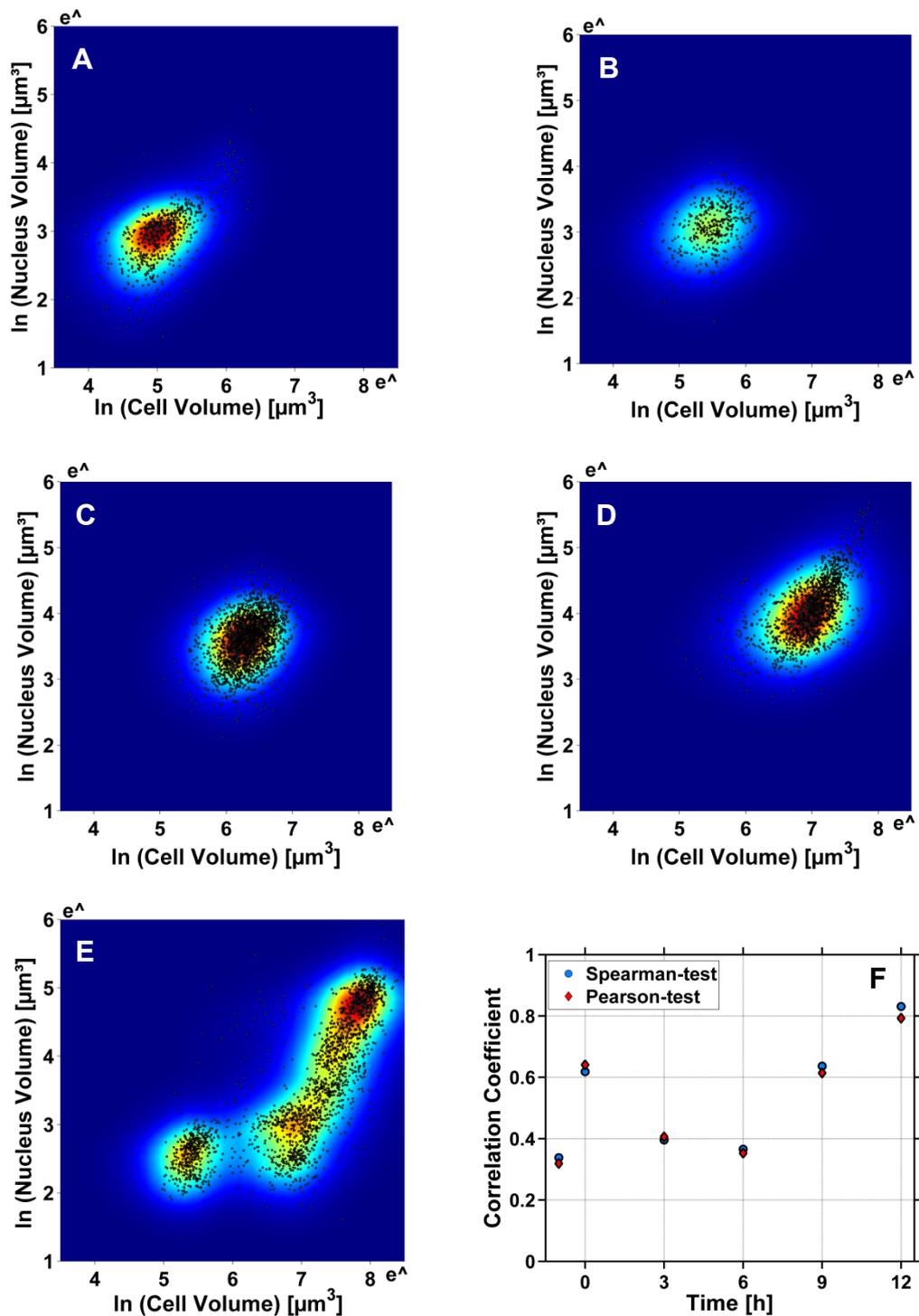
Zu allen Messzeitpunkten (0 h, 3 h, 6 h, 9 h und 12 h) ist eine Heterogenität der zellulären Parameter beobachtbar. Vom Beginn bis zum Ende der Lichtphase nimmt der zelluläre DNA-Gehalt zu. Die Zunahme des zellulären Volumens ist hierbei stärker als die des zellulären DNA-Gehalts (Abb. 36). Zelluläres und nucleäres Volumen nehmen hingegen etwa gleich schnell zu (Abb. 37). Am Ende der Lichtphase werden die bereits freigesetzten Tochterzellen und die noch in Teilung befindlichen Mutterzellen als zwei distinkte Subpopulationen erkannt (Abb. 36, E und 37, E). Die zellulären Parameter der Tochterzellen sind hierbei innerhalb einer kreisförmigen Fläche verteilt bzw. korrelieren nicht. Dagegen zeigen die zellulären Parameter der noch in Teilung befindlichen Mutterzellen eine gegenseitige Abhängigkeit.

Die Korrelationsanalysen mit Hilfe des Spearman- bzw. Pearstests ergeben für die zellulären Parameter Volumen und DNA-Gehalt innerhalb der Wachstumsphase Korrelationskoeffizienten (KK) unterhalb von 0,3; sie sind damit weitgehend unkorreliert. Zum Beginn der Teilungsphase (12 h) ist in der Population der Mutterzellen eine erhöhte Korrelation beider Parameter zu beobachten (KK = 0,6). Die Population der Tochterzellen weist hingegen einen niedrigen KK = 0,4 auf. Zur besseren Übersicht, werden die beiden Subpopulationen zum Beginn der Teilungsphase getrennt dargestellt. Die Tochterzellen werden hierbei am Zeitpunkt -1 h aufgeführt (Abb. 36, F und 37, F).

Für die zellulären Parameter Zellvolumen und nucleäres Volumen sind die KK generell größer (0 h–9 h: 0,35–0,65; 12 h Mutterzellen: 0,8).



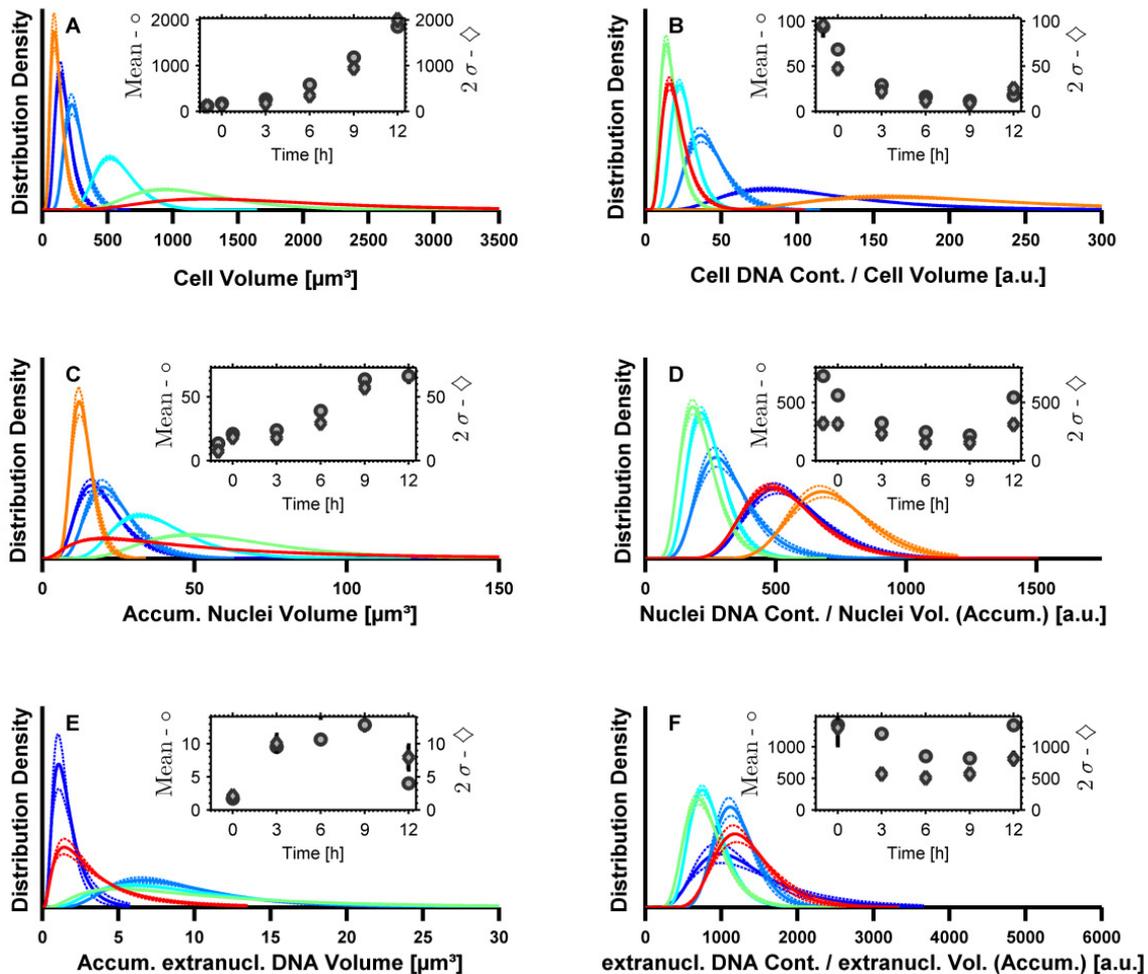
**Abb. 36: Streudiagramm von zellulärem DNA-Gehalt und Zellvolumen in doppellogarithmischer Darstellung zu den Zeitpunkten A) 0 h, B) 3 h, C) 6 h, D) 9 h und E) 12 h.** Kalte und warme Farben repräsentieren Bereiche mit wenigen bzw. vielen Ereignissen. Der Zeitpunkt 0 h ist der Beginn der Lichtphase; am Ende der Lichtphase (12 h) setzt die Zellteilungsphase ein. **F)** Mit dem Spearman- bzw. Pearson-Test ermittelte Korrelationskoeffizienten (KK). Die zum Zeitpunkt E zu beobachtenden beiden Subpopulationen wurden getrennt analysiert. Hier wurden die höchsten KK im Bereich von 0,4–0,6 ermittelt. Die Tochterzellen dieses Zeitpunkts sind als Position -1 h aufgetragen. Während der Wachstumsphase korrelieren die beiden zellulären Parameter nicht.



**Abb. 37: Streudiagramm der Volumina von Zelle und Nucleus in doppellogarithmischer Auftragung.** Darstellung wie in Abb. 36. Eine schwache Korrelation ( $KK = 0,35-0,65$ ) besteht während der Wachstumsphase. Mit beginnender Teilungsphase ist ein Anstieg des  $KK$  auf den Wert  $0,8$  zu beobachten.

## 12.4 Verteilungsfunktion der zellulären Parameter

Die Wahrscheinlichkeitsdichteverteilung der zellulären Parametersätze Volumina von Zelle, Nucleus und extranucleäre DNA und die in jedem Kompartiment vorliegende DNA-Konzentration sind durch Lognormalverteilungen beschreibbar (Abb. 38).



**Abb. 38: Wahrscheinlichkeitsdichteverteilung (PDF, kurz: Distribution Density) verschiedener zellulärer Parameter zu den Messzeitpunkten 0 h (lila), 3 h (blau), 6 h (hellblau), 9 h (grün), 12 h freigesetzte Tochterzellen (orange) und 12 h Mutterzellen (rot). A) Zellvolumen. B) Zelluläre DNA-Dichte, berechnet aus dem Quotienten von zellulärer DNA-Konzentration und Zellvolumen. C) Akkumulierte Nucleivolumina (bei mehr als einem Nucleus pro Zelle wird die Summe der Volumina angegeben). D) Akkumulierte Nucleidichte. E) Akkumulierte Volumina der extranucleären DNA. F) Akkumulierte extranucleäre DNA-Dichte. Alle aufgeführten zellulären Parameter sind im Ensemble lognormalverteilt. Im „Inset“ sind jeweils die arithmetischen Mittelwerte (Kreis) und die zweifache Standardabweichung ( $2\sigma$ , Diamant) abgebildet. Die Volumina nehmen in der Wachstumsphase schneller zu als die DNA-Konzentration (d.h., die zelluläre DNA-Dichte nimmt ab). Die Subpopulation der Tochterzellen (12 h) wurde an der Position -1 h aufgeführt.**

Das Volumen und die DNA-Konzentration werden auf Einzelzellebene durch Bildung des Quotienten, als zelluläre DNA-Dichte, korreliert (Abb. 38, B, D, F). Dies ermöglicht es, Erkenntnisse über die Synthesegeschwindigkeiten der DNA relativ zur Volumenzunahme zu gewinnen. Das mittlere Zellvolumen nimmt in der Wachstumsphase bis zum Einleiten der Zellteilungsphase (12 h) zu (Abb. 38, A) und ist durch eine Boltzmannfunktion beschreibbar (Abschnitt 8.4, Abb. 14). Eine Volumenzunahme, ist auch bei den Nuclei und der extranucleären DNA zu beobachten (Abb. 38, C, E). Die zelluläre DNA-Dichte, die pro Zelle akkumulierten Nuclei und die extranucleäre DNA nehmen im Messzeitraum hingegen ab. (Der Begriff akkumuliert bezieht sich auf die Aufsummierung der Objekte/Konzentrationen innerhalb einer Zelle; für die statistische Betrachtung der individuellen Objekte siehe Anhang A7, Abb. 14). Aus den Messdaten wird gefolgert, dass die Volumina der Zellen, der Nuclei und der extranucleären DNA schneller zunehmen als die im Kompartiment vorliegenden DNA-Konzentrationen.

## 12.5 Nucleäre DNA – Zellteilung

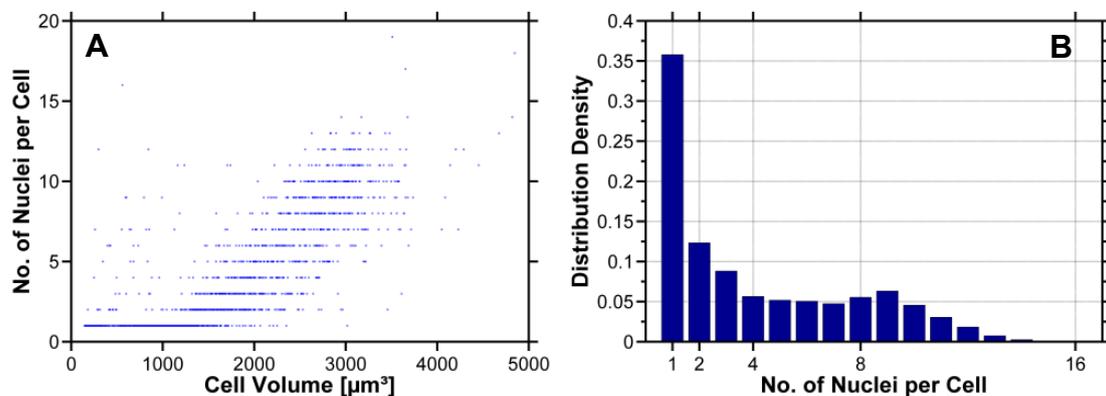
Bei der Zellteilung wird die nucleäre DNA der Mutterzelle auf die Tochterzellen aufgeteilt. Die Bilddatenanalyse ermöglicht es, die Anzahl der in den Zellen zum Ende der Wachstumsphase enthaltenen Nuclei zu bestimmen. Dabei wird jeder entstehenden Tochterzelle ein Nucleus zugeordnet. Mit den Auswerteroutinen in der Bilddatenanalyse ist die Identifizierung von Zellen bzw. Nuclei nur möglich, wenn diese eine ausreichende räumliche Separierung aufweisen. Insbesondere zum Zeitpunkt der begonnenen Zellteilungsphase (12 h) werden die Grenzen der Methode deutlich. Bei der Zellfixierung werden unmittelbar alle zellulären Prozesse, insbesondere der Teilungsprozess, gestoppt. Dementsprechend ist es der Bilddatenanalyse nur möglich, die Anzahl der pro Zelle enthaltenen Nuclei entsprechend des zu diesem Zeitpunkt herrschenden Teilungsstadiums zu bewerten.

Es ist bekannt, dass die meisten Eukaryoten eine multiple Zellteilung aufweisen [113]. Auf Einzelzellniveau erfolgt bei synchronisierten *Chlamydomonas*-Kulturen die Teilung der Mutterzellen erst am Ende der Wachstumsphase und führt, bestimmt durch die Anzahl der Nuclei pro Zelle ( $b = 0, 1, 2, \dots$ ), zu einer exponentiellen Zunahme der Tochterzellen  $T$ :

$$T = 2^b \quad (12.1)$$

Im Experiment wurde festgestellt, dass mit zunehmenden Zellvolumen die Mutterzellen mehrere Nuclei im Bereich von eins (das entspricht einer bereits freigesetzten Tochterzelle bzw. einer Mutterzelle, die keine Zellteilung vollführt) bis 16 besitzen (Abb. 39, A). Das multiple

Teilungsverhalten nach Gleichung (12.1) wurde jedoch nicht beobachtet. Die Häufigkeitsverteilung der pro Mutterzelle enthaltenen Nuclei zeigt Maxima an den Positionen 1, 2, 3 und 9 und weicht an den Positionen 3 und 9 jeweils um den Wert eins von der nach Gleichung (12.1) zu erwartenden Anzahl von Tochterzellen ( $T = 1, 2, 4, 8, 16, \dots$ ) ab (Abb. 39, B). Aufgrund der nur schwach ausgeprägten Maxima in der Häufigkeitsverteilung ist es unwahrscheinlich, dass experimentelle Bedingungen, wie die unterschiedlich hohe Auflösung in axialer und lateraler Richtung, zu einer signifikanten Anzahl von Fehlern in der Identifizierung der Nuclei führten. Vielmehr lassen die Ergebnisse den Schluss zu, dass die Teilung der innerhalb einer Mutterzelle enthaltenen Nuclei mit unterschiedlicher Geschwindigkeit abläuft.



**Abb. 39: Ermittelte Anzahl der Nuclei zum Ende der Wachstumsphase (12 h).** A) Die pro Zelle in Abhängigkeit vom Zellvolumen ermittelte Anzahl der Nuclei steigt; dabei ist jeder Tochterzelle ( $T$ ) ein Nucleus zugeordnet. B) Wahrscheinlichkeitsverteilung der Anzahl der Nuclei pro Zelle.

Diese Heterogenität der zellulären Parameter von synchronisierten *Chlamydomonas*-Zellen im Ensemble ist aus mechanistischer Sicht schwer erklärbar. Einzelzellanalysen von Bakterienzellen zeigten deutlich, dass isogene Tochterzellen bei weitem nicht identisch sind. Die Vielfalt wird durch verschiedene Faktoren verursacht, wobei die meisten, trotz genetischer Gleichheit, funktionaler Natur sind [114] und einer statistischen Verteilung in Bezug auf das Transkriptionslevel, die Teilung der Transkripte und die gelösten Proteine unterliegen. Die Anzahl der Kopien vieler Proteine und Transkripte variiert stark und folgt für fast alle Proteinspezies einer Gammaverteilung [115]. In Pflanzenzellen konnte die Heterogenität von Zelle zu Zelle und die uneinheitliche Verteilung von Proteinen im Kompartiment und deren Auswirkungen auf den Metabolismus untersucht werden [116]. Bei der Analyse eukaryotischer Algenzellen ist die einfachste (und vermutlich wahrscheinlichste) Erklärung für die Heteroge-

nität der synchronisierten *Chlamydomonas*-Zellen, dass die Mehrfachteilung die immanente Zellvielfalt der binären Teilung stäbchenförmiger Bakterien drastisch übersteigt.

### **13 Zusammenfassung und Ausblick**

Im ersten Teil der Arbeit wurde ein Messplatz zur PAM-Fluorimetrie zur Messung der veränderlichen Chlorophyllfluoreszenz an einzelnen Zellen vorgestellt. Die Verwendung eines kommerziellen Mikroskops, die Implementierung empfindlicher Nachweiselektronik und einer geeigneten Immobilisierungsmethode ermöglichten es, ein Signal-zu-Rausch-Verhältnis zu erreichen, mit dem Fluoreszenzsignale einzelner lebender *Chlamydomonas*-Zellen gemessen werden konnten. Insbesondere wurden das Zellvolumen und der als Maß für die Effizienz des Photosyntheseapparats bzw. die Zellfitness geltende Chlorophyllfluoreszenzparameter  $F_v/F_m$  ermittelt und ein hohes Maß an Heterogenität dieser zellulären Parameter in verschiedenen Entwicklungsstadien der synchronisierten *Chlamydomonas*-Zellen festgestellt. Die *Chlamydomonas*-Algen nutzen die Photosynthese als primäre Energiequelle für das zelluläre Wachstum. Eine variable Effizienz der Photosyntheseleistung zieht notwendigerweise eine Variabilität der wachstumsabhängigen zellulären Komponenten, wie DNA bzw. Stärkegehalt, nach sich. Durch apparative Einschränkungen war es mit dem aufgebauten Messplatz zur Einzelzell-PAM-Fluorimetrie nur möglich, jeweils eine Zelle pro Entwicklungsstadium zu vermessen. Eine Bestimmung der Verteilungsfunktionen zellulärer Parameter zu definierten Entwicklungsstadien erfordert jedoch die parallele Erfassung einer statistisch relevanten Zahl von Einzelzellen. Für Korrelationsanalysen werden idealerweise mehrere zelluläre Parameter unabhängig, aber parallel an der gleichen Zelle gemessen.

Im zweiten Teil der Arbeit wurden die bildgebende Laser-Scanning-Mikroskopie und anschließende Bilddatenanalyse zur quantitativen Erfassung der wachstumsabhängigen zellulären Parameter angewandt. Ein kommerzielles konfokales Mikroskop wurde um die Möglichkeit der nichtlinearen Mikroskopie erweitert. Diese hat den Vorteil einer lokalisierten Anregung. Damit verbunden sind eine höhere Ortsauflösung und eine insgesamt geringere Probenbelastung. Die Signalgewinnung kann sowohl durch Fluoreszenzanregung als auch durch die Erzeugung der Zweiten Harmonischen (SHG) an biophotonischen Strukturen, wie z.B. der partikulären Stärke, erfolgen. Die Vorteile der bildgebenden nichtlinearen Mikroskopie wurden bei der Visualisierung der subzellulären Verteilung von Enzymen demonstriert.

Die statistische Analyse der wachstumsabhängigen zellulären Parameter ermöglichte es, ihre Verteilungsfunktionen im Zellensemble zu bestimmen. Anhand dieser Verteilungsfunktionen

war es mit Hilfe von modelltheoretischen Ansätzen möglich, zelluläre Parameter zu ermitteln, die messtechnisch nicht unmittelbar zugänglich sind. Da die Bilddatenanalyse eine parallele Messung mehrerer Zellparameter erlaubte, konnten diese auf Einzelzellebene korreliert werden. Die morphologischen Informationen der Bilddaten ermöglichten die Bestimmung der Zellvolumina und die Volumina subzellulärer Strukturen, wie Nuclei, extranucleäre DNA oder Stärkegranula. Weiterhin konnte die Anzahl subzellulärer Strukturen innerhalb einer Zelle bzw. eines Zellverbands ermittelt werden. Die Analyse der in den Bilddaten enthaltenen Signalintensitäten war Grundlage einer relativen Konzentrationsbestimmung von zellulären Komponenten, wie DNA bzw. Stärke. Mit dem hier vorgestellten Verfahren der nichtlinearen Mikroskopie und nachfolgender Bilddatenanalyse konnte erstmalig die Verteilung des zellulären Stärkegehalts in einer *Chlamydomonas*-Population während des Wachstums bzw. nach induziertem Stärkeabbau verfolgt werden [1]. Im weiteren Verlauf wurde diese Methode auch auf Gefrierschnitte höherer Pflanzen, wie *Arabidopsis thaliana*, angewendet.

Im Ergebnis wurde gezeigt, dass viele zelluläre Parameter, wie das Volumen, der zelluläre DNA- und Stärkegehalt bzw. die Anzahl der Stärkegranula durch eine Lognormalverteilung mit wachstumsabhängiger Parametrisierung beschrieben werden können. Die zellulären Parameter, wie Stoffkonzentration und zelluläres Volumen, zeigten keine signifikanten Korrelationen miteinander. Daraus muss gefolgert werden, dass es ein hohes Maß an Heterogenität der zellulären Parameter innerhalb der synchronisierten *Chlamydomonas*-Populationen gibt. Diese Aussage gilt sowohl für die bisher als homogen geltenden Synchronkulturen von *Chlamydomonas reinhardtii* als auch für die gemessenen zellulären Parameter im intakten Zellverbund an höheren Pflanzen. Dieses Ergebnis ist insbesondere für modelltheoretische Betrachtungen von Relevanz, die sich auf empirische Daten bzw. zelluläre Parameter stützen, welche im Zellensemble gemessen wurden und somit nicht notwendigerweise den zellulären Status einer einzelnen Zelle repräsentieren.

Bei der Analyse des Zusammenhangs von Photosynthese und Wachstum hat die Heterogenität der zellulären Parameter entscheidende Konsequenzen: Erstens, jeder Zellzyklus wird mit einer heterogenen Zellpopulation initiiert. Zweitens, unabhängig von der Tatsache, dass alle Zellen innerhalb der Population mit einem Höchstmaß an identischen externen Umwelteinflüssen heranwachsen, variiert die Zahl der von einer Mutterzelle gebildeten Tochterzellen zwischen 2 und 32 [60, 117]. Auf Einzelzellniveau wird die Anzahl der Nachkommen durch die fortlaufende DNA-Replikation und der Teilung von Nucleus, Chloroplast und Zelle festgelegt. Sogar in synchronisierten Kulturen unterscheiden sich diese eng miteinander

verknüpften Prozesse quantitativ (und wahrscheinlich auch zeitlich) voneinander. Diesen Faktoren, die die Komplexität der Zellteilung spezifizieren, gilt es in zukünftigen Experimenten auf den Grund zu gehen.

## 14 Literatur

1. Garz, A., et al., *Cell-to-Cell Diversity in a Synchronized Chlamydomonas Culture As Revealed by Single-Cell Analyses*. Biophysical Journal, 2012. **103**: p. 1078-1086.
2. Abbe, E., *Beiträge zur Theorie des Mikroskops und der mikroskopischen Wahrnehmung*. Archiv für Mikroskopische Anatomie, 1873. **9**: p. 413-418.
3. Demtröder, W., *Laserspektroskopie*. Laserspektroskopie. 2007.
4. Göppert-Mayer, M., *Über Elementarakte mit zwei Quantensprüngen*. Annalen der Physik, 1931. **401**: p. 273-294.
5. Kaiser, W. and C.G.B. Garrett, *TWO-PHOTON EXCITATION IN  $\text{CaF}_2:\text{Eu}^{2+}$* . Physical Review Letters, 1961. **7**: p. 229-231.
6. Schäfer, F. and G.W. Schmidt, *3C3 - Geometrical model and experimental verification of two-photon absorption in organic dye solution*. IEEE Journal of Quantum Electronics, 1966. **2**: p. 357-360.
7. Singh, S. and L.T. Bradley, *Three-Photon Absorption in Naphthalene Crystals by Laser Excitation*. Physical Review Letters, 1964. **12**: p. 612-614.
8. Callis, P.R., *Two-photon-induced fluorescence*. Annual Review of Physical Chemistry, 1997. **48**: p. 271-297.
9. Xu, C., *Multiphoton fluorescence excitation: New spectral windows for biological nonlinear microscopy*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 1996. **93**: p. 10763-10768.
10. Boyd, G.D. and D.A. Kleinman, *Parametric Interaction of Focused Gaussian Light Beams*. Journal of Applied Physics, 1968. **39**: p. 3597-3638.
11. Franken, P.A., et al., *GENERATION OF OPTICAL HARMONICS*. Physical Review Letters, 1961. **7**: p. 118-121.
12. Boyd, R.W., *Nonlinear Optics (3rd Edition)*. 3 ed. 2008, New York: Elsevier.
13. Juskaitis, R., *Measuring the Real Point Spread Function of High Numerical Aperture Microscope Objective Lens*, in *Handbook of Biological Confocal Microscopy*, J.B. Pawley, Editor. 2006, Springer: USA, New York.
14. Cox, I.J. and C.J.R. Sheppard, *Information capacity and resolution in an optical system*. Journal of the Optical Society of America a-Optics Image Science and Vision, 1986. **3**: p. 1152-1158.
15. Sheppard, C.J.R. and M. Gu, *Image formation in two-photon fluorescence microscopy*. Optik, 1992. **92**: p. 104-106.
16. Inoué, S., *Foundations of Confocal Scanned Imaging in Light Microscopy*, in *Handbook of Biological Confocal Microscopy*, J.B. Pawley, Editor. 2006, Springer: USA, New York.
17. Hell, S., et al., *Aberrations in confocal fluorescence microscopy induced by mismatches in refractive index*. Journal of Microscopy-Oxford, 1993. **169**: p. 391-405.
18. Pawley, J.B., *Fundamental Limits in Confocal Microscopy*, in *Handbook of Biological Confocal Microscopy*, J.B. Pawley, Editor. 2006, Springer: USA, New York.
19. Stefan Wilhelm, B.G., Martin Gluch, Hartmut Heinz *Die konfokale Laser Scanning Mikroskopie*. 2003.
20. Haralick, R.M. and L.G. Shapiro, *Image Segmentation Techniques*. Computer Vision Graphics and Image Processing, 1985. **29**: p. 100-132.

21. Pawley, J.B., *Points, Pixels, and Gray Levels: Digitizing Imagin Data*, in *Handbook of Biological Confocal Microscopy*, J.B. Pawley, Editor. 2006, Springer: USA, New York.
22. Rose, A., *Television pickup tubes and the problem of noise*. *Adv. Electron*, 1948. **1**: p. 35.
23. Klaus Weisshart, G.K., Yauheni Novikau, Michales Kempe, *Strukturierte Beleuchtung in der Hochauflösungsmikroskopie*. *Optik & Photonik*, 2010. **1**: p. 5.
24. Hell, S. and E.H.K. Stelzer, *Properties of a 4Pi confocal fluorescence microscope*. *Journal of the Optical Society of America a-Optics Image Science and Vision*, 1992. **9**: p. 2159-2166.
25. Novotny, L. and B. Hecht, *Principles of Nano-Optics*. 2006: Cambridge University Press.
26. Pendry, J.B., *Negative refraction*. *Contemporary Physics*, 2004. **45**: p. 191-202.
27. Veselago, V.G., *The electrodynamics of substances with simultaneously negative values of  $\epsilon$  and  $\mu$* . *Physics-Uspekhi*, 1968. **10**: p. 509-514.
28. Smolyaninov, I.I., Y.-J. Hung, and C.C. Davis, *Magnifying superlens in the visible frequency range*. *Science*, 2007. **315**: p. 1699-1701.
29. Betzig, E., et al., *Imaging Intracellular Fluorescent Proteins at Nanometer Resolution*. *Science*, 2006. **313**: p. 1642-1645.
30. Hess, S.T., T.P.K. Girirajan, and M.D. Mason, *Ultra-high resolution imaging by fluorescence photoactivation localization microscopy*. *Biophysical Journal*, 2006. **91**: p. 4258-4272.
31. Rust, M.J., M. Bates, and X. Zhuang, *Sub-diffraction-limit imaging by stochastic optical reconstruction microscopy (STORM)*. *Nature Methods*, 2006. **3**: p. 793-795.
32. Huang, B., et al., *Three-dimensional super-resolution imaging by stochastic optical reconstruction microscopy*. *Science*, 2008. **319**: p. 810-813.
33. König, K., *Multiphoton microscopy in life sciences*. *Journal of microscopy*, 2000. **200**: p. 83-104.
34. Zipfel, W.R., R.M. Williams, and W.W. Webb, *Nonlinear magic: multiphoton microscopy in the biosciences*. *Nature Biotech.*, 2003. **21**: p. 1369-1377.
35. Cheng, P.-C., *Interaction of Light with Botanical Specimens*, in *Handbook of Biological Confocal Microscopy*, J.B. Pawley, Editor. 2006, Springer: USA, New York.
36. Helmchen, F. and W. Denk, *Deep tissue two-photon microscopy*. *Nature Methods*, 2005. **2**: p. 932-940.
37. Ping-Chin Cheng, C.K.S., *Nonlinear (Harmonic Generation) Optical Microscopy*, in *Handbook of Biological Confocal Microscopy*, J.B. Pawley, Editor. 2006, Springer: USA, New York.
38. Xu, C. and W.W. Webb, *Measurement of two-photon excitation cross sections of molecular fluorophores with data from 690 to 1050 nm*. *Journal of the Optical Society of America B-Optical Physics*, 1996. **13**: p. 481-491.
39. Larson, D.R., et al., *Water-soluble quantum dots for multiphoton fluorescence imaging in vivo*. *Science*, 2003. **300**: p. 1434-1436.
40. Huang, S.H., A.A. Heikal, and W.W. Webb, *Two-photon fluorescence spectroscopy and microscopy of NAD(P)H and flavoprotein*. *Biophysical Journal*, 2002. **82**: p. 2811-2825.

41. Piston, D.W., B.R. Masters, and W.W. Webb, *3-DIMENSIONALLY RESOLVED NAD(P)H CELLULAR METABOLIC REDOX IMAGING OF THE IN-SITU CORNEA WITH 2-PHOTON EXCITATION LASER-SCANNING MICROSCOPY*. Journal of Microscopy-Oxford, 1995. **178**: p. 20-27.
42. Zhang, Q.H., D.W. Piston, and R.H. Goodman, *Regulation of corepressor function by nuclear NADH*. Science, 2002. **295**: p. 1895-1897.
43. Denk, W., J.H. Strickler, and W.W. Webb, *Two-Photon Laser Scanning Fluorescence Microscopy*. Science, 1990. **248**: p. 73-76.
44. Gannaway, J.N. and C.J.R. Sheppard, *Second-harmonic imaging in the scanning optical microscope*. Optical and Quantum Electronics, 1978. **10**: p. 435-439.
45. Hellwart, R. and Christen, P., *NONLINEAR OPTICAL MICROSCOPIC EXAMINATION OF STRUCTURE IN POLYCRYSTALLINE ZnSe*. Optics Communications, 1974. **12**: p. 318-322.
46. Roth, S. and I. Freund, *Second harmonic generation in collagen*. The Journal of Chemical Physics, 1979. **70**: p. 1637-1643.
47. Gallant, D.J., B. Bouchet, and P.M. Baldwin, *Microscopy of starch: Evidence of a new level of granule organization*. Carbohydrate Polymers, 1997. **32**: p. 177-191.
48. Campagnola, P.J. and L.M. Loew, *Second-harmonic imaging microscopy for visualizing biomolecular arrays in cells, tissues and organisms*. Nature Biotechnology, 2003. **21**: p. 1356-1360.
49. Williams, R.M., W.R. Zipfel, and W.W. Webb, *Interpreting second-harmonic generation images of collagen I fibrils*. Biophysical Journal, 2005. **88**: p. 1377-1386.
50. Yasui, T., et al., *Ex vivo and in vivo second-harmonic-generation imaging of dermal collagen fiber in skin: comparison of imaging characteristics between mode-locked Cr:forsterite and Ti:sapphire lasers*. Applied Optics, 2009. **48**: p. D88-D95.
51. Berger, V., *Nonlinear photonic crystals*. Physical Review Letters, 1998. **81**: p. 4136-4139.
52. Chu, S.W., et al., *Nonlinear bio-photonic crystal effects revealed with multimodal nonlinear microscopy*. Journal of Microscopy, 2002. **208**: p. 190-200.
53. Sacconi, L., D.A. Dombek, and W.W. Webb, *Overcoming photodamage in second-harmonic generation microscopy: Real-time optical recording of neuronal action potentials*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 2006. **103**: p. 3124-3129.
54. Shimomura, O., *The discovery of aequorin and green fluorescent protein*. Journal of microscopy, 2005. **217**: p. 3-15.
55. Shimomura, O., F.H. Johnson, and Y. Saiga, *Extraction, Purification and Properties of Aequorin, a Bioluminescent Protein from the Luminous Hydromedusan, Aequorea*. Journal of Cellular and Comparative Physiology, 1962. **59**: p. 223-239.
56. Harris, E.H., *Chlamydomonas as a model organism*. Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology, 2001. **52**: p. 363-406.
57. Harmer, S.L., *The Circadian System in Higher Plants*, in *Annual Review of Plant Biology*. 2009. p. 357-377.
58. Golombek, D.A. and R.E. Rosenstein, *Physiology of Circadian Entrainment*. Physiological Reviews, 2010. **90**: p. 1063-1102.
59. Dong, G., Y.-I. Kim, and S.S. Golden, *Simplicity and complexity in the cyanobacterial circadian clock mechanism*. Current Opinion in Genetics & Development, 2010. **20**: p. 619-625.

60. Kuhl, A. and H. Lorenzen, *Handling and culturing of chlorella*, in *Methods in cell physiology*, D.M. Prescott, Editor. 1964, Academic Press. p. 59 - 166.
61. Ferullo, D.J., et al., *Cell cycle synchronization of Escherichia coli using the stringent response, with fluorescence labeling assays for DNA content and replication*. *Methods*, 2009. **48**: p. 8-13.
62. Bernstein, E., *Synchronous division in Chlamydomonas-moewusii*. *Science*, 1960. **131**: p. 1528-1529.
63. Moriyama, T., et al., *Characterization of cell-cycle-driven and light-driven gene expression in a synchronous culture system in the unicellular rhodophyte Cyanidioschyzon merolae*. *Microbiology-Sgm*, 2010. **156**: p. 1730-1737.
64. Cools, T., et al., *A replication stress-induced synchronization method for Arabidopsis thaliana root meristems*. *Plant J.*, 2010. **64**: p. 705-714.
65. Riou-Khamlichi, C., et al., *Cytokinin activation of Arabidopsis cell division through a D-type cyclin*. *Science*, 1999. **283**: p. 1541-1544.
66. Hur, J.Y., et al., *Synchronization of cell cycle of Saccharomyces cerevisiae by using a cell chip platform*. *Molecules and Cells*, 2011. **32**: p. 483-488.
67. Schorl, C. and J.M. Sedivy, *Analysis of cell cycle phases and progression in cultured mammalian cells*. *Methods*, 2007. **41**: p. 143-150.
68. Thevoz, P., et al., *Acoustophoretic Synchronization of Mammalian Cells in Microchannels*. *Analytical Chemistry*, 2010. **82**: p. 3094-3098.
69. Radfar, A., et al., *Synchronous culture of Plasmodium falciparum at high parasitemia levels*. *Nature Protocols*, 2009. **4**: p. 1899-1915.
70. Ranford-Cartwright, L., et al., *New synchronization method for Plasmodium falciparum*. *Malaria Journal*, 2010. **9**: p. 1-5.
71. Somerville, C. and M. Koornneef, *Timeline - A fortunate choice: the history of Arabidopsis as a model plant*. *Nature Reviews Genetics*, 2002. **3**: p. 883-889.
72. Fettke, J., et al., *Glucose-1-Phosphate Transport into Protoplasts and Chloroplasts from Leaves of Arabidopsis*. *Plant Physiology*, 2011. **155**: p. 1723-1734.
73. James, H.N., *Kubelka-Munk Theory and the Prediction of Reflectance*. *Review of Progress in Coloration and Related Topics*, 1985. **15**: p. 66-75.
74. Workman, J. and L. Weyer, *Practical Guide to Interpretive Near-Infrared Spectroscopy*. 2007: Taylor & Francis.
75. Alrifaiy, A. and K. Ramser, *How to integrate a micropipette into a closed microfluidic system: absorption spectra of an optically trapped erythrocyte*. *Biomedical Optics Express*, 2011. **2**: p. 2299-2306.
76. Ashkin, A., *ACCELERATION AND TRAPPING OF PARTICLES BY RADIATION PRESSURE*. *Physical Review Letters*, 1970. **24**: p. 156-159.
77. Ashkin, A., *Forces of a single-beam gradient laser trap on a dielectric sphere in the ray optics regime*. *Biophysical Journal*, 1992. **61**: p. 569-582.
78. Ashkin, A., *Forces of a single-beam gradient laser trap on a dielectric sphere in the ray optics regime*. *Methods in Cell Biology*, 1998. **55**: p. 1-27.
79. Visscher, K. and G.J. Brakenhoff, *SINGLE BEAM OPTICAL TRAPPING INTEGRATED IN A CONFOCAL MICROSCOPE FOR BIOLOGICAL APPLICATIONS*. *Cytometry*, 1991. **12**: p. 486-491.

80. Visscher, K. and G.J. Brakenhoff, *THEORETICAL-STUDY OF OPTICALLY INDUCED FORCES ON SPHERICAL-PARTICLES IN A SINGLE BEAM TRAP .I. RAYLEIGH SCATTERERS*. *Optik*, 1992. **89**: p. 174-180.
81. Onda, K. and F. Arai, *Multi-beam bilateral teleoperation of holographic optical tweezers*. *Optics Express*, 2012. **20**: p. 3633-3641.
82. König, K., *Laser tweezers and multiphoton microscopes in life sciences*. *Histochemistry and Cell Biology*, 2000. **114**: p. 79-92.
83. Ashkin, A., *Optical trapping and manipulation of neutral particles using lasers*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1997. **94**: p. 4853-4860.
84. McCord, R.P., J.N. Yukich, and K.K. Bernd, *Analysis of force generation during flagellar assembly through optical trapping of free-swimming Chlamydomonas reinhardtii*. *Cell Motil Cytoskeleton*, 2005. **61**: p. 137-44.
85. Schreiber, U., *Detection of rapid induction kinetics with a new type of high-frequency modulated chlorophyll fluorometer*. *Photosynthesis Research*, 1986. **9**: p. 261-272.
86. Schreiber, U., U. Schliwa, and W. Bilger, *Continuous recording of photochemical and non-photochemical chlorophyll fluorescence quenching with a new type of modulation fluorometer*. *Photosynthesis Research*, 1986. **10**: p. 51-62.
87. Baker, N.R., *Chlorophyll fluorescence: A probe of photosynthesis in vivo*. *Annual Review of Plant Biology*, 2008. **59**: p. 89-113.
88. Schoenfelder, S., *Personal communication: Typical PAM measurement of Arbidopsis thaliana*, 2011.
89. Baker, N.R., et al., *High resolution imaging of photosynthetic activities of tissues, cells and chloroplasts in leaves*. *Journal of Experimental Botany*, 2001. **52**: p. 615-621.
90. Villareal, T.A., *Single-cell pulse amplitude modulation fluorescence measurements of the giant diatom Ethmodiscus (Bacillariophyceae)*. *Journal of Phycology*, 2004. **40**: p. 1052-1061.
91. Krause, G.H. and E. Weis, *CHLOROPHYLL FLUORESCENCE AND PHOTOSYNTHESIS - The Basics*. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 1991. **42**: p. 313-349.
92. Kitajima, M. and W.L. Butler, *QUENCHING OF CHLOROPHYLL FLUORESCENCE AND PRIMARY PHOTOCHEMISTRY IN CHLOROPLASTS BY DIBROMOTHYMOQUINONE*. *Biochimica Biophysica Acta*, 1975. **376**: p. 105-115.
93. Bjorkman, O. and B. Demmig, *Photon yield of O<sub>2</sub> evolution and chlorophyll fluorescence characteristics at 77 K among vascular plants of diverse origins*. *Planta*, 1987. **170**: p. 489-504.
94. Craigie, R.A. and T. Cavaliersmith, *CELL-VOLUME AND THE CONTROL OF THE CHLAMYDOMONAS CELL-CYCLE*. *Journal of Cell Science*, 1982. **54**: p. 173-191.
95. Bedrinath Roysam, G.L., Muhammad-Amri Abdul-Karim, Omar Al-Kofahi, Khalid Al-Kofhai, William Shain, Donald H. Szarowski, James N. Turner, *Automated Three-Dimensional Image Analysis Methods fpr Confocal Microscopy*, in *Handbook of Biological Confocal Microscopy*, J.B. Pawley, Editor. 2006, Springer: USA, New York.
96. Davis, L.S., *A survey of edge detection techniques*. *Computer Graphics and Image Processing*, 1975. **4**: p. 248-270.
97. Meyer, F., *TOPOGRAPHIC DISTANCE AND WATERSHED LINES*. *Signal Processing*, 1994. **38**: p. 113-125.

98. Pal, N.R. and S.K. Pal, *A REVIEW ON IMAGE SEGMENTATION TECHNIQUES*. Pattern Recognition, 1993. **26**: p. 1277-1294.
99. Linkert, M., et al., *Metadata matters: access to image data in the real world*. J. Cell Biol., 2010. **189**: p. 777-782.
100. Scott, D.W., *On optimal and data-based histograms*. Biometrika, 1979. **66**: p. 605-610.
101. Anisha Thayil, K.N., et al., *Starch-based backwards SHG for in situ MEFISTO pulse characterization in multiphoton microscopy*. Journal of microscopy, 2008. **230**: p. 70-75.
102. Hejazi, M., et al., *Glucan, water dikinase phosphorylates crystalline maltodextrins and thereby initiates solubilization*. The Plant Journal, 2008. **55**: p. 323-334.
103. Graf, A., et al., *Circadian control of carbohydrate availability for growth in Arabidopsis plants at night*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2010. **107**: p. 9458-9463.
104. Wolf, M.J., M.M. Macmasters, and V.J. Ruggles, *REFRACTIVE INDICES OF WHEAT STARCH GRANULES AT VARIOUS MOISTURE LEVELS DETERMINED WITH AN INTERFERENCE MICROSCOPE*. Biochimica Et Biophysica Acta, 1962. **57**: p. 135-142.
105. Zhuo, Z.Y., et al., *Second harmonic generation imaging - A new method for unraveling molecular information of starch*. Journal of Structural Biology, 2010. **171**: p. 88-94.
106. D'Hulst, C. and A. Merida, *The priming of storage glucan synthesis from bacteria to plants: current knowledge and new developments*. New Phytologist, 2010. **188**: p. 13-21.
107. Issoglio, F.M., et al., *Mechanisms of Monomeric and Dimeric Glycogenin Autoglucosylation*. J. Biol. Chem., 2012. **287**: p. 1955-1961.
108. Zeeman, S.C., et al., *Starch synthesis in Arabidopsis. Granule synthesis, composition, and structure*. Plant Phys., 2002. **129**: p. 516-529.
109. Crumpton-Taylor, M., et al., *Control of Starch Granule Numbers in Arabidopsis Chloroplasts*. Plant Physiology, 2012. **158**: p. 905-916.
110. Hejazi, M., *Personal communication: Enzymatic starch quantification*, 2012.
111. Coulson, P.B., A.O. Bishop, and R. Lenarduzzi, *QUANTITATION OF CELLULAR DEOXYRIBONUCLEIC-ACID BY FLOW MICROFLUOROMETRY*. Journal of Histochemistry & Cytochemistry, 1977. **25**: p. 1147-1153.
112. Coulson, P.B. and R. Tyndall, *QUANTITATION BY FLOW MICRO-FLUOROMETRY OF TOTAL CELLULAR DNA IN ACANTHAMOEBA*. Journal of Histochemistry & Cytochemistry, 1978. **26**: p. 713-718.
113. John, P.C.L., *CONTROL OF THE CELL-DIVISION CYCLE IN CHLAMYDOMONAS*. Microbiological Sciences, 1984. **1**: p. 96-101.
114. Lloyd-Price, J., et al., *Probabilistic RNA partitioning generates transient increases in the normalized variance of RNA numbers in synchronized populations of Escherichia coli*. Molecular BioSystems, 2012. **8**: p. 565-571.
115. Taniguchi, Y., et al., *Quantifying E-coli Proteome and Transcriptome with Single-Molecule Sensitivity in Single Cells*. Science, 2010. **329**: p. 533-538.
116. Sweetlove, L.J. and A.R. Fernie, *The Spatial Organization of Metabolism Within the Plant Cell*. Annual Review of Plant Biology, 2013. **64**: p. 3.1-3.24.

117. Vitova, M., et al., *Chlamydomonas reinhardtii: duration of its cell cycle and phases at growth rates affected by light intensity*. *Planta*, 2011. **233**: p. 75-86.
118. Prah, S., *PhotochemCAD*, 2012: Oregon Medical Laser Center.
119. Probes, M. *Propidium Iodide Nucleic Acid Stain- US Food and Drug Administration (FDA)*. 2003.
120. Peltier, G. and G.W. Schmidt, *CHLORORESPIRATION - AN ADAPTATION TO NITROGEN DEFICIENCY IN CHLAMYDOMONAS-REINHARDTII*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1991. **88**(11): p. 4791-4795.
121. Renaud, S.M., D.L. Parry, and L.V. Thinh, *Microalgae for use in tropical aquaculture I: Gross chemical and fatty acid composition of twelve species of microalgae from the Northern Territory, Australia*. *Journal of Applied Phycology*, 1994. **6**: p. 337-345.
122. Dixon, J.M., M. Taniguchi, and J.S. Lindsey, *PhotochemCAD 2: A refined program with accompanying spectral atabases for photochemical calculations*. *Photochemistry and Photobiology*, 2005. **81**: p. 212-213.

## 15 Anhang

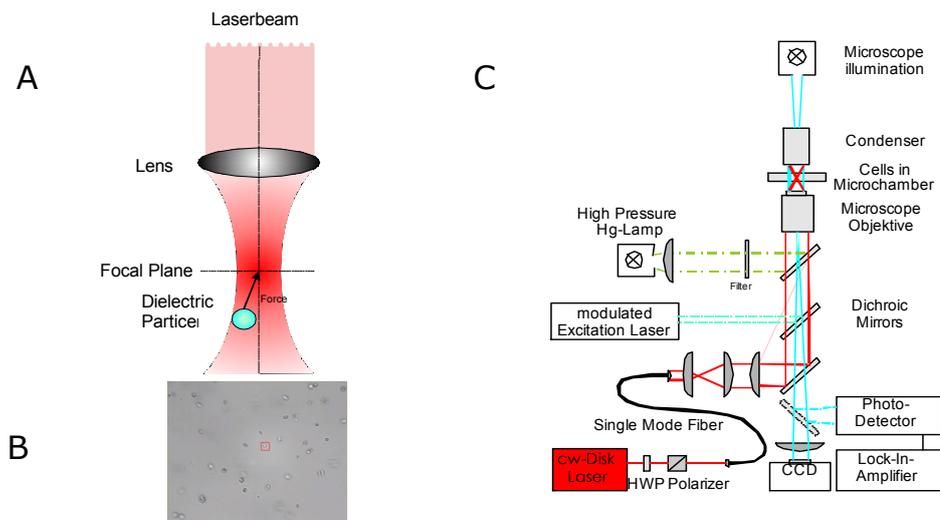
### A1 Zellimmobilisierungsmethoden

#### A1.1 Adhäsionsobjekträger

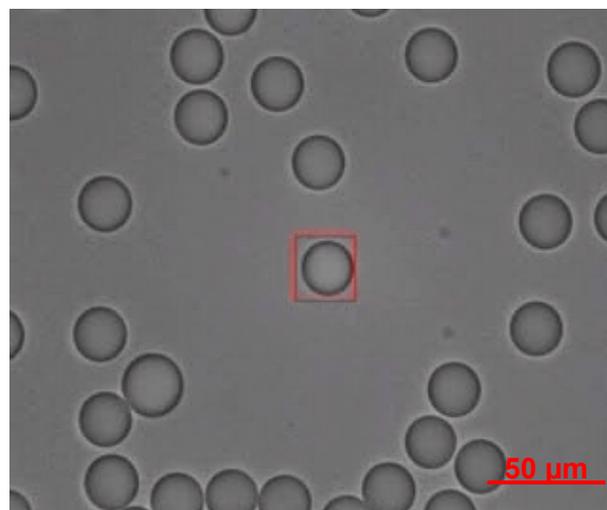
Die Adhäsionsobjekträger wurden nach folgendem Protokoll angefertigt:

1. Vorbehandlung der Deckgläser in zwei Stufen:
  - a. Reinigung im Ultraschallbad in einer Aceton-Wasser-Mischung für 15 min.
  - b. Reinigung in einer Lösung, die aus 35 g NaOH in 140 ml destilliertem Wasser unter ständigem Rühren und der Zugabe von 210 ml Ethanol (96 %) hergestellt wurde, für 5 min.
2. Behandlung der gereinigten Deckgläser mit Poly-L-Lysin:
  - a. Zugabe von 25 ml Poly-L-Lysin-Lösung zu 225 ml destilliertem Wasser.
  - b. Schwenken der gereinigten Deckgläser für 5–10 min in der Poly-L-Lysin Lösung.
  - c. Abtropfen der beschichteten Deckgläser in einem Rack für mindestens 60 s.
  - d. Anschließende Trocknung der Deckgläser im Unterdruckofen für 15 min bei 40 °C.
3. Behandlung der gereinigten Deckgläser mit Vectabond:
  - a. Zugabe von 7 ml Vectabond-Reagenz zu 350 ml Aceton unter ständigem Rühren.
  - b. Eintauchen der gereinigten Deckgläser in die Vectabond-Lösung für 5 min.
  - c. Abspülen der anhaftenden Vectabond-Lösung durch vorsichtiges Eintauchen in destilliertes Wasser für 30 s (Wasserwechsel alle fünf Eintauchvorgänge).
  - d. Abtropfenlassen von überschüssigem Wasser und Trocknung im Unterdruckofen bei 37 °C für 15 min.
4. Aufbewahrung der Adhäsionsobjekträger:
  - a. Die fertig präparierten Deckgläser wurden staubfrei und trocken bei Raumtemperatur (22 °C) für maximal 14 Tage aufbewahrt.

## A1.2 „Optische Pinzette“ („Optical Tweezers“)

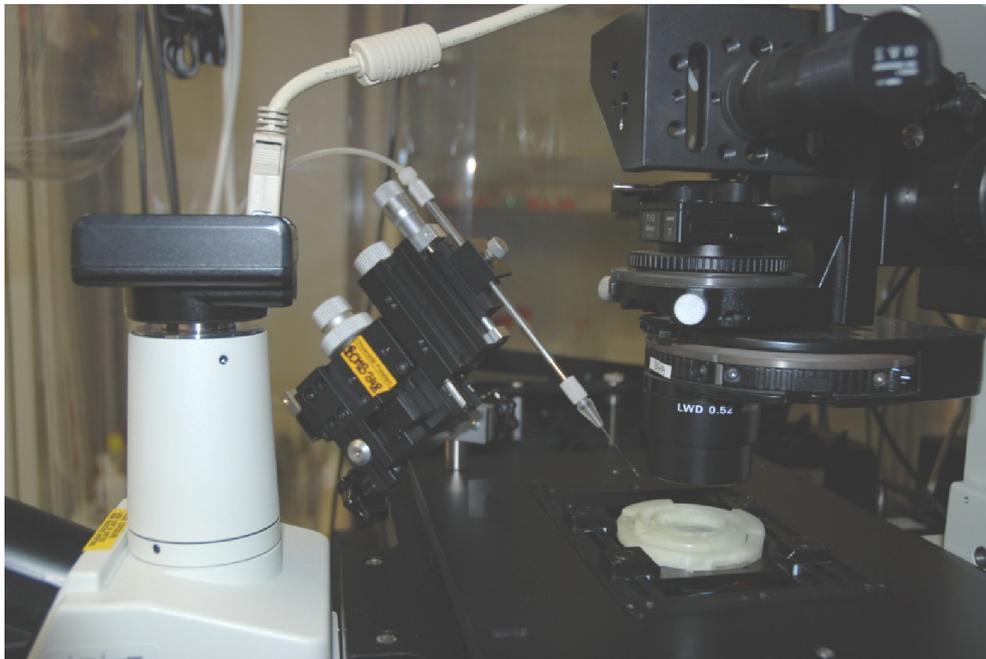


**Abb. 1: Kombination einer „optischen Pinzette“ mit einem konfokalen Laser-Scanning-Mikroskop.** **A)** Funktionsprinzip der „optischen Pinzette“. Die dielektrischen Partikel werden zum Ort der größten elektromagnetischen Feldstärke, der Fokalregion, gezogen. **B)** Eine mit der „optischen Pinzette“ immobilisierte *Chlamydomonas*-Zelle. **C)** Strahlengang im konfokalen Mikroskop Nikon TE-2000 in Kombination mit einer „optischen Falle“.



**Abb. 2: Polystyrenkugeln mit einem Durchmesser von 25 µm.** Die Kugeln wurden zur Optimierung der „optischen Pinzette“ verwendet. Die optische Leistung betrug an der Probenposition 10–500 mW bei einer Wellenlänge von 1030 nm.

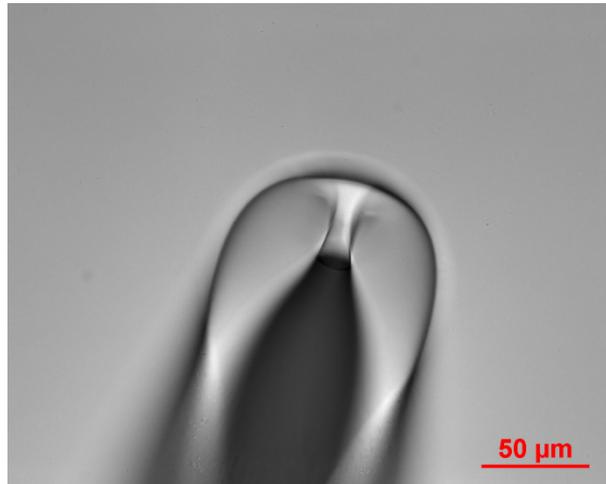
### A1.3 Patch-Clamp-Methode



**Abb. 3: Experimenteller Aufbau zur Zellimmobilisierung mit der Patch-Clamp-Methode.** Die Mikropipette kann mit einem manuellen Verschiebesystem mikrometergenau in der nach oben geöffneten Probenkammer (Jenlab) in alle Raumrichtungen positioniert werden. Weiterhin ist sie über einen flexiblen Schlauch mit einem Druckmanipulator (Abb. 4) verbunden. Da es sich um einen inversen Mikroskopaufbau handelt, befindet sich das Objektiv unterhalb der Probenkammer. Die Probenbeleuchtung kann sowohl über das Objektiv als auch über einen Kondensor erfolgen. Dieser kann zur Detektion des SHG-Signals durch ein weiteres Objektiv ausgetauscht werden. Dabei wird die im Bild oben rechts sichtbare LED durch einen Photomultiplier ersetzt.

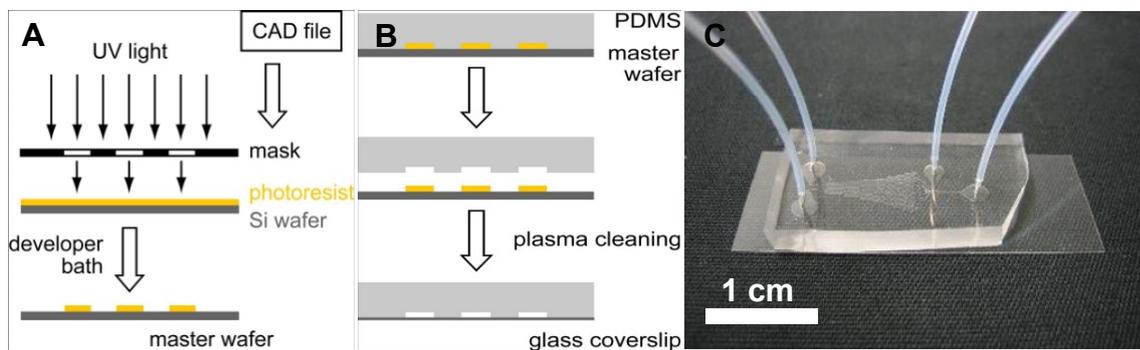


**Abb. 4: Druckmanipulator** zur Erzeugung eines dosierbaren Unterdrucks zum Ansaugen einer Zelle an die Mikropipette.



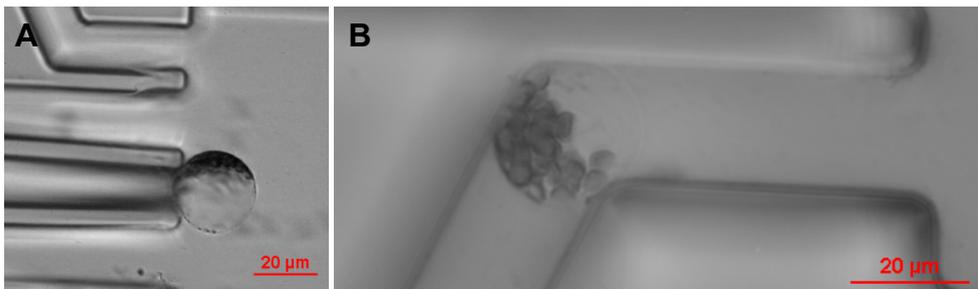
**Abb. 5: Mikropipette mit 10 µm Innendurchmesser.** Klar zu erkennen sind die abgerundeten Kanten.

### A1.1 Mikrofluidik



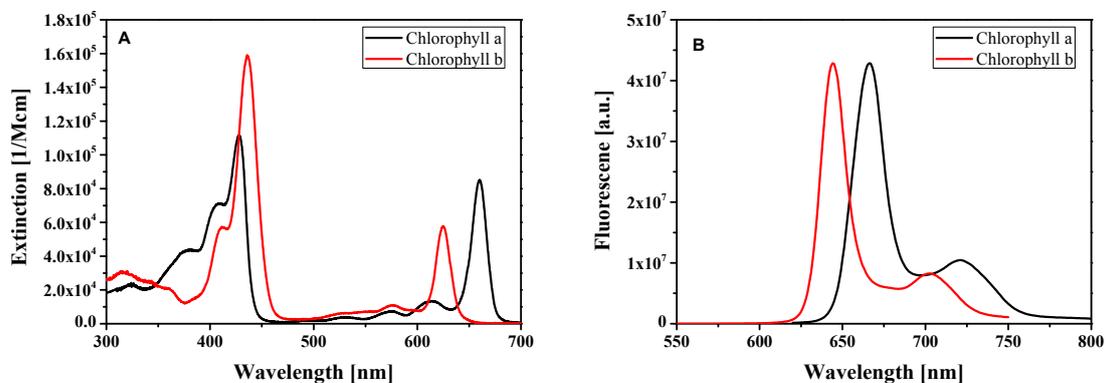
**Abb. 6: Technologische Prozesse bei der Herstellung einer mikrofluidischen Anordnung.** **A)** Die Zeichnung hoher Auflösung wird auf ein im ultravioletten Spektralbereich transparentes Medium, wie Folie oder Glas, gedruckt. Die Strukturen der so entstandenen Maske werden auf einem Siliziumwafer, der mit einem photoempfindlichen Lack beschichtet ist, abgebildet. Im Entwicklungsprozess bleiben auf dem Master-Wafer nur die belichteten Regionen bestehen. **B)** Die dreidimensionale Struktur des Master-Wafers wird mit einem Polymer übergossen. Nach der Aushärtung, wird der Master-Wafer entfernt und kann erneut verwendet werden. Anschließend werden mit einem Plasmareinigungsverfahren das Deckglas und der Polymerabdruck dauerhaft miteinander verbunden. **C)** An den entsprechenden Stellen wird die mikrofluidische Anordnung mit Versorgungsschläuchen kontaktiert, die das Zirkulieren eines flüssigen Mediums ermöglichen (Mit freundlicher Genehmigung von Prof. Beta).

Durch das Fehlen einer Zellwand sind Mesophyllprotoplasten sehr empfindlich gegenüber direkter Krafteinwirkung wie Berührungen oder Strömungen. Bei einer moderaten Strömungsgeschwindigkeit von  $100 \mu\text{m/s}$  ist eine zerstörungsfreie Immobilisierung innerhalb einer mikrofluidischen Struktur möglich.



**Abb. 7:** Mit einer mikrofluidischen Struktur immobilisierte Mesophyllprotoplasten. Die Immobilisierung erfolgt sowohl A) am Kanaleingang B) als auch an Kanalbiegungen.

## A2 Spektrale Eigenschaften der relevanten Fluorophore



**Abb. 8:** A) Extinktionskoeffizient und B) Fluoreszenzsignal für Chlorophyll a und b in Diethylether [118].

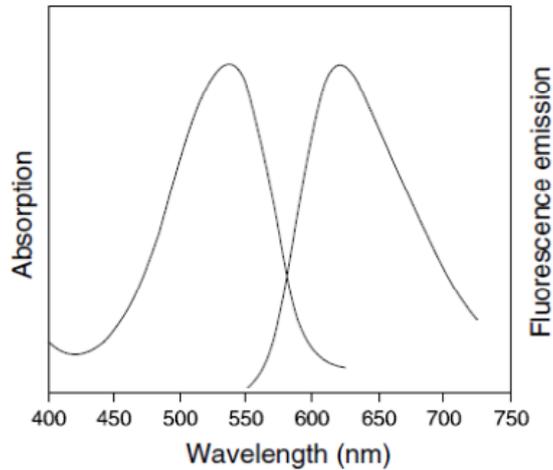


Abb. 9: Absorption- und Emissionsspektrum von Propidiumiodid gebunden an DNA [119].

### A2.1 Im Experiment verwendete Lichtintensitäten

In Tabelle 1 sind die zur Charakterisierung des Photosyntheseapparats verwendeten Lichtquellen und Intensitäten aufgeführt. In dieser Arbeit wurden lediglich das frequenzmodulierte Messlicht und das sättigende Licht verwendet.

	$\mu\text{E}/\text{m}^2\text{s}$	Photonen/ $\text{cm}^2\text{s}$	$\text{J}/\text{m}^2\text{s}$	nW
Frequenzmoduliertes Messlicht (632 nm)	0,1	$6 \cdot 10^{12}$	0,02	0,006
Aktinisches Licht (450 - 470 nm)	1.000	$6 \cdot 10^{16}$	245	77
Sättigendes Licht (450 -470 nm)	10.000	$6 \cdot 10^{17}$	2450	777

**Tabelle 1: Zur Charakterisierung des Photosyntheseapparats gebräuchliche Anregungsbedingungen.** Die Angabe erfolgt in der Einheit Einstein, die gängig in der Biologie ist, bzw. unter Berücksichtigung der spektralen Eigenschaften in SI-Einheiten. In der letzten Spalte ist die effektive Leistung (nW) aufgeführt, die auf eine Alge wirkt. Hierfür wird eine kreisförmig bestrahlte Fläche mit einem Durchmesser von 20  $\mu\text{m}$  angenommen.

**Chlorophyllgehalt der *Chlamydomonas*-Zellen:**pro mg Trockengewicht:  $32,5 \pm 5,6 \mu\text{g}$  [120]pro Zelle: ca.  $8 \cdot 10^{-12} \text{ g}$  [121]**Molekulargewicht:**Chlorophyll a:  $893,5026 \frac{\text{g}}{\text{mol}}$ ; Chlorophyll b:  $907,4862 \frac{\text{g}}{\text{mol}}$ **Spektroskopische Daten von Chlorophyll:****In Lösung:**

Fluoreszenzquantenausbeute in Lösung: 20–35 %

Fluoreszenzlebensdauer: 6–20 ns

**Im Photosyntheseapparat:**

Fluoreszenzquantenausbeute (PS II offen/geschlossen): 2/8 %

Fluoreszenzlebensdauer: (PS II offen): 300 ps

(PS II geschlossen): 1,65 ns

Wellenlänge [nm]	Chlorophyll a		Chlorophyll b	
	$\epsilon_{\lambda} \left[ \frac{1}{\text{mol} \cdot \text{cm}} \right]$	$\sigma_{\lambda} \cdot 10^{-16} [\text{cm}^2]$	$\epsilon_{\lambda} \left[ \frac{1}{\text{mol} \cdot \text{cm}} \right]$	$\sigma_{\lambda} \cdot 10^{-16} [\text{cm}^2]$
450–470	111700	4,3	159100	6,1
632	9412	0,4	24723	0,9

**Tabelle 2:** Ermittelte Extinktionskoeffizienten und Absorptionswirkungsquerschnitte für Chlorophyll a und b unter Verwendungen von Abb. 8 [118, 122].

### **A3 Abschätzung des Fluoreszenzphotonenflusses (FPF) bei Anregung mit schwachem Messlicht und Anwendung der PAM-Fluorimetrie**

Nach Gleichung (2.22) gilt für die aus dem Anregungsvolumen emittierte Fluoreszenzrate  $FP = \eta \int_V d^3r C \sigma_{IP} I(\vec{r}, t)$ . Es beschreiben  $\eta$  die Fluoreszenzquantenausbeute,  $\sigma_{IP}$  den Absorptionsquerschnitt,  $I(\vec{r}, t)$  den Anregungsphotonenfluss und  $C = c(\vec{r}, t)N_A$  die Zahl der Moleküle innerhalb des Fokalvolumens. Hierbei sind  $c$  die Stoffkonzentration und  $N_A$  die Avogadrokonstante. Unter Berücksichtigung der Detektionseffizienz  $\phi$  ergibt sich die Zahl der nachweisbaren Signalphotonen  $p = \phi \cdot FP$ . Die Detektionseffizienz  $\phi = \phi_{N.A.} \cdot \phi_{Trans.}$  ist das Produkt aus der Sammeffizienz des Objektivs  $\phi_{N.A.}$ , das sich aus dem Verhältnis des endlichen Öffnungswinkels des Objektivs zum vollen Raumwinkel  $\phi_{N.A.} = \frac{\Omega_{N.A.}}{4\pi}$  ergibt, und der Transmissionseffizienz der optischen Komponenten  $\phi_{Trans.}$ . Ein Objektiv mit der numerischen Apertur  $N.A. = 1.4$  besitzt eine Sammeffizienz von  $\phi_{Obj} \approx 0,31$ . Die Transmission aller optischen Komponenten wurde zu 50 % bestimmt. Damit ergibt sich eine Gesamteffizienz von  $\phi = \phi_{N.A.} \cdot \phi_{Trans.} \approx 0,15$ .

Für im Photosyntheseapparat enthaltendes Chlorophyll gilt eine Fluoreszenzquantenausbeute von  $\eta = 0.02-0.08$ . Die zelluläre Chlorophyllkonzentration (Molekulargewicht multipliziert mit dem zellulären Chlorophyllgehalt s.o.) beträgt  $c = 6,7 \cdot 10^{-15}$  mol. Multipliziert mit der Avogadrokonstante ergibt sich die Anzahl von Chlorophyllmolekülen pro Zelle bzw. pro Anregungsvolumen zu  $C \approx 4 \cdot 10^9$ .

Die detektierbaren Fluoreszenzphotonen  $p$  des zellulären Chlorophylls können demnach auf  $p = \Phi \cdot \eta \cdot C \cdot \sigma \cdot I = 6,8 \cdot 10^4$  bis  $2,7 \cdot 10^5$  Photonen/s abgeschätzt werden. Multipliziert mit der Quanteneffizienz des Photomultipliers (2 % @ 700 nm) stehen  $\approx 1500$  Photoelektronen/s nach der Photokathode zur Verfügung.

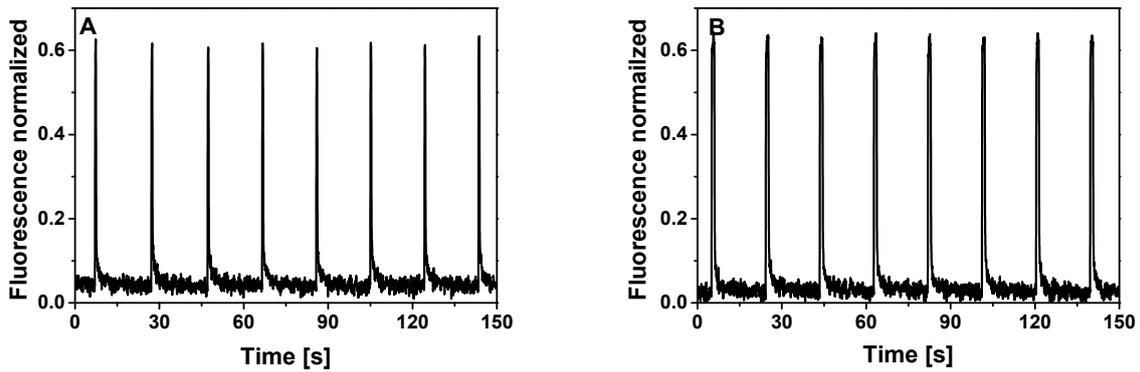
Der Dunkelstrom des verwendeten Photomultipliers beträgt bei Raumtemperatur 30 nA bzw. 600 cps. Zur Steigerung des Signal-zu-Rausch-Verhältnisses wurden Messverfahren wie das Lock-In- oder das Boxcar-Verfahren angewandt.

#### **A4 Effizienz des Photosystems II – Messung des Quotienten $F_v/F_m$ an der Wasserpflanze *Lysimachia nummularia***

Ziel der Messungen war es, bei veränderlichen Umgebungsbedingungen und während des Entwicklungszyklus an einzelnen lebenden *Chlamydomonas*-Zellen die Effizienz des PS II vergleichbar zu ermitteln. Da zunächst Messartefakte, hervorgerufen durch die Immobilisierung der *Chlamydomonas*-Zellen, nicht ausgeschlossen werden konnten, erfolgten Vorversuche im intakten Zellverbund von Blättern der Wasserpflanze *Lysimachia nummularia*. Durch Variation der Parameter und Apparatfunktionen der einzelnen Komponenten des Experiments konnten die besten Messbedingungen (Frequenz und Breite des Anregungsimpulses etc.) ermittelt werden. In weiteren Experimenten wurde die zeitliche Stabilität der Messapparatur überprüft. Dazu wurde über einen längeren Zeitraum ( $\approx 24$  h) die Entwicklung des Quotienten  $F_v/F_m$  gemessen und an zwei im Vorfeld unterschiedlich präparierten Pflanzen verfolgt. Die Ergebnisse zeigten, dass der apparative Aufbau mechanisch und elektronisch den Anforderungen einer Langzeitmessung genügt.

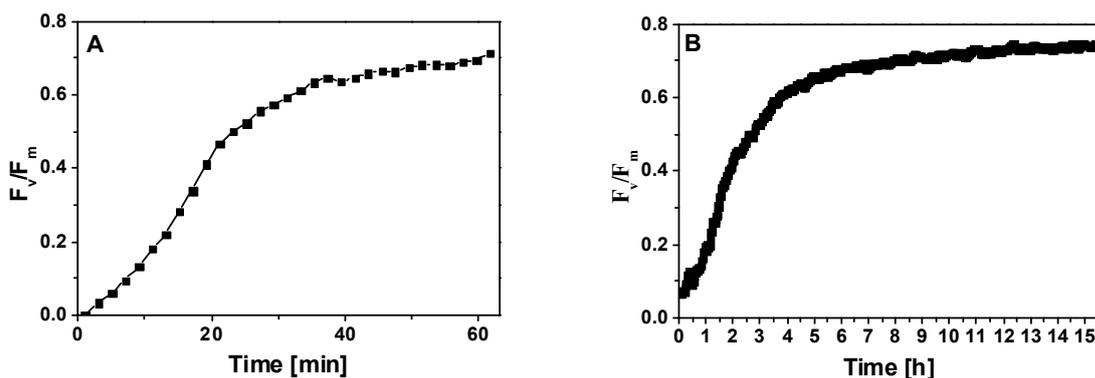
Vor der Messung ist die Pflanze etwa 4 h Tageslichtbedingungen ausgesetzt worden und wurde anschließend über einen Zeitraum von 30 min dunkeladaptiert. Die Präparation eines Blattes erfolgte zwischen zwei Deckgläschen in wässriger Umgebung. Das Blatt war weiterhin Bestandteil der intakten Pflanze.

Die Messungen erfolgten auf zellulärer Ebene, innerhalb eines kreisförmigen Areal mit dem Durchmesser von 20  $\mu\text{m}$ . Neben dem schwachen Anregungslicht, erfolgte alle 30 s die Anregung mit sättigenden Pulsen variabler Breite, um den maximalen Fluoreszenzwert  $F_m$  zu ermitteln. Die Ermittlung des variablen Fluoreszenzwertes  $F_v$  erfolgte unter Verwendung des über einen Zeitraum von 10 s vor dem Sättigungsimpuls gemittelten Basisfluoreszenzwerts  $F_0$ . Exemplarisch sind die Fluoreszenzmesswerte für die Pulsbreiten 0,6 s und 1 s des Sättigungsimpulses in Abb. 10 dargestellt. In beiden Fällen beträgt der ermittelte  $F_v/F_m$ -Wert  $\approx 0,62$ . Kürzere Pulsbreiten ergeben bei den verwendeten Abtastfrequenzen eine schlechtere Datenqualität. Längere Pulsbreiten führten hingegen zu keinen qualitativen Verbesserungen (Abb. 10, B). Daher wurde im Folgenden die Pulsbreite der sättigenden Pulse zu 0,6 s festgelegt.



**Abb. 10: Fluoreszenzsignale bei Messlicht und nach Anregung mit dem sättigenden Lichtpuls alle 30 s. Die Pulsbreite des sättigenden Pulses wurde zwischen A) 0,6 s und B) 1 s variiert, wobei keine quantitativen Unterschiede zu beobachten sind.**

In einem zweiten Experiment wurde die zeitliche Stabilität der Messapparatur überprüft. Einerseits wurde die Pflanze 1 verwendet, die über 4 h dem Sonnenlicht im August ausgesetzt war und andererseits die Pflanze 2, die zusätzlich zu den Bedingungen von Pflanze 1 für 60 s mit dem Licht einer Halogenlampe mit einer Intensität  $I = 0,57 \text{ W/cm}^2$  beleuchtet wurde. Vor Beginn jeder Messserie wurde jeweils ein Blatt nach einer Dunkeladaption von zehn Minuten in wässriger Umgebung in der Zellkulturkammer (MiniCeM) präpariert. Die Blätter waren nach wie vor Bestandteil der intakten Pflanze.

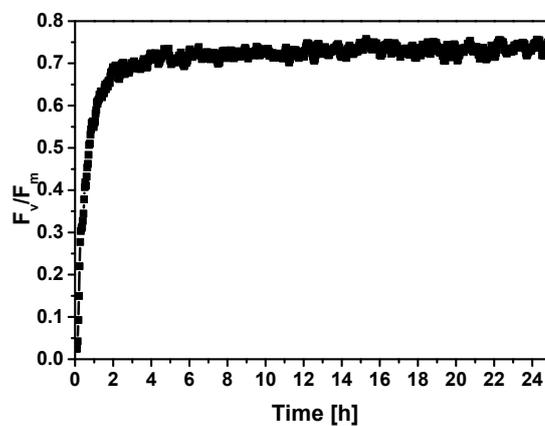


**Abb. 11: Zeitabhängiger  $F_v/F_m$ -Wert auf zellulärer Ebene an der Wasserpflanze *Lysimachia nummularia* nach variablen Startlichtbedingungen. A) Mittagssonne eines wolkenfreien Tages (9:00 - 13:00 Uhr) und B) zusätzliche Beleuchtung.  $F_v/F_m$  nähert sich hierbei asymptotisch dem Maximalwert von  $\approx 0,75$  an. Der halbe Wert wurde nach  $\approx 20$  min (A) bzw.  $\approx 2$  h (B) erreicht.**

In beiden Fällen ist nach Beginn der Messung eine asymptotische Annäherung an einen maximalen  $F_v/F_m$ -Wert von  $\approx 0,75$  zu beobachten (Abb. 11). Für den halben Wert benötigte Pflanze 1 eine Dauer von  $\approx 20$  min und Pflanze 2 eine Dauer von  $\approx 2$  h.

Da in einem Zeitraum von 15 h nach Beleuchtung mit intensivem Licht noch ein linearer Anstieg des  $F_v/F_m$ -Werts zu verzeichnen war, wurde der Messzeitraum erneut verlängert. Weiterhin wurde die Intensität der Beleuchtung vor Beginn der Messung um die Hälfte auf  $I = 0,29 \text{ W/cm}^2$  reduziert. Alle weiteren Messbedingungen blieben unverändert.

Wiederum wurde ein maximaler  $F_v/F_m$ -Wert von  $0,75$  erreicht, wobei der halbe Wert nun bereits nach  $\approx 1$  h erreicht wurde (Abb. 12). Nach  $\approx 15$  h war keine weitere Erhöhung des Werts mehr zu verzeichnen.



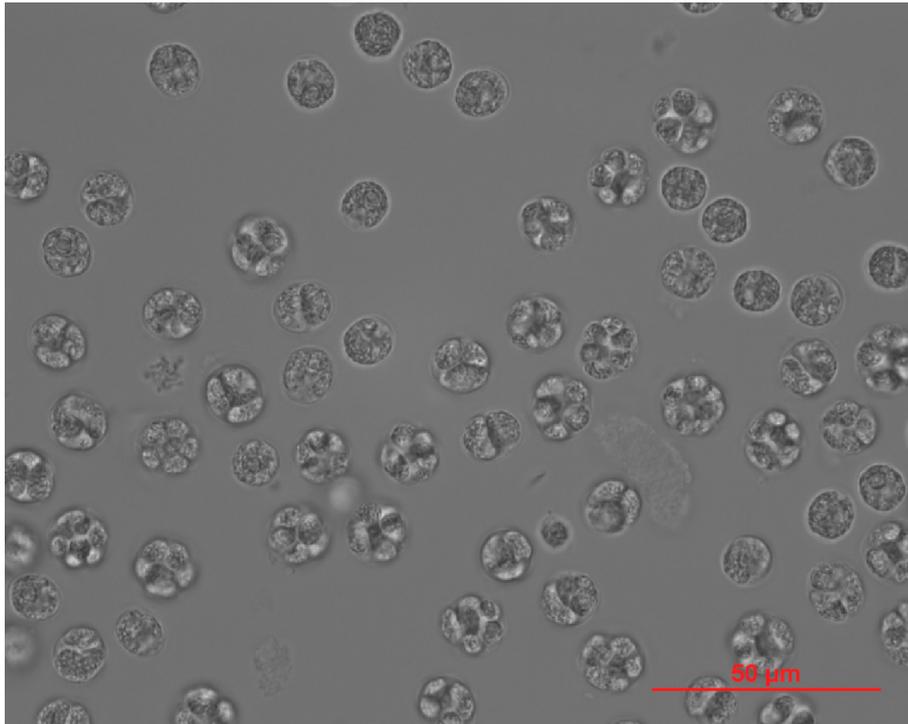
**Abb. 12:** Zeitabhängiger  $F_v/F_m$ -Wert auf zellulärer Ebene an der Wasserpflanze *Lysimachia nummularia*. **A)** Nach Beleuchtung mit  $I = 0,29 \text{ W/cm}^2$  zu Messbeginn. **B)** Zusätzliche Beleuchtung alle 9 h. Ein  $F_v/F_m$ -Wert von  $\approx 0,70$  wurde innerhalb von 4 h erreicht. Anschließend stieg dieser linear auf  $0,75$  an.

Unter Verwendung des apparativen Aufbaus konnte demonstriert werden, dass der Quotient  $F_v/F_m$  auf zellulärer Ebene zuverlässig über einen Zeitraum von mehreren Stunden gemessen werden konnte. Hierbei wurde festgestellt, dass die an der Pflanze gemessenen  $F_v/F_m$ -Werte sensitiv auf in der Vergangenheit liegende äußere Umweltfaktoren, wie den Einfluss der Lichtbedingungen, reagieren.

## A5 Validierung der Messmethode – Fitfunktion des axialen Intensitätsverlaufs der Mikrokugel

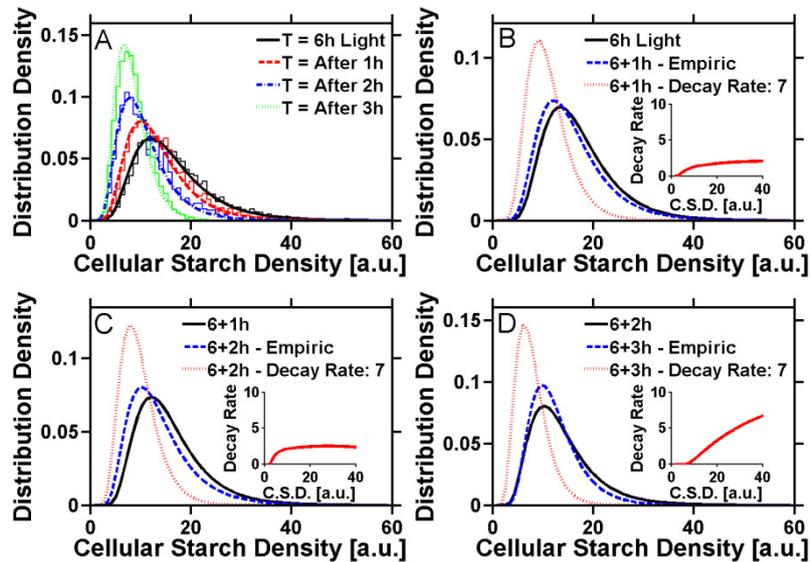
$$y = y_0 + A \sin^2\left(\pi \frac{x - x_c}{w}\right)$$

## A6 *Chlamydomonas*-Zellen in der Zellteilungsphase



**Abb. 13: *Chlamydomonas*-Zellen in der Zellteilungsphase.** In der Zellteilung sind die sich herausbildenden Tochterzellen miteinander verbunden. Nach Freisetzung sind die Zellen durch ein Ellipsoid beschreibbar.

## A7 Verteilungsfunktion der zellulären Stärkedichte einer *Chlamydomonas*-Suspension und Modellierung der Stärkeabbaurate – Stärkeabbau induziert durch Verdunkelung



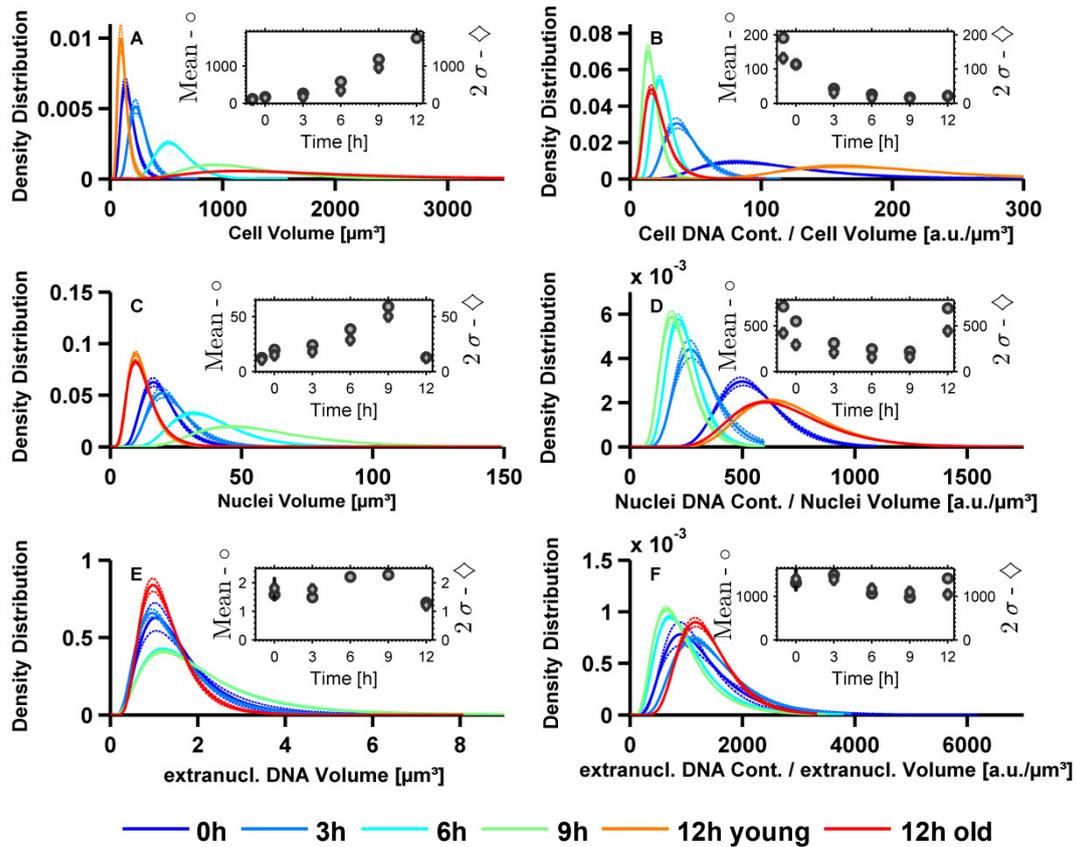
**Abb. 14: Wahrscheinlichkeitsdichtefunktion (PDF, kurz: Distribution Density) der zellulären Stärkedichte (CSD).** A) Zum Zellentwicklungsstand nach 6 h Belichtung und anschließender Verdunkelung wurde im Abstand von 1 h die PDF gemessen. Wie auch in Abb. 31 (Abschnitt 10.3) wird zu jedem Zeitpunkt eine Lognormalverteilung beobachtet, jedoch nehmen arithmetischer Mittelwert bzw. die Breite der PDF mit zunehmendem Stärkeabbau ab. **B–D)** Theoretische und empirische Analyse des Stärkeabbaus nach 1 h (B); 2 h (C) und 3 h (D). Im „Inlet“ ist die jeweilig berechnete Abbaurrate der Stärke zwischen zwei aufeinanderfolgenden Messzeitpunkten dargestellt. Schwarz: PDF der CSD zum Ausgangszeitpunkt; blau: PDF der CSD zum nachfolgenden Messzeitpunkt; rot: PDF der CSD unter der Annahme einer konstanten Abbaurate.

## A8 Quantifizierung des zellulären Stärkegehalts in Chloroplasten der Pflanze *Arabidopsis thaliana in-vitro*

	Value	-	+	Value	-	+
	Density Chloroplast WT			Density Chloroplast SEX1-8		
Mean	<b>0.3</b>	0.03	0.03	<b>1.5</b>	0.11	0.12
2 Sigma	<b>0.2</b>	0.04	0.07	<b>1.0</b>	0.19	0.26
	Density Granular WT			Density Granular SEX1-8		
Mean	<b>64.7</b>	4.3	4.9	<b>305.9</b>	15.1	16.6
2 Sigma	<b>73.0</b>	9.8	12.3	<b>322.1</b>	33.6	39.8
	Volume Chloroplast WT			Volume Chloroplast SEX1-8		
Mean	<b>6695.4</b>	749.8	954.0	<b>6676.8</b>	629.2	765.0
2 Sigma	<b>5674.2</b>	1401.9	2251.7	<b>6086.5</b>	1246.5	1808.9
	Volume Granular WT			Volume Granular SEX1-8		
Mean	<b>58.3</b>	5.8	6.9	<b>55.7</b>	4.3	4.9
2 Sigma	<b>96.9</b>	16.7	22.2	<b>90.4</b>	12.4	15.4

**Tabelle 3: Arithmetische Mittelwerte (Mean) bzw. Verteilungsbreiten (2 Sigma) der lognormalen Stärkedichteverteilungen von SEX1-8-Mutante und Wildtyp.** Neben den berechneten Werten („Value“, fett) ist jeweils der aus dem Vertrauensintervall (95 %) ermittelte Fehlerbereich (-, +) angegeben. Die SEX1-8-Mutante hat eine etwa fünfmal höhere Stärkekonzentration.

## A9 Quantifizierung des wachstumsabhängigen zellulären DNA-Gehalts von *Chlamydomonas*-Zellen



**Abb. 15: Wahrscheinlichkeitsdichteverteilung (PDF, kurz: Distribution Density) verschiedener zellulärer Parameter zu den Messzeitpunkten 0 h (lila), 3 h (blau), 6 h (hellblau), 9 h (grün) 12 h freigesetzte Tochterzellen (orange) und 12 h Mutterzellen (rot). A) Zellvolumen B) zelluläre DNA-Dichte berechnet aus dem Quotienten von zellulärer DNA-Konzentration und Zellvolumen. C) Nuclei-Volumina D) Nuclei-Dichte E) Volumina der extranucleären DNA. F) extranucleäre DNA-Dichte. Alle aufgeführten zellulären Parameter sind im Ensemble lognormalverteilt. Im „Inlet“ sind jeweils die arithmetischen Mittelwerte (Kreise) und als Maß für die Breite der Verteilung die zweifache Standardabweichung ( $2\sigma$ , Diamanten) abgebildet. Die Volumina nehmen im Wachstum schneller zu als die DNA-Konzentration (d.h., die zelluläre DNA-Dichte nimmt ab). Die Subpopulation der Tochterzellen (12 h) wurde in Position -1 h aufgeführt.**



## **Selbständigkeitserklärung**

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorgelegte Dissertation „Nichtlineare Mikroskopie und Bild-datenverarbeitung zur biochemischen Analyse synchronisierter *Chlamydomonas*-Zellen“ selbständig erarbeitet und verfasst habe und alle Hilfsmittel und Hilfen angegeben habe.

Ich erkläre, dass ich mich nicht für einen Doktorgrad anderwärts beworben habe und auch einen dementsprechenden Doktorgrad nicht besitze.

Des Weiteren erkläre ich, dass ich von der zugrunde liegenden Promotionsordnung Kenntnis genommen habe.

Andreas Garz, Potsdam, den 03.03.2013



## **Danksagung**

Mein Dank gilt allen Personen, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben. Insbesondere möchte ich den Herren Prof. Steup und Prof. Menzel für die Überlassung dieser interessanten Thematik recht herzlich danken. Herr Menzel sei überdies für die Bereitstellung der modernen und vielfältigen Laborausstattung gedankt. Insbesondere danke ich Herrn Steup für die umfangreiche wissenschaftliche Begleitung der Promotion.

Großer Dank gilt den Kollegen aus der Biochemie, welche für die Bereitstellung des Probenmaterials sorgten und ohne deren Mitwirken diese Arbeit nicht möglich gewesen wäre. Vor allem waren dies Dr. habil. Jörg Fettke, Dr. Mahdi Hejazi, Stefanie Schönfelder, Michael Sandmann und Irina Malinova. Weiterer Dank gebührt Herrn Dr. Angelo Valleriani und Michael Rading vom Max-Planck-Institut für Kolloid und Grenzflächenforschung für fruchtbare Gespräche bezüglich der Aspekte der Biosystemmodellierung. Herr Prof. Beta danke ich für die Bereitstellung der Mikrofluidik.

Zu ganz besonderem Dank bin ich Herrn Dr. Voigt verpflichtet; aufgrund von zahlreichen zielführenden Diskussionen mit ihm konnte dieses Manuskript eine enorme Qualitätssteigerung erfahren.