

Aus dem Bereich Theoretische Medizin und Biowissenschaften
der Medizinischen Fakultät
der UNIVERSITÄT DES SAARLANDES, Homburg/Saar

Lineare und nichtlineare optische Methoden zur Charakterisierung physiologischer Parameter in gesunden und pathologischen Zellen

Dissertation zur Erlangung des Grades eines Doktors der Naturwissenschaften
der medizinischen Fakultät
der UNIVERSITÄT DES SAARLANDES
20. Januar 2014

vorgelegt von: Benjamin Sauer
geb. am: 06.02.1980 in Saarbrücken

From the Field of Theoretical Medicine and Lifesciences
of the Medical Faculty
of SAARLAND UNIVERSITY, Homburg/Saar

Linear und nonlinear optical methods
for the characterization of
physiological parameters in healthy
and pathological cells

Dissertation for obtaining the grade of a Doctor of Natural Sciences
by the Medical Faculty
of SAARLAND UNIVERSITY
20. Januar 2014

presented by: Benjamin Sauer
born: 02/06/1980 in Saarbrücken

Erklärung gemäß §7 Abs. 1 Nr. 4

Hiermit erkläre ich, Benjamin Sauer, an Eides statt, dass ich die vorliegende Arbeit ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Die aus anderen Quellen direkt oder indirekt übernommenen Daten und Konzepte sind unter Angabe der Quelle gekennzeichnet.

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

Die Arbeit wurde bisher weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form in einem Verfahren zur Erlangung des Doktorgrades einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

Ich versichere an Eides statt, dass ich nach besten Wissen die Wahrheit gesagt und nichts verschwiegen habe.

Vor Aufnahme der vorstehenden Versicherung an Eides statt wurde ich über die Bedeutung einer eidesstattlichen Versicherung und die strafrechtlichen Folgen einer unrichtigen oder unvollständigen eidestattlichen Versicherung belehrt.

Homburg 20. Januar 2014



Benjamin Sauer

Unterschrift der die Versicherung an Eides statt aufnehmenden Beamtin bzw. des aufnehmenden Beamten

Inhaltsverzeichnis

Selbständigkeitserklärung	I
Inhaltsverzeichnis	II
Abbildungsverzeichnis	V
Tabellenverzeichnis	VIII
Abkürzungsverzeichnis	IX
1 Einleitung	1
1.1 Kalziumhomöostase	1
1.1.1 Natrium-Kalzium-Austauscher	3
1.1.2 SERCA-Pumpe	4
1.1.3 Natrium-Kalium-ATPase	4
1.1.4 Aldosteron	5
1.1.5 G-Protein gekoppelte Rezeptoren	5
1.2 Ein- und Zwei-Photonen-Photolyse von Käfigsubstanzen . .	7
1.2.1 Theorie	7
1.2.2 Anwendung der Zwei-Photonen-Photolyse in der Biologie	10
1.3 Fluoreszenzlebensdauer-Bildgebung	11
2 Material und Methoden	15
2.1 Kalziumhomöostase in murinen ventrikulären Kardiomyozyten unter dem Einfluss eines Hyperaldosteronismus in $G\alpha_q$ -/ $G\alpha_{11}$ - <i>knock-out</i> (KO)-Mäusen	15
2.1.1 Genetisch veränderte Tiere und osmotische Minipumpe	15
2.1.2 Schnelle Videobildgebung	16
2.1.3 Verwendete Materialien	17
2.1.4 Verwendete Software	17
2.1.5 Verwendete Chemikalien	17
2.1.6 Versuchsaufbau und Durchführung	18

2.1.7	Computergestützte Datenauswertung	19
2.2	Frequenzvariable Photolyse von Käfigsubstanzen mittels Zwei-Photonen-Absorption	21
2.2.1	Verwendete Materialien	21
2.2.2	Verwendete Software	22
2.2.3	Verwendete Chemikalien	22
2.2.4	Aufbau des Zwei-Photonen-Systems zur Photolyse	25
2.2.5	Optimierung der Zwei-Photonen-Photolyse	27
2.2.6	Justage des Zwei-Photonen-Photolyse-Aufbaus	30
2.2.7	Versuchsprotokolle zur Zwei-Photonen-Photolyse	33
2.2.8	Simulation der frequenzvariablen Zwei-Photonen-Photolyse	36
2.3	Fluoreszenzlebensdauer-Bildgebung	41
2.3.1	Verwendete Materialien	41
2.3.2	Verwendete Software	41
2.3.3	Verwendete Chemikalien	42
2.3.4	Aufbau des FLIM-Systems	46
2.3.5	Regression der Fluoreszenzlebensdauerkurven	51
2.3.6	Ca ²⁺ Messungen in Erythrozyten mittels FLIM	52
3	Ergebnisse	54
3.1	Kalziumhomöostase	54
3.1.1	Änderungen der Kalziumtransientenamplitude in isolierten ventrikulären Kardiomyozyten	55
3.1.2	CTD80-Zeit Änderungen	58
3.1.3	Änderungen der basalen Kalziumkonzentration	59
3.2	Zwei-Photonen-Photolyse	61
3.2.1	Ergebnisse der Simulationen	61
3.2.2	Justage des Systems	69
3.2.3	Messungen zur Parfokalität	71
3.2.4	Sättigung der Fluoreszenz	72
3.2.5	Zellschädigung in Abhängigkeit von der Laserpulsrate	73
3.2.6	Einfluss der Laserpulsrate auf die Photolyse	75
3.2.7	Photolyse mittels definierter Laserpulszahl	77
3.2.8	Zwei-Photonen-Photolyse von DM-Nitrophen in permeabilisierten ventrikulären Kardiomyozyten	81
3.3	Fluoreszenzlebensdauer-Bildgebung	84
3.3.1	Validierung des Systems	84
3.3.2	Reevaluierung der Kalziumindikatoren	90

4	Diskussion	97
4.1	Kalziumhomöostase	97
4.1.1	Änderungen der Kalziumtransientenamplitude in isolierten ventrikulären Kardiomyozyten	97
4.1.2	Änderungen der CTD80-Zeit in isolierten ventrikulären Kardiomyozyten	99
4.1.3	Änderungen der basalen Kalziumkonzentration in ventrikulären Kardiomyozyten	102
4.2	Zwei-Photonen-Photolyse	103
4.2.1	Simulation	103
4.2.2	Kritische Bestandteile für die Justage des Zwei-Photonen-Photolyse-Aufbaus	107
4.2.3	Messungen zur Parfokalität	107
4.2.4	Zellschädigung in Abhängigkeit von der Laserpulsrate	108
4.2.5	Einfluss der Laserpulsrate auf die Photolyse	109
4.2.6	Photolyse mittels definierter Zahl an Laserpulsen	110
4.3	Fluoreszenzlebensdauer-Messungen	111
4.3.1	Justage	111
4.3.2	Fluoreszenzlebensdauern von Fura Red TM bei definierten Kalziumkonzentrationen	113
4.3.3	Reevaluierung der Kalziumindikatoren	113
4.3.4	Zusammenfassung und Ausblick	116
A	Quellcode der Simulation	119
B	Steuerbefehle der DSC	134
	Literaturverzeichnis	139

Abbildungsverzeichnis

1.1	Kalziumzyklus in einer ventrikulären Herzmuskelzelle	2
1.2	Aktionspotential bei humanen ventrikulären Herzzellen	3
1.3	Signalwege des $G\alpha_q$ -Protein-gekoppelten Rezeptors	6
1.4	Aktivierung/Deaktivierung des G-Proteins	7
1.5	Vergleich von Ein- und Zwei-Photonen-angeregter Fluoreszenz	8
2.1	Spektren von Fura-2	18
2.2	Schema schnelle Videobildgebung	19
2.3	Berechnung der Kalziumtransienten	20
2.4	Spektren von Fluo 4 und MitoTracker®Red FM	23
2.5	Spektren von Texas Red	25
2.6	Schematische Darstellung des Setups	26
2.7	Skizze der Arbeitsweise der VisiTech Infinity 4	27
2.8	Phasen während der Bildaufnahme an der Infinity 4	28
2.9	Schaltplan für Dividierer	30
2.10	Diffusion und Zerfall der angeregten Käfigsubstanz bei unterschiedlichen Pulsraten	37
2.11	Spektren von Rose Bengal und Cumarin 6	42
2.12	Spektren von Calcium Green TM und Oregon Green® 488 BAPTA 2	43
2.13	Spektren von Calcium Orange TM und Calcium Crimson TM	44
2.14	Spektren von Fura Red TM	44
2.15	Spektren von Asante Calcium Red	45
2.16	Plan von TILL-Photonics für das Polytrope II System	47
2.17	Platine der Polytrope II Galvanometer-Steuereinheit	48
2.18	Modifizierter Plan des Polytrope II Systems	49
2.19	Ablaufschema FLIM	50
3.1	Kalziumtransienten Wildtyp	54
3.2	Kalziumtransienten $G\alpha_q$ -KO und $G\alpha_{11}$ -KO	55
3.3	Kalziumtransienten Doppel-KO	56
3.4	Statistische Analyse der Kalziumtransientenamplituden	57

3.5	Statistische Analyse der CTD80-Zeiten	58
3.6	Statistische Analyse der basalen Kalziumkonzentration . . .	59
3.7	Simulation der Photolyse von DMNP 15 ms	61
3.8	Analyse Photolysesimulation von DMNP und NDBF-EGTA	62
3.9	Simulationen Photolyse von DMNP 15 ms	63
3.10	Simulationen Photolyse von NDBF-EGTA 15 ms	64
3.11	Simulation der Photolyse mit 1000 Laserpulsen 90 MHz . . .	65
3.12	Simulationen der Photolyse von DMNP mit 1000 Laserpulsen 6 MHz und 4,5 MHz	66
3.13	Simulation der Photolyse von NDBF-EGTA mit 1000 Laser- pulsen 90 MHz	67
3.14	Simulationen der Photolyse von NDBF-EGTA mit 1000 La- serpulsen 6 MHz und 4,5 MHz	68
3.15	Alte Konfiguration Zwei-Photonen-Photolyse Setup	69
3.16	Scan über Grenzfläche	71
3.17	Ermittelte Fokusgrößen	72
3.18	Schlüsselexperiment	72
3.19	Schaden durch 45 mW Laserleistung bei 90 MHz	74
3.20	Versuche zu Deformationen in HEK-Zellen	74
3.21	Versuche mit MitoTracker®Red FM	75
3.22	Photolyse von NPE-caged HPTS in HEK-Zellen	76
3.23	Vergleich der Freisetzung von HPTS bei 90 MHz mit 1,1 MHz	76
3.24	Vergleich mechanisches Verschlussystem und Pulspicker . .	77
3.25	Vollständige Photolyse von CMNB-caged Fluoreszein im Fokus	78
3.26	Zwei-Photonen-Photolyse ohne TPEF-Artefakt	79
3.27	Einfluss der Pulszahl auf die Zwei-Photonen-Photolyse . . .	80
3.28	Photolyse mit definierten Laserpulszahlen in Herzmuskelzellen	80
3.29	Sättigung und Konzentrationen von DMNP	83
3.30	Messungen der Instrumentenfunktionen	85
3.31	Fluoreszenzlebensdauer von Fluoreszein	86
3.32	Fluoreszenzlebensdauer von Cumarin 6	86
3.33	Spektren von Hämoglobin	87
3.34	Messungen der Kalibrierungslösungen	87
3.35	Fura Red TM Kalibrierung	88
3.36	Fura Red TM Fluoreszenzlebensdauer in Erythrozyten	89
3.37	Fluoreszenzlebensdauer von Fluo-8	91
3.38	Fluoreszenzlebensdauer von Calcium Green TM	92
3.39	Fluoreszenzlebensdauer von Oregon Green®488 BAPTA 2 .	93
3.40	Fluoreszenzlebensdauer von Calcium Orange TM	94
3.41	Fluoreszenzlebensdauer von Fura Red TM	95
3.42	Fluoreszenzlebensdauer von Asante Calcium Red	96

4.1	Limitierende Raten bei der Freisetzung	105
-----	--	-----

Tabellenverzeichnis

2.1	Kennwerte des Chameleon XR	26
2.2	Parameter der Stoffe in den Simulationen	40
3.1	Kalziumkonzentrationen in IC Lösungen	83
4.1	Vergleich Simulation mit simplifizierter Rechnung	104

Abkürzungsverzeichnis

AM	Acetoxymethylester
APD	Avalanche-Photodiode
AOM	<i>acusto optical modulator</i>
AOTF	<i>acusto optical tunable filter</i>
ATP	Adenosintriphosphat
BAPTA	1,2-Bis(O-Aminophenoxy)ethan-N,N,N',N'- Tetraessigsäure
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat
CTD80	<i>calcium transient duration 80</i> : Zeit, die benötigt wird, um 80% des eingeströmten Kalziums wieder zu entfernen
DAG	1,2-Diacylglycerine
CCD	<i>charge-coupled device</i>
CICR	<i>calcium induced calcium release</i>
CMNB	bis-(5-Carboxymethoxy-2-Nitrobenzyl)
DMNP	DM-Nitrophen
DMSO	Dimethylsulfoxid
DSC	<i>digital to serial converter</i>
EGTA	Ethylenglykol-Bis(aminoethylether)-N,N,N',N'- -Tetraessigsäure
EMCCD	Elektronen-multiplizierende CCD

ER	endoplasmatisches Retikulum
FLIM	<i>fluorescence-lifetime imaging microscopy</i>
FRAP	<i>fluorescence recovery after photobleaching</i>
GDP	Guanosindiphosphat
GTP	Guanosintriphosphat
GTPase	Guanosintriphosphatase
GPCR	<i>g-protein coupled receptor</i>
G-Protein	Guaninnucleotid-bindendes Protein
HEK	<i>human embryonic kidney</i>
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-Piperazinyl)-Ethansulfonsäure
HPTS	8-Hydroxy-1,3,6-Pyrentrisulfonsäuretrinitriumsalz
IC	<i>intra cellular</i>
ICU	<i>imaging control unit</i>
IP₃	Inositol-1,4,5-trisphosphat
IR	Infrarot
IRF	<i>instrument response function</i>
K_d	Dissoziationskonstante
KO	<i>knock-out</i>
LP	Lang-Pass
M	mol/l
MEM	Minimum Essential Medium
MHC	<i>myosin heavy chain</i>
N.A.	numerische Apertur
Na⁺/K⁺-ATPase	Natrium-Kalium-ATPase
NCX	Natrium-Kalzium-Austauscher

NDBF	Nitrodibenzofuran
NPE	8-1-(2-Nitrophenyl)Ethylester
PIP₂	Phosphatidyl-Inositol 4,5-Bisphosphat
PLB	Phospholamban
PLC	Phospholipase C
PKC	Proteinkinase C
PMT	Photomultiplizierer
PSF	<i>point spread function</i>
ROI	<i>region of interest</i>
RyR	Ryanodin-Rezeptor
SCU	<i>scan control unit</i>
SP	Kurz-Pass
SERCA	<i>sarkoplasmic endoplasmic reticulum calcium ATPase</i>
SPU	<i>scan power unit</i>
SR	sarkoplasmatisches Retikulum
TCSPC	<i>time correlated single photon counting</i>
TIRF	<i>total internal reflection fluorescence microscopy</i>
TiSa	Titan:Saphir
TTL	Transistor-Transistor-Logik
TPEF	<i>two-photon excited fluorescence</i>
UV	Ultraviolett

Zusammenfassung

In der biomedizinischen Forschung stellen Mikroskope schon seit langem ein unverzichtbares Werkzeug dar. Seit den Optiken des niederländischen Tuchhändlers Antoni van Leeuwenhoek (1632-1723 n. Chr.) haben sich diese technischen Hilfsmittel enorm weiterentwickelt. Für diese Arbeit wurden drei fortschrittliche optische Methoden zur Messung und Kontrolle des ubiquitären sekundären Botenstoffs Kalzium in Zellen verwendet, mit dem Ziel diese im Spektrum der Methodiken zu etablieren.

Die Applikation der Methode der schnellen Videobildgebung wurde durch die hohe Prävalenz von Herzpathologien in der westlichen Gesellschaft motiviert. Der Tod in Folge einer Herzerkrankungen ist die verbreitetste natürliche Todesursache in Deutschland und vielen anderen westlichen Ländern. Bluthochdruck ist eine der Hauptursachen von Hypertrophie und einer damit einhergehenden erhöhten Mortalität in jedem Alter. Trotz steigender Erfolge bei der Behandlung von Hypertrophie und deren Folgeerkrankungen bleibt der exakte Zusammenhang zwischen einer Störung des Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems und einer Hypertrophie unklar. In diesem Zusammenhang könnten die Guaninnucleotid-bindenden Proteine und deren Untereinheiten eine entscheidende Rolle bei der Weiterleitung oder Modulierung der Effekte des Renin-Angiotensin-Aldosteron System im Herzen spielen. Zielsetzung des ersten Teils meiner Arbeit war es, den Zusammenhang zwischen einem Hyperaldosteronismus und der Kalziumhomöostase in Kardiomyozyten von genetisch veränderten Mäusen zu untersuchen. Um einen Hyperaldosteronismus zu verursachen, wurden den Tieren osmotische Minipumpen mit Aldosteron implantiert. Aufgrund der rapiden Prozesse bei der Kalziumhomöostase in Kardiomyozyten, wurde die schnelle Videobildgebung zur Untersuchung der Veränderungen im intrazellulären Kalziumtransport verwendet.

Das wichtigste Ergebnis dieser Studie war, dass eine Hyperaldosteronismus den intrazellulären Kalziumtransport in murinen ventrikulären Myozyten moduliert. Des Weiteren war dies der erste Hinweis darauf, dass möglicherweise die $G\alpha_q/G\alpha_{11}$ -Proteine diese Reaktion zumindest teilweise vermitteln. Von Interesse war hierbei, dass der knock-out von $G\alpha_q$ und $G\alpha_{11}$ verschiedene Aspekte der genomischen Reaktion aufheben, was unterschiedliche Rollen der Proteine nahelegt.

Verknüpft mit der Messung von Kalzium in Kardiomyozyten war auch das Ziel des zweiten Abschnittes dieser Arbeit, der Etablierung eines Aufbaus zur Zwei-Photonen-Photolyse einer Kalzium-bindenden Käfigsubstanz. Die Zwei-Photonen-Photolyse kam zum Einsatz, da sie die beugungsbegrenzte Photolyse und damit die subzelluläre Kontrolle der Kalziumkonzentration

ermöglichte. Dabei wurde die Laserpulsrate moduliert, um die Effizienz der Kalziumfreisetzung zu optimieren. Miteinbegriffen in den Aufbau war ein Linienabtaster, der die Steuerung des Photolyselasers im Sichtbereich ermöglichte, um zum Beispiel Ryanodin-Rezeptoren in einer Zelle zu kartographieren.

Zum ersten Mal wurde zudem eine numerische Simulation implementiert, die den Einfluss der Laserpulsrate auf die Kalziumfreisetzung untersuchte. Mit Hilfe der Simulationen konnte gezeigt werden, dass die Laserpulsrate an die intrinsischen Parameter einer Käfigsubstanz, wie Zwei-Photonen-Absorptionsquerschnitt und Umwandlungsrate, angepasst werden kann, um die Freisetzung zu optimieren. Des Weiteren deuteten die Simulationen darauf hin, dass die Laserpulsrate nicht nur die freigesetzte Kalziummenge beeinflusste, sondern auch deren räumliche Verteilung. Die Ergebnisse der Simulation legen zudem nahe, dass eine Kartographierung von Kalziumrezeptoren mit einer Submikrometer-Auflösung nur mit Submillisekundenlangen Laserpulszügen möglich sein könnte. Es wurde in der Folge ein System entwickelt, welches in der Lage war mittels definierter Laserpulszahlen zu photolysieren. Dieses System konnte mit nur wenigen Mikrosekundenlangen Laserpulszügen Kalzium aus DM-Nitrophen freisetzen und dieses mit Fluo 4 detektieren. Eine experimentelle Untersuchung zur Photoschädigung von Zellen, unter Variation der Laserpulsrate, ergab, dass die Hauptursache von Zellschäden in der Zwei-Photonen-Absorption und nicht in der Ein-Photonen-Absorption lag.

Das letzte Teilprojekt dieser Arbeit war darauf ausgerichtet, die Methode der Kalziumkonzentrationsmessungen mit Hilfe der Fluoreszenzlebensdauer zu etablieren und diese auf rote Blutkörperchen anzuwenden. Kalzium vermittelt zum Beispiel das Schrumpfen der Erythrozyten, wenn sich diese durch Kapillare bewegen. Kalzium wird aber auch für pathologisches Verhalten, wie die Sichelzellenanämie, verantwortlich gemacht. Die freie Kalziumkonzentration in Zellen wird häufig über die Fluoreszenzintensität von ratiometrischen Kalziumindikatoren (wie zum Beispiel Fura-2) gemessen. Die hohe Konzentration des Hämoglobins in den Erythrozyten stört diese Intensitätsbasierten Messungen jedoch. Die Fluoreszenzlebensdauer von Kalziumindikatoren kann auch verwendet werden, um die absolute Kalziumkonzentration zu bestimmen.

Dazu wurde ein Fluoreszenzlebensdauer-Bildgebungssystem etabliert. Mit diesem wurde der Einfluss der Kalziumkonzentration auf die Fluoreszenzlebensdauer verschiedener Kalziumindikatoren in Erythrozyten untersucht. Einige Kalziumindikatoren erwiesen sich als geeignet für weitere Messungen. Die Messung der Fluoreszenzlebensdauer von Fura RedTM ergab, dass sich der K_d von Fura RedTM für Kalzium in Erythrozyten stark von dem K_d in *in vitro* unterschied.

Summary

Microscopes are an essential tool in life-sciences. From the simple optics made by Antoni van Leeuwenhoek (1632-1723 AD) these technical utilities developed enormously. In this dissertation three advanced optical methods to measure and control the ubiquitous second messenger calcium in cells were applied with the goal to establish them in the spectrum of methodologies.

The application of the first method was motivated by the high prevalence of cardiac pathologies in western civilization. Death caused by heart diseases are still the major cause of death in Germany and other western countries. Hypertension is one of the main causes for hypertrophy and by this of increased mortality at every age. Despite the advances in the treatment of hypertension and its subsequent diseases, the precise relationship of disturbances in the renine-angiotensine-aldosterone system and hypertrophy still remains unclear. In this context the guaninucleotide-binding proteins and their subunits might play an important role in conducting or modulating the effects of the renine-angiotensine-aldosterone systems in the heart. The goal of the first part of this work was, to investigate the relationship between hyperaldosteronism and calcium-homeostasis in cardiomyocytes of genetically modified mice. To induce hyperaldosteronism osmotic mini-pumps with aldosterone were implanted into mice. Fast video imaging was chosen to investigate the changes in the rapid processes of intracellular calcium handling. The major finding of this study was that indeed hyperaldosteronism modulated intracellular calcium handling in mouse ventricular myocytes. Furthermore it was the first evidence, that $G\alpha_q/G\alpha_{11}$ -proteins might mediate this response, at least partially. Interestingly knock-out of $G\alpha_q$ and $G\alpha_{11}$ abrogated different aspects of the genomic response, strongly indicating different roles for these proteins. Linked to the measurement of intracellular calcium was also the goal of the second part of the work, which was to establish a setup for two-photon-photolysis of caged calcium. Two-photon-photolysis was set-up, because it allows diffraction limited photolysis of caged-compounds to control calcium concentration on a subcellular level. The pulse-rate of the photolysis-laser was modulated with a pulse-picker to investigate how laser-pulse-rate effects the efficiency of release of calcium by two-photon-photolysis. Additionally the setup comprised a laser-scan-head to steer the photolysis-laser across the field of view in order to for example map ryanodine-receptors

In order to further analyze the impact of modulated laser-pulse-rate on the photolysis-rate, a numerical parameterization was implemented. The simulations showed that laser-pulse-rate can be adapted to the intrinsic parameters of a caged-compound in order to optimize the release. Furthermore the simulations suggested, that laser-pulse-rates not only modulate the amount of

released calcium but also the spatial distribution. Moreover the simulation indicated, that a sub-micro-meter resolution, for the mapping of calcium receptors, might need sub-micro-second photolysis times in order to limit the diffusion.

In addition a photolysis-system was developed which uses defined numbers of laser-pulses to photolyse. With this sub-milli-second release and fast detection of calcium from the chelator DM-Nitrophen was successfully realized. Modulated laser-pulse-rates were used in experimental investigation of photo-damage. The results denote that cell damage is mainly attributed to two-photon absorption not one-photon-absorption. The last project of this work was focused on establishing fluorescence-lifetime-imaging as a method to measure the calcium concentration and to apply this method on red blood-cells. Calcium mediates the shrinking of erythrocytes when they pass capillary vessels. Calcium is also discussed to be responsible for the pathological behavior of erythrocytes, such as sickle-cell disease. Free calcium-concentration is often measured with fluorescence-intensity based ratiometric indicators like Fura-2. The high concentration of hemoglobin in erythrocytes hinders these measurements. Fluorescence-lifetime measurements can help to circumvent these limitations, since they do not depend on the fluorescence intensity.

Therefore a fluorescence-lifetime imaging system was established. With this the influence of calcium-concentration on the fluorescence-lifetime of several calcium dyes in erythrocytes was measured. Some of the indicators revealed to be eligible for further research. Additionally the fluorescence-lifetime measurements of Fura RedTM gave hints that the K_d of Fura RedTM for calcium in erythrocytes is massively different from the K_d *in vitro*.

Kapitel 1

Einleitung

1.1 Kalziumhomöostase

Kalziumhomöostase bedeutet die aktive Aufrechterhaltung eines dynamischen Gleichgewichts der Kalziumkonzentration in einem biologischen System, hier einer Herzmuskelzelle. Kalzium ist in Muskelzellen der Vermittler des elektrischen Signals der Nerven zur Kontraktion des Muskels. Der Herzschlag kann sich innerhalb kürzester Zeit plötzlichen körperlichen Belastungen anpassen und durch körperliches Training, über einen längeren Zeitraum, verändert werden [65]. Das Herz muss dabei nicht nur auf den Sauerstoffbedarf des Körpers reagieren, sondern auch auf andere Gegebenheiten, wie zum Beispiel den Blutdruck. Das Herz besteht aus den rechten und linken Vorhofkammern (Atrien) sowie der rechten und linken Hauptkammer (Ventrikel). Das Herz pumpt das Blut sowohl durch den kleinen Kreislauf, d.h. von der rechten Hauptkammer in die Lungenarterien, als auch durch den großen Kreislauf, von der linken Hauptkammer in die Aorta. Während der Vorhofsystole kontrahieren die Atrien und drücken das Blut durch die Segelklappen in die sich entspannenden Hauptkammern. Wenn nun die Ventrikel kontrahieren (Kammersystole), wird das Blut in die Arterien gepumpt. Gleichzeitig werden die Vorhofkammern passiv wieder mit Blut befüllt. Der Herzzyklus beginnt danach von neuem.

Der primäre Impulsgeber des Herzens ist der Sinusknoten am Übergang vom rechten Vorhof zur Vena cava superior. Von dort ausgehend sorgt ein elektrischer Impuls, der durch das Atrium nach unten über den atrioventrikulären Knoten und durch die Purkinje-Fasern geleitet wird, für eine geordnete Kontraktion. Die Ionen, die für diese Erregung verantwortlich sind, bewegen sich durch die Zellen über die sogenannten Gap-Junctions, winzige Poren gebildet aus Membranproteinen aneinanderliegender Zellen.

Das elektrische Signal wird durch die Erregungs-Kontraktions-Kopplung in eine mechanische Bewegung, die Kontraktion der Zelle, umgesetzt [14]. Das

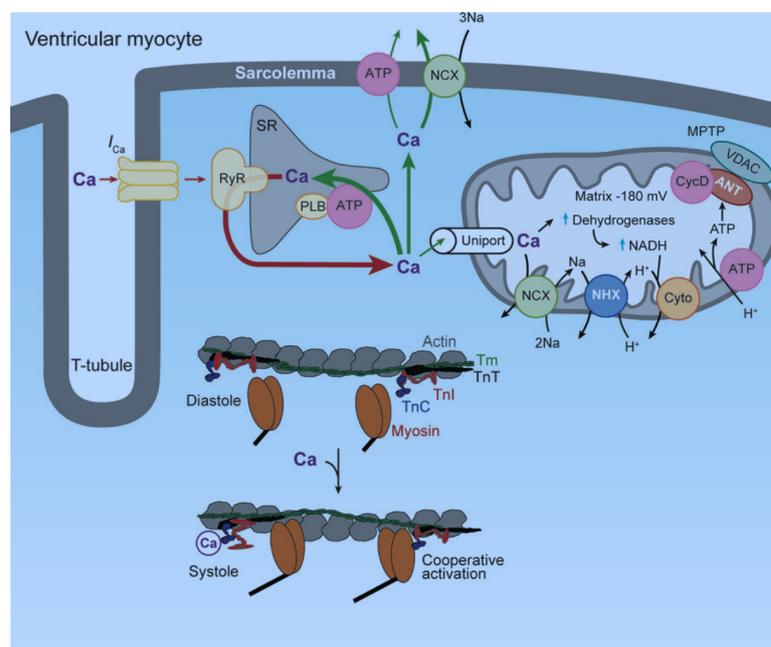


Abbildung 1.1: Kalziumzyklus in der Herzmuskelzelle; durch die L-Typ Kalziumkanäle strömt nach der Depolarisation der Zelle Kalzium aus dem extrazellulären Raum in die Zelle ein. Dies löst an den RyR eine massive Kalziumfreisetzung aus dem SR aus. Dadurch können die Myosinköpfe an die Aktinfilamente koppeln, wodurch es zur Kontraktion kommt. Die NCX sorgen für den Kalziumtransport durch die Zellmembran und die SERCA transportieren das Kalzium zurück in das SR. Am Ende dieses Zyklus ist das Membranpotential wiederhergestellt und die Zelle bereit für eine erneute Kontraktion (Grafik aus [15])

Potential der Zelle gegenüber der extrazellulären Umgebung wird durch den elektrischen Impuls gestört. Die L-Typ Kalziumkanäle reagieren auf diese Störung, indem sie Kalzium in das Zytoplasma einströmen lassen (siehe hierzu Abbildung 1.1). Diese einströmenden Kalziumionen sind für die Kalziumgesteuerte Kalziumfreisetzung (*calcium induced calcium release (CICR)*) aus dem sarkoplasmatischen Retikulum (SR) durch die Ryanodin-Rezeptoren (RyR) verantwortlich. Hierdurch steigt die Kalziumkonzentration im Zytoplasma von ca. 100 nm auf über $1 \mu\text{M}$. Die stark gestiegene Konzentration der Kalziumionen bewirkt, dass Kalzium an das Protein Troponin C bindet. Hierdurch können die Myosinköpfe an die Aktinfilamente ankoppeln, wodurch in der Folge eine Zellkontraktion stattfindet. Durch die hohe Kalziumkonzentration werden zudem die L-Typ Kalziumkanäle deaktiviert und ein weiterer Einstrom von Kalzium aus dem extrazellulären Raum verhindert. Das im Zytoplasma vorhandene Kalzium wird hauptsächlich durch die *sarkoplasmic endoplasmic reticulum calcium ATPases (SERCAs)* und die Natrium-Kalzium-Austauscher (NCX) [15] aus dem Zytoplasma transportiert.

Dadurch wird die diastolische Kalziumkonzentration wiederhergestellt, die Myosinköpfe verlieren ihre Bindung an die Aktinfilamente und die Kontraktion der Zelle endet. Durch die SERCA wird Kalzium in das SR gepumpt. Die NCXs transportieren Kalzium in den extrazellulären Raum. Während die SERCAs Kalzium konstant in das SR transportieren, kehrt sich die Transportrichtung der NCXs um, sobald das Membranpotential einen höheren Wert hat als das Umkehrpotential des NCX. Das während des Kalziumzyklus an humanen ventrikulären Kardiomyozyten anliegende elektrische Potential, das sogenannte Aktionspotential, ist in Abbildung 1.2 dargestellt. Zudem ist das Umkehrpotential des NCX abgebildet sowie der Verlauf der Kalziumkonzentration.

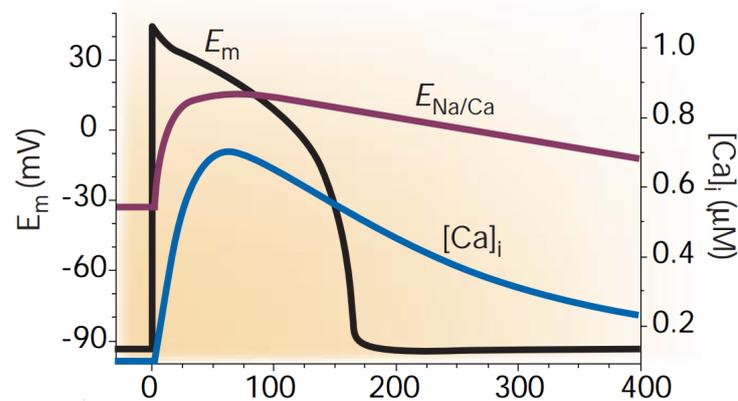


Abbildung 1.2: Aktionspotential der menschlichen Herzzelle, Aktionspotential (E_m), Kalziumtransient ($[Ca]_i$) und Umkehrpotential des NCX (Grafik aus [14])

1.1.1 Natrium-Kalzium-Austauscher

Der NCX ist für einen Großteil des Kalziumefflux, dem Transport von Kalzium aus der Zelle heraus, verantwortlich. Er ist elektrogen, da er 3 Na^+ aus dem extrazellulären Raum gegen ein Ca^{2+} aus der Zelle austauscht [22]. Die Aktivität des NCX ist sowohl von der Konzentration des Na^+ und des Ca^{2+} als auch vom Membranpotential abhängig. Auch ein entgegengesetzter Austausch wurde nachgewiesen. Der NCX wird, da er die intrazelluläre Kalziumkonzentration maßgeblich beeinflusst, mitverantwortlich gemacht für die Effizienz des CICR [81, 111, 99].

1.1.2 SERCA-Pumpe

Die SERCA-Pumpe ist ein Protein, das in die Membran des sarko-endoplasmatischen Retikulums integriert ist. Sie ist bei Mäusen und Ratten hauptverantwortlich für die Wiederherstellung der diastolischen Kalziumkonzentration im Zytoplasma. Dabei werden in Herzmuskelzellen Kalziumionen gegen einen steigenden Konzentrationsgradienten in das Innere des SR gepumpt, wo sie von dem Protein Calsequestrin gebunden werden [57]. Die für diesen Vorgang nötige Energie wird aus der Hydrolyse von Adenosintriphosphat (ATP) bezogen. Der Anteil des Kalziums, der durch die SERCA aus dem Zytosol entfernt wird, beträgt beim Menschen ca. 70% [14], bei Ratten und Mäusen hingegen ca. 92%. Phospholamban (PLB) inhibiert die Aktivität der SERCA [3]. PLB kann durch zyklisches Adenosinmonophosphat (cAMP) und auch Calmodulin-abhängige Proteinkinasen phosphoryliert werden. Die fehlende Inhibierung durch PLB erhöht die SERCA-Aktivität. Dies steigert wiederum die Kalziumbeladung des SR, wodurch die Amplitude der Kalziumkonzentration während der Kontraktion erhöht wird [14]. Weiterhin ist eine Dephosphorylierung von PLB über einen Proteinkinase C (PKC) α -abhängigen Signalweg möglich [21]. Sowohl cAMP als auch PKC α werden in der Singalkaskade von G α_q aktiviert. Deshalb könnte ein KO dieses Proteins, wie er in dieser Arbeit benutzt wurde, beide Wege zur Phosphorylierung von PLB beeinflussen.

1.1.3 Natrium-Kalium-ATPase

Die Natrium-Kalium-ATPase (Na⁺/K⁺-ATPase) ist eine Ionen-Pumpe, die 3 Na⁺ aus der Zelle heraus und zeitgleich 2 K⁺ in die Zelle hinein transportiert. Dies geschieht unter Verwendung von ATP, da die Na⁺/K⁺-ATPase bei dem Transport gegen ein elektrisches und ein chemisches Potential arbeitet. Beide Potentiale werden durch den Transport verstärkt. Die Na⁺/K⁺-ATPase ist zusammen mit dem Na⁺/K⁺Cl⁻ Kotransporter hauptverantwortlich für den Natrium- und Kaliumhaushalt der Kardiomyozyten und beeinflusst somit auch die Aktivität von NCX. Indirekt wird damit Einfluss auf die Kalziumfreisetzung aus dem SR [47] genommen. Die Na⁺/K⁺-ATPase wird von Aldosteron über PKC ϵ beeinflusst. Aldosteron hat jedoch nicht nur akute Effekte, sondern moduliert auch die Expression der Na⁺/K⁺-ATPase [54]. Eine dauerhafte Inhibierung des Transporters wirkt sich auf den Zellmetabolismus, das Zellvolumen und auch auf den CICR aus. Dies wird pharmakologisch genutzt, um mittels Herzglykosiden den Herzschlag zu kräftigen [111, 47, 82]. Da die in dieser Arbeit verwendeten Tiere einen Hyperaldosteronismus hatten, könnte dieser Mechanismus des gestärkten CICR und der erhöhten basalen Kalziumkonzentration zum Tragen kommen.

1.1.4 Aldosteron

Aldosteron ist ein Mineralkortikosteroid, das eine wichtige Rolle in der Regulierung des Blutdruckes und des Durstgefühles spielt. Es wird in einem Teil der Nebennieren, der Zona glomerulosa, gebildet. Es steuert in den Sammelrohren der Nieren die Ausscheidung von Kalium bzw. Natrium. Wie oben schon erwähnt, gibt es einen Zusammenhang zwischen einer erhöhten Aldosteronkonzentration im Blut beziehungsweise dem kardialen Gewebe und Herzpathologien wie Hypertrophie und dem metabolischen Syndrom [115, 63]. Sontial et al. [134] berichten, dass die Herzen von C57Bl/6 Mäusen bei einer Aldosterongabe von durchschnittlich 350 mg/kg/d eine signifikante Erhöhung des Herzgewichtes normiert auf die Tibia Länge zeigten. Zudem kam es zu einer Zunahme des Kollagenanteils im Herzgewebe. Beides weist auf eine entstandene Hypertrophie sowie Fibrose hin. Bei Experimenten mit Ratten, denen eine Niere entfernt wurde, konnte festgestellt werden, dass eine Diät mit reduziertem Kochsalzgehalt eine Fibrose, trotz Aldosteroninfusion, unterbinden konnte [23].

Neben schnellen nicht-genomischen Effekten, wie dem Einfluss auf cAMP, 1,2-Diacylglycerine (DAG), Inositol-1,4,5-trisphosphat (IP_3) und Kalzium-Ionen [33], zeigt Aldosteron auch genomische Effekte. So kann der Steroideinfluss auf die Zellen zu einer veränderten Genregulation führen. Dies kann zum Beispiel durch die Aktivierung von Transkriptionsprozessen oder durch transkriptionellen Interferenz erfolgen [66]. In der glatten Gefäßmuskulatur kommt es zu genomischen Effekten, wenn Aldosteron an den Mineral-Kortikoid-Rezeptor bindet [23]. Die exakten Singalwege möglicher genomischer Effekte von Aldosteron in Herzmuskelzellen sind nicht umfassend geklärt, da die Mineral-Kortikoid-Rezeptoren in Herzmuskelzellen wohl überwiegend von physiologischen Glukokortikoiden okkupiert, aber nicht aktiviert werden [48]. Jedoch modulieren viele Steroide in anderen System *g-protein coupled receptors* (GPCRs), was auch bei Aldosteron der Fall sein könnte.

1.1.5 G-Protein gekoppelte Rezeptoren

Das heterotrimerische Guaninnucleotid-bindende Protein (G-Protein) ist ein Signalwandler in der Zellmembran, der Rezeptoren und Effektoren verbindet und für die Signalweiterleitung in das Zellinnere verantwortlich ist [106] [30] [100]. Rezeptoren, die an G-Proteine gekoppelt sind (GPCRs), existieren für eine Vielzahl von Hormonen und Neurotransmittern. G-Proteine besitzen drei Untereinheiten: α , β und γ . Es sind mehr als 15 G_α -Untereinheiten bekannt [120]. Gegenstand der kardiologischen Forschung sind sowohl diese α -Untereinheiten als auch die β - und γ -Untereinheiten, die ebenfalls eine

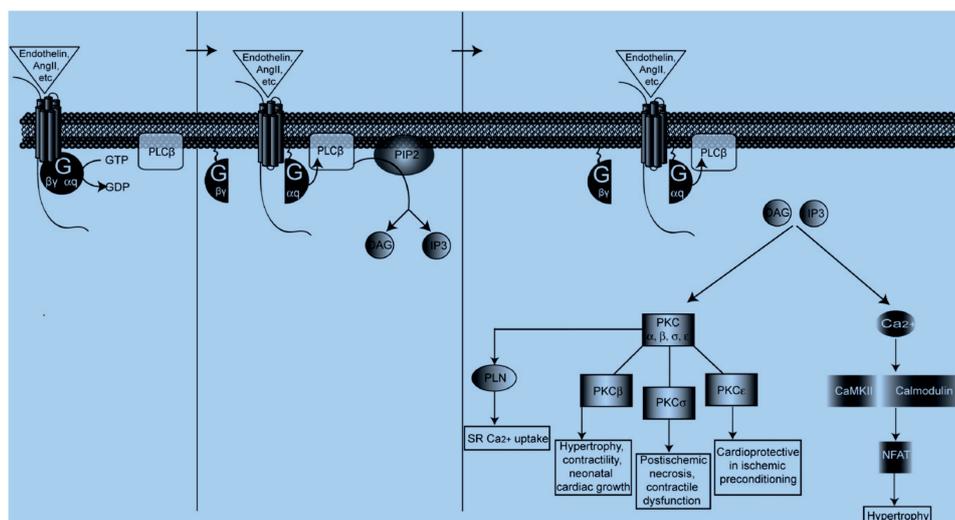


Abbildung 1.3: Signalwege des $G\alpha_q$ -Protein-gekoppelten Rezeptors in Herzmuskelzellen (Grafik aus [118])

Rolle bei der Entwicklung von Herzerkrankungen spielen können [89]. Unter den α -Untereinheiten nimmt $G\alpha_q$ eine prominente Rolle im Herzen ein (siehe hierzu auch Abbildung 1.3) [144, 34, 118]. Durch $G\alpha_q$ wird wahrscheinlich auch das gesunde Wachstum des Herzens (kompensatorische Hypertrophie durch körperliche Anstrengung) vermittelt [72]. Es verdichten sich ebenfalls die Hinweise, dass die Entwicklung einer Nachlast-induzierten Hypertrophie durch Abwesenheit des $G\alpha_q$ - und des $G\alpha_{11}$ -Proteins gehemmt wurde [104]. Hier muss darauf hingewiesen werden, dass das $G\alpha_{11}$ -Protein bei der fötalen Entwicklung des Herzens, wie von Offermanns et al. [104] gezeigt, redundant für das $G\alpha_q$ -Protein ist. Jedoch scheint sich diese Redundanz nicht auf alle Funktionen von $G\alpha_q$ zu erstrecken [64].

Durch Binden des Liganden an den Rezeptor kommt es zu einer Konformationsänderung der α -Untereinheit (siehe Abbildung 1.4). Dadurch löst sich das an diese Untereinheit gebundene GDP, dessen Platz durch GTP eingenommen wird. Infolgedessen dissoziiert die α -Untereinheit von der β - und γ -Untereinheit. Das GTP wird durch die intrinsische Guanosin triphosphatase-Aktivität der $G\alpha$ -Untereinheit hydrolysiert. Hierdurch kann diese Untereinheit erneut an die beiden übrigen Untereinheiten binden.

Der Effektor der $G\alpha_q$ -Stimulation ist die Phospholipase C (PLC), welches das an der Zellmembran vorhandene Phosphatidyl-Inositol 4,5-Bisphosphat (PIP_2) hydrolysiert. Das daraus entstehende IP_3 kann an die IP_3 -Rezeptoren im endoplasmatischen Retikulum (ER) und SR binden und dadurch die Kalziumfreisetzung induzieren. Eine Überexpression der IP_3 -Rezeptoren fördert in Tiermodellen eine Hypertrophie, was auf eine mögliche Beziehung

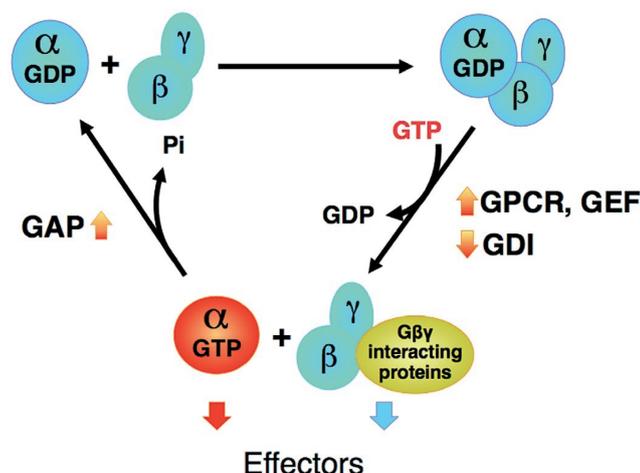


Abbildung 1.4: Aktivierung und Deaktivierung des heterotrimeren G-Proteins. Durch die Aktivierung des GPCR kommt es zu einer Konformationsänderung in der $G\alpha$ -Untereinheit, wodurch sich das an diese gebundene Guanosindiphosphat (GDP) löst. Durch die folgende Bindung von Guanosintriphosphat (GTP) an $G\alpha$ dissoziiert die Untereinheit von $G\beta/G\gamma$. Die resultierenden getrennten Untereinheiten wirken auf ihre Effektoren. Durch die $G\alpha$ intrinsische Guanosintriphosphatase (GTPase) wird GTP wieder zu GDP hydrolysiert. Die $G\alpha$ -Untereinheit kann wieder an $G\beta/G\gamma$ binden (Grafik aus [120])

zwischen IP_3 -Rezeptor Aktivierung und Hypertrophie-Entstehung hindeutet [97]. Ein weiteres Produkt der PIP_2 -Hydrolyse ist DAG. DAG aktiviert seinerseits die Kalzium-insensitiven neuen PKCs, was in der Folge zu veränderten Transkriptionsprozessen führen kann. Es werden Gene exprimiert, die ansonsten nur in fötalen Zellen zu finden sind [144, 50, 70].

1.2 Ein- und Zwei-Photonen-Photolyse von Käfigsubstanzen

1.2.1 Theorie

Photolyse bezeichnet im Allgemeinen die Spaltung eines Moleküls, ausgelöst durch die Bestrahlung mit Licht. Dabei wird ein Photon (oder mehrere Photonen) durch das Molekül absorbiert, woraufhin dieses, häufig in mehreren Schritten, in multiple Endprodukte zerfällt. Die Bindungsenergie bestimmt dabei, welche Energie beziehungsweise welche Wellenlänge notwendig ist, um eine Bindung innerhalb des Moleküls aufzubrechen.

Photolyse wird experimentell häufig dazu verwendet, einen Liganden, der durch ein Käfigmolekül für biologische Rezeptoren inert gemacht wurde

(z.B. ein Kalziumion oder auch Glutamat), von eben jenem Käfig zu trennen. So kann mittels Photolyse dieser Käfigsubstanz, zu einem bestimmten Zeitpunkt und an einem definierten Ort, eine Reaktion der Zelle induziert werden [119, 114, 43, 128]. Die meisten Käfiggruppen sind acsUV-sensitiv da hohe Energien notwendig sind, um die Bindung aufzubrechen. Aus diesem Grund werden oftmals Quecksilberdampf-Blitzlampen, welche ein breites Spektrum im UV-Bereich besitzen, oder UV-Laser zur Photolyse eingesetzt [26, 20, 136]. Soll der Ligand nicht nur zeitlich, sondern auch räumlich definiert freigesetzt werden, so ist die Photolyse mittels Absorption eines Photons nur bedingt geeignet [49, 39]. Durch Fokussieren mit Hilfe eines Objektivs wird die Photolyse nur in zwei Dimensionen, senkrecht zur optischen Achse des Objektivs, eingeschränkt. Entlang der optischen Achse wird pro Schnittebene immer die gleiche Menge an Käfigmolekülen angeregt. Wäre nur die Detektion des freigesetzten Stoffes von Interesse, so wäre es mittels mathematischer Dekonvolution einer Stapelaufnahme möglich, die Freisetzung außerhalb der Fokusebene herauszurechnen. Da jedoch ein Ziel der örtlich begrenzten Freisetzung die Lokalisierung von Rezeptoren in drei Dimension innerhalb von Zellen ist, wäre eine solch ungewollte Freisetzung nicht nur hinderlich, sondern würde eine Lokalisierung in Richtung der optischen Achse unmöglich machen.

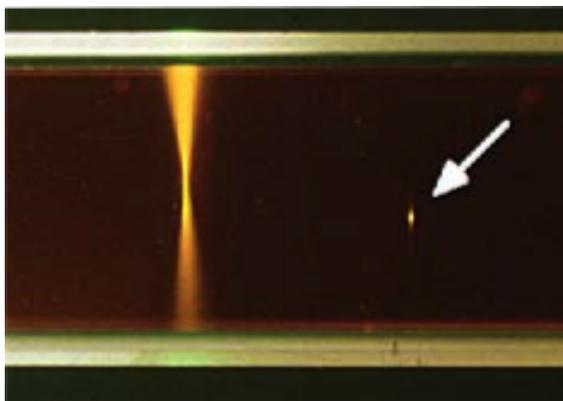


Abbildung 1.5: Vergleich von Fluoreszenz durch Ein- und Zwei-Photonen-Absorption in einer Safranin O Lösung: Links ist zu erkennen, dass der Laser, der von oben in die Küvette fokussiert wird, einen kompletten Konus ausleuchtet. Der Pfeil rechts zeigt auf eine Zwei-Photonen-Anregung. Diese beschränkt sich auf ein Paraboloid und ist im Idealfall nicht viel größer als der beugungsbegrenzte Fokus (aus [105] ohne Maßstab)

Maria Goeppert-Mayer [52] beschrieb erstmals, dass ein Molekül auch zwei Photonen gleichzeitig absorbieren kann. Dies ist auch möglich mit Photonen, deren Wellenlänge normalerweise nicht ausreichen würde, um das Molekül

in einen angeregten Zustand zu versetzen [108, 109]. Ein solcher Prozess einer Zwei-Photonen-Absorption findet jedoch nur bei sehr hohen Intensitäten statt, da die Koeffizienten der nichtlinearen Beiträge zum elektromagnetischen Feld im Allgemeinen recht klein sind. Aus diesem Grund werden für die Zwei-Photonen-Absorption, bis auf wenige Ausnahmen [157], nur gepulste Laser verwendet, denn bei diesen können Spitzenintensitäten in der Größenordnung von MW/cm^2 erreicht werden [49, 116]. Die Rate der Absorption P ergibt sich aus;

$$P = c\sigma(\lambda)\langle I^2 \rangle \quad (1.1)$$

wobei c die Konzentration des absorbierenden Moleküls, $\sigma(\lambda)$ der Wirkungsquerschnitt des Moleküls für Photonen der Wellenlänge λ und I die momentane Intensität des Lasers ist. Der Wirkungsquerschnitt ist als ein Maß für die räumliche Ausdehnung zu verstehen und gibt die Wahrscheinlichkeit wieder, mit der bei einer bestimmten Lichtintensität zur einer Absorption kommt. Die Intensität des Lasers in drei Raumrichtungen wird näherungsweise durch zwei Gaussfunktionen unterschiedlicher Halbwertsbreite beschrieben;

$$I = I_0 \cdot e^{-\frac{r^2}{2\omega_0^2}} \cdot e^{-\frac{z^2}{2z_0^2}} \quad (1.2)$$

Hierbei ist r der radiale Abstand vom Fokus, $2\omega_0$ der Fokusdurchmesser, z der Abstand vom Fokus in Richtung der optischen Achse und z_0 die Rayleigh-Länge. Aus dieser quadratischen Abhängigkeit, kombiniert mit der Intensitätsverteilung in einem fokussierten Laserstrahl, ergibt sich eine intrinsische Sektierung. In Abbildung 1.5 wird die Fluoreszenz durch Ein-Photonen-Absorption mit der Fluoreszenz durch Absorption zweier Photonen in einer Safranin O Lösung verglichen. Es müssen verschiedene Voraussetzungen erfüllt sein, um Zwei-Photonen-Photolyse in einem biologischen Experiment einsetzen zu können. Zum einen muss die Menge der freigesetzten Liganden, groß genug sein, um eine Antwort des biologischen Systems hervorrufen zu können [29, 61, 149]. Zum anderen darf sowohl die Konzentration der Käfigsubstanz als auch die Intensität des Anregungslasers nicht so hoch sein, dass das biologische System signifikant gestört wird [131, 67, 127, 145]. Die Photolyserate ergibt sich direkt aus der Absorptionsrate, da für je zwei absorbierte Photonen eine Käfiggruppe zerstört werden kann. Bei einer realen Käfigsubstanz zerfällt nicht jedes angeregte Käfigmolekül. Viele Käfigmoleküle, wie z.B. DM-Nitrophen (DMNP), können die absorbierte Energie auch anderweitig dissipieren. Solche Möglichkeiten wären strahlende sowie nicht-strahlende Übergänge, interne Schwingungszustände oder auch Stöße mit anderen Molekülen. Hierdurch sinkt die Effizienz der Photolyse [1, 46]. Diese sogenannte Quanteneffizienz ϵ ist ein Hauptfaktor für die Photolyserate R .

Somit lässt sich die Photolyserate mit Gleichung 1.1 für die Absorptionsrate schreiben als;

$$R = c \frac{1}{2} \epsilon \sigma(\lambda) \langle I^2 \rangle \quad (1.3)$$

1.2.2 Anwendung der Zwei-Photonen-Photolyse in der Biologie

Zwei-Photonen-Photolyse ist heutzutage eine effiziente Methode, um Substanzen, die an ein Käfigmolekül gebunden sind, in einer Zelle räumlich begrenzt freizusetzen [87, 74, 69]. Zudem hat IR-Strahlung durch die höhere Eindringtiefe in Gewebe [59, 139] sowie die niedrigere Phototoxizität für Zellen [146, 145, 121, 78], viele Vorteile gegenüber einer Photolyse mit UV-Licht. In Hinsicht auf Substanzen mit verbesserten Eigenschaften für die Zwei-Photonen-Photolyse [35, 107, 19] sowie die komplexen Mechanismen, im Zusammenhang von gepulster Freisetzung und Diffusion [42, 41, 73], liegen viele Forschungsergebnisse vor. Jedoch ist die Zahl der Publikationen in denen die Zwei-Photonen-Photolyse als Methodik angewendet wurde (768 Publikationen gefunden mittels ISI-Suche, Stichwörter „photolysis and two photon“, Erscheinungsjahre 1990-2013) nicht mit der Gesamtzahl an Veröffentlichungen zu vergleichen, in denen Photolyse verwendet wurde (51729 Publikationen gefunden mittels ISI-Suche, Stichwort „photolysis“, Erscheinungsjahre 1990-2013).

Die Menge der angeregten Käfigmoleküle, die pro Sekunde zerfallen, hängt, wie anhand von Gleichung 1.3 zu sehen ist, von vier Parametern ab: vom Wirkungsquerschnitt sowie der Quanteneffizienz (beides sind intrinsische Eigenschaften der Käfigmoleküle, auf die kein weiterer Einfluss besteht); von der Laserintensität und von der Stoffmenge der Käfigsubstanz. Die letzten beiden Parameter werden häufig durch biologische und physikalische Grenzen beschränkt. Der Parameter der letztendlich die Gesamtzahl der zerfallenden Käfigmoleküle bestimmt, ist die Photolysedauer, welche, zumindest theoretisch, beliebig vergrößert werden kann. Häufig werden Photolysezeiten von mehreren Millisekunden [87, 46] verwendet. Jedoch führt eine längere Freisetzung nicht immer zu einer Reaktion der Zelle. Dies liegt darin begründet, dass eine Reaktion der Zelle häufig nicht von der reinen Anzahl an aktiven Molekülen abhängt, sondern von deren Konzentration [68, 113, 76]. Bei kleinen Freisetzungsraten diffundieren durch das Konzentrationsgefälle unter Umständen die freigesetzten Liganden so schnell aus dem Fokus, dass die Konzentration im Fokus nicht signifikant angehoben wird.

Des Weiteren bedingt die Diffusion bei langen Photolysezeiten, dass eine räumlich begrenzte Anhebung der Konzentration des Liganden nicht mehr

gegeben ist [74]. Die beiden weiteren Faktoren, die die Freisetzungsrates beeinflussen (die Konzentration der Käfigsubstanz sowie die Laserintensität) können, wie oben schon erwähnt, in gewissen Grenzen angepasst werden. Häufig wurde in Experimenten, bei denen die Liganden kovalent gebunden sind, eine hohe Konzentrationen ($>0,01$ mol/l (M)) der Käfigsubstanzen verwendet, um die niedrigen Wirkungsquerschnitte und Quanteneffizienzen der Käfigsubstanzen auszugleichen [91, 101]. Nicht immer ist eine solche Vorgehensweise möglich, wie z.B. bei Kalzium, bei dem die Kalziumionen in einer Gleichgewichtsreaktion vom Käfigmolekül, einem Chelator, gepuffert werden. Die Konzentration der Käfiggruppe lag bei vielen Publikationen im Allgemeinen im niedrigen einstelligen mM Bereich [79, 132, 96]. Des Weiteren wurden niedrige Laserleistungen verwendet, dafür jedoch lange Photolysezeiten von mehreren ms. Eine Ausnahme bildet hier Figuerora et al. [45] mit einer Konzentration von bis zu 15 mM DMNP. In den von Figuerora et al. durchgeführten Experimenten wurde in glatter Muskulatur der Chelator DMNP mittels einer Photolysezeit von wenigen Mikrosekunden bei einer nicht näher spezifizierten Intensität des Lasers photolytisch, um CICR zu erzielen.

1.3 Fluoreszenzlebensdauer-Bildgebung

Fluoreszenz bezeichnet die spontane Emission von Photonen, wenn ein Molekül oder Atom aus dem angeregten Singulett-Zustand S_1 in den Grundzustand zurückfällt. Häufig wird die Intensität der Fluoreszenz eines Indikators, um die Konzentration eines nicht fluoreszenten Stoffes zu messen, wie z.B. Fluo 8 im Fall von Kalziumionen. Da die Fluoreszenzintensität auch immer von der Konzentration des Indikators abhängt und da die Bewegungen von Zellen die Messungen beeinflussen, sind ratiometrische Messungen mit speziellen Indikatoren, wie zum Beispiel Fura-2, notwendig, um absolute Konzentrationswerte zu bestimmen.

Die Fluoreszenzlebensdauer ist meist unabhängig von der Konzentration des Indikators. Aus diesem Grund bietet die Messung der Fluoreszenzlebensdauer einen alternativen Ansatz für optische Untersuchungen physiologischer Parameter. Dabei kann die Fluoreszenzlebensdauer nicht nur punktuell gemessen werden. Durch Abrastern der Probe oder eine Weitfeldaufnahme mittels einer Kamera, kann die Lebensdauer auch orts aufgelöst detektiert werden. Dieses System wird Fluoreszenzlebensdauer-Bildgebung, oder auch *fluorescence-lifetime imaging microscopy* (FLIM), genannt. Die Grundlagen von FLIM sind die Zerfallsraten und Zerfallswege der angeregten Zustände der fluoreszenten Moleküle. Die Zerfallsraten ergeben sich nach einer streng quantenmechanischen Betrachtung, wie sie zuerst von V. Weisskopf und E.

Wigner [153], unter Zuhilfenahme der Ideen von P. Dirac [31], für ein System mit einem angeregten Zustand und vielen Zielzuständen, durchgeführt wurde. Es wird von einem Atommodell als Superposition von Eigenzuständen ausgegangen [92];

$$|\Psi(t)\rangle = C_i(t)e^{-i\omega t}|i\rangle + \sum_{\alpha} C_f e^{-i(\omega_f+\omega)t}|f\rangle_{\alpha} \quad (1.4)$$

Hierbei ist $|\Psi(t)\rangle$ der zeitabhängige Zustandsoperator des fluoreszierenden Atoms und $C_i(t)e^{-i\omega t}$ bzw. $\sum_{\alpha} C_f e^{-i(\omega_f+\omega)t}$ sind die Zeitentwicklungsoperatoren für den inertialen (angeregten) $|i\rangle$ bzw. finalen (Grund-) Zustand $|f\rangle_{\alpha}$ des Atoms. Nach dem Einsetzen in die Bewegungsgleichung der Quantenmechanik, Anwenden des Dipoloperators und formeller Integration von $\dot{C}_{f\alpha}$ wird daraus;

$$\dot{C}_i(t) = - \sum_{\alpha} |g_{\alpha}|^2 \int_0^t e^{-i(\omega-\omega_f)(t-t')} C_i(t') \quad (1.5)$$

mit g_{α} der Dipolkopplungskonstante für den Übergang von $|i\rangle$ nach $|f\rangle_{\alpha}$. Danach kann die grobe Näherung $C_i(t') = C_i(t)$ angewendet werden. Zusammen mit dem Cauchy-Hauptsatz ergibt sich die Gleichung für den exponentiellen Zerfall für den angeregten Zustand;

$$\dot{C}_i(t) = -\frac{\gamma}{2} C_i(t) \quad \text{mit} \quad \gamma = 2\pi \sum_{\alpha} |g_{\alpha}|^2 \quad (1.6)$$

Für ein komplexes System aus vielen angeregten und Grundzuständen ergeben sich in gleicher Weise mehrere Zerfallskonstanten. Aus diesen Zerfallsraten lassen sich die Fluoreszenzlebensdauern berechnen. Die Lebensdauer eines angeregten Zustandes ist dabei von allen Zuständen des emittierenden Systems abhängig. Sie kann also Auskunft über die das System beeinflussenden Parameter geben. Ein Parameter kann z.B. die Protonierung sein, die wiederum vom pH-Wert abhängt, oder die Bindung an ein Ion wie Ca^{2+} . Eine Messung der Fluoreszenzdauer kann also zum Bestimmen systemrelevanter Parameter, wie zum Beispiel der Kalziumkonzentration oder des pH-Wertes [28, 85], verwendet werden.

Es gibt verschiedene Methoden diese Lebensdauer zu messen. Die Messung kann in der sogenannten Frequenzdomäne, mittels Phase und Amplitude [83] oder in der Zeitdomäne [9, 10, 117], mit Hilfe von *time correlated single photon counting* (TCSPC) oder schnell geschalteter Detektoren, erfolgen. Weitere Unterscheidungsmöglichkeiten bestehen durch die Technik, mit der die Photonen detektiert werden und auf welche Art und Weise mit der das Bild, in dem die Fluoreszenzlebensdauer orts aufgelöst dargestellt wird, zustande kommt. Da es eine große Vielzahl an Techniken gibt, die auch fast

alle miteinander kombinierbar sind, würde eine umfassend Einführung in die Thematik die Ausführungen dieses Abschnitts übersteigen. Es wird an dieser Stelle auf einen Übersichtsartikel von W. Becker [8] beziehungsweise das Buchkapitel von E.B. van Munster und W.J. Gadella [147] verwiesen, welche für eine weiterführende Einarbeitung geeignet sind.

Da die in dieser Arbeit verwendete Messmethode eine Bestimmung der Lebensdauer in der Zeitdomäne verwendete, wird diese Technik näher beleuchtet. Wie erwähnt, existieren zwei Techniken mit denen die Fluoreszenzlebensdauer in der Zeitdomäne gemessen werden kann. Beide haben gemein, dass das Chromophor mit einem kurzen Lichtpuls angeregt wird, um danach das Abklingen der Fluoreszenz zu messen. Mit schnell geschalteten Detektoren wird immer nur für ein bestimmtes Zeitfenster die Messung der Fluoreszenz durchgeführt. Die zeitliche Information wird dadurch erlangt, dass das Messfenster zeitlich gegen den Anregungspuls verschoben wird. Die Möglichkeit bei dieser Technik Flächendetektoren zu verwenden, ermöglicht es, die räumliche Information gleichzeitig aufzunehmen. Dies ist, trotz der Notwendigkeit den zeitlichen Verlauf mittels der *gates* zu messen, schneller als die Bildaufnahme beim Einzelphotonenzählen. Möglich sind Bildwiederholraten von bis zu 100 Hz [2]. Der Nachteil beim *gatedeten* Messen ist, dass immer nur ein Teil der Photonen detektiert wird, was eine hohe Anregungsleistung notwendig macht. Weiter ist zu beachten, dass sich ein zu starkes Bleichen der Probe, welches wie eine weitere „Entleerung“ des angeregten Zustands wirkt, negativ auf die Genauigkeit der zu bestimmenden Lebensdauer auswirkt [135]. Die starke Beleuchtung der Probe, welche diese unter Umständen zu stark bleicht, kann durch Verwendung von nur wenigen Einschaltzeiten ausgeglichen werden. Jedoch besteht dann das Problem, dass die Zahl der Messpunkte nicht ausreicht, um bei Anwesenheit mehrerer fluoreszenter Spezies mit Hilfe einer Regression mehrere Zerfallsraten und Fluoreszenzintensitäts-Amplituden akkurat zu bestimmen. Des Weiteren wird bei der Weitfeld-Methode Licht von außerhalb der Fokusebene mitdetektiert, was zum einen die Auflösung reduziert und zum anderen auch die Messung der Lebensdauer beeinflusst

Zeitkorreliertes Einzelphotonenzählen [102, 10] ist eine Technik, um Fluoreszenzlebensdauern zeitlich hochauflösend zu messen. Dabei wird ein schneller Detektor benötigt und eine Korrelationselektronik. Die Elektronik erlaubt das präzise Aufzeichnen der Ankunftszeiten der Photonen. Ein Synchronisationssignal mit der Anregung wird parallel dazu aufgezeichnet. Auch sollte hier erwähnt werden, dass zu hohe Zählraten die Messung verzerren. Das Prinzip des TCSPC basiert darauf, dass nach der Anregung durch den i -ten Laserpuls die Ankunftszeit eines Photons gemessen wird. Danach ist der Detektor für mehrere ns inaktiv, im Idealfall bis zum $(i+1)$ -ten Laserpuls. Bis dahin müssen alle durch den i -ten Laserpuls angeregten Chromophore in den

Grundzustand zurückgekehrt sein, da sonst die Zuordnung der detektierten Photonen zu dem i -ten Synchronisationssignal gestört wird. Die Liste mit den Ankunftszeiten kann im Anschluss mit der Synchronisation korreliert werden. Da die Detektion mit einer begrenzten Wahrscheinlichkeit erfolgt, wird von einem Ensemble an Emittlern nicht immer zum gleichen Zeitpunkt ein Photon detektiert. So kann ein Histogramm mit den Zählraten, zu verschiedenen Zeitpunkten nach der Anregung, erstellt werden. Die mathematische Regression dieser Statistik mittels einer Zerfallsfunktion, erlaubt eine sehr genaue Bestimmung der Zeitkonstanten des Zerfalls des Fluoreszenzsignals, auch bei multiplen Zerfallsraten. Diese Methode erfordert die Verwendung eines schnellen Punktdetektors [zum Beispiel Avalanche-Photodiode (APD) oder Photomultiplizierer (PMT)] die einen Linienabtaster notwendig machen, um ein Bild der Probe zu erstellen. Da zu jedem Bildpunkt eine ausreichende Zahl an Photonen gezählt werden muss, um eine Regression des Histogramms vornehmen zu können, ist in den meisten Fällen die Abtastgeschwindigkeit begrenzt. Dies wiederum beschränkt die Geschwindigkeit des FLIM mittels TCSPC. Jedoch ermöglicht die Verwendung eines Punktdetektors eine konfokale Filterung und somit eine höhere räumliche Auflösung sowie ein niedrigeres Rauschsignal. Zudem ermöglicht die hohe Quanteneffizienz der verwendeten Detektoren eine Messung der Lebensdauer auch bei schwach fluoreszenten Proben.

Kapitel 2

Material und Methoden

2.1 Kalziumhomöostase in murinen ventrikulären Kardiomyozyten unter dem Einfluss eines Hyperaldosteronismus in G_{α_q} -/ $G_{\alpha_{11}}$ -KO-Mäusen

2.1.1 Genetisch veränderte Tiere und osmotische Minipumpe

Die Haltung der Tiere sowie die Isolation der Herzmuskelzellen wurden von der Tierversuchskommission der Universität des Saarlandes genehmigt und gemäß den Richtlinien der Direktive der Europäischen Union für Labortiere (86/609/EEC) und dem Leitfaden für die Pflege und Nutzung von Labortieren der US National Institutes of Health (NIH Veröffentlichung Nr. 85-23, 1996) durchgeführt. Für diesen Abschnitt der Arbeit wurden genetisch veränderte Mäuse verwendet, um die Rolle der G_{α_q} - und $G_{\alpha_{11}}$ -Proteinuntereinheiten für die Aldosteron-Singalkaskade in Kardiomyozyten zu untersuchen. Im Folgenden werden die verwendeten Genotypen kurz eingeführt:

- $gnaq^{fx/fx} gna11^{-/-} \alpha\text{-MHC Cre}^{tg/0}$
Tiere mit einem, durch Tamoxifeninjektionen und Cre-Rekombinase, unter dem Promoter der schweren α -Myosinkette (*myosin heavy chain* (MHC)), induzierbaren KO des „geflochten“ Gens *gnaq* und einem permanenten KO des Gens *gna11*. Dies waren die Doppel-Knockout-Tiere.
- $gnaq^{fx/fx} gna11^{-/-} \alpha\text{-MHC Cre}^{0/0}$
Durch das Fehlen des Cre-Gens kam es bei diesen Tieren, trotz Gabe von Tamoxifen, nicht zu einem KO des *gnaq*-Gens. Es waren die

Wurfgeschwister der Doppel-KO-Tiere, sie wurden auch kurz als $G\alpha_{11}$ -KO-Tiere bezeichnet.

- $gnaq^{fx/fx} gna11^{+/+} \alpha$ -MHC Cre^{tg/0}
Diese Tiere verfügten über ein intaktes *gna11* Gen. Nach Tamoxifen Injektionen kam es durch Aktivierung der Cre-Rekombinase zu einem KO des *gnaq*-Gens. Nach 25 Tagen konnte kein $G\alpha_q$ -Protein mehr in den Zellen nachgewiesen werden. Diese Mäuse waren die $G\alpha_q$ -Einzel-KO-Tiere
- $gnaq^{fx/fx} gna11^{+/+} \alpha$ -MHC Cre^{0/0}
Diese Mäuse waren die Wurfgeschwister der $G\alpha_q$ -Einzel-KO-Tiere. Ohne Expression der Cre-Rekombinase konnten auch hier die Tamoxifeninjektionen keinen KO induzieren. Die Gensequenz dieser Tiere kam funktionell der eines Wildtyps am nächsten.

Die oben beschriebenen Genotypen wurden gewählt, da experimentelle Befunde aus einer Basis-Charakterisierung [106] der transgenen Mauslinien ergaben, dass diese Genotypen optimal für die Evaluierung des Einflusses der jeweiligen Proteinuntereinheiten auf die Kalziumhomöostase sind. Sämtliche Tiere erhielten im Alter von 5 Wochen über 5 Tage hinweg Tamoxifeninjektionen.

Um die Rolle der $G\alpha_q$ - und $G\alpha_{11}$ -Proteine für die Aldosteron-Signalkaskade in Herzmuskelzellen zu untersuchen, wurden den Tieren im Alter von 8 Wochen osmotische Minipumpen implantiert, die über einen Zeitraum von 6 Wochen eine kontrollierte Menge (360mg/kg/d) des Mineralcorticosteroids Aldosteron abgaben. In den Kontrollgruppen wurden Implantat-Attrappen verwendet, die den Einfluss des Pumpenkörpers und der Operation simulierten, um die Messergebnisse mit denen der Tiere mit echten Pumpen vergleichbar zu machen. Durch die Minipumpen konnte der Blutplasmaspiegel von Aldosteron in den Testtieren auf das 7-fache des Wertes in den Kontrolltieren angehoben werden, dies entspricht dem Konzentrationsanstieg, der bei einem im Menschen vorkommenden Hyperaldosteronismus gemessen wird.

2.1.2 Schnelle Videobildgebung

Der im Folgenden beschriebene Aufbau und die zugehörigen Experimente sollten zeigen, ob sich durch einen Hyperaldosteronismus die Kalziumhomöostase in den ventrikulären Herzmuskelzellen der Tiere, mit dem oben beschriebenen genetischen Hintergrund, änderte. Dazu wurde die freie Kalziumkonzentration in den Kardiomyozyten mittels der Fluoreszenz von Fura-2 und schneller Videobildgebung gemessen.

2.1.3 Verwendete Materialien

- *charge-coupled device* (CCD) Kamera (IMAGO, TILL Photonics)
- Inverses Mikroskop (Eclipse TE2000-U, Nikon Corporation, Tokyo, Japan)
- Monochromator (Polychrome IV; TILL Photonics GmbH, Gräfelfing, Deutschland)
- Pulsgenerator: Eigenbau zur Erzeugung variabler Rechteckspannungen

2.1.4 Verwendete Software

- Excel 2010, Microsoft Corporation, Redmond, WA, USA
- GraphPad Prism, GraphPad Software, Inc., La Jolla, CA, USA
- Igor, WaveMetrics, Inc., Lake Oswego, OR, USA
- TILLvisION 4.0, TILL Photonics

2.1.5 Verwendete Chemikalien

- Tyrode-Lösung:
Zusammensetzung (in mM) 135 NaCl, 5,4 KCl, 10 Glukose, 10 2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-Piperazinyl)-Ethansulfonsäure (HEPES), 1,8 CaCl, 1 MgCl, pH 7,35 mit NaOH
- Fura-2:
Dieser Indikator ist ein sogenannter ratiometrischer Kalziumindikator, er bildet mit Kalzium einen Chelatkomplex. Durch Binden an Kalzium verschiebt sich das Maximum der Absorption des Farbstoffes von 360 nm zu etwa 330 nm. Das Emissionsmaximum des Indikators liegt stabil bei 510 nm. Wird bei zwei verschiedenen Anregungswellenlängen wie z.B. 340 nm und 380 nm die Emission des Sensors gemessen, so kann die freie Kalziumkonzentration über den Quotienten der beiden Emissionsintensitäten bestimmt werden, da dieser (im Gegensatz zu der Fluoreszenz von Indikatoren wie Fluo 3 oder Calcium Green) unabhängig von der Konzentration des Farbstoffes ist. Die Spektren für den Kalzium-gebundenen und Kalzium-freien Zustand sind in Abbildung 2.1 dargestellt. Dieser Farbstoff wurde als membrangängiges Derivat Fura-2 Acetoxymethylester (AM) verwendet und musste zuerst in Pluronic F-127 (20% Lösung in Dimethylsulfoxid (DMSO)), Life

Technologies) gelöst werden. Die angesetzte Stammlösung hatte eine Konzentration von 1 mM.

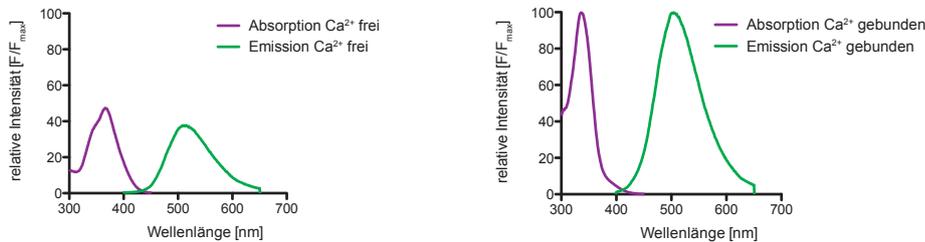


Abbildung 2.1: Absorptions- und Emissionsspektren des Kalzium Indikators Fura-2 (links) im Kalzium-freien und (rechts) im Kalzium-gebundenen Zustand, die Spektren wurden jeweils auf die maximale Fluoreszenz normiert (Daten von der Webseite des Herstellers <http://www.lifetechnologies.com/de/de/home/life-science/cell-analysis/labeling-chemistry/fluorescence-spectraviewer.html>, zuletzt eingesehen am 17.01.2014)

2.1.6 Versuchsaufbau und Durchführung

Für die Anregung des fluoreszenten Kalziumindikators wurde bei diesen Versuchen ein Monochromator verwendet. Die Software TILL Vision steuerte sowohl den Monochromator als auch die Datenakquise mittels einer CCD Kamera, dabei wurde nach jedem aufgenommenen Bild die Anregungswellenlänge gewechselt. Die Kardiomyozyten wurden für die Messungen wie in [106] beschrieben isoliert und bis zum Experiment in einem Inkubator bei 37°C und 5% CO₂, in Minimum Essential Medium (MEM)-Lösung, aufbewahrt. Für die Messung wurden die Zellen über einen Zeitraum von 30 Minuten mit dem membrangängigen Derivat Fura-2 AM beladen. Die Konzentration des Fura-2 AM betrug 1 μM in Tyrode-Lösung. Vor der Messung wurden die Zellen mit reiner Tyrode-Lösung überspült. Dann wurde 15 Minuten gewartet, um die Deesterifikation abzuschliessen. Um Messungen bei physiologisch relevanten Temperaturen durchzuführen, war das Mikroskop in einem auf 37°C heizbaren Gehäuse untergebracht. Während der Messung wurden die Zellen mit Tyrode superfundiert. Die Stimulation erfolgte mittels elektrischem Feld zwischen zwei Platinelektroden. Die rechteckigen Spannungspulse an den Elektroden hatten eine Länge von 5 ms und eine Amplitude von 6 V, wobei die Polarität nach jedem Puls umgekehrt wurde. In Vorversuchen wurde bestimmt, welche Frequenz von den Zellen toleriert wurde. Es zeigte sich, dass die Zellen bei einer physiologischen Stimulation von 6 Hz abstarben. Aus diesem Grund war die Stimulationsfrequenz während

der Versuche 4 Hz. Die Zellen unterlagen zwischen der Isolation und den Versuchen keiner elektrischen Stimulation. Aus diesem Ruhezustand wurden die ventrikulären Myozyten für 1 Minute bei 4 Hz repetitiv stimuliert, um ein dynamisches Gleichgewicht zu erreichen. Ein dreiteiliges Protokoll ermöglichte sowohl die Aufzeichnung der Kalziumhomöostase direkt nach Ruhe als auch während der Gleichgewichtsstimulation. Die Anregung des

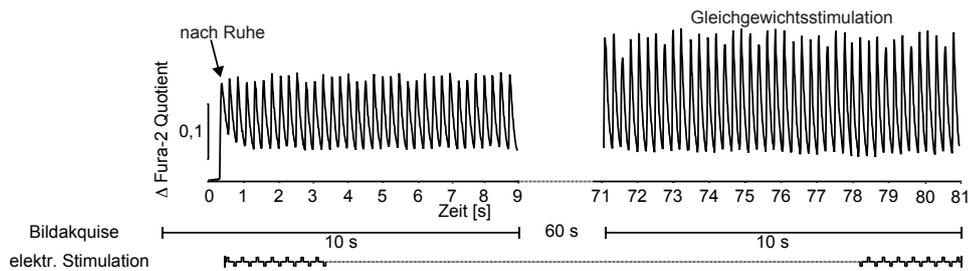


Abbildung 2.2: Schematische Darstellung des Versuchsablaufs zur schnellen Videobildgebung; Die Videoaufzeichnung mit 46 Hz startete kurz vor der elektrischen Stimulation mit 4 Hz, um so auch den ersten Transienten nach Ruhe zu erfassen. Nach 10 s stoppte die Aufzeichnung, die elektrische Stimulation wurde jedoch beibehalten. Weitere 60 s später wurde die Bildakquise wieder gestartet und es wurde für weitere 10 s die Fluoreszenz aufgezeichnet. Die elektrische Feldstimulation erfolgte dabei mit alternierender Polarisation.

Farbstoffs und die Detektion der Fluoreszenz mittels Kamera starteten, wie in Abbildung 2.2 dargestellt, schon vor der ersten elektrischen Stimulation. Nach etwa 40 Stimulationen stoppte die Akquise, die elektrische Stimulation wurde jedoch beibehalten, um die Zellen in einen Gleichgewichtszustand zu bringen. Nach einer Minute startete die Bildaufzeichnung wieder, wobei die Kamera für weitere 40 Stimulationen die Fluoreszenz detektierte. Nach dem Experiment wurde für beide Anregungswellenlängen ein Bild ohne Zellen aufgenommen, um den Hintergrund in der anschließenden Datenauswertung berücksichtigen zu können.

2.1.7 Computergestützte Datenauswertung

Zur automatisierten Auswertung der Daten, die in dem proprietären Datenformat (*.vws) der TILL Vision Software vorlagen, wurden verschiedene Programme benötigt. Es wurde ein modifiziertes Makro der Software Igor Pro verwendet. Dieses wurde von Dr. Qinghai Tian zur Verfügung gestellt und wird in seiner Dissertation [142] weiter beschrieben. Von dem Makro wurden folgende Parameter ermittelt:

- Amplitude des ersten Kalziumtransienten nach Ruhe

- Mittlere Amplitude der Transienten während Gleichgewichtsstimulation
- Länge des ersten Transienten nach Ruhe anhand der Zeit, die die Zelle benötigten, um die Kalziumkonzentration im Zytosol wieder um 80% der Transienten Amplitude zu senken. Dies wird im Folgenden auch *calcium transient duration 80*: (CTD80) genannt.
- Mittlere Länge der Transienten während Gleichgewichtsstimulation anhand der CTD80
- Ruhe Kalziumkonzentration vor der ersten Stimulation
- Diastolische Kalziumkonzentration während Gleichgewichtsstimulation

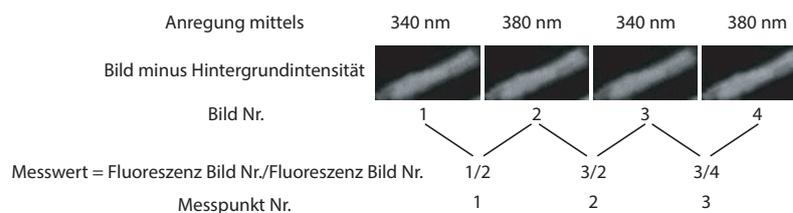


Abbildung 2.3: Berechnung der Kalziumtransienten; Die Werte der Kalziumkonzentration $c_{Ca}(t)$ ergaben sich aus den Kamerabildern, die alternierend mit den Anregungswellenlängen 340 nm und 380 nm aufgenommen wurden. Dazu wurde zuerst der entsprechende Hintergrund vom jeweiligen Bild abgezogen, anschließend wurde, wie oben gezeigt, der Quotient der Fluoreszenz aus der mittleren Fluoreszenz der Auswerteregionen gebildet

Die Auswertung mittels Igor erfolgte in drei Schritten. Zuerst subtrahierte das Makro die Hintergrundfluoreszenz bei den Anregungswellenlängen 340 nm und 380 nm von den entsprechenden Bildern. Mittels einer Auswerteregion (*region of interest* (ROI)) wurde dann für jedes Kamerabild die mittlere Fluoreszenz der relevanten Zellen bestimmt. Abbildung 2.3 erklärt wie die Messwerte, welche proportional zur Kalziumkonzentration sind, zustande kamen. Diese Werte wurden anschließend in einer Messspur gegen die Zeit aufgetragen (siehe Abb. 2.2). Aus diesen Spuren bestimmte das Makro automatisch die oben genannten Parameter. Die Werte der Parameter wurden mittels GraphPad Prism statistisch aufbereitet. Alle verwendeten Skripte und Makros befinden sich auf dem der Arbeit beiliegenden Datenträger.

2.2 Frequenzvariable Photolyse von Käfigsubstanzen mittels Zwei-Photonen-Absorption

2.2.1 Verwendete Materialien

- *acusto optical tunable filter* (AOTF) (MOD.nc, AA opto-electronic, AA SA, Orsay, Frankreich)
- Adapter 2,54 cm- auf Nikon-Objektiv-Gewinde (Thorlabs, Inc., Newton, NJ, USA)
- Arbiträrpulsgenerator (PulseStation; Teledyne LeCroy GmbH, Heidelberg, Deutschland)
- Autokorrektor inklusive externem Sensor (Carpe, APE Angewandte Physik und Elektronik GmbH, Berlin, Deutschland)
- Diodenlaser 2 [491 nm (Cobolt 85, Cobolt AB, Solna, Sweden) und 561 nm (Jive, Cobolt AB)]
- Dispersionskompensator (Femto, Control APE GmbH)
- Dividierer: Bestehend aus Schmitt-Trigger-Invertierer (SN74HC14N, Texas Instruments, Dallas, TX, USA) und gekoppeltem Binärwellenzähler (MC74HC4040AN, ON Semiconductor, Phoenix, AZ, USA)
- Irisblenden 2 (Thorlabs)
- Linsen, $f=25$ mm und $f=100$ mm in Teleskop (Thorlabs)
- Linsentubus, 20 cmx2,54 cm(Thorlabs)
- Kameras, Elektronen-multiplizierende CCD (EMCCD) 2 (iXon 887; Andor Technology plc., Belfast, UK)
- Mikroskop, invers (Eclipse TE2000-U, Nikon Corporation, Tokyo, Japan)
- Multistrahl-Konfokaleinheit (Infinity 4, VisiTech International, Sunderland, UK)
- Objektiv, 60x Plan APO numerische Apertur (N.A.) 1,49 (Nikon)
- Optischer Tisch (Thorlabs)
- *patch clamp*-Verstärker (EPC10, HEKA Elektronik Dr. Schulze GmbH, Lambrecht/Pfalz, Deutschland)

- Photodiode (DET10a, Thorlabs) lieferte *seed* Signal für den Pulspicker
- Pulspicker (Pulse Select; APE)
- Spiegel, E02 Thorlabs Verspiegelung 4 (Thorlabs)
- Spiegelhalter, bewegliche 4 (Thorlabs)
- Spiegel, dichroisch (650 nm Kurz-Pass (SP), AHF analysentechnik AG, Tübingen, Deutschland)
- Titan:Saphir (TiSa)-Laser, modengekoppelt (Chameleon XR, Coherent Inc., Santa Clara CA, USA)
- Verschlussystem, mechanisch minimale Öffnungszeit 15 ms gesteuert mit Transistor-Transistor-Logik (TTL)-Hoch-Pegel

2.2.2 Verwendete Software

- ImageJ 1.47 for MacOS X National Institutes of Health
- VoxCell 7 VisiTech International
- GraphPad Prism GraphPad Software

Um Missverständnissen vorzubeugen, ist es notwendig, der Liste der Chemikalien zwei Definitionen voranzustellen.

- Käfiggruppe
Als Käfiggruppe wird das Molekül bezeichnet, welches den biologisch aktiven Liganden inert macht gegenüber der Zelle.
- Käfigsubstanz
Als Käfigsubstanz wird der Verbund aus Käfiggruppe und dem Liganden bezeichnet.

2.2.3 Verwendete Chemikalien

- DM-Nitrophen:
DMNP ist ein Kalziumchelator dessen K_d -Wert durch Photolyse von etwa 4,5-5 nM auf 3 mM [71, 39] ansteigt. Durch Photolyse wird somit die Kalziumkonzentration angehoben. Das Maximum der Ein-Photonen-Absorption liegt bei 350 nm. Der Zwei-Photonen-Absorptionsquerschnitt wird in der Literatur mit 0.01-0.013 GM bei 730 nm angegeben [25, 39]. Die Quanteneffizienz, also die Wahrscheinlichkeit, dass

eine angeregte DMNP-Käfiggruppe zerfällt, beträgt 18% [39]. Dabei muss das angeregte DMNP mehrere Zerfallsschritte durchlaufen. In einem linearen Fit beträgt die Halbwertszeit hierfür 18.2 μ s. DMNP wurde 1987 von Graham C.R. Ellis-Davies entwickelt und ist kommerziell verfügbar. Merck-Millipore (Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland) verkauft den Chelator unter dem Markennamen DM-Nitrophen (als Salz mit 4 Na^+) während er von Life Technologies (Carlsbad, CA, USA) als DMNP-EDTA (als Säure) vertrieben wird. Der K_d -Wert für Magnesium beträgt 2,5 μ M [71], was jedoch in Kardiomyozyten von großer Bedeutung ist, da diese eine freie Magnesiumkonzentration von ca. 1,3 mM aufweisen [53]. Die Effektivität des Chelators bei „normalen“ Magnesiumkonzentrationen in Kardiomyozyten wurde diskutiert [38, 138]. Bei einer gesamt Magnesiumkonzentration von ca. 5 mM (freie Magnesiumkonzentration ca. 1 mM) waren sowohl die Fähigkeit des DMNP das Kalzium zu puffern als auch die Effizienz der Kalzium-Freisetzung stark eingeschränkt (Daten nicht in dieser Arbeit). DMNP wurde in einer Konzentration von 50 mM in Reinstwasser gelöst und aliquotiert tiefgefroren. Der pH-Wert der Flüssigkeit musste erst mittels KOH oder NaOH in einen neutralen Bereich angehoben werden, da sich die Säure sonst nicht vollständig löste.

- Fluo 4:

Fluo 4 ist ein Kalziumindikator, der auf 1,2-Bis(O-Aminophenoxy)ethan-N,N,N',N'-Tetraessigsäure (BAPTA) basiert. Er ist verwandt mit Fluo 3 und Fluo 8. Er wurde als Kaliumsalz und als AM bei Life Technologies erworben. Das Salz wurde in Reinstwasser gelöst. Zur

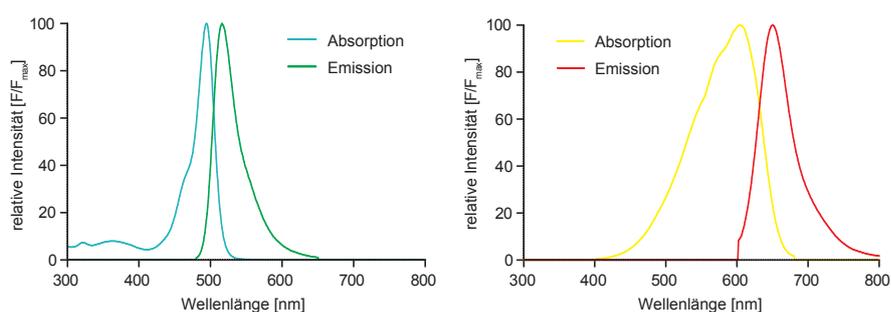


Abbildung 2.4: Absorptions- und Emissionsspektren des Kalzium Indikators Fluo 4 (links) und des Mitochondrien markierenden Farbstoffes MitoTracker® Red FM, die Spektren wurden jeweils auf die maximale Fluoreszenz normiert (Daten von der Webseite des Herstellers <http://www.lifetechnologies.com/de/de/home/life-science/cell-analysis/labeling-chemistry/fluorescence-spectraviewer.html>, zuletzt eingesehen am 17.01.2014)

Verwendung mit intakten Zellen wurde die Variante Fluo 4 AM erst in Pluronic F-127 (20% (w/v) Lösung in DMSO, Life Technologies) gelöst. Die Stammlösungen hatten eine Konzentration von 1 mM. Das Absorptionsspektrum von Fluo 4 hat ein Maximum bei 494 nm, die Emission ist maximal bei 506 nm: die Spektren sind in Abbildung 2.4 zusammengefasst. Fluo 4 wurde ausgewählt, da es einen K_d -Wert hat, der in einem physiologisch relevanten Bereich liegt (*in vitro* 345 nM [51], *in situ* ca. 1000 nM [141]) und da es eine schnelle Bindungsrate mit Kalzium aufweist ($6 \times 10^5 \text{ s}^{-1} \text{ mol}^{-1}$ [124]).

- Fluoreszein, CMNB-caged :
Dieses von Life Technologies bezogene Fluoreszein wurde durch die Käfiggruppe bis-(5-Carboxymethoxy-2-Nitrobenzyl) (CMNB) so verändert, dass es keine Photolumineszenz zeigt. Erst nach Photolyse durch UV-Licht bei einer Wellenlänge von 355 nm kann es durch 488 nm Licht zur Fluoreszenz angeregt werden. Es wurde verwendet, um möglichst direkt Photolyse und Diffusion zu beobachten, da es im Gegensatz zu freigesetztem Kalzium keinen weiteren Indikator zur Detektion benötigt. Die verwendete Konzentration betrug 3 mM, sowohl bei Versuchen in Zellen als auch *in vitro*. CMNB-caged Fluoreszein wurde schon von Soeller et al. [133] zum Evaluieren der Freisetzung durch Zwei-Photonen-Photolyse verwendet.
- Fluoreszein, Dextran MW 10000:
Fluoreszein ist ein Farbstoff mit einem Absorptionsmaximum bei ca. 485 nm und einem Emissionsmaximum bei 514 nm. Es hat eine Fluoreszenzlebensdauer von ca. 4 ns. Verwendet wurde ein Fluoreszein, das an eine 100000 Atomeinheiten schwere Dextranskette (Mehrfachzucker) gebunden ist. Dies hat den Vorteil, dass das Molekül eine niedrigere Diffusionsrate aufweist und nicht an Proteine bindet.
- HPTS, NPE-caged:
NPE-caged HPTS ist ein von Tocris (Tocris Bioscience, Bristol, UK) verkauftes, mit einer 8-1-(2-Nitrophenyl)Ethylester (NPE) Käfiggruppe verbundenes Derivat des pH-Sensors 8-Hydroxy-1,3,6-Pyrentrisulfonsäuretrinitratsalz (HPTS). Erst nach Photolyse mittels UV-Licht der Wellenlänge 350 nm, kann das freigesetzte HPTS mit Licht der Wellenlänge 410 nm angeregt werden. Je nach pH-Wert ist diese Anregung mehr oder weniger effektiv. Dieser Indikator wurde schon in einer Publikation für die Evaluierung von Zwei-Photonen-Photolyse verwendet [73, 133, 146, 110, 107]. Auch diese Käfigsubstanz hat den Vorteil, dass die Freisetzung direkt über die Fluoreszenz detektiert werden kann. Sie wurde in einer Konzentration von 3 mM verwendet.

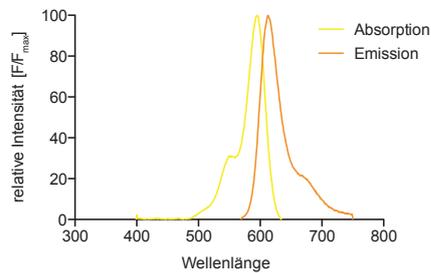


Abbildung 2.5: Absorptions- und Emissionsspektren von Texas Red, die Spektren wurden jeweils auf die maximale Fluoreszenz normiert (Daten von der Webseite des Herstellers <http://www.lifetechnologies.com/de/de/home/life-science/cell-analysis/labeling-chemistry/fluorescence-spectraviewer.html>, zuletzt eingesehen am 17.01.2014)

- MitoTracker® Red FM:
MitoTracker® Red ist ein Mitochondrien-selektiver Farbstoff, welcher membrangängig ist und von Life Technologies bezogen wurde. Zur Vorbereitung musste das gelieferte Produkt in DMSO gelöst werden. Die Konzentration der so erhaltenen Stammlösung betrug 1 mM. Zum Anfärben der Mitochondrien wurden die Kardiomyozyten in Tyrodelösung mit in einer Konzentration von 1 μ M MitoTracker® Red für 40 Minuten inkubiert. Die optimale Anregungswellenlänge war 581 nm. Die Emission erfolgte in einem breiten Spektrum zwischen 600 nm und 800 nm mit einem Maximum bei 644 nm (Spektren in Abbildung 2.4). Dieser Farbstoff ermöglichte es, die Integrität der Mitochondrien zu prüfen, wenn diese hohen Intensitäten des Photolyselasers ausgesetzt wurden.
- Texas Red Dextran MW 3000:
Ist ein auf Rhodamin basierender Farbstoff von Life Technologies. Er kann zusammen mit Indikatoren wie Fluo 4 oder Fluo 8 eingesetzt werden, da er, wie die Spektren in Abbildung 2.5 zeigen, bei etwa 586 nm angeregt wird und eine Emission bei über 600 nm besitzt.

2.2.4 Aufbau des Zwei-Photonen-Systems zur Photolyse

Der Zwei-Photonen-Photolyse-Aufbau, wie er in Abbildung 2.6 skizziert wurde, stand komplett auf einen schwingungsfrei gelagerten Tisch. Der Puls picker diente dazu, die Laserrepetitionsrate zu variieren. Ein interner Frequenzteiler ermöglichte eine Änderung der Repetitionsrate von 4,5 MHz bis 18 kHz. Extern lies sich der Puls picker, zum Picken von Einzelpulsen, mit

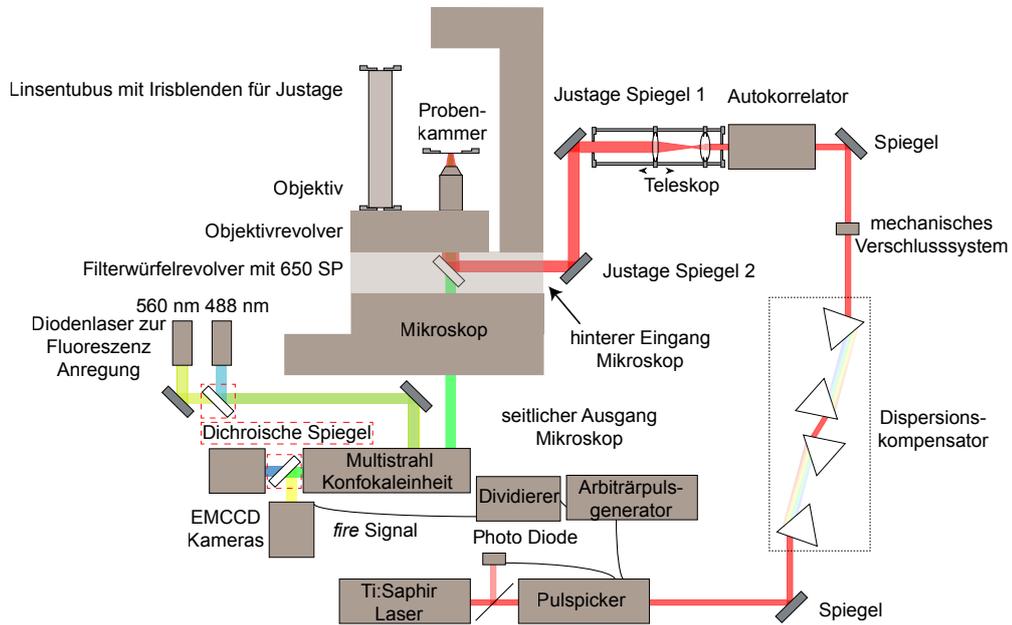


Abbildung 2.6: Skizziert ist der Aufbau zur Zwei-Photonen-Photolyse mittels dessen es möglich war, eine definierte Zahl an Laserpulsen zur Photolyse von Käfigsubstanzen zu verwenden (Eine detaillierte Beschreibung ist im Text auf Seite 25 zu finden+)

einer Frequenz von 1 Hz bis 6 MHz auslösen. Eine Photodiode synchronisierte den Pulspicker mit der Pulsrate des Lasers. Durch den Dispersionskompensator konnte die Pulslänge angepasst werden, was sich mittels des Autokorrelators überprüfen lies. Die beweglichen Teleskoplinsen weiteten den Laserstrahl auf, so dass dieser die Rückapertur des Objektivs ausfüllte. Ein Tubus mit zwei Irisblenden, in den Objektivrevolver geschraubt, diente

Tabelle 2.1: Kennwerte des Chameleon XR

Wellenlängen	Pulslänge	Wiederholrate	Ausgangsleistung
705 nm - 980 nm	>130 fs	90 MHz	0,9 W - 2 W

dazu, den TiSa-Laser auf die optische Achse des Mikroskops einzujustieren. Zur Bildgebung wurde eine Multistrahl-Konfokaleinheit mit gekoppelten Diodenlasern verwendet. Die parallele Verwendung von vielen Pinholes in der Konfokaleinheit machte hierbei eine konfokal gefilterte Weitfeldaufnahme mittels Kamera möglich. Ein dichroischer Spiegel zwischen den Kameras wurde verwendet, um die Emission in zwei spektralen Bereichen getrennt aufnehmen zu können. Der *patch clamp*-Verstärker diente zum Starten und Stoppen der Experimente. Die von der Software gesteuerte Kamera gab wäh-

rend der Aufnahme als Auslösesignal einen TTL-Hoch-Pegel, das sogenannte *fire* Signal, aus, welches in Zusammenhang mit der Belichtungszeit der Kamera stand. Dieses Signal löste den Arbiträrpulsgenerator aus, welcher zur externen Steuerung des Pulspickers verwendet wurde. Um das Kamera *fire* Signal in der Frequenz variieren zu können und die Signalqualität zu verbessern, wurden ein Schmitt-Trigger-Inverter und ein Frequenzteiler verwendet.

2.2.5 Optimierung der Zwei-Photonen-Photolyse

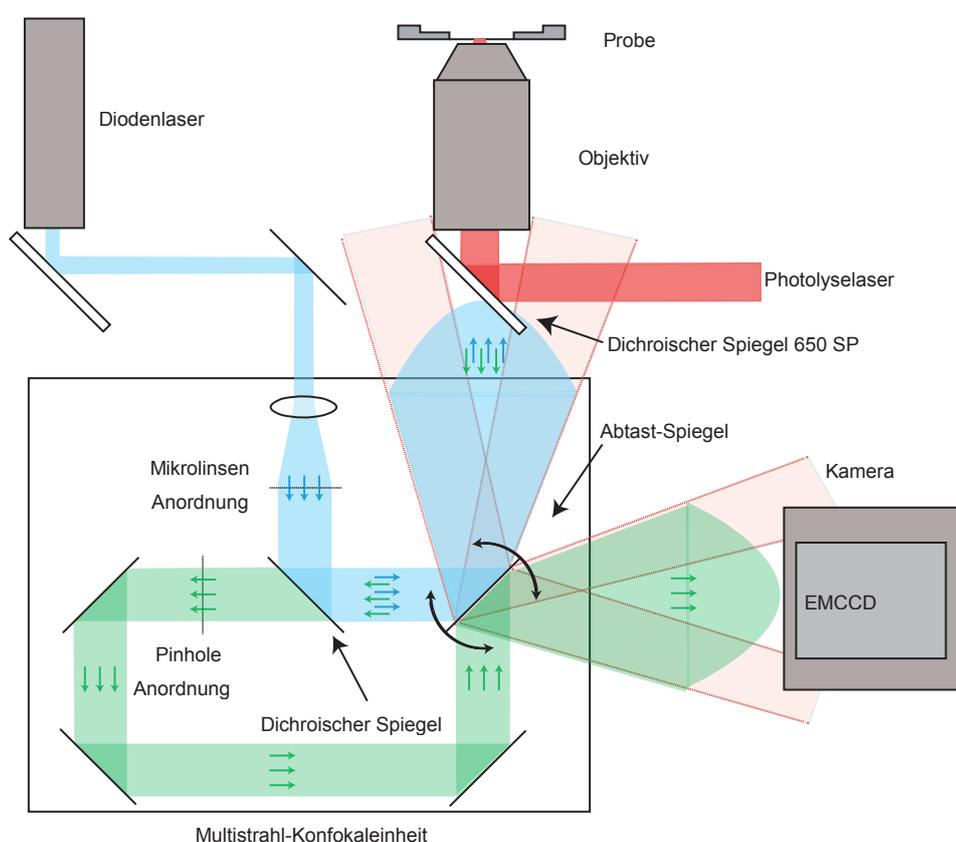


Abbildung 2.7: Skizze der Arbeitsweise der VisiTech Infinity 4 Konfokaleinheit. Der Abtast-Spiegel schwang periodisch, um die Probe mittels des Laserstrahls abzutasten; die emittierte Fluoreszenz wurde spektral durch einen dichroischen Spiegel und konfokal durch die Pinhole Anordnung gefiltert und auf die reflektierende Rückseite des Abtast-Spiegels geleitet, welche das Fluoreszenzsignal auf den Chip der EMCCD Kamera abbildete. Im hellrot markierten Bereich, konnte die Kamera kein Bild aufnehmen. Wenn der Photolyselaserstrahl während der Zeit eingestrahlt wurde, in der sich der Spiegel in einer solchen Position befand, konnte die Kamera keine Zwei-Photonen-angeregte Fluoreszenz detektieren

Ein in einigen Experimenten verwendetes mechanisches Verschlusssystem hatte eine minimale Öffnungszeit von 15 ms. Nach Kiskin et al. [73] und den in dieser Arbeit durchgeführten Simulationen (siehe Abschnitt 3.2.1), gewährleisteten solch lange Pulszüge keine räumlich auf den Fokus begrenzte Freisetzung. Um dieses Problem zu umgehen, wurde ein Arbiträrpuls-generator verwendet, um mit variabler Frequenz den Pulspicker auszulösen. Dies konnte entweder *gegated* erfolgen, d.h. während eines TTL-Hoch-Pegels war der Arbiträrpuls-generator aktiv, oder in Form eines sogenannten *bursts*, der eine feste Zahl an Pulsen generierte, nachdem ein Hoch-Pegel eingegangen war. Im Hinblick auf die besondere Arbeitsweise der verwendeten Konfokaleinheit ergab sich mittels dieses System eine sehr interessante Methode der Photolyse. Dabei wurde mit Hilfe einer definierten Zahl an Laserpulsen die Käfigsubstanz angeregt, ohne dass die (bei der Photolyse mittels gepulster Laserstrahlen in biologischen Proben immer vorhandene) Autofluoreszenz durch Zwei-Photonen-Anregung von der Kamera detektiert werden konnte. Die Steuerung der Konfokaleinheit besaß zwei Modi der Abtast-Spiegel-

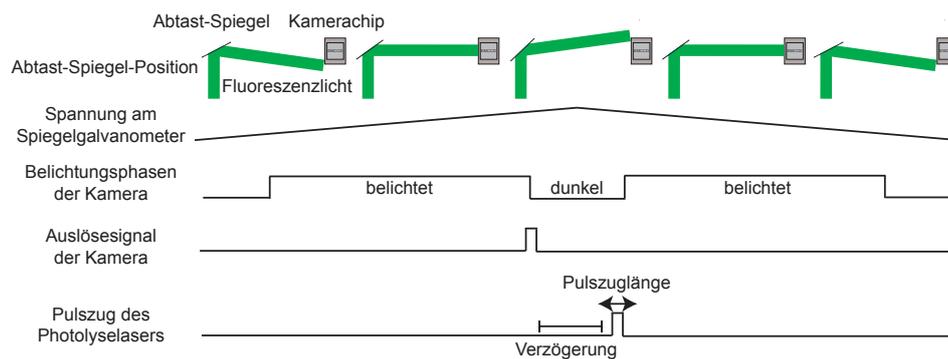


Abbildung 2.8: Phasen während der Bildaufnahme an der Konfokaleinheit Infinity 4 mit einer Kamera beim Abtasten im *brightfield* Modus, während die Spannung des Galvanometers, an dem der Abtast-Spiegel befestigt war, periodisch schwang, wurde die Kamera zweimal beleuchtet. In der Phase dazwischen konnte, ausgelöst durch das Kamera fire Signal, eine Photolyse durchgeführt werden, ohne dass die Kamera eine *two-photon excited fluorescence* (TPEF) detektierte. Mittels der Verzögerung, die am Arbiträrpuls-generator eingestellt wurde, war es zudem möglich, das Ende des Photolyselaserpulszuges bis auf wenige ns an die nächste Belichtungsphase der Kamera heranzubringen

Umkehr, um unterschiedlichen Beleuchtungsarten Rechnung zu tragen. Der Fluoreszenz-Modus war für den Einsatz mit Laserstrahlen gedacht, die in der Intensität zwischen 0% und 100% durch die Konfokaleinheit gesteuert werden konnten. Hierbei modulierte das Steuersystem die Intensität der Laserstrahls mittels des AOTFs, um eine ungleichmäßige Beleuchtung, durch das periodische Umkehren des Abtast-Spiegels zu vermeiden. Dies wäre mit

einer nicht von der Software steuerbaren Lichtquelle unmöglich, daher existierte zusätzlich der sogenannte *brightfield* Modus, in dem das Umkehren des Abtast-Spiegels in einem Bereich stattfand, in dem keine Beleuchtung des Detektors erfolgte (siehe hierzu auch die Skizze in Abbildung 2.7 und die Grafik 2.8). Während dieser Phase war es möglich, in der Probe zu Photolysieren, ohne dass die Kamera dabei eine durch den Zwei-Photonen-Laserstrahl angeregte Fluoreszenz detektieren konnte. Dies ist von Bedeutung, da es durch den intensiven gepulsten Laser in fast allen organischen Medien zu Fluoreszenz kommt. Wenn z.B. die mittels 488 nm angeregte Fluoreszenz von Fluo 4 verwendet wird (um die Kalziumkonzentration zu messen) ist die TPEF des Fluo 4, sowie zelleigener Moleküle, durch den Photolyselaser hinderlich für die exakte Bestimmung der Kalziumkonzentration. Sollte auf diese Weise photolysiert werden, so war zu beachten, dass die Zeit, die der Abtast-Spiegel für das Umkehren der Bewegungsrichtung benötigte, die maximale Pulszuglänge vorgab.

Abfolge der Photolyse

1. Die Kamera sendete das *fire* Signal, welches eine neue Bildaufnahme anzeigte
2. Dieses Signal löste den Pulsgenerator aus
3. Woraufhin dieser eine elektrische Signalfolge mit n TTL-Hoch-Pegeln ausgab
4. Diese n TTL-Hoch-Pegel lösten den Pulspicker aus, der daraufhin pro TTL-Hoch-Pegel einen Laserpuls auf die Probe lenkte.

Um exakt die Zeitperiode zu nutzen, während derer der Abtast-Spiegel kein Licht auf die Kamera lenkte, konnte an dem Arbiträrpulsgenerator die Verzögerung (*delay*) zwischen dem Eintreffen des Auslösesignals und der Ausgabe der TTL-Hoch-Pegel verändert werden. Um die Verzögerung richtig einzustellen, kann die TPEF eines Farbstoffes verwendet werden. Die Verzögerung des TTL-Hoch-Pegel wurde so gewählt, dass die Zwei-Photonen-Fluoreszenz, z.B. von Fluoreszein, nicht mehr mit der Kamera detektierbar war. Verschwand das Fluoreszenzsignal bei keiner einstellbaren Verzögerung, so war der Pulszug länger als die Dunkelzeit der Kamera und musste entsprechend verkürzt werden. Sobald die gewünschte Pulszahl eingestellt war, musste die Verzögerung systematisch vergrößert werden, um das Ende des Laserpulszugs zeitlich möglichst nahe an das nächste Bild heranzubringen. Um nicht zwischen allen aufgenommenen Bildern zu photolysieren, wurde dem Auslösesignal eine Elektronik (Schaltbild siehe 2.9) vorgeschaltet, die

die Frequenz durch Potenzen von zwei teilte. Es waren Divisionen bis zu 2^{12} möglich, was bedeutete, dass nur jedes 4096ste Kamerasignal eine Photolyse auslöste. Da das *fire* Signal der Kamera nicht exakt einer Rechteck-

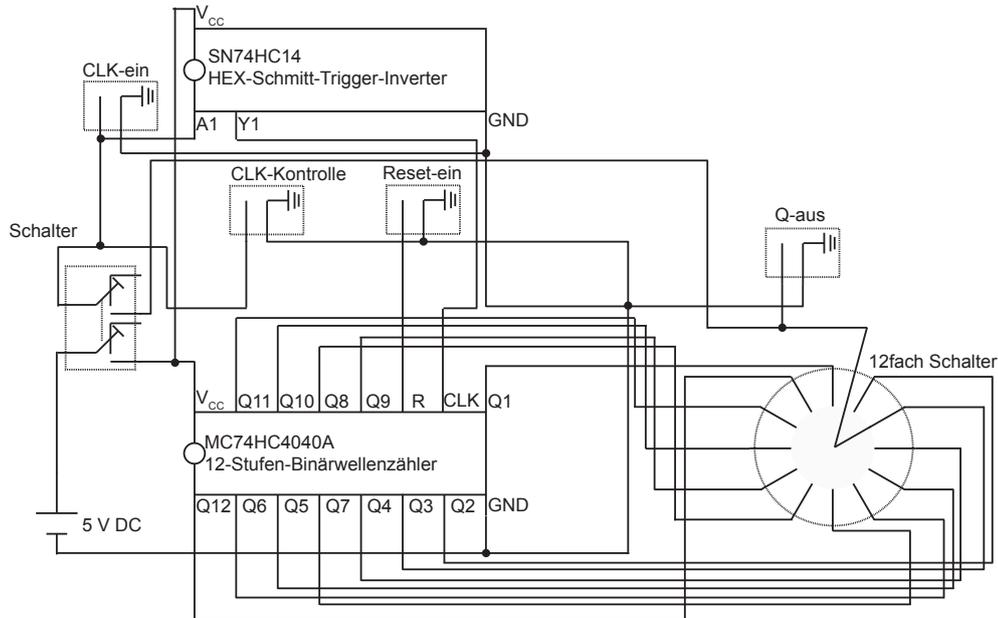


Abbildung 2.9: Schaltplan für Dividierer bestehend aus einem Schmitt-Trigger-Invertierer, zur Bereinigung des Eingangssignals, und einem Binärwellenzähler, welcher die eigentliche Frequenzkonversion des Kamera *fire* Signals vornahm

spannung folgte, sondern fluktuierende Störungen der Spannungen aufwies, wurde dem Dividierer ein Schmitt-Trigger-Invertierer vorangestellt. Dieser hat für Ein- und Ausschaltvorgänge unterschiedliche Spannungsschwellen, so dass die Stabilität des Dividierer-Ausgangssignals verbessert wurde.

2.2.6 Justage des Zwei-Photonen-Photolyse-Aufbaus

Um einen reibungslosen Versuchsablauf zu gewährleisten, war es vor jedem Versuch notwendig, folgende Justageschritte durchzuführen.

Das Signal zur Synchronisation von Laserpulsen und Pulspicker musste bei jedem Verwenden des Pulspickers kontrolliert werden, da die Diode batteriebetrieben war. Eine zu starke Entladung der Batterie verhinderte die Synchronisation des Pulspickers mit den Laserpulsen. Als Folge hiervon war die mittlere Leistung des gepickten Laserstrahls beeinträchtigt. Des Weiteren kam es durch einen Wechsel der Laserwellenlänge zu einer leichten Verschiebung des Strahlweges, so dass der Laserstrahlreflex die Diode nicht

mehr traf.

Die Effizienz des Pulspickers sollte anhand der Leistung mittels Standardwerten kontrolliert werden, um die optimale Alignierung, wie im Handbuch des Pulspickers beschrieben, zu überprüfen.

Im nächsten Schritt musste verifiziert werden, ob der Laserstrahl das Prismenpaar frei passieren konnte. Die notwendigen Schritte zur Justage sind im Handbuch des Pulscompressors zu finden.

Die Länge der Laserpulse ist nach Gleichung 2.10 wichtig für die Photolyseeffizienz, somit war es notwendig, diese zu messen und zu optimieren. Die Justage der unterschiedlichen Strahlwege erfolgte hierzu auf die Aperturen des Autokorrelators, da dieser auf dem optischen Tisch positioniert und somit besser zugänglich war als die Aperturen des Linsentubus im Mikroskop. Eine exakte Ausrichtung auf die Aperturen des Autokorrelator war des Weiteren unumgänglich, wenn dieser auch verwendet werden sollte. Diese Justage reduzierte zudem den Aufwand, falls Umbauten am System direkt vor dem Mikroskop, wie z.B. durch Einbringen eines dichroischen Spiegels für einen UV-Laser, erfolgten. Da die zur Photolyse verwendeten Objektive mit hoher N.A. (z.B. Nikon 60x Plan APO N.A. 1,4 und Nikon 60x TIRF N.A. 1,49 Arbeitsabstand 0,12 mm-0,13 mm) einen zu geringen Arbeitsabstand ($<0,25$ mm) für den Messkopf des Autokorrelators aufwiesen, wurde die zur Kompensation nötige Einstellung der Prismen mittels eines Luft-Objektivs der Firma Nikon (40x Plan Fluor ph2 N.A. 0,6) mit 2,3-3,7 mm Arbeitsabstand ausgeführt. Da diese Methode, aufgrund der Unterschiede von Luft- und Immersionsobjektiven, fehlerbehaftet war, musste anhand einer Messung der Anregungseffizienz von Fluoreszein die Prismenposition kontrolliert und optimiert werden. Dazu wurde die Prismenposition schrittweise geändert, während das Fluoreszein mittels des gepulsten TiSa-Laserstrahls angeregt und die vom Fluoreszein emittierte Fluoreszenz gemessen wurde. Die Intensität der Fluoreszenz I wird gegen die Prismenposition r aufgetragen, woraus sich die Funktion $I(r)$ ergibt. Die optimale Einstellung der Prismen ergibt sich anhand des Maximums von $I(r)$.

Eine maximale Zwei-Photonen-Absorption kann nur durch einen optimierten Fokus gewährleistet werden. Die Fokusgröße im beugungsbegrenzten Fall berechnet sich nach dem Auflösungsvermögen des Objektivs in Gleichung 2.1. Aus diesem Grund wurde die Photolyse in den Experimenten immer nahe des Deckplättchens der Messkammer durchgeführt, da zum einen das Objektiv auf diesen Abstand optimiert ist und zum anderen die Lösung in der Messkammer eine niedrigere optische Dichte aufweist als das Glas und das mit den Objektiven verwendete Immersionsöl, was zu größeren Foki führt.

$$\text{Auflösungsvermögen } d = \frac{\text{Wellenlänge}}{\text{optische Dichte} \cdot \text{numerische Apertur}} \quad (2.1)$$

Zudem konnten zwei bewegliche Linsen (Abtast-Linse und Bild-Linse) in einem Halterungssystem dazu verwendet werden, die Kollimation des Laserstrahls sowie dessen Strahldurchmesser auf die Rückapertur des Objektivs abzustimmen. Optimalerweise sollte der Durchmesser des Laserstrahls ein Vielfaches der Rückapertur betragen. Da hierdurch jedoch ein Großteil der Leistung des Laserstrahls nicht die Probe erreicht, wurde der Strahldurchmesser gleich dem Durchmesser der Apertur gewählt. Zwei Spiegel hinter dem Teleskop erlaubten, es den Laserstrahl unabhängig von der Bild-Linsen-Position auf die in den Objektivrevolver geschraubten Aperturen nachzujustieren. Mit Hilfe dieses Teleskopes konnte über die Divergenz des gepulsten Laserstrahls dessen Fokus bezüglich des Objektivfokus variiert werden. Hierdurch wurde sichergestellt, dass die Fokusebene des Lasers zur Detektion, der die Konfokaleinheit passierte, auch den Fokus des Photolyslaserstrahls enthielt und somit Parfokalität erzielt wurde. Es musste also ein Protokoll erstellt werden, welches diese Justage standardisierte. Um die Divergenz einzustellen wurde die Linse in dem Käfigsystem um jeweils eine bestimmte Distanz verschoben, die paraxiale Justage kontrolliert und danach der Fokus, bzw. die Effektivität der Zwei-Photonen-Absorption, gemessen.

Zum Ermitteln der Fokusgröße wurde wiederum die Fluoreszenz von Fluoreszein, durch Anregung mittels des gepulsten TiSa-Laserstrahls, gemessen. Ein piezo-getriebener Objektivhalter, der Bewegungen über eine Distanz von $100 \mu\text{m}$ mit einer Schrittweite von 100 nm ermöglichte, senkte das Objektiv während dieser Messung ab. Damit verschob sich der Anregungsfokus aus dem Fluoreszein in das Deckglas. Beim Überstreichen dieser Grenze nimmt die Fluoreszenz ab. Wird die detektierte Fluoreszenz gegen die Objektivposition aufgetragen, so ergibt sich $F(z)$ wenn z die Richtung der optischen Achse ist. Nach der Berechnung von $\frac{d}{dz}F(z)$ mittels finiter Differenzen und approximiert mit einer Gaussfunktion, ergibt sich direkt die Intensitätsverteilung des Laserfokus in z -Richtung. Hieraus kann mittels des Wertes $1/e \cdot F(z)_{max}$ die Fokusslänge bestimmt werden. Das Maximum $F(z)_{max}$ gibt dabei die optimale Position der Linse zur Justage des Photolyselaserfokuses gegenüber dem Fokus der konfokalen Detektion an.

Wird ein Querschnitt durch das Fluoreszenzbild, in x - oder y -Richtung, erstellt, so kann die Intensität des Laser in der jeweiligen Richtung angenähert werden. Die Intensitätsverteilung wurde unter Zuhilfenahme des *curve fitting tools* in Matlab approximiert. Für die x - und y -Ausdehnung wurde die Summe aus zwei Gaussfunktionen zur Approximation verwendet, da dies ein niedrigeres χ^2 ergab als eine einfache Gaussfunktion. Eine ausführliche Behandlung der Thematik multistrahl-konfokale Bildgebung und *point spread function* (PSF) findet sich bei Egner et al. [37] sowie bei Fewer et al. [44]. Nach diesen Schritten wurde es notwendig, die Funktionalität des Frequenzteilers zu prüfen, wenn mit einer definierten Zahl an Laserpulsen photolysiert

werden sollte. Am einfachsten war dies mittels der Zwei-Photonen-Anregung von Fluoreszein. Dazu wurde eine Verzögerung gewählt, die die Laseranregung nicht „versteckte“ (s.o.). Anschließend konnten Bildserien aufgenommen werden und die Abstände der Laserpulsszüge anhand der Bilder gewählt werden.

2.2.7 Versuchsprotokolle zur Zwei-Photonen-Photolyse

In vitro Versuche

Agarosegele wurden verwendet, um möglichst stabile und vor allem reproduzierbare Umgebungen für die im Folgenden beschriebenen *in vitro* Experimente zu gewährleisten. Dies war besonders wichtig, um die Effizienz des photolytischen Prozesses zu bewerten, den Aufbau zu testen, Störungen zu identifizieren und die Justage des Photolyselasers zu überprüfen. Die Agarosegele mit 2,5% (w/v) Agarose wurden mit 100 mM KCl und 10 mM HEPES in Reinstwasser angesetzt. Der pH-Wert der Lösung wurde vor dem Einrühren des Agarosepulvers auf 7,35 eingestellt. Zum Mischen mit den Käfigsubstanzen wurde eine Experimentkammer erwärmt und die flüssige Agaroselösung mit den Substanzen kurz (maximal 3 s) vermischt. Anschließend wurde die lichtgeschützte Experimentierkammer für 20 Minuten in einen auf 60°C beheizten Wärmeschrank gestellt. Nach einem erneuten Durchmischen wurde die Kammer wiederum für 20 Minuten in den Wärmeschrank gestellt, um in dem Gel eingeschlossene Luftbläschen zu entfernen.

Mit NPE-HPTS und CMNB-caged Fluoreszein wurde getestet, welche Leistungen notwendig waren, um durch die EMCCD-Kamera detektierbare Freisetzungen zu bewirken. Dazu wurde eine Leistung zu der jeweiligen Laserpuls-Pickrate gewählt und mit einem festen Abstand mehrere Pulsszüge des Photolyselaserstrahls auf das in Agarose eingebettete CMNB-caged Fluoreszein eingestrahlt. Hierbei detektierte die Konfokaleinheit mit Hilfe der Kamera die Fluoreszenz. Diese Vorversuche waren notwendig, um einen Parameterraum für die Simulationen und die Versuche in Zellen zu bestimmen. Da die Akquisitionsrate (je nach gewählter Kameraauflösung) bei den Versuchen variierte, wird diese, wie auch die Parameter Leistung und Pulszuglänge, im Kapitel 3 bei dem jeweiligen Experiment angegeben.

Zellschäden

Es können unterschiedliche Schädigungen an Zellen auftreten. Zum einen sind Rupturen der Zellmembranen [5], welche sich unter Umständen auch wieder verschließen, oder Schäden an Zellorganellen [127], möglich. Zum anderen können durch den Photolyselaser zytotoxische Stoffe erzeugt werden, die eine Apoptose der Zelle einleiten. Um Schäden an der Membran und den

Organellen zu bewerten, wurden Versuche mit HEK und Kardiomyozyten von Ratten durchgeführt.

Bei der Kultivierung der HEK Zellen unterstützte mich freundlicherweise Xin Hui. Die *human embryonic kidney* (HEK)-Zellen wurden nach der Entnahme aus den Zellkultur-Platten 40 Minuten in Tyrodelösung (Zusammensetzung siehe auch 2.1.2) mit Fluo 4 AM ($1 \mu\text{M}$) inkubiert. Nach dem Beladen wurden die Zellen mit frischer Tyrodelösung superfundiert und es wurde weitere 15 Minuten bis zum Experiment gewartet. Die HEK-Zellen wurden im Experiment wiederholt Laserpulsszügen von 100 ms Länge ausgesetzt. Die Laserrepetitionsrate betrug dabei 4,5 MHz und 1,1 MHz bei gleicher Spitzenleistung. Die mittlere Leistung betrug, bei 1,1 MHz, 1 mW an der Probe. Die Experimente wurden bei einer Wellenlänge von 730 nm durchgeführt. Die Bildrate der Kamera betrug 50 Hz.

Die Herzmuskelzellen wurden mit MitoTracker® Red FM ($1 \mu\text{M}$ in Tyrode) inkubiert, um die Mitochondrien mit dem Farbstoff zu beladen. Auch hier wurde vor dem Experiment auf die Deesterifikation gewartet. Der Fokus des PhotolyseLasers war in den Experimenten auf die Mitochondrien gerichtet. Dabei fanden Tests mit den Pulsraten 250 kHz, 1,1 MHz und 90 MHz statt. Die Spitzenintensität des Lasers war bei 250 kHz und 1,1 MHz gleich. Die mittlere Leistung an der Probe betrug $250 \mu\text{W}$ im Fall von 250 kHz und 1 mW bei 1,1 MHz. Die Spitzenleistung bei 90 MHz betrug $1/13$ der Spitzenintensität bei den anderen Laserraten. Die mittlere Leistung an der Probe betrug 7 mW. Die durch das mechanische Verschlussystem geregelte Zeit, in der die Laserpulse auf die Mitochondrien einwirkten, betrug 20 ms. Die Wellenlänge des Lasers war 730 nm. Die Bildrate der Kamera betrug 10 Hz.

Photolytische Freisetzung von HPTS

Die ersten Versuche wurden mit der Unterstützung von Dr. Martin Oberhofer durchgeführt. Hierbei wurde das Zytosol der Zellen mit Hilfe von Mikropipetten mit der benötigten Käfigsubstanz beladen. Die Zusammensetzung der verwendeten intrazellulären Lösung war (in mM) 135 KCl, 10 NaCl, 15 HEPES, 3 NaATP. Für die Versuche aus Abschnitt 3.2.6 verwendeten wir eine Konzentration von 3 mM NPE-caged HPTS. Für die Anregung des freigesetzten HPTS wurde 1 mW (an der Probe) bei 491 nm verwendet. Die Belichtungszeit der Kameras betrug 50 ms und die Öffnungszeit des mechanischen Verschlussystems betrug 100 ms.

Photolytische Freisetzung von Kalzium

Bei späteren *in vivo* Versuchen wurden permeabilisierte Zellen verwendet. Um die Kardiomyozyten zu depolarisieren und die Kalziumbeladung des SR zu reduzieren, wurde eine Equilibrierungslösung (pH-Wert 7,2 mit KOH) verwendet, die (in mM) 100 Kalium L-Asparaginsäure, 20 KCl, 0,5 Ethylen-glykol-Bis(aminoethylether)-N,N,N',N'-Tetraessigsäure (EGTA), 10 HEPES und 0.75 MgCl₂ enthielt. Während der Versuche waren die Zellen von einer intrazellulären Lösung (pH-Wert 7,2 eingestellt mit KOH) superfundiert, die sich zusammensetzte aus (in mM) 100 Kalium L-Asparaginsäure, 15 KCl, 0,5 EGTA, 10 HEPES, 5 KH₂PO₄, 10 Phosphokreatin di-Natrium Salz, 3 Na₂ATP und 8% Dextran. Zur Permeabilisierung wurden für 40 s 5 µg/ml Saponine (Santa Cruz Biotechnology, Inc., Dallas, TX, USA) zugegeben. Die Saponinkonzentration und/oder die Inkubationszeit der Zellen in der Saponinlösung mussten für jede Zelleisolation der Qualität der Zellen angepasst werden. Dies lag daran, dass die Myozyten (je nach Verlauf der Zelleisolation) unterschiedlich lange den Verdauungsenzymen ausgesetzt waren und damit unterschiedlich viele extrazelluläre Matrixproteine die Zelle umgaben. Zum Überprüfen der Permeabilisierung stand Texas Red Dextran MW3000 zur Verfügung, welches in die superfundierende Lösung gegeben wurde und dessen Fluoreszenz, nach Anregung mittels 560 nm Laser, bei erfolgreicher Permeabilisierung im Inneren der Zelle nachweisbar war.

Bei den Versuchen mit DMNP und Kardiomyozyten wurden verschiedene Konzentrationen der Käfiggruppe und CaCl₂ in der intrazellulären Lösung verwendet, um die Konzentration des freien Kalziums auf einen für die Zellen physiologischen Wert (100 nM) einzustellen. Das zum Bestimmen der Kalziumkonzentration verwendete Fura-2 Penta-Kalium Salz hatte eine Konzentration von 50 µM in der Permeabilisierungslösung. Die Messungen erfolgten an dem im Labor stehenden uiMIC (TILL Photonics), welches einen dichroischen Filter besitzt, der für Fura-2 optimiert ist. Die Anregung erfolgte mittels des an das Mikroskop gekoppelten Monochromators (Polychrome V) bei den Anregungswellenlängen 340 nm und 380 nm. Die Steuerung des Systems übernahm die Software LifeAcquisition (TILL Photonics). Zur Kalibrierung wurden die Fluoreszenzen je einer Fura-2-Lösung mit 10 mM Kalzium und mit 0 mM Kalzium aufgezeichnet. Als Grundlage für die Berechnung der freien Kalziumkonzentration diente Gleichung 2.2 [55].

$$[Ca^{2+}] = K_d \cdot \frac{R - R_{min}}{R_{max} - R} \cdot \frac{F_{380}^{frei}}{F_{380}^{gesättigt}} \quad (2.2)$$

2.2.8 Simulation der frequenzvariablen Zwei-Photonen-Photolyse

Die Simulationen der Zwei-Photonen-Photolyse wurden durchgeführt, da bei Experimenten zur Photolyse von CMNB-caged Fluoreszein festgestellt wurde, dass die Fluoreszenz nicht durch längere Freisetzung beliebig erhöht werden konnte. Stattdessen kam es, nach einem Maximum zu Beginn der Freisetzung, zu einer Abnahme der Fluoreszenz hin zu einem konstanten Gleichgewichtswert. Die Annahme, dass dieser Effekt durch eine vollständige Umwandlung der Käfigsubstanz innerhalb des Fokus zustande kommt, wurde durch ein Experiment mit CMNB-caged Fluoreszein, welches in Abschnitt 3.2.4 behandelt wird, bekräftigt. Um diesem Effekt entgegenzuwirken, bot die Variation der Pulsrate eine geeignete Möglichkeit, den rapiden Abbau der Käfigsubstanz im Fokus zu verlangsamen, ohne die Zahl der photolysierten Käfigmoleküle eines einzelnen Pulses zu reduzieren. Das Ziel der Simulation war es, zuvorderst die Auswirkungen der Variation der Photolyselaserpulsrate auf die Freisetzung des gebundenen Liganden zu untersuchen. Dabei waren die Menge der Freisetzung, der zeitliche Verlauf der freigesetzten Menge und die räumliche Verteilung der Freisetzung von Interesse. Ein weiteres Ziel war die Optimierung von Leistung, Repetitionsrate und Dauer des Pulszuges, mit dem Ziel die freigesetzte Stoffmenge im Experiment zu maximieren.

Bei der Photolyse werden Käfigsubstanzen in Käfiggruppenrest und Ligand aufgespalten. Die drei Substanzen liegen wiederum in einer Lösung vor, die, falls sich das System im thermodynamischen Gleichgewicht befindet, homogen ist. Die Photolyse mittels des Lasers stört das Gleichgewicht durch Anregung der Käfigsubstanz. Die angeregte Käfigsubstanz zerfällt nicht instantan in Käfiggruppenrest und Ligand. Vielmehr entsteht durch die Laseranregung intermediär eine weitere Substanz, die angeregte Käfigsubstanz. Diese liegt, bedingt durch die Fokussierung, nur im Photolyselaserfokus vor. Das durch das Konzentrationsgefälle vorliegende chemische Potential sorgt für einen Ausgleich der Konzentrationen. Nach einiger Zeit stellt sich wieder das thermodynamische Gleichgewicht ein. Die Dauer ist abhängig von den Diffusionskoeffizienten der Substanzen und der mittleren Zerfallszeit der angeregten Käfigsubstanz. Jedoch haben die Laserpulse der meisten kommerziell verfügbaren TiSa-Laser, wie in Abschnitt 1.2 erläutert, einen Abstand von wenigen ns. Deshalb erfolgt die Anregung durch den nächsten Laserpuls, wie in Abbildung 2.10 B dargestellt, meist lange bevor sich das thermodynamische Gleichgewicht erneut eingestellt hat. In einer Simulation einer solchen Freisetzung, kann der Zerfall der angeregten Käfigsubstanz und die Diffusion vernachlässigt werden. Falls jedoch die Änderung der Konzentration der angeregten Käfigsubstanz bis zum nächsten Laserpuls nicht zu vernachlässigen

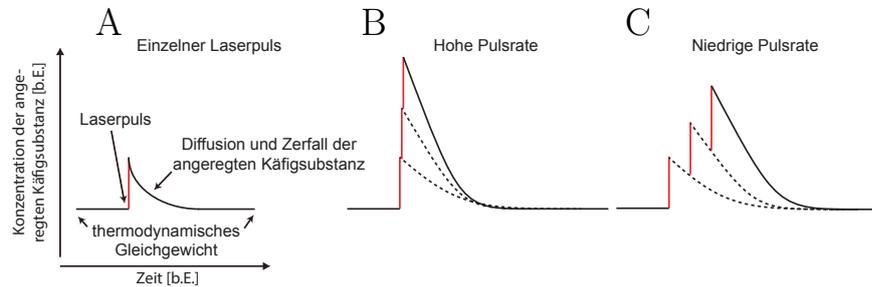


Abbildung 2.10: Diffusion und Zerfall der angeregten Käfigsubstanz bei unterschiedlichen Pulsraten. (A) Nach einem einzelnen Laserpuls stellt sich in der Lösung mit der Käfigsubstanz und dem Liganden nach einiger Zeit, durch Zerfall der angeregten Käfigsubstanz und Diffusion der Substanzen wieder das thermodynamische Gleichgewicht ein. (B) Bei einer hohen Pulsraten bei der sich die Konzentration der angeregten Käfigsubstanz nur wenig zwischen zwei Pulsen ändert, kann bei einer Berechnung der Zerfall der Käfigsubstanz und u.U. die Diffusion der Substanzen zwischen zwei Pulsen vernachlässigt werden. (C) Bei niedriger Pulsrate ist dies jedoch unerlässlich, da der Einfluss des Zerfalls der angeregten Käfigsubstanz und evtl. auch die Diffusion der Substanzen relevant wird

ist, wie in Abbildung 2.10 C, so muss dies in einer Simulation berücksichtigt werden. Eine Zielsetzung der in dieser Arbeit dargelegten Simulation war es, ein Modell zu erstellen, dass im Gegensatz zu der Arbeit von Kiskin et al. [74] und der Simulation von Figuerora et al. [45] den zeitlichen Verlauf der Konzentrationen aller Substanzen zwischen zwei Laserpulsen berücksichtigte. So konnte auch simuliert werden wie sich das System verhält, wenn die Zerfallsrate der angeregten Käfigsubstanz sowie die Diffusionsrate der Käfigsubstanz und des Kalziums gegenüber der Rate der Laserpulse relevant wird. Dazu wurden folgende Vereinfachungen angenommen.

- Stationäre Photonenzahl
Es wurde davon ausgegangen, dass sich die Zahl der Photonen pro Laserpuls beim Durchgang des Fokus nicht ändert. Dies konnte angenommen werden, da auch im Fokus die Absorptionsrate bei mittleren Käfigsubstanz-Konzentrationen und hohen Zwei-Photonen-Absorptionsquerschnitten gering war.
- Instantaner Puls
Es wurde angenommen, dass der Laserpuls jeden Ort des Fokus im gleichen Moment erreichte und so keine signifikante Diffusion während der Pulsdauer entlang der optischen Achse oder auch senkrecht zu optischen Achse auftritt. Bei einer Fokusslänge von $1.5 \mu\text{m}$ sowie der Lichtgeschwindigkeit in Wasser ergab sich ein ungefähres Zeitfenster von $6,5 \text{ fs}$, was sogar ein Vielfaches kürzer war als der Laserpuls selbst.

Jegliche Diffusionsprozesse während dieser Zeit und der Länge des Laserpulses von ca. 145 fs konnten problemlos vernachlässigt werden.

Unter der Annahme, dass es, abgesehen vom Photolyseprozess, zu keinen Änderungen der Gesamtmenge der Käfigsubstanz kam, wurde im Folgenden die Differentialgleichung 2.3 für die Diffusion im stationären Fall verwendet [24].

$$\frac{\partial c(\vec{r}, t)}{\partial t} = D^2 \Delta c(\vec{r}, t) \quad (2.3)$$

Hierbei ist c die Konzentration der Käfigsubstanz, D deren Diffusionskonstante und Δ der Laplace Operator. Es sind \vec{r} und t die Orts- bzw. Zeitvariable.

Eine analytische Lösung, die mittels des Programms Maple (Maplesoft, Inc., Waterloo, ON, Kanada) berechnet wurde, benötigte eine Laufzeit von mehreren Tagen für nur 2000 Laserpulse. Da sich die Lösung der Differentialgleichung für die Diffusion zwischen zwei Pulsen für den n -ten Puls iterativ aus dem $(n-1)$ -ten Puls ergab, wurde die Gleichung (aus der sich die Lösung ergab) exponentiell länger mit der Zahl der Pulse. Eine numerische Lösung in nur einer Dimension erschien somit notwendig. Diese eindimensionale Simulation sollte jedoch ausreichen, um den Effekt der verminderten Pulsrate deutlich zu machen. Hierzu wurde die Methode der finiten Differenzen verwendet und eine Routine in c++ programmiert (der dokumentierte Quellcode ist in Anhang A und als Textdatei auf der beiliegenden CD zu finden). Gleichung 2.4 ergibt sich im eindimensionalen Fall aus Gleichung 2.3.

$$\frac{dc(x, t)}{dt} = D^2 \frac{d^2}{dx^2} c(x, t) \quad (2.4)$$

Die Methode der finiten Differenzen teilt die Diffusion zwischen den Orten x und $x + \delta_x$ sowie den Zeiten t und $t + \delta_t$ in eine Anzahl n_j an kleineren Schritten, $\frac{\delta_x}{n_x} = \Delta x$ sowie $\frac{\delta_t}{n_t} = \Delta t$, auf. Diese werden anschließend, mit Hilfe des Differenzenquotienten, angenähert. Mittels der Methode der finiten Differenzen ergibt sich somit Gleichung 2.5 als Näherung.

$$\frac{dc}{dt} = \frac{c_i^k - c_i^{k-1}}{\Delta t} \quad (2.5)$$

Mit Δt der Schrittweite in der Zeit bei der numerischen Kalkulation und c_i^k der Konzentration am Ort i im numerischen Kalkulationsschritt k . Für die Näherung der doppelten Ableitung nach dem Ort ergibt sich entsprechend

$$\frac{d^2 c}{dx^2} = \frac{c_{i+1}^{k-1} + 2c_i^{k-1} - c_{i-1}^{k-1}}{\Delta x^2} \quad (2.6)$$

Hierbei entspricht Δx der Schrittweite der numerischen Kalkulation in der Raumdimension. Kombiniert man die Gleichungen 2.5, 2.6 sowie 2.4, und löst anschließend nach c_i^k auf, so ergibt sich für die numerische Berechnung Gleichung 2.7.

$$c_i^k = \left(1 - 2D \frac{\Delta t}{(\Delta x)^2}\right) \cdot c_i^{k-1} + D \frac{\Delta t}{(\Delta x)^2} (c_{i+1}^{k-1} + c_{i-1}^{k-1}) \quad (2.7)$$

Werden Δt und Δx ausreichend klein gewählt, so ergibt c_i^k eine gute Näherung für die Diffusion im Raum zwischen x und $x + \delta_x$ und in der Zeit von t bis $t + \delta_t$. In der erstellten Simulation war Δt $1/2000$ der Distanz der Laserpulse. Δx betrug $1/250$ des simulierten Raumes. Um die Diffusion verschiedener Substanzen zu berechnen, muss der entsprechende Diffusionskoeffizient in die Berechnung eingesetzt werden. Mit diesen Voraussetzungen wurde nun noch eine Formel für die Abnahme der Konzentration durch einen Puls benötigt. Nach [73] gilt für die Zahl der angeregten Käfiggruppen:

$$N_e = \frac{\epsilon \sigma \lambda^2 c_0 N_A}{2h^2 \zeta^2} \int_T I_0(t)^2 dt \int_{r,z} S(r, z)^2 dV \quad (2.8)$$

Hierbei ist c_0 die Konzentration der Käfigsubstanz im Volumen V , N_A die Avogadro-Konstante, h das Plancksche Wirkungsquantum und ζ die Lichtgeschwindigkeit. Das Zeitintegral trägt hier noch der Laserintensität während des Pulses Rechnung. $S(r, z)^2$ variiert die Intensität entlang des fokussierten Laserstrahls. Wird 2.8 durch N_A dividiert, so ergibt sich die Gesamtzahl der angeregten Moleküle in mol im Volumen V . Die Konzentrationsänderung ergibt sich aus der differentiellen Betrachtung.

$$\frac{dN_e/N_A}{dV} = \frac{\epsilon \sigma \lambda^2 c_0}{2h^2 \zeta^2} S(r, z)^2 \int_T I_0(t)^2 dt \quad (2.9)$$

Wird danach das Zeitintegral wie nach Xu et. al. [156] ersetzt, so ergibt sich Gleichung 2.10 für die orts aufgelöste Änderung der Konzentration.

$$dc = \frac{\epsilon \sigma \lambda^2 c_0}{2h^2 \zeta^2} S^2(r, z) \frac{g_p}{\nu \tau_p} \langle I \rangle^2 \quad (2.10)$$

Hierbei ist ν die Laserfrequenz und τ_p die Pulslänge. g_p ergibt sich aus der zeitlichen Korrelation des Laserpulses für gauss'sche Pulse zu:

$$g_p^{(G)} = 0,664 \quad (2.11)$$

und für hyperbolische-sekant Pulse zu:

$$g_p^{(hsec)} = 0,588 \quad (2.12)$$

Um $\langle I \rangle^2$ noch durch experimentell zugänglichere Größen zu ersetzen, kann näherungsweise:

$$I(t) = \frac{\lambda^2}{\pi(N.A.)^2} P(t) \quad (2.13)$$

angenommen werden. Hierbei ist $P(t)$ die mittlere Laserleistung und da von Fraunhofer Beugung ausgegangen wird, entspricht die Beugungsbegrenzung $\frac{N.A.}{\lambda} = 2\omega_0$, wenn $N.A.$ die numerische Appertur des Objektivs, λ die verwendete Laserwellenlänge ist und die Fläche des Fokusquerschnitts $\pi \cdot (2\omega_0)^2$ ist. Wird 2.13 in 2.10 eingesetzt, so ergibt sich mit Gleichung 2.14 für den Anteil an Käfigsubstanz der durch einen Laserpuls photolysiert wird.

$$\frac{dc}{c_0} = \frac{\epsilon\sigma\lambda^2}{2h^2\zeta^2} S^2(r, z) \frac{g_p}{\nu\tau_p} \frac{\lambda^4}{\pi^2(N.A.)^4} P^2(t) \quad (2.14)$$

Wird die Betrachtung auf eine einzige Dimension in der Fokusebene mit einem gauss'schem Strahlquerschnitt eingeschränkt, so kann $S^2(r, z)$ durch die Beschreibung des Strahlquerschnitts $\exp(-2\frac{x^2}{\sigma_G^2})$ ersetzt werden. Wobei σ_G wiederum dem Beugungslimit entspricht, und es ergibt sich

$$\frac{dc}{c_0} = \frac{\epsilon\sigma\lambda^2}{2h^2\zeta^2} \frac{g_p}{\nu\tau_p} \frac{\lambda^4}{\pi^2(N.A.)^4} \exp(-2\frac{x^2}{\lambda^2(N.A.)^2}) \cdot P^2(t) \quad (2.15)$$

Anschließend kann dies in die numerische Kalkulation eingesetzt werden. So können zusammen mit Gleichung 2.7 die Konzentrationen der Käfigsubstanz und der angeregten Käfigsubstanz nach beliebig vielen Laserpulsen iterativ berechnet werden. Um aus diesen Konzentrationen die Konzentration des freigesetzten Stoffes zu berechnen, wird der Zerfall der angeregten Käfigsubstanz als einfach exponentieller Zerfall angenähert. In jedem berechneten Zeitschritt, wird eine entsprechende Menge Produkt freigesetzt, welches dann der Diffusion unterliegt. Die Simulationen wurden alle unter

Tabelle 2.2: Parameter der Stoffe in den Simulationen. Der mit * markierte Wert wurde als Mittel diverser Werte in Publikationen gewählt [6, 132, 32, 4].

Stoff	D [$\mu\text{m}^2/\text{s}$]	η [%]	σ [GM]	Zerfallsrate [s^{-1}]
DMNP	147[45]	18 [39]	0,013 [25]	38000 [39]
NDBF-EGTA	147[45]	70 [96]	0,6 [96]	20000 [39]
Ca^{2+}	200*	-	-	-

der Voraussetzung einer Laserwellenlänge von 730 nm, einem Objektiv mit einer $N.A.$ von 1,49 sowie 143 fs langen Pulsen durchgeführt. Die in der Simulation verwendeten Parameter der Substanzen sind in Tabelle 2.2 zusammengefasst.

2.3 Fluoreszenzlebensdauer-Bildgebung

2.3.1 Verwendete Materialien

- Abtastkopf für Laser (Yanus 4, TILL Photonics GmbH)
- AOTF (MOD.nc, AA opto-electronic)
- Anregungsfilter für die Wellenlängen 470/40 nm, 437/14 nm, 480/10 nm, 510/10 nm, 560/14 nm, Kurzpass-IR-Filter (AHF)
- Avalanche-Photodioden 2 (PD1CTC, Micro Photon Devices, Bolzano, Italien)
- Faserkoppler (TILL Photonics GmbH)
- Filterräder 2 (6 Halter für 1 Zoll Filter, Thorlabs)
- Fluoreszenzspektrometer (LS55, PerkinElmer, Waltham, MA, USA)
- Frequenzgenerator (HM 8030-z, HAMEG Instruments GmbH, Mainhausen, Deutschland)
- Inverses Mikroskop (TE2000-U, Nikon Corporation, Tokyo, Japan)
- Modusumschalter (Polytrope II; TILL Photonics GmbH)
- Monochromator (Polychrome V; TILL Photonics GmbH)
- Lichtwellenleiter 2, 50 μm Kerndurchmesser und 6 μm Kerndurchmesser (Thorlabs)
- Superkontinuum-Laser (Femtopower 1040 430 nm 4 W 40 MHz, Fianium Limited, Southhampton, UK)
- U-Bank mit einem Faserkoppler FC/APC (Thorlabs)
- Zeitkorrelierender-Einzelphotonenzähler (Hydra Harp 400, PicoQuant GmbH, Berlin, Deutschland)

2.3.2 Verwendete Software

- LiveAcquisition, TILL Photonics GmbH
- LabView 2012, National Instruments, Austin, TX, USA
- Sympho Time 32Bit, PicoQuant GmbH

2.3.3 Verwendete Chemikalien

- Rose Bengal:
Mit vollem Namen auch 4,5,6,7-tetrachloro-2',4',5',7'-tetraiodofluorescein genannt, ist ein Farbstoff, der in einer 5,66 M KI-Lösung eine extrem kurze Lebensdauer von nur 16 ns aufweist [137]. Er wurde, wie auch von Sun et al. [135] beschrieben, zum Bestimmen der *instrument response function* (IRF) verwendet. Das Spektrum von Rose Bengal ist in Abbildung 2.11 A dargestellt.

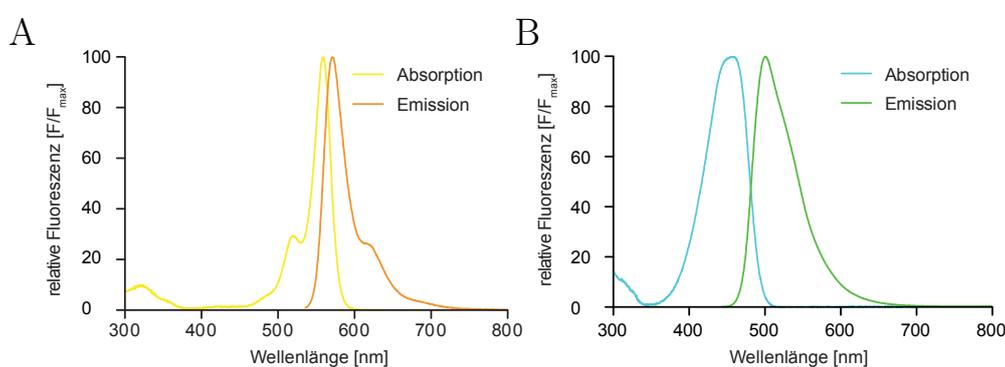


Abbildung 2.11: Absorptions- und Emissionsspektren der Farbstoffe (A) Rose Bengal in wässriger Lösung und von (B) Cumarin 6 in Ethanol (von der Webseite des Oregon Medical Laser Centers, <http://omlc.ogi.edu/spectra/PhotochemCAD/html/084.html> zuletzt eingesehen am 17.01.2014)

- Cumarin 6:
Ein Farbstoff, der eine konstante Fluoreszenzlebensdauer von 3 ns hat, wenn er in einer Konzentration von 50 μM in reinem Ethanol (p.a.) gelöst wird. Das Anregungsmaximum von Cumarin 6 liegt bei 460 nm, dabei hat es ein Emissionsmaximum bei 505 nm. Zur Kontrolle des FLIM-Systems wurde mit 480/10 nm angeregt. Die Spektren sind in Abbildung 2.11 B dargestellt

Um die absolute freie Kalziumkonzentration in Erythrozyten zu messen, wurden mehrere fluoreszente Kalziumindikatoren getestet. Es wurde geprüft, inwieweit sich diese für die gestellte Aufgabe eignen. Da alle verwendeten Kalziumindikatoren im grünen beziehungsweise gelben bis roten Spektralbereich emittierten, wurde APD 1, welche von APD 2 durch einen 532 nm Lang-Pass (LP) dichroischen Spiegel getrennt wird, verwendet.

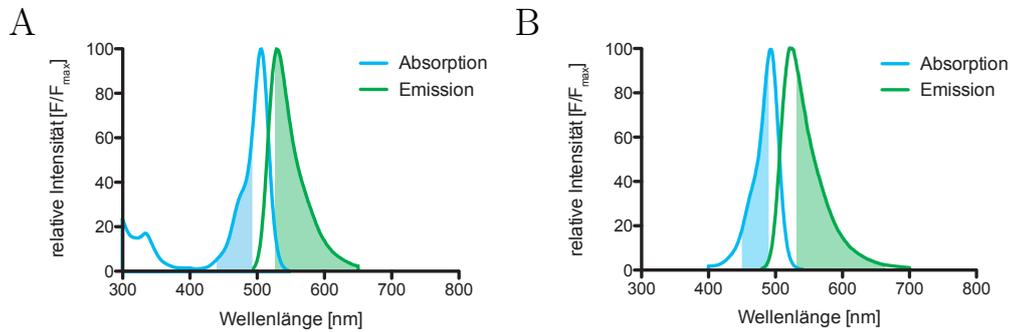


Abbildung 2.12: Absorptions- und Emissionsspektren der Farbstoffe (A) Calcium GreenTM und (B) Oregon Green® 488 BAPTA 2, die verwendeten Anregungs- und Emissionsfilter sind im Bild mit einem farbigen Hintergrund markiert, die Spektren wurden jeweils auf die maximale Fluoreszenz normiert (Daten von der Webseite des Herstellers, <http://www.lifetechnologies.com/de/de/home/life-science/cell-analysis/labeling-chemistry/fluorescence-spectraviewer.html>, zuletzt eingesehen am 17.01.2014)

- Calcium GreenTM und Oregon Green® 488 BAPTA 2:
Calcium GreenTM unterscheidet sich in seiner Ca²⁺-Bindungsaffinitäten und dem dynamischen Bereich seiner ionensensitiven Fluoreszenzantwort von anderen Kalziumindikatoren wie Fluo 3. Calcium GreenTM ist bis zu fünfmal heller als Fluo-3 bei Sättigung mit Ca²⁺ und bleicht mit einer signifikant niedrigeren Rate. Calcium GreenTM fluoresziert mehr als Fluo-3 bei sehr niedrigen Ca²⁺ Konzentrationen. Calcium GreenTM zeigt einen ungefähr 14-fachen Anstieg der Emission durch Bindung an Ca²⁺. Oregon Green® 488 BAPTA 2 hat generell gleiche der Ca²⁺-Konzentration entsprechende Reaktionen wie Calcium GreenTM. Jedoch sind sowohl das Absorptions- als auch das Emissions-Maximum von Oregon Green® 488 BAPTA ca. 10 nm zu kürzeren Wellenlängen hin verschoben [112]. Die Spektren für die beiden Indikatoren sind in Abbildung 2.12 dargestellt. Die Filter für Anregung und Emission waren bei beiden Indikatoren respektive ein 470/40 nm Bandpassfilter und ein 532 nm LP. Alle Farbstoffe wurden, wenn nicht anders vermerkt, in einer Konzentration von 1 mM AM in Pluronic F-127 (20% (w/v) in DMSO, Life Technologies) gelöst.
- Calcium CrimsonTM and Calcium OrangeTM:
Calcium OrangeTM und Calcium CrimsonTM sind spektral ähnlich zu Tetramethylrhodamin und Texas Red [112]. Die Spektren der beiden Farbstoffe sind in Abbildung 2.13 zu finden.
- Fura RedTM:
Fura RedTM ist ein langwelliges Analogon zu Fura-2. Fura RedTM er-

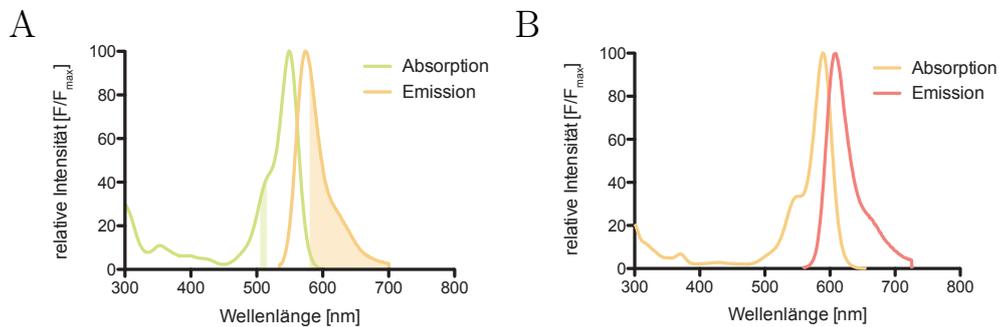


Abbildung 2.13: Absorptions- und Emissionsspektren der Kalziumindikatoren (A) Calcium OrangeTM und (B) Calcium CrimsonTM, die verwendeten Anregungs- und Emissionsfilter sind im Bild mit einem farbigen Hintergrund markiert, die Spektren wurden jeweils auf die maximale Fluoreszenz normiert (Daten von der Webseite des Herstellers, <http://www.lifetechnologies.com/de/de/home/life-science/cell-analysis/labeling-chemistry/fluorescence-spectraviewer.html>, zuletzt eingesehen am 17.01.2014)

möglichst es, mit dem Quotienten der Fluoreszenz durch Anregung bei den Wellenlängen 420 nm und 480 nm, die absolute Kalziumkonzentration zu bestimmen. Um die relativ niedrige Fluoreszenz-Quanteneffizienz von Fura RedTM zu kompensieren, ist es üblich, es mit der doppelten Konzentration, bezogen auf Fluo-3, zum Beladen zu verwenden [112]. Die Spektren von Fura RedTM im kalziumfreien und kalziumgebundenen Zustand sind in Abbildung 2.14 dargestellt.

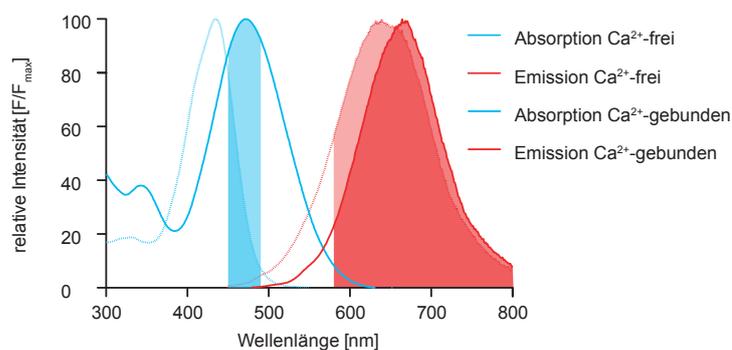


Abbildung 2.14: Absorptions- und Emissionsspektren des Kalziumindikators Fura RedTM im Kalzium-freien und im Kalzium-gebundenen Zustand, die verwendeten Anregungs- und Emissionsfilter sind mit einem farbigen Hintergrund markiert (Daten von der Webseite des Herstellers, <http://www.lifetechnologies.com/de/de/home/life-science/cell-analysis/labeling-chemistry/fluorescence-spectraviewer.html>, zuletzt eingesehen am 17.01.2014)

- **Asante Calcium Near Infra Red:**
Ein Kalzium-sensitiver Farbstoff der von TEFLabs (Austin, TX, USA) hergestellt wird. Der Hersteller gibt nur eine Anregungs- (630 nm) und Emissionswellenlänge (690 nm) an. Der Farbstoff wurde als Salz und in der zellpermeablen Variante als Ester verwendet. Asante Calcium Near IR AM wurde als 5 mM Stammlösung in Pluronic F127 (20% (w/v) in DMSO, LifeTechnologies) gelöst.
- **Asante Calcium Red:**
Ein weiterer Kalziumindikator, der von TEFLabs hergestellt wird. Er konnte auch ratiometrisch eingesetzt werden. Der Farbstoff war sowohl als Salz als auch als AM erhältlich. Sein K_d für die Kalziumbindung wird mit 400 nM angegeben. Für eine fluoreszenzratiometrische Messung erfolgt die Anregung bei 488 nm. In diesem Fall müssen die Emissionen bei 525 nm und 650 nm gemessen werden. Laut Hersteller kann der Indikator auch nicht ratiometrisch verwendet werden, in einem solchen Fall muss bei 540 nm angeregt werden. Die Emission wird dann bei 650 nm gemessen. Die verwendeten Filter für Anregung und Emission waren respektive 560/14 nm und 645/75 nm. In 2.15 sind die Spektren für verschiedene Konzentrationen von Kalzium abgebildet.

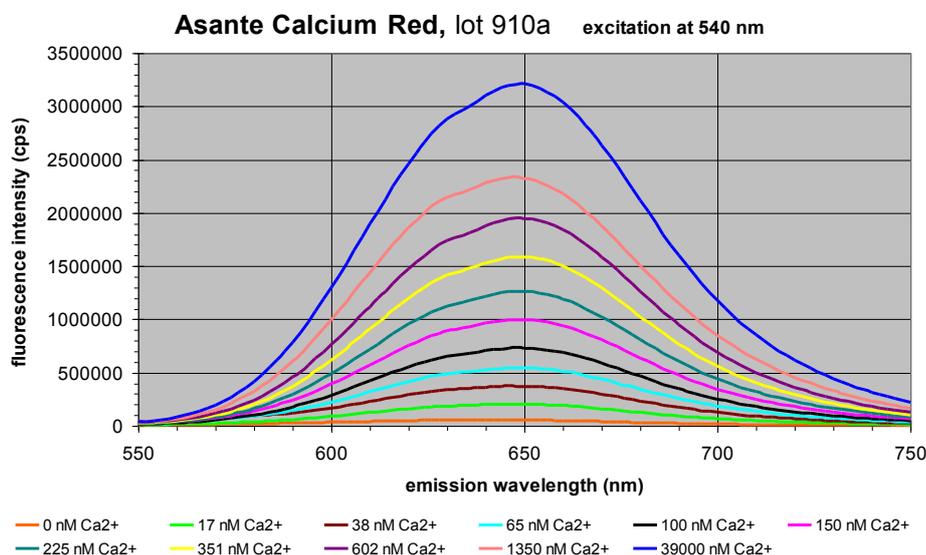


Abbildung 2.15: Emissionsspektren des Kalziumindikators Asante Calcium Red bei verschiedenen Kalziumkonzentrationen und 540 nm Anregungswellenlänge (Daten von der Webseite des Herstellers, <http://www.teflabs.com/Portals/44052/docs/AsanteCalciumRed-Info%20Packet.pdf> zuletzt eingesehen am 18.10.2013)

- Fluo-8
Fluo-8 ist ein weiteres Derivat von Fluo-3 und Fluo-4, diesen jedoch im Bezug auf Absorptions- und Emissionsspektrum sehr ähnlich. Es hat von diesen drei Indikatoren den höchsten dynamischen Bereich. Fluo-8 wurde von TEFLabs bezogen und vor der Verwendung als Stammlösung in einer Konzentration von 1 mM in Pluronic F127 (20% (w/v) in DMSO, LifeTechnologies) gelöst.
- Ionomycin:
Ionomycin ist ein Ionophor, der sich in die Zellmembran einfügt und den Austausch von 1 Kalziumion gegen 3 Protonen, durch die Zellmembran ermöglicht [40]. Durch das Binden von Kalzium an Ionomycin kann dieses die Zellmembran überwinden. Diese Bindung von Kalzium an den Ionophor ist erst ab einem pH-Wert von 7 möglich. Bei einem pH-Wert von 9,5 ist die Bindungseffizienz am höchsten. Da der pH-Wert durch den elektrogenen Austausch von Kalzium gegen Protonen steigt, kann sich die Konzentration des Kalziums auf beiden Seiten der Membran nicht komplett angleichen [88]. Das gelieferte Ionomycin-Kalzium Salz wurde als Stammlösung 1 mM in DMSO gelöst.

2.3.4 Aufbau des FLIM-Systems

Der Messaufbau des FLIM bestand aus zwei, durch einen dichroischen Spiegel getrennte, Avalanche-Photodioden (APD) und einem an diese gekoppelten zeitkorrelierenden Mehrkanal-Einzelphotonenzähler. Zur Anregung diente ein Superkontinuum-Laser mit 10 ps langen Pulsen (laut Testzertifikat). Zur Wahl der gewünschten Anregungswellenlänge stand ein Satz von Bandpassfiltern zur Verfügung (siehe Materialien), die mittels eines Filterrades in den Strahlengang gedreht werden konnten. Um Reflektionen zu vermeiden, die die Messungen der Fluoreszenzlebensdauer stören könnten, wurden die Filter in einem Winkel von 5° eingebracht. Ein Kurzpassfilter bei 700 nm blockierte dabei in jedem Fall das infrarote Spektrum des Lasers, welches ein Vielfaches der Leistung des sichtbaren Bereichs aufwies und die Facetten der Glasfasern beschädigen kann. Das Laserlicht wurde über eine *single mode* Faser und einen Faserkoppler mit dichroischem Strahlteiler, zu einem Galvanometer getriebenen Yanus 4 Abtastkopf geleitet. Eine angeschrägte *multimode* Faser an dem Faserkoppler diente der Aufnahme der Fluoreszenz (Kerndurchmesser $50 \mu\text{m}$) und bot dabei konfokale Filterung, sowie die störungsarme Weiterleitung der Fluoreszenz zu den APDs. Der Abtastkopf war über den Modusumschalter, Polytrope II, mit einem inversen Mikroskop verbunden. Dieses System erlaubte das schnelle Umschal-

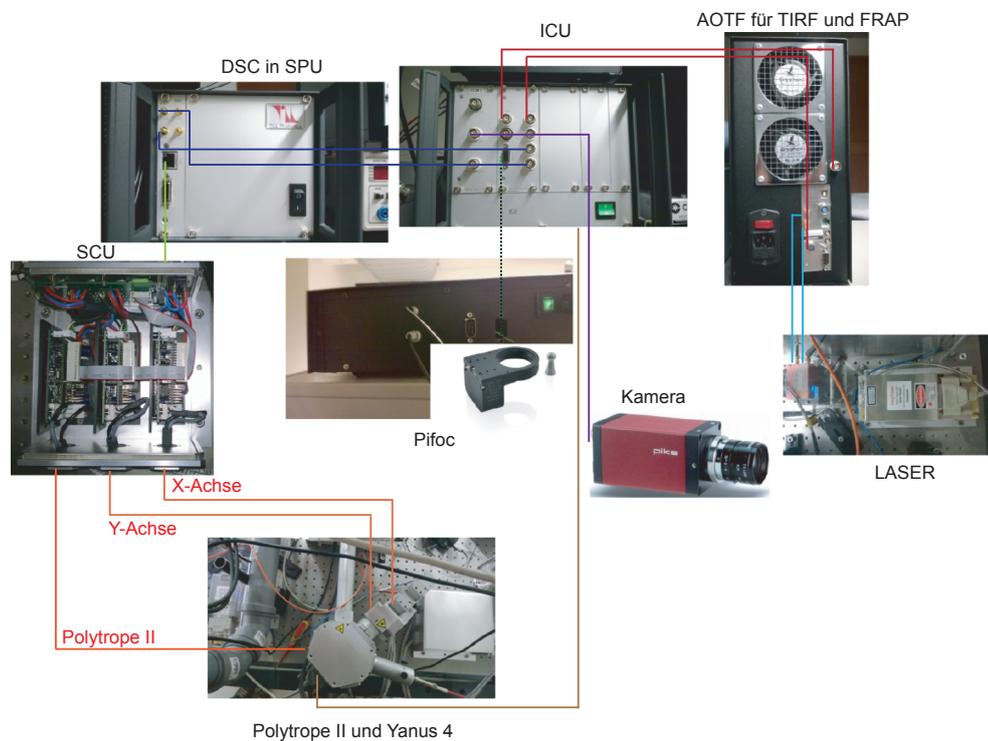


Abbildung 2.16: Plan von TILL-Photonics für das Polytrope II System

ten zwischen Laseranregung und Anregung mittels Monochromator, welcher auch per Lichtleiter an den Polytrop gekoppelt war, sowie ein Umschalten zu dem *total internal reflection fluorescence microscopy* (TIRF) Modus. Innerhalb des Mikroskops wurde ein Silberspiegel an Stelle eines dichroischen Filterblocks im Filterrevolver verwendet, um die vollständige Reflektion von Anregungslicht und emittierter Fluoreszenz zu gewährleisten. Ein dichroischer Spiegel konnte an dieser Stelle gewählt werden, um ohne Laseranregung und APDs, mittels einer Kamera, eine Übersicht über das Präparat zu bekommen. Die APDs waren, zum Schutz vor Streulicht, in einem separaten Gehäuse untergebracht. Zum Filtern des Signals sowie zum Blocken der Anregungswellenlänge standen weitere Bandpassfilter (siehe Materialien) zur Verfügung, welche direkt vor den Dioden in dem Gehäuse eingesetzt werden konnten. Die Software Symphotime (PicoQuant GmbH) ermöglichte die Aufzeichnung und Darstellung der gewonnenen Einzelphotonen-Daten, sowie deren Auswertung. Die Software benötigte zur akuraten Zuordnung der gezählten Photonen zu einem Anregungspuls ein Synchronisationssignal mit dem gepulsten Laser. Des Weiteren wurde sowohl ein Auslösesignal benötigt, das ein neues Bild markierte (*frame clock*) als auch die Start- und Stoppsignale für jede Linie, die der Abtastkopf abrasterte (*line start/line*

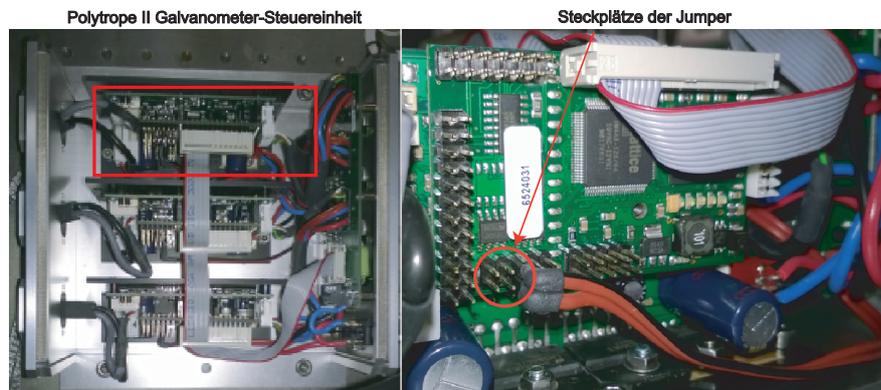


Abbildung 2.17: Platine der Galvanometer-Steuereinheit des Polytrope II, markiert sind die Steckplätze, an denen für den analogen Betrieb die Jumper entfernt wurden

stop), um die gezählten Photonen einem Bildpunkt zuweisen zu können.

Das System von TILL Photonics übernahm die Steuerung des Abtastkopfes, des Polytropes sowie die Synchronisation aller Komponenten. Es bestand aus drei separaten Elektronik-Einheiten.

- *scan control unit* (SCU)
Die Steuereinheiten der Galvanometer, in Abtastkopf und Polytrop, waren in der SCU untergebracht. Diese Steuereinheiten stabilisierten die Galvanometer mit einer Rückkopplungsschleife.
- *digital to serial converter* (DSC)
Die Steuereinheiten selbst erhielten ihre Anweisungen von der DSC, welche in der *scan power unit* (SPU) untergebracht war. Diese wurde, im Fall der zu diesem Zeitpunkt aktuellen Firmware (ab LiveAcquisition 2.1), vom Computer mittels Binärdaten gesteuert.
- *imaging control unit* (ICU)
Die dritte und auch wichtigste Komponente war die ICU, in der alle Steuersignale synchronisiert wurden. Die von TILL vorgesehene Schaltung aller Komponenten wird in Abbildung 2.16 dargestellt. Nur in dieser Konfiguration waren TIRF sowie *fluorescence recovery after photobleaching* (FRAP) verfügbar, da diese Modi eine komplexe Steuerung aller Komponenten erforderten, für die die ICU unerlässlich war.

Da Live Acquisition, die proprietäre Software von TILL Photonics, nicht in der Lage war, beim Abtasten die nötigen Signale an die HydraHarp 400 zu übertragen, weder auf Software- noch auf Hardware-Basis, musste das System für den FLIM-Betrieb umgerüstet werden. Es war notwendig, eine ältere

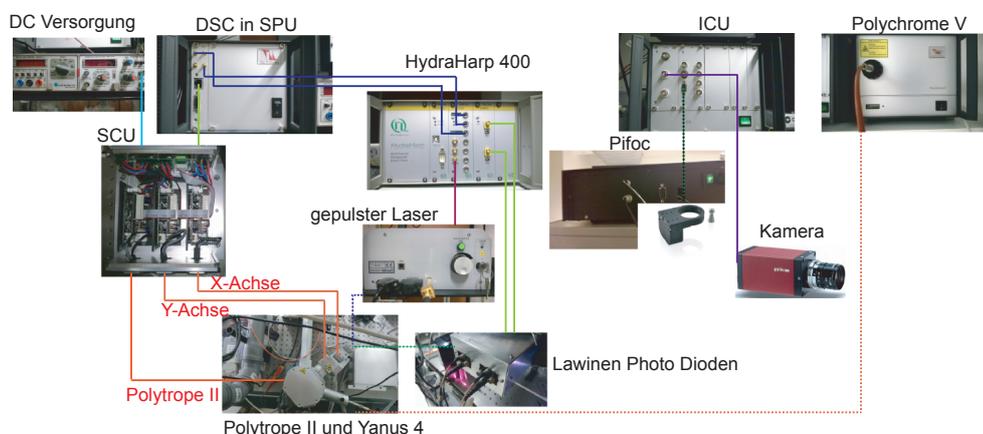


Abbildung 2.18: Modifizierter Verkabelungsplan des FLIM Aufbaus, aufgrund der Anforderungen der HydraHarp 400

Firmware der DSC zu verwenden, da bei dieser die Steuersignale in einem einfachen ASCII-Code übertragen wurden (Steuersignale aus Anleitung von TILL im Anhang B). Hierdurch wurde es notwendig die ICU von der DSC zu entkoppeln, da die ältere Firmware mit der ICU sowie der Steuerung des Polytrope II nicht kompatibel war. Die Steuereinheit des Polytrope II Galvanometers wurde hierzu auf analogen Betrieb umgeschaltet. Dies erfolgte durch Entfernen zweier Jumper auf der Platine (siehe Abbildung. 2.17). Danach war es möglich, den Spiegel durch eine angelegte Spannung richtig zu positionieren, so dass der Laser in Richtung Mikroskop und die Emission in Richtung der detektierenden Faser gelenkt wurden. Die Spannung wurde von einem Funktionsgenerator im Gleichspannungsbetrieb geliefert. Zur Kontrolle diente ein Digitalmultimeter, welches eine Messung der Regelspannung mit 0.01 V Genauigkeit ermöglichte. Die Steuerung der beiden Abtast-Spiegel im Yanus 4 wurde in LabVIEW implementiert. Die Grundlage hierfür bildete die Softwarebibliothek Colibri für die Steuerung von konfokalen Mikroskopen von Christian Seebacher (BioImaging Center Ludwig-Maximilians Universität, München). Durch Modifizierung einiger Steuerelemente war es möglich, die nötigen *frame* sowie *line* Signale an der DSC auszugeben. Das Schema der Steuerung ist in Abbildung 2.19 skizziert. Um den automatisierten Tisch und angeschlossenen Monochromator zu steuern, zum Beispiel zum Identifizieren von Zellen, die ein Fluoreszenzprotein generierten, war ein Betrieb der ICU notwendig. Hierfür wurde ein neuer Verkabelungsplan entwickelt, welcher in Abb. 2.18 dargestellt ist.

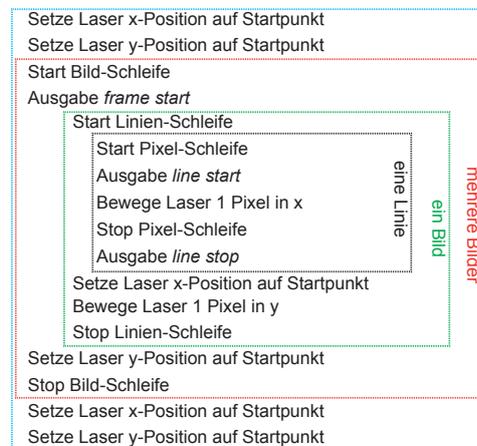


Abbildung 2.19: Ablaufschema zum Abtasten mittels Yanus 4 und zur Ausgabe der Steueresignale für die HydraHarp 400

Justage des FLIM Setups

Zur Justage des Systems musste der Strahlverlauf an zwei Positionen kontrolliert werden, so dass die Lage des Fokus der Anregung mit dem Fokus der Detektion übereinstimmten. Hierzu wurde der Faserkoppler als Laserlinienkombinierer betrieben, indem durch die Detektionsfaser ein weiterer Laser gekoppelt wurde. Beide Laser mussten dann auf einer Mattscheibe, die in den Objektivrevolver geschraubt wurde, überlagert werden. Anschließend konnte mittels einer Farbstofflösung (hier eine 50% (w/v) Fluoreszeindextran MW 10000 wässrige Lösung) die Fokussierung und Überlagerung der Foki kontrolliert bzw. korrigiert werden. Wichtig war in diesem Zusammenhang, dass einer der Justagespiegel am Faserkoppler beide Strahlwege kontrollierte. Dieser musste zuerst genutzt werden, um die Detektion einzustellen. Anschließend konnte der Fokus der Anregung mittels des zweiten Spiegels separat auf den Detektionsfokus eingestellt werden. Die Fokussierung wurde mit Hilfe der Linsen am Faserkoppler kontrolliert. Diese mussten so eingestellt werden, dass der Fokus der Laser mit dem Fokus der Kamera und des Okulars übereinstimmte. Würde dies nicht beachtet, so wäre es unmöglich ein scharfes FLIM Bild zu erhalten, obwohl die fluoreszierenden Objekte mit dem Auge oder der Kamera klar erkennbar sind. Die Software, die das Abtasten steuerte, erhielt keine Rückkopplung über die Position der Spiegel des Abtastkopfes. Aus diesem Grund wurde, zur einfacheren Handhabung des Systems, eine Kalibrierung des Abtastkopfes anhand des Kamerabildes der steuernden LiveAcquisition Software durchgeführt. Hierzu war ein Abgleich der Position des Laserfokus auf der Kamera mit der Position des Abtastkopfes notwendig. In Ruheposition der Galvanometer wurde

die genaue Lage des Lasers auf dem Kamerabild in Pixeln bestimmt. Danach wurde der Abtaster um einen festen Wert (zum Beispiel 5000000000) verfahren und die neue Position ermittelt. Durch Verwenden des Quotienten:

$$\frac{\text{Verfahrens Weg}}{\text{Position Anfang} - \text{Position Ende}} \quad (2.16)$$

als Schrittweite konnte gewährleistet werden, dass die Pixel der Bilder der HydraHarp 400 mit den Pixeln des Kamerabildes übereinstimmten. Zur Bestimmung der Fluoreszenzlebensdauern war es notwendig, die mit dem Fluoreszenzsignal konvulierte IRF zu bestimmen. Diese Funktion ist die Antwort der Photodioden und der Elektronik auf die Detektion eines Photons. Da diese Antwort nicht infinitesimal kurz war, wird durch die IRF jede Messung der Fluoreszenzlebensdauer beeinflusst. Falls der Laserpuls länger als die elektronischen Signale ist, so kann auch dieser die IRF beeinflussen. Da der verwendete Laser 10 ps lange Pulse hatte, konnte dieser Einfluss vernachlässigt werden. Eine Methode zum Bestimmen der IRF war den Laser direkt zu detektieren. Durch die kurze Laufzeit und die kurzen Laserpulse, war dies die unmittelbarste Art vom System die IRF zu erhalten. Ein anderer Weg die IRF zu bestimmen, war mittels eines Fluoreszenzfarbstoffes mit einer sehr kurzen Fluoreszenzlebensdauer. Durch die kurze Fluoreszenzlebensdauer ist die Fluoreszenz des Farbstoffes nach einer Anregung schon abgeklungen, bevor die elektronische Antwort des Messsystems endet. Es wird also nur ein Photon der Fluoreszenz von dem System detektiert, jedes weitere gezählte Photon ist nur eine Ungenauigkeit in der Elektronik der HydraHarp 400.

2.3.5 Regression der Fluoreszenzlebensdauerkurven

Die Fluoreszenzlebensdauern der Indikatoren ermittelte die Software Symphotime, welche auch für die Datenerfassung verwendet wurde. Hierzu wurde eine doppelt exponentielle Regression der Fluoreszenzlebensdauerkurve durchgeführt. In dieser Regression wurde die vor dem jeweiligen Experiment gemessene IRF verwendet. Hierdurch kann der Fluoreszenzanstieg durch die Anregung des Indikators mit einem Laserpuls in der Regression berücksichtigt werden. Die Regression hat somit folgende Parameter:

- Amplitude 1/Amplitude 2
- Lebensdauer 1/Lebensdauer 2
- Hintergrundfluoreszenz
- IRF Verschiebung zeitlich/IRF Verschiebung Intensität

Diese Parameter unterlagen bei der Regression keinen Beschränkungen. Optimiert wurden bei der Regression die Residuen. Die Startwerte für die Regression wurden individuell angepasst, um eine Konvergenz des Algorithmus zu gewährleisten.

2.3.6 Ca^{2+} Messungen in Erythrozyten mittels FLIM

Isolation der Erythrozyten

Zur Isolation der Erythrozyten wurden 20 μl Blut mittels Einmal-Lanzette entnommen. Diese Menge wurde mit 1 ml Tyrode-Lösung vermischt. Um die Erythrozyten aufzureinigen, wurde diese Mischung für 3 Minuten bei 5000 Umdrehungen pro Minute zentrifugiert. Hierdurch sammelten sich die Erythrozyten am Boden des Aliquots. Der Überstand wurde abgenommen und 1 ml Tyrode hinzugefügt und die Zellen durch Vortexen erneut suspendiert. Dieser Aufreinigungsprozess wurde insgesamt 3-mal wiederholt. Zum Beladen mit den Farbstoffen wurden 10 μl der Zellsuspension in 1 ml der Tyrode-Lösung gegeben.

Erstellen der Kalibrierungslösungen

Um die Kalziumkonzentration mittels der Fluoreszenzlebensdauer des Kalziumsensors bestimmen zu können, war zunächst eine Eichung der Fluoreszenzlebensdauer mit Hilfe definierter Kalziumkonzentrationen notwendig. Eine *in vitro*-Messung hätte, da sich die Affinität der Indikatoren für Kalzium in Zellen ändert [140, 80], keine exakte Eichung ermöglicht. Daher war es unerlässlich, eine Kalibrierung der Fluoreszenzlebensdauer in Erythrozyten durchzuführen. Es wurden 500 ml einer kalziumfreien Lösung (pH-Wert 7,35 mit KOH) mit einer Konzentration von (in mM) 100 KCl, 10 EGTA sowie 20 HEPES angesetzt. Die Hälfte dieser Lösung wurde umgefüllt und durch Zugabe von CaCl_2 auf eine Gesamtkonzentration von 10 mM Kalzium gebracht. Hiernach war eine erneute Anpassung des pH-Wertes notwendig. Dies musste unter Umständen mehrfach wiederholt werden, da der pH-Wert und die freie Kalziumkonzentration sich indirekt über den pH-abhängigen Dissoziationskonstante (K_d) von EGTA gegenseitig beeinflussten. Die somit erstellte Lösung hatte, durch den pH-Abhängigen K_d von EGTA von 76 nM bei einem pH-Wert von 7,35, eine freie Kalziumkonzentration von 27,61 μM . Die Konzentration an freien Kalziumionen der extrazellulären Lösung wurde mittels Fluoreszenz-Spektroskopie spezifiziert, um eine möglichst exakte Bestimmung zu ermöglichen. Hierzu wurde ein Fluoreszenzspektrometer verwendet. Der Vorteil dieser Methode war, dass mittels Gittermonochromatoren das Anregungsspektrum von Fura-2 durchgestimmt werden konnte,

während die resultierende Emission gemessen wurde. Infolgedessen musste bei der Analyse die Transmission durch dichroische Filter nicht berücksichtigt werden. Die Messungen wurden bei einer Konzentration von $100 \mu\text{M}$ Fura-2 Salz in $100 \mu\text{l}$ der zu analysierenden Lösung durchgeführt. Das Anregungsspektrum wurde in $0,5 \text{ nm}$ Schritten zwischen 300 nm und 400 nm abgerastert und die jeweilige Emission bei $520 \pm 10 \text{ nm}$ detektiert. Zur Analyse wurde der Quotient der Emission bei 337 nm und 380 nm gebildet. Zur Bestimmung der freien Kalziumkonzentration diente die Formel 2.2 auf Seite 35 von Gryniewicz et al. [55].

Kapitel 3

Ergebnisse

3.1 Kalziumhomöostase in kardialen Myozyten unter Einfluß eines Hyperaldosteronismus in $G\alpha_q/G\alpha_{11}$ -Knockout-Tieren

Im ersten Abschnitt dieser Arbeit wurden isolierte Kardiomyozyten von genetisch veränderten Mäusen untersucht. Diesen Tieren wurde mit Aldosteron beladene osmotische Minipumpen implantiert, die in den Tieren einen Hyperaldosteronismus verursachten. Als Kontrollgruppe dienten Tiere die eine Implantat-Attrappe trugen. Um den Einfluss des Hyperaldosteronismus auf die Kalziumhomöostase zu untersuchen, wurden die Zellen von acht Gruppen von Mäusen (Behandlung und genetischer Hintergrund siehe Abschnitt 2.1.1) miteinander verglichen. Die Datenerhebung fand mittels schneller Vi-

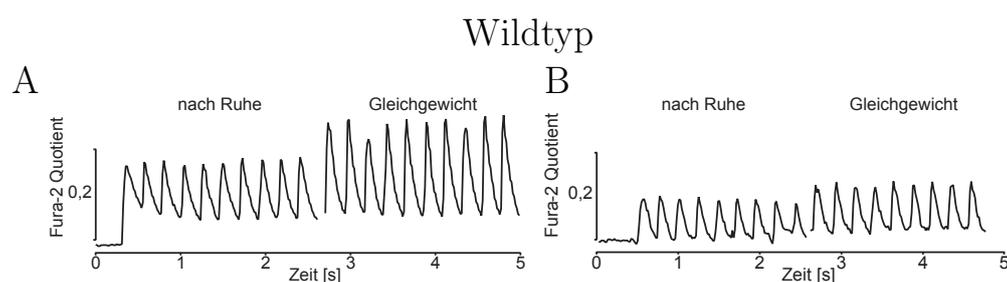


Abbildung 3.1: Typische Kalziumtransienten der murinen ventrikulären Kardiomyozyten der Wildtyp Tiere, gemessen mit dem Quotienten der Fura-2 Fluoreszenzen ($\frac{F(t)_{380}}{F(t)_{340}}$) an den Zellen von: (A) Tieren ohne Hyperaldosteronismus und (B) Tieren mit Hyperaldosteronismus

deobildgebung, wie in Abschnitt 2.1.2 dargestellt, statt. Typische Spuren der Kalziumtransienten der verschiedenen Genotypen, mit und ohne Hype-

raldosteronismus, sind in den Abbildungen 3.1 bis 3.3 zu finden. Anhand der

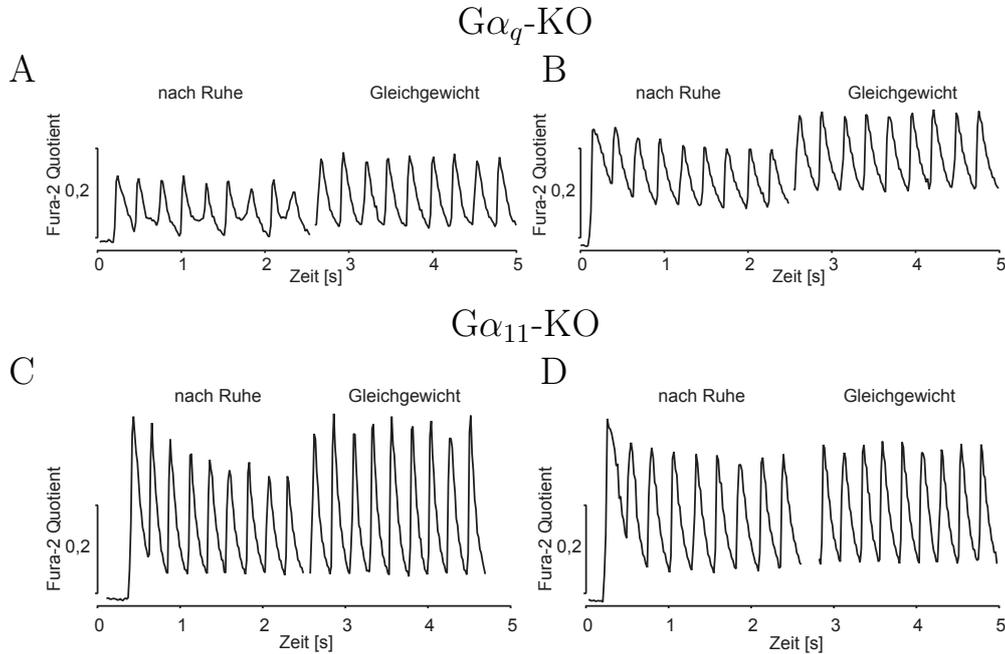


Abbildung 3.2: Typische Kalziumtransienten der murinen ventrikulären Kardiomyozyten der $G\alpha_q$ -KO-Tiere und der $G\alpha_{11}$ -KO-Tiere, gemessen mit dem Quotienten der Fura-2 Fluoreszenzen ($\frac{F(t)_{380}}{F(t)_{340}}$) an den Zellen von: (A) $G\alpha_q$ -KO-Tieren ohne Hyperaldosteronismus, (B) $G\alpha_q$ -KO-Tieren mit Hyperaldosteronismus, (C) $G\alpha_{11}$ -KO-Tieren ohne Hyperaldosteronismus und (D) $G\alpha_{11}$ -KO-Tieren mit Hyperaldosteronismus

Spuren wurden 3 relevante Parameter, jeweils nach Ruhe und während der Gleichgewichtsstimulation, bestimmt: die Amplitude, die basale Kalziumkonzentration und die CTD80-Zeit. Diese drei Parameter wurden statistisch analysiert. Die zusammenfassenden Statistiken in den Abbildungen 3.4, 3.5 und 3.6 zeigen aufgrund der nicht Gauss'schen Verteilung der Messwerte den Median.

3.1.1 Änderungen der Kalziumtransientenamplitude in isolierten ventrikulären Kardiomyozyten

Änderung der Kalziumtransientenamplituden in Abhängigkeit vom Genotyp der untersuchten Tiere

Ohne Hyperaldosteronismus zeigten die Zellen der Tiere beider Gruppen mit $G\alpha_{11}$ -KO nach Ruhe eine gleich hohe Kalziumtransientenamplitude. Sie

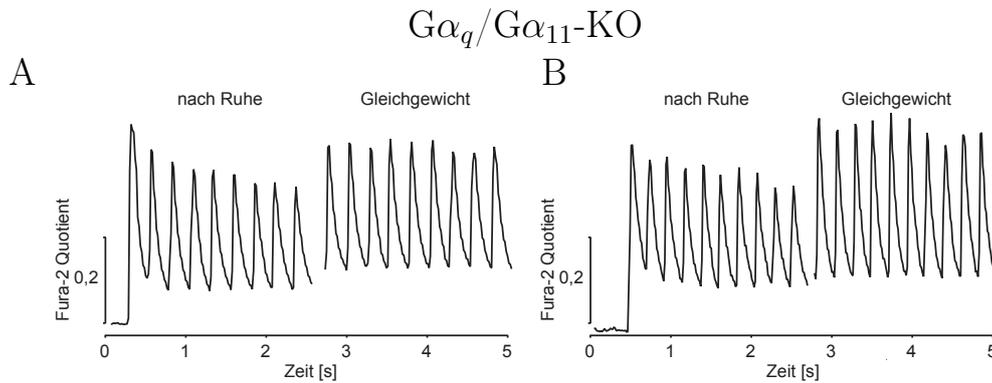


Abbildung 3.3: Typische Kalziumtransienten der murinen ventrikulären Kardiomyozyten der $G\alpha_q/G\alpha_{11}$ -KO-Tiere, gemessen mit dem Quotienten der Fura-2 Fluoreszenzen ($\frac{F(t)_{380}}{F(t)_{340}}$) an den Zellen von: (A) Tieren ohne Hyperaldosteronismus und (B) Tieren mit Hyperaldosteronismus

zeigten zudem eine höhere Kalziumtransientenamplitude als die Zellen der Wildtyptiere und als die Zellen der $G\alpha_q$ -KO-Tiere. Die Zellen der $G\alpha_q$ -KO-Tiere hatten zudem eine niedrigere Kalziumtransientenamplitude als die Zellen der Wildtyptiere.

Die Kalziumtransientenamplituden der Tiere mit $G\alpha_q$ -KO waren, im Fall der Transienten während der Gleichgewichtsstimulation, niedriger als die der Wildtyptiere. Wiederum hatten die Zellen der Tiere ohne $G\alpha_{11}$ -Protein gleich hohe Kalziumtransientenamplituden und zeigten gegenüber den Zellen der $G\alpha_q$ -KO-Tiere und der Wildtyptiere eine erhöhte Kalziumtransientenamplitude.

Nach Ruhe und mit Hyperaldosteronismus zeigten die Zellen der Tiere mit einem Einzel-KO keine signifikanten Unterschiede in der Kalziumtransientenamplitude. Jedoch waren die Kalziumtransientenamplituden nach Ruhe in den Zellen aller KO-Varianten erhöht gegenüber denen in den Zellen der Wildtyptiere. Auch zeigten die Zellen des Doppel-KO höhere Kalziumtransientenamplituden nach Ruhe als die Zellen der Tiere mit einem einzelnen KO.

Während der Gleichgewichtsstimulation waren wiederum, wie ohne Hyperaldosteronismus, alle Kalziumtransientenamplituden der Zellen der KO-Tiere höher als die der Wildtyptiere. Von den Zellen der Tiere mit einem KO hatten die mit dem $G\alpha_q$ -KO die niedrigsten Kalziumtransientenamplituden und die Zellen der Tiere mit dem $G\alpha_q/G\alpha_{11}$ -KO die höchsten.

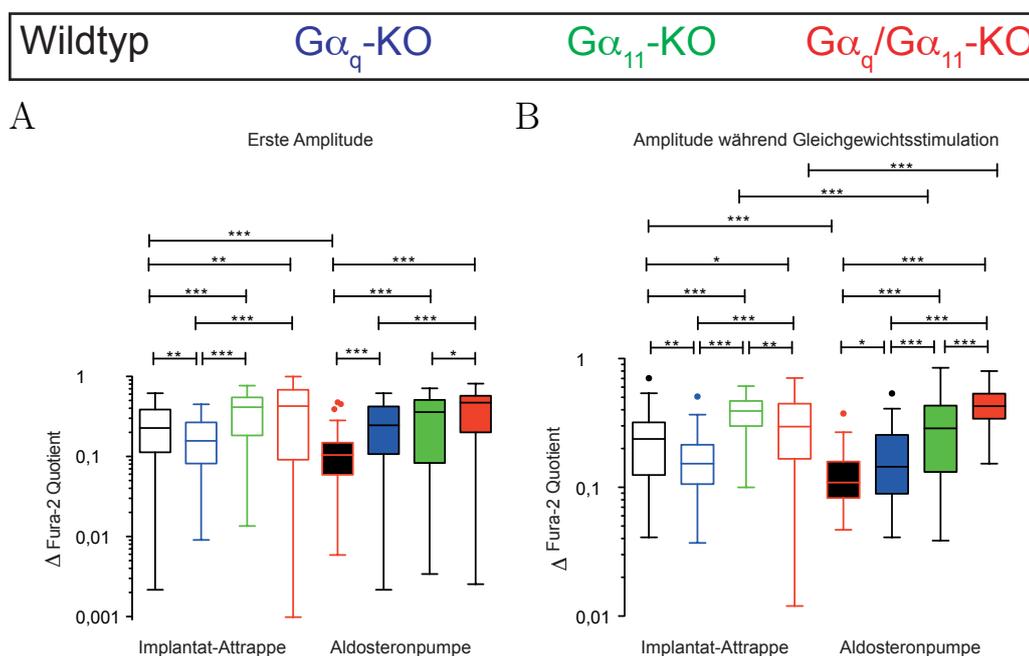


Abbildung 3.4: Statistische Analyse der Kalziumtransientenamplituden durch elektrische Stimulation (A) nach Ruhe (B) während der Gleichgewichtsstimulation, an murinen ventrikulären Kardiomyozyten mit und ohne Hyperaldosteronismus, alle Änderungen bis auf die gekennzeichneten waren signifikant

Änderung der Kalziumtransientenamplituden der unterschiedlichen Genotypen durch den Einfluss des Hyperaldosteronismus

Anhand der, in Abbildung 3.4 gezeigten, statistisch aufbereiteten Amplitudenwerten der Kalziumtransienten, lässt sich ablesen, dass durch Hyperaldosteronismus die Kalziumtransientenamplituden nach Ruhe in den Zellen der Wildtyptiere abnahmen und in den Zellen der $G\alpha_q$ -KO-Tiere zunahmen. Dahingegen änderte der Hyperaldosteronismus bei den Zellen $G\alpha_{11}$ - und $G\alpha_q/G\alpha_{11}$ -KO-Tieren nichts an der Kalziumtransientenamplitude nach Ruhe.

Während der Gleichgewichtsstimulation rief der Hyperaldosteronismus keine Veränderung der Kalziumtransientenamplitude bei den Zellen der Tiere mit $G\alpha_q$ -KO hervor. Dahingegen kam es in den Zellen der Doppel-KO-Tiere zu einem Anstieg der Kalziumtransientenamplitude. Bei den Ventrikelzellen der Wildtyp- sowie $G\alpha_{11}$ -KO-Tiere kam es hingegen zu einer Abnahme der Kalziumtransientenamplitude.

Aufgrund der großen Ungenauigkeit bei der Bestimmung des Parameters CTD80 nach Ruhe werden im Folgenden nur die Daten während der Gleichgewichtsstimulation genauer analysiert.

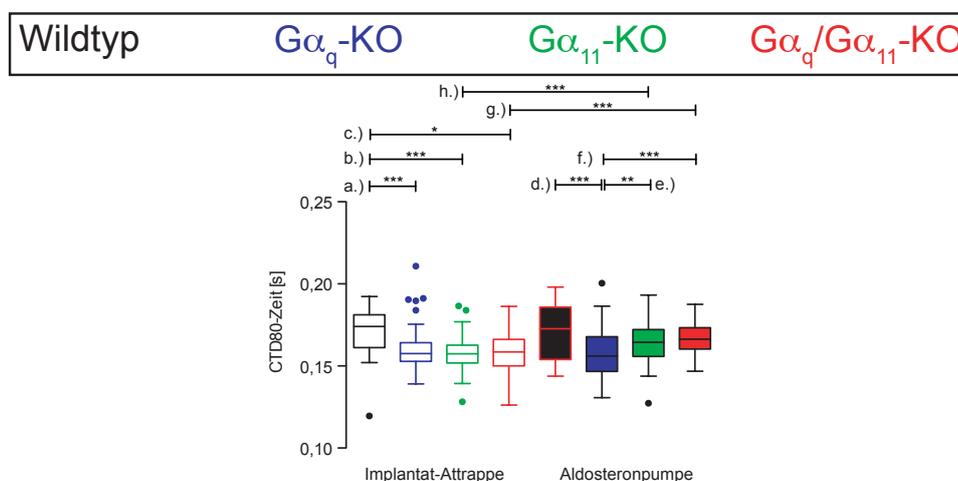


Abbildung 3.5: Statistische Analyse der CTD80-Zeiten bei murinen ventrikulären Kardiomyozyten ohne und mit Hyperaldosteronismus, während der Gleichgewichtsstimulation, alle signifikanten Änderungen wurden gekennzeichnet

3.1.2 CTD80-Zeit Änderungen

Änderung der CTD80-Zeit in Abhängigkeit vom Genotyp der untersuchten Tiere

Die Myozyten der KO-Tiere hatten signifikant kürzere CTD80-Zeiten als die Zellen der Wildtyp-tiere (Signifikanzen a, b und c). Die CTD80-Zeiten in den Zellen aller drei KO-Gruppen waren nicht signifikant unterschiedlich.

Mit Hyperaldosteronismus zeigten die Zellen der $G\alpha_{11}$ - und der $G\alpha_q$ -KO-Tiere gleich lange CTD80-Zeiten wie die Zellen der Wildtyp-tiere. Die Zellen der $G\alpha_q$ -KO-Tiere zeigten signifikant kürzere als CTD80-Zeiten als die Zellen der drei anderen Genotypen (Signifikanzen d, e und f).

Änderung der CTD80-Zeit der unterschiedlichen Genotypen durch den Einfluss des Hyperaldosteronismus

An den CTD80-Daten in Abbildung 3.5 ist abzulesen, dass die Zellen der $G\alpha_{11}$ - und der $G\alpha_q/G\alpha_{11}$ -KO-Tiere durch den Hyperaldosteronismus signifikant längere CTD80-Zeiten hatten (Signifikanzen h und g). Dahingegen kam es bei den Zellen der Wildtyp- und $G\alpha_q$ -KO-Tiere zu keiner Veränderung der CTD80-Zeiten.

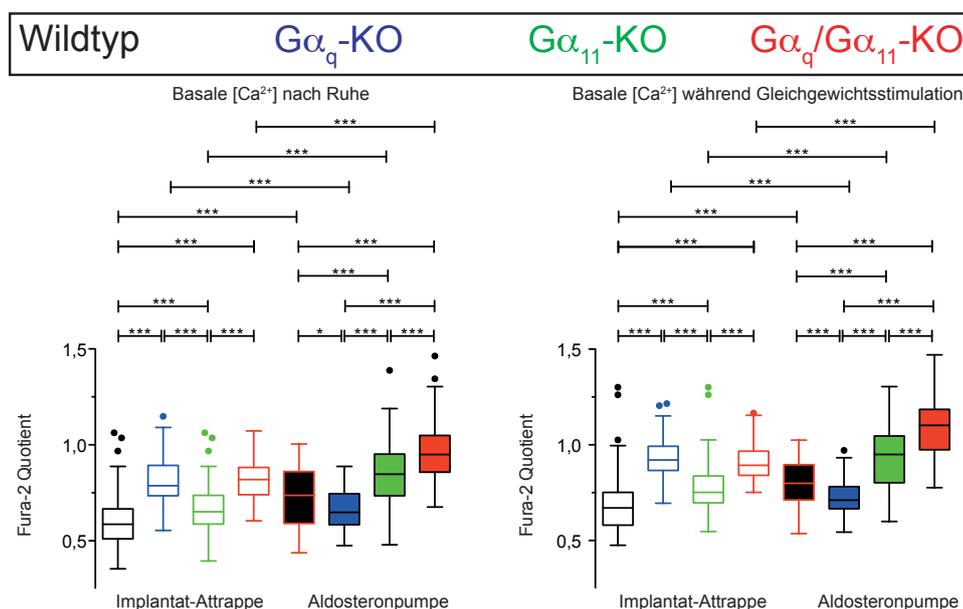


Abbildung 3.6: Statistische Analyse der basalen Kalziumkonzentration von murinen ventrikulären Kardiomyozyten ohne und mit Hyperaldosteronismus. (A) nach Ruhe (B) während der Gleichgewichtsstimulation, alle nicht signifikanten Änderungen wurden gekennzeichnet

3.1.3 Änderungen der basalen Kalziumkonzentration

Änderung der basalen Kalziumkonzentration in Abhängigkeit vom Genotyp der untersuchten Tiere

Die Kalziumkonzentrationen in den Zellen der KO-Tiere mit Implantat-Attrappe waren nach Ruhe höher als in den Zellen der Wildtyp-tiere. Von den Zellen der KO-Tiere hatten die Zellen der $G\alpha_{11}$ -KO-Tiere die niedrigste basale Kalziumkonzentration nach Ruhe. Die Zellen der $G\alpha_q$ - und der $G\alpha_q/G\alpha_{11}$ -KO-Tiere hatten nach Ruhe die gleichen basalen Kalziumkonzentrationen.

Die Zellen der $G\alpha_q$ -KO-Tiere mit Aldosteronpumpe hatten niedrigere basale Kalziumkonzentration als die Zellen der Wildtyp-tiere mit Aldosteronpumpe. Die Zellen der $G\alpha_{11}$ - und der $G\alpha_q/G\alpha_{11}$ -KO-Tiere mit Aldosteronpumpe hatten eine höhere basale Kalziumkonzentration als die Zellen der Wildtyp-tiere mit Aldosteronpumpe. Die Zellen der Doppel-KO-Tiere hatten die höchsten basalen Kalziumkonzentrationen aller Tiere mit Aldosteronpumpe.

Während der Gleichgewichtsstimulation galten genau die gleichen Relationen wie nach Ruhe.

Änderung der basalen Kalziumkonzentration der unterschiedlichen Genotypen durch den Einfluss des Hyperaldosteronismus

Durch den Hyperaldosteronismus wurden die basalen Kalziumkonzentrationen bei den Zellen der $G\alpha_q$ -KO-Tiere gesenkt. Die Zellen aller anderen Genotypen wiesen durch den Hyperaldosteronismus eine höhere Kalziumkonzentration auf. Wiederum galten diese Relationen sowohl nach Ruhe als auch während der Gleichgewichtsstimulation.

3.2 Zwei-Photonen-Photolyse

3.2.1 Ergebnisse der Simulationen

In diesem Abschnitt werden die Ergebnisse der Simulation der Zwei-Photonen-Photolyse bei variierender Laserpulsrate präsentiert. Zum besseren Verständnis der Ergebnisse der Simulation sollte beachtet werden, dass Gleichung 2.10 mittels Division durch c_0 normierbar ist. Somit werden die Konzentrationen der Käfigsubstanz und der freigesetzten Substanz in den folgenden Graphen normiert auf die Ausgangskonzentration der Käfigsubstanz angegeben, welche im späteren Experiment variieren kann. Die in den Si-

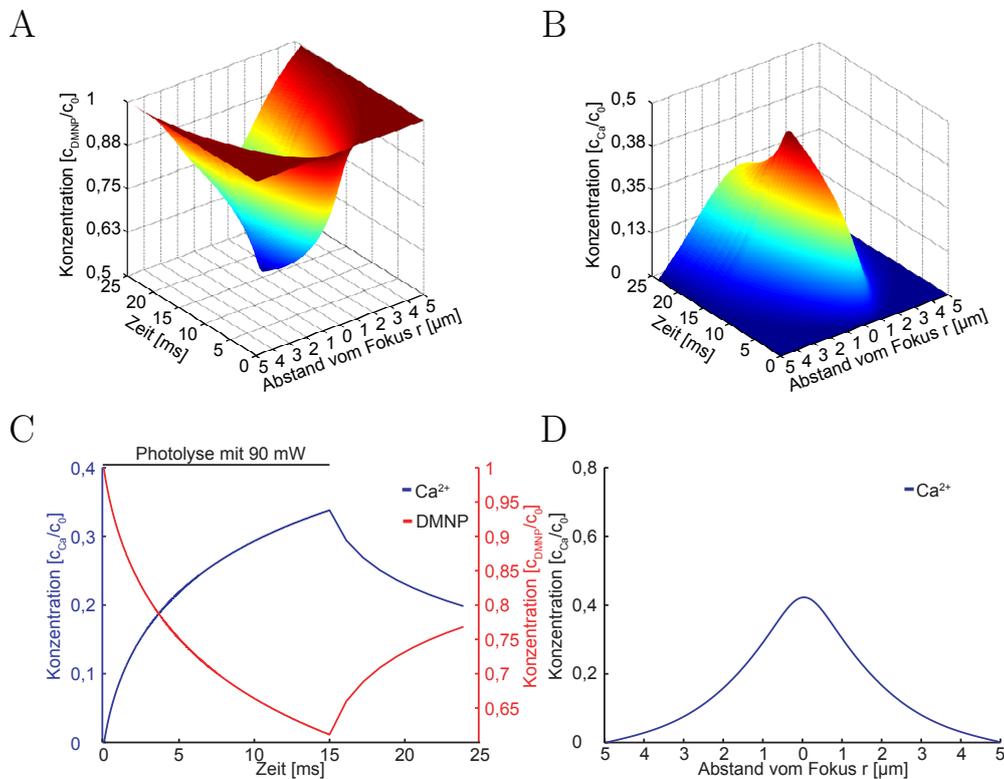


Abbildung 3.7: Simulation des Konzentrationsverlaufs (A) von DMNP und (B) des freigesetzten Kalziums in der Fokusebene bei 15 ms Photolyse und 10 ms Diffusion nach Photolyse mit 90 MHz und 90 mW Leistung, (C) Zeitverlauf der Konzentrationen im Laserfokus, (D) Profil von $[Ca^{2+}](r)$ bei $[Ca^{2+}]_{max}$

mulationen verwendeten Leistungen sind die mittleren Leistungen des Photolyselasers an der Probe. Um die Vermutungen bezüglich des Abbaus der Käfigsubstanz im Fokus zu bestätigen, wurde zuerst eine Simulation mit 90 mW Leistung und 90 MHz Pulsrate durchgeführt. Des Weiteren sollte

beachtet werden, dass die angegebene Konzentration des Kalziums nicht die Gesamtkonzentration darstellt, sondern nur die durch die Photolyse freigesetzte Konzentration. Die gesamte freie Kalziumkonzentration kommt (in einem realen Experiment) durch die vor dem Experiment eingestellte freie Kalziumkonzentration, sowie freie Kalziumpuffer und die durch Photolyse freigesetzte Kalziumkonzentration, zu Stande. Die Simulation diente jedoch dem Zweck, die Effizienz der Photolyse bei variierender Laserpulsfrequenz zu analysieren und für die jeweilige Käfigsubstanz zu optimieren. Eine Simulation für ein komplexeres zellähnliches System (mit zusätzlichen Kalziumpuffern, inhomogener Kalziumkonzentrationen durch Kompartimentalisierung und anisotroper Diffusion) hätte einen Umfang, der den hier gesteckten Rahmen weit überschreiten würde.

Das Ergebnis der Simulation, abgebildet in Grafik 3.7 zeigt, dass die Freisetzung, aufgrund des Abbaus der Käfigsubstanz im Fokus (siehe Teile A und C der Abbildung), nicht mehr linear sondern asymptotisch steigt (siehe Teile B und C der Abbildung). Abbildung 3.7 D zeigt das Profil der Konzentration

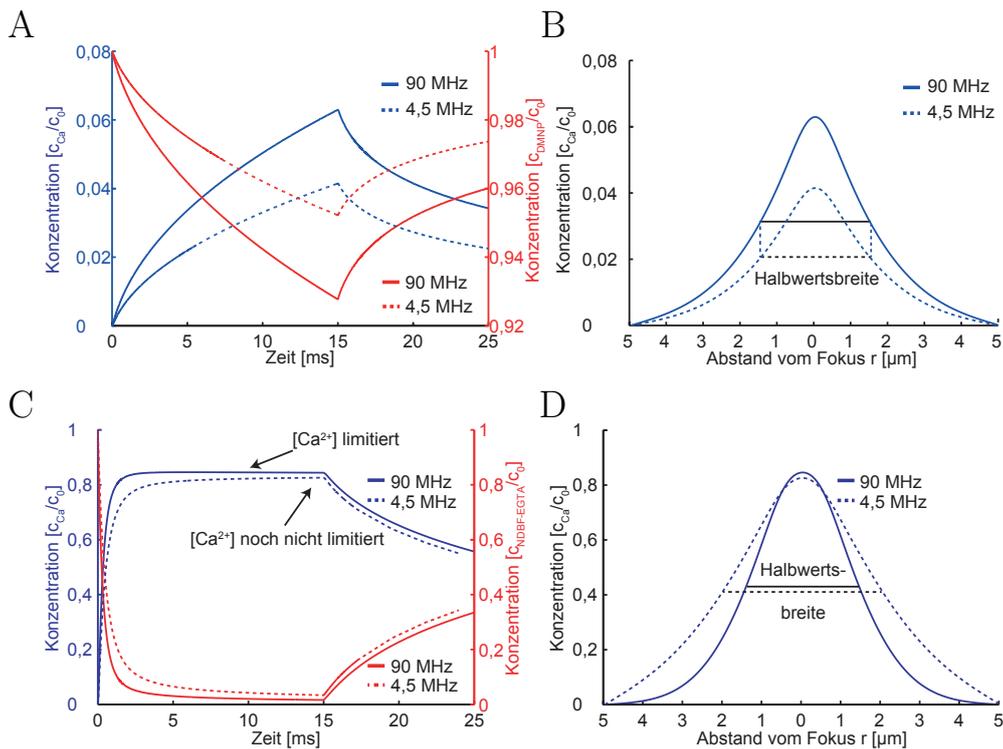


Abbildung 3.8: Simulationen der Photolyse bei 15 ms Photolysedauer, 10 ms Diffusion nach Photolyse, bei 90 MHz/25 mW sowie bei 4,5 MHz/90 mW: (A) Zeitverlauf von [DMNP] und $[Ca^{2+}]$ im Fokus, (B) Profil von $[Ca^{2+}]$ bei $[Ca^{2+}]_{max}$ bei Freisetzung aus DMNP (C) Zeitverlauf von [NDBF-EGTA] und $[Ca^{2+}]$ im Fokus, (D) Profil von $[Ca^{2+}](r)$ bei $[Ca^{2+}]_{max}$ bei Freisetzung aus NDBF-EGTA

des freigesetzten Kalziums zum Zeitpunkt der Spitze der Kalziumkonzentration. An diesem Profil ist zu erkennen, dass die Halbwertsbreite mehr als $2 \mu\text{m}$ beträgt.

Um nicht Simulationen mit Laserleistungen und Photolysezeiten durchzuführen, die die Herzmuskelzellen wie in Abbildung 3.19 gezeigt, massiv schädigen würden, wurden Tests mit Zellen durchgeführt (Daten nicht in dieser Arbeit), um Grenzwerte für diese Parameter zu finden. Die in den anschließenden Simulationen verwendeten Werte wurden so gewählt, dass eine Schädigung der Zellen ausgeschlossen werden konnte. Die ersten Simulationen, zur Optimierung der Experimente, wurden zudem unter der Voraussetzung durchgeführt, dass die minimale Pulszuglänge durch die Öffnungszeit des Verschlussystems beschränkt war, welches, wie in Abschnitt 2.2.5 bereits erwähnt, keine kürzeren Zeiten als 15 ms erlaubte.

Die Abbildungen 3.9 A und B zeigen die Simulation des Konzentrationsverlaufs von DMNP und Kalzium bei einer Photolyse mit 90 MHz und 25 mW

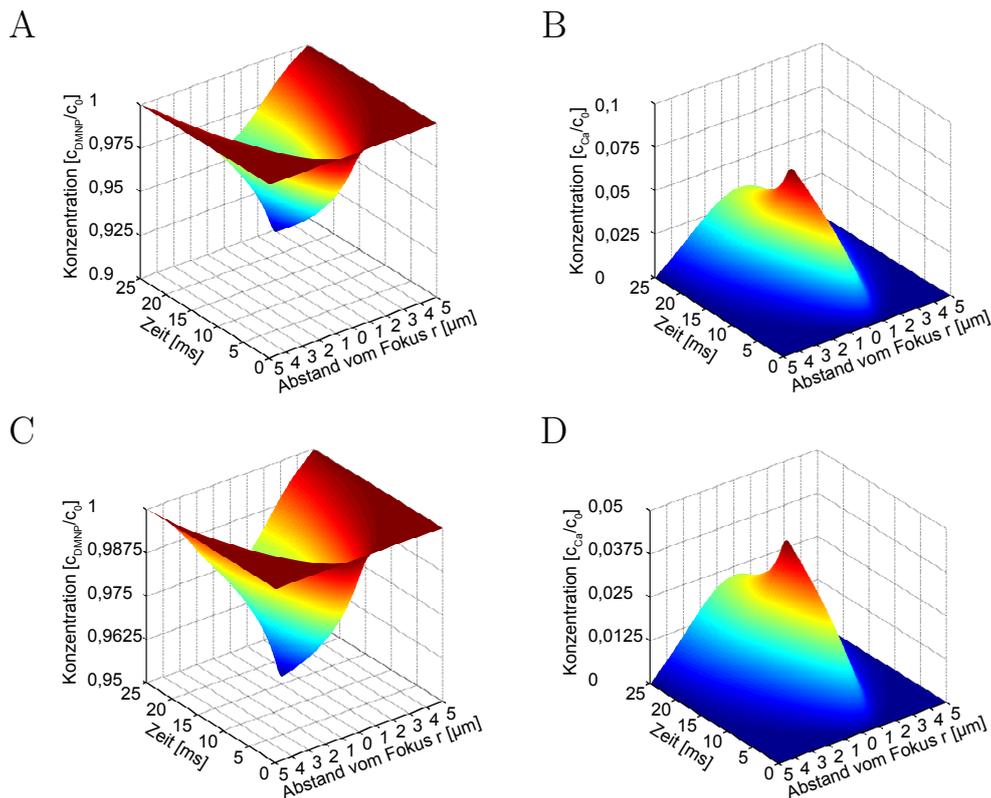


Abbildung 3.9: Simulationen des Konzentrationsverlaufs bei Photolyse mit 15 ms Photolysezeit und 10 ms Diffusion nach Photolyse; (A) von DMNP bei 90 MHz/25 mW, (B) von Ca^{2+} bei 90 MHz/25 mW; (C) von [DMNP] bei 4,5 MHz/90 mW (D) von Ca^{2+} bei 4,5 MHz/90 mW

Leistung. Zum Vergleich sind in den Abbildungen 3.9 C und D die Konzentrationsverläufe bei Photolyse mit 4,5 MHz und 90 mW Leistung zu sehen. In den Abbildungen 3.8 A und B auf Seite 62 ist der Vergleich der Konzentrationsverläufe und der Konzentrationsprofile bei unterschiedlichen Laserpulsraten dargestellt. An dem Profil des Kalziumkonzentrationsmaximums in Abbildung 3.8 B ist zu sehen, dass die Halbwertsbreite der Freisetzung schon auf $2 \mu\text{m}$ angewachsen war. Bei 90 MHz konnte das Kalzium nicht so weit diffundieren wie bei 4,5 MHz, jedoch war auch in diesem Fall der Radius mit erhöhter Kalziumkonzentration größer als der Fokus der Zwei-Photonen-Photolyse von ca. 460 nm .

Die intrinsischen Eigenschaften der zu photolisierenden Substanz, wie Quan-

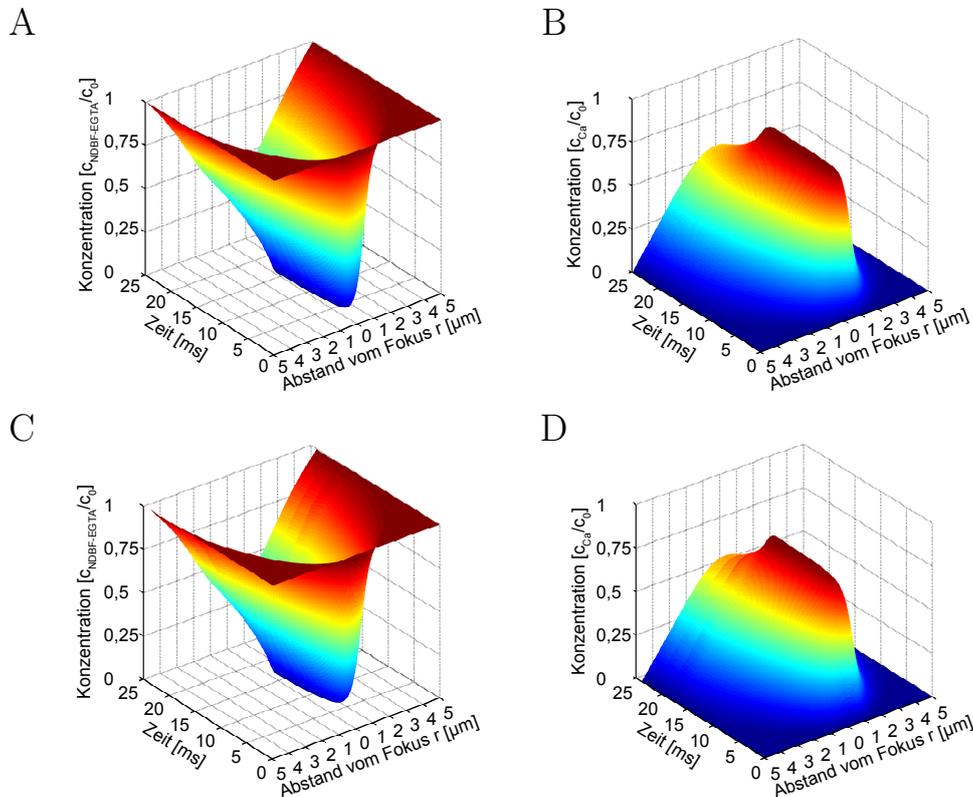


Abbildung 3.10: Simulationen des Konzentrationsverlaufs bei Photolyse mit 15 ms Photolysedauer und 10 ms Diffusion nach Photolyse, (A) von NDBF-EGTA bei 90 MHz/25 mW, (B) von Ca^{2+} bei 90 MHz/25 mW (C) von NDBF-EGTA bei 4,5 MHz/90 mW, (D) von Ca^{2+} bei 4,5 MHz/90 mW

teneffizienz und Absorptionsquerschnitt, beeinflussen immens die Photolyserate (siehe Gleichung 1.3). Um zu untersuchen, wie sich der Einfluss der veränderlichen Laserpulsrate bei einer Käfigsubstanz auswirkt, die deutlich höheren intrinsischen Parameterwerte als den besitzt als DMNP, wurde auch

dies in einer Simulationen untersucht. Die Ergebnisse der Simulationen mit den Parametern von Nitrodibenzofuran (NDBF)-EGTA (siehe hierzu auch Tabelle 2.2 auf Seite 40) sind in Abbildung 3.10 dargestellt. Abbildung 3.10 A und B zeigen die Kalziumkonzentrationsverläufe bei 90 MHz Laserpulsrate und 25 mW Leistung. In Abbildung 3.10 C und D wurde mit 4,5 MHz und 90 mW simuliert. Wie anhand 3.8 C zu sehen ist, wird der Fokus viel schneller

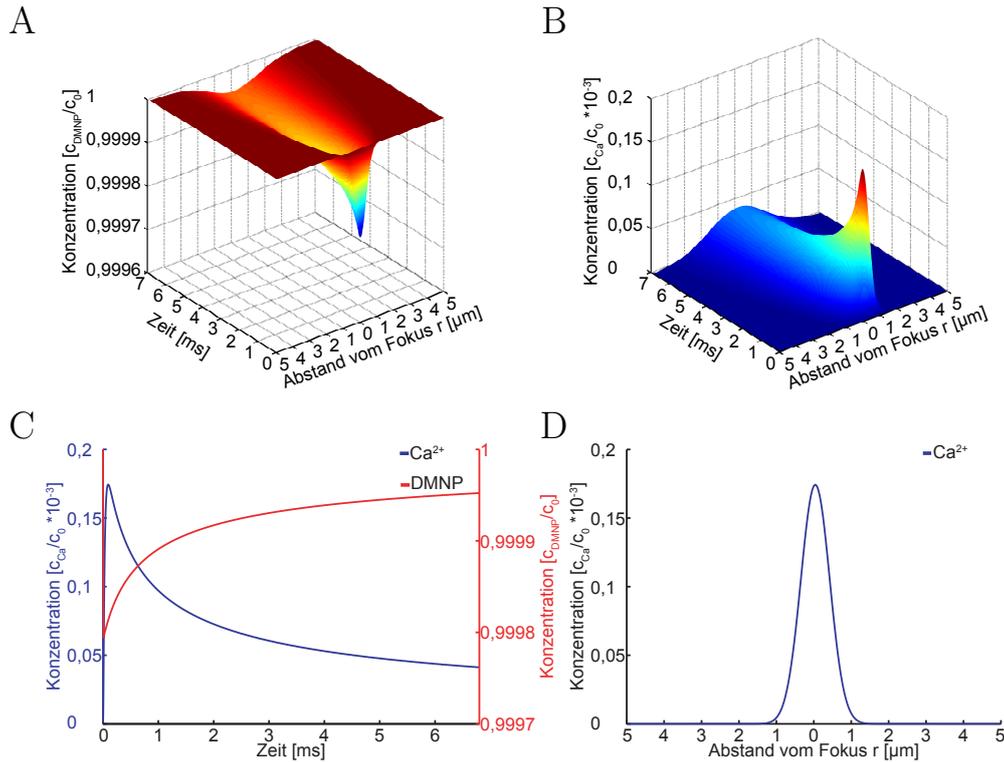


Abbildung 3.11: Simulation der Photolyse in der Fokusebene während 6,7 ms bei einer Pulszuglänge von 1000 Pulsen mit 90 MHz und 25 mW Leistung: (A) [DMNP] (B) $[Ca^{2+}]$ (C) [DMNP] und $[Ca^{2+}]$ aufgetragen gegen die Zeit (D) Profil von $[Ca^{2+}](r)$ bei $[Ca^{2+}]_{max}$

„geleert“ als es mit DMNP (3.8 A) der Fall ist. Es kommt sogar zu einem Maximum in der Kalziumkonzentration durch Freisetzung. Die Konzentrationen des freigesetzten Kalziums bei 90 MHz und 4,5 MHz sind vergleichbar, jedoch hat die Kalziumkonzentration bei der Photolyse mit 4,5 MHz noch nicht ihr Maximum erreicht wie bei 90 MHz. Wie Anhand der Abbildung 3.8 B und D zu sehen ist, kam es infolge der schnelleren und höheren Freisetzung des Kalziums auch zu einer größeren Halbwertsbreite des Kalziumkonzentrationsprofils bei maximaler Kalziumkonzentration. Obige Simulationen führten dazu, dass der experimentelle Aufbau neu gestaltet wurde. Wie in Abschnitt 2.2.5 beschrieben, kam ein Arbiträrpulsgenerator zum Einsatz, um mittels

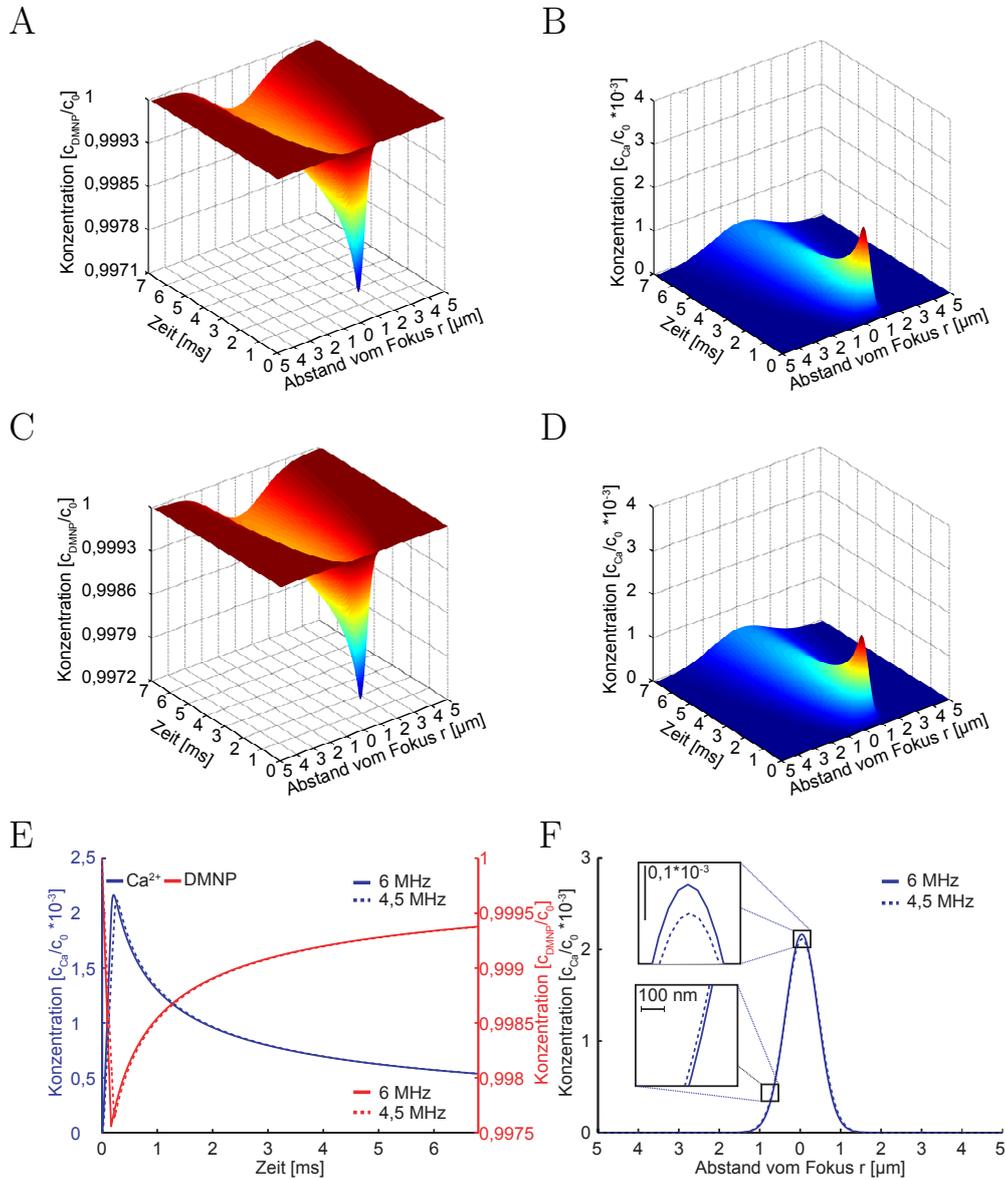


Abbildung 3.12: Simulation der Photolyse in der Fokusebene wahrend 6,7 ms mit 1000 Pulsen: (A) [DMNP] bei 90 MHz/25 mW (B) $[Ca^{2+}]$ bei 90 MHz/25 mW (C) DMNP bei 4,5 MHz/90 mW, (D) $[Ca^{2+}]$ bei 4,5 MHz/90 mW (E) [DMNP] und $[Ca^{2+}]$ aufgetragen gegen die Zeit (F) Profile von $[Ca^{2+}](r)$ bei $[Ca^{2+}]_{max}$

definierter Pulszahlen Photolyse zu betreiben. Um die Simulationen diesen neuen Gegebenheiten anzupassen, wurden in der Folge deutlich kürzere Photolysezeiten, Pulszüge von nur 1000 Pulsen, simuliert. So sollte der Einfluss

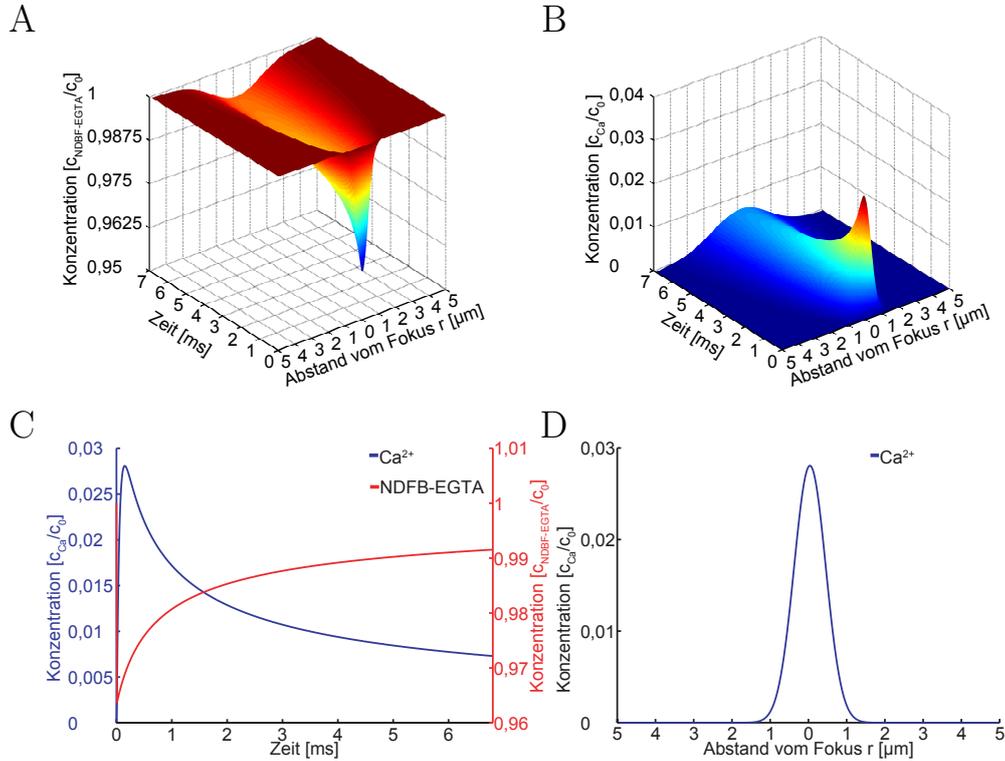


Abbildung 3.13: Simulation der Photolyse in der Fokusebene während 6,7 ms bei einer Pulszuglänge von 1000 Pulsen mit 90 MHz und 25 mW Leistung: (A) [NDBF-EGTA] (B) $[Ca^{2+}]$ (C) [NDBF-EGTA] und $[Ca^{2+}]$ aufgetragen gegen die Zeit (D) Profil von $[Ca^{2+}](r)$ bei $[Ca^{2+}]_{max}$

der Diffusion auf die Konzentrationsverteilung minimiert werden. Die Simulationsergebnisse mit kurzen Pulszügen von nur 1000 Pulsen bei 4,5 MHz und 6 MHz (Abbildung 3.12) zeigten, dass eine höhere Pulsrate bei gleicher Laserleistung eine größere Amplitude der Freisetzung zur Folge hatte. Wie für die 15 ms Pulszüge, wurden auch für 1000 Pulse Simulationen bezüglich NDBF-EGTA durchgeführt und der Einfluss der intrinsischen Parameter untersucht. Die Abbildungen 3.13 und 3.14 zeigen wiederum, dass eine höhere Rate bei gleicher Leistung eine größere Menge an Kalzium freisetzt. Zudem wird erneut gezeigt, dass eine höhere Laserpulsrate eine geringere Halbwertsbreite des Kalziumkonzentrationsprofils bewirkt.

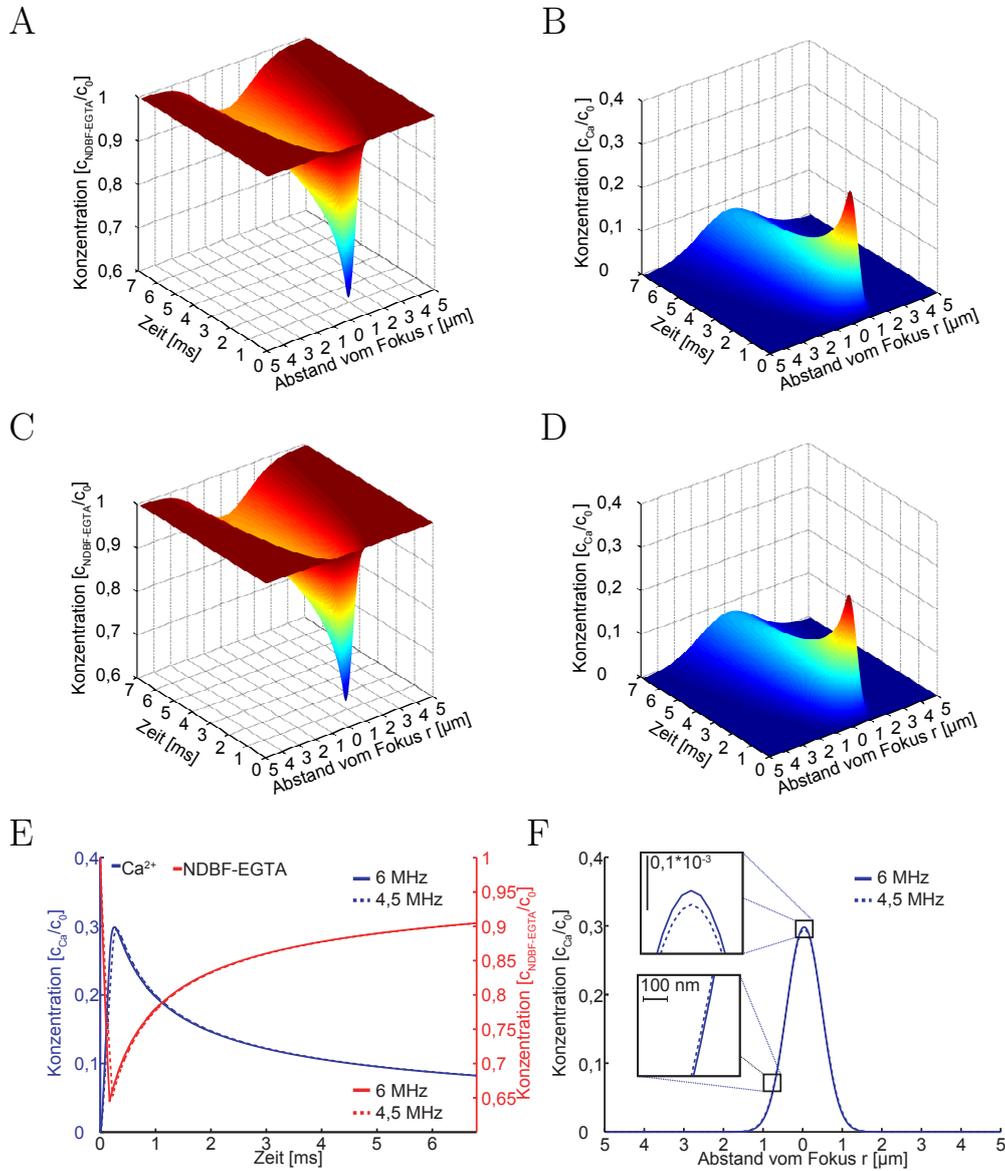


Abbildung 3.14: Simulation der Photolyse in der Fokusebene wahrend 6,7 ms mit 1000 Pulsen: (A) [NDBF-EGTA] bei 90 MHz/25 mW (B) [Ca^{2+}] bei 90 MHz/25 mW (C) [NDBF-EGTA] bei 4,5 MHz/90 mW, (D) [Ca^{2+}] bei 4,5 MHz/90 mW (E) [DMNP] und [Ca^{2+}] aufgetragen gegen die Zeit (F) Profile von [Ca^{2+}](r) bei [Ca^{2+}] $_{max}$

3.2.2 Justage des Systems

Im Verlauf der Arbeit kam es zu diversen Umbauten des Versuchsaufbaus, da sich herausstellte, dass die Photolyse nicht stabil war. Der ursprüngliche Aufbau des Zwei-Photonen-Photolyse Systems wurde in Kapitel 2 nicht diskutiert. Jedoch ist es sinnvoll im Folgenden einige der Erkenntnisse, die zu einem Umbau des System in den Zustand, wie es auf Seite 26 abgebildet ist führten, festzuhalten. Der ursprüngliche Aufbau ist in Abbildung 3.15

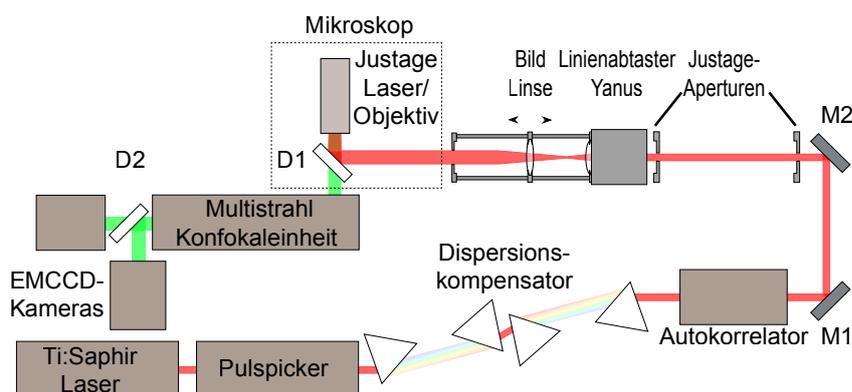


Abbildung 3.15: Die Skizze zeigt den Aufbau zur Photolyse, wie er ursprünglich angelegt war, im Vergleich zum Aufbau der im Folgenden beschriebenen Versuche existierte hier zusätzlich ein Linienabtaster, zudem wurde der Dispersionskompensator ausgetauscht. Die vorgenommenen Veränderungen brachten eine Stabilisierung der Photolyse mit sich

skizziert. Drei Bauteile wurden identifiziert, die sich als problematisch für die Photolyse erwiesen. Zwei der Teile, Scankopf und Dispersionskompensator, machten einen Umbau notwendig. Das dritte Bauteil, der Pulse Picker, war essentiell für die Photolyse mittels einer definierten Zahl an Pulsen und konnte somit nicht ausgetauscht oder entfernt werden.

Linienabtaster

Die Ausrichtung, des Linienabstasters Yanus 3 von TILL Photonics und der damit verbundenen Linse, musste frei per Hand vorgenommen werden. Die optische Achse des Mikroskops war zudem an dem Eingang, durch den der Photolyselaser eingekoppelt wurde, nicht markiert. Somit war die Kopplung des freien Laserstrahls in die optische Achse des Mikroskops nicht exakt zu gewährleisten. Ein Problem, das in Zusammenhang mit der Konstruktionsweise des Yanus 3 steht, ist, dass eine Verschiebung des Linienabstasters in horizontaler Richtung eine vertikale Parallelverschiebung des Laserstrahls zur Folge hatte. Somit brachte eine Drehung des Yanus 3 immer auch eine

vertikale Änderung des Strahlengangs mit sich, welche ausgeglichen werden musste. Der Versuch, einen in den Objektivrevolver geschraubten Diodenlaser in umgekehrter Richtung zum Markieren der optischen Achse zu verwenden, brachte eine Besserung der Einkopplung mit sich. Jedoch war die Justageprozedur äußerst aufwendig. Erst musste der Scankopf entfernt werden, um die Halterung auszurichten. Dann wurde der Scanner angebracht und zwei Aperturen vor dem Scanner ausgerichtet. Als Letztes wurde der TiSa Laserstrahl auf diese Aperturen ausgerichtet. Die Ausrichtung der Linsen, so dass der Laserstrahl diese mittig passierte, war zudem nie perfekt. Dies führte zu einigen weiteren Problemen. Musste die Linse zur Aufweitung verschoben werden, so wurde es notwendig, danach eine erneute Ausrichtung des gesamten Spiegelsystems durchzuführen. Um dies zu umgehen (und da der Linienabtaster ohne eine funktionstüchtige Photolyse keinen Zweck erfüllte) wurde beschlossen, den Linienabtaster aus dem System zu entfernen. Dies führte in der Folge zu einer erheblichen Steigerung der Stabilität der Versuche.

Dispersionskompensator

Lange Zeit wurde ein in unserem Labor modifizierter Dispersionskompensator verwendet. Die Modifikation und die im Kompensator verwendeten Spiegel (\varnothing 0,5 Zoll) machten es schwierig, einen Laserstrahl durch das Prismenpaar zu koppeln. Infolgedessen machten leichte Strahlwegänderungen vor dem Kompensator eine komplette neue Justage, auf die Aperturen vor dem Mikroskop, notwendig. Der Wechsel auf den APE Dispersionskompensator steigerte die Stabilität erheblich.

Pulspicker

Eine wichtige Beobachtung bei der Justage war, dass der Laserstrahl nach passieren des Pulspickers kein Gaussprofil mehr aufwies. Der Strahlquerschnitt wurde durch die im Pulspicker verwendeten Hohlspiegel elliptisch, was jedoch nur im aufgeweiteten Zustand sichtbar wurde. Damit einhergehend hatte der Laser auch zwei unterschiedliche Divergenzen für die beiden Symmetrieachsen des Strahlprofils. Ohne den Pulspicker im Strahlengang behielt der Laser auch im aufgeweiteten Zustand seine Ausgangsform bei. Dieser Umstand erschwerte die Justage auf Aperturen, da es notwendig wurde, für eine exakte Ausrichtung, die Transmission durch die teils geschlossene Irisblende als Maß zu verwenden. Zusätzlich erschwerte wurde die Justage des gesamten Systems durch kleine Lageänderungen des Laserstrahls bei Wechsel der Wellenlänge.

3.2.3 Messungen zur Parfokalität

Um die optimale Einkopplung zu gewährleisten, musste der Laser auf die Aperturen des in den Objektivrevolver eingeschraubten Linsentubus ausgerichtet werden. Dies erfolgte mittels der beiden beweglich gelagerten Spiegel zwischen Teleskop und Mikroskop, mit deren Hilfe abwechselnd auf die jeweilige Apertur justiert wurde. Zur Kontrolle diente die mittels Laserleistungsmessgerät gemessene Leistung bei zu 1/3 geschlossener Apertur. Danach wurde die Parfokalität mittels der beweglichen Linse in dem Käfigsystem eingestellt. Um die optimale Position zu gewährleisten, mussten die aparenten Fokusgrößen in x-, y-, und z-Richtung ermittelt werden. Die

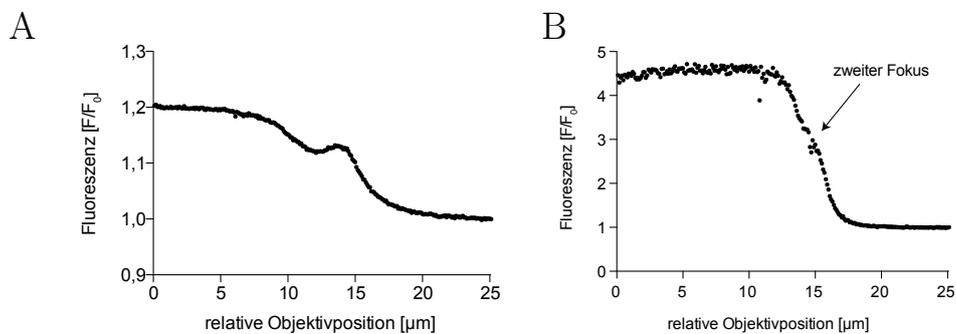


Abbildung 3.16: Die Bilder zeigen die aufgenommene Fluoreszenz beim Überstreichen der Grenzschicht von Fluoreszeinlösung zu Glas. In (A) ist zu sehen, dass der Laser entsprechend der unterschiedlichen Divergenzen, die durch die Deformierung im Puls Picker entstehen, zwei Foki aufweist. In (B) ist dies auch sichtbar, jedoch mit deutlich geringerem Abstand der Foki in Richtung der optischen Achse

Messungen zum ermitteln der optimalen Bild-Linsen-Position, mittels Überstreichen der Grenze zwischen Glas und Fluoreszein, ergaben in z-Richtung, bei nicht optimaler Justage, häufig Graphen wie sie in Abbildung 3.16 A zu sehen sind. Dabei ist zu erkennen, dass es mehrere Maxima gab. Dies deutet darauf hin, dass mehrere Foki gemessen wurden. Abbildung 3.16 B stellt die Fluoreszenz bei besserer Justage dar, zeigt jedoch ebenfalls zwei Foki wenn auch mit deutlich geringerem Abstand. Falls zwei Maxima erkennbar waren, wurden mittels Regression zwei Fokusslängen bestimmt und anschließend addiert, um die Gesamtlänge des Fokus in z-Richtung zu bestimmen. Die Foki in x- und y-Richtung wurden mittels einfacher Gauss-Regression bestimmt. Die Ergebnisse der Messungen zur Parfokalität in Abhängigkeit von der Position der Bild-Linse, sind in Abbildung 3.17 zu finden. Zu beachten ist in diesem Zusammenhang, dass die so bestimmten Foki nicht die reale Fokusgröße wiedergeben. Zum einen wird bei der Detektion der reale Fokus mit der PSF der Konfokaleinheit, im mathematischen Sinne, gefaltet.

Zum anderen kann in der wässrigen Lösung das angeregte Fluoreszein frei diffundieren.

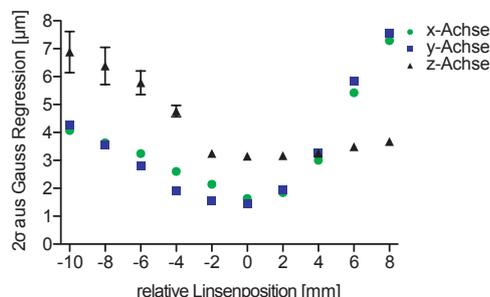


Abbildung 3.17: Mittels Gauss-Regression angenäherte Fokusgrößen, angegeben ist der Wert 2σ für die volle Fokusbreite, der sichtbar größere Fehler bei -10 mm bis -4 mm ist auf doppelte Foki zurückzuführen

3.2.4 Sättigung der Fluoreszenz

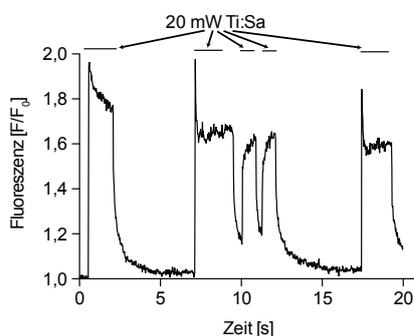


Abbildung 3.18: Photolyse von CMNB-caged Fluoreszein in 2,5% (w/v) Agarose-Gel. Es ist zu sehen, dass die Spitze zu Beginn der Photolyse nur reproduziert werden kann wenn dem System Zeit zur Relaxation gegeben wird

Die endliche Diffusionsrate in einem realen Medium bedingt, dass die photolysierten Moleküle nicht instantan durch solche aus der Umgebung ersetzt werden. Bei geringen Photolyseraten konnte dieser Effekt unter Umständen so klein sein, dass er nicht mit einer Photolyse-dauer im ms Bereich nachweisbar war. Eine reduzierte freie Weglänge zum Verkleinern der Diffusionsgeschwindigkeit, zum Beispiel in einem Agarose-Gel, konnte diesen Effekt der Verknappung der Käfigmoleküle im Fokus verstärken. Um die Hypothese, dass es im Fokus zu einer Verknappung der Käfigsubstanz kam, zu untermauern, wurde ein Experiment mit verringerter Diffusion durchgeführt.

Dazu wurde in einem 2,5% (w/v) Agarose-Gel, Fluoreszein mittels Zwei-Photonen-Photolyse aus einem CMNB-Käfig freigesetzt. In Abbildung 3.18 ist die detektierte Emission gegen die Zeit aufgetragen. Die Fluoreszenz stieg dabei in den ersten Millisekunden stark an, um dann auf ein Gleichgewichtsniveau abzusinken. Nach Abschalten des Lasers, sank die Fluoreszenz wieder auf das Hintergrundniveau. Wurde der gepulste Laser nur kurz abgeschaltet (<1 s), so stieg die Fluoreszenz nach dem Wiedereinschalten erneut, diesmal jedoch ohne das schnelle Maximum am Anfang. Hatte das System mindestens 5 s Zeit bis zum Wiedereinschalten der Photolyse, so konnte die Spitze reproduziert werden.

3.2.5 Zellschädigung in Abhängigkeit von der Laserpulsrate

Zu Beginn dieses Abschnittes soll anhand Abbildung 3.19 verdeutlicht werden, welche Schäden 45 mW mittlere Laserleistung an einer Zelle, bei 90 MHz Repetitionsrate, verursachten. Dies gibt einen guten Eindruck davon, wie stark die negativen Auswirkungen des Lasers, durch Verringerung der Pulsrate, abgemildert werden konnten.

Wie in Abschnitt 2.2.7 auf Seite 33 erläutert, dienten Experimente an Zellen einer HEK-Zelllinie und Kardiomyozyten zur Evaluation der Schädigung bei Variation der Laserpulsfrequenz.

Die Fluo-4 beladenen HEK-Zellen wurden dabei 50 Laserpulszügen von 100 ms Länge im Abstand von 1 s ausgesetzt. Zum einen konnte die Zelle, durch die Beladung mit Fluo-4, im Fluoreszenzbild sichtbar gemacht werden, und zum anderen war die Fluoreszenz des Fluo-4 ein Indikator für die Kalziumkonzentration in der Zelle. Bei einem Schaden an der Zellmembran durch den Laser konnte so einströmendes Kalzium detektiert werden. Durch die Fluoreszenz des Fluo-4 konnten aber auch Deformationen innerhalb der Zelle, wie in Abbildung 3.20 A gezeigt, nachgewiesen werden.

In Abbildung 3.20 B ist die mittlere Zahl der Pulse aufgetragen, nach denen die Zellen eine sichtbare Deformation zeigten. Der Median der Pulszahl bis zu einer Deformation war bei 4,5 MHz 16, bei einer Pulsrate von 1,1 MHz war der Median 50. Da jedoch nur 50 Pulse aufgenommen wurden, kam der Wahrscheinlichkeit, mit der eine Deformation auftritt, mehr Bedeutung zu. Bei einer Pickrate von 1 zu 20, also 4,5 MHz, erfolgte eine Deformation mit 60% Wahrscheinlichkeit vor dem fünfzigsten Puls, bei 1,1 MHz kam es in nur ca. 8% der Fälle zu einer solchen Deformation. Die Datenerhebung bezüglich des Fluoreszenzanstiegs des Fluo-4 durch einströmendes Kalzium, ergab keine signifikanten Unterschiede zwischen beiden Repetitionsraten. Sowohl bei

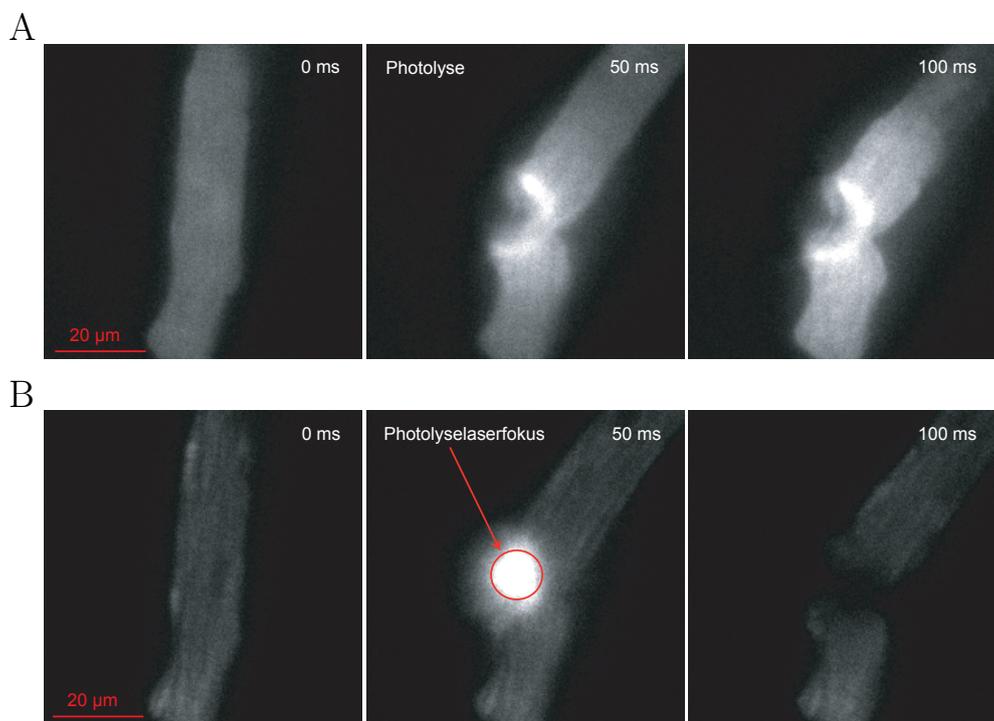


Abbildung 3.19: Die Bilder zeigen die aufgenommene Fluoreszenz von (A) Fluo-4 und (B) MitoTracker@Red bei Schädigung der Zelle durch 45 mW Laserleistung an der Probe bei 90 MHz und 20 ms Öffnungszeit des Verschlussystems, die Bildrate betrug 20 Hz

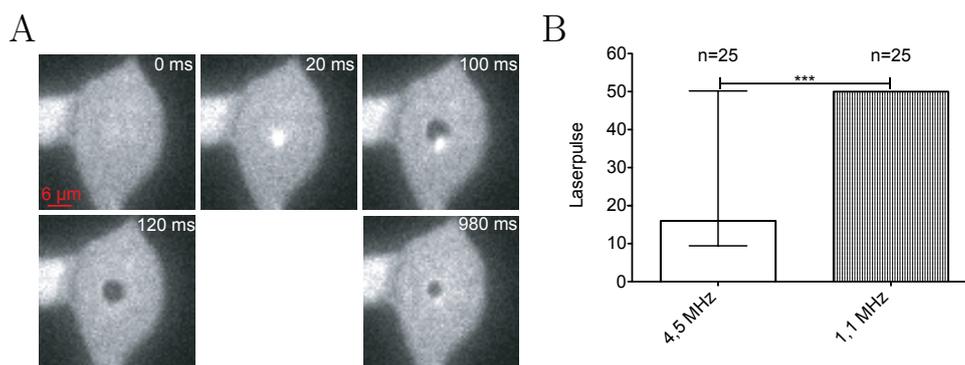


Abbildung 3.20: (A) Deformation innerhalb einer HEK-Zelle durch den 15ten Laserpulszug von 100 ms Länge bei 4,5 MHz mit 1 mW mittlerer Leistung an der Zelle, (B) Einfluss der Pulsfrequenz auf die Wechselwirkung der Laserpulsezüge mit der Zelle. Aufgetragen ist der Median mit Interquartilsabstand der Zahl der Pulszüge, bis diese eine Deformation in der Zelle, wie in (A) gezeigt, verursachten. Der Median war einem Mann-Whitney-Test zufolge signifikant unterschiedlich

4,5 MHz als auch bei 1,1 MHz kam es in 8 von 20 Fällen zu einem Ansteigen der zytosolischen Kalziumkonzentration.

Des Weiteren wurden, wie in Abschnitt 2.2.7 beschrieben, Versuche mit ventrikulären Kardiomyozyten von Ratten unternommen, deren Mitochondrien mit MitoTracker®Red beladen wurden. In Abbildung 3.21 ist die gemittelte Fluoreszenz aus mehreren Versuchen gegen die Zeit aufgetragen. Zu sehen ist, dass bei gleicher Spitzenleistung mit 250 kHz und mit 1,1 MHz die Fluoreszenz fast gleich stark abnahm, obwohl bei 1,1 MHz 4mal so viele Pulse die Probe erreichten wie mit 250 kHz. Abbildung 3.21 C zeigt zum Vergleich die Abnahme der Fluoreszenz bei 90 MHz mit 1/13 der Spitzenleistung. Hierbei war fast keine Abnahme der Fluoreszenz zu beobachten. Die unterschiedlich hohen und breiten Spitzen in der 2-Photonen angeregten Fluoreszenz kamen dadurch zustande, dass das Verschlussystem des Lasers und die Kamera nicht explizit synchronisiert waren.

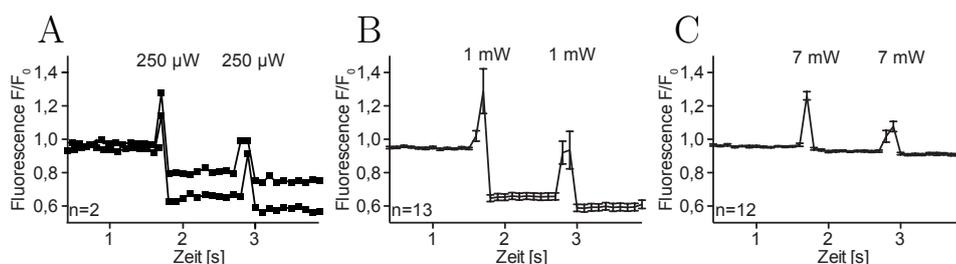


Abbildung 3.21: Einfluss der Pulsfrequenz auf die Abnahme der Fluoreszenz innerhalb der Mitochondrien von ventrikulären Kardiomyozyten aus Rattenherzen, mit einer Laserpulsrate von (A) 250 kHz, (B) 1,1 MHz bei gleicher Spitzenleistung und (C) 90 MHz bei 1/13 Spitzenleistung von (A) und (B)

3.2.6 Einfluss der Laserpulsrate auf die Photolyse

Die Ergebnisse aus den Simulationen in Abschnitt 3.2.1 waren ausschlaggebend dafür, weitere Untersuchungen mit hohen (90 MHz) und niedrigen (1,1 MHz) Pulsraten in Zellen durchzuführen. Dazu wurden HEK-Zellen mittels Mikro-Pipette mit einer 3 mM NPE-HPTS Lösung beladen (siehe Abschnitt 2.2.7). Da beabsichtigt war, den Auswirkungen einer modulierten Laserpulsrate bei starkem Einfluss der Diffusion zu eruieren, wurde eine lange Pulszuglänge von 100 ms gewählt. Die Laserleistung bei 90 MHz Laserpulsrate betrug 10 mW an der Probe, bei 1.1 MHz wurde eine mittlere Leistung von rund 1 mW verwendet. Verglichen wurde die mittlere Freisetzung in 9 Zellen, um Unterschiede in der Beladung und der Lokalisierung der Freisetzung auszugleichen. Zur Demonstration ist in Abbildung 3.22 eine solche Freisetzung in einer HEK-Zelle zu sehen. Die Aufnahmezeit der Kamera

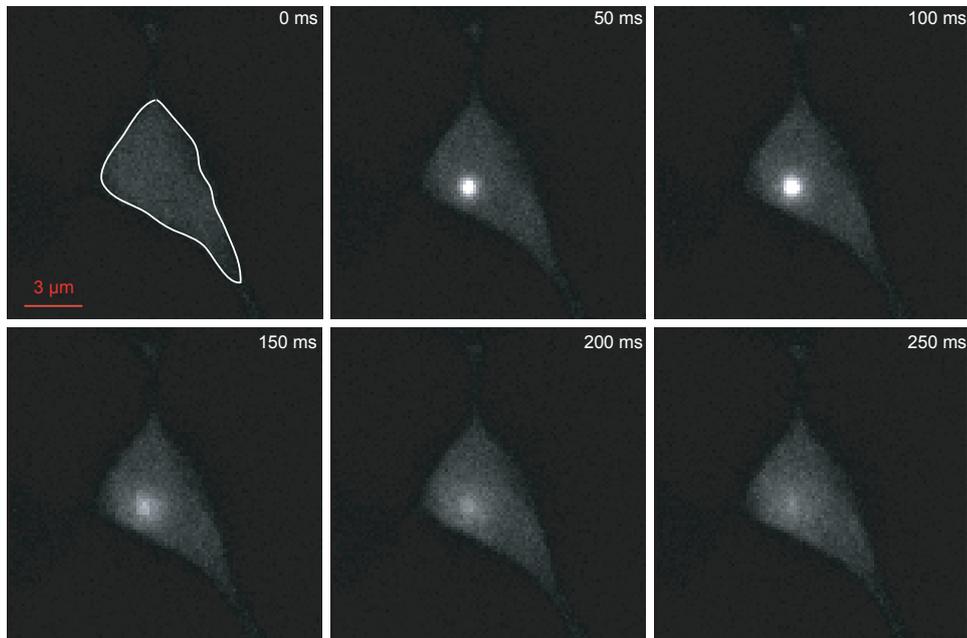


Abbildung 3.22: Freisetzung von HPTS aus NPE-caged HPTS in HEK-Zelle mit Fluoreszenz von freigesetztem HPTS, die Leistung an der Probe betrug 1 mW, die Pulszuglänge betrug 100 ms bei 1,1 MHz Laserpulsrate. Angeregt wurde das HPTS bei 491 nm mit ca. 1 mW. Um die Zelle deutlich hervorzuheben, wurde diese im ersten Bild weiß umrandet, eine Mittelung aus 9 Spuren und die statistische Analyse ist in Abbildung 3.23 zu finden

betrug 20 Hz. Wie in Abbildung 3.23 zu sehen ist, waren beide Fluoreszenz-Verläufe fast identisch. Eine statistische Analyse der Daten zeigte, bis auf zwei Messpunkte vor Durchführung der Photolyse, keine signifikanten Unterschiede.

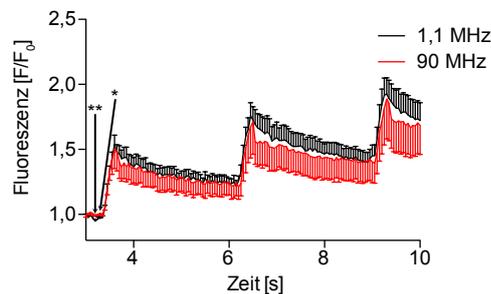


Abbildung 3.23: Verglichen wird hier die Fluoreszenz von HPTS in je 9 HEK-Zellen nach der Freisetzung durch Zwei-Photonen-Photolyse bei 1,1 MHz Laserpulsrate und 1 mW mittlerer Leistung an der Probe sowie bei 90 MHz mit 20 mW. Die Daten wurden statistisch überprüft und alle signifikant unterschiedlichen Messpunkte markiert

3.2.7 Photolyse mittels definierter Laserpulszahl

Die Simulationen aus Abschnitt 3.2.1 zeigten, dass bei Photolysezeiten von 15 ms die Halbwertsbreite der Kalziumkonzentrationsspitze durch Zwei-Photonen-Photolyse mehr als $2 \mu\text{m}$ durchmaß. In Experimenten, die der Kartographierung von Rezeptorclustern dienten, war somit die räumliche Auflösung auf diesen Wert begrenzt. Der Fokus der 2-Photonen-Photolyse im beugungsbegrenzten Fall war jedoch, bei 730 nm Laserwellenlänge und bei einer numerischen Apertur von 1,49, kleiner als 490 nm. Für diese Diskrepanz ist die Diffusion der angeregten Käfigsubstanz und des Kalziums verantwortlich. Aus diesem Grund wurde, wie in Abschnitt 2.2.5 beschrieben, eine Methode entwickelt, um mit Hilfe des Pulsepickers eine definierte Zahl an Laserpulsen zur Photolyse zu verwenden. Um diese neue Methode zur Steuerung der Pulszüge mit der alten Methode mittels Verschlussystem zu vergleichen, erfolgte ein Versuch mit CMNB-caged Fluoreszein in Agarose-Gel. Abbildung 3.24 zeigt, dass trotz gleicher Bedingungen in 4 Fällen eine jeweils andere Freisetzung gemessen werden konnte. Dies war bedingt dadurch, dass die Bildakquise nicht explizit mit dem Start der Photolyse synchronisiert war. Auch mit gepickten Pulsen kam es zu einem Mangel an Käfigsubstanz im Fo-

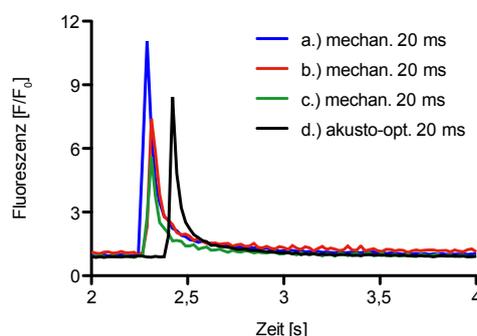


Abbildung 3.24: Fluoreszenz von Fluoreszein nach Freisetzung aus CMNB-caged Fluoreszein im Agarose-Gel. Die Steuerung des Pulszuges zur Photolyse erfolgte bei den Graphen a,b und c durch das mechanische Verschlussystem. Im Falle des schwarzen Graphen wurde der Pulszug mittels des Pulsepickers und des daran gekoppelten Arbiträrpulsgenerators gesteuert

kus des Photolyselasers, wie Abbildung 3.25 zeigt. In Grafik 3.25 A wird der Fluoreszenzverlauf von Fluoreszein dargestellt. Dabei wurden jeweils 1000 Laserpuls, mit 6 MHz, zwischen den aufgenommenen Bildern, bei einer Akquisitionsrate von 45 Hz, zur Photolyse von CMNB-caged Fluoreszein verwendet. Es kam nach ca. 50000 Pulsen, siehe bei 5 ms, zu einem Maximum und anschließend zu einer Abnahme der Fluoreszenz auf ein niedrigeres Niveau. Grafik 3.25 B zeigt zudem, dass es auch bei 1,8 s Pause zwischen

Pulszügen mit 30000 Pulsen zu einem Mangel an Käfigsubstanz im Fokus des Photolyselasers kam, da die Fluoreszenzmaxima sukzessive abnahmen.

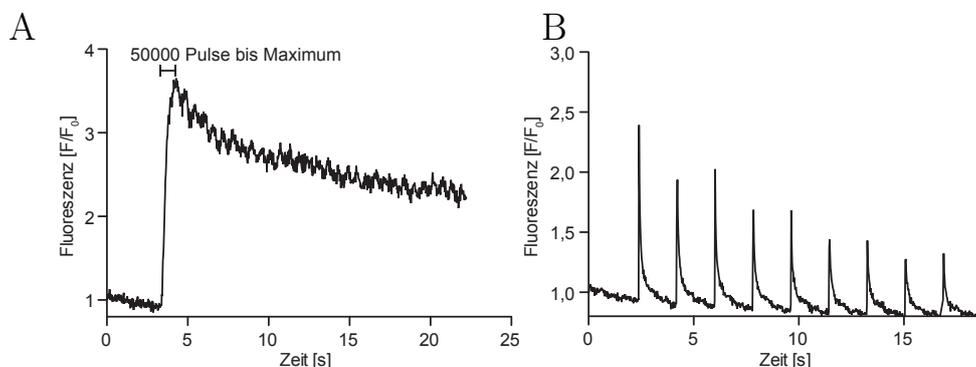


Abbildung 3.25: Fluoreszenz von Fluoreszein nach Photolyse mittels definierter Pulszahlen von CMNB-caged Fluoreszein im Agarose-Gel. (A) die Photolyse erfolgte mit 1000 Laserpulsen nach jedem Bild, das von der Kamera aufgenommen wurde. Zu erkennen ist, dass die Fluoreszenz nach bei ca. 5 s ein Maximum hatte. (B) die Photolyse erfolgte mit 30000 Laserpulsen nach jedem 80sten Bild, hier nahmen die Maxima der Fluoreszenz ab

Um alle Vorteile der durch den Pulspicker gesteuerten Photolyse auszunutzen war es notwendig, die Photolysedauer, den Zeitpunkt der Photolyse und die Bildakquise der Kamera aufeinander abzustimmen. Durch die Synchronisation von Belichtungszeit und Photolyse, mittels des Auslösesignals der Kamera und der Verzögerung, konnte gewährleistet werden, dass durch den Photolyselaser entstandene TPEF nicht mehr von der Kamera detektiert werden konnte (siehe auch Abbildung 3.26) und dass die Photolyse immer zum gleichen Zeitpunkt der Bildakquise aufgenommen wurde. Somit konnte sichergestellt werden, dass bei gleicher Photolyse auch gleich hohe Maxima gemessen werden konnten.

Bei der Zwei-Photonen-Photolyse kam es im Allgemeinen auch zu TPEF, welche die exakte Bestimmung der Freisetzung störte und nur durch aufwendige zusätzliche Messungen und Berechnungen in den Messdaten identifiziert werden konnte. In Abbildung 3.26 wird gezeigt, dass die „Totzeit“ der Kamera (wie in Abschnitt 2.2.5 erläutert) nutzbar war, um zu photolysieren. Abbildung 3.26 A präsentiert ein Experiment, bei dem mit Kalzium beladenes DMNP photolysiert wurde. Das freigesetzte Kalzium wurde durch die Fluoreszenz von $25 \mu\text{M}$ Fluo-4 sichtbar gemacht. Die 500 Laserpulse zur Photolyse lagen zeitlich zwischen den Aufnahmen bei 0 s und 6,9 s. Die Leistung des Lasers betrug an der Probe dabei 3 mW, bei 6 MHz und 715 nm. Wurde wie in Abbildung 3.26 B, der Anregungslaser (491 nm) für das Fluo-4 abgeschaltet, konnte keine Fluoreszenz oberhalb des Rau-

schens der Kamera detektiert werden. Eine TPEF von Fluo-4 war somit nicht messbar und das Artefakt, welches in der Regel durch TPEF in den Aufnahmen mit Zwei-Photonen-Photolyse sichtbar war, konnte verhindert werden. Abbildung 3.26 C zeigt die Fluoreszenz im Photolyselaserfokus, der beiden Aufnahmen aus A und B, aufgetragen gegen die Zeit. Zum Einstellen

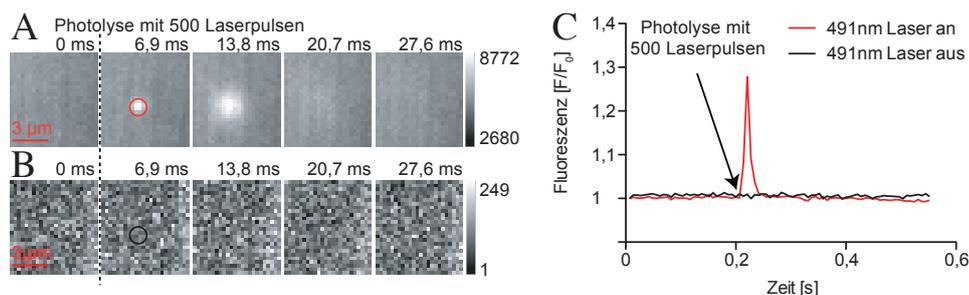


Abbildung 3.26: (A) Fluoreszenz von Fluo-4 bei der Photolyse mittels 500 Laserpulsen von mit Kalzium beladenem DMNP. Die Fluoreszenz wurde angeregt bei 491 nm. Die Photolyselaserleistung betrug 3 mW an der Probe bei 6 MHz Photolyselaserpulsrate. (B) zeigt die Photolyse unter den gleichen Bedingungen ohne 491 nm Anregung des Fluo-4. Es ist keine TPEF messbar. Dies zeigte, dass die Photolyse in der „Totzeit“ der Kamera durchgeführt wurde. (C) zeigt den Verlauf der Fluoreszenz in den beiden Auswerteregionen die in (A) und (B) markiert sind

der richtigen Verzögerung sollte die Kamera auf eine hohe Photoelektronen-Verstärkung (*EM-gain*) eingestellt sein. Des Weiteren wurden meist mehrere der Detektorpixel integriert (4x4 oder 8x8). Es war zudem hilfreich, eine hohe Leistung des gepulsten Lasers zu verwenden, um die Fluoreszenz einer schon geringen Zahl an Laserpulsen (50-100) mit der Kamera detektieren zu können. Zudem konnte eine hohe Konzentration des Fluoreszenzfarbstoffes gewählt werden.

Die Möglichkeit der Photolyse mit hoher Pulsenergie (ca. 500 nJ dies entspricht 3 mW Durchschnittsleistung bei 6 MHz) und niedriger Laserpulsrate (<6 MHz) bei kurzen Pulszügen (<5000 Pulse) wurde durch die Fluoreszenz von Fluo-4, bei der Freisetzung von Kalzium aus DMNP, mit Pulszügen von 25, 50, 250, 500, 1000 und 2000 Pulsen, in einem Agarose-Gel (2 Massenprozent) untersucht. Hierzu wurden je 10 Messungen gemittelt. Wie in Abbildung 3.27 A zu sehen ist, konnte das durch 50 Laserpulse freigesetzte Kalzium gut detektiert werden. Diese Freisetzung war in ein bis zwei Bildern nach der Photolyse zu detektieren. Dies bedeutet, dass eine nur 8,3 μs lange Photolyse hinreichend viel Kalzium freisetzte, um dieses mittels Fluo4 über 13,4 s hinweg zu detektieren. Verwendet wurde eine Konzentration von 3 mM DMNP und eine Photolyselaserleistung von ca. 5 mW an der Probe, bei 715 nm und 6 MHz Repititionsrate. Die Akquisitionsrate der Kamera betrug

145 Hz bei 2 ms Belichtungszeit und einer elektronen multiplizierten Verstärkung von 200. In Abbildung 3.27 B ist die Fluoreszenzamplitude gegen die Zahl der Pulse aufgetragen. Es gab bei Pulszügen bis 2000 Laserpulse eine lineare Abhängigkeit der Fluoreszenz von der Laserpulszahl.

Um zu demonstrieren, dass eine Freisetzung mit einer definierten Zahl an

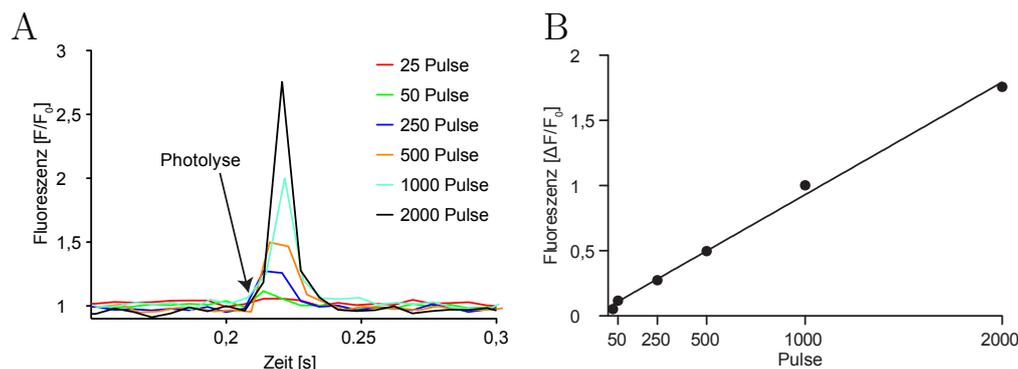


Abbildung 3.27: Einfluss der Pulszahl auf die Zwei-Photonen-Photolyse. Verglichen wird hier die Fluoreszenz von Fluo-4 in Lösung nach der Freisetzung von Kalzium aus DMNP durch Zwei-Photonen-Photolyse aus 10 gemittelten Messungen. (A) Fluoreszenz aufgetragen gegen die Zeit. (B) Amplitude aufgetragen gegen die Laserpulszahl. Die lineare Abhängigkeit der Fluoreszenzamplitude von der Pulszahl wird durch die lineare Regression verdeutlicht

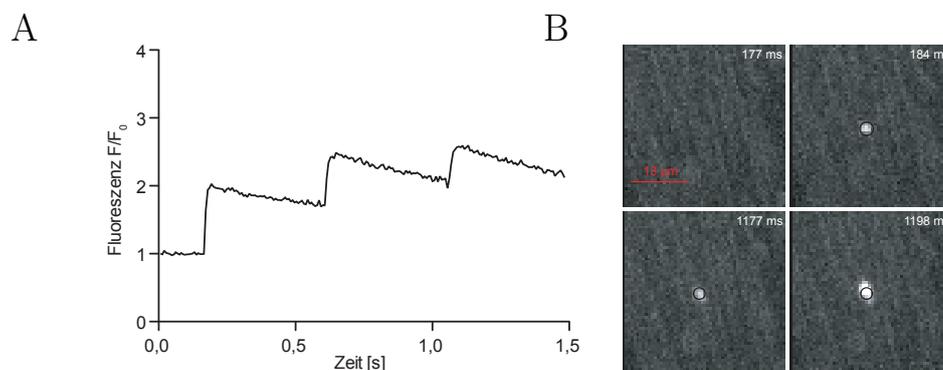


Abbildung 3.28: Fluoreszenz von Fluoreszein nach der Photolyse von CMNB-caged Fluoreszein in einer ventrikulären Herzmuskelzelle einer Ratte. (A) stellt den Fluoreszenzverlauf in den in (B) markierten Auswerteregionen dar. In (B) ist zu beobachten, dass der Farbstoff nach der Freisetzung anisotrop verteilt war und nur wenig diffundiert; Zur Photolyse wurden 5000 Pulse bei 715 nm mit 6 MHz und 6 mW mittlerer Leistung verwendet. Die Bildwiederholungsrate betrug 145 Hz bei 2 ms Belichtungszeit

Photolyselaserpulsen auch in Zellen möglich war, wurden ventrikuläre Kar-

diomyozyten von Ratten, mit der in Abschnitt 2.2.7 beschriebenen Methode, permeabilisiert. Die extrazelluläre Lösung enthielt zusätzlich 3 mM CMNB-caged Fluoreszein. In Grafik 3.28 A ist gezeigt, wie der zeitliche Verlauf der Freisetzung aussah. In Abbildung 3.28 B sind einige Bilder der Freisetzung in der Zelle zu sehen. Zu erkennen ist, dass die Fluoreszenz nur schwach abnahm und anisotrop diffundierte. Dies lässt darauf schließen, dass das freigesetzte Fluoreszein durch Zellorganellen an der freien Diffusion gehindert wurde.

3.2.8 Zwei-Photonen-Photolyse von DM-Nitrophen in permeabilisierten ventrikulären Kardiomyozyten

Permeabilisieren der ventrikulären Herzmuskelzellen

Das Permeabilisieren der Herzmuskelzellen, mit DMNP als Kalziumpuffer, stellte sich als sehr anspruchsvoll heraus. So konnte es zu unterschiedlichen Zeitpunkten des Permeabilisierungsprozesses zu einem plötzlichen Absterben sämtlicher Zellen kommen. Im Folgenden wird zusammengefasst, welche Punkte für das erfolgreiche Permeabilisieren der Herzmuskelzellen, zu beachten waren. Der Prozess des Permeabilisierens war in drei Schritte unterteilt.

- **Equilibrieren:** Die erste Lösung depolarisierte die Zellen durch die hohe Kaliumkonzentration. Dies sorgte dafür, dass die L-Typ-Kalziumkanäle permanent geöffnet wurden. Durch die in der Zelle gestiegene Kalziumkonzentration wurde in der Folge die Kalziumbeladung des SR reduziert. Dies erfolgte durch einen Kalziumausstrom aus dem SR über die RyR. Die verwendete Lösung konnte über mehrere Tage im Kühlschrank gelagert werden, ohne dass es zu einer signifikanten Verschlechterung der Überlebensrate der Zellen beim Equilibrieren kam. Aus Rattenherzen isolierte ventrikuläre Myozyten konnten bis zum dritten Tag der *in vitro* Kultivierung verwendet werden. Am vierten Tag nach der Isolation lag der Anteil der Zellen, die diesen ersten Schritt nicht überlebten, zwischen 60% und 70%. Dies führte dazu, dass nur max. 10 Zellen für die weiteren Schritte zur Verfügung standen. Diese Zellzahl war zu gering, da auch die weiteren Schritte das Risiko bargen, dass die Zellen abstarben.
- **Permeabilisieren:** Bei diesem Schritt wurde der intrazellulären Lösung Saponin beigegeben und die Zellen ca. 40 s damit inkubiert. Danach wurde der Überstand abgenommen und die Zellen mit reiner intrazellulärer Lösung superfundiert. Die verwendete *intra cellular* (IC)-Lösung sollte nach der Herstellung aliquotiert und tiefgefroren werden, da sie neben ATP auch Phosphokreatin di-Natrium Salz enthielt, welches

sich bei Raumtemperatur zersetzt. Somit sollte immer nur soviel IC aufgetaut werden wie verbraucht wurde. Ein maximal 2maliges Auftauen kann empfohlen werden. Bei häufigerem Wiederverwenden kann es zum Absterben der Zellen durch die IC-Lösung kommen. Durch welche Prozesse genau sich die IC-Lösungen veränderten, wurde nicht untersucht.

Sollten die Zellen dennoch in diesem Schritt abgestorben sein, so konnte dies manchmal am Permeabilisieren mit Hilfe des Saponins liegen. Da die Zellisolation, wie schon beschrieben, auch einen Einfluss auf die Integrität der Zellmembran hatte. Es konnte vorkommen, dass auch 40 s eine zu lange Zeit zum Permeabilisieren war und die Zelle so apoptotisch wurde. Die Saponin Stammlösung konnte 4-5 Wochen verwendet und in dieser Zeit 15-20mal aufgetaut werden, ohne dass dies einen merklichen Einfluss auf das Permeabilisieren der Zellen oder deren Überlebensrate hatte. Nach dieser Zeit wurde die aliquotierte Stammlösung gewechselt und eine neuere Stammlösung verwendet.

- Zellen in DMNP-Lösung mit fixierter Kalziumkonzentration geben: Vor diesem Schritt musste die Konzentration der Ca^{2+} Ionen in der Lösung eingestellt werden. Hierzu empfahl es sich, die genaue Konzentration mittels eines Fura-2 Protokolls zu messen und gegebenenfalls weiteres Kalzium zuzugeben, bis die Lösung eine Konzentration von ca. 100 nM freien Kalziums aufwies. DM-Nitrophen konnte in einer Stammlösung über mehrere Wochen bei -20°C gelagert werden. Messungen der Konzentration des DMNP mittels Absorptionsspektroskopie zu Beginn und nach 1-2 Monaten mit mehrmaligem Auftauen und Einfrieren zeigten jedoch, dass die Konzentration auf 2/3 des ersten Wertes abgesunken war. Zudem konnte eine DMNP/IC-Mischung nur so lange verwendet werden, wie es oben für die reine IC beschrieben wurde. Zum Einstellen der Kalziumkonzentration durften immer nur kleine Mengen an Kalzium zugegeben werden. Dies war bedingt durch den niedrigen K_d von DMNP (4,5 nM) und den hohen verwendeten Endkonzentration von DMNP (3 mM). Dies bedingte, dass kleine Änderungen der Konzentration des gesamten Kalziums (z.B. zwischen 2.9 mM und 3 mM) relativ große Änderungen der Konzentration des freien Kalziums (von ca. 300 nM auf 100 μM) bewirkten (siehe hierzu auch Abbildung 3.29 A).

Kalibrierung der Kalziumkonzentration mittels Fura-2

Bei Fura-2 Kalibrierungsmessungen stellte sich heraus, dass die gemessenen Konzentrationen an freiem Kalzium nicht den berechneten Konzentratio-

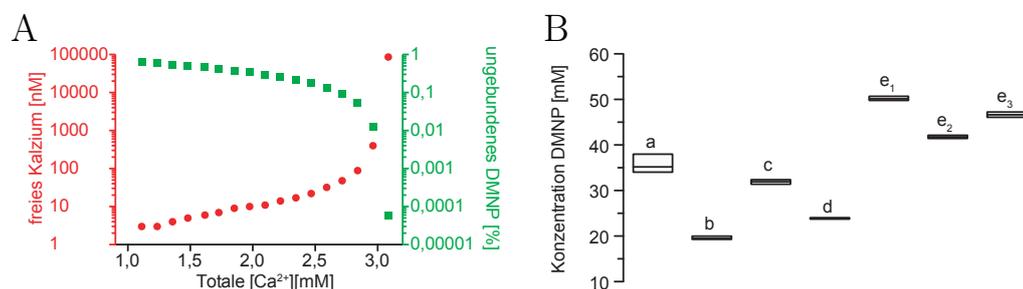


Abbildung 3.29: (A) Berechnete DMNP-Sättigung. Gezeigt ist, wie sich der Anteil an ungebundenem DMNP bei einer Zugabe von Kalzium verhielt und wie viel freies Kalzium vorhanden war. Die Berechnung wurde angefertigt auf der Grundlage dass die Lösung 3 mM DMNP enthält. (B) gemessene DMNP Konzentrationen in Stammlösungen. Die Werte zeigen die mittels Absorptionsspektroskopie gemessenen DMNP-Konzentrationen der Stammlösungen. Angesetzt wurden die Lösungen mit einer Zielkonzentration von 50 mM, die HPLC-Messungen der Hersteller gaben eine Reinheit von mindestens 95% an, Lösungen a und b entstammen der gleichen Stammlösung einer Lieferung von Lifetchnologies wobei a bei -20°C gelagert und b mehrfach aufgetaut und wieder eingefroren wurde. Lösungen c und d entstammen zwei Lieferung von Merck Chemicals, e₁, e₂, e₃ sind drei Mischungen aus einer zeitnahen Lieferung DMNP des gleichen Herstellers

nen laut des Mischungsverhältnisses entsprachen. Die großen Abweichungen ließen sich nicht durch Verunreinigungen der anderen Chemikalien mit Kalzium erklären. In Tabelle 3.1 sind die Mischungsverhältnisse, die berechneten Kalziumkonzentrationen und die gemessenen Kalziumkonzentrationen festgehalten. Da die gemessenen Kalziumkonzentrationen im Grenzbereich der mit Fura-2 messbaren Werte lagen, entsprachen diese eher groben Angaben der Größenordnung. Die Hersteller gaben einen mittels HPLC gemessenen Reinheitsgrad von über 99% für die gelieferten DMNP Chargen an. Auch

Tabelle 3.1: Kalziumkonzentrationen in IC Lösungen

[DMNP]/[Ca]	berechnete [Ca ²⁺] [nm]	gemessene [Ca ²⁺] [nm]
2,401/2,305	120	ca. 5000
2,401/2,305	120	ca. 3000
2,401/1,730	12	ca. 2

Faas et al. [42] stellten Abweichungen der Konzentration von DMNP in den Stammlösungen fest. Dies führten sie auf die gelieferten Mengen DMNP zurück. Daher wurde die Konzentration des Käfigmoleküls in wässriger Lösung (pH-Wert 7,1) mittels Absorptionsspektroskopie (350 nm Wellenlänge) bestimmt. Nach [71] hat DMNP unter diesen Bedingungen einen Absorptionskoeffizienten von ($4330 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$). Die gemessenen Konzentrationswerte von Stammlösungen verschiedener Lieferungen und unterschiedlicher Lager-

zeiten werden in Abbildung 3.29 B gezeigt. Die Konzentration des DMNP nahm dabei mit zunehmender Lagerzeit und Zahl der Auftauvorgänge ab. Es wurde zur Kontrolle der in Abbildung 3.29 B gemessenen Konzentrationen eine Messung mit Fura-2 durchgeführt. Hierfür wurde eine Lösung angesetzt, deren freie Kalziumkonzentration der Berechnung nach (bei der die gemessenen DMNP-Konzentrationen verwendet wurden) 59 nM betrug. Dahingegen ergab die Messung mit Fura-2 eine freie Kalziumkonzentration von 81 nM.

3.3 Fluoreszenzlebensdauer-Bildgebung

3.3.1 Validierung des Systems

Zum Validieren des Systems und um zukünftige Messungen vorzubereiten, wurden verschiedene Messungen der IRF vorgenommen. Eine Messmethode verwendet den Laser direkt. Dazu reflektierte ein Spiegel den Laser, welcher dann von den APDs gemessen wurde. Bei dieser Methode ist mit Sorgfalt darauf zu achten die Intensität des Laserstrahls zu Beginn ausreichend (um 6-8 Größenordnungen) abzuschwächen, da eine zu hohe Leistung des Lasers die APDs schädigen kann. Die so gemessene IRF ist in Abbildung 3.30 A dargestellt. Ein Nachteil dieser Methode war jedoch, dass jede Reflektion des Laserstrahls im optischen System sichtbar wurde. Da diese Reflektionen jedoch erst nach 17 ns an den APDs ankamen, sind diese in Abbildung 3.30 nicht zu sehen.

Des Weiteren konnte die Fluoreszenz eines Farbstoffes (in diesem Fall Rose Bengal) mit extrem kurzer Lebensdauer ($\ll 100$ ps) zum Bestimmen der IRF verwendet werden. Durch drei 532 nm Langpass-Filter vor den APDs wurde verhindert, dass Reflektionen des Lasers weitere Maxima lieferten. Eine Abbildung der so gemessenen IRF ist in 3.30 B zu sehen.

Die positionsabhängige Messung der IRF ergab, dass die Anregung am linken Bildrand ca. 100 ps vor dem rechten Bildrand erfolgte. Eine Abbildung der Fluoreszenz zu verschiedenen Zeitpunkten ist in Abbildung 3.30 C zu finden. Zusätzlich zeigt 3.30 D zum Vergleich den Verlauf der Fluoreszenzlebensdauerkurven vom linken und rechten Bildrand.

Um die gemessenen Fluoreszenzlebensdauern zu validieren, bot es sich an, die Fluoreszenzlebensdauer eines Stoffes zu messen, dessen Fluoreszenz unter verschiedenen Bedingungen gut erforscht oder sehr stabil war. Hierfür war Fluorescein ein idealer Kandidat. Da sich seine Fluoreszenzlebensdauer in Abhängigkeit von dem pH-Wert verändert [130], konnten die Fluoreszenzlebensdauern mittels des separat gemessenen pH-Wertes abgeglichen werden. Sjöback et al. [130] konnten zeigen, dass Fluorescein je nach Deprotonierung

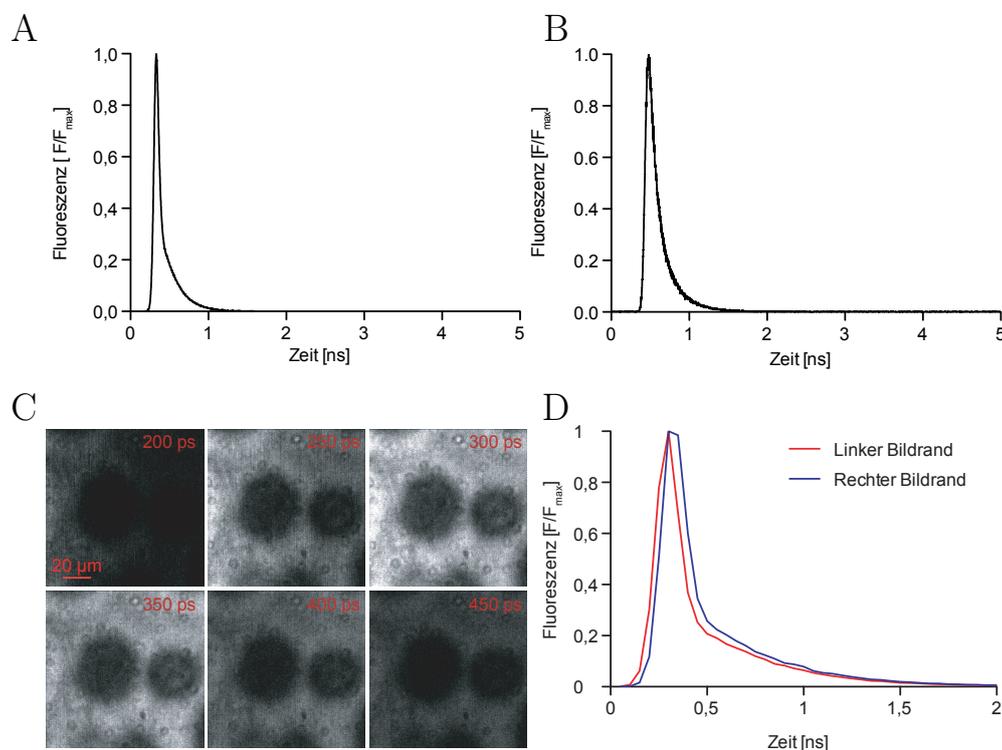


Abbildung 3.30: Messungen der Instrumentenfunktionen. (A) IRF die mittels der Reflektion des Lasers gemessen wurde. (B) IRF durch messen der Fluoreszenz von Rose Bengal. (C) Zu sehen ist die ortsabhängige Fluoreszenz von Rose Bengal zu verschiedenen Zeiten nach der Anregung mittels eines Laserpulses. (D) Vergleich der Verläufe der Fluoreszenzlebensdauerkurven von Rose Bengal am linken und rechten Bildrand (erstellt aus den Aufnahmen von (C)). Zu erkennen ist, dass die am linken Bildrand gemessene IRF sich von der am rechten Bildrand unterschied

eine andere Fluoreszenzlebensdauer besitzt. Das Anion hat eine Lebensdauer von 3 ns während das Dianion eine Fluoreszenzlebensdauer von 4,1 ns aufweist. Das Anion von Fluoreszein hat einen pK von 4,31, das Dianion ein pK von 6.43.

Abbildung 3.31 A zeigt die Fluoreszenzlebensdauerkurve einer 100 mM wässrigen Fluoreszeinlösung bei einem pH-Wert von 7,3. Abbildung 3.31 B zeigt weitere, bei unterschiedlichen pH-Werten ermittelte, Fluoreszenzlebensdauern. Die verwendete Regression mittels einer Hillschen-Kurve ergab, dass der obere Wert der Hillschen-Kurve, welcher der Fluoreszenzlebensdauer des Dianion entsprechen sollte, $3,981 \pm 0,0121$ ns war. Der untere Wert der Hillschen-Kurve, welcher der Lebensdauer des Anions entsprechen sollte, beträgt laut Regression $3,325 \pm 1,533$. Eine weitere Möglichkeit, die gemessene Lebensdauer zu validieren war mit Hilfe einer Cumarin 6 Lösung ($50 \mu\text{M}$) in reinem Ethanol. Cumarin 6 hat unter dieser Bedingung eine Fluoreszenz-

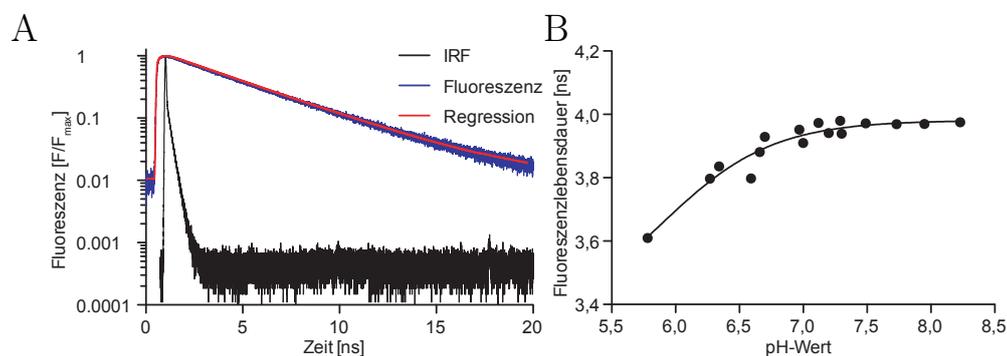


Abbildung 3.31: (A) Fluoreszenzlebensdauerkurve von Fluoreszein Dextran MW10000 in einer 100 mM wässrigen Lösung bei einem pH von 7.3 mit exponentieller Regression und verwendeter IRF. (B) pH-Wert abhängige Fluoreszenzlebensdauer von Fluoreszein Dextran MW10000 bei einer Konzentration von 100 mM mit Regression einer Dosis-Wirkungs-Kurve

lebensdauer von ca. 2,5 ns [135]. Die Lebensdauerkurve, die exponentielle Regression und die verwendete IRF sind in Abbildung 3.32 zu finden, wobei die Regression dreier Messungen im Mittel eine Zerfallskonstante von 2,553 ns ergab.

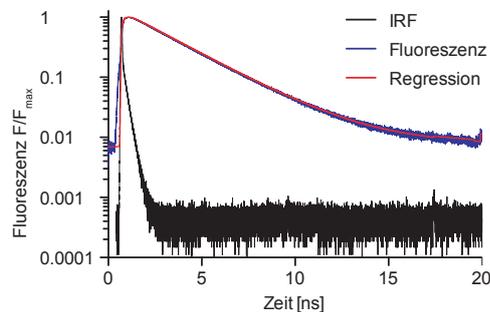


Abbildung 3.32: Fluoreszenzlebensdauerkurve von Cumarin 6 ($50 \mu\text{M}$ in Ethanol) gemessen bei einer Anregung mit 443 nm, exponentielle Regression die mittels der IRF in der Software Symphotime erstellt wurde

Fluoreszenzlebensdauer Kalibration mit Fura RedTM

Kalzium ist ein ubiquitärer Botenstoff in allen Zellen [12] so auch in Erythrozyten [18]. Die Messung von absoluten Kalziumkonzentrationen ist somit wichtig für das Verständnis physiologischer und pathologischer Abläufe in roten Blutkörperchen. Aufgrund des in den Erythrozyten in hohen Konzentrationen vorhandenen Hämoglobins (ca. 35% (m/m) eines Erythrozyten), welches ein sehr breites Absorptionsspektrum (siehe Abbildung 3.33) besitzt,

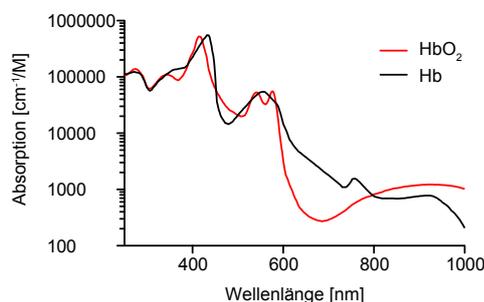


Abbildung 3.33: Absorptionsspektrum von Hämoglobin im sauerstoffgesättigten und sauerstofffreien Zustand (von der Webseite des Oregon Medical Laser Center, <http://omlc.ogi.edu/spectra/hemoglobin/>, zuletzt eingesehen am 17.01.2014)

war die Messung der absoluten Kalziumkonzentration mittels ratiometrischer Kalziumsensoren (wie zum Beispiel Fura-2 oder Indo 1) schwierig. Dies war zum einen dadurch bedingt, dass die gebräuchlichsten ratiometrischen Kalziumsensoren ihre primäre Absorption im UV-Bereich haben, in dem auch Hämoglobin die stärkste Absorption zeigt. Darüber hinaus entwickelt dieses induzierte Autofluoreszenz durch UV-Absorption. Zum anderen ist die Absorption von Hämoglobin im grünen Spektrum noch sehr stark, in dem viele Kalziumsensoren ihre Emission haben. Eine Möglichkeit eine Fluoreszenzintensitäts-basierte Messung der Kalziumkonzentration vorzunehmen würde der rote ratiometrische Kalziumsensor Fura RedTM bieten. Die Absorptionsswellenlängen für Fura RedTM sind jedoch 420 nm und 480 nm, wodurch das Anregungslicht stark vom Hämoglobin absorbiert werden würde. Zudem hat Fura RedTM eine sehr niedrige Quanteneffizienz, so dass nur ein geringer Teil des absorbierten Lichts zu einer Emission von Fluoreszenz führt. Beides erschwert die Messung der Kalziumkonzentration.

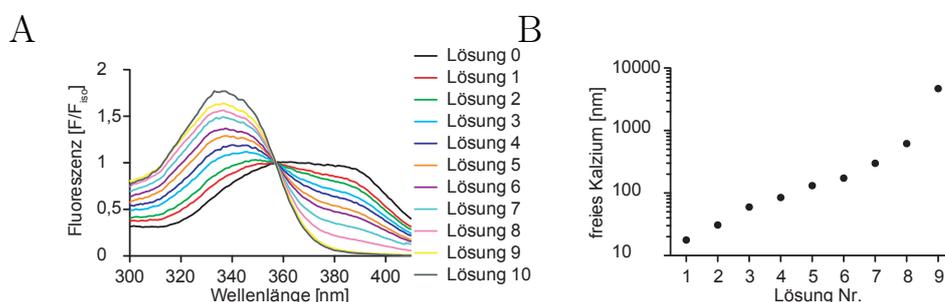


Abbildung 3.34: (A) Spektren der Fura-2 Fluoreszenz der Kalibrierungslösungen. Die Intensitäten wurden auf den isobestischen Punkt normiert. (B) Kalziumkonzentration der extrazellulären Kalibrierungslösungen ermittelt aus den Intensitäten der Messungen aus (A)

on mittels der Intensität der Emission. Nicht an Kalzium gebundenes Fura RedTM besitzt ein Absorptionsspektrum mit dem Maximum bei 480 nm. Dieses überschneidet sich zum Teil mit dem Anregungsspektrum des Kalzium-gebundenen Fura RedTM mit einem Maximum bei 420 nm (siehe hierzu auch die Spektren auf Seite 44). Für diesen Wellenlängenbereich stand ein 480/10 nm Bandpass zur Verfügung, um mittels des Superkontinuum-Lasers sowohl die Kalzium-gebundenen als auch die nicht an Kalzium gebundenen Fura RedTM Moleküle anzuregen. Dies war unerlässlich, um die Fluoreszenzlebensdauer der ungebundenen und Kalzium-gebundenen Fura RedTM Moleküle parallel zu messen, da beide gleichzeitig angeregt werden mussten. Fura RedTM emittiert im Wellenlängenbereich zwischen 600 nm und 700 nm. Der Emissionsfilter vor der APD, ein 580 nm LP, ermöglichte die gleichzeitige Detektion beider Emissionen.

Zur Kalibrierung der Fluoreszenzlebensdauer in Abhängigkeit von der Kal-

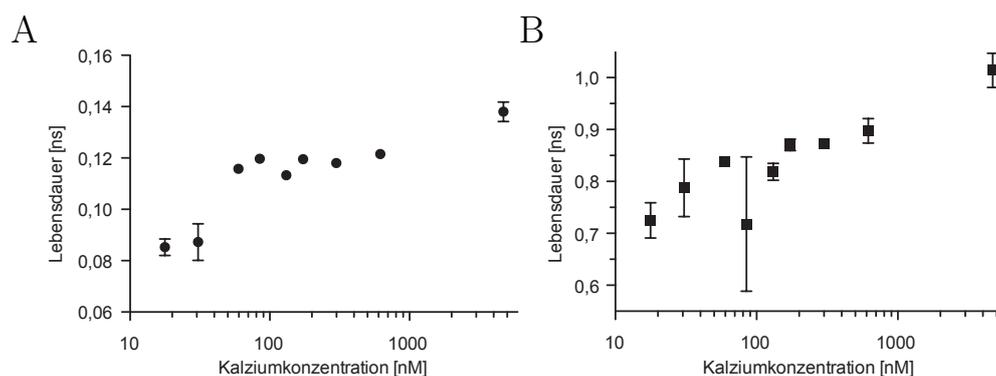


Abbildung 3.35: Fluoreszenzlebensdauern von Fura RedTM in Erythrozyten aus zweifach exponentieller Regression (zu sehen in Abbildung 3.36 A-K). (A) kürzere Lebensdauern von Fura RedTM in mit Ionomycin permeabilisierten Erythrozyten, aufgetragen gegen die Kalziumkonzentration der extrazellulären Lösung. (B) längere Lebensdauern von Fura RedTM in mit Ionomycin permeabilisierten Erythrozyten, aufgetragen gegen die Kalziumkonzentration der extrazellulären Lösung

ziumkonzentration wurden, wie in Abschnitt 2.3.6 beschrieben, Lösungen mit definierten Kalziumkonzentrationen benötigt. Die Kalziumkonzentrationen wurden mittels Fura-2 und einem Fluoreszenzspektrometer gemessen. Die Spektren dieser Fura-2 Messungen sind in Abbildung 3.34 A zu sehen. Die Analyse der Spektren ergab die Kalziumkonzentrationen der Lösungen zur Kalibration. Diese sind in Abbildung 3.34 A dargestellt. Zu erkennen ist, dass die Kalziumkonzentration in den Lösungen 1 bis 8 einfach exponentiell anstieg. Lösung 9 hatte eine höhere Kalziumkonzentration, welche im Grenzbereich dessen liegt, was mittels Fura-2 gemessen werden kann. Somit konnte diese Lösung nur verwendet werden, um eine Tendenz der Fluores-

zenzlebensdauer unter Einfluss von $1\mu\text{M}$ bis $10\mu\text{M}$ Kalzium zu ermitteln. Die Fluoreszenzlebensdauerkurven der mit Fura RedTM beladenen Erythrozyten in den Kalibrierungslösungen sind in Abbildung 3.36 zu finden. Die

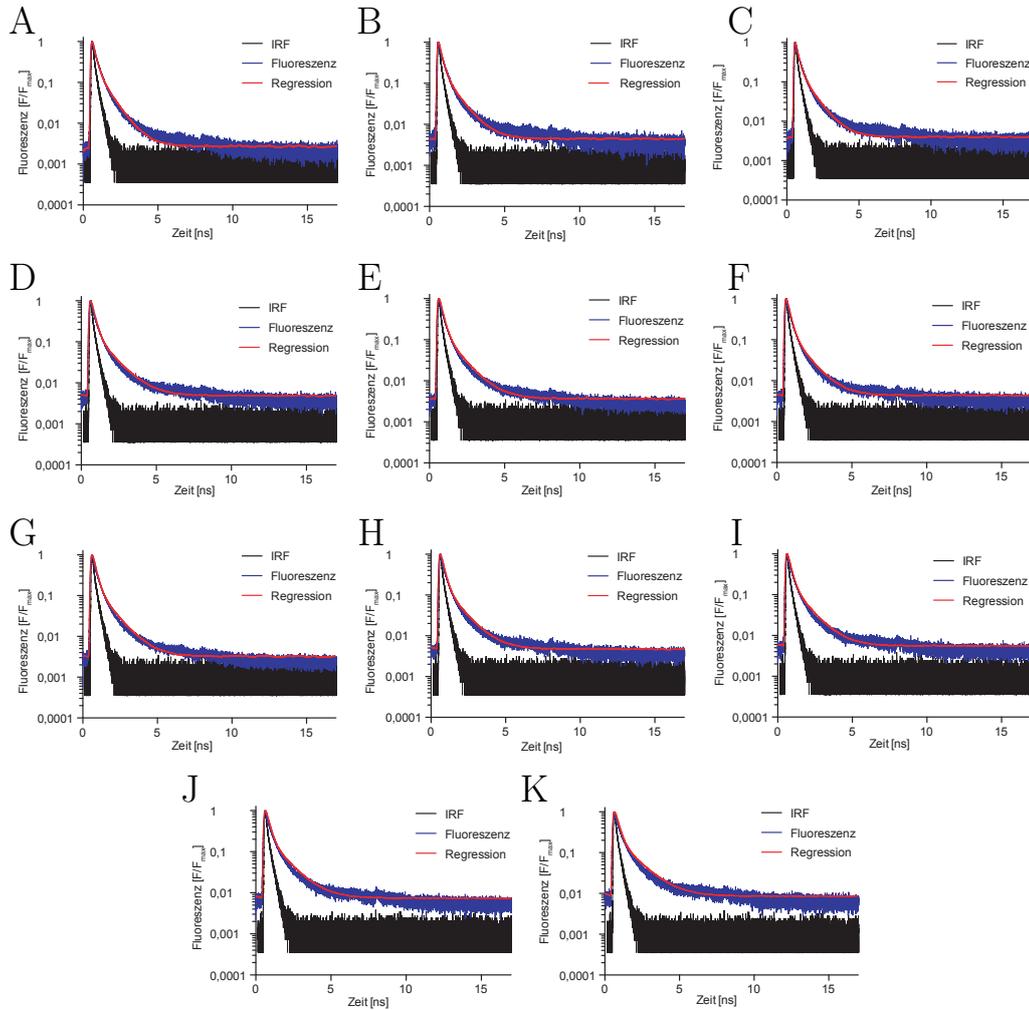


Abbildung 3.36: Fluoreszenzlebensdauerkurven von Fura RedTM in mit Ionomycin permeabilisierten Erythrozyten bei einer Konzentration an freiem Kalzium von (A) 0 nM; (B) 17,7 nM; (C) 30,7 nM; (D) 59,6 nM; (E) 84,8 nM; (F) 131,5 nM; (G) 173,2 nM; (H) 299,0 nM; (I) 617,5 nM; (J) 4,700 μM und (K) 27,6 μM in der extrazellulären Lösung

Ergebnisse der Regressionen mittels eines zweifachen exponentiellen Zerfalls sind in den Abbildung 3.35 A und B zusammengefasst. Für die Lebensdauer war eine Hill-Kurve in Abhängigkeit vom K_d von Fura RedTM in den Erythrozyten abhing. Jedoch ergaben sich bei den Regressionen mit dem K_d und den vorliegen Daten immer χ^2 mit Werten weit über 10. Solch hohe χ^2

kommen vor, wenn die Modellierungsfunktion für die Daten ungeeignet ist. Es wurde des Weiteren eine lineare Funktion zur Regression verwendet, diese ergab jedoch ebenfalls kein akzeptables χ^2 . Dies könnte im Falle der längeren Fluoreszenzlebensdauer jedoch durch die große Varianz der Messung mit Lösung 4 verursacht worden sein.

3.3.2 Reevaluierung der Kalziumindikatoren

Nach der Messung der Fluoreszenzlebensdauer von Fura RedTM wurden weitere Kalziumindikatoren auf ihre Fluoreszenzlebensdaueränderungen durch das Binden an Kalzium untersucht. Dazu wurde für jeden Kalziumsensor je eine Messung der Fluoreszenzlebensdauer bei einer Kalziumkonzentration von 26 μM Kalzium in der extrazellulären Lösung und mit 0 M Kalzium (sowie 10 mM EGTA) in der extrazellulären Lösung durchgeführt. Alle Fluoreszenzlebensdauern wurden in den folgenden Abschnitten unter Verwendung zweier Exponentialfunktionen und mit der zuvor mit Hilfe von Rose Bengal aufgezeichneten IRF angenähert. Zwischen den ersten Fura RedTM Messungen und diesen Experimenten wurde das FLIM-System neu justiert, sowie die Kabel zwischen den APDs und dem Einzelphotonenzähler erneuert. Aus diesem Grund wurde auch Fura RedTM erneut in die Messungen mit einbezogen.

Fluo-8

Fluo-8 war unter den verwendeten Kalziumsensoren derjenige mit dem größten dynamischen Bereich. Dadurch kam es bei den Messungen mit 26 μM Kalziumkonzentration in der extrazellulären Lösung zu Photonenzählraten im Bereich von 10^6 pro Sekunde an der APD. Somit war es notwendig, die Leistung des Anregungslasers zu reduzieren, da es, wie in Abschnitt 1.3 beschrieben, durch hohe Zählraten zu einer Verfälschung der gemessenen Fluoreszenzlebensdauer kam. Fluo-8 zeigte dabei die höchste Intensität aller Indikatoren bei hoher Kalziumkonzentration. Die Änderung der längeren der zwei Lebensdauern aus der Regression war von allen Farbstoffen am stärksten ausgeprägt, wie in Abbildung 3.37 zu sehen ist. Sie sank um 55%, während die kürzere Fluoreszenzlebensdauer eine nur geringe Änderung von 4% zeigte. Da der Quotient der Amplituden aus langer und kurzer Fluoreszenzlebensdauer einen weiteren Ansatz einer ratiometrischen Messung bot, wurde er in Abbildung 3.37 E zusätzlich aufgezeigt. In Abbildung 3.37 F sind einige mit Fluo-8 beladene Zellen bei einer Kalziumkonzentration von 0 M sowie 10 mM EGTA und in 3.37 G bei einer Kalziumkonzentration von 27 μM dargestellt.

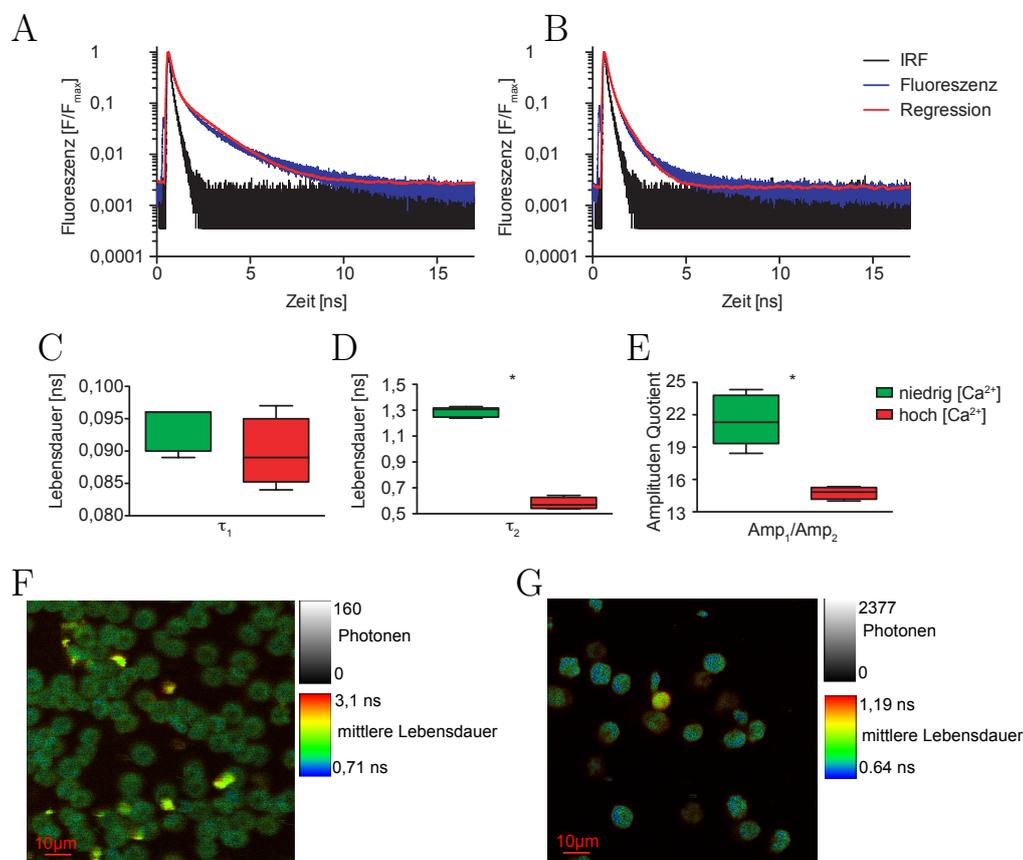


Abbildung 3.37: Fluoreszenzlebensdauermessungen von Fluo-8 in Erythrozyten. (A) Fluoreszenzlebensdauerkurve mit 10 mM EGTA und 0 M Kalzium und (B) mit 10 mM EGTA und 10 mM Kalzium bei einem pH-Wert von 7,35 mit Fluoreszenzsignal, Regression und bei der Regression verwendeter IRF. (C) kurze Fluoreszenzlebensdauer ohne eine signifikante Änderung. (D) lange Fluoreszenzlebensdauer mit signifikanter Änderung. (E) Quotient der Amplituden der Lebensdauerkurven aus der doppelt exponentiellen Regression mit signifikanter Änderung. Die Statistik wurde mit je 4 Bildern zu je ca. 20 Zellen erstellt. (F) Bild der Fluoreszenzlebensdauer von Fluo-8 in Erythrozyten mit 10 mM EGTA und 0 M Kalzium und (G) mit 10 mM Kalzium und 10 mM EGTA bei einem pH von 7,35

Calcium GreenTM

Die Fluoreszenzlebensdauerkurven von Calcium GreenTM bei niedriger und hoher Kalziumkonzentration sind in den Abbildungen 3.38 A und B zu finden. Calcium GreenTM zeigte nach Fluo-8 die zweithöchsten Zählraten der APD im Bereich von $7 \cdot 10^5$ Photonen pro Sekunde. Es war im Gegensatz zu Fluo-8 nicht notwendig, die Anregungsleistung bei 27 μ M Kalziumkonzentration zu senken. Nach Asante Calcium Red zeigte Calcium GreenTM die zweitgrößte Änderung des Quotienten aus den Amplituden der Fluoreszenz-

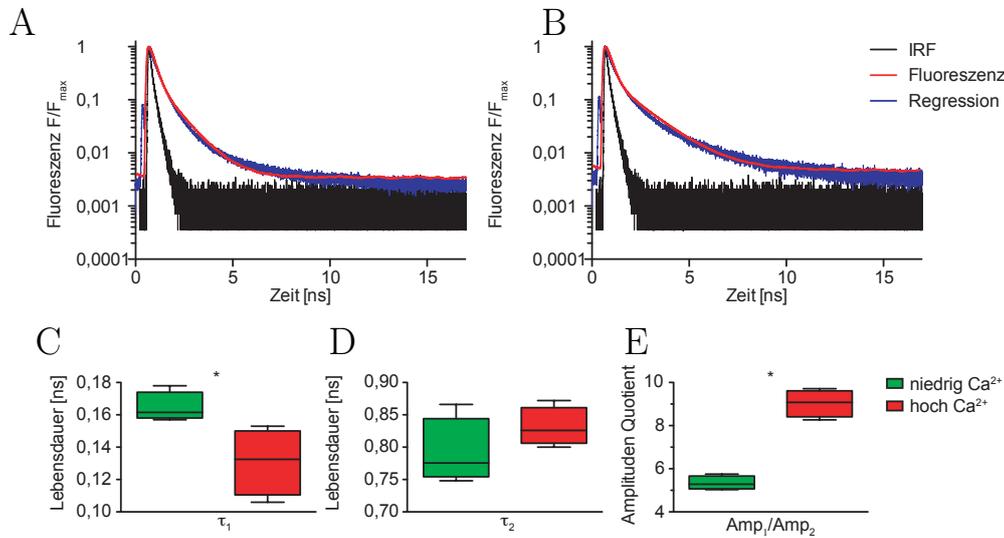


Abbildung 3.38: Fluoreszenzlebensdauermessungen von Calcium GreenTM in Erythrozyten. (A) Fluoreszenzlebensdauerkurve mit 10 mM EGTA und 0 M Kalzium und (B) mit 10 mM EGTA und 10 mM Kalzium bei einem pH-Wert von 7.35 mit Fluoreszenzsignal, Regression und bei der Regression verwendeter IRF. (C) kurze Fluoreszenzlebensdauer mit signifikanter Änderung. (D) lange Fluoreszenzlebensdauer ohne signifikante Änderung. (E) Quotient der Amplituden der Lebensdauerkurven aus der doppelt exponentiellen Regression mit signifikanter Änderung. Die Statistik wurde mit je 4 Bildern zu je ca. 20 Zellen erstellt

lebensdauerkurven, welche mittels der doppelt exponentiellen Regression bestimmt wurden. Die signifikante Änderung des Quotienten der Amplituden um 69% ist in Abbildung 3.38 E dargestellt. Die signifikante Änderung der kurzen Fluoreszenzlebensdauer betrug 20% und ist in Abbildung 3.38 C zu finden. Die lange Fluoreszenzlebensdauer in Abbildung 3.38 D zeigte keine signifikante Änderung in Abhängigkeit von der Kalziumkonzentration.

Oregon Green488 BAPTA 2

Oregon Green®488 BAPTA 2 lieferte im Experiment eine niedrige Fluoreszenz bei niedriger Kalziumkonzentration. Aus diesem Grund zeigte die Lebensdauerkurve stärkere Fluktuationen der Zählraten zwischen 5 ns und 15 ns als dies bei hoher Kalziumkonzentration der Fall war. Bei hoher Kalziumkonzentration zeigte Oregon Green®BAPTA 2 jedoch Zählraten im Bereich von $5 \cdot 10^5$ Photonen pro Sekunde. Es zeigte zudem bei den in Grafik 3.39 C, D und E dargestellten Werten kleinere Änderungen als Fluo-8 und Calcium GreenTM. Der Quotient aus den Amplituden der beiden Fluoreszenzlebensdauerkurven wurde von der niedrigen zur hohen Kalziumkonzentration um 31% kleiner (siehe hierzu Abbildung 3.39 E). Während sich

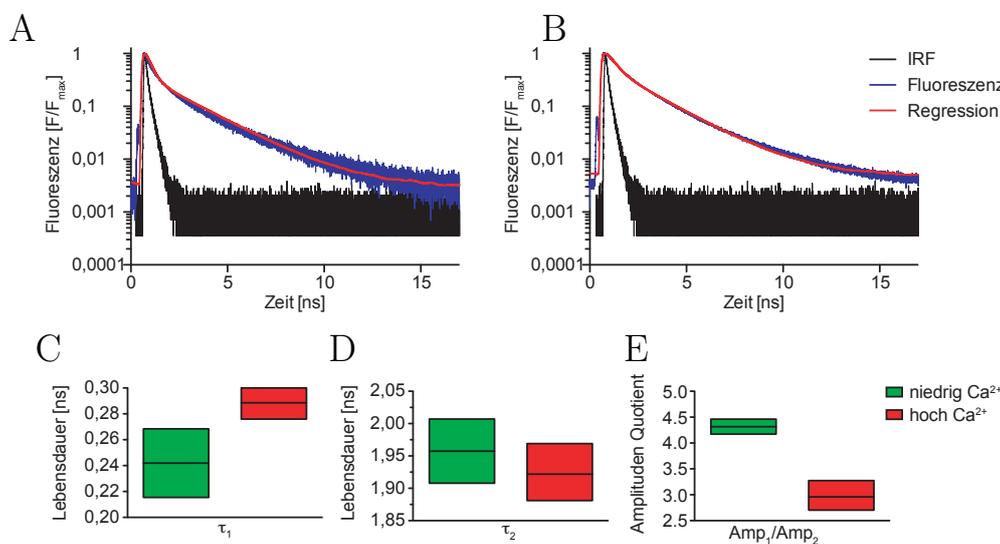


Abbildung 3.39: Fluoreszenzlebensdauermessungen von Oregon Green®BAPTA 2 in Erythrozyten. (A) Fluoreszenzlebensdauerkurve mit 10 mM EGTA und 0 M Kalzium und (B) mit 10 mM EGTA und 10 mM Kalzium bei einem pH-Wert von 7.35 mit Fluoreszenzsignal, Regression und bei der Regression verwendeter IRF. (C) kurze Fluoreszenzlebensdauer. (D) lange Fluoreszenzlebensdauer. (E) Quotient der Amplituden der Lebensdauerkurven aus der doppelt exponentiellen Regression mit signifikanter Änderung, die Statistik wurde mit 2 Bildern zu je ca. 20 Zellen bei niedriger Kalziumkonzentration und mit 4 Bilder zu je ca. 20 Zellen bei hoher Kalziumkonzentration erstellt

die kürzere Fluoreszenzlebensdauer (wie in Abbildung 3.39 A zu sehen ist) um 18% änderte, blieb die lange Lebensdauer (Abbildung 3.39 B) nahezu konstant.

Calcium OrangeTM

Bei den Messungen mit niedriger Kalziumkonzentration ergab sich bei Calcium OrangeTM eine Besonderheit. Bei nominell 0 M Kalzium waren, wie in Abbildung 3.40 F zu sehen ist, zwei Populationen an Zellen erkennbar, die sich in der dargestellten mittleren Fluoreszenzlebensdauer unterschieden. Einige der Zellen mit der höheren mittleren Fluoreszenzlebensdauer sind rot, einige Zellen mit niedrigerer mittleren Fluoreszenzlebensdauer blau umrandet. Nach Kalziumerhöhung blieb nur eine Population übrig. Die kleinere Population hatte eine kurze Fluoreszenzlebensdauer von 360 ps und eine lange Fluoreszenzlebensdauer von 2,52 ns. Die größere Population hatte eine kurze Fluoreszenzlebensdauer von 221 ps und eine lange Fluoreszenzlebensdauer von 2.13 ns. Verglichen wurden in der Statistik die Fluoreszenzlebensdauern der größeren Population bei niedriger Kalziumkonzentration mit den Fluoreszenzlebensdauern der größeren Population bei hoher Kalziumkonzentration.

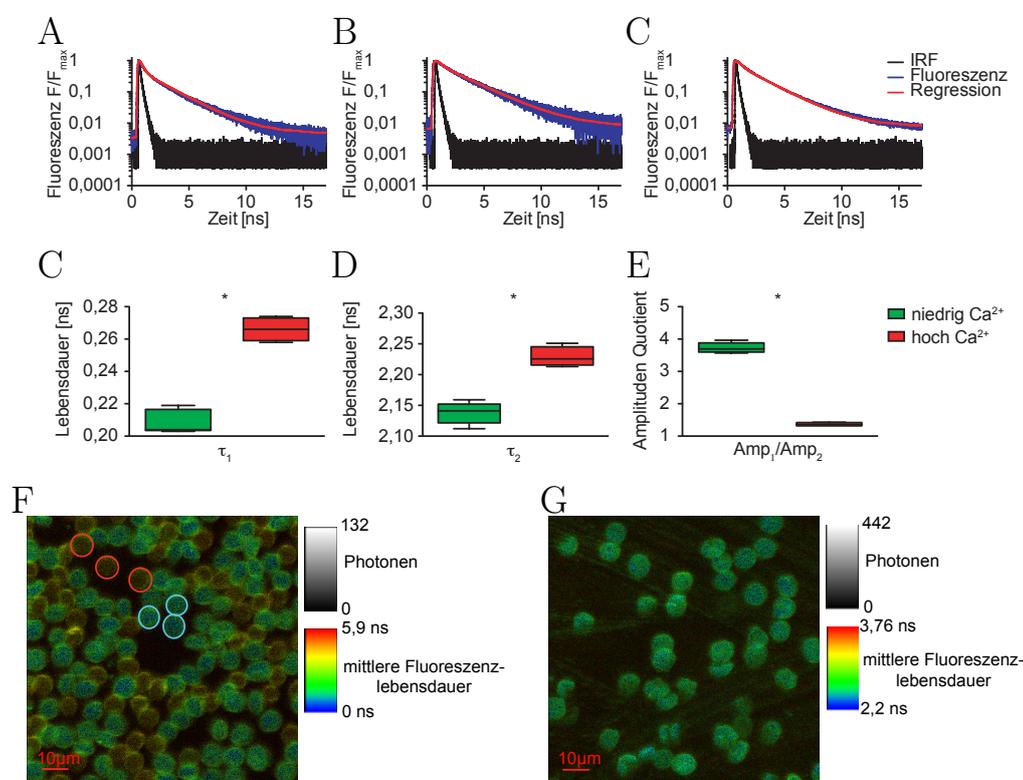


Abbildung 3.40: Fluoreszenzlebensdauermessungen von Calcium OrangeTM f in Erythrozyten. Da die Erythrozyten zwei Populationen aufwiesen, die sich durch die Fluoreszenzlebensdauer des Calcium OrangesTM in ihnen unterschieden, wurden diese beiden Populationen im Folgenden getrennt behandelt. (A) Lebensdauerkurve der größeren Population an Zellen mit 2,2 ns langer Fluoreszenzlebensdauer, (B) Lebensdauerkurve der kleineren Population an Zellen mit 2,52 ns langer Fluoreszenzlebensdauer mit jeweils 10 mM EGTA und 0 M Kalzium in der extrazellulären Lösung und (C) Lebensdauerkurve mit 10 mM EGTA und 10 mM Kalzium in der extrazellulären Lösung bei einem pH-Wert von 7.35, (D) kurze Fluoreszenzlebensdauern mit signifikanter Änderung, (E) lange Fluoreszenzlebensdauer mit signifikanter Änderung, (F) Quotient der Amplituden der Lebensdauerkurven aus der doppelt exponentiellen Regression mit signifikanter Änderung, (F) Bild der Fluoreszenzlebensdauer von Calcium OrangeTM f in Erythrozyten mit 10 mM EGTA ohne Kalzium und (G) mit 10 mM Kalzium und 10 mM EGTA bei einem pH von 7.35

reszenzlebensdauern bei hoher Konzentration. Dabei ergab sich, wie in Abbildung 3.40 dargestellt, eine Änderung des Amplitudenquotienten in Höhe von 265%, welches die größte Änderung aller Kalziumindikatoren war. Die kurze Fluoreszenzlebensdauer erhöhte sich um 27%, die lange jedoch nur um 4,2%.

Fura RedTM

Fura RedTM war einer von zwei in diesem Projekt verwendeten ratiometrischen Kalzium-Sensoren, deren Fluoreszenzlebensdauer untersucht wurde. Aufgrund seiner niedrigen Quanteneffizienz wurde er in der doppelten Konzentration ($10 \mu\text{M}$) zum Beladen der Zellen verwendet. Die Änderung der kurzen und langen Fluoreszenzlebensdauer in Abbildung 3.41 betrug 5%, beziehungsweise 12%. Der Quotient der Amplituden nahm um 17% ab.

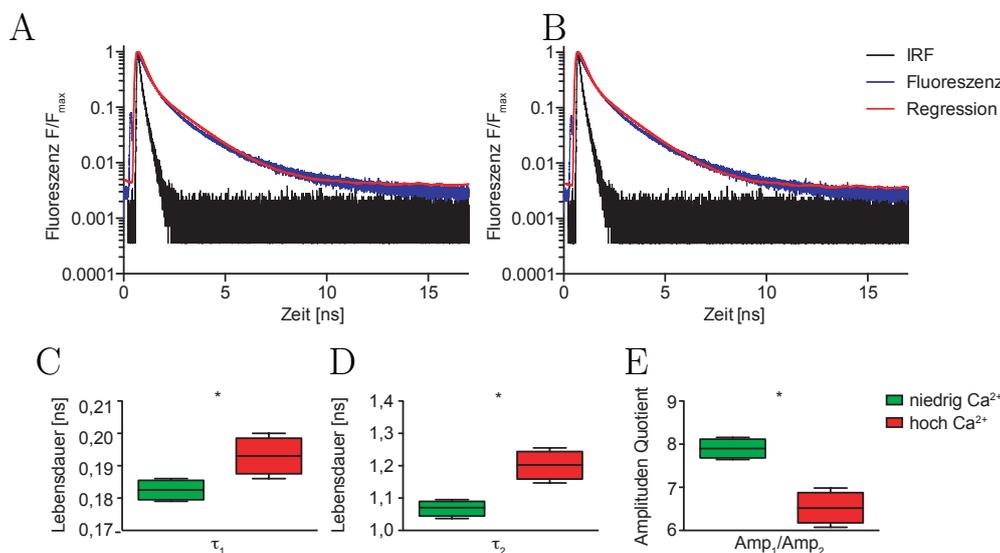


Abbildung 3.41: Fluoreszenzlebensdauermessungen von Fura RedTM in Erythrozyten, (A) Fluoreszenzlebensdauerkurve mit 10 mM EGTA und 0 M Kalzium und (B) mit 10 mM EGTA und 10 mM Kalzium bei einem pH-Wert von 7.35 mit Fluoreszenzsignal, Regression und bei der Regression verwendeter IRF (C) kurze Fluoreszenzlebensdauer mit signifikanter Änderung (D) lange Fluoreszenzlebensdauer (E) Quotient der Amplituden der Lebensdauerkurven aus der doppelt exponentiellen Regression mit signifikanter Änderung, die Statistik wurde mit 4 Bildern zu je ca. 20 Zellen erstellt

Asante Calcium Red

Die Fluoreszenz in den Zellen war niedrig, verglichen mit den im grünen Spektrum emittierenden Farbstoffen. Die Zählrate der APD lag bei $2 \cdot 10^5$ Photonen pro Sekunde. Der Quotient der Amplituden der Fluoreszenzlebensdauerkurven in Grafik 3.42 F zeigte von allen Sensoren die größte Abnahme von niedriger zu hoher Kalziumkonzentration. Auch zeigte die kurze Fluoreszenzlebensdauer den größten Anstieg, sie verdoppelte sich von niedriger zu hoher Kalziumkonzentration.

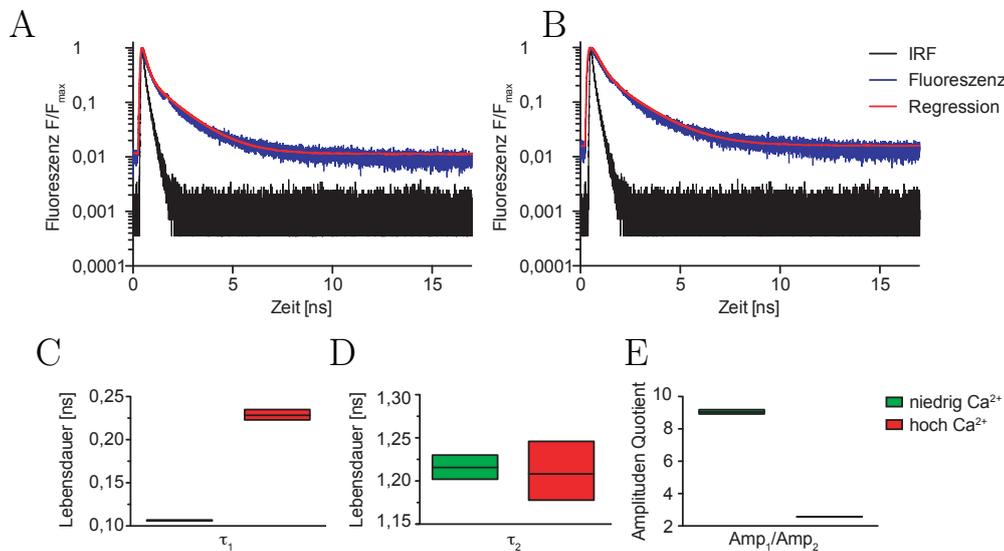


Abbildung 3.42: Fluoreszenzlebensdauermessungen von Asante Calcium RedTM in Erythrozyten. (A) Fluoreszenzlebensdauerkurve mit 10 mM EGTA und 0 M Kalzium und (B) mit 10 mM EGTA und 10 mM Kalzium bei einem pH-Wert von 7.35 mit Fluoreszenzsignal, Regression und bei der Regression verwendeter IRF. (C) kurze Fluoreszenzlebensdauer. (D) lange Fluoreszenzlebensdauer. (E) Quotient der Amplituden der Lebensdauerkurven aus der doppelt exponentiellen Regression mit signifikanter Änderung. Die Statistik wurde mit 3 Bildern zu je ca. 20 Zellen erstellt

Asante Calcium Near Infra Red

Die zum Beladen der Zellen verwendete Konzentration betrug 10 μM . Jedoch war die Fluoreszenz so schwach, dass diese nicht von den APDs detektiert werden konnte. In der Folge wurde keine Lebensdauer gemessen.

Calcium CrimsonTM

Calcium CrimsonTM wurde in einer Konzentration von 2 μM zum Beladen der Zellen verwendet. Es setzten sich jedoch nach der Deesterifizierung keine Zellen mehr auf den Deckglässchen ab. Hieraufhin wurde versucht mittels Zentrifugieren der Zellsuspension die Erythrozyten abzutrennen. Dies ergab schließlich, dass sich keine intakten Erythrozyten mehr in der Suspension befanden. Somit muss davon ausgegangen werden, dass Calcium CrimsonTM eine hämolytische Wirkung hat, und damit ungeeignet ist für die Bestimmung der Kalziumkonzentration in roten Blutkörperchen.

Kapitel 4

Diskussion

4.1 Kalziumhomöostase in isolierten ventrikulären Kardiomyozyten unter dem Einfluss eines Hyperaldosteronismus in $G\alpha_q/G\alpha_{11}$ -KO-Tieren

4.1.1 Änderungen der Kalziumtransientenamplitude in isolierten ventrikulären Kardiomyozyten

Wie schon in Abschnitt 3.1 erwähnt, kann die Messung der Kalziumhomöostase in ventrikulären Kardiomyozyten Aufschluss über mögliche Myopathien geben [27, 62]. Muskelzellen kontrahieren stärker, wenn höhere Amplituden der Kalziumkonzentration vorliegen, unter der Voraussetzung, dass Troponin C eine konstante Sensitivität für Kalzium aufweist [13]. Eine stärkere Kontraktion der Muskelzellen bedingt, bei unverändertem Verhältnis von Muskelzellen zu Kollagenfasern, eine höhere Kontraktilität. Einer höheren Kontraktilität des Herzens folgt, bei gleichem enddiastolischen Druck, eine größere Auswurfraction und folglich pumpt das Herz mehr Blut in den großen Kreislauf.

Durch Viatchenko-Karpinski et al. [148] konnte nach einer links ventrikulärer Hypertrophie (die durch Isoproterenol sowie durch einen aortocavalen Shunt hervorgerufen wurde) eine reduzierte Kalziumtransientenamplitude der Herzzellen ermittelt werden. Dies wurde auch durch Forschungen von Siri et al. [129] belegt. Sie konnten eine reduzierte Kalziumtransientenamplitude in Herzmuskelzellen aus hypertrophierten Herzen durch eine transverse Aortenkonstriktion messen.

Änderung der Kalziumtransientenamplituden in Abhängigkeit vom Genotyp der untersuchten Tiere

Zeigen die Herzmuskelzellen eine stärkere Kontraktion, so kann dieses Verhalten kompensatorisch [34] (zum Beispiel durch körperliche Belastungen über einen längeren Zeitraum) oder überkompensatorischer Art sein und damit der Vorläufer einer pathologischen Veränderung des Herzens [98, 65]. Die erhöhten Kalziumtransientenamplituden der Zellen der $G\alpha_{11}$ - und $G\alpha_q/G\alpha_{11}$ -KO-Tiere, welche statistisch aufbereitet in Grafik 3.4 dargestellt sind, könnten auf ein kompensatorisches oder überkompensatorisches Verhalten des Herzens hinweisen.

Ohne Hyperaldosteronismus hatten die Zellen der Tiere ohne das $G\alpha_{11}$ -Protein, die gleiche, gegenüber den Zellen der Wildtyp-tiere erhöhte Kalziumtransientenamplitude, während die Zellen der $G\alpha_q$ -KO-Tiere kleinere Kalziumtransientenamplituden als die Zellen der Wildtyp-tiere zeigten. Daraus kann geschlossen werden, dass das fehlende $G\alpha_{11}$ -Protein alleine für diese erhöhte Kalziumtransientenamplitude verantwortlich war.

Änderung der Kalziumtransientenamplituden der unterschiedlichen Genotypen durch den Einfluss des Hyperaldosteronismus

Sowohl nach der Ruhe als auch während der Gleichgewichtsstimulation, waren die Kalziumtransientenamplituden der Zellen der Wildtyp-tiere nach einem Hyperaldosteronismus verringert (dargestellt in Abbildung 3.4 in den grünen Feldern der Tabelle). Kleinere Kalziumtransientenamplituden nach Ruhe deuten auf eine niedrige Beladung des SR hin. Dies könnte durch ein höheres Ausströmen von Kalzium durch die RyR [158] bedingt gewesen sein. Die Beladung des SR mit Kalzium und das Ausströmen von Kalzium aus dem SR sollten jeweils überprüft werden. Die Beladung des SR könnte mittels eines Experimentes mit Koffein gemessen werden, wie es z.B. auch von Shannon et al. [125] verwendet wurde. Da Koffein für eine Ausschüttung des Kalziums aus dem SR sorgt, wäre die Menge des ausgeschütteten Kalziums ein Maß für die Menge des im SR gespeicherten Kalziums [128]. Weiterführende Erkenntnisse über das aus dem SR ausströmende Kalzium könnten durch eine Untersuchungen der Kalzium *sparks* gewonnen werden [56, 36, 128]. Kalzium *sparks* sind Kalziumfreisetzungen durch einen RyR-*cluster* aus dem SR. Durch unterschiedlich starkes Ausströmen des Kalziums aus dem SR wird, bei konstanter Aktivität der SERCA-Pumpe, die Beladung des SR verringert.

Niedrigere Kalziumtransientenamplituden während der Gleichgewichtsstimulation, wie es die Zellen der Wildtyp- und $G\alpha_{11}$ -KO-Tiere zeigten, waren entweder die Folge einer verringerten Beladung des SR oder eines ineffizi-

enteren CICR, z.B. durch schlechtere Kopplung der L-Typ-Kalziumkanäle in der Plasmamembran an die RyR [122, 143, 90, 17, 58]. Hingegen lieferten die Zellen ohne das $G\alpha_q$ -Protein andere Ergebnisse. Die Zellen der $G\alpha_q$ -KO-Tiere zeigten keine Veränderung der Kalziumtransientenamplituden nach dem Hyperaldosteronismus. Die Zellen der Doppel-KO-Mäuse zeigten sogar eine Steigerung der Kalziumtransientenamplituden. Beides deutet auf eine direkte Beteiligung der $G\alpha_q$ -Untereinheit am Aldosteron-Signalweg oder eine Einflussnahme auf die gleichen sekundären Singalproteine, wie z.B. im Fall von $PKC\epsilon$ [118, 95], hin. Die $G\alpha_{11}$ -Proteinuntereinheiten konnten während den in dieser Arbeit durchgeführten Versuchen, im Gegensatz zu einem anderen Fall [104], nicht die entsprechenden Aufgaben der fehlenden $G\alpha_q$ -Proteine übernehmen. Daher scheint die Aldosteron-Signalkaskade nur wenig Einfluss auf die Kalziumtransientenamplituden über $G\alpha_{11}$ -Proteingekoppelte Rezeptoren zu nehmen. Hauptsächlich wirkten sich Veränderungen durch Aldosteron an der Kalziumtransientenamplitude über $G\alpha_q$ -Proteingekoppelte Rezeptoren aus. Obwohl die Zellen aus dem Herz isoliert wurden und ca. 1 Stunde in Aldosteron-freiem Medium kultiviert wurden, kann nicht ausgeschlossen werden, dass die nicht-genomischen Effekte des Aldosterons [154, 151, 93] an den Veränderungen in der Kalziumhomöostase beteiligt waren [95, 94]. Trotzdem sollten in den Messungen die Langzeiteinflüsse von Aldosteron auf die Genregulation [123, 11], wie sie z.B. auch in der Vaskulatur vorkommen [63], überwiegen.

4.1.2 Änderungen der CTD80-Zeit in isolierten ventrikulären Kardiomyozyten

In murinen ventrikulären Kardiomyozyten beträgt der Anteil des durch die SERCA aus dem Zytosol in das SR gepumpten Kalziums am gesamten aus dem Zytosol entfernten Kalziums, über 90% [84]. Der Anteil des Kalziums, welcher durch die NCX wieder aus dem Zytosol in den extrazellulären Raum gepumpt wird, beträgt ca. 9%. Weitere Prozesse, wie die langsame Kalziumaufnahme in die Mitochondrien durch den Kalziumuniporter oder die Kalzium ATPase, welche Kalzium aus der Zelle in die Zellumgebung pumpt, tragen ca. 1% bei [84]. Der Einfluss der Transportrate der SERCA auf die Kalziumhomöostase und damit die Herzfähigkeit ist entsprechend groß. Die SERCA-Aktivität zu messen ist daher für die Bewertung der physiologischen Tätigkeit des Herzens von großem Interesse. Da der Netto-Fluss (die Summe des Kalziums, das aus dem Zytoplasma in das SR gepumpt wird und des aus den RyR strömenden Kalziums während der Diastole) des Kalziums in das SR von dem Konzentrationsgradienten des Kalziums zwischen SR und

Zytosol abhängt, jedoch die SERCA-Pumpe konstant aktiv ist [126], bietet es sich an, die Zeit, welche die Zelle braucht, um die diastolische Kalziumkonzentration wiederherzustellen, zu verwenden, um die SERCA-Aktivität zu charakterisieren. Als Messwert wurde die Zeit angegeben, zu welcher die Kalziumkonzentration durch die zelleigenen Mechanismen wieder auf 20% der Kalziumtransientenamplitude gesenkt wurde. Jedoch gibt dieser Wert nicht die Transportrate der SERCA wieder, mit der diese das Kalzium aus dem Zytosol in das SR pumpen. Um einen Eindruck von den Transportraten der SERCA zu bekommen, muss die CTD80-Zeit in Relation mit den Kalziumtransientenamplituden gebracht werden.

Änderung der CTD80-Zeit in Abhängigkeit vom Genotyp der untersuchten Tiere Die Zellen der Tiere ohne das $G\alpha_q$ -Protein zeigten, wie in Abbildung 3.5 dargestellt, verkürzte CTD80-Zeiten gegenüber den Zellen der Wildtypiere. Dies ließe den Schluss zu, dass entweder die SERCA-Aktivität oder die Effektivität mit der die NCX Kalzium aus dem Zytosol entfernen, oder beide dieser Kalziumtransportraten erhöht waren. Jedoch ist zu beachten, dass während der Gleichgewichtsstimulation auch die Kalziumtransientenamplituden, der Zellen der $G\alpha_q$ -KO-Tiere verringert waren. Weitere Untersuchungen, die nicht im Zusammenhang mit der Rolle der GPCR in der Signalkaskade des Aldosterons stehen, wären notwendig, um diesen Sachverhalt eindeutig zu klären.

In den Zellen der Tiere mit $G\alpha_{11}$ - und $G\alpha_q/G\alpha_{11}$ -KO ohne Hyperaldosteronismus lagen, aufgrund der höheren Kalziumtransientenamplituden und kürzeren CTD80-Zeiten, dahingegen eindeutig erhöhte Transportraten vor. Ein $G\alpha_{11}$ -KO verursachte somit bei mindestens einem der für den Kalziumefflux verantwortlichen Proteine eine höhere Transportrate. Um zu klären, welcher der Kalziumtransportwege durch das Ausschalten der *gna11*-Gensequenz bei Mäusen eine höhere Transportrate aufwies, könnte bei einer Versuchsreihe der NCX blockiert werden. Auch Ergebnisse einer Patch-Clamp-Messung könnten zur Klärung der Sachverhältnisse beitragen.

Änderung der CTD80-Zeit der unterschiedlichen Genotypen durch den Einfluss des Hyperaldosteronismus Die CTD80-Zeit zeigte (siehe Abbildung 3.5 auf Seite 58) bei den Myozyten der Wildtypiere keine Änderung nach Hyperaldosteronismus. Die CTD80-Zeit muss jedoch auch in diesem Fall, wie oben schon erwähnt, im Zusammenhang mit den Kalziumtransientenamplituden gebracht werden. Die Kalziumtransientenamplitude nahm bei den Zellen der Wildtypiere nach einem Hyperaldosteronismus ab. Somit ergab sich, dass nach einem Hyperaldosteronismus bei den Wildtypieren die Transportrate, mit dem das Kalzium aus dem Zytosol transportiert

wurde, abgenommen haben musste. Bei Myozyten von Katzen mit Hypertrophie konnte von B.A. Bailey und S.R. Houser [7] ein Anstieg der CTD50 Zeit gegenüber der Kontrollgruppe nachgewiesen werden. Somit wäre eine langsamere Wiederaufnahme des Kalziums ein Indikator für Hypertrophie. Hierbei ist jedoch zu beachten, dass die Anteile des von den SERCA und von den NCX aus dem Zytosol transportierten Kalziums bei Katzen und Hunden 70%, beziehungsweise 28% am gesamten Kalzium betragen, was ein großer Unterschied zu Mäusen ist (siehe hierzu auch Abschnitt 1.1.2).

Die CTD80-Zeit bei den Zellen der $G\alpha_q$ -KO-Tiere blieb durch den Hyperaldosteronismus unverändert. Da auch die Kalziumtransientenamplituden der Zellen aus den Herzen der $G\alpha_q$ -KO-Tiere keine Änderung nach einem Hyperaldosteronismus zeigten, waren demnach die Transportraten mit und ohne Hyperaldosteronismus gleich. Natürlich gilt diese Schlussfolgerung nur unter der Prämisse, dass die Pufferung des Kalziums im Zytosol in beiden Fällen gleich war. Denn ändert sich die Pufferung des Kalziums, so sind keine sinnvollen Aussagen sowohl über die Kalziumtransientenamplitude als auch über die CTD80-Zeit möglich, da mittels der Fura-2-Messungen immer nur die Konzentration an freiem Kalzium gemessen werden kann und nicht die absolute Menge an Kalzium.

Die gemessenen CTD80-Zeiten verlängerten sich bei den Zellen der $G\alpha_{11}$ - und $G\alpha_q/G\alpha_{11}$ -KO-Tiere signifikant durch einem Hyperaldosteronismus. In Kombination mit den Änderungen der Kalziumtransientenamplituden in diesen Zellen (siehe Abbildung 3.4), so wurde deutlich, dass die Transportraten in beiden KO-Varianten unterschiedlich waren, da die Kalziumtransientenamplitude bei den Zellen der $G\alpha_q/G\alpha_{11}$ -KO-Tiere signifikant höher war als bei den Zellen der Einzel-KO-Tiere.

Die Zellen der Tiere ohne $G\alpha_{11}$ -Protein benötigten nach Hyperaldosteronismus bei kleineren Kalziumtransientenamplituden mehr Zeit, um die diastolische Kalziumkonzentration wiederherzustellen. Somit waren entweder die Transportraten der SERCA oder des NCX in diesen Zellen reduziert, oder die Zahl der Transportkanäle war vermindert. Da in den Zellen der $G\alpha_q/G\alpha_{11}$ -KO-Tiere neben der CTD80-Zeit auch die Kalziumtransientenamplitude durch einen Hyperaldosteronismus erhöht war, kann in diesem Fall keine eindeutige Aussage über die Transportraten der Kalziumtransporter und Kalziumpumpen getroffen werden.

Die vorliegenden Daten lassen darauf schließen, dass sich der Hyperaldosteronismus über das $G\alpha_{11}$ -Protein auf die Aktivität mindestens eines der Proteine inhibierend auswirkte, die das Kalzium aus dem Zytosol entfernen. Neben der Erklärung, dass sich die Transportraten ändern, gibt es auch die Möglichkeit, dass die Zahl der für den Transport verantwortlichen Proteine in der Membran des SR oder der Zellemembran durch den Hyperaldosteronismus veränderte. Ein solcher Vorgang würde auch auf einen genomischen

Effekt des Aldosterons hindeuten. Des Weiteren kann über den Kalziumefflux gesagt werden, dass sich mit den vorliegenden Ergebnissen nicht eindeutig eine erhöhte Beladung des SR mit Kalzium durch die SERCA nachweisen lässt, da das Entfernen des Kalziums aus dem Zytosol, wie schon in Abschnitt 1.1 erklärt, über zwei Transportwege erfolgt. Da der Transport durch die NCX und die SERCA-Pumpen unterschiedliche Konstanten aufweisen, könnten diese eventuell über eine doppelt exponentielle Regression getrennt identifiziert werden. Hierdurch würden die Aussagen dieses Abschnittes mehr Reliabilität bekommen. Diese Regression war mit den vorliegenden Daten jedoch nicht möglich, da die Akquisitionsrate der verwendeten Kamera mit 46 Hz zu niedrig war. Infolgedessen ergaben sich für eine doppelt exponentielle Regression zu wenige Messpunkte pro Transient, um eine Angleichung mit akzeptablem χ^2 zu erhalten. Eine Möglichkeit diese Limitierung zu umgehen, falls keine schnellere Videokamera zur Verfügung steht, wäre eine niedrigere Stimulationsfrequenz als 4 Hz. Eine weitere Möglichkeit wäre der Einsatz von pharmakologischen Substanzen zum Blocken des NCX oder der SERCA-Pumpe.

4.1.3 Änderungen der basalen Kalziumkonzentration in ventrikulären Kardiomyozyten

Die basale Kalziumkonzentration der Zelle gibt Aufschluss über die Kalzium-*Leakage*-Rate des SR. Zudem kann die Stimulation der in der Signalkaskade der GPCRs zu findenden Rezeptoren, wie z.B. IP₃ [97], die basale Kalziumkonzentration anheben. Die Änderungen der basalen Kalziumkonzentrationen in Abhängigkeit von Genotyp und Hyperaldosteronismus sind nach Ruhe und während der Gleichgewichtsstimulation die gleichen.

Änderung der basalen Kalziumkonzentration in Abhängigkeit vom Genotyp der untersuchten Tiere Durch den KO erhöhte sich die basale Kalziumkonzentration in den Zellen der $G\alpha_{11}$ -, $G\alpha_q$ - und $G\alpha_q/G\alpha_{11}$ -KO-Tiere. Der $G\alpha_q$ -KO hatte dabei eine größere Auswirkung als der $G\alpha_{11}$ -KO. Der $G\alpha_{11}$ -KO in den Doppel-KO-Tieren brachte keine weitere Steigerung der basalen Kalziumkonzentration gegenüber dem $G\alpha_q$ -KO mit sich.

Änderung der basalen Kalziumkonzentration der unterschiedlichen Genotypen durch den Einfluss des Hyperaldosteronismus In den Fura-2-Messungen zeigte sich, dass die basale Kalziumkonzentration nur in den Zellen der $G\alpha_q$ -KO-Tiere durch den Hyperaldosteronismus gesenkt wurde. In den Zellen aller anderen Genotypen stieg die basale Kalziumkonzentration durch den Hyperaldosteronismus. Ohne Hyperaldosteronismus konn-

te zwischen den basalen Kalziumkonzentrationen der Zellen der $G\alpha_q$ - und $G\alpha_q/G\alpha_{11}$ -Tiere keine signifikanten Unterschiede festgestellt werden. Durch den Hyperaldosteronismus zeigten die Zellen der Doppel-KO-Tiere eine signifikant höhere basale Kalziumkonzentration als die Zellen der $G\alpha_q$ -KO-Tiere. Zudem kam es durch den Hyperaldosteronismus zu einem Anstieg der basalen Kalziumkonzentration in den Herzmuskelzellen der $G\alpha_{11}$ -KO-Tiere. Obige Ergebnisse deuten darauf hin, dass das $G\alpha_{11}$ -Protein ebenso wie das $G\alpha_q$ -Protein, eine Rolle für die basale Kalziumkonzentration im Signalweg des Aldosterons spielen. Jedoch erhöht der KO des $G\alpha_{11}$ -Proteins die basale Kalziumkonzentration in Folge eines Hyperaldosteronismus, während der KO des $G\alpha_q$ -Proteins die basale Kalziumkonzentration senkt.

Zusammenfassung und Ausblick

Der Hyperaldosteronismus hatte einen Einfluss auf den intrazellulären Kalziumtransport. Je nach genetischem Hintergrund veränderte sich dieser Einfluss jedoch, was auf eine Beteiligung sowohl des $G\alpha_q$ -Proteins als auch des $G\alpha_{11}$ -Protein an unterschiedlichen genomischen Veränderungen schliessen ließ. Um die Beteiligungen beider G-Proteine an der Aldosteron-Signalkaskade und dessen Einfluss auf die Kalziumhomöostase besser zu trennen, sowie tiefergehend zu ergründen, sind weitere Experimente notwendig. Zum einen sollte der akute kurzzeitige Einfluss des Aldosterons näher untersucht werden. Zum anderen sollten die Effektoren der beobachteten Veränderungen in der Kalziumhomöostase identifiziert werden, um Rückschlüsse auf den weiteren Signalweg des Aldosterons ziehen zu können.

4.2 Zwei-Photonen-Photolyse

4.2.1 Simulation

Die Simulationen mit 90 MHz und 4,5 MHz Laserpulsrate in Abbildung 3.9 auf Seite 63 wurden mit 25 mW respektive 90 mW durchgeführt. Die Menge der Kalzium-Freisetzung durch 25 mW Pulse entspricht, aufgrund der quadratischen Abhängigkeit bei der Zwei-Photonen-Photolyse, 7,7% der Freisetzung durch Pulse mit einer Leistung von 90 mW. Einer Berechnung zufolge, die Diffusion und einen Mangel an unphotolysierter Käfigsubstanz im Fokus vernachlässigt, ergab sich somit für das Verhältnis der Menge an freigesetztem Kalzium;

$$\frac{(90 \text{ mW})^2 \cdot 4,5 \text{ MHz}}{(25 \text{ mW})^2 \cdot 90 \text{ MHz}} = 0,648 \quad (4.1)$$

Der aus den Simulationen gewonnene Wert für dieses Verhältnis betrug jedoch 0,81. Für diese Diskrepanz war folglich die Umwandlung der Käfigsubstanz im Fokus des Photolyselasers, sowie die Diffusion von Käfigsubstanz in den Laserfokus zwischen den Laserpulsen verantwortlich. Die Simulationen zur Zwei-Photonen-Photolyse mit variabler Pulsfrequenz, zu sehen in den Abbildungen 3.8 und 3.9, haben gezeigt, dass der Zusammenhang zwischen der Freisetzung von Kalzium aus der Käfigsubstanz DMNP mittels 15 ms Pulszügen keine quadratische Abhängigkeit von der Leistung aufwies, wie es nach Gleichung 1.3 bei einzelnen Laserpulsen der Fall ist.

Aufgrund des höheren Zwei-Photonen-Absorptionsquerschnitts und der höheren Quanteneffizienz bei der Zwei-Photonen-Photolyse von NDBF-EGTA, kam es bei dieser Käfigsubstanz zu einer höheren Diskrepanz durch verstärkten Einfluss der Diffusion. Durch die schnellere Umwandlung der im Fokus vorhandenen Käfigsubstanz war der Einfluss der durch Diffusion nachgeführten unphotolysierten Käfigsubstanz größer als bei DMNP. Das Verhältnis der freigesetzten Kalziummenge bei 90 MHz Laserpulsrate und 25 mW Laserleistung, zu der Menge bei 4,5 MHz Laserpulsrate und 90 mW, betrug der Simulation nach 0,98, statt wie oben berechnet 0,648.

Bei einer Pulszuglänge von 15 ms sowie höheren Zwei-Photonen-Absorptionsquerschnitten ($>0,6$ GM) und Quanteneffizienzen ($>70\%$) wurde somit durch eine niedrigere Pulsrate (z.B. 4,5 MHz) mit einer höheren Laserleistung (z.B. 90 mW) mehr Substanz durch Photolyse freigesetzt als dies bei einer hohen Pulsrate (z.B. 90 MHz) mit einer niedrigen Anregungsleistung (z.B. 25 mW) der Fall war. Somit kommt es auf die Eigenschaften der Käfigsubstanz und die Ziele des Experiments an, welche Pulsrate und Laserleistung für das jeweilige Experiment optimal sind.

Infolge der Diffusion des freigesetzten Kalziums, war bei Photolysezeiten

Tabelle 4.1: Diese Tabelle ist eine Übersicht der Freisetzungsverhältnisse mit 4,5 MHz bei 90 mW und 90 MHz bei 25 mW aus den Simulationen. Diese werden verglichen mit den Ergebnissen einer vereinfachten Rechnung. Hierbei wird ersichtlich, dass bei größeren intrinsischen Parametern eine Photolyse mit hoher Laserleistung und niedriger Pulsrate mehr Liganden aus der Käfigsubstanz freisetzt als niedrige Laserleistung bei hoher Pulsrate

einf. Rechnung	Simu. DMNP	Simu NDBF-EGTA	Pulszuglänge
0,648	0,81	0,98	15 ms
1.0	1.1	1.2	1000 Pulse

von 15 ms die Region um den Fokus, in dem die Kalziumkonzentration auf über 50% der maximalen Kalziumkonzentration ansteigt (im Folgenden Halbwertsbreite genannt) mehr als 4mal größer als der beugungsbegrenzte Fokus von 490 nm. Bei 4,5 MHz kam es, trotz annähernd gleicher Menge an

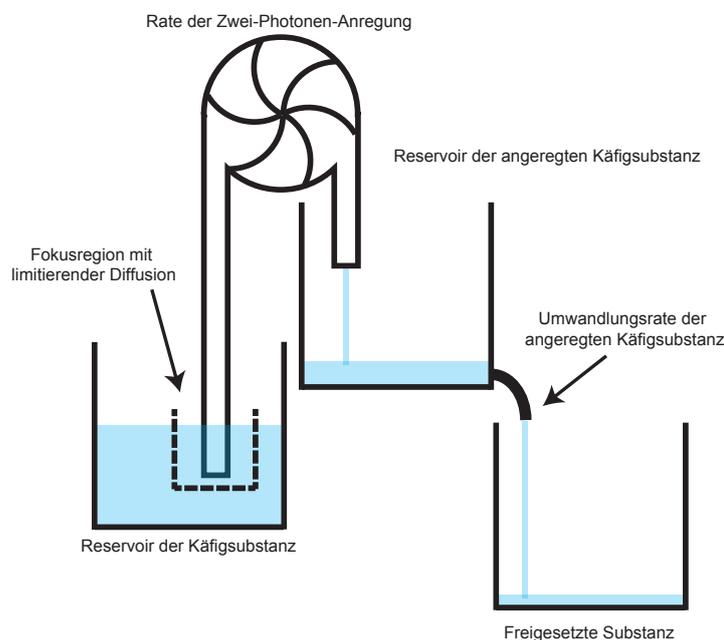


Abbildung 4.1: Raten bei der Freisetzung eines Liganden aus einer Käfigsubstanz. Neben der Anregungsrate durch den Laser ist die Umwandlungsrate der angeregten Käfigsubstanz ein limitierender Faktor. Nur wenn der Laser durch eine hohe Anregungsrate das Reservoir der angeregten Käfigsubstanz ausreichend schnell befüllt, kann die exponentielle Umwandlung der angeregten Käfigsubstanz eine schnelle Freisetzung des Liganden gewährleisten

freigesetztem Kalzium, zu einer größeren Halbwertsbreite als bei 90 MHz. Dies ist dem exponentiellen Zerfall des angeregten DMNPs zuzuschreiben. Da das angeregte DMNP sich, wie in Abschnitt 2.2.3 beschrieben, mit einer Rate von 38000 s^{-1} in das niedrig kalziumaffine Produkt umwandelt, kann immer nur der bereits angeregte Teil, zerfallen. Der Anstieg der Kalziumkonzentration war somit ultimativ durch die Umwandlungsrate der angeregten Käfigsubstanz limitiert. Jedoch kann auch die Rate der Anregung einen limitierenden Faktor darstellen. Abbildung 4.1 verdeutlicht diesen Sachverhalt in einer Grafik.

Somit ist eine hohe Rate, zum Befüllen des Reservoirs der angeregten DMNP Moleküle, von Vorteil für eine kleine Halbwertsbreite. Limitierend ist jedoch für die minimale Halbwertsbreite die Umwandlungsrate der angeregten Käfigsubstanz. Da dies eine intrinsische Eigenschaft der Käfigsubstanz ist, kann nur die Entwicklung sich schneller umwandelnder Käfigsubstanzen eine kleinere Halbwertsbreite ermöglichen.

Die Simulationen zur Zwei-Photonen-Photolyse mit nur 1000 Laserpulsen, die in den Grafiken 3.11 bis 3.14 abgebildet sind, haben gezeigt, dass im Gegensatz zu der Photolyse über 15 ms hinweg die quadratische Abhängigkeit

der Freisetzung von der Leistung des Photolyselasers gilt. Die Simulation zur Photolyse von DMNP mit nur 1000 Laserpulsen, gezeigt in Abbildung 3.12, ergab zudem, dass es mit einer Laserleistung von 5 mW bei 6 MHz (bei einer Ausgangskonzentration von 3 mM beladenem DMNP) möglich ist, die Konzentration an Kalzium lokal von 0 M auf $4,5 \mu\text{M}$ anzuheben. Im Vergleich dazu wurde bei einer Freisetzung mittels 90 MHz und 25 mW die Kalziumkonzentration nur auf $0,42 \mu\text{M}$ angehoben. Bei den Simulationen die auf der Grundlage der Parameter von NDBF-EGTA durchgeführt wurden, zeigte sich zudem, dass die Effekte der reduzierten Laserpulsrate durch schnellere Umwandlungsrate im Laserfokus stärker hervortraten als bei DMNP. Die Anpassung der Pulsrate und der Leistung wird demzufolge interessanter bei für die Zwei-Photonen-Photolyse optimierten Käfigsubstanzen.

Werden alle Ergebnisse der Simulationen zusammengefasst, so geht daraus hervor, dass die Laserpulsrate auf die Länge der Pulszüge angepasst werden sollte. Bei Versuchen, die keine hohe zeitliche oder räumliche Begrenzung der Freisetzung benötigen, sind niedrige Pulsraten zu bevorzugen, da sie durch eine hohe Spitzenleistung mehr Freisetzung pro mittlerer Leistung bewirken. Wenn für ein Experiment die Kalziumkonzentration nur in einem sehr kleinen Bereich angehoben werden soll, so dürfen nur kurze Pulszüge von wenigen μs Länge verwendet werden. Da in einem solchen Fall die Diffusion fast keine Rolle mehr spielt und somit eine fast statische Konzentrationsverteilung vorliegt, können hohe Laserpulsraten zu einer kleineren Halbwertsbreite der Freisetzung beitragen.

Es ist also möglich das System aus Leistung, Laserfrequenz und Pulszuglänge zu optimieren, um sowohl die Freisetzung als auch die räumliche Begrenzung der Konzentrationserhöhung zu verbessern. Jedoch ist die zurzeit vorliegende Simulation nur begrenzt in der Lage, die optimalen Einstellungen für das jeweilige Experiment zu berechnen. Hierzu wäre es notwendig, das Näherungsverfahren der finiten Differenzen durch ein effizienteres, wie zum Beispiel das Runge-Kutta-Verfahren, zu ersetzen. Dies würde zum einen die Performanz steigern und zum anderen positiv auf die Genauigkeit, bei höheren zeitlichen sowie räumlichen Auflösungen, auswirken. Die Simulationen von Kiskin et al. [74] konzentrierten sich auf die Freisetzungsraten in Abhängigkeit von Anregungs- und Umwandlungsrate. Weiter wurde von Kiskin et al. der Einfluss der Randbedingungen in den numerischen Simulationen näher beleuchtet. Jedoch wurde von Kiskin et al., im Gegensatz zu der in dieser Arbeit vorgestellten Simulation, die Diffusion vernachlässigt. Eine weitere Vertiefung der Fragestellung nach Freisetzung und Diffusion könnten wie schon in Abschnitt 3.2.1 angesprochen, durch Einbeziehen von Puffern für das freigesetzte Kalzium und anisotrope Diffusion geschehen.

4.2.2 Kritische Bestandteile für die Justage des Zwei-Photonen-Photolyse-Aufbaus

Wie in Kapitel 3.2 angedeutet, wies der Aufbau zur Zwei-Photonen-Photolyse mehrere, für die Photolyse kritische Komponenten auf, deren Einstellung vor jedem Experiment kontrolliert wurden, um eine optimale Freisetzung zu gewährleisten. Arbeiten von Lipp und Niggli [87] oder Konishi et al. [79] verzichteten auf einige der Komponenten, die in dem vorliegenden Aufbau unerlässlich sind, wie zum Beispiel den Pulpicker. Diese Bauteile erhöhten die Gefahr, dass durch eine schlechte Justage dieser die Photolyse beeinträchtigt wurde. Zudem kam es, wie im Falle der Deformation des Strahlquerschnitts durch die Hohlspiegel des Pulpickers zu einer Beeinträchtigung des Photolyselaserfokus, die mit den gegebenen Mitteln nicht auszugleichen war. Spezielle Linsen, die jedoch nicht vorlagen, könnten die Deformation des Strahlquerschnitts kompensieren.

Zudem hatte der verwendete Chameleon TiSa Laser vergleichsweise lange Laserpulse (>130 fs) gegenüber einem auch im Labor verfügbaren MIRA (<90 fs). Jedoch verhinderte die Tatsache, dass der Pulpicker nur für Laser mit 90 MHz Laserpulstrate gebaut war und der MIRA bei 80 MHz Laserpulstrate lief, den Einsatz dieses flexibleren und im Hinblick auf die Laserpulslänge besser geeigneten Lasers.

Eine weitere Verbesserung der Photolyse könnte der Umbau des Autokorrelators bringen. Bei diesem Umbau würde ein spezieller externer Sensor zum Einsatz kommen, der mit Objektiven mit einem Arbeitsabstand von $<0,2$ mm verwendet werden kann. So wäre die Positionierung der Prismen zur Dispersionskompensation schneller und genauer möglich. Eine Alternative wäre ein neueres Lasermodell, welches kürzere Pulse liefert sowie eine integrierte Dispersionskompensation besitzt.

4.2.3 Messungen zur Parfokalität

Die Messungen zur Parfokalität haben gezeigt, dass eine exakte Einkopplung des Lasers einen großen Einfluss auf den Laserfokus hatte. Die gemessenen Fokusgrößen sind um ein vielfaches höher als der beugungsbegrenzte Fokus. Dies kann zum Beispiel darin begründet sein, dass die Rückapertur des Objektivs nicht massiv überfüllt wurde. Des Weiteren erschweren es die unterschiedlichen Divergenzen in beiden Richtungen senkrecht zu optischen Achse die optimale Parfokalität. Zuletzt kann auch eine nicht optimierte PSF der konfokalen Detektion nicht ausgeschlossen werden, da diese nicht explizit nach den Parfokalitätsmessungen überprüft wurde. Der Fokus der Zwei-Photonen-Photolyse ist bei dem momentanen Kenntnisstand ungeeignet, für eine Rezeptorkartographie.

4.2.4 Zellschädigung in Abhängigkeit von der Laserpulsrate

Die Schädigung von Zellen durch Nahinfrarot-Laserpulse wurde schon vielfach untersucht [77, 75, 145, 103, 150] und die Vorteile der Zwei-Photonen-Anregung gegenüber der UV-Anregung wurden ebenso diskutiert [78]. Die meisten dieser Arbeiten konzentrierten sich jedoch auf Zwei-Photonen-Mikroskopie sowie den Vergleich von Zwei-Photonen-Anregung mit Ein-Photonen-Anregung und nicht auf lokale kurzzeitige Laserillumination für die Photolyse und den Einfluss variabler Laserpulsfrequenzen. Das Ziel dieser Arbeit war es, diesen Aspekt näher zu untersuchen.

Die Schäden oder auch Beeinflussungen der Zellen, wie sie in Abbildung 3.20 A gezeigt wurden, sind zum Teil reversibel. Ein Aufbrechen der Zellmembran bei Kardiomyozyten, wie in Abbildung 3.19, kam gehäuft bei Zellen der gleichen Isolation vor, was auf eine Abhängigkeit der Stabilität der Zellen von der Zellisolation oder von dem Gesundheitszustand des Herzens schließen lässt. Eine Deformation der Zelle, wie sie in Abbildung 3.20 A in einer HEK-Zelle dargestellt wurde, ging der Ruptur der Zellmembran meist voraus. Somit ist diese Deformation ein geeigneteres Indiz für eine Schädigung der Zelle.

Die Untersuchungen zur Schädigung der Zellen, die in Abschnitt 3.2.5 präsentiert wurden, verglichen unterschiedliche Laserpulszahlen bei unterschiedlicher Frequenz aber gleicher Laserpulsenergie. Die mechanischen Deformationen traten, wie zu erwarten war, bei niedrigerer Pulszahl seltener auf. Ob eine lineare Abhängigkeit von der Pulszahl vorlag, konnte mittels dieser Versuche nicht abschließend geklärt werden. Hierzu müssten die Versuche mittels definierter Laserpulszahlen anstatt gleicher Pulszuglängen wiederholt werden. Was erst nach der Entwicklung der neuen Pulszugsteuerung mittels des Pulspickers möglich wurde.

Den Versuchen von Shimada et al. [127] zufolge können Mitochondrien durch zu hohe Laserleistungen zerstört werden. Da Mitochondrien, die im Experiment meist nicht sichtbar sind, selbst Kalzium speichern, könnte deren Zerstörung bei Versuchen zur Kalziumfreisetzung falsch positive Ergebnisse produzieren. Der Verlust der Fluoreszenz der Mitochondrien (in Abbildung 3.21), durch 20000 Laserpulse mit einer Laserpulsenergie von 1 nJ zeigte, dass auch geringe Laserpulszahlen die Mitochondrien zerstören oder depolarisieren können. Bei gleicher Laserpulsenergie, jedoch lediglich 5000 Laserpulsen, traten die gleichen Fluoreszenzverluste auf. Eine Laserpulsenergie von 77 pJ hingegen, wie sie bei den Versuchen mit 90 MHz Pulsrate verwendet wurde, wirkte sich trotz 400.000 Laserpulsen nicht negativ auf die Mitochondrien aus. Dadurch wurde klar, dass in diesem Fall die Einzelpulsenergie ausschlaggebend war und nicht die Summe der deponierten Energien.

Folglich ist im Hinblick auf die Schädigung der Mitochondrien in einem Experiment eine niedrige Laserpulsenergie von Vorteil.

Es liegen, aufgrund der relativ zeitnahen Entwicklung im Bereich, des Photolysierens mittels definierter Laserpulszahlen, keine quantitativen Ergebnisse vor, die eine Verträglichkeit der hohen Laserintensitäten bei Pulszügen von weniger als 1000 Laserpulsen, nahelegen. Einige Beobachtungen während der Experimente deuteten jedoch darauf hin, dass es trotz der sehr kurzen Photolysezeiten durch den Laser zu Schädigungen an den Zellen kam. Es waren dieselben dunklen Flecken in den Zellen zu beobachten, wie sie in Abbildung 3.20 A auf Seite 74 zu sehen sind, wenn wiederholt im Abstand von weniger als einer Sekunde mittels 1000 Laserpulsen (bei 60 MHz und 3 mW Laserleistung an der Probe) photolysiert wurde. Jedoch sollten weitere Experimente mit definierten Laserpulszahlen eine quantitativ exaktere Evaluation ermöglichen.

Zum einen hatte die Energie pro Laserpuls bei den Untersuchungen einen größeren Einfluss als die mittlere Leistung. Zum anderen waren die längeren Abstände zwischen den Laserpulsen bei niedrigen Laserpulsraten von Vorteil, da selbener Schädigungen an den Zellen auftraten. Dies mag daran liegen, dass die Zelle bei niedrigeren Laserpulsraten zwischen den Laserpulsen mehr Energie dissipieren kann. Zusammengefasst kann gesagt werden, dass die untersuchten Zellen eine höhere Schädigungen durch die Zwei-Photonen- als durch Ein-Photonen-Absorption erfuhren. Somit ist bei biologischen Experimenten eine hohe Laserpulsrate (90 MHz) bei niedriger Pulsernergie (<1 nJ) einer niedrigen Laserpulsrate bei hoher Laserpulsenergie vorzuziehen, um einer Schädigung der Zellen vorzubeugen.

4.2.5 Einfluss der Laserpulsrate auf die Photolyse

Die Photolyse von NPE-caged HPTS in HEK-Zellen zeigte, wie auch schon die Simulation, den Einfluss der Diffusion zwischen den Laserpulsen. Die Freisetzung pro Laserpuls ist an das Quadrat der momentanen Leistung gebunden. Somit war zu erwarten, dass pro Puls mit 1 mW mittlerer Leistung bei 1,1 MHz ca. das 10fache der Menge an HPTS freigesetzt wurde, wie bei 20 mW mittlerer Leistung bei 90 MHz. Dies ergab sich aus der Energie pro Puls. Umgekehrt wurden bei gleicher Photolysezeit mit 90 MHz, 80mal so viele Pulse auf die Probe geschickt wie bei 1,1 MHz. Damit ergab sich ein apparenter Vorteil für die hohe Repetitionsrate. Jedoch zeigen die Messergebnisse in Abbildung 76, dass die Freisetzungen mit 1,1 MHz Rate bei 1 mW Leistung und 90 MHz bei 20 mW Leistung keine signifikanten Unterschiede aufwiesen. Dies ist der Umwandlung der Käfigsubstanz im Fokus des Photolyselasers und den niedrigen Diffusionsraten der Käfigsubstanz geschuldet. Diese These wird gestützt durch die in Abschnitt 3.2.1 präsentierten Ergeb-

nisse der Simulation.

4.2.6 Photolyse mittels definierter Zahl an Laserpulsen

Grafik 3.24 stellt dar, wie in 4 Fällen, trotz gleicher Parameter (Laserleistung, Pulszuglänge und Belichtungszeit der Kamera), ein jeweils anderer Fluoreszenzanstieg nach der Freisetzung von CMNB-caged Fluoreszein, gemessen wurde. Es war möglich bei 40 ms Belichtungszeit und 50 ms Pulszuglänge den Photolyselaser auf 2 oder 3 Bildern zu erkennen und dies auch mit unterschiedlicher Verteilung über 3 Bilder. Dies geschah, obwohl die Software Patchmaster immer in gleicher Weise Photolyse und Bildakquise startete. Dies lag an der Ungenauigkeit des mechanischen Verschlusssystems. In den Fällen in denen die Kamera als Auslöser für die Photolyse mittels definierter Pulszahl fungierte, konnte diese Beobachtung nicht mehr gemacht werden. Es wurde nicht überprüft, inwieweit die Kamera eine stabile Bildrate aufwies.

Eine wichtige Entwicklung an dem System zur Photolyse mittels definierten Laserpulszahlen war, Artefakte in den Messdaten durch TPEF zu vermeiden. Bei Soeller et al. [133] wurde zur Messung der Diffusion eines fluoreszenten Stoffes erst der Zeitraum nach Abschalten des Lasers analysiert. Escobar et al. nutzten die Möglichkeit, die Detektion erst nach dem Abschalten des Lasers zu starten [41]. Bei der in dieser Arbeit verwendeten Konfokaleinheit wird die Kamera 2mal beleuchtet, während die Spannung des Galvanometers an dem der Abtastspiegel befestigt ist, eine Periode durchlief. In der Phase zwischen den beiden Belichtungen konnte, ausgelöst durch das Kamera *fire* Signal, eine Photolyse durchgeführt werden, ohne dass die Kamera eine TPEF detektierte. Mittels der Verzögerung, die am Arbiträrpulsgenerator eingestellt wurde, war es zudem möglich das Ende des Photolyselaserpulses bis auf wenige ns an die nächste Belichtungsphase der Kamera heranzubringen, um somit die unmittelbare Reaktion der Zelle auf die Freisetzung eines Liganden zu beobachten (siehe hierzu auch die Grafik 2.8 auf Seite 28). Die Abtastrate des Infinity 4 Konfokalmoduls war, bei der vorliegenden Version, frei einstellbar zwischen 1 Hz und 1000 Hz.

Die Abtastrate limitierte auf der einen Seite die maximale Akquisitionsrate der Kameras und auf der anderen Seite die maximale Pulszuglänge. Beides musste sich jedoch die Waage halten, denn kürzere Pulszüge bedingten eine geringere Freisetzung, wodurch in der Regel eine kleinere Antwort des Zellsystem ausgelöst wurde. Des Weiteren brachte eine höhere Akquisitionsrate eine niedrigere Belichtungszeit mit sich. Da die maximale Akquisitionsrate der verwendeten EMCCD Kameras 150 Hz für zweidimensionale Aufnahmen (bei Bildgrößen von 50x50 Pixeln mit 4x4 *binning*) und bis zu 400 Hz für Linienaufnahmen war und zudem die Detektionseffizienz limitiert war,

wurden Freisetzungen unter $100 \mu\text{s}$ nicht Standard. Mit den verwendeten Kameras wären höhere Bildraten möglich, wenn der Photolyselaser zentraler in dem Bildausschnitt der Kamera läge. Bei allen Justagen auf die Aperturen des Linsentubus lag der Fokus des Lasers jedoch immer im oberen Drittel des Kamerabildes. Bei der Aufnahme eines Kamerabildes wird die Intensität der detektierten Photonen über die Belichtungszeit hinweg gemittelt. Bei 145 Bildern pro Sekunde war die Belichtungszeit ca. 1000mal so lang wie die Dauer einer Photolyse mittels 50 Laserpulsen. Mit schnelleren Kameras, die eine höhere Detektionseffizienz besitzen, wären theoretisch Submillisekunden-lange Aufnahmen möglich, um zum Beispiel die Propagation von, durch die Photolyse ausgelösten, Kalziumwellen zu messen. Des Weiteren könnte, durch Freisetzung von *caged-IP₃*, die Kopplung von Kalzium *puffs* und Kalziumwellen analysiert werden.

Eine Alternative zur Photolyse mittels definierter Laserpulszahlen wäre ein elektro-optischer Modulator (zum Beispiel in Form einer Pockels-Zelle) oder auch ein *acusto optical modulator* (AOM). Beide Systeme erlauben Schaltzeiten im Mikrosekundenbereich. Jedoch würde eine exakte Definition der Laserpulszahl und damit die Bestimmung der exakten Menge an freigesetzter Substanz nicht gewährleistet. Mit einer festen, aber variablen, Zahl an Laserpulsen zu photolysieren, ist in seinem Wert zum jetzigen Zeitpunkt noch nicht vollständig abzuschätzen. Jedoch würde diese Methode, durch die lineare Abhängigkeit der Freisetzung von der Laserpulszahl (bei kleinen Laserpulszahlen), die genaue Bestimmung von Zwei-Photonen-Absorptionsquerschnitten verbessern. Durch umfassende Kenntnis der eingesetzten Intensität und Effizienz bei der Photolyse, könnten zudem Messungen Kalzium-sensitiver Prozesse durchgeführt werden, anstatt Simulationen [152, 60, 76, 16], wie zum Beispiel die Aktivierung der RyR durch Kalzium in der *dyadic cleft*. Diese Methode des Photolysierens mit wenigen definierten Laserpulszahlen ist ein wichtiger Schritt zu dem Ziel, Photolyse mit einem einzelnen Laserpuls durchzuführen, um so die Einflüsse von Diffusion oder Bleichen des Farbstoffes durch Zwei-Photonen-Anregung auf das Messergebnis zu vermeiden.

4.3 Fluoreszenzlebensdauer-Messungen

4.3.1 Justage

Um die Ergebnisse der Fluoreszenzlebensdauer-Messungen zu diskutieren, ist es unerlässlich darauf einzugehen, wie verschiedene Bauteile des verwendeten Versuchsaufbaus die Messungen der IRF und der Fluoreszenzlebensdauern beeinflussten. Ein wichtiger Punkt war, dass die Alignierung des Lasers

die Messungen der Fluoreszenzlebensdauer dahingehend beeinflusste, dass ein längerer Strahlweg den zeitlichen Abstand der Anregung von der Detektion veränderte und unter Umständen auch die Anregungsdauer selbst variierte. Dies führte dazu, dass die IRF erneut gemessen werden musste, um zu gewährleisten, dass die korrekte Anregung und Antwort der Elektronik in der mathematischen Faltung mit dem detektierten Fluoreszenzsignal berücksichtigt wurde. Um dieses Problem zu umgehen, sollte die IRF vor jedem Experiment gemessen werden. Ansonsten könnte es zu Fluktuationen in den Fluoreszenzlebensdauerwerten der Regression kommen. Da die IRF zum größten Teil von der Elektronik und den optischen Elementen abhing, sollte darauf geachtet werden, dass die Kabel, das Objektiv, die Position des Silberspiegels im Filterrevolver und Position der Emissionsfilter vor den APDs nicht während einer Versuchsreihe verändert wurden.

Leider zeigte sich während der Experimente und der anschließenden Auswertung, dass die Funktionalität der Rekonstruktion der IRF, mittels der Symphotime Software, stark eingeschränkt war. Mittels rekonstruierter IRF kam es zu enorm großen Schwankungen der gemessenen Fluoreszenzlebensdauern. Die Verwendung der vor dem Experiment gemessenen IRF erbrachte deutlich stabilere Messwerte. Des Weiteren war der Algorithmus zur Analyse nicht ausgereift genug für den verwendeten Aufbau. Die IRF zeigte in einer Messung eine Abhängigkeit von der Bildposition durch unterschiedliche Laufzeiten des Lasers links und rechts im Bild. Diese Verschiebung war, wie in Abbildung 3.30 abgebildet, nicht symmetrisch zum Mittelpunkt des aufgenommenen Bildes. Dies lässt sich durch die Positionierung der Ruhestellung des Scanners zu der optischen Achse des gesamten Systems erklären. Der Fehler, der durch die unterschiedlichen Weglängen, links und rechts an der Probe, auftrat, lies sich in Symphotime nur durch getrennte Auswertung der Signale links und rechts im Bild vermeiden. Besser wäre in diesem Fall eine Positionsabhängige IRF zu verwenden, wie es in dem Script FLIMfit für Matlab und OMERO möglich ist. Unglücklicherweise ist dieses Script nicht kompatibel mit dem Datenformat, welches die Symphotimesoftware ausgab. Ein weiterer Parameter, der für exakte Fluoreszenzlebensdauermessungen kontrolliert werden muss, war der pH-Wert. Da der pH-Wert die Protonierung der fluoreszierenden Moleküle beeinflusst und diese wiederum die Energieniveaus jener Moleküle, wurde indirekt die gemessene Fluoreszenzlebensdauer beeinflusst. Dies wurde auf Seite 86 am Beispiel von Fluoreszein dargestellt. Aus diesem Grund eignete sich Cumarin 6 besser für eine Referenzmessung der Fluoreszenzlebensdauer. Bei diesem war die exakte Kontrolle des pH-Wertes nicht notwendig. Die Abweichung der gemessenen Fluoreszenzlebensdauer von Cumarin 6 (2,553 ns) vom Literaturwert (2,5 ns) lässt sich durch unterschiedliche Temperaturen während der Messung oder Verunreinigungen des Ethanolis erklären.

Die mittels Reflektion des Anregungslasers bestimmte IRF wies, aufgrund von Reflektionen an den Optiken innerhalb des Versuchsaufbaus zusätzliche Fluoreszenzmaxima auf. Um diese Maxima nicht in der Regression berücksichtigen zu müssen, wurde bei der Verwendung dieser IRF auf die gemessene Fluoreszenz bei Werten oberhalb von 17 ns verzichtet. Gerade bei langen Fluoreszenzlebensdauern von über 5 ns konnte dies jedoch, durch eine falsche Bestimmung des Fluoreszenzhintergrundes, zu Fehlern in der Regression führen. Aus diesem Grund sollte für die Regression möglichst immer eine mittels eines Farbstoffes gemessene IRF verwendet werden, da bei der Messung einer solchen IRF die Reflektionen des Lasers mit entsprechenden Emissionsfiltern unterdrückt werden können.

4.3.2 Fluoreszenzlebensdauern von Fura RedTM bei definierten Kalziumkonzentrationen

In dieser Arbeit wurde Fura RedTM auf seine Eignung zur Messung der Kalziumkonzentration mittels FLIM getestet. Die Entscheidung Fura RedTM als Kalziumindikator für die Fluoreszenzlebensdauer messung zu verwenden, beruhte zum einen darauf, dass Fura RedTM ein ratiometrischer Kalziumindikator war. Zum anderen zeigte Asante Calcium Red, ein weiterer im roten Spektrum emitierender Kalziumindikator, in Testmessungen deutlich geringere Fluoreszenzintensitäten. Wie anhand von Abbildung 3.34 zu erkennen ist, waren die Kalziumkonzentrationsanstiege bei den Kalibrierungslösungen exponentiell. Die sich aus den Regressionen ergebenden kurzen Fluoreszenzlebensdauern, in einer Statistik auf Seite 88 zusammengefasst, schienen keine Abhängigkeit von der Kalziumkonzentration zu haben. Eventuell war diese durch eine Bindung des Fura RedTM an Proteine bedingt, wie es auch schon von Lipp et al. [86] berichtet wurde. Die Änderung der langen Fluoreszenzlebensdauern, abgebildet in Grafik 3.35 B, war dahingegen deutlich nachzuweisen. Jedoch ist die gemessene von pCa nicht einfach zu erklären. Eine Möglichkeit wäre die Verschiebung des K_d von Fura RedTM von 140 nM in vitro, hin zu höheren Werten von 1,1 μ M-1,4 μ M, wie im Skelettmuskel des Frosches [80]. Dies würde auch die hohen χ^2 erklären, da die Regressionen mit der Hill-Funktion für einem festen K_d von 140 nM durchgeführt wurden.

4.3.3 Reevaluierung der Kalziumindikatoren

Wie in Abschnitt 3.3 gezeigt, wiesen verschiedene Kalzium-sensitive Farbstoffe in Erythrozyten eine Änderung der Fluoreszenzlebensdauer auf, wenn sich die Kalziumkonzentration in den Zellen erhöhte. Im Folgenden wird diskutiert, welche Indikatoren sich für den Versuch einer Eichung mittels

kalibrierter Kalziumlösungen eignen könnten. Da die Herstellung und Kalibrierung der Kalziumlösungen sehr aufwendig war, sollte die Kalibrierung der Fluoreszenzlebensdauer gegen die Kalziumkonzentration nur an wenigen Farbstoffen, nach einer Vorauswahl, erfolgen.

Fluo-8

Fluo-8 wäre aufgrund der Änderung von über 50% der aus der doppelt exponentiellen Regression gewonnen langen Fluoreszenzlebensdauer ein geeigneter Farbstoff. Jedoch zeigte Fluo-8 einen starken Anstieg der Fluoreszenz, wenn die Kalziumkonzentration in der extrazellulären Lösung von 0 M Kalzium auf 27 μM erhöht wurde. Dies machte es, wie auch bei den durchgeführten Messungen geschehen, nötig, die Anregungsleistung zu reduzieren. Dieser Umstand ist nicht weiter hinderlich, wenn keine zeitabhängigen Prozesse beobachtet werden sollen. Wenn es jedoch von Interesse wäre, die Dynamik eines physiologischen Vorgangs aufzuzeichnen, so ist ein Nachregeln der Anregungsleistung nicht möglich. Somit ist Fluo-8 für dynamische Kalziummessungen nicht geeignet.

Calcium GreenTM

Aufgrund der signifikanten Änderung des Quotienten der Amplituden der Fluoreszenzlebensdauerkurven von 5,8 auf 8,9 von ca. 0 M Kalzium zu 27 μM Kalzium ist Calcium GreenTM ein geeigneter Kandidat zur weiteren Verwendung. Sein, im grünen Bereich liegendes, Emissionsspektrum verhindert jedoch die parallele Verwendung anderer, im grünen Spektrum emittierender, Farbstoffe.

Oregon Green® 488 BAPTA 2

Trotzdem Oregon Green® 488 BAPTA 2 nur sehr geringe Änderung aller Parameter zeigte, kann es, aufgrund der stabilen Fluoreszenz, für eine weitere Verwendung empfohlen werden. Wilms et al. [155] hatten mittels 2-Photonen-Anregung die Kalzium-abhängige Fluoreszenzlebensdauer von Oregon Green® BAPTA 1 gemessen. Sie konnten mittels Regression bei steigender Kalziumkonzentration eine Zunahme der Fluoreszenzamplitude der kurzen Fluoreszenzlebensdauer messen. Die lange Fluoreszenzlebensdauer hatte hingegen bei steigender Kalziumkonzentration eine geringere Amplitude. Die beiden für die Regression verwendeten Zeitkonstanten der Fluoreszenzlebensdauern von Oregon Green® BAPTA 1 in Nervenzellen waren 396 ps und 2.45 ns. Bei freier Regression aller in Abschnitt 2.3.5 beschriebenen Parameter wurden in den in dieser Arbeit durchgeführten Versuchen,

Fluoreszenzlebensdauern von 244 ps bis 288 ps für die kurze Fluoreszenzlebensdauer ermittelt. Die Regression der langen Fluoreszenzlebensdauer ergab 1,92 ns bis 1,95 ns. Dabei wurde jedoch, im Gegensatz zu den Ergebnissen von Wilms et al., ermittelt, dass die Amplitude der Fluoreszenz der kurzen Lebensdauer abnahm gegenüber der Amplitude der langen Lebensdauer. Dies kann dadurch erklärt werden, dass Wilms et al. bei der Regression der Daten von zwei festen Fluoreszenzlebensdauern ausgingen, wohingegen die Zerfallskonstante in den Regressionen in dieser Arbeit nicht eingeschränkt wurde. Eine erneute Untersuchung der Fluoreszenzlebensdauer bei 0 M Kalzium und bei 27 μ M Kalzium ist daher angebracht.

Calcium OrangeTM

Der Kalziumindikator zeigte signifikante Änderungen beider, durch die Regression ermittelter Fluoreszenzlebensdauern, und mit 265% die größte Änderung des Quotienten aus den Amplituden der angenäherten Fluoreszenzlebensdauerkurven. Er ist, aufgrund seines Absorptions- und Emissionsspektrums, vielseitig mit anderen Indikatoren zusammen verwendbar. Wie jedoch anhand der Ergebnisse aus Abschnitt 3.3.2 zu sehen ist, ergab die Messung bei 0 mM Kalzium zwei Subpopulationen an Fluoreszenzlebensdauern in den Zellen. Da der Grund für die beiden Subpopulationen nicht ermittelt werden konnte, ist dieser Sensor vorerst nicht für weitere Fluoreszenzlebensdauer-Messungen verwendbar.

Fura RedTM

Die Messungen des ratiometrischen Kalziumindikators Fura RedTM ergaben sowohl für die kürze als auch für die längere (der mittels der Regression bestimmten) Fluoreszenzlebensdauern eine signifikante Änderung in Abhängigkeit von der extrazellulären Kalziumkonzentration. Auch das Verhältnis der aus der Regression bestimmten Amplituden der Fluoreszenzlebensdauerkurven zeigte bei den Messungen mit 0 mM Kalzium in der extrazellulären Lösung und den Messungen mit 27 μ M Kalzium in der extrazellulären Lösung eine signifikante Änderung. Es sollte eine erneute Messung mit Lösungen definierter Kalziumkonzentration durchgeführt werden, wobei darauf zu achten wäre, dass die höchste Kalziumkonzentration bei ca. 50 μ M liegen sollte, um dem Umstand Rechnung zu tragen, dass sich der K_d von Fura RedTM *in vivo* in den Bereich von 1 μ M verschieben kann.

Asante Calcium Red

Wie Fura RedTM war auch Asante Calcium Red ratiometrisch verwendbar. Jedoch wurde nicht mit 488 nm angeregt, da auch bei diesem Farbstoff der

Vorteil der Kombinierbarkeit mit anderen, im grünen Spektrum emittierenden Farbstoffen im Vordergrund stand und die Emission bei 525 nm dies unterbunden hätte. Es zeigte sich, dass dieser Farbstoff, trotz der immensen Änderung der ermittelten kurzen Fluoreszenzlebensdauer, von ca 0,1 ns auf 0,23 ns, ungeeignet war. Da die kurze Fluoreszenzlebensdauer mit 100 ps sehr nahe an der IRF lag, konnte nicht gewährleistet werden, dass sich niedrige Kalziumkonzentrationsänderungen exakt messen lassen, da schon geringe Änderungen der IRF zu großen Fluktuationen in der Regression der kurzen Fluoreszenzlebensdauer führen würden. Die geringe Fluoreszenzintensität von Asant Calcium Red machte zudem dynamische Messungen, aufgrund der langen Integrationszeiten zum Erreichen eines akzeptables Signal-zu-Rausch-Verhältnisses, unmöglich.

4.3.4 Zusammenfassung und Ausblick

Es konnte erfolgreich ein System für FLIM etabliert werden, welches mittels eines Superkontinuum-Lasers in der Lage ist, ein breites Anregungsspektrum abzudecken. Anhand der in dieser Arbeit ermittelten Daten wurden Kalziumindikatoren identifiziert, die sich eignen, um mittels der Fluoreszenzlebensdauer, die Kalziumkonzentration in Erythrozyten zu bestimmen. Fluo-8, Calcium GreenTM, Oregon Green® 488 BAPTA 2 und Fura RedTM sind geeignete Kandidaten für weiterführende Kalibrierungsmessungen. Falls es möglich ist die Subpopulationen der Zellen bei der Fluoreszenz von Calcium OrangeTM zu erklären, ist auch dieser Indikator ein geeigneter Kandidat für eine Messung der Fluoreszenzlebensdauern bei kalibrierten Kalziumkonzentrationen. Nach der Kalibrierung der Fluoreszenzlebensdauer gegen die Kalziumkonzentration, sollte eine Messung der Kalziumkonzentration in gesunden und pathologischen Erythrozyten durchgeführt und mit bestehender Ergebnissen verglichen werden.

Danksagung

Ich danke meinem Doktorvater Prof. Dr. Peter Lipp für die Überlassung des Themas meiner Dissertation und seine Betreuung während meiner Arbeit in seiner Arbeitsgruppe.

Du hattest für mich immer ein offenes Ohr wenn ich bei die anklopfte. Trotz Missverständnissen fandest du meist die richtigen Worte, um mich wieder aufzubauen, zu motivieren, mir weiterzuhelfen oder um mit dir zu lachen. Ich hoffe ernsthaft, wir können den Kontakt aufrechterhalten.

Ich danke meinem Betreuer PD Dr. Lars Kaestner für die Unterstützung, die er mir während meiner Dissertation hat zukommen lassen.

Deine manchmal allzu trockene Art hat viel zu oft die Herzlichkeit, die du in dir trägst, verschleiert. Ich wünsche dir alles Gute und möge dein Schutzengel nie schlafen, wenn du mal wieder zu einem Termin düst.

Ich danke Dr. Martin Oberhofer für seine Unterstützung bei den Patch Clamp Experimenten. Dein Herz schlug zwar für die Junge Union, doch als es darum ging, mich zu unterstützen, hattest du jede Menge Verständnis für die Probleme bei der Realisierung meiner Experimente. Du hast dich wirklich krumm gemacht, damit am Ende ein Ergebnis stand. Ich hoffe, deine neue Arbeit lässt dir mehr Zeit für deine Familie.

Ich danke Dr. Sandra Ruppenthal für ihre zahlreichen Kommentare zu meiner Dissertationsarbeit, die mir sehr weitergeholfen haben. Ich hoffe dein Computer spielt dir nicht allzu viele Streiche, wenn ich nicht mehr aushelfen kann. Du bist aber auf dem besten Weg den Rechner zu dominieren.

Ich danke Dr. Anke Scholz für dafür, dass sie mir bei meinen Verständnisproblemem mit den Aldosteron-Signalwegen ausgeholfen hat. Ich wünsche dir und deiner Familie alles Liebe.

Ich danke Dr. Qinghai Tian, der mir mit viel Rat und Tat zur Seite stand. I thank Dr. Qinghai Tian for helping me out not only with words but also with deeds. I guess although I sometimes did get on your nerves, but I felt that we had a wonderful work-relationship. I think we both profited by the different expertise of one another. I wish you all the best for your future work. May your driving develop well.

Ich danke all meinen anderen Kolleginnen und Kollegen, die mich durch ihre

Präsenz immer wieder aufgemuntert haben. Ich danke euch allen auch für euer Verständnis, wenn ich als Physiker mal nur biologischen Unsinn fabriziert habe. Namentlich danke ich Tanja Kuhn für ihre unbändige Wut, Cornelia Feß für ihre zahl- und hilfreichen Computertipps, Sabrina Hennig für die unmenigen an guten Zellen, Anne Vecerdea für ihre ruhige Art, Xin Hui für die Hilfe bei der Zellkultur und seine großartige Kollegialität, Katja Nitze für ihre Korrekturen und ihre Stabilität (keine Anspielung), Sara Pahlavan für den tollen Einblick in die persische Kultur, Elisabeth Kaiser für die vielen Taxidienste und zahlreichen lustigen Gespräche im Shuttlebus und im Zug, Laura Schröder für die Konditionierung, Julia Schweizer dafür, dass sie kein Blatt vor den Mund nimmt, Yue Wang für die Hilfe mit der Isolation der Erythrozyten, Kathrina Wiesen dafür, dass sie durchgehalten hat, Monika Barth für ihre verständnisvolle Art, nicht aber für ihre Meinung zur Stadt Saarbrücken, Polina Petkova-Kirova dafür, dass sie immer ein nettes Wort für alle Menschen hat, Jens Danielczok für das Putzen meines alten Versuchsaufbau, Laura Herz für ihre Eigeninitiative am Rechner, Jörg Sauerbaum für all die Sonderanfertigungen und seine Tipps in der Werkstatt, sowie Christoph Neuhardt für seine technische Unterstützung in allen Belangen. Ihr habt mich alle immer wieder zum Lachen gebracht und habt mir damit eine Arbeitsatmosphäre beschert, wie man sie sich erträumt.

Ich danke allen, die ich hier vergessen habe und die mich so uneigennützig unterstützt haben.

Ich danke Karin Schumacher für ihre Unterstützung. Nicht zuletzt danke ich dir als Hauptverantwortliche für die Kaffeemaschine, ohne die ich die Dissertation nicht durchgestanden hätte.

Ich danke nicht zuletzt meiner gesamten Familie. Insbesondere meinen Eltern, ohne die ich nicht derjenige wäre, der ich heute bin.

Ganz besonders Danke ich meiner wunderbaren Freundin die mich in allen Belangen immer unterstützt hat.

Soweit wäre ich ohne dich nie gekommen. Ich hoffe, dass ich auch dir immer eine solche Stütze sein werde.

Anhang A

Quellcode der Simulation

```

//=====
// Name      : NumericalDiffusion.cpp
// Author    : Benjamin Sauer
// Version   : 0.2 alpha
// Copyright  : GNU+
// Description : Ansi-style
//=====
#define _USE_MATH_DEFINES
#include <iostream>
#include <cmath>
#include <iomanip>
#include <fstream>
#include <string>
#include <sstream>
#include <time.h>

using namespace std;

int main() {
//-----
// Variablen
//-----
    //Statische Variablen
    clock_t start, end;
    start = clock();
    time_t t;
    t=time(NULL);
    char* c_time_string;
    c_time_string= ctime(&t);

    //Berechnungsparameter Parameter
    const long double ten=10;
    const long double K0=2000;
    const long double n=250;
    //Fixe Parameter
    const long double rep0=90*pow(ten,6);
    const long double h=6.606*pow(ten,-34);
    const long double c=300000000;
    //Variable Parameter
    const long double L=0.00001;
    const long double dx=(L)/(n);
    const long double NA=1.49;
    const long double g=0.664;
    const long double P0=0.090;
    const long double tau=148*pow(ten,-15);
    long double lambda=705*pow(ten,-9);

```

```

        long double w0=lambda/NA;
        //Experimentelle Parameter
        long double
pick=1; //
Standard Pickrate
        //Änderung der Pickrate
        cout << "pulserate="<<rep0<<endl<<"choose pickrate"<<endl;
        int pic=0;
        cin >>pic;
        pick=(long double) pic;
        long double P=P0/
pick; //Anpassen der
Lesitung pro Puls
        const long double
K=K0*pick; //Anpassen der Zeit
Auflösung
        long double rep=rep0/
pick; //Apassen der
Repetitionsrate
        long double dt=1/
(rep*K); //Anpassen der
Zeitschrittweite
        long double
time1=0.167; //Standarzeit mit
Laser
        long double
time2=10; //
Standradzeit ohne Laser
        //Änderung der Zeiten
        cout<<"1: Read in times?"<<endl;
        cout<<"2: Readin pulse number and time?"<<endl;
        cout<<"3: Pulse number and acquisition rate?"<<endl;
        int wtf=0;
        cin>>wtf;
        cout<<endl;
        switch(wtf)
        {
        case 1:
                cout<<"Time with laser="<<endl;
                cin>>time1;
                cout<<endl<<"Time without laser=";
                cin>>time2;
                break;
        case 2:
                cout<<"Number of pulses="<<endl;
                cin>>time1;

```

```

        time1=time1*1000/rep;
        cout<<endl<<"Time without laser="<<endl;
        cin>>time2;
        break;
case 3:
    cout<<"Number of pulses="<<endl;
    cin>>time1;
    time1=time1*1000/rep;
    cout<<endl<<"Acquisition rate="<<endl;
    cin>>time2;
    time2=1/time2;
    time2=time2*1000-time1;
    if(time2<0)
    {
        cout<<"please check rate and pulstrain length";
        return 0;
    }
    break;
default:
    cout<<"You entered a wrong number"<<endl;
    return 0;
}
//Substanz Parameter
long double d=1.4/pow(ten,10);
long double dCa=2/pow(ten,10);
long double qe=0.70;
long double sigma=0.6*pow(ten, -58);
long double lam=20000;
string stuff;
//Änderung der Substanz Parameter
cout <<"please choose a substance"<<endl;
cout << "1 DM Nitrophen"<<endl;
cout << "2 NDBF EGTA"<<endl;
cout << "3 NPE HPTS"<<endl;
cout << "4 Input free parameters"<<endl;
int choice=0;
cin >> choice;
if(choice==1)
{
    d=1.47/pow(ten,10);
    dCa=2/pow(ten,10);
    qe=0.18;
    sigma=0.01*pow(ten, -58);
    lam=38000;
    cout<<"You chose DM Nitrophen"<<endl;
    stuff=("DM_Nitrophen");
}

```

```

}
else
{
    if(choice==2)
    {
        cout<<"You chose NDBF EGTA"<<endl;
        stuff=("NDBF_EGTA");
    }
    else
    {
        if (choice==3)
        {
            d=2.3/pow(ten,10);
            dCa=2.3/pow(ten,10);
            qe=.2;
            sigma=8.84*pow(ten, -58);
            lam=550;
            cout<<"You chose NPE HPTS"<<endl;

            stuff=("NPE_HPTS");
        }
        else
            if(choice==4)
            {
                cout<<"D cage? [10^-6 cm^2/s]"<<endl;
                cin >> d;
                d=d/pow(ten,10);
                cout<<"D substance? [10^-6 cm^2/s]"<<endl;
                cin>> dCa;
                dCa=dCa/pow(ten,10);
                cout<<"Quantum efficiency?"<<endl;
                cin>> qe;
                cout<<"Absorption cross section? [GM]"<<endl;
                cin>> sigma;
                sigma=sigma*pow(ten, -58);
            }
            else
            {
                cout<<"Wrong input, using standard values"<<endl;
            }
        }
    }
}
//Änderung der Wiederholungen
cout<<"Choose number of repetitions"<<endl;
int repetitions=1;
cin>>repetitions;

```

```

long double dAc=d;
//Matrizenparameter
//Käfigsubstanz
long double e=1-2*d*dt/pow(dx,2);
long double f=(d*dt/pow(dx,2));
//Kalzium
long double eCa=1-2*dCa*dt/pow(dx,2);
long double fCa=(dCa*dt/pow(dx,2));
//Käfigsubstanz im angeregten Zustand
long double eAc=1-2*dCa*dt/pow(dx,2)-lam*dt;
long double fAc=dCa*dt/pow(dx,2);
//Berechnung der Rechenschritte
long double m1=rep*time1/1000;
long double m2=rep*time2/1000;
long double m=m1+m2;
//Änderung der Auflösung in der Ausgabe
cout <<"Number of steps = "<<m<<endl;
int res = 1;
    int res2= 1;
    cout<< "Res 1 = "<<res<<" Res 2 = "<<res2<<endl;
    cout<< "1: Continue!"<<endl;
    cout<<"2: Change Resolution!"<<endl;
    int resdec=0;
    cin>>resdec;
    switch(resdec)
    {
    case 1:

        break;
    case 2:
        cout<<"
        "Resolution 1 ="<<endl;
        cin>>res;

        cout<<endl<<"Resolution 2 ="<<endl;
        cin>>res2;
        break;
    default:
        cout<<"You entered a wrong number"<<endl;
        return 0;
    }
//corref to adapt to experimental data!!
long double corref=0.05;
qe=qe*corref;
//Berechnung der Effizienz

```

```

    long double eff=(2*qe*sigma*pow(lambda,2)*g*pow(P,2))/(pow(h,2)*pow(c,
2)*pow(rep,2)*tau*pow(w0,4)*pow(M_PI,2));
    cout <<"Efficiency = "<<eff<<endl;
    //Initiiieren der Variablen zur Berechnung
    //Gesamtmenge
    long double *amount;
    amount = new long double [(int)m+1];
    long double am=0;
    //Linearraum zur Berechnung
    long double *x= new long double [(int) n];
    for(int i=0;i<=(int)n;i++)
    {
        x[i]=(long double)i*dx;
    }
    //Diffusionsmatrizen initiieren
    //Käfig Substanz
    long double *u=new long double[(int)n+1];
    for (int i=0;i<=(int)n;i++)
    {
        u[i]=1;
    }
    long double *V= new long double[(int)n+1];
    for (int i=0;i<=(int)n;i++)
    {
        V[i]=1;
    }
    //Käfigsubstanz im angeregten Zustand
    long double *w=new long double[(int)n+1];
    for (int i=0;i<=(int)n;i++)
    {
        w[i]=0;
    }
    long double *C = new long double[(int)n+1];
    for (int i=0;i<=(int)n;i++)
    {
        C[i]= 0;
    }
    //Freigesetzte Substanz
    long double *r=new long double[(int)n+1];
    for (int i=0;i<=(int)n;i++)
    {
        r[i]=0;
    }
    long double *R = new long double[(int)n+1];
    for (int i=0;i<=(int)n;i++)

```

```

{
    R[i]= 0;
}
long double *Rx = new long double[(int)m+1];
    for (int i=0;i<=(int)m*repetitions;i++)
    {
        Rx[i]= 0;
    }
//Zeit
long double *ti=new long double[(int)n+1];
for (int i=0;i<=(int)n;i++)
{
    ti[i]=1;
}
cout<<m1<<","<<m2<<","<<m<<endl;

```

```

//-----
//Dateien vorbereiten
//-----
//Dateinamen generieren
    string name1("CScwl");
    string name3("Cacwl");
    string name4("Accwl");
    string name5("Metadata");
    string name6("Time");
    string name2=("Caa");
    string MHz("Hz");
    string mW=("W");
    string msec=("ms");
    stringstream NumberString;
    NumberString <<c_time_string;
    string Number = NumberString.str();
    name1+=Number+".csv";
    name2+=Number+".csv";
    name3+=Number+".csv";
    name4+=Number+".csv";
    name6+=Number+".csv";
    name5+=Number+".txt";
    ofstream myfile;
    myfile.open (name1.c_str());
    myfile.close();

    myfile.open (name3.c_str());
    myfile.close();

    myfile.open (name4.c_str());

```

```

myfile.close();

myfile.open (name2.c_str());
myfile.close();
myfile.open (name5.c_str());
myfile <<"Metadata" << endl;
myfile<<endl;
myfile<<"repetition rate:"<<rep<<" time with laser:"<<time1<<" number of pulses
"<<time1*rep/1000<<" time without laser:"<<time2<<" power:"<<P<<endl
    <<"full rate power:"<<P0<<endl
    <<"educt"<<stuff<<" diffusion coefficient educt:"<<d<<" diffusion
coefficient product:"<<dCa<<endl
    <<"Number of pulsetrains:"<<repetitions<<endl
    <<"pulse duration:"<<tau<<" two-photon absorption cross-
section:"<<sigma<<" quantum efficiency:"<<qe<<endl
    <<"efficiency:"<< eff << endl
    <<"Calculation parameters"<<endl<<endl
    <<"pulse parameter:"<<g<<endl
    <<"dx:"<<dx<<" spacing"<<L<<endl
    <<"dt:"<<dt<<" K:"<<K<<" n:"<<n
    <<"wavelength"<<lambd<<" focussize:"<<w0<<endl
    <<"resolution with laser:"<<res<<" resolution without laser:"
<<res2<<endl;
myfile.close();
myfile.open (name6.c_str());
myfile.close();
long double hours;
long double minutes;
long double seconds;
long double ehours;
long double eminutes;
long double esconds;

//-----
//Berechnung mit Laserpulsen
//-----
for(int reps=0;reps<repetitions;reps++)
{
    int counter2=0;
    int reser=0;
    int maxer=0;
    for(int i=0;i<=(int)m1;i++)
    {
        Rx[((int)i)+((int)reps)*((int)m)]=C[((int)n)/2];
    }
}

```

```

int mod = i;
    if(mod%res ==0)
    {
        cout << reps <<" of "<<repetitions<<" Repetitions " << i
+reps*m<<"/" <<repetitions*m<<endl;
        cout<<V[((int)n)/4]<<" " << V[((int)n)/
2]<<" "<<V[((int)n)*3/4]<<endl;
        cout<<R[((int)n)/4]<<" " << R[((int)n)/
2]<<" "<<R[((int)n)*3/4]<<endl;
        cout<<C[((int)n)/4]<<" " << C[((int)n)/
2]<<" "<<C[((int)n)*3/4]<<endl;
        end = clock();
        seconds=end/1000000;
        esconds=(m*repetitions)/((reps+1)*i)*seconds;
        ehours=esconds/3600;
        esconds=esconds-(long double)3600*(int)ehours;
        eminutes=esconds/60;
        esconds=esconds-(long double)60*(int)eminutes;
        hours=seconds/3600;
        seconds=seconds-(long double)3600*(int)hours;
        minutes=seconds/60;
        seconds=seconds-(long double)60*(int)minutes;
        cout<<(int)hours<<"h " <<(int)minutes<<"min
"<<(int)seconds<<"s of "<<(int)ehours<<"h " <<(int)eminutes<<"min
"<<(int)esconds<<"s"<<endl;
        //Werte schreiben
        //Käfigsubstanz mit Laser
        myfile.open (name1.c_str(), ios::app);
        for (int j=0; j<(int)n; j++)
        {

            myfile << V[j] << " ";

        }
        myfile << endl;
        myfile.close();
        //Kalzium mit Laser
        myfile.open (name3.c_str(), ios::app);
        for (int j=0; j<(int)n; j++)
        {

            myfile << C[j] << " ";

        }
        myfile << endl;
        myfile.close();
        //Käfigsubstanz in angeregten Zustand
        myfile.open (name4.c_str(), ios::app);

```

```

for (int j=0; j<(int)n; j++)
{
    myfile << R[j] << " ";
}
myfile << endl;
myfile.close();
//Kalzium Gesamtmenge
myfile.open (name2.c_str(), ios::app);
myfile << amount[i] << " ";
myfile << endl;
myfile.close();
//Time
myfile.open (name6.c_str(), ios::app);
myfile << (i+reps*m)/rep << " ";
myfile << endl;
myfile.close();
}
//Laserpuls ausführen
for(int j=1;j<(int)n;j++)
{
    R[j]=R[j]+(V[j]*eff*exp(-(x[j]-x[((int)n)/2])*(x[j]-x[((int)n)/2])/
(w0*w0)));
    am=am+(V[j]*eff*exp(-(x[j]-x[((int)n)/2])*(x[j]-x[((int)n)/2])/
(w0*w0)));
    amount[i+1]=am;
    V[j]=V[j]*(1-eff*exp(-(x[j]-x[((int)n)/2])*(x[j]-x[((int)n)/2])/
(w0*w0)));
}
//Randbedingungen wiederherstellen
for(int j=0;j<=(int)K;j++)
{
    C[0]=0;
    C[(int)n]=0;
    R[0]=0;
    R[(int)n]=0;
    V[0]=1;
    V[(int)n]=1;
}
//Diffusion berechnen
for(int j=0;j<=(int)K/2;j++)
{
    for(int k=1;k<(int)n;k++)
    {
        u[k]=V[k-1]*f+V[k]*e+V[k+1]*f;
        r[k]=R[k-1]*fAc+R[k]*eAc+R[k+1]*fAc;
    }
}

```

```

        w[k]=C[k-1]*fCa+C[k]*eCa+C[k+1]*fCa+lam*dt*R[k];
    }
    for(int k=1;k<(int)n;k++)
    {
        V[k]=u[k-1]*f+u[k]*e+u[k+1]*f;
        R[k]=r[k-1]*fAc+r[k]*eAc+r[k+1]*fAc;
        C[k]=w[k-1]*fCa+w[k]*eCa+w[k+1]*fCa+lam*dt*r[k];
    }
}

//-----
//Berechnung ohne Laserpulse
//-----

    int counter=0;
    for(int i=1;i<=(int)m2;i++)
    {
        Rx[((int)i)+((int)m1)+((int)reps)*((int)m)]=C[((int)n)/2];
        int mod = i;
        long double factor=abs((Rx[(int)i+(int)m1+(int)reps*(int)m]-Rx[(int)i+
(int)m1+(int)reps*(int)m-1])*(Rx[(int)i+(int)m1+(int)reps*(int)m]-2*Rx[(int)i+(int)m1+
(int)reps*(int)m-1]+Rx[(int)i+(int)m1+(int)reps*(int)m-2]))*3000000000000000;
        long double factor4=abs(Rx[(int)i+(int)m1+(int)reps*(int)m]-Rx[(int)i
+(int)m1+(int)reps*(int)m-1]);
        long double factor5=abs(Rx[(int)i+(int)m1+
(int)reps*(int)m]-2*Rx[(int)i+(int)m1+(int)reps*(int)m-1]+Rx[(int)i+(int)m1+
(int)reps*(int)m-2]);
        int decider=0;
        //cout<<factor<<endl;
        if(factor<=0.1)
        {
            counter=counter+1;
        }
        if(factor>0.1)
        {
            decider=1;
            cout<<"Faktor!"<<endl;
            counter2=counter2+1;
        }
        if(factor4<pow(ten,-10))
        {
            decider=1;
            if(factor5>pow(ten,-10))
            {
                cout<<"Max!"<<endl;
                maxer=1;
            }
        }
    }
}

```

```

        }
        else
        {
            decider=0;
        }
    }
    if(counter==res2)
    {
        decider=1;
        counter=0;
        reser=reser+1;
    }
    end = clock();

    seconds=end/1000000;
    eseconds=(m*repetitions)/((reps+1)*(i
+m1))*seconds;

    ehours=eseconds/3600;
    eseconds=eseconds-(long
double)3600*(int)ehours;

    eminutes=eseconds/60;
    eseconds=eseconds-(long
double)60*(int)eminutes;

    hours=seconds/3600;
    seconds=seconds-(long
double)3600*(int)hours;

    minutes=seconds/60;
    seconds=seconds-(long
double)60*(int)minutes;

    if(end%3000000==0)
    {
        cout<<(int)hours<<"h
"<<(int)minutes<<"min "<<(int)seconds<<"s of "<<(int)ehours<<"h
"<<(int)eminutes<<"min "<<(int)eseconds<<"s"<<endl;
        cout<<endl;
    }

    if(decider==1)
    {
        cout<<reps<<" of "<<repetitions<<" Repetitions " << i
+m1+reps*m<<" " <<repetitions*m<<endl;
        cout<<V[((int)n)/4]<<" " << V[((int)n)/
2]<<" "<<V[((int)n)*3/4]<<endl;
        cout<<R[((int)n)/4]<<" " << R[((int)n)/
2]<<" "<<R[((int)n)*3/4]<<endl;
        cout<<C[((int)n)/4]<<" " << C[((int)n)/
2]<<" "<<C[((int)n)*3/4]<<endl;
        //Werte schreiben

```

```

//Käfigsubstanz ohne Laser
myfile.open (name1.c_str(), ios::app);
for (int j=0; j<(int)n; j++)
{
    myfile << V[j] << " ";
}
myfile << endl;
myfile.close();
//Kalzium ohne
myfile.open (name3.c_str(), ios::app);
for (int j=0; j<(int)n; j++)
{
    myfile << C[j] << " ";
}
myfile << endl;
myfile.close();
//Käfigsubstanz im angeregten Zustand
myfile.open (name4.c_str(), ios::app);
for (int j=0; j<(int)n; j++)
{
    myfile << R[j] << " ";
}
myfile << endl;
myfile.close();
myfile.open (name6.c_str(), ios::app);
myfile << (i+m1+reps*m)/rep << " ";
myfile << endl;
myfile.close();
decider=0;
counter=0;
}
//Randbedingungen wiederherstellen
for(int j=0;j<=(int)K;j++)
{
    C[0]=0;
    C[(int)n]=0;
    V[0]=1;
    V[(int)n]=1;
    R[0]=0;
    R[(int)n]=0;
}
//Diffusion berechnen
for(int j=0;j<=(int)K/2;j++)
{
    for(int k=1;k<(int)n;k++)

```

```

    {
        u[k]=V[k-1]*f+V[k]*e+V[k+1]*f;
        r[k]=R[k-1]*fAc+R[k]*eAc+R[k+1]*fAc;
        w[k]=C[k-1]*fCa+C[k]*eCa+C[k+1]*fCa+lam*dt*R[k];
    }
    for(int k=1;k<(int)n;k++)
    {
        V[k]=u[k-1]*f+u[k]*e+u[k+1]*f;
        R[k]=r[k-1]*fAc+r[k]*eAc+r[k+1]*fAc;
        C[k]=w[k-1]*fCa+w[k]*eCa+w[k+1]*fCa+lam*dt*r[k];
    }
}
//Ausgabe Parameter in Metafile übertragen
myfile.open (name5.c_str(), ios::app);

myfile<<"Factor"<<reps<<"="<<counter2<<endl;
                               myfile<<"Max"<<reps<<"="<<maxer;
                               myfile<<"Reser"<<reps<<"="<<reser;
                               myfile << endl;
                               myfile.close();
}
//Speicher freigeben
delete[] x;
delete[] V;
delete[] C;
delete[] u;
delete[] w;
delete[] amount;
cout<<"Finished";
return EXIT_SUCCESS;
}

```

Anhang B

Beschreibung der Steuerbefehle für die DSC

RS232 Kommunikationsparameter

- Baudrate 57600
- Daten-bits 8
- Parität keine
- Stop-bit 1
- Flusskontrolle keine

Kommandos um die Abtast Kontroll DSP anzusprechen

Aus der *firmware* Beschreibung Scan Control DSP v1.7.0 Kontrollkommandos werden vom PC als Bytes gesendet.

Kommando Syntax: eine Kommandozeile wird mittels eines Semikolons oder eines *return*-Zeichens beendet.

Kommando Namen sind ein *char* lang. Alle Leerzeichen werden ignoriert. Der erste nicht Leerzeichen *char* wird als Kommando interpretiert. Unmittelbar nach diesem *char* startet die Parameterliste. Parameter werden von Kommas separiert.

Kommandos geben einen Wert zurück oder nicht wie in der Kommandobeschreibung angegeben.

```
// Definition der DSP Kontrollkommandos
DSP_CMD_DO_NOTHING '#'
// tut nichts, aber beschäftigt das interface und signalisiert einen break
//der Protokollausführung, kann auch als Kommentarmarker verwendet
```

```
// werden
// keine Argumente
// keine Antwort

DSP_CMD_RETURN_INFO 'R'
// teilt der DSP mit einen null terminated string zurückzugeben
// keine Argumente
// Gibt einen string „TILL scan control DSP v%s \“, bei
// dem %s ersetzt wird durch die versionsnummer

DSP_CMD_CLEAR_PROT 'C'
// Löscht das Abtastkontrollprotokoll
// Keine Argumente
// Gibt eine Nummer als Status/Fehler-Kode zurück

DSP_CMD_ADD_PROT_CMD 'A'
// Fügt ein Kommando der Abtastprotokollliste hinzu
// Argumente:
// chart < Abtast-Kontroll-Kommando (siehe oben)>
// Zyklen_t < Zyklus (Aktueller Typ long)>
// int < Kanal>
// int < Wert>
// Alle Argumente müssen präsent sein, Auch wenn sie im Abtastkommando
// nicht vorkommen.
//
// Gibt eine Nummer als Status/Fehler-Kode zurück

DSP_CMD_EXECUTE_PROT 'I'
// Führt das Protokoll aus
// Keine Argumente
//
// Gibt eine Nummer als Status/Fehler-Kode zurück

DSP_CMD_LIST_PROT 'L'
// Listet Protokoll auf
// Keine Argumente
// Gibt eine Liste des Protokolls im Speicher oder die Nachricht
// „No Protokoll in Memory. \n \r“ zurück

DSP_CMD_SHOW_BUFFER 'B'
// Zur Fehlerbehebung
// Zeigt den Inhalt des Puffers für den Abtastkanal „Kanal“
```

```
// Argument:
// int <Kanal>
// Gibt den Inhalt des Puffers zurück, kein Fehlercode

DSP_CMD_SHOW_VALUE '?'
// Zeigt den aktuellen Wert des Abtastkanals „Kanal“
// Argument:
// int <Kanal>
// Gibt eine Zahl zurück: den Wert, kein Fehlercode

DSP_CMD_SET_VALUE 'V'
// Setzt direkt den Wert eines Abtastkanals. Wie 'V' Kommando in
// // einem Abtastprotokoll, aber das aktuelle Protokoll bleibt unangetastet
// und der Wert wird direkt gesetzt nachdem die Zeile verarbeitet wurde.
// Argumente:
// int <Kanal>
// long <Value>
//
// Gibt eine Nummer als Status/Fehler-Kode zurück

DSP_CMD_SET_OFFSET 'O'
// Setzt den offset Wert eines Galvanometerkanals (Kanal 3-6) in Zählungen
// (nicht Mikro-Zählungen).
// Der offset wird zum Wert des Kanals addiert bevor der Wert an die
// Galvanometersteuerung übermittelt wird.
// Argumente:
// int <Kanal>
// long <Value>, Reichweite: -32768 .. 32767
//
// Gibt eine Nummer als Status/Fehler-Kode zurück
```

Abtast-Kontroll-Kommandos

Die Abtast-Kontroll-Kommandos haben drei Parameter:

```
Zyklus (long; 48 bit)
// Nummer des 10  $\mu$ s Zyklus, in welchem das Kommando ausgeführt werden
// soll
Kanal (integer; 24 bit)
// Ausgabekanal, dessen Inkrement geändert wird
Wert (long; 48)
// Wert der gesetzt werden soll
```

Die Abtast-Kontroll-Kommandos sind

```
scan_cmd_do_nothing = (int) '0',
// Attrappen Kommando, zum Beispiel um die Ausführung eines
// Kommandos nach dem letzten „echten“ Kommandos
// zu verzögern.

scan_cmd_set_value = (int) 'V',
// Kommando, um direkt den Wert eines Ausgabekanals zu setzen.
// Zyklus: 10  $\mu$ s Zyklus, in welchem der Wert zu setzen ist
// Kanal: Kanal, welcher zu setzen ist
// Wert: Wert, auf welchen der Kanal gesetzt werden soll

scan_cmd_set_value_relative = (int) 'R',
// Kommando den Wert eines Ausgabekanals relativ zu dem
// jetzigen Wert zu setzen

scan_cmd_set_increment_1 = (int) 'I',
// Kommando um den Wert zu setzen, um den ein Kanal jeden Zyklus
// inkrementiert wird ( $\wedge = 1$ . Ableitung).
// Zyklus: 10  $\mu$ s Zyklus, in welchem der Wert zu setzen ist
// Kanal: Kanal, dessen 1. Inkrement zu setzen ist
// Wert: Wert, auf welchen der Kanal gesetzt werden soll

scan_cmd_set_increment_2 = (int) 'J',
// Kommando um den Wert zu setzen, um den das Inkrement eines Kanals
// jeden Zyklus inkrementiert wird ( $\wedge = 2$ . Ableitung).
// Zyklus: 10  $\mu$ s Zyklus, in welchem der Wert zu setzen ist
// Kanal: Kanal, dessen 2. Inkrement zu setzen ist
// Wert: Wert, auf welchen der Kanal gesetzt werden soll

scan_cmd_switch_offset = (int) 'O',
// Kommando um den offset eines Abtastkanals (3-6) an- und auszuschal-
// ten.
// Die offsets sind ausgeschaltet wenn das Protokoll startet.
// Zyklus: 10  $\mu$ s Zyklus, in welchem der offset geschaltet wird
// Kanal: Kanal, dessen offset geschaltet wird
// Wert: 0: aus ; 1: an

scan_cmd_loop_star = (int) 'S',
// Startet eine Schleife; Bis zu 100 Schleifen können geschachtelt werden
```

Anm. des Autors // Zyklus: 10 μ s Zyklus, in welchem die Schleife startet
// Kanal: ungenutzt
// Wert: Zahl der Iterationen

```
scan_cmd_loop_end = (int) 'E',  
// Startet eine Schleife; Bis zu 100 Schleifen können geschachtelt werden  
Anm. des Autors // Zyklus: 10  $\mu$ s Zyklus, in welchem die erste Iteration der  
Schleife endet  
// Kanal: ungenutzt  
// Wert: ungenutzt  
Anm. des Autors nach der Schleife ist der nächst mögliche Zyklus für ein  
Kommando der Zyklus nachdem die letzte Iteration der Schleife ausgeführt  
wurde.
```

```
scan_cmd_wait_trig_rising = (int) 'U',  
// Warte auf ansteigendes TTL-Signal  
// Zyklus: Ausführung der Kommandos nach diesem Zyklus werden  
// angehalten bis ein ansteigendes TTL-Signal detektiert wurde  
// (Verwende nicht Zyklus=0)  
// Kanal: ungenutzt  
// Während das Protokoll auf das TTL-Signal wartet werden Inkremente  
// nicht ausgeführt  
// Sollte nicht in Zyklus 0 verwendet werden!
```

```
scan_cmd_wait_trig_falling = (int) 'D',  
// Warte auf fallendes TT-Signal  
// Parameter und Gebrauch sind wie bei scan_cmd_wait_trig_rising
```

Literaturverzeichnis

- [1] Adams SR, Lev-Ram V, Tsien RY (1997) A new caged Ca^{2+} , azid-1, is far more photosensitive than nitrobenzyl-based chelators. *Chemistry & Biology* 4(11):867–878
- [2] Agronskaia AV, Tertoolen L, Gerritsen HC (2004) Fast fluorescence lifetime imaging of calcium in living cells. *J Biomed Opt* 9(6):1230–1237
- [3] Akin BL, Hurley TD, Chen Z, Jones LR (2013) The Structural Basis for Phospholamban Inhibition of the Calcium Pump in Sarcoplasmic Reticulum. *J Biol Chem*
- [4] Allbritton NL, Meyer T, Stryer L (1992) Range of messenger action of calcium ion and inositol 1,4,5-trisphosphate. *Science* 258(5089):1812–1815
- [5] Ando J, Smith NI, Fujita K, Kawata S (2009) Photogeneration of membrane potential hyperpolarization and depolarization in non-excitable cells. *Euro Biophys J* 38(2):255–262
- [6] Atri A, Amundson J, Clapham D, Sneyd J (1993) A single-pool model for intracellular calcium oscillations and waves in the *Xenopus laevis* oocyte. *Biophys J* 65(4):1727–1739
- [7] Bailey B (1992) Calcium transients in feline left ventricular myocytes with hypertrophy induced by slow progressive pressure overload. *J Mol Cell Cardiol* 24(4):365–373
- [8] Becker W (2012) Fluorescence lifetime imaging - techniques and applications. *Journal of Microscopy* 247(2):119–136
- [9] Becker W, Bergmann A, Hink MA, König K, Benndorf K, Biskup C (2004) Fluorescence lifetime imaging by time-correlated single-photon counting. *Microsc Res Tech* 63(1):58–66

-
- [10] Becker W, Bergmann A, Koenig K, Tirlapur U (2001) Picosecond fluorescence lifetime microscopy by TCSPC imaging. *Proc SPIE* 4262:414–419
- [11] Benitah JP, Vassort G (1999) Aldosterone upregulates Ca^{2+} current in adult rat cardiomyocytes. *Circ Res* 85(12):1139–1145
- [12] Berridge MJ, Lipp P, Bootman MD (2000) The versatility and universality of calcium signalling. *Nat Rev Mol Cell Biol* 1(1):11–21
- [13] Bers DM (2000) Calcium Fluxes Involved in Control of Cardiac Myocyte Contraction. *Circ Res* 87(4):275–281
- [14] Bers DM (2002) Cardiac excitation-contraction coupling. *Nature* 415(6868):198–205
- [15] Bers DM (2008) Calcium cycling and signaling in cardiac myocytes. *Annu Rev Physiol* 70:23–49
- [16] Best JM, Kamp TJ (2011) Different subcellular populations of L-type Ca^{2+} channels exhibit unique regulation and functional roles in cardiomyocytes. *J Mol Cell Cardiol* :1–12
- [17] Bito V, Heinzel FR, Biesmans L, Antoons G, Sipido KR (2007) Crosstalk between L-type Ca^{2+} channels and the sarcoplasmic reticulum: alterations during cardiac remodelling. *Cardiovasc Res* 77(2):315–324
- [18] Bogdanova A, Makhro A, Wang J, Lipp P, Kaestner L (2013) Calcium in red blood cells—a perilous balance. *Int J Mol Sci* 14(5):9848–9872
- [19] Bort G, Gallavardin T, Ogden D, Dalko PI (2013) From One-Photon to Two-Photon Probes: “Caged” Compounds, Actuators, and Photoswitches. *Angew Chem Int Ed* 52(17):4526–4537
- [20] Braet K, Mabilde C, Cabooter L, Rapp G, Leybaert L (2004) Electroporation loading and photoactivation of caged InsP_3 : tools to investigate the relation between cellular ATP release in response to intracellular InsP_3 elevation. *J Neurosci Methods* 132(1):81–89
- [21] Braz JC, Gregory K, Pathak A, Zhao W, Sahin B, Klevitsky R, Kimball TF, Lorenz JN, Nairn AC, Liggett SB (2004) PKC_α regulates cardiac contractility and propensity toward heart failure. *Nat Med* 10(3):248–254

- [22] Bridge JH, Smolley JR, Spitzer KW (1990) The relationship between charge movements associated with I_{Ca} and I_{Na-Ca} in cardiac myocytes. *Science* 248(4953):376–378
- [23] Briet M, Schiffrin EL (2010) Aldosterone: effects on the kidney and cardiovascular system. *Nat Cell Biol* 6(5):261–273
- [24] Bronstein IN, Semendjajew KA, Musiol G, Muehlig H (2008) Taschenbuch der Mathematik. Harri Deutsch Verlag
- [25] Brown EB, Shear JB, Adams SR, Tsien RY, Webb WW (1999) Photolysis of caged calcium in femtoliter volumes using two-photon excitation. *Biophys J* 76(1):489–499
- [26] Burgalossi A, Jung S, Man KnM, Nair R, Jockusch WJ, Wojcik SM, Brose N, Rhee JS (2012) Analysis of neurotransmitter release mechanisms by photolysis of caged Ca^{2+} in an autaptic neuron culture system. *Nat Protocols* 7(7):1351–1365
- [27] Chen X, Nakayama H, Zhang X, Ai X, Harris DM, Tang M, Zhang H, Szeto C, Stockbower K, Berretta RM, Eckhart AD, Koch WJ, Molkenstin JD, Houser SR (2011) Calcium influx through Cav1.2 is a proximal signal for pathological cardiomyocyte hypertrophy. *J Mol Cell Cardiol* 50(3):460–470
- [28] Day D, Cranfield CG, Gu M (2006) High-Speed Fluorescence Imaging and Intensity Profiling of Femtosecond-Induced Calcium Transients. *International Journal of Biomedical Imaging* 2006(2):1–6
- [29] Delaney KR, Zucker RS (1990) Calcium released by photolysis of DM-nitrophen stimulates transmitter release at squid giant synapse. *J Physiol* 426:473–498
- [30] DeWire SM, Violin JD (2011) Biased ligands for better cardiovascular drugs: dissecting G-protein-coupled receptor pharmacology. *Circ Res* 109(2):205–216
- [31] Dirac PAM (1927) The Quantum Theory of the Emission and Absorption of Radiation . In: *Proceedings of the Royal Society of London Series A*, London, 243–265
- [32] Donahue BS, Abercrombie RF (1987) Free Diffusion-Coefficient of Ionic Calcium in Cytoplasm. *Cell Calcium* 8(6):437–448

- [33] Dooley R, Harvey BJ, Thomas W (2012) Non-genomic actions of aldosterone: From receptors and signals to membrane targets. *Mol Cell Endocrinol* 350(2):223–234
- [34] Dorn G, Force T (2005) Protein kinase cascades in the regulation of cardiac hypertrophy. *J Clin Invest* 115(3):527–537
- [35] Dreuw AA, Polkehn MAM, Binder RR, Heckel AA, Knippenberg SS (2012) Computational design of improved two-photon active caging compounds based on nitrodibenzofuran. *J Comput Chem* 33(22):1797–1805
- [36] Dries E, Bito V, Lenaerts I, Antoons G, Sipido KR, Macquaide N (2013) Selective Modulation of Coupled Ryanodine Receptors During Microdomain Activation of CaMKII in the Dyadic Cleft. *Circ Res*
- [37] Egner A, Andresen V, Hell SW (2002) Comparison of the axial resolution of practical Nipkow disk confocal fluorescence microscopy with that of multifocal multiphoton microscopy: theory and experiment. *Journal of Microscopy* 206(1):24–32
- [38] Ellis-Davies GCR (2006) DM-nitrophen AM is caged magnesium. *Cell Calcium* 39(6):471–473
- [39] Ellis-Davies GCR (2007) Caged compounds: photorelease technology for control of cellular chemistry and physiology. *Nat Methods* 4(8):619–628
- [40] Erdahl WL, Chapman CJ, Taylor RW, Pfeiffer DR (1994) Ca^{2+} transport properties of ionophores A23187, ionomycin, and 4-BrA23187 in a well defined model system. *Biophys J* 66(5):1678–1693
- [41] Escobar AL, Velez P, Kim AM, Cifuentes F, Fill M, Vergara JL (1997) Kinetic properties of DM-nitrophen and calcium indicators: rapid transient response to flash photolysis. *Pflügers Archiv European Journal of Physiology* 434(5):615–631
- [42] Faas GC, Karacs K, Vergara JL, Mody I (2005) Kinetic Properties of DM-Nitrophen Binding to Calcium and Magnesium. *Biophys J* 88(6):4421–4433
- [43] Faas GC, Mody I (2012) Measuring the kinetics of calcium binding proteins with flash photolysis. *Biochim Biophys Acta* 1820(8):1195–1204

- [44] Fewer DT, Hewlett SJ, McCabe EM, Hegarty J (1997) Direct-view microscopy: experimental investigation of the dependence of the optical sectioning characteristics on pinhole-array configuration. *Journal of Microscopy* 187(1):54–61
- [45] Figueroa L, Shkryl VM, Zhou J, Manno C, Momotake A, Brum G, Blatter LA, Ellis-Davies GCR, Ríos E (2012) Synthetic localized calcium transients directly probe signalling mechanisms in skeletal muscle. *J Physiol* 590(Pt 6):1389–1411
- [46] Fino E, Roberto A, Peterka DS, Salierno M, Etchenique R, Yuste R (2009) RuBi-Glutamate: Two-Photon and Visible-Light Photoactivation of Neurons and Dendritic spines. *Front Neural Circuits* 3:2
- [47] Fuller W, Tulloch LB, Shattock MJ, Calaghan SC, Howie J, Wypijewski KJ (2012) Regulation of the cardiac sodium pump. *Cell Mol Life Sci* 70(8):1357–1380
- [48] Funder J (2006) Aldosterone and the Cardiovascular System: Genomic and Nongenomic Effects. *Endocrinology* 147(12):5564–5567
- [49] Furuta T, Wang SS, Dantzker JL, Dore TM, Bybee WJ, Callaway EM, Denk W, Tsien RY (1999) Brominated 7-hydroxycoumarin-4-ylmethyls: photolabile protecting groups with biologically useful cross-sections for two photon photolysis. *Proc Natl Acad Sci USA* 96(4):1193–1200
- [50] Garcia-Hoz C, Sanchez-Fernandez G, Garcia-Escudero R, Fernandez-Velasco M, Palacios-Garcia J, Ruiz-Meana M, Diaz-Meco MT, Leitges M, Moscat J, Garcia-Dorado D (2012) Protein Kinase C (PKC) $_{\zeta}$ -mediated G α_q Stimulation of ERK5 Protein Pathway in Cardiomyocytes and Cardiac Fibroblasts. *J Biol Chem* 287(10):7792–7802
- [51] Gee K, Brown KA, Chen WN, Bishop-Stewart J (2000) Chemical and physiological characterization of fluo-4 Ca $^{2+}$ -indicator dyes. *Cell Calcium*
- [52] Goppert-Mayer M (1931) Über Elementarakte mit zwei Quantensprüngen. *Ann Phys* 9:273–295
- [53] Griffiths EJ (2000) Calcium handling and cell contraction in rat cardiomyocytes depleted of intracellular magnesium. *Cardiovasc Res* 47(1):116–123

- [54] Grossmann C, Benesic A, Krug AW, Freudinger R, Mildenerger S, Gassner B, Gekle M (2005) Human mineralocorticoid receptor expression renders cells responsive for nongenotropic aldosterone actions. *Mol Endocrinol* 19(7):1697–1710
- [55] Grynkiewicz G, Poenie M, Tsien RY (1985) A new generation of Ca^{2+} indicators with greatly improved fluorescence properties. *J Biol Chem* 260(6):3440–3450
- [56] Gutierrez DA, Fernandez-Tenorio M, Ogrodnik J, Niggli E (2013) NO-dependent CaMKII activation during β -adrenergic stimulation of cardiac muscle. *Cardiovasc Res* 100(3):392–401
- [57] Gyorke S, Stevens SCW, Terentyev D (2009) Cardiac calsequestrin: quest inside the SR. *J Physiol* 587(13):3091–3094
- [58] Heinzl FR, Bito V, Biesmans L, Wu M, Detre E, von Wegner F, Claus P, Dymarkowski S, Maes F, Bogaert J, Rademakers F, D’hooge J, Sipido K (2008) Remodeling of T-tubules and reduced synchrony of Ca^{2+} release in myocytes from chronically ischemic myocardium. *Circ Res* 102(3):338–346
- [59] Helmchen F, Denk W (2005) Deep tissue two-photon microscopy. *Nat Methods* 2(12):932–940
- [60] Hinch R, Greenstein JL, Tanskanen AJ, Xu L, Winslow RL (2004) A Simplified Local Control Model of Calcium-Induced Calcium Release in Cardiac Ventricular Myocytes. *Biophys J* 87(6):3723–3736
- [61] Hirth IC, Britz FC, Deitmer JW (2007) G protein activation by uncaging of GTP- γ -S in the leech giant glial cell. *J Exp Biol* 210(21):3771–3779
- [62] Houser SR, Piacentino V III, Weisser J (2000) Abnormalities of calcium cycling in the hypertrophied and failing heart. *J Mol Cell Cardiol* 32(9):1595–1607
- [63] Huang S, Briet M, Heikal A, Schiffrin EL, Webb W (2013) Vascular actions of aldosterone. *J Vasc Res* 50(2):89–99
- [64] Hubbard KB, Hepler JR (2006) Cell signalling diversity of the Gq α family of heterotrimeric G proteins. *Cell Signal* 18(2):135–150
- [65] Hunter JJ, Chien KR (1999) Signaling pathways for cardiac hypertrophy and failure. *N Engl J Med* 341(17):1276–1283

- [66] Ivanova L (2006) Der nicht-genomische Effekt des Mineralokortikoids Aldosteron auf die Transportsysteme der Erythrozytenmembran. Ph.D. thesis, Universität des Saarlandes
- [67] Iwanaga S, Kaneko T, Fujita K, Smith N, Nakamura O, Takamatsu T, Kawata S (2006) Location-dependent photogeneration of calcium waves in HeLa cells. *Cell Biochem Biophys* 45(2):167–176
- [68] Jafri MS, Keizer J (1995) On the roles of Ca^{2+} diffusion, Ca^{2+} buffers, and the endoplasmic reticulum in IP_3 -induced Ca^{2+} waves. *Biophys J* 69(5):2139–2153
- [69] Ji G, Feldman M, Doran R, Zipfel W, Kotlikoff MI (2006) Ca^{2+} -induced Ca^{2+} release through localized Ca^{2+} uncaging in smooth muscle. *J Gen Physiol* 127(3):225–235
- [70] Kach J, Sethakorn N, Dulin NO (2012) A finer tuning of G-protein signaling through regulated control of RGS proteins. *Am J Physiol* 303(1):H19–H35
- [71] Kaplan JH, Ellis-Davies G (1988) Photolabile chelators for the rapid photorelease of divalent cations. *Proc Natl Acad Sci USA* 85(17):6571
- [72] Kehat I, Molkenin JD (2010) Molecular pathways underlying cardiac remodeling during pathophysiological stimulation. *Circulation* 122(25):2727–2735
- [73] Kiskin N, Chillingworth R, McCray JA, Piston D, Ogden D (2002) The efficiency of two-photon photolysis of a „caged“ fluorophore, o-1-(2-nitrophenyl) ethylpyranine, in relation to photodamage of synaptic terminals. *Euro Biophys J* 30:588–604
- [74] Kiskin N, Ogden D (2002) Two-photon excitation and photolysis by pulsed laser illumination modelled by spatially non-uniform reactions with simultaneous diffusion. *Euro Biophys J* 30(8):571–587
- [75] Koester HJ, Baur D, Uhl R, Hell SW (1999) Ca^{2+} fluorescence imaging with pico- and femtosecond two-photon excitation: Signal and photodamage. *Biophys J* 77(4):2226–2236
- [76] Koh X, Srinivasan B, Ching HS, Levchenko A (2006) A 3D Monte Carlo analysis of the role of dyadic space geometry in spark generation. *Biophys J* 90(6):1999–2014

- [77] König K, Becker TW, Fischer P, Riemann I, Halbhuber KJ (1999) Pulse-length dependence of cellular response to intense near-infrared laser pulses in multiphoton microscopes. *Opt Lett* 24(2):113–115
- [78] König K, So P, Mantulin WW (1996) Two-photon excited lifetime imaging of autofluorescence in cells during UV A and NIR photostress. *Journal of Microscopy* 183(3):197–204
- [79] Konishi M, Yamashita T, Nakayama S, Kokubun S (2001) Calcium waves in skinned cardiac myocytes evoked by two-photon excitation photolysis of caged calcium. *Jpn J Physiol* 51(1):127–132
- [80] Kurebayashi N, Harkins AB, Baylor SM (1993) Use of fura red as an intracellular calcium indicator in frog skeletal muscle fibers. *Biophys J* 64(6):1934–1960
- [81] Larbig R, Torres N, Bridge JHB, Goldhaber JJ, Philipson KD (2010) Activation of reverse Na^+ - Ca^{2+} exchange by the Na^+ current augments the cardiac Ca^{2+} transient: evidence from NCX knockout mice. *J Physiol* 588(Pt 17):3267–3276
- [82] Laurita KR, Rosenbaum DS (2008) Mechanisms and potential therapeutic targets for ventricular arrhythmias associated with impaired cardiac calcium cycling. *J Mol Cell Cardiol* 44(1):31–43
- [83] Leray A, Riquet FB, Richard E, Spriet C, Trinel D, Héliot L (2009) Optimized protocol of a frequency domain fluorescence lifetime imaging microscope for FRET measurements. *Microsc Res Tech* 72(5):371–379
- [84] Li L, Chu G, Kranias EG, Bers DM (1998) Cardiac myocyte calcium transport in phospholamban knockout mouse: relaxation and endogenous CaMKII effects. *Am J Physiol* 274(4 Pt 2):H1335–47
- [85] Lin HJ, Herman P, Lakowicz JR (2003) Fluorescence lifetime-resolved pH imaging of living cells. *Cytometry* 52A(2):77–89
- [86] Lipp P, Lüscher C, Niggli E (1996) Photolysis of caged compounds characterized by ratiometric confocal microscopy: a new approach to homogeneously control and measure the calcium concentration in cardiac myocytes. *Cell Calcium* 19(3):255–266
- [87] Lipp P, Niggli E (1998) Fundamental calcium release events revealed by two-photon excitation photolysis of caged calcium in guinea-pig cardiac myocytes. *J Physiol* 508(3):801–809

- [88] Liu CM, Hermann TE (1978) Characterization of Ionomycin as a Calcium Ionophore. *J Biol Chem* 253(17):5892–5894
- [89] Lorenz K, Schmitt JP, Schmitteckert EM, Lohse MJ (2009) A new type of ERK1/2 autophosphorylation causes cardiac hypertrophy. *Nat Med* 15(1):75–83
- [90] Louch W (2004) Reduced synchrony of Ca^{2+} release with loss of T-tubules—a comparison to Ca^{2+} release in human failing cardiomyocytes. *Cardiovasc Res* 62(1):63–73
- [91] Marvin JS, Borghuis BG, Tian L, Cichon J, Harnett MT, Akerboom J, Gordus A, Renninger SL, Chen TW, Bargmann CI (2013) An optimized fluorescent probe for visualizing glutamate neurotransmission. *Nat Methods* 10(2):162–170
- [92] Meschede D (2007) *Optics, Light and Lasers: The Practical Approach to Modern Aspects of ...* - Dieter Meschede - Google Books. Second edition, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co KGaA, Weinheim
- [93] Mihailidou AS, Bundgaard H, Mardini M, Hansen PS, Kjeldsen K, Rasmussen HH (2000) Hyperaldosteronemia in rabbits inhibits the cardiac sarcolemmal Na^+ - K^+ pump. *Circ Res* 86(1):37–42
- [94] Mihailidou AS, Funder JW (2005) Nongenomic effects of mineralocorticoid receptor activation in the cardiovascular system. *Steroids* 70(5-7):347–351
- [95] Mihailidou AS, Mardini M, Funder JW (2004) Rapid, nongenomic effects of aldosterone in the heart mediated by epsilon protein kinase C. *Endocrinology* 145(2):773–780
- [96] Momotake A, Lindegger N, Niggli E, Barsotti RJ, Ellis-Davies GC (2005) The nitrodibenzofuran chromophore: a new caging group for ultra-efficient photolysis in living cells. *Nat Methods* 3(1):35–40
- [97] Nakayama H, Bodi I, Maillet M, DeSantiago J, Domeier TL, Mikoshiba K, Lorenz JN, Blatter LA, Bers DM, Molkentin JD (2010) The IP_3 receptor regulates cardiac hypertrophy in response to select stimuli. *Circ Res* 107(5):659–666
- [98] Nattel S, Khairy P, Schram G (2001) Arrhythmogenic ionic remodeling: adaptive responses with maladaptive consequences. *Trends Cardiovasc Med* 11(7):295–301

- [99] Neco P, Rose B, Huynh N, Zhang R, Bridge JHB, Philipson KD, Goldhaber JI (2010) Sodium-Calcium Exchange Is Essential for Effective Triggering of Calcium Release in Mouse Heart. *Biophys J* 99(3):755–764
- [100] Neves SR (2002) G Protein Pathways. *Science* 296(5573):1636–1639
- [101] Noguchi J, Nagaoka A, Watanabe S, Ellis-Davies GCR, Kitamura K, Kano M, Matsuzaki M, Kasai H (2011) In vivo two-photon uncaging of glutamate revealing the structure-function relationships of dendritic spines in the neocortex of adult mice. *J Physiol* 589(10):2447–2457
- [102] O'Connor D, Phillips D (1984) Time-correlated single photon counting - Desmond O'Connor - Google Books. Academic Press, Orlando
- [103] Oehring H, Riemann I, Fischer P, Halbhuber KJ, König K (2000) Ultrastructure and reproduction behaviour of single CHO-K1 cells exposed to near infrared femtosecond laser pulses. *Scanning* 22(4):263–270
- [104] Offermanns S (2001) Der G_q/G_{11} -vermittelte zelluläre Signalweg und seine Bedeutung für kardiale Erkrankungen. *Z Kardiol* 90(9):601–606
- [105] Oheim M, Michael DJ, Geisbauer M, Madsen D, Chow RH (2006) Principles of two-photon excitation fluorescence microscopy and other nonlinear imaging approaches. *Adv Drug Deliv Rev* 58(7):788–808
- [106] Pahlavan S, Oberhofer M, Sauer B, Ruppenthal S, Tian Q, Scholz A, Kaestner L, Lipp P (2012) $G\alpha_q$ and $G\alpha_{11}$ contribute to the maintenance of cellular electrophysiology and Ca^{2+} handling in ventricular cardiomyocytes. *Cardiovasc Res* 95(1):48–58
- [107] Palma-Cerda F, Auger C, Crawford DJ, Hodgson ACC, Reynolds SJ, Cowell JK, Swift KAD, Cais O, Vyklicky L, Corrie JET, Ogden D (2012) New caged neurotransmitter analogs selective for glutamate receptor sub-types based on methoxynitroindoline and nitrophenylethoxycarbonyl caging groups. *Neuropharmacology* 63(4):624–634
- [108] Petricolas WL, Goldsborough J, Rieckhoff KE (1963) Double Photon Excitation in Organic Crystals. *Phys Rev Lett* 10(2):43–45
- [109] Petricolas WL, Rieckhoff KE (1963) Double Photon Excitation of Organic Molecules in Dilute Solution. *J Chem Phys* 39(5):1347–1348
- [110] Piston DW, Kremers GJ, Benninger RKP, Davidson MW (2009) Photoactivation in Fluorescence Microscopy. *Micros Today* 17(04):8

- [111] Pott C, Yip M, Goldhaber JI, Philipson KD (2007) Regulation of cardiac L-type Ca^{2+} current in Na^{+} - Ca^{2+} exchanger knockout mice: functional coupling of the Ca^{2+} channel and the Na^{+} - Ca^{2+} exchanger. *Biophys J* 92(4):1431–1437
- [112] Probes M (1999) Fluorescent Calcium Indicators. Publication by Supplier 1:1–4
- [113] Queisser G, Wittum G (2011) A method to investigate the diffusion properties of nuclear calcium. *Biol Cybern* 105(3-4):211–216
- [114] Roberto A, Andino-Pavlovsky V, Yuste R, Etchenique R (2013) Two-Photon Optical Interrogation of Individual Dendritic Spines with Caged Dopamine. *ACS Chem Neurosci*
- [115] Rocha R, Stier C (2001) Pathophysiological effects of aldosterone in cardiovascular tissues. *Trends Endocrin Met* 12(7):308–314
- [116] Rubart M (2004) Two-photon microscopy of cells and tissue. *Circ Res* 95(12):1154–1166
- [117] Ryder AG, Power S, Glynn TJ, Morrison JJ (2001) Time-domain measurement of fluorescence lifetime variation with pH. *Proc SPIE* 4259:102–109
- [118] Salazar NC, Chen J, Rockman HA (2007) Cardiac GPCRs: GPCR signaling in healthy and failing hearts. *Biochim Biophys Acta*
- [119] Sarkisov DV, Gelber SE, Walker JW, Wang SSH (2007) Synapse specificity of calcium release probed by chemical two-photon uncaging of inositol 1,4,5-trisphosphate. *J Biol Chem* 282(35):25517–25526
- [120] Sato M (2013) Roles of accessory proteins for heterotrimeric G-protein in the development of cardiovascular diseases. *Circ. J.* 77(10):2455–2461
- [121] Saytashev I, Arkhipov SN, Winkler N, Zuraski K, Lozovoy VV, Dantus M (2012) Pulse duration and energy dependence of photodamage and lethality induced by femtosecond near infrared laser pulses in *D. melanogaster*. *J Photochem Photobiol B*
- [122] Schendel T, Thul R, Sneyd J, Falcke M (2012) How does the ryanodine receptor in the ventricular myocyte wake up: by a single or by multiple open L-type Ca^{2+} channels? *Euro Biophys J* 41(1):27–39

- [123] Schlaich MP, Schobel HP, Hilgers K, Schmieder RE (2000) Impact of aldosterone on left ventricular structure and function in young normotensive and mildly hypertensive subjects. *Am J Cardiol* 85(10):1199–1206
- [124] Scott R (2006) Main Determinants of Presynaptic Ca^{2+} Dynamics at Individual Mossy Fiber-CA3 Pyramidal Cell Synapses. *J Neurosci* 26(26):7071–7081
- [125] Shannon TR (2002) Quantitative Assessment of the SR Ca^{2+} Leak-Load Relationship. *Circ Res* 91(7):594–600
- [126] Shannon TR, Bers DM (2004) Integrated Ca^{2+} Management in Cardiac Myocytes. *Ann N Y Acad Sci* 1015(1):28–38
- [127] Shimada T, Watanabe W, Matsunaga S, Higashi T, Ishii H, Fukui K, Isobe K, Itoh K (2005) Intracellular disruption of mitochondria in a living HeLa cell with a 76-MHz femtosecond laser oscillator. *Opt Express* 13(24):9869
- [128] Shkryl VM, Maxwell JT, Domeier TL, Blatter LA (2012) Refractoriness of sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} release determines Ca^{2+} alternans in atrial myocytes. *Am J Physiol* 302(11):H2310–H2320
- [129] Siri FM, Krueger J, Nordin C, Ming Z, Aronson RS (1991) Depressed intracellular calcium transients and contraction in myocytes from hypertrophied and failing guinea pig hearts. *Am J Physiol* 261(2 Pt 2):H514–H530
- [130] Sjöback R, Nygren J, Kubista M (1995) Absorption and fluorescence properties of fluorescein. *Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc* 51(6):L7–L21
- [131] Smith NI, Kumamoto Y, Iwanaga S, Ando J, Fujita K, Kawata S (2008) A femtosecond laser pacemaker for heart muscle cells. *Opt Express* 16(12):8604–8616
- [132] Soeller C, Cannell MB (2002) Estimation of the Sarcoplasmic Reticulum Ca. *Biophys J* 82(5):2396–2414
- [133] Soeller C, Jacobs MD, Jones KT, Ellis-Davies GCR, Donaldson PJ, Cannell MB (2003) Application of two-photon flash photolysis to reveal intercellular communication and intracellular Ca^{2+} movements. *J Biomed Opt* 8(3):418–427

- [134] Sontia B, Montezano ACI, Paravicini T, Tabet F, Touyz RM (2008) Downregulation of renal TRPM7 and increased inflammation and fibrosis in aldosterone-infused mice: effects of magnesium. *Hypertension* 51(4):915–921
- [135] Sun Y, Day RN, Periasamy A (2011) Investigating protein-protein interactions in living cells using fluorescence lifetime imaging microscopy. *Nat Protocols* 6(9):1324–1340
- [136] Swift F, Tovsrud N, Sjaastad I, Sejersted OM, Niggli E, Egger M (2010) Functional coupling of alpha(2)-isoform Na⁺/K⁺-ATPase and Ca²⁺ extrusion through the Na⁺/Ca²⁺-exchanger in cardiomyocytes. *Cell Calcium* 48(1):54–60
- [137] Szabelski M, Luchowski R, Gryczynski Z, Kapusta P, Ortmann U, Gryczynski I (2009) Evaluation of instrument response functions for lifetime imaging detectors using quenched Rose Bengal solutions. *Chemical Physics Letters* 471(1-3):153–159
- [138] Takano T, Nedergaard M (2007) DM-nitrophen provides physiologically significant increases of intracellular [Ca²⁺] in the presence of Mg²⁺. *Cell Calcium* 41(5):503–504
- [139] Theer P, Hasan M, Denk W (2003) Two-photon imaging to a depth of 1000 μm in living brains by use of a Ti:Al₂O₃ regenerative amplifier. *Opt Lett* 28(12):1022–1024
- [140] Thomas D, Tovey SC, Collins T, Bootman MD, Berridge MJ, Lipp P (2000) In situ properties of fluorescent Ca²⁺ indicators: a comparison. *J Physiol* 527:82P–83P
- [141] Thomas D, Tovey SC, Collins TJ, Bootman MD, Berridge MJ, Lipp P (2000) A comparison of fluorescent Ca²⁺ indicator properties and their use in measuring elementary and global Ca²⁺ signals. *Cell Calcium* 28(4):213–223
- [142] Tian Q (2012) Cardiac Calcium-Induced Calcium Release Failure Recordings, Analysis and its Prevention. Ph.D. thesis, Universität des Saarlandes, Homburg/Saar
- [143] Tian Q, Pahlavan S, Oleinikow K, Jung J, Ruppenthal S, Scholz A, Schumann C, Kraegeloh A, Oberhofer M, Lipp P, Kaestner L (2012) Functional and morphological preservation of adult ventricular myocytes in culture by sub-micromolar cytochalasin D supplement. *J Mol Cell Cardiol* 52(1):113–124

- [144] Tilley DG (2011) G protein-dependent and G protein-independent signaling pathways and their impact on cardiac function. *Circ Res* 109(2):217–230
- [145] Tirlapur UK, König K, Peuckert C, Krieg R, Halbhuber KJ (2001) Femtosecond near-infrared laser pulses elicit generation of reactive oxygen species in mammalian cells leading to apoptosis-like death. *Exp Cell Res* 263(1):88–97
- [146] Trigo FF, Corrie JE, Ogden D (2009) Laser photolysis of caged compounds at 405nm: Photochemical advantages, localisation, phototoxicity and methods for calibration. *J Neurosci Methods* 180(1):9–21
- [147] van Munster EB, Gadella TWJ (2005) Fluorescence lifetime imaging microscopy (FLIM). *Adv Biochem Eng Biotechnol* 95:143–175
- [148] Viatchenko-Karpinski S (2005) Synergistic interactions between Ca^{2+} entries through L-type Ca^{2+} channels and Na^+ - Ca^{2+} exchanger in normal and failing rat heart. *J Physiol* 567(2):493–504
- [149] Walker JW, Somlyo AV, Goldman YE, Somlyo AP, Trentham DR (1987) Kinetics of smooth and skeletal muscle activation by laser pulse photolysis of caged inositol 1,4,5-trisphosphate. *Nature* 327(6119):249–252
- [150] Watanabe W, Arakawa N, Matsunaga S, Higashi T (2004) Femtosecond laser disruption of subcellular organelles in a living cell. *Opt Express*
- [151] Wehling M (1997) Specific, nongenomic actions of steroid hormones. *Annu Rev Physiol* 59:365–393
- [152] Weiss JN, Nivala M, Garfinkel A, Qu Z (2011) Alternans and Arrhythmias From Cell to Heart. *Circ Res* 108(1):98–112
- [153] Weisskopf V, Wigner E (1930) Über die natürliche Linienbreite in der Strahlung des harmonischen Oszillators. *Z Physik* 65(1-2):18–29
- [154] Wendler A, Albrecht C, Wehling M (2012) Nongenomic actions of aldosterone and progesterone revisited. *Steroids* 77(10):1002–1006
- [155] Wilms CD, Schmidt H, Eilers J (2006) Quantitative two-photon Ca^{2+} imaging via fluorescence lifetime analysis. *Cell Calcium* 40(1):73–79

-
- [156] Xu C, Webb WW (1996) Measurement of two-photon excitation cross sections of molecular fluorophores with data from 690 to 1050 nm. *JOSA B* 13(3):481–491
- [157] Zhang Z, Sonek GJ, Wei X, Berns MW, Tromberg BJ (1997) Continuous wave diode laser induced two-photon fluorescence excitation of three calcium indicators. *Jpn J Appl Phys* 36(12A):L1598–L1600
- [158] Zima AV, Bovo E, Bers DM, Blatter LA (2010) Ca^{2+} spark-dependent and -independent sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} leak in normal and failing rabbit ventricular myocytes. *J Physiol* 588(23):4743–4757

Veröffentlichungen

Beteiligt an:

Pahlavan, S., Oberhofer, M., **Sauer, B.**, Ruppenthal, S., Tian, Q., Scholz, A., et al. (2012). $G\alpha_q$ and $G\alpha_{11}$ contribute to the maintenance of cellular electrophysiology and Ca^{2+} handling in ventricular cardiomyocytes. Cardiovascular Research, 95(1), 48-58. doi:10.1093/cvr/cvs162

Protokolle:

Benjamin Sauer, Martin Oberhofer, Peter Lipp, and Lars Kaestner (2014). Two-Photon Photolysis Combined with a Kilobeam Array Scanner to Probe Calcium Signaling in Cardiomyocytes. Cold Spring Harb Protoc doi:10.1101/pdb.prot077008 Calcium Techniques: A Laboratory Manual Kapitel 6

Benjamin Sauer, Qinghai Tian, Peter Lipp, and Lars Kaestner (2014) Confocal FLIM of Genetically Encoded FRET Sensors for Quantitative Ca^{2+} Imaging. Cold Spring Harb Protoc doi:10.1101/pdb.prot077040 Calcium Techniques: A Laboratory Manual Kapitel 6

Poster:

Benjamin Sauer, Peter Lipp, Lars Kaestner (2011). 2-photon based calcium imaging in rat ventricular myocytes using Indo-1. European Conferences on Biomedical Optics, 8086-47

B. Sauer, M. Oberhofer, M. Bonny, P. Lipp, L. Kaestner (2012). Frequency modulated two-photon uncaging. 91st annual Meeting Deutsche Physiologische Gesellschaft, P162