

# INAUGURAL-DISSERTATION

zur Erlangung der Doktorwürde  
der Naturwissenschaftlich-Mathematischen  
Gesamtfakultät der Ruprecht-Karls-Universität  
Heidelberg

vorgelegt von  
Dipl.-Phys. Sebastian Schürmann  
aus Iserlohn

Tag der mündlichen Prüfung:  
30. Juni 2010



# Second Harmonic Generation Mikroskopie in biomedizinischen Anwendungen

Gutachter:

**Prof. Dr. Rainer H.A. Fink**  
Institut für Physiologie und Pathophysiologie

**Prof. Dr. Dr. Christoph Cremer**  
Kirchhoff Institut für Physik



---

## ZUSAMMENFASSUNG

### **Second Harmonic Generation Mikroskopie in biomedizinischen Anwendungen**

Frequenzverdopplung (SHG) von Licht kann durch verschiedene wichtige Proteinstrukturen in biologischen Proben selbst hervorgerufen werden. Zu diesen zählen vor allem das extrazelluläre Matrixprotein Collagen und das Motorprotein Myosin in der quergestreiften Muskulatur. Mit Hilfe von Kurzpulslasern und Laser-Scanning Mikroskopie können die SHG Signale dazu genutzt werden, um diese Proteinstrukturen ohne den Zusatz externer Marker hochauflösend darzustellen.

Das Hauptziel dieser Arbeit ist eine biomolekulare und physikalische Charakterisierung des SHG Signals von Muskelpräparaten und eine Diskussion von Anwendungsmöglichkeiten an der Haut im Kontext von Hautkrebs und Sklerodermie. Am Muskel wurde speziell die Orientierungsabhängigkeit des SHG Signals von der Polarisation des Lasers untersucht. Komplementär dazu wurden theoretische Modelle zur quantitativen Beschreibung und zum Verständnis der beobachteten Effekte entwickelt. Erstmals wurde hier auch ein Modell der Verteilung des elektrischen Feldes im Objektivfokus in die Berechnungen mit einbezogen. Das zentrale Ergebnis dieser Experimente ist, dass die SHG Polarisationsabhängigkeit im Muskel in den physiologischen Zuständen *Relaxed* und *Rigor* unterschiedlich ist. Auf diese Weise lässt sich also der funktionale molekulare Zustand der Myosinmoleküle aus der SHG Signalcharakteristik ablesen.

An der Haut konnte durch SHG und Autofluoreszenz Signale die Struktur der obersten Hautschichten *in vivo* mit hoher Auflösung dreidimensional abgebildet werden. Die SHG Mikroskopie verspricht eine besondere Eignung als nicht-invasives Werkzeug zum Studium von Hauterkrankungen.

---

## ABSTRACT

### **Second Harmonic Generation Microscopy in Biomedical Applications**

Several biologically relevant protein structures are known as sources for second harmonic generation (SHG) signals. Among these are collagen, an extracellular matrix protein, and the motor protein myosin in striated muscle. In combination with short-pulse lasers and laser-scanning microscopy, SHG signals can provide high-resolution imaging of these structures without the need for extrinsic labels.

The main objective of this study is to characterize the physical and biomolecular properties of SHG from mammalian skeletal muscle and further to discuss applications of SHG microscopy to the skin in the context of skin cancer and scleroderma. In muscle, a special focus lay on the SHG orientation dependency on the axis of laser polarization. Complementary to the experimental work, several theoretical models were developed for a precise quantitative description and a deeper understanding of the observed effects. For the first time, the entire electric field distribution in the focus of the objective was considered here for the modeling of the polarization dependency. The central result of the conducted experiments is that the SHG polarization dependency is different for the two physiological states *relaxed* and *rigor* in muscle, which means that the functional molecular state of the myosin molecules is expressed in the SHG signal characteristics.

In murine skin, SHG and autofluorescence signals showed the three-dimensional structure of the upper skin layers *in vivo* with high resolution. SHG microscopy proposes excellent suitability as a non-invasive tool for studying cutaneous conditions.

---



# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung</b>	<b>11</b>
<b>2</b>	<b>Grundlagen</b>	<b>15</b>
2.1	Mikroskopie . . . . .	15
2.1.1	Feldverteilung im Fokus . . . . .	17
2.1.2	Auflösungsvermögen . . . . .	19
2.1.3	Laser-Scanning Mikroskopie . . . . .	22
2.2	Second Harmonic Generation . . . . .	24
2.2.1	Symmetrie Eigenschaften . . . . .	25
2.2.2	SHG Mikroskopie . . . . .	27
2.3	Coherent Anti-Stokes Raman Scattering . . . . .	28
2.4	Skelettmuskel . . . . .	30
2.4.1	Struktur . . . . .	30
2.4.2	Aktin und Myosin . . . . .	32
2.4.3	Helices und Filamente . . . . .	35
2.4.4	Der Querbrückenzyklus . . . . .	40
2.4.5	Myosin Inhibitoren . . . . .	42
2.5	Haut . . . . .	44
2.5.1	Aufbau der Haut . . . . .	44
2.5.2	Hautkrebserkrankungen . . . . .	45
2.5.3	Sklerodermie . . . . .	47

<b>3</b>	<b>Experimente</b>	<b>49</b>
3.1	Modellierung . . . . .	49
3.1.1	SHG in rotationssymmetrischen Strukturen . . . . .	49
3.1.2	Annahme von Kleinman-Symmetrie? . . . . .	53
3.1.3	Einfaches E-Feld Modell . . . . .	53
3.1.4	Erweitertes E-Feld Modell . . . . .	56
3.1.5	Dipole auf einer $\alpha$ -Helix . . . . .	60
3.1.6	Abknickmodell . . . . .	62
3.2	Präparation . . . . .	64
3.2.1	Myofibrillen . . . . .	64
3.2.2	Zellkultur B16 Melanom . . . . .	65
3.2.3	Tumorwachstum . . . . .	66
3.2.4	Kryoschnitte intracutaner Tumore . . . . .	66
3.2.5	Hautschnitte Sklerodermie . . . . .	67
3.3	SHG Mikroskopie am Muskel . . . . .	67
3.3.1	Mikroskopie System . . . . .	67
3.3.2	Polarisationsabhängige Messungen . . . . .	68
3.3.3	Einstellungen am Mikroskop . . . . .	69
3.4	SHG Mikroskopie an der Haut . . . . .	70
3.4.1	Hautschnitte . . . . .	70
3.4.2	<i>In vivo</i> Mikroskopie . . . . .	71
3.5	CARS Mikroskopie . . . . .	71
3.6	Bildverarbeitung . . . . .	72
3.6.1	SHG Polarisationsabhängigkeit . . . . .	72
3.6.2	Sklerodermie . . . . .	74
<b>4</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>75</b>
4.1	SHG Mikroskopie am Skelettmuskel . . . . .	75
4.1.1	Polarisationsabhängigkeit des SHG Signals . . . . .	77
4.1.2	Unterschiede im Relaxed- und Rigor-Zustand . . . . .	80



---

4.1.3	Weak-binding Zustand . . . . .	83
4.1.4	Kleinman-Symmetrie . . . . .	83
4.1.5	Ergebnisse mit erweitertem E-Feld Modell . . . . .	84
4.2	Modelle zur SHG Polarisationsabhängigkeit . . . . .	86
4.2.1	Berücksichtigung der Feldverteilung im Fokus . . . . .	86
4.2.2	SHG aus helicalen Strukturen . . . . .	90
4.2.3	Auslenkungen von der Filamentachse . . . . .	91
4.3	SHG Mikroskopie an Hautproben . . . . .	94
4.3.1	Schnitte von Hauttumoren . . . . .	94
4.3.2	Native Hautproben . . . . .	97
4.3.3	<i>In vivo</i> SHG Mikroskopie . . . . .	99
4.3.4	Sklerodermie . . . . .	103
4.4	CARS Mikroskopie . . . . .	107
<b>5</b>	<b>Diskussion</b>	<b>111</b>
5.1	SHG Emission von Myofibrillen . . . . .	111
5.2	SHG Mikroskopie an der Haut . . . . .	116
5.3	Ausblick . . . . .	119
	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>121</b>



# Kapitel 1

## Einleitung

Die Mikroskopie ist eines der wichtigsten Instrumente für die biologische und medizinische Forschung - von den ersten Beschreibungen zellulärer Strukturen im 17. Jahrhundert bis zu den heutigen umfangreichen Erkenntnissen über die komplexen zellulären Abläufe und Zusammenhänge. Neben der kontinuierlichen Weiterentwicklung der Mikroskopietechnik spielte dabei auch die Vielzahl von verfügbaren spezifischen Farbstoffen und Antikörpern eine wichtige Rolle, durch die eine exakte Lokalisation von Proteinen innerhalb zellulärer Strukturen möglich ist oder auch die Überwachung funktioneller Eigenschaften, wie der intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$  Ionen Konzentration.

Innerhalb der letzten zehn Jahre wurden neben der Fluoreszenzmikroskopie aber auch verstärkt Verfahren entwickelt, biologische Strukturen *ohne* den Zusatz externer Marker abzubilden. Zu diesen Techniken gehört die SHG Mikroskopie, die auf dem nichtlinearen optischen Effekt der Frequenzverdopplung (englisch *second harmonic generation* - SHG) basiert. Bestimmte Proteinstrukturen wie Collagen- und Myosinfilamente werden hier dadurch sichtbar, dass sie bei Anregung durch einen Laser der Frequenz  $\omega$  Schwingungen der doppelten Frequenz  $2\omega$  erzeugen – ähnlich zu akustischen Obertönen. Bei Anregung mit infrarotem Licht, z. B. der Wellenlänge 880 nm, entsteht also direkt an diesen Proteinstrukturen blaues Licht, in diesem Fall der Wellenlänge 440 nm, das dann im Mikroskop detektiert werden kann.

Die SHG Mikroskopie ist aus mehreren Gründen ein hochinteressantes Gebiet für die Forschung. Dies betrifft bereits die Tatsache, dass dieser nichtlineare Effekt, der polare und hochgeordnete Strukturen erfordert wie sie sonst eigentlich nur in Kristallen zu finden sind, überhaupt an biologischen Strukturen zu beobachten ist. Hier ist zu klären, welche molekularen Strukturen genau die Quelle der SHG Signale in Filamenten aus Collagen oder Myosin bilden. Hinzu kommen interessante Beobachtungen wie die Abhängigkeit der SHG Signalintensität von der Laserpolarisation,

welche eng mit den spezifischen Eigenschaften der SHG erzeugenden Strukturen verknüpft ist.

Im Rahmen dieser Arbeit wird gezeigt, dass die genannte Polarisationsabhängigkeit am Skelettmuskel für verschiedene physiologische Zustände unterschiedlich ausfällt, sich also Informationen über den funktionellen Zustand der Myosinmoleküle direkt in der SHG Signalcharakteristik wiederfinden lassen.

Neben den Aspekten die zum tieferen Verständnis von SHG an Proteinstrukturen beitragen, gibt es auch noch eine Reihe hochinteressanter Anwendungsgebiete für die SHG Mikroskopie. Dies sind z. B. die Quantifizierung von pathologischen Veränderungen in der Morphologie des Skelettmuskels oder die in dieser Arbeit vorgestellten Ansätze zur Mikroskopie der Haut. Da keine Anfärbung mit Farbstoffen nötig ist, birgt die SHG Mikroskopie hier ein besonderes Potential für *in vivo* Anwendungen.

Ein weiterer nichtlinearer optischer Effekt, der für nicht-invasive Laser-Scanning Mikroskopie genutzt werden kann, ist die kohärente Anti-Stokes Ramanstreuung (CARS). Der Kontrast entsteht bei diesem Verfahren durch die Anregung spezifischer Molekülvibrationen in der Probe und liefert möglicherweise komplementäre Informationen zu SHG. Auch für die CARS Mikroskopie sollen mögliche Anwendungsbereiche an der Haut und am Muskel untersucht werden.

Das Ziel dieser Arbeit ist es, mit experimentellen Messungen und Modellen einen Beitrag zur Charakterisierung von SHG am Muskel zu leisten und einen Anstoß für mögliche Anwendungen von SHG und CARS Mikroskopie an der Haut zu geben.

In Kapitel 2 werden zunächst einige für die Arbeit wesentliche Grundlagen angesprochen. Im ersten Abschnitt ist dies die allgemeine Funktionsweise eines Lichtmikroskops. Wichtig für die später gezeigten Berechnungen ist hier besonders, wie das elektrische Feld im Fokus eines Objektivs beschrieben werden kann. In Abschnitt 2.2 wird der Effekt der optischen Frequenzverdopplung (SHG) näher erklärt, sowie einige seiner charakteristischen Eigenschaften, insbesondere in Bezug auf Symmetrien. Das Prinzip der kohärenten Anti-Stokes Ramanstreuung (CARS) wird in Abschnitt 2.3 erläutert.

In den darauf folgenden Abschnitten 2.4 und 2.5 werden die verwendeten biologischen Präparate vorgestellt, der Skelettmuskel und die Haut. Die Beschreibung des Skelettmuskels ist ausführlicher gestaltet, da einige der Details für die Diskussion der Messergebnisse von großer Relevanz sind.

In Kapitel 3 werden die entwickelten theoretischen Modelle, sowie experimentelle Methoden und Messaufbauten dargestellt. Im Bereich der Modellierung wird für rotationssymmetrische Strukturen zunächst die Ableitung einer Fitfunktion zur Beschreibung der Polarisationsabhängigkeit der SHG Intensität gezeigt. Eine wichtige

Erweiterung der bestehenden Konzepte stellt hier die in Abschnitt 3.1.3 entwickelte Methode zur Berücksichtigung der elektrischen Feldverteilung im Objektivfokus dar. Darüberhinaus werden zwei Modelle entworfen, um eine mögliche Quelle des SHG Signals am Muskel zu untersuchen (3.1.5) und den Einfluss verschiedener physiologischer Zustände auf die Polarisationsabhängigkeit zu verstehen (3.1.6).

In Abschnitt 3.2 wird die Handhabung der biologischen Proben erläutert: zunächst die Herstellung von Myofibrillen, dann die Kultur von Krebszellen, das Tumorstadium in Mäusen und das Anfertigen von Hautschnitten. Die weiteren Abschnitte in Kapitel 3 behandeln die verwendeten Mikroskopaufbauten, sowie Details zur Durchführung und Auswertung der Experimente.

In Kapitel 4 werden die Ergebnisse der Experimente vorgestellt. Hier zeigt sich, dass die charakteristische Polarisationsabhängigkeit der SHG Intensität von Myofibrillen in den beiden physiologischen Zuständen *Relaxed* und *Rigor* unterschiedlich ausgeprägt ist. Dieses wichtige Ergebnis wird mit Hilfe der entwickelten Modelle quantifiziert und analysiert.

An Hautschnitten wird eine Möglichkeit beschrieben, mit Hilfe der SHG Mikroskopie die Grenzen intracutan gewachsener Tumore zu finden. Diese wird an ganzen Hautproben und schließlich *in vivo* an Mäusen erprobt. Für das Krankheitsbild der Sklerodermie werden an Hautschnitten exemplarisch einige charakteristische Veränderungen der Collagenmatrix gezeigt und Möglichkeiten diskutiert, diese durch Methoden der Bildverarbeitung zu quantifizieren.

Kapitel 5 beinhaltet eine abschließende Diskussion und Bewertung der gefundenen Resultate und gibt einen Ausblick auf mögliche weiterführende Projekte.



# Kapitel 2

## Grundlagen

In diesem Kapitel werden zunächst einige Grundlagen zur Mikroskopie, sowie zum Effekt der Frequenzverdopplung und der kohärenten Anti-Stokes Ramanstreuung angesprochen. Dann folgt eine kurze Übersicht über die Struktur der biologischen Präparate, des Skelettmuskels und der Haut.

### 2.1 Mikroskopie

Die ersten Lichtmikroskope wurden bereits im 17. Jahrhundert erfunden. Eine der ersten Publikationen mikroskopischer Forschung ist die *Micrographia* von Robert Hooke aus dem Jahr 1665, in der unter anderem die Entdeckung der Pflanzenzellen beschrieben wird.

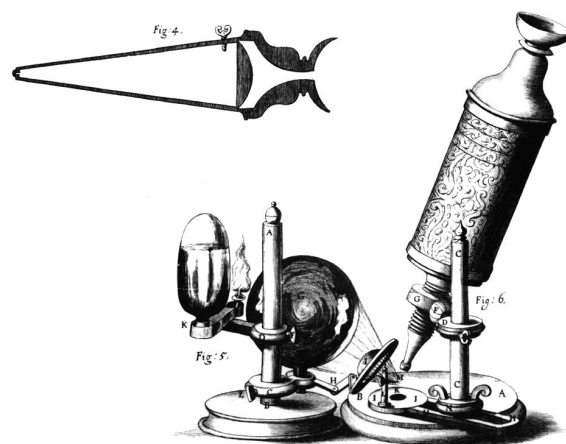
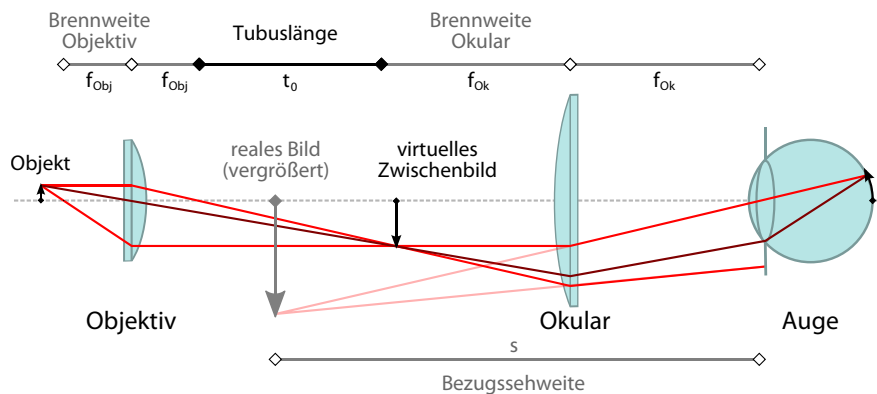


Abbildung 2.1 Mikroskop von Robert Hooke. Zeichnung aus der *Micrographia* (1665).



**Abbildung 2.2 Prinzip der Vergrößerung im Lichtmikroskop.** Das Objektiv bildet das Objekt auf ein vergrößertes virtuelles Zwischenbild ab, das man mit erneuter Vergrößerung durch das Okular betrachten kann. In der Bezugssehweite des Auge entsteht ein vergrößertes reelles Bild. *Erstellt nach [BERGMANN, 1993].*

Das Prinzip der vergrößerten Abbildung durch ein Mikroskop ist seitdem unverändert. Es ist in Abbildung 2.2 skizziert. Mindestens zwei Linsen oder Linsensysteme sind notwendig, das *Objektiv* und das *Okular*.

Das Objektiv bildet ein Objekt, das kurz hinter dem Brennpunkt der Linse liegt, auf ein vergrößertes reelles Zwischenbild ab. Dieses kann dann durch das Okular wie durch eine Lupe mit erneuter Vergrößerung betrachtet werden. Die Gesamtvergrößerung  $\nu$  ergibt sich vereinfacht aus dem Produkt von Objektiv- und Okularvergrößerung und ist antiproportional zu deren Brennweiten  $f_{\text{obj}}$  und  $f_{\text{ok}}$ :

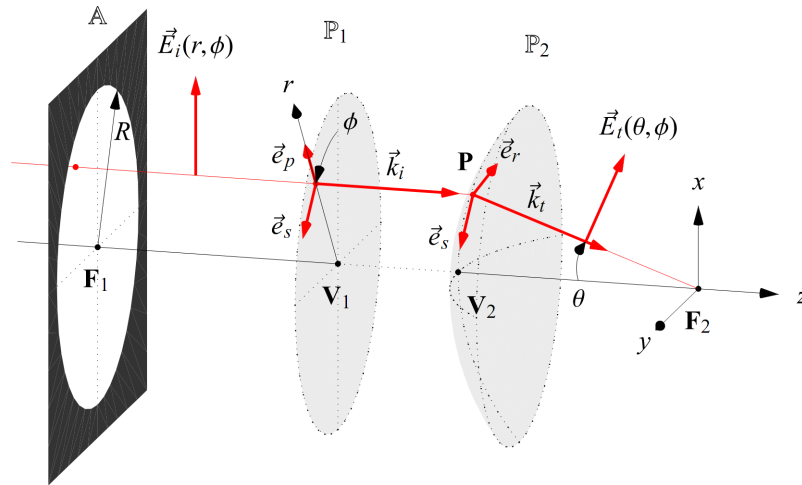
$$\nu = \frac{t_0}{f_{\text{obj}}} \cdot \frac{s}{f_{\text{ok}}} \quad (2.1)$$

Die Größe  $t_0$  ist der Abstand zwischen den Brennpunkten von Objektiv und Okular und wird als *optische Tubuslänge* bezeichnet. Die Größe  $s$  heißt *Bezugssehweite* des Auges und steht für die Entfernung, bei deren Unterschreiten Objekte vom Auge nicht mehr scharf abgebildet werden. Als Normwert wurden 25 cm festgelegt [BERGMANN, 1993].

Hohe Vergrößerungen lassen sich nach Gleichung 2.1 durch Kombination von Linsen kleiner Brennweite in einer Anordnung mit großer Tubuslänge erreichen. Es treten jedoch einige Probleme auf, die die nutzbare Vergrößerung begrenzen.

Beispielsweise verursachen einzelne Linsen verschiedene Konvergenz- und Farbfehler durch veränderte Brechung des Lichts in den Randbereichen oder unterschiedliche Brechung von Licht verschiedener Wellenlängen. Dadurch werden Objekte verzerrt abgebildet. Diese Fehler waren früher der maßgebliche Faktor für das Auflösungsvermögen eines Mikroskops, können heute aber durch moderne Objektive mit





**Abbildung 2.3 Strahlengang im Fokus.** Das Objektiv wird beschrieben durch die Aperturebene  $\mathbb{A}$  mit Radius  $R$  und die zwei Hauptebenen  $\mathbb{P}_1$  und  $\mathbb{P}_2$  mit den Foki  $F_1$  und  $F_2$ . Aus den p- und s-Komponenten der einfallenden Welle  $\mathbf{E}_i(r, \phi)$  wird die transmittierte Welle  $\mathbf{E}_t(\theta, \phi)$  in Polarkoordinaten errechnet. [LEUTENEGGER et al., 2006]

komplexen Linsensystemen zum größten Teil korrigiert werden. Dennoch gibt es eine Grenze sinnvoller Vergrößerung, da der Wellencharakter des Lichts mit den daraus folgenden Beugungseffekten die Auflösung kleiner Strukturen begrenzt. Die Abbildung eines Punktes durch eine Optik wird durch die im folgenden erläuterte Punktabbildungsfunktion (*point spread funktion*) beschrieben.

### 2.1.1 Feldverteilung im Fokus

Das Objektiv eines Mikroskops bündelt Lichtstrahlen im Fokuspunkt (Brennweite  $f$ ). Das elektrische Feld  $\mathbf{E}(x, y, z)$  an jedem Punkt in der Umgebung des Fokus lässt sich aus dem einfallenden Feld  $\mathbf{E}_i(r, \phi)$  berechnen.

$$\mathbf{E}(x, y, z) = -\frac{ik}{2\pi} \iint \mathbf{E}_i(\mathbf{r}) e^{i\mathbf{k}\mathbf{r}} d\Omega$$

Für den einfachen Fall einer in  $x$ -Richtung polarisierten, ebenen Welle liefern die Gleichungen von Richards und Wolf eine Lösung [RICHARDS und WOLF, 1959]:

$$\begin{aligned} E_x &= -i(I_0 + I_2 \cos 2\phi) \\ E_y &= -iI_2 \sin 2\phi \\ E_z &= -2I_1 \cos \phi \end{aligned}$$

wobei die Integrale  $I_0$ ,  $I_1$  und  $I_2$  mit wie folgt definiert sind:

$$\begin{aligned}
 I_0 &= \int_0^\alpha \sqrt{\cos \theta} \sin \theta (1 + \cos \theta) J_0(kr \sin \theta) e^{ikz \cos \theta} d\theta \\
 I_1 &= \int_0^\alpha \sqrt{\cos \theta} \sin^2 \theta J_1(kr \sin \theta) e^{ikz \cos \theta} d\theta \\
 I_2 &= \int_0^\alpha \sqrt{\cos \theta} \sin \theta (1 - \cos \theta) J_2(kr \sin \theta) e^{ikz \cos \theta} d\theta
 \end{aligned}$$

Hier ist  $\alpha$  der halbe Öffnungswinkel der Apertur,  $r = \sqrt{x^2 + y^2}$  und  $J_n$  sind die einfachen Bessel-Funktionen  $n$ -ter Ordnung. Lässt sich das eingestrahlte E-Feld nicht durch eine ebene Welle vereinfachen, enthalten die Integrale zusätzlich die Feldverteilung  $B(r, \phi)$  in der Aperturebene, die für einen Laser mit Gauß'schem Strahlprofil und Breite  $W$  beispielsweise durch  $B(\theta, \phi) = \exp(-f^2 \tan^2 \theta / W^2)$  gegeben ist [ASATRYAN et al., 2004].

Eine Anpassung zur schnelleren Berechnung der Feldverteilung im Fokus wurde von Leutenegger et al. präsentiert, indem sie die Integration über den Raumwinkel  $d\Omega = \sin \theta d\theta d\phi$  durch eine entsprechende Integration über  $dx dy$  in der Aperturebene ersetzen [LEUTENEGGER et al., 2006].

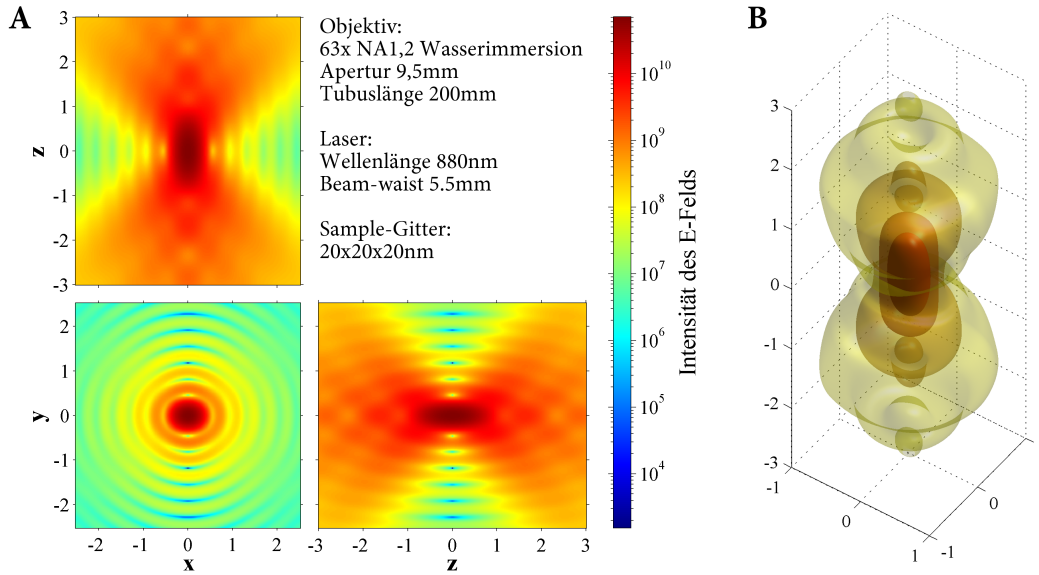
$$\mathbf{E}(x, y, z) = -\frac{if}{\lambda k_t^2} \iint (\mathbf{E}_t(\theta, \phi) e^{ik_z z / \cos \theta}) e^{-i(k_x x + k_y y)} dk_x dk_y$$

Wenn man  $\mathbf{E}_t$  mit  $E = 0$  für  $r > R$  so einschränkt, dass die Integrationsgrenzen ins Unendliche ausgedehnt werden können, lässt sich das Integral als Fouriertransformation schreiben:

$$\mathbf{E}(x, y, z) = -\frac{if}{\lambda k_t^2} \mathcal{F}_{x,y}(\mathbf{E}_t(\theta, \phi) e^{ik_z z / \cos \theta})$$

Mit Hilfe der schnellen Fouriertransformations (FFT) können Feldverteilungen im Fokus in kurzer Zeit berechnet werden. Die Autoren stellen eine Implementierung der Berechnungen in MATLAB (The Mathworks Inc., Natick, MA, USA) auf ihrer Homepage zur Verfügung.

Ein Ergebnis solcher Berechnungen ist in Abbildung 2.4 zu sehen. (A) zeigt die Lichtintensität in den Schnittebenen durch den Fokuspunkt, (B) eine dreidimensionale Projektion mit Flächen gleicher Intensität. In (A) wurde eine logarithmische Farbdarstellung gewählt, in der auch die Intensitätsverteilung in den Randbereichen noch gut zu erkennen ist. Dabei ist zu beachten, dass bereits die Intensität in den



**Abbildung 2.4** Feldverteilung im Fokus. (A) Logarithmische Darstellung der Lichtintensität in der  $xz$ -,  $xy$ - und  $zy$ -Ebene in  $W/cm^2$  berechnet für 1 mW Laser-Leistung. (B) Dreidimensionale Projektion. Eigene Berechnung nach [LEUTENEGGER et al., 2008].

gelb-orangen Bereichen nur noch 1% der Maximalintensität im Zentrum beträgt. In einer linearen Darstellung (vgl. Abbildung 4.9 im Ergebnisteil) erscheint die Feldverteilung entsprechend etwas anders, da dann vor allem das zentrale Ellipsoid zu sehen ist. Unabhängig von der Darstellung ist auffällig, dass die Ausdehnung des Fokus in  $z$ -Richtung deutlich größer ist als in  $x$  oder  $y$ -Richtung.

### 2.1.2 Auflösungsvermögen

Wenn man die Abmessungen des Fokus nur eindimensional entlang der Koordinatenachsen bestimmen möchte, wird die Berechnung deutlich einfacher. Die Verteilung in der  $xy$ -Ebene ist in Abbildung 2.4 A gut erkennbar. Man sieht hier einen zentralen hellen Lichtfleck, der von mehreren konzentrischen Ringen umgeben ist. Das Phänomen ist letztlich auf die Beugung des Lichts an der Öffnung des Objektivs zurückzuführen. Allgemein hängt die Intensitätsverteilung im Beugungsbild mit der Form der Blende über eine Fouriertransformation zusammen. Für eine kreisförmige Öffnung vom Radius  $R$  lässt sich die radiale Verteilung der Intensität durch die Besselfunktionen 1. Ordnung  $J_1(r)$  beschreiben [BERGMANN, 1993]:

$$I(r) \propto \frac{J_1^2(\eta r)}{(\eta r)^2} \quad \text{mit} \quad \eta = \frac{2\pi n R}{\lambda f} \quad (2.2)$$

Diese Gleichung wird auch als laterale Punktabbildungsfunktion oder *point spread function* (PSF) bezeichnet. Der Radius  $r_1$  des inneren Beugungsscheibchens wird durch die erste Nullstelle der Besselfunktion festgelegt:

$$r_1 = 0,61 \frac{\lambda f}{nR} \quad (2.3)$$

Das Verhältnis  $nR/f$  ist die *numerische Apertur* des Objektivs. Sie bestimmt den Öffnungswinkel  $2\sigma$  des Strahlenbündels im Fokus.

$$\text{NA} = n \sin \sigma \quad (2.4)$$

Die theoretische Maximalgröße von NA ist also 1 in Luft und gleich dem Brechungsindex  $n$  des Immersionsmediums für Immersionsobjektive. Typische technisch erreichte Werte sind 0,9 für Trockenobjektive, 1,2 für Wasser- und 1,4 für Ölimmersion. Mit der numerischen Apertur ausgedrückt, nimmt Gleichung 2.3 folgende Form an:

$$r_1 = 0,61 \frac{\lambda}{\text{NA}} \quad (2.5)$$

Diese Gleichung definiert auch die *Auflösungsgrenze* eines Objektivs, da sich zwei Punkte nur dann sicher getrennt wahrnehmen lassen, wenn die Maxima der Beugungsscheiben den Abstand  $r_1$  haben (*Rayleigh Kriterium*). Ein Maximum fällt bei diesem Abstand mit dem ersten Minimum der anderen Beugungsfigur zusammen. Im Einzelfall können anhand der Helligkeitsverteilung eventuell auch bei geringerem Abstand schon zwei getrennte Punkte erkannt werden, so dass die angegebene Definition nur als Richtwert zu verstehen ist. Für ein Objektiv mit numerischer Apertur von 1,2 liegt die Auflösungsgrenze nach Gleichung 2.2 beispielsweise bei  $r_1 = 250$  nm für eine Wellenlänge  $\lambda = 500$  nm.

Analog zur lateralen PSF (Gleichung 2.2) kann man auch in axialer Richtung eine Punktabbildungsfunktion berechnen.

$$I_z \propto \left( \frac{\sin(\zeta z)}{\zeta z} \right)^2 \quad \text{mit} \quad \zeta = \frac{\pi n R^2}{\lambda f^2} \quad (2.6)$$

Mit der numerischen Apertur ausgedrückt liegt die erste Nullstelle der axialen Verteilung bei:

$$z_1 = \frac{2n\lambda}{(\text{NA})^2} \quad (2.7)$$

Das Auflösungsvermögen ist in axialer Richtung also deutlich geringer als in der lateralen Ebene. Für das Beispiel eines Objektivs der numerischen Apertur 1,2 und eine Wellenlänge von  $\lambda = 500$  nm ergibt sich eine axiale Auflösungsgrenze von  $z_1 = 920$  nm.

### Höchstaflösende Mikroskopie

Die Auflösungsgrenze klassischer Lichtmikroskopie ist nach den oben durchgeführten Berechnungen lateral bei ca. 200 nm und axial bei ca. 700 nm erreicht. Mittlerweile wurden aber Verfahren entwickelt, die diese Auflösungsgrenze überwinden können. Dazu zählt beispielsweise die 4Pi-Mikroskopie, bei der mit Hilfe von zwei Objektiven kohärent beleuchtet und detektiert wird, um den größtmöglichen Teil des Raumwinkels von  $4\pi$  zu nutzen [HELL und STELZER, 1992]. Die axiale Auflösung verbessert sich dadurch auf bis zu 100 nm.

Ein Verfahren, das auch die laterale Auflösung verbessern kann, ist die STED-Mikroskopie (Stimulated Emission Depletion) [HELL und WICHMANN, 1994]. Hier werden die Fluoreszenzsignale in den Randbereichen des Fokus durch stimulierte Emission mittels eines ringförmigen Laserprofils unterdrückt. Die Größe des verbleibenden Spots und damit die erreichbare Auflösung liegt etwa bei 20 nm [HELL, 2007].

Einen etwas anderen Ansatz verfolgen Verfahren der Lokalisationsmikroskopie wie SPDM (Spektrale Präzisions-Distanz Mikroskopie), die einzelne Moleküle auch innerhalb des klassischen Fokusvolumens auflösen können, wenn diese sich in ihrer spektralen Signatur unterscheiden, etwa über ihre Farbe oder ein unterschiedliches Leucht- oder Blinkverhalten bei Photobleaching [LEMMER et al., 2008]. In Kombination mit räumlich modulierter Illumination (SMI), also einer Art stehender Welle im Beleuchtungsfeld, durch die die Probe bewegt werden kann, lassen sich effektive Auflösungen unter 20 nm erreichen.

### Abschätzung der Zahl von Myosinmolekülen im Fokusvolumen

Die in dieser Arbeit durchgeführten Experimente unterliegen den Limitationen der klassischen Lichtmikroskopie. Nimmt man jeweils die ersten Nullstellen der PSF als Begrenzung, ergibt sich als kleinstes Anregungsvolumen ein Ellipsoid mit Durchmesser  $2r_1$  in der lateralen Ebene und Höhe  $2z_1$  in axialer Richtung. Für das oben genannte Zahlenbeispiel sind dies also 500 nm und 1840 nm.

Auf eine Anwendung am Skelettmuskel übertragen bedeutet diese Größenordnung, dass einige Einzelheiten des Sarkomers wie die Lage der A- und I-Banden (siehe Abschnitt 2.4.1) noch aufgelöst werden können, andere Details wie die Struktur der dicken und dünnen Filamente im Lichtmikroskop aber verborgen bleiben werden. Bei einem Abstand von 40 nm zwischen den dicken Filamenten liegen für eine Myofibrille mit Durchmesser  $1\ \mu\text{m}$  Teile von etwa 200 dicken Filamenten im Anregungsvolumen, über deren Beiträge folglich gemittelt werden muss.

Die Zahl der Einzelmoleküle in diesem Volumen ist entsprechend noch größer. Zur Abschätzung kann man vereinfachend die Zahl der Myosinmoleküle in einem

Würfel gleichen Volumens ausrechnen. Bei 620 nm Kantenlänge liegen etwa 250 dicke Filamente in diesem Würfel. In jedem Filament befinden sich auf einer Länge von 43 nm zehnmal zwei Myosinköpfe, also etwa 140 Myosindimere innerhalb von 620 nm. Insgesamt ergibt sich damit eine Zahl von ca. 35.000 Myosinmolekülen in diesem Volumen.

Bei Anregung mit langwelligerem Licht verbreitert sich der Radius des Fokuspunkts gemäß Gleichung 2.5, so dass das Fokalvolumen bei 900 nm Wellenlänge etwa 6-mal so groß ist wie bei 500 nm Wellenlänge und sich die Zahl der Moleküle in diesem Volumen entsprechend erhöht.

Als Begrenzung des Fokalvolumens kann man statt der Nullstellen auch engere Grenzen setzen, wie z. B. die Breite bei der Intensität  $1/e^2$  oder die volle Halbwertsbreite (*FWHM*), wenn man annimmt, dass für die Anregung eines Effekts eine bestimmte Energie nötig ist. Als Abschätzung der Größenordnung sind die oben gezeigten Schritte sicher ausreichend.

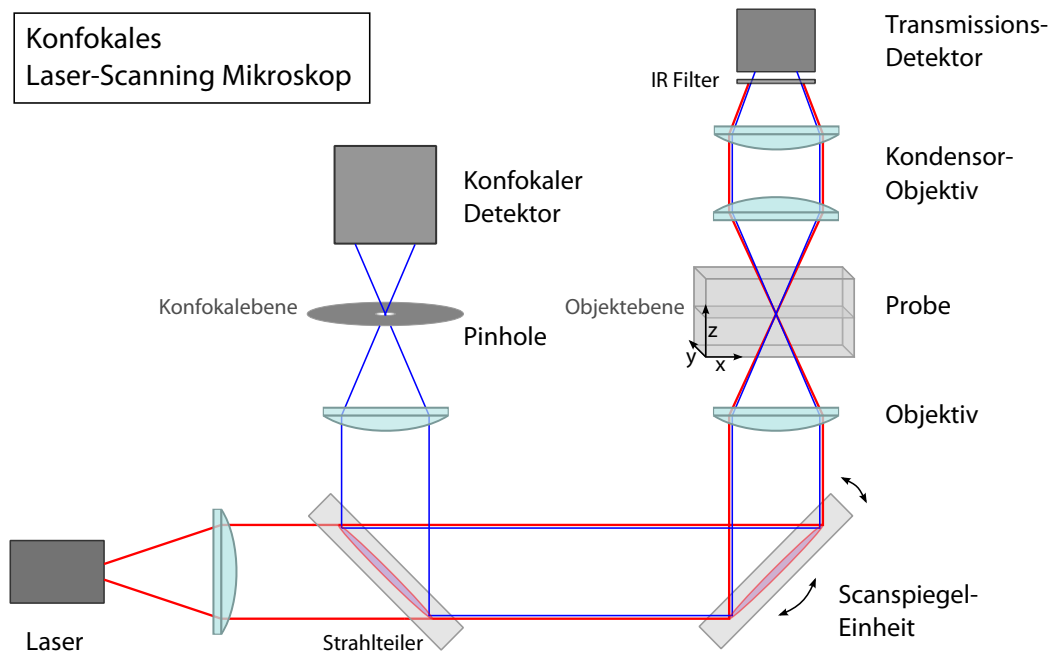
### 2.1.3 Laser-Scanning Mikroskopie

Bei einem klassischen Lichtmikroskop nimmt man mit dem Auge den gesamten Bildausschnitt, den das Objektiv bietet, gleichzeitig wahr. Im Unterschied dazu wird die Probe bei der Laser-Scanning Mikroskopie punktweise abgerastert und anschließend digital zu einem Bild zusammengesetzt. Dazu ist eine Einheit von einem oder mehreren verkippbaren Scanspiegeln nötig, die den Laserstrahl durch das Objektiv auf die Punkte in der Objektebene ( $xy$ ) lenkt, die den Bildausschnitt bilden sollen. Scannen in der Tiefe ( $z$ ) erfordert eine Bewegung des Objektivs oder der Probe.

Der Strahlengang eines Laser-Scanning Mikroskops ist schematisch in Abbildung 2.5 dargestellt. Die Farbdarstellung wurde hier so gewählt, dass sie die Anwendung der SHG Mikroskopie mit einer Laseranregung im nahen Infrarotbereich und SHG Signalen im blauen Bereich des Spektrums treffend illustriert. Für ein Fluoreszenzmikroskop wären typische Farben z. B. eine Laseranregung im blauen Bereich und Fluoreszenz im grünen Bereich.

In beiden Fällen entsteht in der Probe Licht einer anderen Wellenlänge als der des anregenden Laserstrahls. Dieses Licht kann in Rückwärtsrichtung durch das Objektiv oder in Transmissionsrichtung durch ein zusätzliches Kondensor-Objektiv gesammelt werden und muss dann vom Anregungslicht getrennt werden. Dies geschieht mit Hilfe wellenlängenabhängiger Filter oder Strahlteiler. Detektiert wird das Licht durch Photomultiplier (PMT) oder Photodioden, die einfallendes Licht in Elektronen bzw. einen elektrischen Strom umwandeln und verstärken.

Bei einem konfokalen Laser-Scanning Mikroskop ist vor dem Detektor eine zusätzliche Lochblende (Pinhole) angebracht, die Licht aus anderen als der fokussierten



**Abbildung 2.5 Konfokales Laser-Scanning Mikroskop.** Der Laserstrahl wird über die Scanspiegel auf das Objektiv gelenkt und dort auf die Objektebene fokussiert. In der Probe entstehende Fluoreszenz oder SHG Signale können im Transmissionsmodus hinter dem Kondensor-Objektiv detektiert werden, oder zurückgestreut durch das Objektiv im Epimodus. Das Pinhole in der konfokalen Ebene blendet Licht aus, das nicht aus der Fokusebene stammt.

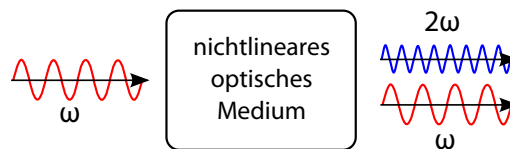
Ebene abschirmt. Dies steigert die Schärfe der Abbildung, da das Licht unscharfer Objekte zu einem Großteil in der Konfokalebene blockiert wird.

In der Multiphotonen-Mikroskopie kann man auf das Pinhole auch verzichten. Dies hängt damit zusammen, dass die Intensität nichtlineare Effekte 2. Ordnung wie Zweiphotonen Fluoreszenzanregung oder SHG quadratisch von der Feldstärke des elektrischen Feldes abhängt. Außerhalb des Fokus findet also praktisch keine Anregung statt, so dass aus diesen Ebenen auch keine störenden Signale blockiert werden müssen.

Das Pinhole kann bei dieser Anwendung auch einen störenden Einfluss haben, wenn es Licht blockiert, das zwar im Fokus entstanden ist, auf seinem Weg zum Detektor aber durch Streuung im Gewebe abgelenkt wurde. Wenn man möglichst viel dieses gestreuten Lichts einsammeln möchte, bietet es sich an, das Licht direkt unterhalb des Objektivs noch vor der Scanning-Einheit auf einen weiteren Detektor auszukoppeln (*non-descanned* Detektor, im Schema nicht eingezeichnet).

## 2.2 Second Harmonic Generation

Frequenzverdopplung (engl. second harmonic generation, kurz SHG) ist ein nicht-linearer optischer Effekt, der durch die Wechselwirkung von elektromagnetischen Wellen mit besonderen nichtlinearen Medien entsteht. Ähnlich wie bei Obertönen in der Akustik, entstehen hier zusätzlich zu den anregenden Wellen der Grundfrequenz  $\omega$  auch Wellen der doppelten Frequenz  $2\omega$ . Aus Licht der Wellenlänge 880 nm im nahen Infrarotbereich kann so blaues Licht der Wellenlänge 440 nm entstehen.



**Abbildung 2.6** Schema zur optischen Frequenzverdopplung (*second harmonic generation*)

Wie alle elektromagnetischen Prozesse lässt sich SHG grundsätzlich über die Maxwell-Gleichungen für die elektrischen und magnetischen Felder  $\mathbf{E}$  und  $\mathbf{B}$  beschreiben [SHEN, 1984]. Zur Anwendung der Maxwell-Gleichungen in Materie muss berücksichtigt werden, dass zwei Sorten von Ladungen im Festkörper vorhanden sein können. Die eine Sorte besteht aus Ladungsträgern, die im Kristallgitter annähernd frei beweglich sind. Der andere Teil setzt sich aus gebundenen Ladungen zusammen, wie Elektronen und Atomkernen in Atomen und Molekülen, die nach außen elektrisch neutral sind. Solche gebundenen Ladungen können durch Einwirkung eines äußeren elektrischen Feldes aus ihrer Ruhelage ausgelenkt werden und bilden so elektrische Dipole. In gleicher Weise können auch magnetische Dipole und Multipole höherer Ordnung auftreten, die für biologische Materie aber meist vernachlässigt werden können.

Aus der Summe der elektrischen Dipolmomente einer Ladungsverteilung ergibt sich die Polarisation  $\mathbf{P}$  der gesamten Probe. Durch die Polarisation lässt sich die Reaktion eines Mediums auf ein elektrisches Feld vollständig beschreiben [SHEN, 1984].

Im einfachsten Fall besteht ein linearer Zusammenhang zwischen  $\mathbf{P}$  und dem anregenden Feld  $\mathbf{E}$

$$\mathbf{P} = \chi \mathbf{E}$$

Die Größe  $\chi$  wird *elektrische Suszeptibilität* genannt und ist in diesem Fall eine Materialkonstante.

Im Allgemeinen, insbesondere wenn höhere Feldstärken ins Spiel kommen, ist  $\chi$  aber eine nichtlineare Funktion des elektrischen Feldes  $\mathbf{E}$ . Die Darstellung vereinfacht sich etwas, wenn man  $\mathbf{P}$  nach Potenzen von  $\mathbf{E}$  entwickelt. Für die Komponenten



$P_i$  der Polarisations  $\mathbf{P}$  ergibt sich dann

$$P_i = P_i^{(0)} + \sum_j \chi_{ij}^{(1)} E_j + \sum_{jk} \chi_{ijk}^{(2)} E_j E_k + \dots \quad (2.8)$$

wobei  $\chi^{(n)}$  die Suszeptibilität n-ter Ordnung bezeichnet. Die „nullte Ordnung“  $P^{(0)}$  bezeichnet ein statisches Dipolmoment, das bei einigen Materialien auftreten kann. Im linearen Term ist die Suszeptibilität  $\chi^{(1)}$  ein Tensor 2. Stufe, der die Komponenten des Polarisationsvektors  $\mathbf{P}$  mit den Komponenten des Feldvektors  $\mathbf{E}$  verknüpft. Der Term zweiter Ordnung, durch den sich auch die Frequenzverdopplung beschreiben lässt, hängt quadratisch vom elektrischen Feld ab.

$$P_i^{(2)} = \sum_{jk} \chi_{ijk}^{(2)} E_j E_k \quad (2.9)$$

Die Suszeptibilität 2. Ordnung (oder *Hyperpolarisierbarkeit*) ist in diesem Fall ein Tensor 3. Stufe mit 27 Komponenten. Durch Symmetrie-Überlegungen lässt sich die Anzahl der voneinander unabhängigen Tensorelemente allerdings deutlich reduzieren.

### 2.2.1 Symmetrie Eigenschaften

#### Ausschluss von Inversionssymmetrie

Eine interessante Eigenschaft der Frequenzverdopplung ist direkt aus Gleichung 2.9 ersichtlich: Sie tritt nur bei Strukturen *ohne* Inversionssymmetrie auf. Unter Inversion aller Koordinaten

$$\begin{aligned} P(\mathbf{r})_i^{(2)} &= \sum_{jk} \chi_{ijk}^{(2)} E_j(\mathbf{r}) E_k(\mathbf{r}) \\ \xrightarrow{\mathbf{r} \rightarrow -\mathbf{r}} -P(\mathbf{r})_i^{(2)} &= \sum_{jk} \chi_{ijk}^{(2)} [-E_j(\mathbf{r})] [-E_k(\mathbf{r})] \end{aligned} \quad (2.10)$$

bleibt Gleichung 2.10 nur gültig, wenn die Komponenten  $\chi_{ijk}^{(2)} \equiv 0$  sind. Deshalb kann an inversionssymmetrischen Strukturen kein SHG Signal erzeugt werden.

Dieser Punkt ist sehr wichtig bei der Diskussion der Quelle der SHG Signale in biologischen Präparaten. Hier kommen also nur Strukturen in Frage, die gerichtet sind, aber keine Inversionssymmetrie haben. Interessanterweise besitzen quer-gestreifte Muskeln Spiegelebenen an den M-Linien und Z-Scheiben (siehe Abschnitt 2.4), dennoch lassen sich SHG Signale beobachten. Den Grund dafür findet man hier in der Größe des Fokusvolumens. Das elektrische Feld der eingestrahlten Lichtwelle

regt immer nur einen kleinen Bereich gleichzeitig an, in dem lokal keine Inversions-Symmetrie vorliegt. Eine Ausnahme ist der Bereich um die M-Linie, in dem die Myosinmoleküle antiparallel orientiert sind und in dem tatsächlich auch eine Verminderung der SHG Signalstärke zu beobachten ist.

### Vertauschbarkeit der Feldkomponenten

Die einfachste grundlegende Symmetrie des  $\chi^{(2)}$ -Tensors ergibt sich aus der kausalen Vertauschbarkeit der E-Feld Komponenten  $E_j$  und  $E_k$  in Gleichung 2.9. Für die Tensorkomponenten muss also gelten:

$$\chi_{ijk} = \chi_{ikj} \quad (2.11)$$

Die Zahl der unabhängigen  $\chi^{(2)}$ -Tensorkomponenten reduziert sich damit unabhängig von der Probe generell von 27 auf 18.

### Kleinman-Symmetrie

Die Bedingungen für Kleinman-Symmetrie [KLEINMAN, 1962] sind gegeben, wenn die Frequenzverdopplung verlustfrei stattfindet, also bei diesem Vorgang keine Energie absorbiert wird. In diesem Fall ist der  $\chi^{(2)}$  Tensor symmetrisch und die Indices können frei permutiert werden.

$$\chi_{ijk} = \chi_{kij} = \chi_{jki} = \chi_{ikj} = \chi_{jik} = \chi_{kji} \quad (2.12)$$

Dies lässt sich zeigen, indem man die elektrische Arbeit betrachtet, die innerhalb einer Periode des Lichts am Medium geleistet wird [BERGMANN, 1993]. Wenn keine Verluste auftreten, muss gelten:

$$\oint \mathbf{P} d\mathbf{E} = 0$$

Das Integral verschwindet, wenn die Rotation des Vektors  $\mathbf{P}$  bezüglich  $\mathbf{E}$  gleich null ist. Damit muss für alle Komponenten gelten:

$$\frac{\partial \mathbf{P}_i}{\partial \mathbf{E}_j} = \frac{\partial \mathbf{P}_j}{\partial \mathbf{E}_i}$$

Dies ist nur dann für alle Frequenzen der Fall, wenn  $\chi_{ijk} = \chi_{jik}$  ist. Zusammen mit der grundlegenden Symmetrie 2.11 ergibt sich daraus die Auswirkung der Kleinman-Symmetrie in Gleichung 2.12.

### Kristall-Symmetrien

Sehr wichtig für die Beschaffenheit des  $\chi^{(2)}$  Tensors sind die räumlichen Symmetrien in der Probe, bei SHG Erzeugung in Kristallen also die Kristallsymmetrie. Die Symmetriegruppe bestimmt die unabhängigen Komponenten des Suszeptibilitätstensors [CYVIN et al., 1965]. Für SHG an biologischen Präparaten ist vor allem die Zylindersymmetrie relevant. Die Berechnungen für die konkrete Anwendung werden in Abschnitt 3.1.1 durchgeführt.

### 2.2.2 SHG Mikroskopie

Die Möglichkeit nichtlinearer optischer Effekte wurde bereits 1931 in Diskussion gebracht [GOEPPERT-MAYER, 1931], der experimentelle Nachweis erfolgte allerdings erst deutlich später. Da zur Beobachtung aller nichtlinearen Effekte sehr hohe Feldstärken notwendig sind, konnte erst nach Entwicklung des Lasers erstmals ein SHG Signal an Quarz-Kristallen erzeugt werden [FRANKEN, 1961].

Laser-Scanning Mikroskopie mit SHG Kontrast wurde erstmal 1978 an Lithiumniobat und KD\*P Kristallen realisiert [GANNAWAY und SHEPPARD, 1978]. Zur gleichen Zeit wurde SHG auch an biologischem Gewebe entdeckt. Roth und Freund fanden durch Streuung eines Laserstrahls an Rattenschwanz-Sehnen eine Frequenzverdopplung an geordneten Collagen Strukturen [ROTH und FREUND, 1978]. In der Folge wurde SHG an Collagen auch mit Hilfe der SHG Mikroskopie untersucht [FREUND et al., 1986], u. a. in Bezug auf die Abhängigkeit der SHG Intensität von der Orientierung der Collagen-Strukturen. Grundlegende Untersuchungen dazu wurden z. B. durchgeführt in [STOLLER et al., 2002, WILLIAMS et al., 2005].

Vielfältige Anwendungen von SHG Mikroskopie an Collagen gibt es mittlerweile an Hautpräparaten, wie z. B. gezeigt in [KONIG und RIEMANN, 2003, YASUI et al., 2004], an Herzklappen [SCHENKE-LAYLAND et al., 2005] oder an der Cornea des Auges [HAN et al., 2004]. Die Haut und das Auge eignen sich dabei besonders für *in vivo* Mikroskopie.

Neben Collagenstrukturen wurde auch am Skelettmuskel ein starkes intrinsisches SHG Signal gefunden [CAMPAGNOLA et al., 2002, BOTH et al., 2004]. Als dessen Quelle konnten inzwischen die Myosinfilamente ermittelt werden [PLOTNIKOV et al., 2006, SCHÜRSMANN et al., 2007]. Mit den Fortschritten in der Entwicklung mikroendoskopischer Stablinsen konnte kürzlich auch erstmals eine Anwendung von *in vivo* SHG Mikroskopie am Muskel in der Unterarmmuskulatur eines Menschen gezeigt werden [LLEWELLYN et al., 2008].

Die dritte wichtige Sorte von SHG erzeugenden Proteinstrukturen sind Mikrotubuli [CAMPAGNOLA und LOEW, 2003], die als Bestandteil des Zytoskeletts vielfach

im Körper vorkommen. Eine Anwendung wurde z. B. in neuronalem Gewebe gezeigt [DOMBECK et al., 2003]. Neben den SHG erzeugenden Proteinstrukturen ist für Mikroskopieanwendungen noch die Klasse der SHG Farbstoffe von Bedeutung [MOREAUX et al., 2000], insbesondere die der potentialabhängigen Farbstoffe (*voltage sensing dyes*).

### 2.3 Coherent Anti-Stokes Raman Scattering

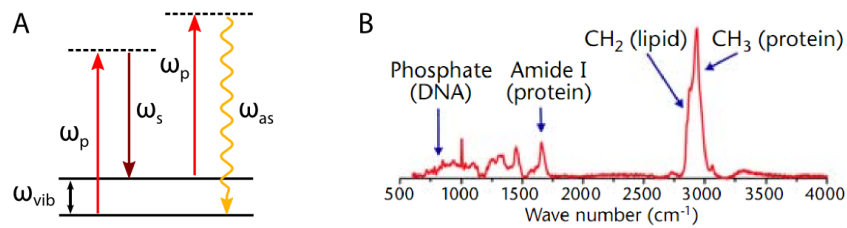
Ein weiterer nichtlinearer optischer Effekt, der für die Laser-Scanning Mikroskopie genutzt werden kann, ist die kohärente Anti-Stokes Raman Streuung (CARS) [ZUMBUSCH et al., 1999, VOLKMER et al., 2001]. Der Kontrast für die Bildgebung entsteht bei diesem Verfahren durch Anregung charakterischer Molekülvibrationen. Die Ramanfrequenz  $\omega_{vib}$  solcher Vibrationen liegt im fernen Infrarotbereich und lässt sich in der Mikroskopie nicht direkt anregen. Stattdessen findet die Anregung über einen 3 Photonen Prozess statt (Abbildung 2.7 A).

Dazu werden zwei Laserquellen gebraucht: ein Pumplaser der Frequenz  $\omega_p$  und der sogenannte *Stokes-Laser* der Frequenz  $\omega_s$ . Durch die Differenz  $\omega_p - \omega_s$  beider Frequenzen wird die Molekülvibration  $\omega_{vib}$  angeregt. Nach Absorption eines zweiten Photons des Pumplasers kann ein Photon der Frequenz  $2\omega_p - \omega_s$  emittiert werden (blauverschobenes *Anti-Stokes* Photon), das bei der Mikroskopie detektiert werden kann [POTMA und XIE, 2004].

Welche Molekülvibrationen angeregt werden, hängt also von der Differenz der beiden Laserfrequenzen ab. Durch Variation der Laserfrequenz kann das Raman Spektrum einer Probe aufgezeichnet werden (Abbildung 2.7 B). In der CARS-Mikroskopie werden die Laser auf feste Frequenzen abgestimmt, die zu Molekülen passen, die in der Probe in großer Zahl vorhanden sind. In Zellen treten beispielsweise viele C-H Verbindungen in Lipiden und Proteinen auf. Auch Amid-Bindungen haben eine charakteristische Vibrationsfrequenz. In lipidreichen Geweben ist die Signalintensität sogar hoch genug für *in-vivo* Imaging [EVANS et al., 2005].

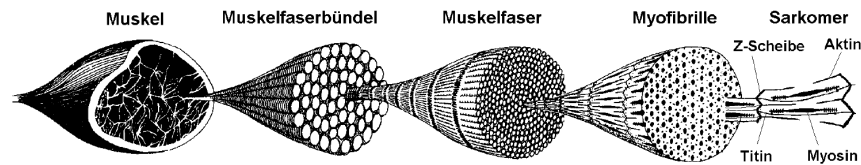
Ein generelles Problem bei CARS ist, dass auch nicht-resonante Anregungen stattfinden, die als Hintergrund das eigentliche Signal überstrahlen. Da auch die Vibrationsfrequenz der Wassermoleküle durch die Laser angeregt wird, kann in allen biologischen Proben ein starker Hintergrund auftreten.

Weitere experimentelle Schwierigkeiten bestehen darin, dass Pumplaser und Stokes-Laser gleichzeitig in der Probe auftreffen müssen, um eine Anregung der Vibrationen zu erreichen. Beide Laser müssen also gut synchronisiert und korrekt ausgerichtet sein. Die unterschiedliche Dispersion für verschiedenen Wellenlängen im optischen System muss gegebenenfalls kompensiert werden.



**Abbildung 2.7 Coherent Anti-Stokes Raman Scattering.** (A) CARS Energieschema. Molekylvibrationen werden bei der Differenz  $\omega_p - \omega_s$  der Frequenzen von Pumplaser und Stokes-Laser angeregt. Nach Absorption eines zweiten Pump-Photons kann ein Anti-Stokes Photon erzeugt werden. (B) Raman Spektrum von HeLa Zellen. Das stärkste Signal liefern C-H Verbindungen.

Um gute Signalstärken für diesen 3-Photonen Effekt zu erreichen, werden Kurzpuls-laser verwendet. Bei Pulslängen im Femtosekunden-Bereich tritt allerdings das Problem auf, dass die spektrale Breite des Lasers größer wird als die Raman Banden. Insgesamt wird so der nichtresonante Hintergrund sehr groß. Bessere Ergebnisse lassen sich in dieser Hinsicht mit 2-3 ps Pulsen erzielen [POTMA und XIE, 2004]. Mit spektral breiten Laserquellen kann durch geeignete Modulation des Laserstrahls aber auch eine 1-Puls Anregung von CARS erreicht werden [DUDOVICH et al., 2002].



**Abbildung 2.8** Aufbau des Skelettmuskels. Parallel ausgerichtete Strukturen wiederholen sich von makroskopischen Faserbündeln bis zur mikroskopischen Sarkomerstruktur.

## 2.4 Skelettmuskel

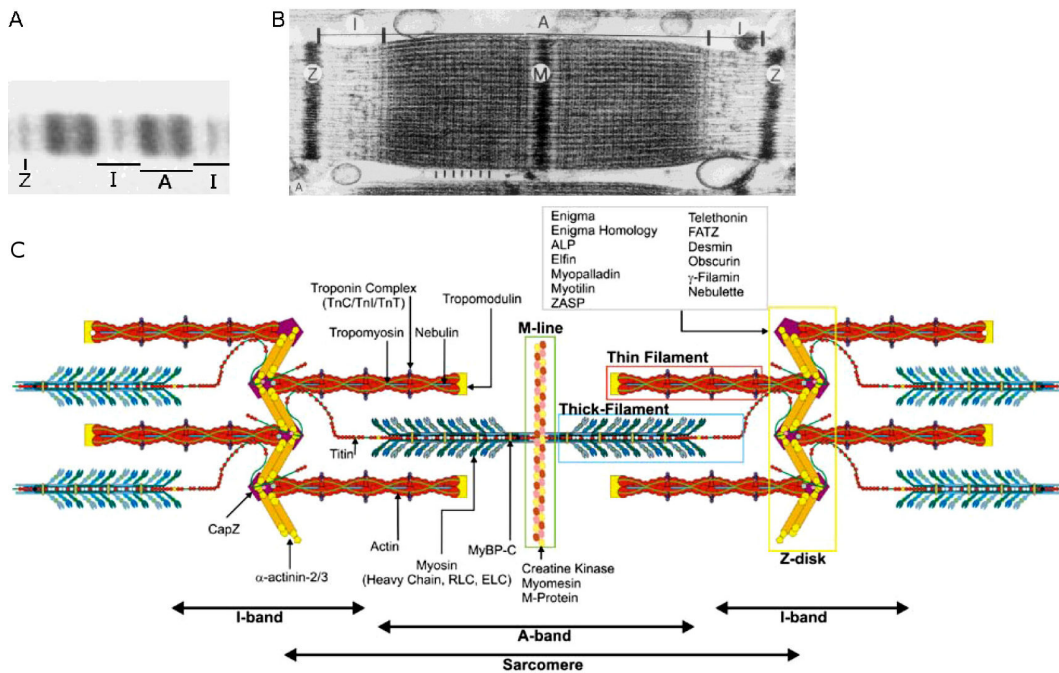
Die Skelettmuskulatur führt alle Bewegungen im Körper aus, die willkürlich steuerbar sind. Sie wird häufig auch als *quergestreifte Muskulatur* bezeichnet, da sie unter dem Lichtmikroskop als regelmäßige Abfolge heller und dunkler Bereiche erscheint.

Vom Skelettmuskel zu unterscheiden ist die *glatte Muskulatur*, die im Körper vor allem in den Blutgefäßen und im Verdauungstrakt zu finden ist. Sie erfüllt eher Haltearbeiten und ist nicht willkürlich steuerbar. Unter dem Mikroskop zeigt die glatte Muskulatur keine Querstreifung.

Eine Sonderstellung nimmt der *Herzmuskel* ein, der zwar wie die Skelettmuskeln eine Querstreifung besitzt, aber nicht willkürlich steuerbar ist. Seine Kontraktion wird über einen eigenen Taktgeber, den Sinusknoten, ausgelöst. Die Skelettmuskulatur wird hingegen über das zentrale Nervensystem gesteuert.

### 2.4.1 Struktur

Der Skelettmuskel zeichnet sich durch einen Aufbau aus vielen parallel ausgerichteten Strukturen aus, die in jeder Größenskala vom ganzen Muskel bis zu den mikroskopischen Details zu finden sind (Abbildung 2.8). Außen ist der gesamte Muskel von einer festen Hülle aus Bindegewebe (*Fascie*) eingeschlossen. Sie hält den Muskel in seiner Form und geht an den Muskelenden in die Sehnen über, von denen die Muskelkraft auf das Skelett übertragen wird. Im Innern des Muskels ist schon mit bloßem Auge eine Struktur von unzähligen kleinen Faserbündeln erkennbar. Jedes dieser Bündel setzt sich wiederum aus kleineren parallelen Bündeln zusammen, die schließlich aus einzelnen Muskelzellen bestehen. Die Muskelzellen, häufig als *Einzel-fasern* bezeichnet, messen nur etwa 100 µm im Querschnitt, können sich aber über die Länge des kompletten Muskels erstrecken. Wie alle Zellen besitzen sie eine Zellmembran und verschiedene intrazelluläre Kompartimente. Der Zusammenschluss vieler Zellen zu Bündeln wird durch ein Geflecht aus Bindegewebe stabilisiert, das vor allem aus *Collagen*-Fasern besteht.

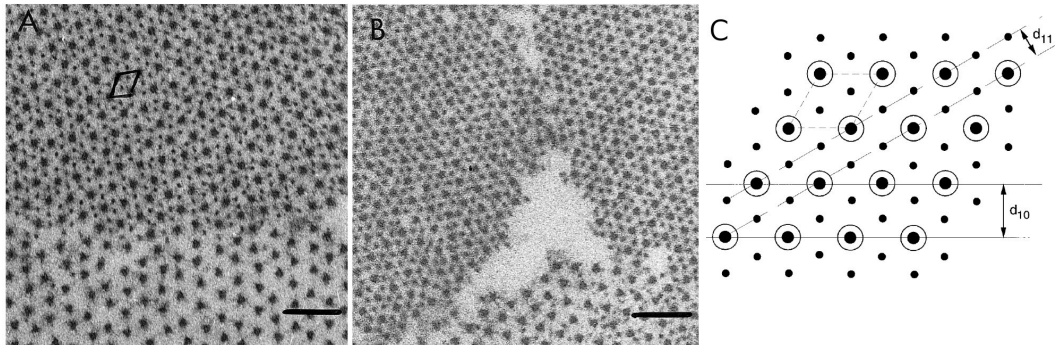


**Abbildung 2.9 Das Sarkomer.** (A) Zwei Sarkomere einer Myofibrille aufgenommen mit Phasenkontrast [COLBY, 1971]. (B) Elektronenmikroskopische Aufnahme eines Sarkomers. Lage der hellen I-Bänder, der dunklen A-Bänder, der Z-Scheiben und M-Linien [BARRAL und EPSTEIN, 1999]. (C) Schema zur Sarkomerstruktur. Anordnung der dicken und dünnen Filamente (farbige Boxen) sowie Bezeichnung der Proteine im einzelnen. [Au, 2004]

Auch auf mikroskopischer Ebene wiederholt sich das System parallel ausgerichteter Strukturen. Eine Muskelzelle besteht aus einigen hundert parallelen Röhren, den *Myofibrillen*. Die Myofibrillen können sich über die gesamte Länge der Muskelzelle erstrecken, sind aber nur ungefähr  $1\ \mu\text{m}$  dick und damit gerade noch mit Lichtmikroskopen auflösbar (siehe Abschnitt 2.1.2).

Im Durchlicht erkennt man in den Myofibrillen eine regelmäßige Abfolge von hellen und dunklen Bändern, die als *I-Bande* (isotrop) und *A-Bande* (anisotrop) bezeichnet werden (Abbildung 2.9 A). Die anisotropen Bänder drehen die Polarisation des Lichts und heben sich daher im Phasenkontrast deutlich ab [COLBY, 1971]. In der Mitte der Bänder zeigt sich jeweils eine schmale Linie, die in den I-Bändern als *Z-Scheibe* und in der A-Bande als *M-Linie* bezeichnet wird. Der Bereich zwischen zwei Z-Scheiben ist beim entspannten Muskel im Mittel etwa  $2,2\ \mu\text{m}$  lang und bildet die kleinste funktionelle Einheit des Muskels, das *Sarkomer*. Die detaillierte Struktur eines Sarkomers wird unter dem Elektronenmikroskop sichtbar (Abbildung 2.9 B).

In Abbildung 2.9 C ist die Struktur des Sarkomers mit den beteiligten Proteinen schematisch dargestellt. Die beiden für die Funktion wesentlichen Bestandteile sind die



**Abbildung 2.10 Skelettmuskel im Querschnitt.** (A,B) Elektronenmikroskopische Aufnahmen von transversal geschnittenem Skelettmuskel (*rabbit psoas*) im Zustand relaxed (A) und rigor (B) - Im oberen Bereich des Bildes überlappen dicke und dünne Filamente, im unteren Bereich sieht man nur dicke Filamente - Skala: 100 nm. (C) Modell des Muskels als hexagonales Gitter - Ein dickes Filament (dicke, umrandete Kreise) ist von 6 dünnen Filamenten (kleine Kreise) umgeben.  $d_{11}$ ,  $d_{10}$  Abstand verschiedener Gitterebenen. [MILLMAN, 1998]

Strukturen parallel zur Faserrichtung: die *dicken Filamente* und die *dünnen Filamente*. Diese Filamente gleiten bei der Muskelkontraktion (2.4.4) ineinander. Die dünnen Filamente bestehen aus den Proteinen *Aktin*, *Troponin*, *Tropomyosin* und *Nebulin*, die dicken Filamente bestehen aus dem Motorprotein *Myosin* und myosinassoziierten Proteinen wie *MyBP-C* und der elastischen Komponente *Titin*. Die Z-Scheiben sind für die Aufrechterhaltung der dreidimensionalen Struktur verantwortlich [CLARK et al., 2002, AU, 2004].

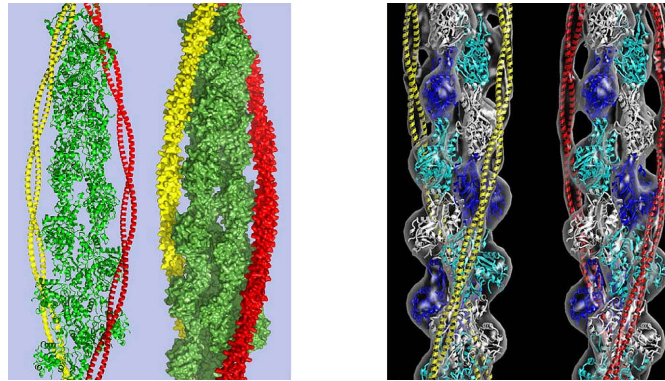
Wie aus den elektronenmikroskopischen Bildern in Abbildung 2.10 zu erkennen ist, bilden die Filamentstrukturen ein sehr regelmäßiges, hexagonales Gitter. In diesem ist ein dickes Filament jeweils von 6 dünnen Filamenten umgeben. Der Abstand der Filamente lässt sich durch Röntgen-Streuexperimente ermitteln. Beim Säugetier-Muskel ergibt sich für den Abstand  $d_{10}$  zwischen den 1,0 Gitterebenen (Abbildung 2.10 C) ein Wert von etwa 40 nm [MILLMAN, 1998]. Eine Myofibrille von 1  $\mu\text{m}$  Durchmesser besteht also aus etwa 500 dicken und circa 1000 dünnen Filamenten.

## 2.4.2 Aktin und Myosin

Das Protein Aktin ist der Hauptbestandteil der dünnen Filamente. Das Aktin Monomer (G-Aktin) ist ein globuläres Protein mit einem Molekulargewicht von 42 kDa, das mit weiteren Aktinmolekülen zu einem Filament polymerisieren kann (F-Aktin).

Das Aktinfilament ist von zwei Strängen des doppelwendelförmigen Tropomyosins umwickelt. Tropomyosin kann die Myosin-Bindungsstelle am Aktin blockieren (rote Konfiguration in Abbildung 2.11) und wieder freigeben (gelbe Konfiguration). Auf





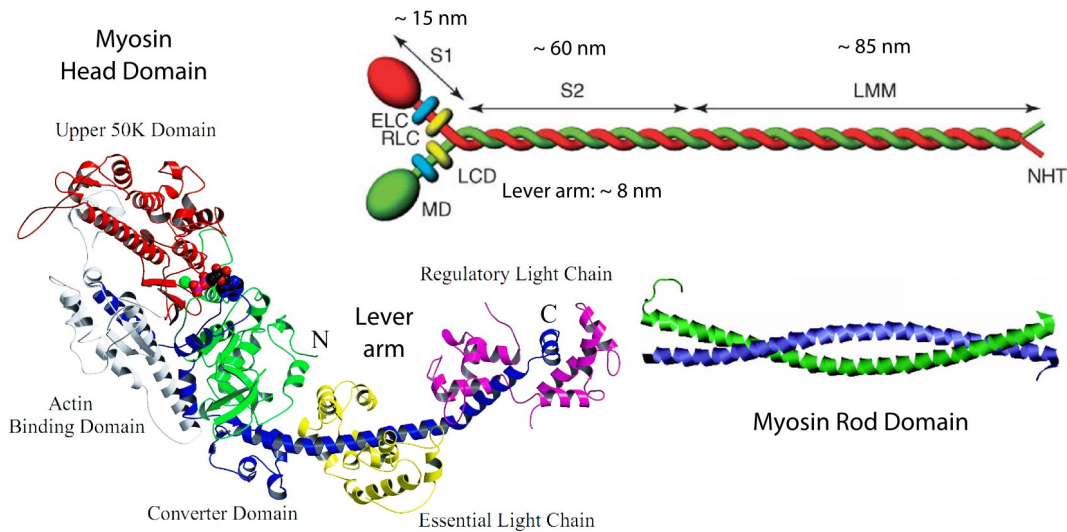
**Abbildung 2.11 Struktur der Aktinfilamente.** Das gesamte Aktin Polymer (grün) setzt sich aus einzelnen Aktin Molekülen (Blautöne) zusammen. Um das Aktinfilament sind zwei Doppelhelices aus Tropomyosin gewickelt, die die Myosin-Bindungsstelle des Aktins zur Regulierung der Muskelkontraktion blockieren (rot) und wieder freilegen können (gelb). [HOLMES und LEHMAN, 2008]

diese Weise wird die Muskelkontraktion im Skelettmuskel reguliert. Das Umschalten zwischen beiden Zuständen geschieht durch das Protein Troponin, das in regelmäßigen Abständen an die Tropomyosin Doppelwendel gebunden ist. Troponin ändert seine Struktur geringfügig, wenn es  $Ca^{2+}$ - Ionen bindet. In Folge dieser Änderung legen die Tropomyosin Moleküle die Myosin Bindungsstelle am Aktin frei [CLARK et al., 2002]. Über diesen Mechanismus ist die Muskelkontraktion letztlich von der intrazellulären  $Ca^{2+}$ -Konzentration abhängig, die aus diesem Grund im Skelettmuskel sehr vielfältig und komplex reguliert ist.

Die dicken Filamente bestehen hauptsächlich aus Myosin (siehe Abbildung 2.12). Präziser handelt es sich aus der großen Familie der Myosinarten um das Protein Myosin-II, das in dieser Arbeit vereinfachend als Myosin bezeichnet wird. Myosin ist ein relativ großes und schweres Protein (Molekulargewicht: 520 kDa). Es besteht aus zwei schweren (*heavy chains*) und vier leichten Ketten (*light chains*).

Die schweren Ketten bestehen aus zwei vollkommen unterschiedlichen Domänen: einer kompakter Kopfregion (*S1 domain*), etwa 15 nm lang und 8 nm breit, sowie einer langgestreckte Schwanzregion (*rod*) aus zwei verdrehten Helices von etwa 150 nm Länge und 2 nm im Durchmesser [STEWART und EDWARDS, 1984]. Die Schwänze von zwei schweren Ketten sind zu einer übergeordneten Helix verdreht (*coiled coil*) und bilden so ein komplettes Myosinmolekül.

Myosin wird von bestimmten Enzymen (*Trypsin*, *Chymotrypsin*) an einer gut definierten Stelle, etwa 80 nm vor dem Ende des Moleküls, in zwei Teile gespalten, die man nach ihrem Gewicht von etwa 140 und 80 kDa mit HMM (*heavy meromyosin*) und LMM (*light meromyosin*) bezeichnet. Das HMM besteht aus der S1-Region, mit



**Abbildung 2.12 Das Myosin-Molekül.** Das Molekül besteht aus zwei globulären Köpfen und einem langgestreckten, stabförmigen Teil (Myosin-Rod) aus zwei Helices. In den Köpfen befinden sich Bindungsstellen für Aktin und ATP. Durch eine Konformationsänderung in der Konverter-Region kann ein Teil des Moleküls, der Lever-arm (blaue Helix) aktiv rotiert werden. Angepasst aus [CRAIG und WOODHEAD, 2006, HOUDUSSE et al., 1999, BROWN et al., 2008].

der die leichten Ketten verbunden sind, und aus der S2-Region. Das LMM enthält zwei Drittel der rod domain und ist für die Bildung der dicken Filamente mit verantwortlich (siehe Abschnitt 2.4.3).

Die S1 Region ist für die Funktionalität als Motorprotein verantwortlich und wird deshalb auch *motor domain* genannt. Sie enthält die Bindungsstellen für Aktin und ATP und kann durch katalytische Spaltung von ATP ihre Konformation ändern.

Dabei wird eine kleine Verschiebung in der *converter domain* durch eine Kette von Änderungen fortgesetzt und immer weiter verstärkt bis schließlich die gesamte Gelenkregion der Myosinköpfe umklappt [FISCHER et al., 2005]. So kommt eine Hebelwirkung zu Stande, wegen der diese ca. 8 nm lange Helixstruktur [RUFF et al., 2001] auch als *lever arm* bezeichnet wird [HOLMES, 1997].

Im Zusammenspiel mit dem Binden und Lösen der Aktinfilamente bewirkt das aktive Umklappen des Myosinkopfs schließlich die Muskelkontraktion (Abschnitt 2.4.4). Die Myosinrods sind bei der Muskelkontraktion passiv. Ihre besondere Struktur ist hingegen dafür verantwortlich, dass sich Myosinmoleküle zu dicken Filamenten verbinden.

### 2.4.3 Helices und Filamente

Helices sind hoch geordnete und polare Strukturen. Beides sind wesentliche Eigenschaften möglicher SHG Emitter, so dass eine genauere Betrachtung der helicalen Strukturen von Myosin und Collagen interessant ist. Einen Überblick dazu gibt Abbildung 2.13.

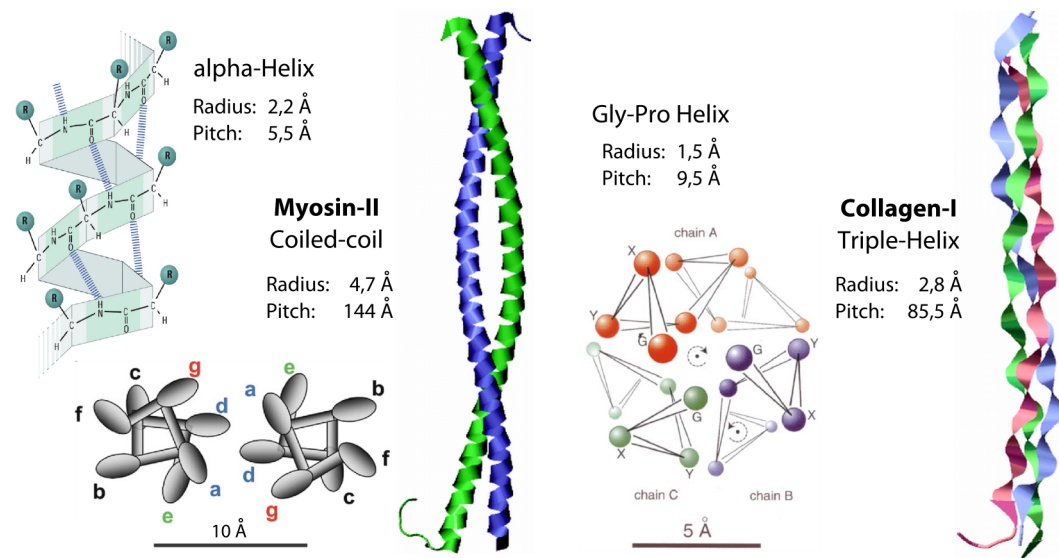
#### Myosin $\alpha$ -Helix Doppelwendel

Die Myosinrods bestehen aus zwei miteinander verdrehten  $\alpha$ -Helices. Eine  $\alpha$ -Helix ist sehr regelmäßig aufgebaut aus einer Kette von Kohlenstoff- und Stickstoff-Atomen in der Form (RCH-CO-NH), jeweils mit einer Aminosäure R am ersten C-Atom [PAULING et al., 1951]. Die Atome C-CO-NH liegen jeweils in einer Ebene. Zwischen der CO-Gruppe und der viertnächsten NH-Gruppe bilden sich Wasserstoffbrückenbindungen, die zusammen die Helix-Struktur fixieren. Die Wechselwirkungen zwischen den Atomen bestimmen den Radius und die Ganghöhe (Pitch) der Helix. Beide Größen variieren leicht, abhängig von den lokalen Aminosäuren. Im Mittel ergibt sich ein Radius von 2,24 Å und ein Pitch von 5,5 Å [BECK und BRODSKY, 1998]. Aus diesen Größen lässt sich ein mittlerer Steigungswinkel von 21° berechnen (zur Längsachse gesehen entsprechend 69°).

Im Myosinrod wiederholt sich die grundlegende Struktur alle 28 Aminosäuren nach 4 Clustern (*heptad*), die aus je 7 Aminosäuren aufgebaut sind. Die Heptads bilden jeweils zwei Umläufe der  $\alpha$ -Helix (Abbildung 2.13). Auf den Positionen *a*, *b*, *c*, *d*, *e*, *f*, *g* können sich in jedem Heptad verschiedene Aminosäuren befinden, der Typ der Aminogruppe (z. B. „polar“ oder „hydrophob“) ist für eine bestimmte Position aber immer gleich [STRAUSSMAN et al., 2005].

Die Positionen *a* und *d* werden immer durch hydrophobe Aminosäuren wie Leucin besetzt. Mit den entsprechenden Aminosäuren einer zweiten  $\alpha$ -Helix (siehe Abbildung 2.13) bilden sie eine dicht gepackte, hydrophobe Oberfläche. Die beiden Helices verdrehen sich dadurch zur *coiled-coil* Struktur des Myosinmoleküls und bringen die hydrophoben Aminosäuren in das Innere der Doppelhelix. Über Salzbrücken wird die Struktur dort weiter stabilisiert. Die Anzahl solcher Salzbrücken ist in der S2 Region geringer als im LMM. Deshalb ist das Myosinmolekül in diesem Bereich auch flexibler und kann sich in Richtung des Aktins biegen und Konformationsänderungen im Kopf zulassen [LI et al., 2003].

Auch die Polarität der Aminosäuren ist für eine bestimmte Position *a-g* immer gleich, was dazu führt, dass sich entlang der Helix abwechselnd positiv und negativ geladene Banden ausprägen. Die Coulomb-Wechselwirkungen zwischen diesen Banden sind entscheidend für die Entstehung der dicken Filamente aus meh-



**Abbildung 2.13 Helikale Struktur von Myosin-II und Collagen-I.** Die Myosinrods bestehen aus einer Doppelwendel (Coiled-Coil) von zwei  $\alpha$ -Helices. Collagen-I ist ein Dreifach-Strang von Glycin-Proline Helices mit deutlich größerer Ganghöhe. Angepasst aus [PARRY et al., 2008, OFFER und SESSIONS, 1995, BECK und BRODSKY, 1998].

renen Myosinmolekülen. Welche Aminosäuren aber genau die verschiedenen Positionen besetzen, kann bei den diversen Myosin-Unterarten sehr unterschiedlich sein. Zusammen mit charakteristischen Brüchen der Sequenz (*skip residues*) führt dies zu der großen Vielfalt in den Eigenschaften und Funktionen der Myosin-Arten [STRAUSSMAN et al., 2005].

Die Wechselwirkungen zwischen verschiedenen Aminosäure-Kombinationen auf der  $\alpha$ -Helix lassen sich am Computer modellieren, so dass lokaler Radius und Pitch des Coiled-Coil errechnet werden können [OFFER und SESSIONS, 1995]. Für die Myosinrods kann man einen mittleren Pitch von 144 Å und Radius von 4,7 Å annehmen.

### Collagen Dreifach-Helix

Collagen-I ist aus drei Helices aufgebaut. Jede Helix ist grundsätzlich der  $\alpha$ -Helix sehr ähnlich, hat wegen der in großer Zahl vorkommenden Aminosäuren Glycin und Prolin aber eine deutlich größere Ganghöhe. Die Struktur wiederholt sich hier nicht nach sieben, sondern nach drei Einheiten in der Form  $(\text{Gly-X-Y})_n$ .

Mittlere Werte für eine  $(\text{Gly-X-Y})$ -Helix sind ein Radius von 1,5 Å und ein Pitch von 9,6 Å [BECK und BRODSKY, 1998]. Daraus lässt sich ein Steigungswinkel von 45,3° (bzw. 44,7° zur Achse der Helix) errechnen.

Im Gegensatz zum Myosin Coiled-Coil wird die Collagen Triple-Helix nicht durch hydrophobe Wechselwirkung stabilisiert, sondern durch Wasserstoffbrückenbindungen. Dies ist möglich, da in einer Gly-X-Y Dreier-Gruppe jeweils nur eine N-H...O=C Brücke innerhalb der Einzelhelix entsteht. Die zwei anderen N-H-Gruppen wechselwirken mit den anderen Einzelhelices [BECK und BRODSKY, 1998].

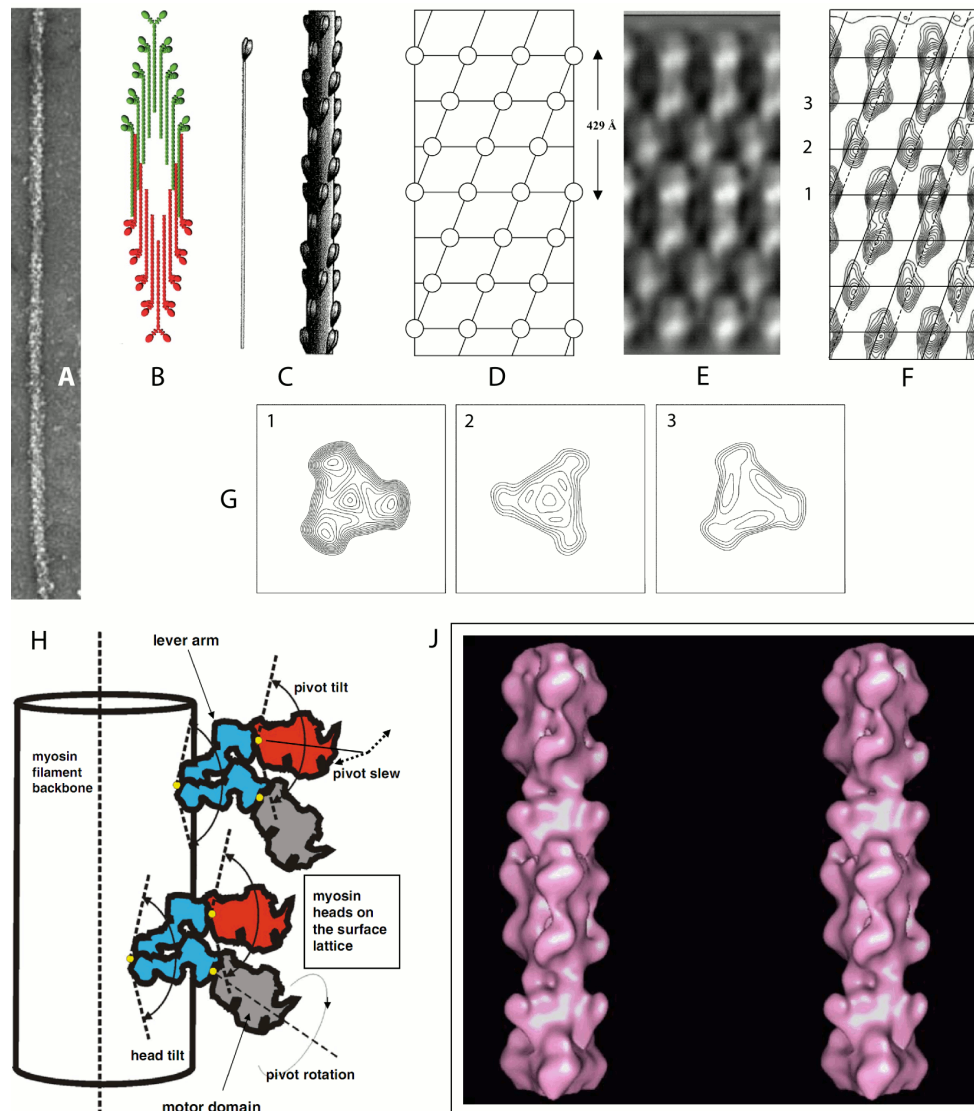
### Myosin-Filamente

Die sogenannten dicken Filamente des Skelettmuskels haben eine Länge von etwa 1,6  $\mu\text{m}$  [STRAUSSMAN et al., 2005], messen ca. 20 nm im Durchmesser und bestehen hauptsächlich aus Myosin. Die elektronenmikroskopische Aufnahme eines dicken Filaments vom Goldfischmuskel ist in Abbildung 2.14 A zu sehen.

Die dicken Filamente entstehen durch parallele Aneinanderlagerung von Myosinmolekülen (Abb. 2.14 B). Im Bereich der M-Linie in der Mitte des Filaments ist die Anordnung antiparallel, so dass dort eine etwa 160 nm lange *bare zone* ohne Myosinköpfe entsteht. Auf jeder Seite der M-Linie sind die Myosinmoleküle einheitlich gerichtet.

Der Versatz der Moleküle wird durch das Muster von positiven und negativen Ladungen in den einzelnen Coiled-Coils festgelegt, das sich aus den Aminosäuresequenzen ergibt [STRAUSSMAN et al., 2005]. Diese Muster sind charakteristisch für die jeweiligen Myosinsorten, so dass in anderen Geweben wie dem glatten Muskel andere Mikrostrukturen entstehen.

Die Positionen der Myosinköpfe können aus elektronenmikroskopischen Daten und Röntgenstrukturanalysen ermittelt werden. Zwischen benachbarten Köpfen gibt es einen Versatz von 14,3 nm, während sich die gesamte Struktur alle 43 nm wiederholt. Die Köpfe bilden dabei grob gesehen drei Helices auf einem Zylinder (Abbildung 2.14 C). Eine perfekte 3-strängige 9/1-Helix bildet ein Muster wie in Abbildung 2.14 D auf der Mantelfläche eines Zylinders. Eine exaktere Modellierung der 3D-Struktur der Filamente [AL-KHAYAT et al., 2006] ergibt aber einige Abweichungen von der streng helikalen Positionierung der Köpfe. Abbildung 2.14 E zeigt die Dichteverteilung auf der Mantelfläche bei Radius 11 nm für eine Rekonstruktion von elektronenmikroskopischen Daten; Abbildung 2.14 F zeigt zudem das helikale Ausgangsmuster. In Ebene 2 und 3 liegen die Schwerpunkte der Masse ziemlich genau auf den gestrichelten Linien, in Ebene 1 sind sie merklich nach links verschoben. Eine mögliche Erklärung dafür wäre das Myosin-assoziierte Protein *MyBP-C*, das in die dicken Filamente integriert ist [AL-KHAYAT et al., 2006]. Die Querschnitte der Ebenen 1-3 sind in Abbildung 2.14 G zu sehen. Insgesamt ergibt sich eine Hexagonal-Symmetrie, die genau zur Anordnung der dünnen Filamente passt (vgl. Muskelquerschnitt in Abbildung 2.10).



**Abbildung 2.14 Struktur der Myosin-Filamente.** (A) Elektronenmikroskopische Aufnahme eines dicken Filaments aus der Skelettmuskulatur des Goldfischs. (B) Die Filamente entstehen durch parallele Aneinanderlagerung einzelner Myosin-Moleküle (antiparallel im Bereich der M-Linien in der Mitte der Filamente). (C) Die langen, schmalen Myosinrods (Skizze maßstäblich) bilden die Basis der Filamente. Die Myosinköpfe ergeben in ihrer Anordnung eine helixförmige Struktur. (D) Modell zur Anordnung der Myosin-Köpfe auf einer dreisträngigen Helix mit Periode 43 nm. (E, F) Die Dichteverteilung in einer verfeinerten Modell-Rekonstruktion der EM-Aufnahmen zeigt eine Hexagonal-Symmetrie. (G) Querschnitt des Filaments in drei Ebenen. (H) Hinsichtlich der exakten Orientierung der Myosin-Köpfe lassen EM- und Röntgenstrukturdaten Variationen zu. (J) 3D-Stereo-Darstellung eines Myosin-Filaments. [CRAIG und WOODHEAD, 2006, CHEW und SQUIRE, 1995, AL-KHAYAT et al., 2006, AL-KHAYAT und SQUIRE, 2006].

Die exakte Ausrichtung der Myosin-Köpfe bleibt auch in diesem Modell noch offen. Abbildung 2.14 H zeigt welche Parameter in einem verfeinerten Modell noch angepasst werden können. Mögliche Bewegungen sind Kippen, Schwenken oder Rotation von Kopfregion *und* Lever arm [AL-KHAYAT und SQUIRE, 2006]. Durch die große Zahl von Parametern können sehr gute Fits an die existierenden Datensätze erzielt werden. Eine verallgemeinerte Aussage über die Ausrichtung der Myosin-Köpfe in den dicken Filamenten, wie einen fixen Winkel für den Relaxed- und den Rigor-Zustand, kann wohl nicht ohne weiteres getroffen werden.

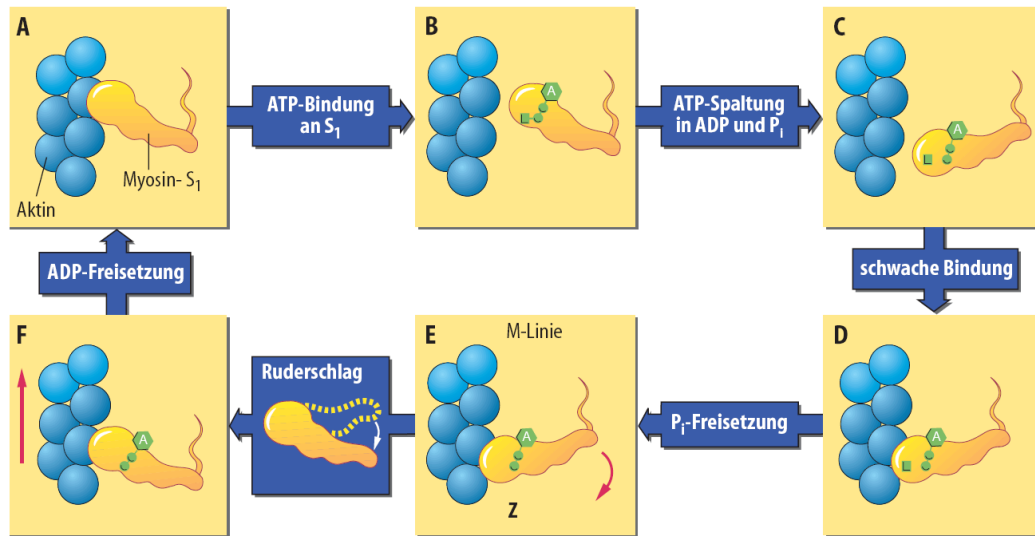
### Entstehung von Filamenten

Die Struktur der Filamente hängt von den äußeren Bedingungen bei ihrer Entstehung ab. Vor allem Gesamt-Ionenstärke und pH-Wert der Lösung beeinflussen die Stärke der elektrostatischen Kräfte zwischen den einzelnen Myosinmolekülen. So ist Myosin bei hoher Salzkonzentration ( $> 0.3 \text{ M KCl}$ ) wasserlöslich, und erst bei geringen Konzentrationen ( $< 0.2 \text{ M KCl}$ ) bilden sich Filamente. Diesen Effekt kann man ausnutzen, um synthetisch Filamente zu erzeugen [KATSURA und NODA, 1973, WARD und MURRAY, 1990]. Dabei löst man die Myosinmoleküle in einer Hochsalz-Lösung und verdünnt diese dann immer weiter bis physiologische Bedingungen erreicht sind (bei  $\sim 0.1 \text{ M KCl}$ ). Wenn dieser Prozess langsam genug stattfindet, bilden sich regelmäßige Filamente aus.

Bei pH 7.0 entspricht die mittlere Länge synthetischer Filamente ungefähr der natürlicher Filamente, allerdings mit relativ großer Streuung. Bei pH 8.0 entstehen Filamente mit sehr exakt definierter Länge, die aber mit ca.  $0,65 \mu\text{m}$  deutlich kürzer sind [DAVIS, 1986]. Den Ordnungsgrad der Filamente *in vivo* erreicht man bei synthetischen Filamenten nicht.

Zu den Vorgängen bei der Entstehung von Filamentstrukturen gibt es eine Reihe von Modelle, von denen einige in [BARRAL und EPSTEIN, 1999] zusammengefasst werden. Thermodynamische Betrachtungen führten zu der Annahme, dass Myosinmoleküle so lange an ein entstehendes Filament angelagert werden, wie dabei noch Bindungsenergie frei wird (*Cumulative Strain Model*). Ab einer bestimmten Filamentgröße werden die abstoßenden Kräfte zwischen den Ladungen mehrerer Moleküle dann größer als die anziehenden Kräfte. Das thermodynamische Gleichgewicht bestimmt die Länge der Filamente [DAVIS, 1986].

Sicher ist, dass noch eine Reihe von weiteren Proteinen an der Filamentbildung beteiligt sind. Vor allem Titin und Myosin binding proteins (*MyBP-C* und *-G*), die beide im Innern der dicken Filamente zu finden sind, spielen eine wichtige Rolle [CLARK et al., 2002]. Im Bereich der A-Bande besteht Titin aus einer Kette von 11 gleichen Bereichen mit einem Abstand von 43 nm. Dazwischen sind in 7 bis 9



**Abbildung 2.15 Der Querbrückenzyklus.** Schematische Darstellung - detaillierte Beschreibung im Text. [SCHMIDT und THEWS, 1997]

Querstreifen MyBP-C Moleküle angeordnet, die jeweils eine Bindungsstelle für die C-terminale Region der Myosinrods besitzen. Möglicherweise orientieren sich die Myosinmoleküle bei der Filamentbildung an diesem System als Vorlage (*Template Model*).

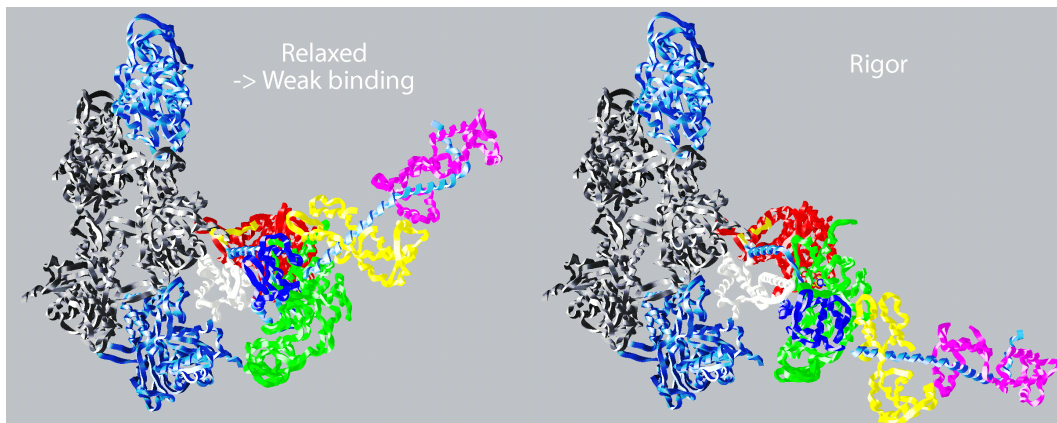
Die regelmäßige molekulare Anordnung der Proteine legt die Symmetrieeigenschaften der Filamente fest, und ist damit von zentraler Bedeutung für kohärente Streuprozesse an diesen Strukturen.

#### 2.4.4 Der Querbrückenzyklus

Bei der Kontraktion des Muskels verkürzen sich die einzelnen Sarkomere, indem dicke und dünne Filamente ineinandergleiten. Auf molekularer Ebene ist dafür eine zyklische Bindung von Myosinköpfen an Aktinfilamente und eine Konformationsänderung im Myosinmolekül verantwortlich. Die Energie für diesen Vorgang wird durch Abspaltung einer Phosphatgruppe von ATP-Molekülen (*Adenosintriphosphat*) zur Verfügung gestellt.

Der elementare Prozess der Kontraktion heißt *Querbrückenzyklus* und läuft in mehreren Phasen ab (Abbildung 2.15). Als Ausgangspunkt (A) wählt man willkürlich den ATP-freien *Rigor*-Zustand, der in allen Muskeln eintritt, wenn nach dem Tod das ATP langsam vollständig verbraucht ist (Totenstarre). Die Kopffregion des Myosinmoleküls ist in diesem Zustand fest mit dem Aktin verbunden und wird erst bei





**Abbildung 2.16 Molekülstruktur im Relaxed- und Rigor-Zustand.** Jeweils links das Aktin-Filament (blau-schwarz) und rechts der Myosin Kopf (Farben wie in 2.12). Die wesentliche Änderung zwischen beiden Zuständen ist die Rotation der lever-arm Region (blau) und der beiden leichten Ketten (magenta und gelb) um einen Winkel von ca. 60°. [HOLMES, 1997]

ATP Bindung wieder abgelöst (B). Durch Spaltung des ATP in ADP und ein anorganisches Phosphat  $P_i$  wechselt das Myosinmolekül im sogenannten *recovery stroke* von der Rigor-Anordnung in den entspannten Zustand (*Relaxed-Zustand*) (C). Die Spaltprodukte bleiben dabei weiterhin mit dem Myosin verbunden. Während dieses Vorgangs erhöht sich auch die Affinität zum Aktinfilament, so dass beide Moleküle schwach rekombinieren können (*weak binding state*) (D). Eine feste Bindung bildet sich erst bei Abgabe der Phosphatgruppe (E). Zu diesem Zeitpunkt findet auch die eigentliche Kraftentwicklung statt: Durch eine Konformationsänderung des Myosin-Kopfes wird das gebundene Aktinfilament in einer Art „Ruderbewegung“ in Richtung der M-Linien gezogen (*power stroke*) (F). Mit Abgabe des ADP ist wieder der Rigor-Zustand erreicht.

Ein einzelnes Myosin-II-Molekül kann eine maximale Kraft von etwa 5-6 pN entwickeln [ISHIJIMA et al., 1996] und bewirkt einen Versatz des Aktinfilaments um 5-15 nm [SPUDICH, 2001].

### Molekulare Vorgänge vom Relaxed- zum Rigor-Zustand

Die zwei Extremlzustände im Querbrückenzyklus sind der Rigor-Zustand (Bindung an Aktin, kein ATP) und der Relaxed-Zustand (ATP gebunden, vom Aktin gelöst). Die Molekularstruktur beider Zustände ist durch Analysen von Röntgen-Kristallographien bekannt (Abbildung 2.16).

Die wesentliche und offensichtlichste Veränderung ist die große Umklapp-Bewegung der Halsregion des Moleküls, die in Abbildung 2.16 als blaue  $\alpha$ -Helix mit den zwei

leichten Ketten in gelb und magenta dargestellt ist. Diese Region wirkt so als Hebel (*lever arm*) für die Kraftübertragung [HOLMES, 1997].

Die gesamte Bewegung wird nur durch das Binden und Spalten von ATP in der ATPase-Region (Grenze von rotem und grünem Bereich in Abbildung 2.16) und durch die Freisetzung der Spaltprodukte ausgelöst. Die initialen Veränderungen sind minimal. Eine Simulation von energetisch sinnvollen Intermediärzuständen zwischen Relaxed und Rigor zeigt im Anschluss eine sich selbst verstärkende Kaskade kleinster molekularer Veränderungen, die zu einer Rotation der sogenannten *converter domain* in der S1 Region führt und so schließlich den kompletten Hebelarm um ca. 60° umlegt. [FISCHER et al., 2005, MESENTEAN et al., 2007]

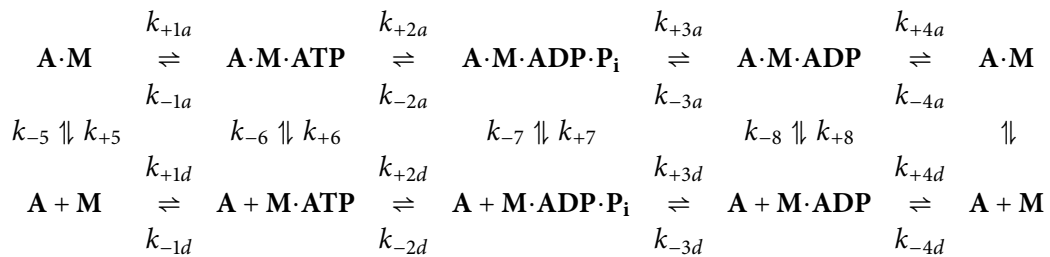
Im größten Teil des Myosin-Kopfes finden also nur kleine Veränderungen statt. Der wesentliche Unterschied liegt tatsächlich in der Hebelarm-Region. Nicht berücksichtigt wurden bisher allerdings der Einfluss der Myosinrods, des zweiten Myosinkopfes in einem Dimer oder der dicken Filamente. Eine Kraft wirkt am Molekül nicht nur an der Aktin-Bindungsstelle, sondern auch an der Verbindung jedes Kopfes zu den dicken Filamenten, bei der die Flexibilität der S2 Region eine Rolle spielt [LI et al., 2003]. Ein Teil der S2 Region könnte bei der Bindung von Myosin an Aktin oder während des Kraftschlags von der Filamentachse zum Aktin hin gebogen werden. In einem Abstand von 43 nm und 62 nm von der S1-S2-Verbindungsstelle (vgl. Abbildung 2.12) existieren besonders flexible Stellen, die als Gelenk (*hinge*) fungieren könnten [SUGGS et al., 2007].

Bei der Betrachtung aller Veränderungen zwischen Relaxed- und Rigor-Zustand im Hinblick auf unterschiedliche Charakteristiken der SHG Signale (siehe Abschnitt 3.1.6) werden wohl große Änderungen, die die Gesamtsymmetrie betreffen, die größte Rolle spielen. Dies sind vor allem die Rotation des lever arm und eine mögliche zusätzliche Auslenkung der S2 Region von der Filamentachse.

#### 2.4.5 Myosin Inhibitoren

Bei der Muskelkontraktion ändert Myosin seine Konformation durch Spaltung von ATP. Für ein Reihe von Experimenten ist es interessant, diese ATPase Tätigkeit blockieren zu können. Dazu eignen sich u. a. die Myosin Inhibitoren *BTS* (*N*-benzyl-*p*-toluene sulfonamide) [CHEUNG et al., 2002] und *Blebbistatin* [STRAIGHT et al., 2003]. Beides sind kleine Moleküle, die leicht in die Zelle diffundieren können.

BTS bindet an die S1 Region des Myosinmoleküls, aber nicht im Wettbewerb mit ATP um die ATP-Bindungsstelle. Es beeinflusst im Wesentlichen drei Schritte des Reaktionsablaufs [SHAW et al., 2003]:

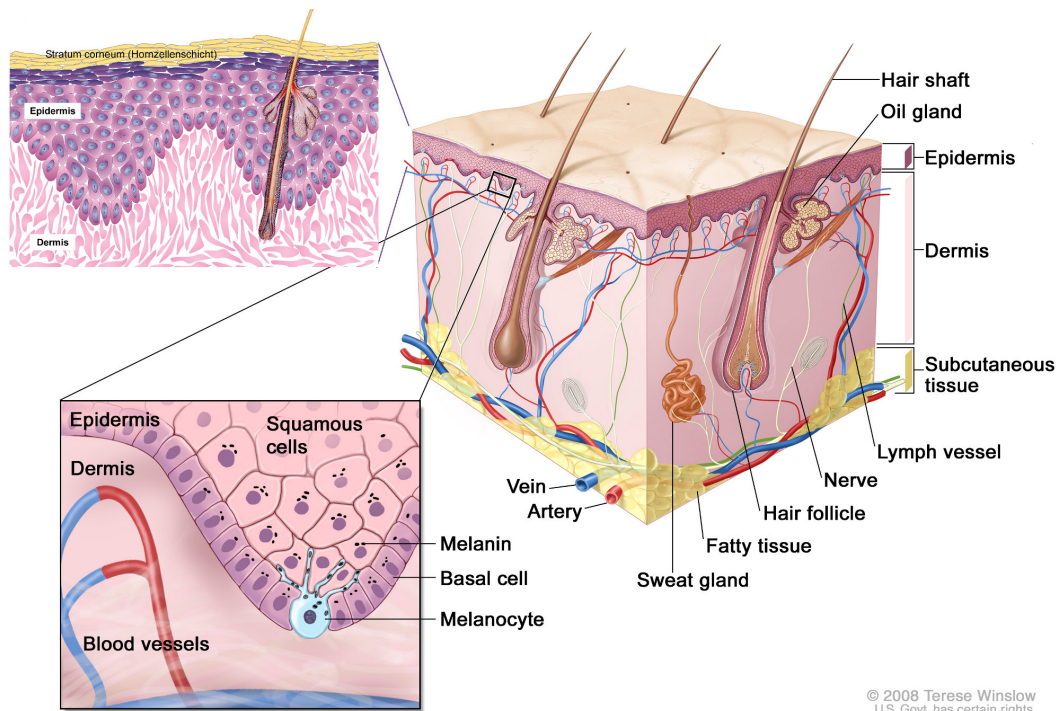


BTS senkt die Rate der  $P_i$  Phosphat-Freisetzung in einer Konzentration von  $100 \mu\text{M}$  um einen Faktor  $> 20$  mit dissoziiertem Aktin ( $k_{3d}$ ) und  $> 100$  in Verbindung mit Aktin ( $k_{3a}$ ). Es verkleinert zudem die Dissoziations-Konstante ( $k_{4d}$ ) und Geschwindigkeit von  $M \cdot \text{ADP}$  und reduziert die Affinität von Myosin zu Aktin. Der deutlichste Effekt ist dabei die Unterdrückung der Phosphat-Freisetzung.

Für Myofibrillen in einer physiologischen Lösung mit ATP,  $\text{Ca}^{2+}$  und BTS ist also zu erwarten, dass sich ein Großteil der Querbrücken in den Zuständen  $\text{A} \cdot \text{M} \cdot \text{ADP} \cdot \text{P}_i$  und  $\text{A} + \text{M} \cdot \text{ADP} \cdot \text{P}_i$  sammelt. Der Zustand  $\text{A} \cdot \text{M} \cdot \text{ADP} \cdot \text{P}_i$  muss in jedem Fall deutlich stärker besetzt sein als bei Myofibrillen in  $\text{Ca}^{2+}$ -freier Lösung mit blockierter Aktin-Bindungsstelle. Damit ist BTS in Verbindung mit  $\text{Ca}^{2+}$  geeignet, um den *weak-binding* Zustand zu untersuchen.

BTS hat eine große Affinität zu Skelettmuskelfasern des schnellen Typs. Die Wirkung auf langsam zuckende Muskelfasern oder Herzmuskelfasern ist deutlich geringer [CHEUNG et al., 2002].

Blebbistatin blockiert auch Nicht-Muskel Myosin-II [SHAW et al., 2003], z. B. Human Platelet Myosin. Der Inhibierungs-Mechanismus ist sehr ähnlich zu dem von BTS: Blebbistatin reduziert vor allem die Phosphat-Freisetzung [KOVÁCS et al., 2004]. Im Gegensatz zu BTS fluoresziert das Blebbistatin-Molekül im sichtbaren Bereich, was für einige mikroskopische Anwendungen ungünstig sein kann.



© 2008 Terese Winslow  
U.S. Govt. has certain rights

**Abbildung 2.17 Anatomie der Haut.** Die drei primären Schichten sind die Epidermis (Oberhaut), die Dermis (Lederhaut) und die Subcutis (Unterhaut). Weitere Erläuterungen im Text. [PDQ, 2009]

## 2.5 Haut

Die Haut ist das größte Organ des Menschen. Sie grenzt den Körper von der Umwelt ab, schützt vor externen Einflüssen, hilft den Wärme und Flüssigkeitshaushalt zu regulieren und enthält eine Vielzahl von Sensoren für Berührung, Druck oder Hitze.

### 2.5.1 Aufbau der Haut

Die menschliche Haut ist primär aus drei Schichten aufgebaut (Abbildung 2.17): der *Epidermis* (Oberhaut), der *Dermis* (Lederhaut) und der *Subcutis* (Unterhaut). Die Epidermis als äußerste Schicht ist die eigentliche Grenze des Körpers gegenüber seiner Umwelt. Sie ist von der Dermis durch eine *Basalmembran* getrennt. Die Epidermis erneuert sich ständig selbst. An der Basalmembran findet die Zellteilung epidermaler Stammzellen (*Basalzellen*) statt. Von dort aus wandert ein Teil der Zellen langsam nach außen, produziert dabei zunehmend Keratin (*Keratinocyten*), verflacht

und wird so schließlich in Hornzellen (*Korneozyten*) umgewandelt. Die äußerste Schicht der Epidermis, das *Stratum corneum*, besteht nur noch aus toten, abgeflachten Korneozyten, die nach und nach von der Haut abfallen. Von der Entstehung einer neuen Zelle bis zu ihrer Ablösung von der Hornschicht vergeht in der Regel etwa ein Monat.

Der zweite wichtige Zelltyp in der Epidermis sind die *Melanozyten*. Sie produzieren das Pigment Melanin, das sie verpackt in Form von *Melanosomen* an die umliegenden Keratinozyten abgeben. Dort dient Melanin zum Schutz der Haut vor der UV-Strahlung.

Die Dermis ist für die Stabilität und Elastizität der Haut verantwortlich und versorgt die Epidermis mit Nährstoffen. Außerdem befinden sich dort die meisten Sinnesrezeptoren der Haut, sowie Haarwurzeln, Talg- und Schweißdrüsen. Die Dermis selbst wird von einem feinen Netz kapillarer Blutgefäße versorgt.

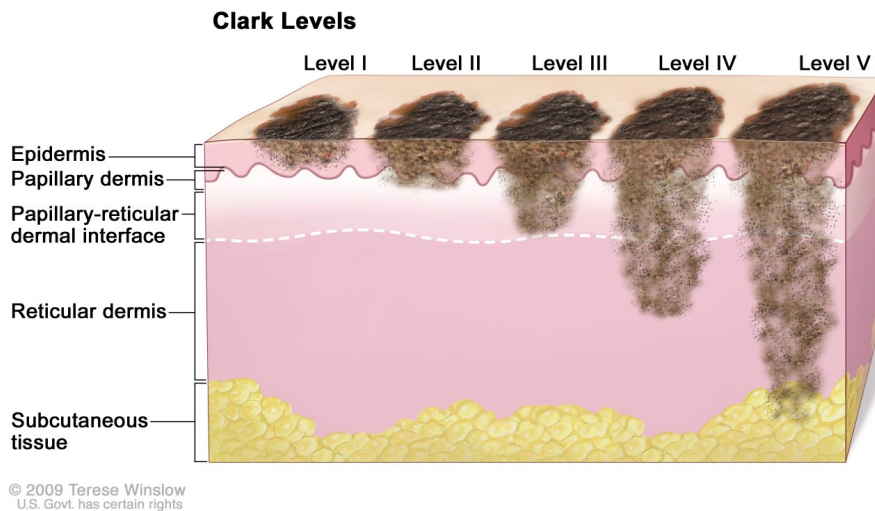
Der größte Teil der Dermis besteht aus extrazellulärer Matrix, einem dicht verwobenen Netzwerk aus stabilen *Collagen-I* Filamenten und flexiblen *Elastin*-Fasern, das für die stabile aber gleichzeitig elastische Beschaffenheit der Haut verantwortlich ist. In dieser Schicht befinden sich insgesamt verhältnismäßig wenige Zellen, darunter vor allem Zellen, die Teil des Immunsystems sind.

Das Collagen Netzwerk der Dermis ist ein besonders interessanter Anwendungsbe- reich für die SHG-Mikroskopie, da Collagen-I ein starker SHG-Emitter ist und da das Gewebe so nah unter der Hautoberfläche auch für *in-vivo* Mikroskopie erreichbar ist.

## 2.5.2 Hautkrebskrankungen

Die häufigsten Formen von Hautkrebs sind *Basalzellenkarzinome*, *Plattenepithelkarzinome* und *maligne Melanome* [ROGERS et al., 2010]. Die ersten beiden Arten, oft als „weißer Hautkrebs“ zusammengefasst, treten häufiger auf, wohl hauptsächlich ausgelöst durch UV Licht, sind durch Operation aber gut behandelbar, da sie nur sehr selten Metastasen bilden. Das maligne Melanom („schwarzer Hautkrebs“) ist hingegen ein sehr aggressiver Krebs, der früh Metastasen bilden kann und dann häufig auch tödlich verläuft.

Melanome entstehen in der Epidermis aus veränderten Melanozyten. Die Entwicklung von Melanomen wird anhand verschiedener Kriterien in Stadien (I-IV) klassifiziert [BALCH et al., 2009]. Ein übliches Bewertungsschema für Tumore (TMN) überprüft Tumorgöße (T), Metastasen in Lymphknoten (N) und entfernte Metastasen (M). Ein relevantes Kennzeichen der Tumorgöße eines Melanoms ist die Eindringtiefe nach Clark (Abbildung 2.18).



**Abbildung 2.18 Eindringtiefe eines Melanoms nach Clark.** In Level I befinden sich noch alle Tumorzellen oberhalb der Basalmembran, später dringt der Tumor in die Dermis ein und schließlich bis zur Subkutis vor (Level V). [PDQ, 2009]

Solange der Tumor klein ist und nur oberflächlich in der Epidermis ausgebreitet ist (Level I), kann der Tumor operativ entfernt werden. Die 10-Jahres Überlebensrate liegt dann über 97%. Wenn das Melanom allerdings größer wird und die Basalmembran überschreitet (Level II), steigt das Risiko, dass Tumorzellen in die Lymphgefäße oder in das Blut abgegeben werden, aus denen sich dann Metastasen bilden können. Wenn sich Metastasen nicht nur im nächsten Lymphknoten, sondern bereits in entfernten Orten im Körper gebildet haben (finale Stadium IV), liegt die 10-Jahres Überlebensrate schließlich unter 20% [BALCH et al., 2009]. Eine frühe Diagnose und Therapie sind also ausschlaggebend für eine erfolgreiche Behandlung der Patienten.

Der Ablauf einer Diagnose [GARBE et al., 2007] sieht zunächst die Examinierung fraglicher Hautpartien durch den Dermatologen anhand verschiedener Kriterien vor (z. B. Asymmetrie, Begrenzung, Coloration, Durchmesser, Erhabenheit). Beim Verdacht eines Melanoms muss eine histologische Untersuchung vorgenommen werden. Dies erfordert eine Biopsie der fraglichen Hautpartie inklusive eines Sicherheitsrandes aus gesundem Gewebe. Folgeprobleme sind hier die Wundheilung und mögliche Narbenbildung.

Als langfristiges Ziel wäre die Etablierung einer nicht-invasiven optischen Methode mit zellulärem Auflösungsvermögen zur Ergänzung des diagnostischen Verfahrens sicherlich wünschenswert.

## Hautkrebs im Tiermodell

Wenn das Krankheitsbild Hautkrebs an Mäusen im Tiermodell untersucht werden soll, verläuft die Entwicklung des Tumors meist anders als bei spontan entstandenen Hauttumoren. In der Regel werden die Tumorzellen zunächst in Zellkultur gezüchtet und dann in die Haut von Mäusen transplantiert, d. h. als Zellsuspension intracutan injiziert. Aus den Zellen bildet sich an dieser Stelle meist ein schnell wachsender Tumor. Der Krebs entsteht hier also nicht oberflächlich in der Epidermis, sondern direkt in einer tieferen Hautschicht, in die die Tumorzellen eingepflanzt wurden.

Die Tumore sind ein wichtiges Modellsystem, um wissenschaftliche Erkenntnisse über Krebserkrankungen zu gewinnen und um den Erfolg potenzieller Behandlungsmethoden zu testen. Beispielsweise kann hier die Wechselwirkung des Immunsystems mit dem Tumor und seiner Umgebung untersucht werden, um später möglicherweise die körpereigene Abwehr einer Krebserkrankung unterstützen zu können [MAHNKE et al., 2005]. Weitere wichtige Themen sind das Wachstum der Blutgefäße zur Versorgung des Tumors [HAGENDOORN et al., 2006] und der Prozess der Metastasenbildung im nächstgelegenen Lymphknoten [HOSHIDA et al., 2006].

Eine nicht-invasive optische Methode, um denselben Tumor über einen gewissen Zeitraum mikroskopisch untersuchen zu können, wäre also auch für den Bereich der Grundlagen-Krebsforschung ein äußerst hilfreiches Instrument.

### 2.5.3 Sklerodermie

Sklerodermie ist eine Autoimmunerkrankung, die in ihrer lokalisierten Form (*zirkumskripte Sklerodermie*) primär die Haut betrifft. Im Unterschied dazu kann die *systemische Sklerose* auch andere Organe betreffen und insbesondere bei massivem Befall der Lunge auch tödlich enden. Beides sind verschiedene Krankheitsbilder, die nicht ineinander übergehen [KREUTER et al., 2009, DISTLER und GAY, 2010].

Das charakteristische Merkmal der zirkumskripten Sklerodermie sind Verhärtungen der Haut, die auf verstärkte Anreicherung von Bindegewebe (Fibrosen) zurückzuführen sind. Ausgelöst wird die Fibrose vermutlich durch Zytokinausschüttung infolge einer entzündlichen Reaktion [KREUTER et al., 2009]. Der genaue Mechanismus ist zu großen Teilen aber noch ungeklärt.

Die Anreicherung von Bindegewebe in der Dermis wird in histologischen Schnitten anhand dickerer und weniger quervernetzter Collagenbündel und einer allgemein kompakteren Hautstruktur sichtbar.

Da dieses Krankheitsbild von Veränderungen der Collagenmatrix geprägt wird und Collagen gleichzeitig ein starker SHG Emitter ist, könnte die Sklerodermie ein besonders interessantes Anwendungsgebiet für die SHG Mikroskopie sein.





# Kapitel 3

## Experimente

In diesem Kapitel werden zunächst einige theoretische Modelle zu SHG am Muskel entwickelt, insbesondere zur Abhängigkeit der SHG Intensität von der Polarisati-on des anregenden Laserstrahls. Danach werden die durchgeführten Experimente beschrieben. Dies umfasst die einzelnen Schritte der Gewinnung von Muskel- und Hautpräparaten, sowie Details zu den Mikroskopen, den experimentellen Abläufen und der Auswertung der Daten.

### 3.1 Modellierung

Zunächst geht es hier um die besonderen Symmetrieeigenschaften des Muskels und deren Auswirkungen auf die Polarisationsabhängigkeit des SHG Signals. Darüber-hinaus wird ein Modell entwickelt, das die komplexe Verteilung des elektrischen Feldes eines Lasers im Fokus eines Objektivs mit hoher numerischer Apertur beim Prozess der Frequenzverdopplung berücksichtigt. Schließlich werden zwei Modelle konzipiert, um die mögliche Quelle des SHG Signals am Muskel zu untersuchen und den Einfluss verschiedener physiologischer Zustände auf die Polarisationsabhän-gigkeit zu verstehen.

#### 3.1.1 SHG in rotationssymmetrischen Strukturen

Eine Myofibrille kann vereinfacht als zylindersymmetrisch entlang der Faserachse angesehen werden. In der Mikrostruktur des Skelettmuskels sind dicke und dün-ne Filamente zwar in Form eines hexagonalen Gitters angeordnet (siehe Abschnitt 2.4.1), der Gitterabstand ist mit ca. 40 nm aber deutlich kleiner als die verwendete

Laserwellenlänge von 880 nm. Letztlich führt die Annahme von Hexagonalsymmetrie aber auch zu den gleichen Ergebnissen, wie die folgenden Berechnungen für Rotationssymmetrie.

Rotationssymmetrie bedeutet, dass bei einer Drehung um die Symmetrie-Achse keine Veränderungen auftreten. Der Übergang von einem Koordinatensystem  $\mathbf{r}$  nach  $\mathbf{r}'$  durch Drehung um einen Winkel  $\phi$  um die y-Achse lässt sich mit Hilfe der Drehmatrix  $M$  beschreiben:

$$\mathbf{r}' = M\mathbf{r} \quad \text{mit} \quad M = \begin{pmatrix} \cos \phi & 0 & \sin \phi \\ 0 & 1 & 0 \\ -\sin \phi & 0 & \cos \phi \end{pmatrix}$$

Die Komponenten eines Tensors 2. Stufe  $\chi_{lmn}$  transformieren sich entsprechend:

$$\chi'_{ijk} = \sum_{l,m,n} M_{il} M_{jm} M_{kn} \chi_{lmn} \quad (3.1)$$

Wenn der Tensor symmetrisch unter Rotationen um beliebige Winkel um die y-Achse ist, muss die Ableitung nach dem Winkel für alle Komponenten null sein:

$$\frac{\partial}{\partial \phi} \chi'_{ijk} = 0 \quad (3.2)$$

Nimmt man Hexagonalsymmetrie an, so muss die Ableitung jeweils für Drehungen um Vielfache von  $60^\circ$  gleich null sein.

Aus den Gleichungen 3.1 und 3.2 ergibt sich ein System von 27 Gleichungen, das sich mit Hilfe einer Algebra Software lösen lässt. Im folgenden sind die Eingaben für das Open-Source Programm MAXIMA ([maxima.sourceforge.net](http://maxima.sourceforge.net)) gezeigt.

### Berechnungen mit MAXIMA

Zunächst wird die Drehmatrix  $M$  definiert und für den Tensor  $\chi_{lmn}$  und den gedrehten Tensor  $\chi'_{ijk}$  je ein  $3 \times 3 \times 3$ -Array (Variable  $X$  bzw.  $Y$ ) angelegt. Die Nummerierung der Indizes beginnt hier bei 0 und läuft bis 2.

```
M: :matrix([cos(p),0,sin(p)], [0,1,0], [-sin(p),0,cos(p)]);
array(X,2,2,2);
array(Y,2,2,2);
```

Dann wird die Matrixmultiplikation nach Gleichung 3.1 für alle Tensorelemente durchgeführt:

```

for i:0 thru 2 do
for j:0 thru 2 do
for k:0 thru 2 do
Y[i,j,k]::sum(sum(sum(M[i+1,l+1]*M[j+1,m+1]*M[k+1,n+1]
*X[1,m,n],1,0,2),m,0,2),n,0,2);

```

Schließlich wird das Gleichungssystem mit den Bedingungen 3.2 aufgestellt und gelöst. Dazu werden `equations` und `solutions` als Liste angelegt; die Funktion `cons()` hängt für jedes Tensorelement eine neue Gleichung an die Liste `equations` an:

```

equations:[];
solutions:[];
for i:0 thru 2 do
for j:0 thru 2 do
for k:0 thru 2 do
equations:cons(diff(Y[i,j,k],p)=0,equations);
solutions:solve(equations);

```

Das Ergebnis enthält neben dem Winkel 7 freie Parameter und die folgenden 6 Bedingungen.  $\chi_{yyy}$  ist nicht festgelegt, alle anderen Komponenten sind null.

1.  $\chi_{yxx} = \chi_{yzz}$
2.  $\chi_{yxz} = -\chi_{yzx}$
3.  $\chi_{xyx} = -\chi_{zyz}$
4.  $\chi_{xyz} = -\chi_{zyx}$
5.  $\chi_{xxy} = -\chi_{zzy}$
6.  $\chi_{xzy} = -\chi_{zxy}$

Die einfachste grundlegende Symmetrie ist die Vertauschbarkeit der E-Feld Komponenten in Gleichung 2.9. Für die  $\chi^{(2)}$ -Tensorkomponenten folgt daraus nach Gleichung 2.11 die Bedingung:  $\chi_{ijk} = \chi_{ikj}$ .

Damit entfällt Lösung Nr. 2 sofort wegen  $\chi_{yxz} = \chi_{yzx} = -\chi_{yzx} = 0$ . Die Lösungen Nr. 3 und Nr. 5, sowie Nr. 4 und Nr. 6 lassen sich weiter zusammenfassen.

$$\chi_{yyy} \tag{3.3}$$

$$\chi_{yxx} = \chi_{yzz} \tag{3.4}$$

$$\chi_{xxy} = \chi_{xyx} = \chi_{zzy} = \chi_{zyz} \tag{3.5}$$

$$\chi_{xyz} = \chi_{xzy} = -\chi_{zyx} = -\chi_{zxy} \tag{3.6}$$

In zylindersymmetrischen Strukturen gibt es also nur 4 unabhängige Komponenten. Der  $\chi^{(2)}$ -Tensor nimmt damit die folgende Form an:

$$\begin{aligned}\chi_{1jk}^{(2)} &= \begin{pmatrix} 0 & \chi_{xxy} & 0 \\ \chi_{xxy} & 0 & \chi_{xyz} \\ 0 & \chi_{xyz} & 0 \end{pmatrix} \\ \chi_{2jk}^{(2)} &= \begin{pmatrix} \chi_{yxx} & 0 & 0 \\ 0 & \chi_{yyy} & 0 \\ 0 & 0 & \chi_{yxx} \end{pmatrix} \\ \chi_{3jk}^{(2)} &= \begin{pmatrix} 0 & -\chi_{xyz} & 0 \\ -\chi_{xyz} & 0 & \chi_{xxy} \\ 0 & \chi_{xxy} & 0 \end{pmatrix}\end{aligned}\quad (3.7)$$

Da die absolute Größe der Tensorcomponenten in unseren Messungen nicht zu bestimmen ist, betrachten wir im folgenden die Größe der einzelnen Komponenten in Relation zu  $\chi_{yxx}$ :

$$\gamma = \frac{\chi_{yyy}}{\chi_{yxx}}, \quad \kappa = \frac{\chi_{xxy}}{\chi_{yxx}}, \quad \zeta = \frac{\chi_{xyz}}{\chi_{yxx}} \quad (3.8)$$

Der  $\chi^{(2)}$ -Tensor nimmt damit die folgende Form an:

$$\chi_{1jk}^{(2)} = \begin{pmatrix} 0 & \kappa & 0 \\ \kappa & 0 & \zeta \\ 0 & \zeta & 0 \end{pmatrix} \quad \chi_{2jk}^{(2)} = \begin{pmatrix} 1 & 0 & 0 \\ 0 & \gamma & 0 \\ 0 & 0 & 1 \end{pmatrix} \quad \chi_{3jk}^{(2)} = \begin{pmatrix} 0 & -\zeta & 0 \\ -\zeta & 0 & \kappa \\ 0 & \kappa & 0 \end{pmatrix} \quad (3.9)$$

Die Symmetrie 2.11 erlaubt es, den Tensor alternativ in einer reduzierten Notation darzustellen:

$$d_{is}^{(2)} = \chi_{ijk}^{(2)}$$

Der Index  $i$  bezieht sich weiterhin auf die 3 Komponenten  $P_i$  des Polarisationsvektors, der Index läuft von 1 bis 6 und steht in folgender Beziehung zu  $j$  und  $k$ .

s	1	2	3	4	5	6
j	1	2	3	2	1	1
k	1	2	3	3	3	2

Die unabhängigen Tensorcomponenten sind in dieser Schreibweise  $d_{22}$ ,  $d_{21}$ ,  $d_{16}$  der  $d_{14}$  vereinfachte Tensor lautet vollständig:

$$d_{is}^{(2)} = \begin{pmatrix} 0 & 0 & 0 & \zeta & 0 & \kappa \\ 1 & \gamma & 1 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & \kappa & 0 & -\zeta \end{pmatrix} \quad (3.10)$$

Eine leicht abweichende Darstellung ergibt sich, wenn ein anderes Koordinatensystem gewählt wurde. Bei Rotationssymmetrie um die z-Achse, wie beschrieben in [PLOTNIKOV et al., 2006], sind die unabhängigen Komponenten  $d_{33}$ ,  $d_{31}$ ,  $d_{15}$  und  $d_{14}$ .

### 3.1.2 Annahme von Kleinman-Symmetrie?

Wie in Abschnitt 2.2.1 gesehen, bedeutet Kleinman Symmetrie einige Vereinfachung für den Fall, dass die Frequenzverdopplung verlustfrei abläuft. Meistens wird Kleinman Symmetrie als gegeben vorausgesetzt [BOTH et al., 2004, PLOTNIKOV et al., 2006]. Ob diese Annahme für die SHG Mikroskopie am Skelettmuskel tatsächlich gerechtfertigt ist, soll hier auch experimentell geprüft werden.

Wenn Kleinman-Symmetrie gilt, sind die Indices  $i, j, k$  der  $\chi^{(2)}$ -Tensorkomponenten frei permutierbar (Gleichung 2.12). Für rotationssymmetrischen Strukturen mit den Eigenschaften 3.3–3.6 muss dann also zusätzlich gelten:

$$\chi_{xyz} = \chi_{zyx} = \chi_{xzy} = -\chi_{zyx} = -\chi_{zxy} = 0$$

so dass Lösung in Gleichung 3.6 entfällt. Außerdem muss gelten, dass

$$\chi_{yxx} = \chi_{xxy}$$

so dass die Komponenten aus den Gleichungen 3.5 und 3.4 zusammenfallen. Damit bleiben nur  $\chi_{yyy}$  und  $\chi_{yxx}$  als unabhängige Komponenten.

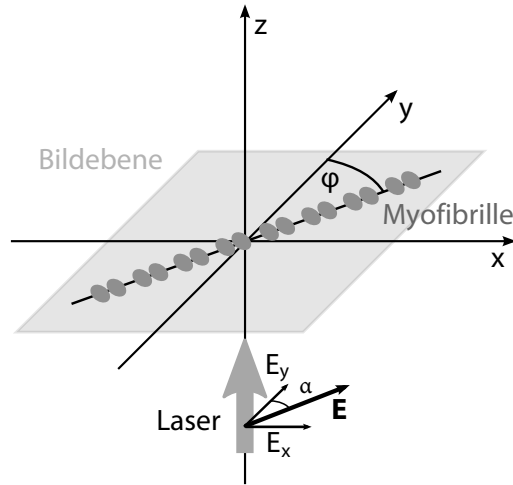
Das Verhältnis  $\gamma$  dieser beiden Komponenten nach Definition 3.8 ist bei Annahme von Kleinman-Symmetrie also die relevante Größe zur Beschreibung des  $\chi^{(2)}$ -Tensors für rotationssymmetrische Strukturen. In diesem Fall ist  $\kappa = 1$  und  $\zeta = 0$ . Der  $\chi^{(2)}$ -Tensor hat dann die folgende einfache Form bei Kleinman-Symmetrie:

$$\chi_{1jk}^{(2)} = \begin{pmatrix} 0 & 1 & 0 \\ 1 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 \end{pmatrix} \quad \chi_{2jk}^{(2)} = \begin{pmatrix} 1 & 0 & 0 \\ 0 & \gamma & 0 \\ 0 & 0 & 1 \end{pmatrix} \quad \chi_{3jk}^{(2)} = \begin{pmatrix} 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 1 \\ 0 & 1 & 0 \end{pmatrix}$$

Wenn Kleinman-Symmetrie nicht von vornherein angenommen wird, die Bedingungen dafür aber tatsächlich gegeben sind, ist zu erwarten, dass die Messwerte für  $\kappa$  und  $\zeta$  etwa bei 1 bzw. bei 0 liegen.

### 3.1.3 Einfaches E-Feld Modell

Die letzten Vereinfachungen in den Tensorkomponenten ergeben sich aus der Geometrie der Versuchsanordnung, wenn man die Rechnung für eine spezielle Anwendung durchführt. Das Koordinatensystem lässt sich beispielsweise so legen, dass der



**Abbildung 3.1 Geometrie der Versuchsanordnung.** Eine Myofibrille liegt in der  $xy$ -Ebene im Winkel  $\varphi$  zur  $y$ -Achse. Der Laserstrahl verläuft entlang der  $z$ -Achse und ist linear polarisiert in einem Winkel  $\alpha$  zur  $y$ -Achse.

Laserstrahl entlang der  $z$ -Achse verläuft und das Licht so in der  $xy$ -Ebene polarisiert ist, dass die Schwingungsebene des Lichts einen Winkel  $\alpha$  mit der  $y$ -Achse bildet (siehe Abbildung 3.1). Die Symmetrieachse der Myofibrille soll in der  $xy$ -Ebene liegen und einen Winkel  $\varphi$  mit der  $y$ -Achse bilden.

Lässt man den Einfluss der Fokussierung des  $E$ -Feldes durch die Optik des Objektivs zunächst außer acht, sind die Komponenten des  $E$ -Feldes  $E_x$ ,  $E_y$ ,  $E_z$  in dieser Anordnung:

$$\begin{aligned} E_x &= E \sin \alpha \\ E_y &= E \cos \alpha \\ E_z &= 0 \end{aligned} \quad (3.11)$$

Die Polarisierung 2. Ordnung ergibt sich dann aus Gleichung 2.9 und den gezeigten Vereinfachungen 3.3–3.6 für die Rotationssymmetrie:

$$\begin{aligned} P_x &= 2\chi_{xxy}E_xE_y + 2\chi_{xyz}E_yE_z \\ P_y &= \chi_{yyy}E_y^2 + \chi_{yxx}E_x^2 + \chi_{yxx}E_z^2 \\ P_z &= -2\chi_{xyz}E_xE_y + 2\chi_{xxy}E_yE_z \end{aligned}$$

Mit den angenommenen Komponenten 3.11 des  $E$ -Feldes, ergibt sich bei  $\varphi = 0$ :

$$\begin{aligned} P_x &= E^2 (\chi_{xxy} \sin 2\alpha) \\ P_y &= E^2 (\chi_{yyy} \cos^2 \alpha + \chi_{yxx} \sin^2 \alpha) \\ P_z &= -E^2 (\chi_{xyz} \sin 2\alpha) \end{aligned} \quad (3.12)$$

Eine experimentelle Prüfung lässt sich also durchführen, indem der Winkel  $\alpha$  der Eingangspolarisation variiert und die entstehende Polarisation 2. Ordnung gemessen wird. Das Koordinatensystem ließe sich dabei jeweils willkürlich so legen, dass die Faser entlang der  $y$ -Achse liegt.

Sinnvoller ist allerdings die Wahl eines raumfesten Koordinatensystems. Für die zeilenweise aufgebauten Aufnahmen eines Konfokalmikroskops bietet es sich beispielsweise an, die  $x$ -Achse entlang der Zeilen zu legen. Da für die Gleichungen 3.12 die  $y$ -Achse entlang der Faserachse gelegt wurde, muss für das neue Koordinatensystem noch der Winkel  $\varphi$  zwischen Faser und  $y$ -Achse berücksichtigt werden, so dass der Winkel  $\alpha$  in allen Termen durch  $(\alpha - \varphi)$  ersetzt werden muss.

Die eigentliche Messgröße ist in jedem Fall aber die Intensität eines Signals und damit proportional zum Quadrat der Polarisation:

$$I \propto \mathbf{P}^2 = P_x^2 + P_y^2 + P_z^2$$

Der Proportionalitätsfaktor lässt sich zum Fitten der experimentellen Daten durch eine Konstante  $B$  ausdrücken. Da für die Tensorkomponenten  $\chi_{ijk}$  keine absoluten Werte ermittelt werden können, bietet es sich an, die relative Größe der Komponenten gemäß der Definition 3.8 zu verwenden:

$$\gamma = \frac{\chi_{yyy}}{\chi_{yxx}}, \quad \kappa = \frac{\chi_{xxy}}{\chi_{yxx}}, \quad \zeta = \frac{\chi_{xyz}}{\chi_{yxx}}$$

Fasst man zudem  $\kappa^2 + \zeta^2 := k^2$  zusammen, kann die Gesamtintensität des SHG Signals durch folgende Formel beschrieben werden:

$$I_{\text{SHG}}(\alpha) = B \left[ \left( \sin^2(\alpha - \varphi) + \gamma \cos^2(\alpha - \varphi) \right)^2 + k^2 \sin^2 2(\alpha - \varphi) \right] + C \quad (3.13)$$

Gleichung 3.13 wird später als Fitfunktion für die experimentell gewonnenen Daten verwendet. Die Intensität des Hintergrunds  $C$  kann dabei einzeln gemessen und vorher abgezogen werden. Als Startwert für  $B$  setzt man den Messwert bei  $\alpha - \varphi = 90^\circ$  an, da für diesen Winkel die beiden Terme mit  $\gamma$  und  $k$  wegfallen. Damit bleiben  $\gamma$ ,  $k$  und  $\varphi$  als freie Parameter für den Fit.

Wenn Kleinman-Symmetrie vorliegt, ist  $\kappa = 1$  und  $\zeta = 0$ , also auch  $k = 1$ . Die Orientierungsabhängigkeit des SHG Signals kann dann in dieser Form beschrieben werden:

$$I_{\text{SHG,KL}}(\alpha) = B_{\text{KL}} \left[ \left( \sin^2(\alpha - \varphi) + \gamma_{\text{KL}} \cos^2(\alpha - \varphi) \right)^2 + \sin^2 2(\alpha - \varphi) \right] + C \quad (3.14)$$

Der Winkel  $\varphi$  kann alternativ auch einzeln ermittelt werden, indem man eine Parabel an das Minimum der SHG-Intensität fittet. Anschließend kann eine neue Winkel-Koordinate  $\alpha' = \alpha - \varphi$  eingeführt werden. Zudem lassen sich Messdaten mit dem

Faktor  $1/B_{KL}$  skalieren, nachdem der Hintergrund  $C$  abgezogen wurde. Damit ergibt sich für einheitlich skalierte Messdaten die einfachste Form von Gleichung 3.14:

$$I_{\text{simp}}(\alpha') = (\sin^2 \alpha' + \gamma_{KL} \cos^2 \alpha')^2 + (\sin 2\alpha')^2 \quad (3.15)$$

Ob tatsächlich Kleinman-Symmetrie vorliegt und die Vereinfachung  $k = 1$  gemacht werden kann, oder ob sich signifikant bessere Fitresultate aus Gleichung 3.13 mit  $k \neq 1$  ergeben, sollen die Experimente zeigen.

### 3.1.4 Erweitertes E-Feld Modell

Hinter dem bisherigen einfachen Modell stand die Annahme aus Gleichung 3.11, dass das elektrische Feld keine Feldkomponenten  $E_z$  in Ausbreitungsrichtung des Lasers hat. Durch die starke Fokussierung des Lasers bei hohen numerischen Aperturen, kann das elektrische Feld im Fokus aber Komponenten  $E_x$ ,  $E_y$ ,  $E_z$  in jeder Richtung haben, auch wenn der Laser in der Aperturebene beispielsweise ausschließlich in  $y$ -Richtung polarisiert ist. Dies hat einen erheblichen Einfluss auf die Charakteristik der erzeugten SHG Signale [ASATRYAN et al., 2004, YEW und SHEPPARD, 2006].

Daher soll hier ein erweitertes Modell für die Polarisationsabhängigkeit des SHG Signals entwickelt werden, das die vollständige Feldverteilung des elektrischen Feldes eines Laserstrahls im Fokus eines Objektivs berücksichtigt. Wie in Abschnitt 2.1.1 gesehen, lässt sich für jeden Punkt  $\mathbf{r}$  in der Umgebung des Fokus das elektrische Feld  $\mathbf{E}(\mathbf{r})$  mit Hilfe der Kenndaten des Abbildungssystems berechnen.

In einem nichtlinearen optischen Medium kann durch dieses elektrische Feld eine Polarisation 2. Ordnung  $\mathbf{P}^{(2)}(\mathbf{r})$  angeregt werden. In einem Abstand  $R$ , der groß gegenüber den Abmessungen der Probe im Fokus ist, resultiert aus dieser Polarisation ein elektrisches Fernfeld  $\mathbf{E}^{(2)}$ . An einem Punkt mit den Koordinaten  $(R, \theta, \phi)$  kann das elektrische Fernfeld durch Integration über das Fokusvolumen ( $FV$ ) wie folgt berechnet werden:

$$\mathbf{E}^{(2)}(R, \theta, \phi) = \frac{e^{i2kR}}{R} \int_{FV} e^{-i2k \frac{\mathbf{R} \cdot \mathbf{r}}{R}} \mathbf{M} \cdot \mathbf{P}^{(2)}(\mathbf{r}) dV \quad (3.16)$$

Da hier die frequenzverdoppelten Wellen summiert werden, ist der Wellenvektor  $2k$ . Zur Umrechnung von  $\mathbf{r}$  zwischen kartesischen Koordinaten und Polarkoordinaten wird die Matrix  $\mathbf{M}$  benötigt [NOVOTNY, 1997]:

$$\mathbf{M} = \begin{bmatrix} 1 - \cos^2 \phi \sin^2 \theta & -\sin \phi \cos \phi \sin^2 \theta & -\cos \phi \sin \theta \cos \theta \\ -\sin \phi \cos \phi \sin^2 \theta & 1 - \sin^2 \phi \sin^2 \theta & -\sin \phi \sin \theta \cos \theta \\ -\cos \phi \sin \theta \cos \theta & -\sin \phi \sin \theta \cos \theta & \sin^2 \theta \end{bmatrix}$$



Der Energiefluss des Feldes wird durch den Poynting-Vektor beschrieben. Die Richtung des Poynting-Vektors ist  $\mathbf{R}/R$ , sein Betrag ergibt sich für eine transversal elektromagnetische Welle im Fernfeld als

$$|\mathbf{S}| = \frac{1}{2} \sqrt{\frac{\varepsilon}{\mu}} \mathbf{E}^* \cdot \mathbf{E}$$

wobei  $\varepsilon$  und  $\mu$  die dielektrische und die magnetische Leitfähigkeit sind, und  $E^*$  die komplex konjugierten Komponenten des elektrischen Feldes meint. Der gesamte SHG Energiefluss ist proportional zum Integral von  $\mathbf{S}$  über die Aperturfläche des Kondensatorobjektivs, welches das transmittierte Signal sammelt. Es gilt also:

$$I_{ges} \propto \int_{Ap.} \mathbf{S} \cdot d\mathbf{A} \propto \int_{Ap.} \sum_i E_i^{(2)*} E_i^{(2)} R^2 \sin \theta d\theta d\phi$$

Setzt man hier nun Gleichung 3.16 ein, so ergibt sich folgender Ausdruck:

$$I_{ges} \propto \int_{Ap.} \sin \theta d\theta d\phi \sum_i \int_{FV} d^3 r' e^{i2k \frac{\mathbf{R} \cdot \mathbf{r}'}{R}} \sum_j M_{ij}^* P_j^{(2)*}(\mathbf{r}') \int_{FV} d^3 r e^{-i2k \frac{\mathbf{R} \cdot \mathbf{r}}{R}} \sum_m M_{im} P_m^{(2)}(\mathbf{r})$$

Die Polarisation 2. Ordnung ergibt sich aus dem bekannten Zusammenhang 2.9:

$$P_j^{(2)}(\mathbf{r}') = \sum_{kl} \chi_{jkl}^{(2)}(\mathbf{r}') E_k(\mathbf{r}') E_l(\mathbf{r}')$$

$$P_m^{(2)}(\mathbf{r}) = \sum_{no} \chi_{mno}^{(2)}(\mathbf{r}) E_n(\mathbf{r}) E_o(\mathbf{r})$$

Die Gesamtintensität der SHG Signale aus dem Fokusvolumen durch die Aperturfläche des Kondensators ist also:

$$I_{ges} \propto \int_{Ap.} \sin \theta d\theta d\phi \sum_i \int_{FV} d^3 r' e^{i2k \frac{\mathbf{R} \cdot \mathbf{r}'}{R}} \sum_j M_{ij}^* \sum_{kl} \chi_{jkl}^{(2)*} E_k^*(\mathbf{r}') E_l^*(\mathbf{r}')$$

$$\int_{FV} d^3 r e^{-i2k \frac{\mathbf{R} \cdot \mathbf{r}}{R}} \sum_m M_{im} \sum_{no} \chi_{mno}^{(2)} E_n(\mathbf{r}) E_o(\mathbf{r}) \quad (3.17)$$

Vereinfachend kann man nun zunächst annehmen, dass die Probe homogen und der Tensor  $\chi_{jkl}^{(2)}(\mathbf{r}) = \chi_{jkl}^{(2)}$  unabhängig von  $\mathbf{r}$  ist. In diesem Fall können der  $\chi^{(2)}$ -Tensor und Summierung aus dem Integral gelöst werden. Für die Volumenintegrale bietet sich dann eine verkürzende Schreibweise an:

$$V_{kl}^*(\theta, \phi) := \int_{FV} d^3 r' e^{i2k \frac{\mathbf{R} \cdot \mathbf{r}'}{R}} E_k^*(\mathbf{r}') E_l^*(\mathbf{r}')$$

$$V_{no}(\theta, \phi) := \int_{FV} d^3 r e^{-i2k \frac{\mathbf{R} \cdot \mathbf{r}}{R}} E_n(\mathbf{r}) E_o(\mathbf{r}) \quad (3.18)$$

Fasst man gleichzeitig noch die Matrizen zusammen durch  $\sum_i M_{ji}M_{im} = M_{jm}$  (da  $M_{ji} = M_{ij}$ ), nimmt Gleichung 3.17 die folgende Form an:

$$I_{ges} \propto \sum_{jklmno} \chi_{jkl}^{(2)*} \chi_{nmo}^{(2)} \int_{Ap.} \sin \theta \, d\theta \, d\phi M_{jm} V_{kl}^* V_{no}$$

Zu jeder Kombination von Elementen aus  $\chi^{(2)*}$  und  $\chi^{(2)}$ , lässt sich nun also ein Faktor  $T_{jklmno}$  errechnen, der nur von der E-Feld Verteilung im Fokusbereich abhängt:

$$I_{ges} \propto \sum_{jklmno} \chi_{jkl}^{(2)*} \chi_{nmo}^{(2)} T_{jklmno}$$

$$T_{jklmno} = \int_{Ap.} \sin \theta \, d\theta \, d\phi M_{jm} V_{kl}^* V_{no} \quad (3.19)$$

Der Tensor  $\mathbf{T}$  hat  $3^6$  Tensorelemente  $T_{jklmno}$ , von denen der größte Teil für die Berechnung der SHG Intensität nicht relevant ist, da die zugehörigen Elemente  $\chi_{jkl}^*$  oder  $\chi_{mno}$  null sind. Für rotationssymmetrische Strukturen wurde in Abschnitt 3.1.1 gezeigt, dass nur die folgenden 11 Tensorkomponenten ungleich null sind:  $\chi_{yyy}, \chi_{yxx} = \chi_{yzz}, \chi_{xxy} = \chi_{xyx} = \chi_{zzy} = \chi_{zyz}, \chi_{xyz} = \chi_{xzy} = -\chi_{zyx} = -\chi_{zxy}$  (Gleichungen 3.3–3.6). Die zugehörigen Elemente  $T_{jklmno}$  können nun numerisch berechnet werden.

## Berechnungen mit MATLAB

Zur Berechnung des elektrischen Feldes im Objektivfokus wurde die MATLAB Toolbox 'Electromagnetic field in the focus region of a microscope objective' (Abk. *EFF*) von Marcel Leutenegger verwendet [LEUTENEGGER et al., 2006].

Als *Standard-Konfiguration* wurden die folgenden Kenngrößen des Mikroskopie-Systems verwendet, wie sie in Abschnitt 3.3.1 detaillierter beschrieben sind: 63×-Objektiv; Wasserimmersion  $n_m = 1,33$ ; Numerische Apertur  $NA = 1,2$ ; Aperturdurchmesser  $D_a = 9,5$  mm; Laserwellenlänge  $\lambda = 880$  nm; Strahldurchmesser an der Rückapertur  $w_a = 5,5$  mm; Tubuslänge des Mikroskops  $f_t = 200$  mm.

Für die numerische Berechnung des E-Feldes muss ein sinnvolles Raster angelegt werden, das einen Kompromiss aus Präzision und aufzuwendender Rechenzeit darstellt. Als Größenbereich des numerischen Fokusbereichs wurden in der xy-Ebene  $\pm 2 \mu\text{m}$  um den Fokuspunkt und entlang der z-Achse  $\pm 5 \mu\text{m}$  um den Fokuspunkt gewählt. Die Voxelgröße des Rasters betrug  $25 \text{ nm} \times 25 \text{ nm} \times 50 \text{ nm}$ . Die Rastergröße für die Apertur war in der *auto*-Einstellung  $85 \times 85$  Punkte. Die genannten Angaben bildeten die Basiskonfiguration für die Berechnungen. Um den Einfluss von Laser Strahldurchmesser oder numerischer Rastergröße auf die Berechnungen zu untersuchen, wurden zusätzliche Konfigurationen erstellt und ausgewertet, in denen jeweils einer der genannten Parameter variiert wurde.

Für jede Konfiguration wurde zunächst das elektrische Feld  $\mathbf{E}(x, y, z)$  im Fokusbereich berechnet. Daraus wurden über die Volumenintegrale  $V_{kl}^*$  und  $V_{no}$  nach Gleichung (3.18) numerisch die 729 Tensorelemente  $T_{ijklmno}$  nach Gleichung (3.19) ermittelt. Für den Winkel  $\theta$  wurde dabei ein Raster mit Schrittweite  $2^\circ$  im Bereich von  $0^\circ$  bis  $90^\circ$  gewählt, für den Winkel  $\phi$  ein Raster mit Schrittweite  $4^\circ$  im Bereich von  $0^\circ$  bis  $360^\circ$ .

### Rotation der Probe

Gleichung 3.14 beschreibt die Abhängigkeit der SHG Intensität  $I_{SHG}$  von den Winkeln  $\alpha$  (Polarisationsebene des Lasers) und  $\varphi$  (Orientierung der Faserachse) im einfachen E-Feld Modell bei Annahme von Kleinman-Symmetrie. Experimentell wird diese Abhängigkeit durch eine Drehung der Polarisationsebene des Lasers gemessen (siehe Abschnitt 3.3.2). Mathematisch und physikalisch äquivalent ist eine Rotation der Probe und damit eine Drehtransformation ihres  $\chi^{(2)}$ -Tensors gemäß Gleichung 3.1.

Die Anwendung der Drehtransformation auf  $\chi_{jkl}^{(2)*}$   $\chi_{nmo}^{(2)}$  ergibt eine umfangreiche Zahl von Termen, die nach Potenzen  $f$  von  $\cos(\alpha - \varphi)$  und Potenzen  $g$  des Parameters  $\gamma$  geordnet werden können. Mit Hilfe der numerisch berechneten Tensorelemente  $T_{ijklmno}$  lässt sich aus Gleichung 3.19 nun auch im erweiterten E-Feld Modell ein Ausdruck für die SHG Intensität  $I_{SHG}$  ableiten:

$$I_{SHG,kl}^{ext} = B' [(\eta_{0,2}\gamma^2 + \eta_{0,1}\gamma + \eta_{0,0}) \cos^0(\alpha - \varphi) + (\eta_{2,2}\gamma^2 + \eta_{2,1}\gamma + \eta_{2,0}) \cos^2(\alpha - \varphi) + (\eta_{4,2}\gamma^2 + \eta_{4,1}\gamma + \eta_{4,0}) \cos^4(\alpha - \varphi) + (\eta_{6,2}\gamma^2 + \eta_{6,1}\gamma + \eta_{6,0}) \cos^6(\alpha - \varphi)] + C \quad (3.20)$$

$\eta_{f,g}$  sind die numerisch berechneten Koeffizienten für jeden der einzelnen Summanden  $\gamma^g \cos^f(\alpha - \varphi)$ . Die Ergebnisse der Berechnungen werden in Abschnitt 4.2.1 erläutert. Es stellt sich dabei heraus, dass die Koeffizienten  $\eta_{6,g}$ ,  $\eta_{0,2}$  und  $\eta_{0,1}$  sehr klein sind und daher näherungsweise auf null gesetzt werden können. Wenn ohne Beschränkung zusätzlich  $B_{KL} = B'\eta_{0,0}$  gesetzt wird, haben  $B_{KL}$ ,  $\alpha$ ,  $\varphi$  und  $C$  die gleiche Bedeutung wie in Gleichung 3.14. Die beiden Gleichungen 3.14 und 3.20 haben dann die gleiche gemeinsame Form:

$$I_{SHG} = B [1 + b_2 \cos^2(\alpha - \varphi) + b_4 \cos^4(\alpha - \varphi)] + C$$

Gleichung 3.14 für das einfache Modell lässt sich ohne Schwierigkeiten in diese Form bringen, indem die Sinus-Terme in Cosinus-Terme umgewandelt werden und die

Gleichung nach Potenzen von Cosinus sortiert wird. Es ergibt sich dann:

$$I_{SHG}^{sim} = B_{KI} \left[ 1 + (2\gamma + 2) \cos^2(\alpha - \varphi) + (\gamma^2 - 2\gamma - 3) \cos^4(\alpha - \varphi) \right] + C$$

Die oben eingeführten Koeffizienten  $\eta_{n,g}$  lauten also für das einfache Modell:

$$\eta_{0,0} = 1, \quad \eta_{2,0} = 2, \quad \eta_{2,1} = 2, \quad \eta_{4,0} = -3, \quad \eta_{4,1} = -2, \quad \eta_{4,2} = 2$$

### 3.1.5 Dipole auf einer $\alpha$ -Helix

Eine Gemeinsamkeit der SHG Emitter Myosin-II und Collagen-I sind die helixförmigen Proteinstrukturen, die die Basis der Filamente bilden (vgl. Abbildung 2.13). Es ist also naheliegend, Helices als mögliche Quelle der SHG Signale zu untersuchen. Als einfaches Modell kommen SHG Dipole in Frage, die entlang der Steigung der Helix orientiert sind.

Der  $\beta^{(2)}$ -Tensor für einen einzelnen in  $y'$ -Richtung orientierten SHG Dipol ist nur in der Komponente  $\beta_{y'y'y'}$  verschieden von null.

Liegt die Achse der Helix in  $y$ -Richtung und der SHG Dipol auf der Helix, lässt sich dessen Lage über zwei Winkel beschreiben: den Azimutalwinkel  $\theta$ , der dem Gangwinkel  $\theta$  der Helix entspricht, und der Polarwinkel  $\phi$ , der über die gesamte Helix alle Werte von 0 bis  $2\pi$  annimmt. Zur Transformation zwischen dem Koordinatensystem des Dipols und dem der Helix sind also zwei Drehmatrizen nötig:

$$M_{\theta} = \begin{pmatrix} \cos \theta & -\sin \theta & 0 \\ \sin \theta & \cos \theta & 0 \\ 0 & 0 & 1 \end{pmatrix} \quad \text{und} \quad M_{\phi} = \begin{pmatrix} \cos \phi & 0 & \sin \phi \\ 0 & 1 & 0 \\ -\sin \phi & 0 & \cos \phi \end{pmatrix}$$

Der  $\chi^{(2)}$ -Tensor für ein System aus  $N$  Einzeldipolen  $\beta_{y'y'y'}$  auf einer Helix lässt sich damit errechnen.

#### Berechnungen mit MAXIMA

Die Berechnung mit MAXIMA funktioniert analog zu den Betrachtungen zur Rotationssymmetrie. Zunächst werden die Rotationsmatrizen definiert:

```
Mt::matrix([cos(t),-sin(t),0],[sin(t),cos(t),0],[0,0,1]);
Mp::matrix([cos(p),0,sin(p)],[0,1,0],[-sin(p),0,cos(p)]);
```

Dann werden die leeren Tensor-Arrays deklariert und der Ausgangstensor gefüllt. Nur die Komponente  $\chi_{yyy}$  ist ungleich null.

```
array(X0,2,2,2);
fillarray(X0,[0,0,0, 0,0,0, 0,0,0,
              0,0,0, 0,yyy,0, 0,0,0,
              0,0,0, 0,0,0, 0,0,0]);
```

Nun wird die erste Matrixmultiplikation für die Rotation um den Winkel  $\theta$  um die  $z$ -Achse nach Gleichung 3.1 für alle Tensorelemente durchgeführt :

```
for i:0 thru 2 do
for j:0 thru 2 do
for k:0 thru 2 do
X1[i,j,k]::sum(sum(sum(Mt[i+1,l+1]*Mt[j+1,m+1]*Mt[k+1,n+1]
                      *X0[l,m,n],1,0,2),m,0,2),n,0,2);
```

Dann folgt die zweite Rotation um den Winkel  $\phi$  um die  $y$ -Achse und die Integration über alle Winkel  $\phi$  von 0 bis  $2\pi$ . Das Integral wird mit  $1/2\pi$  normiert.

```
for i:0 thru 2 do
for j:0 thru 2 do
for k:0 thru 2 do
X2[i,j,k]::integrate(
  sum(sum(sum(Mp[i+1,l+1]*Mp[j+1,m+1]*Mp[k+1,n+1]
              *X1[l,m,n],1,0,2),m,0,2),n,0,2),
  phi, 0, 2*%pi) / (2*%pi);
```

Für das System von  $N$  Einzeldipolen  $\beta_{y'y'y'}$  auf einer Helix ergibt sich dann ein  $\chi^{(2)}$ -Tensor mit

$$\begin{aligned}\chi_{yyy} &= N \cdot \cos^3 \theta \cdot \beta_{y'y'y'} \\ \chi_{yxx} &= \frac{N}{2} \cdot \cos \theta \sin^2 \theta \cdot \beta_{y'y'y'}\end{aligned}\quad (3.21)$$

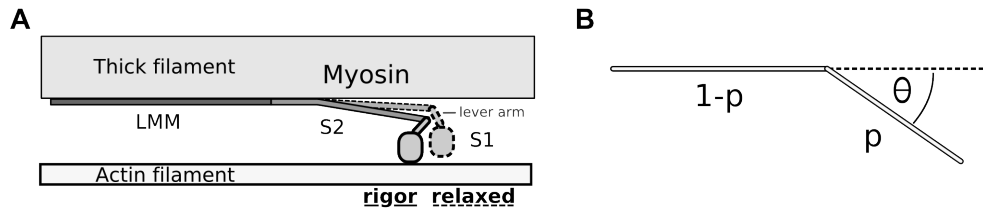
Für die weiteren Komponenten gilt:

$$\chi_{yxx} = \chi_{yzz} = \chi_{xxy} = \chi_{xyx} = \chi_{zzy} = \chi_{zyz}$$

Alle verbleibende Komponenten sind null, insbesondere auch  $\chi_{xyz}$ . Der Parameter  $\gamma$  wie in 3.8 definiert, ergibt sich aus Gleichung 3.21 als:

$$\gamma_\alpha = 2/\tan^2 \theta$$

Der Parameter  $\gamma$  hängt in diesem Modell also nur vom Gangwinkel  $\theta$  der Helix ab. Für die anderen Parameter gilt  $\kappa = 1$  und  $\zeta = 0$ .



**Abbildung 3.2** Abknickmodell zur Auslenkung von Molekülen aus der Symmetrieachse. (A) Situation beim Myosinmolekül: zum einen wird der Lever-arm rotiert und zum anderen eventuell ein Teil der S2-Region ausgeknickt. Die genauen Details sind noch ungeklärt. (B) Vereinfachte Modellannahme: ein Teil  $p$  eines Moleküls wird um einen Winkel  $\theta$  von der Achse ausgeknickt.

### Coiled-coil aus zwei Helices

Im Myosin-II Molekül sind die  $\alpha$ -Helices zweier Myosinrods zu einem Coiled-Coil verdrillt (siehe Abschnitt 2.4.2). Jede Helix ist also nochmal in Form einer größeren Superhelix mit Gangwinkel  $\Theta$  verdreht.

Aus dem  $\chi^{(2)}$ -Tensor für eine  $\alpha$ -Helix, kann man mit den gleichen Berechnungen wie im vorangegangenen Abschnitt der  $\chi^{(2)}$ -Tensor für einen Coiled-Coil berechnet werden. Für den Parameter  $\gamma$  ergibt sich dann:

$$\gamma_{cc} = -\frac{6 \sin^2 \Theta \sin^2 \theta + 4 \cos^2 \Theta \cos^2 \theta}{(5 \sin^2 \Theta - 2) \sin^2 \theta - 2 \sin^2 \Theta}$$

Nun hängt der Parameter  $\gamma$  vom Gangwinkel  $\theta$  der  $\alpha$ -Helix und vom Gangwinkel  $\Theta$  der Coiled-Coil Superhelix ab. Für die anderen Parameter gilt weiterhin  $\kappa = 1$  und  $\zeta = 0$ . Die durch die Kleinman-Symmetrie gegebene Forderung ist hier also erfüllt.

### 3.1.6 Abknickmodell

In den Experimenten zeigte sich, dass der  $\chi^{(2)}$ -Tensor für Myofibrillen im Rigor- und Relaxed-Zustand unterschiedlich ist (siehe Ergebnis 4.1.2). Wie in Abschnitt 2.4.4 diskutiert, findet im Übergang zwischen beiden Zuständen ein Abklappen des Lever arms in der Halsregion des Moleküls statt. Zudem ist, wie in Abbildung 3.2 skizziert, auch eine Auslenkung der S2 Domain von der Symmetrieachse möglich.

Mit Hilfe eines einfachen Modells soll nun abgeschätzt werden, welchen Einfluss ein solches Abklappen oder eine kleine Auslenkung von Teilen eines Moleküls aus der Symmetrieachse auf den  $\chi^{(2)}$ -Tensor des Systems haben kann.

Dazu nehmen wir an, dass ein Teil  $p$  des Moleküls um einen Winkel  $\beta$  ausgelenkt wird. Der Rest  $1 - p$  verbleibt in der Symmetrieachse. Das Ganze soll rotationssymmetrisch um die  $y$ -Achse in beliebigen polaren Winkeln  $\phi$  stattfinden. Im Fall  $\beta = 0$  soll der  $\chi^{(2)}$ -Tensor durch zwei Parameter  $\gamma_0$  und  $\kappa_0$  definiert sein, für alle anderen Winkel  $\beta$  ergeben sich dann effektive Parameter  $\gamma_{\text{eff}}$ ,  $\kappa_{\text{eff}}$  und  $\zeta_{\text{eff}}$ , die sich wie folgendermaßen berechnen lassen.

### Berechnung mit MAXIMA

Wie bei den vorangegangenen Berechnungen werden zunächst wieder die Rotationsmatrizen definiert:

```
Mb::matrix([cos(b),-sin(b),0],[sin(b),cos(b),0],[0,0,1]);
Mp::matrix([cos(p),0,sin(p)],[0,1,0],[-sin(p),0,cos(p)]);
```

Dann werden die Tensoren definiert und der Ausgangstensor gemäß Gleichung 3.9 mit Parametern  $\gamma$ ,  $\kappa$  und  $\zeta$  initialisiert:

```
array(X0,2,2,2);
fillarray(X0,[0,kappa,0,kappa,0,zeta,0,zeta,0,
1,0,0,0,gamma,0,0,0,1,
0,-zeta,0,-zeta,0,kappa,0,kappa,0]);
```

Wie in Abschnitt 3.1.5 wird die erste Matrixmultiplikation für die Rotation um den Winkel  $\beta$  um die  $z$ -Achse nach Gleichung 3.1 für alle Tensorelemente durchgeführt:

```
for i:0 thru 2 do
for j:0 thru 2 do
for k:0 thru 2 do
X1[i,j,k]::sum(sum(sum(Mb[i+1,1+1]*Mb[j+1,m+1]*Mb[k+1,n+1]
*X0[1,m,n],1,0,2),m,0,2),n,0,2);
```

Dann folgt die zweite Rotation um den Winkel  $\phi$  um die  $y$ -Achse und die Integration über alle Winkel  $\phi$  von 0 bis  $2\pi$ . Das Integral wird mit  $1/2\pi$  normiert.

```
for i:0 thru 2 do
for j:0 thru 2 do
for k:0 thru 2 do
X2[i,j,k]::integrate(
sum(sum(sum(Mp[i+1,1+1]*Mp[j+1,m+1]*Mp[k+1,n+1]
*X1[1,m,n],1,0,2),m,0,2),n,0,2),
phi,0,2*%pi)/(2*%pi);
```

Aus den Komponenten des Ergebnistensors können nun effektive Parameter  $\gamma_{\text{eff}}(\beta)$ ,  $\kappa_{\text{eff}}(\beta)$  und  $\zeta_{\text{eff}}(\beta)$  abgeleitet werden:

$$\begin{aligned} \gamma_{\text{eff}} &: X2[1,1,1] / X2[1,0,0] \\ \kappa_{\text{eff}} &: X2[0,0,1] / X2[1,0,0] \\ \zeta_{\text{eff}} &: X2[0,1,2] / X2[1,0,0] \end{aligned}$$

Die Ergebnisse werden in Abschnitt 4.2.3 unter der zusätzlichen Annahme von Kleinman Symmetrie diskutiert.

## 3.2 Präparation

### 3.2.1 Myofibrillen

Der wesentliche Vorteil von Myofibrillen gegenüber kompletten Muskelzellen ist ihr geringer Durchmesser von nur ca. 1  $\mu\text{m}$ . SHG Signale, die in einzelnen Sarkomeren entstehen, werden nicht durch weitere Signale überlagert. Die Orientierung von Myofibrillen auf einem Deckglas ist leicht bestimmbar.

Myofibrillen wurden aus der Schienenbeinmuskulatur (*Tibialis anterior*) von C57BL6 Mäusen gewonnen. Einzelne Myofibrillen können aus ganzen Muskeln durch Zerkleinerung im Mixer hergestellt werden. Dazu wurde der komplette Muskel zunächst von Sehnen befreit und dann mit dem Skalpell grob zerteilt. Die Stücke wurden mit 2 ml Rigor Lösung (siehe Tabelle 3.1) in ein Sarstedt-Röhrchen gegeben und ca. 20 Sekunden im Ultra-Turrax gemixt. Da viele Zellmembranen, insbesondere das sarkoplasmatische Reticulum (Calcium-Speicher), dabei bereits zerrissen werden, muss ein  $\text{Ca}^{2+}$ -Puffer (EGTA) in der Lösung den Anstieg der  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration abfangen, um eine Muskelkontraktion zu verhindern.

Durch Zentrifugieren (10 Minuten bei 1000 g) wurden die schwereren Myofibrillen von Blut und anderen Zellbestandteilen im Überstand getrennt. Das Pellet wurde wieder in Rigor-Lösung aufgenommen, diesmal zusätzlich mit 0,5 % Triton-X-100 um alle Lipid-Membranen aufzulösen. Bei diesem Schritt ist wiederum der Calcium-Puffer besonders wichtig. Das Präparat wurde dann erneut im Ultra-Turrax zerkleinert und das Triton anschließend durch Zentrifugieren und Aufnehmen in Rigor Lösung wieder ausgewaschen. Schließlich folgte ein letzter Zentrifugierschritt und die Myofibrillen wurden in Rigor oder Relaxing Lösung aufgenommen. Die verwendete Menge von Lösung wurde so bemessen, dass die Myofibrillen auf einem Deckglas möglichst einzeln und nebeneinander lagen.



**Tabelle 3.1** Zusammensetzung der verwendeten physiologischen Lösungen

Rigor	140 mM K-Glutamat 10 mM Hepes	10 mM MgCl <sub>2</sub>	2 mM EGTA <i>pH 7.0</i>
Relaxing	140 mM K-Glutamat 5 mM Na <sub>2</sub> ATP 10 mM Hepes	5,4 mM MgCl <sub>2</sub> 5 mM Na <sub>2</sub> CP 5 mM Glucose	0,5 mM EGTA 0,1 mM CaCl <sub>2</sub> <i>pH 7.0</i>
HR+BTS	66 mM K-OH 8 mM Na <sub>2</sub> ATP 30 mM Hepes	8,1 mM MgOH <sub>2</sub> 10 mM Na <sub>2</sub> CP 0,1 mM BTS	30 mM EGTA 1 nM CaCO <sub>3</sub> <i>pH 7.0</i>
HA+BTS	66 mM K-OH 8 mM Na <sub>2</sub> ATP 30 mM Hepes	7,5 mM MgOH <sub>2</sub> 10 mM Na <sub>2</sub> CP 0,1 mM BTS	30 mM EGTA 30 mM CaCO <sub>3</sub> <i>pH 7.0</i>

Wenn die Myofibrillen fest am Deckglas haften sollten, wurden sie in einer Zentrifuge für 2 Minuten bei 1000 U/min (650 g) auf das Deckglas zentrifugiert. Dies ist vor allem wichtig, wenn während der Messung, die Lösung gewechselt werden soll.

Zur Untersuchung des weak-binding Zustandes wurden die Lösungen HR+BTS (High relaxing) und HA+BTS (High activating) verwendet. Die Lösungen besitzen die gleiche Ionenstärke von 155 mM, sowie definierte freie Mg<sup>2+</sup>-Konzentrationen von 0,5 mM (HR, HA) und definierte freie Ca<sup>2+</sup>-Konzentrationen von 0 nM (HR) und 47 µM (HA). Der Myosininhibitor BTS wurde in einer Konzentration von 0,1 mM verwendet. In HA+BTS ist wie in Abschnitt 2.4.5 beschrieben, eine verstärkte Besetzung des weak-binding Zustands zu erwarten.

### 3.2.2 Zellkultur B16 Melanom

Zellen aus der Maus-Melanom Zelllinie B16-F10 wurden bei 37 °C und 5% CO<sub>2</sub> in Kultur gehalten. Das Kulturmedium bestand aus DMEM mit 10% FCS (Fetal Calf Serum), 1% Penicillin-Streptomycin, 1% Glutamin und 1% Hepes.

Zum Splitten der Kultur wurden die Zellen mit Phosphatpuffer Lösung (PBS, 37 °C) gewaschen und dann mit Trypsin-Lösung (ca. 3 ml) abgelöst. Nach ungefähr 4 Min. wurde das Trypsin gestoppt durch Zugabe von 10 ml Kulturmedium (enthält Trypsin Inhibitor). Dann wurden die Zellen bei 1300 U/min zentrifugiert, resuspendiert und gezählt.

Pro Kulturflasche wurden immer etwa  $3 \cdot 10^6$  Zellen mit 12 ml Kulturmedium ausgesät. In 48 Stunden vermehrten sich die Zellen ungefähr auf eine Zahl von  $2 \cdot 10^7$ .

### 3.2.3 Tumorwachstum

Die Experimente an lebenden Mäusen wurden im Forschungslabor Hautklinik des Klinikums Heidelberg von Prof. Dr. Karsten Mahnke, Dr. Sabine Ring und Dr. Volker Storn gemäß den Richtlinien der lokalen Ethikkommission durchgeführt.

B16 Tumorzellen wurden in die Haut von C57BL6 Mäusen transplantiert, um dort ein Melanom wachsen zu lassen. Dazu wurde den Mäusen jeweils eine Menge von etwa  $0,5-1,5 \cdot 10^6$  Zellen in einem kleinen Suspensionsvolumen PBS intracutan injiziert.

In den ersten Experimenten wurden die Zellen in die ventrale Haut gespritzt, später in jeweils in eine Ohrmuschel. Die Haut der Ohrmuschel ist sehr dünn, was für die Mikroskopie von Vorteil ist, die Injektion der Tumorzellen aber sehr schwierig macht. Zum Teil waren mehrere Einstichversuche nötig, was auch dazu führen konnte, dass zwei kleine Tumore in einem Ohr wuchsen, wie es im Ergebnisteil zu sehen ist.

Mit der genannten Zahl von transplantierten Zellen war ein Melanom nach ca. 1 Woche mit bloßem Auge erkennbar. Nach etwa 2 Wochen hatte der Tumor einen Durchmesser von ungefähr 2-5 mm. In diesem Stadium wurden die Tumore mikroskopiert bzw. die Hautschnitte angefertigt.

### 3.2.4 Kryoschnitte intracutaner Tumore

Die Schnitte wurden aus intracutan in C57BL6-Mäusen gewachsenen B16- und RMA-Tumoren hergestellt. Die Mäuse wurden mit CO<sub>2</sub> getötet. Der Tumor wurde jeweils inklusive eines Teils der umgebenden gesunden Haut entnommen. Das meist etwa 0,5 cm<sup>2</sup> große Hautstück wurde auf ein kleines Stück Styropor aufgepinnt und dann in 4% Paraformaldehyd (PFA) in PBS für 3 Stunden oder über Nacht fixiert.

Anschließend wurde das Gewebe in wenig TissueTec Medium geschwenkt, um Flüssigkeit zu entfernen, und dann in einer Plastikform (KryoMold) in TissueTec eingebettet. Schließlich wurde die Probe mit der Form in Isobutan in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Alternativ kann die Probe auch direkt in flüssigem Stickstoff oder auf Trockeneis eingefroren werden. Der Prozess läuft dann langsamer ab. Welche Methode zu besseren Ergebnissen führt, wurde nicht untersucht.

Aus den gefrorenen Proben wurden an einem Kryo-Mikrotom (Leica, Nussloch) bei -20 °C Schnitte der Dicke 10 µm hergestellt und wahlweise auf Objektträger oder Deckgläser (24 × 36 mm) gezogen und getrocknet. Bei einigen Schnitten wurden die Zellkerne mit einem DNA-Marker (ToPro-3 oder Hoechst 33258) angefärbt. Die Schnitte wurden entweder in wässriger Lösung mikroskopiert oder mit Aqua Poly-Mount (Polyscience Inc.) eingedeckt.

### 3.2.5 Hautschnitte Sklerodermie

Die Experimente zur Sklerodermie wurden in Zusammenarbeit mit Prof. Helmbold von der Hautklinik Heidelberg durchgeführt. Hautproben von Sklerodermie-Patienten und Vergleichsproben stammten aus dem Archiv der Hautklinik. Aus den paraffinierten Proben wurden in der histologischen Abteilung der Hautklinik Schnitte der Dicke 4  $\mu\text{m}$  angefertigt, mit Hämatoxylin und Eosin gefärbt und eingedeckt.

## 3.3 SHG Mikroskopie am Muskel

### 3.3.1 Mikroskopie System

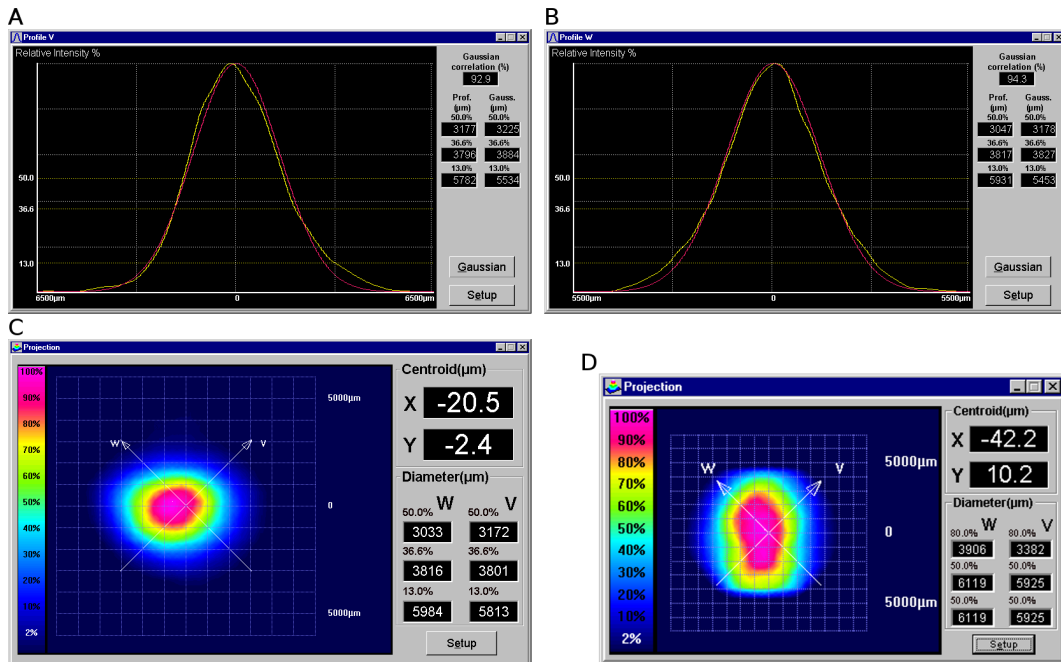
Alle SHG Experimente wurden an einem inversen Fluoreszenz-Mikroskop (Leica DM IRBE) mit konfokaler Laser-Scanning Einheit (Leica TCS SP2) und ps-gepulstem Ti:Sa-Laser (Spectra Physics Tsunami) durchgeführt.

Der Laser wurde für alle Messungen bei einer Wellenlänge von 880 nm und einer mittleren Leistung von 1,2 W ( $\pm 0,1$  W) betrieben. Die Wiederholrate ist vom Hersteller mit ungefähr 80 MHz angegeben, die Pulslänge mit etwa 2 ps. Der letzte Wert ergibt sich auch aus der Breite des Laser-Pulses im Frequenzraum von etwa 0,6 nm (FWHM) bei einer zentralen Wellenlänge von 880 nm.

Als mittlere Leistung an der rückwärtigen Apertur des Objektivs wurden je nach Einstellung zwischen 50 und 200 mW gemessen. Die Feineinstellung der Laserleistung erfolgt mit Hilfe eines Elektro-Optischen Modulators (EOM), der über die Mikroskopsoftware angesteuert werden kann.

Der Laser hat ein Gaussförmiges Strahlprofil mit einem Beamwaist (Strahlbreite bei Intensität  $1/e^2$ ) von 5,5 mm in der Aperturebene des Objektivs. Die Messung wurde mit einem Coherent BeamMaster ausgeführt (siehe Abbildung 3.3). Durch Zuschalten einer Strahlaufweitung im Mikroskop-Scanner (Beam Expander 3) kann auch ein größerer Strahldurchmesser von etwa 9 mm erreicht werden. Wegen der deutlichen Leistungsverluste wurde diese Einstellung normalerweise nicht verwendet.

Die SHG Signale wurden in einer Transmissions-Konfiguration mit zwei identischen Objektiven gemessen. Ein Objektiv fokussiert den eingehenden Laserstrahl auf die Probe. Das andere wird benötigt, um die vorwärtsgestreuten SHG Signale zu sammeln. Für eine optimale Ausbeute müssen beide Objektive ungefähr auf den selben Punkt in der Probe fokussiert sein. Es wurden Wasser-Immersionsojektive mit 63-facher Vergrößerung und einer numerischen Apertur von 1,2 (Leica HCX PL APO 63x 1.2 W Corr.) verwendet. Der Hersteller gibt für die Objektivlinsen eine maximale Auflösung von 162,7 nm in der lateralen Ebene und 290,3 nm in axialer Richtung an.



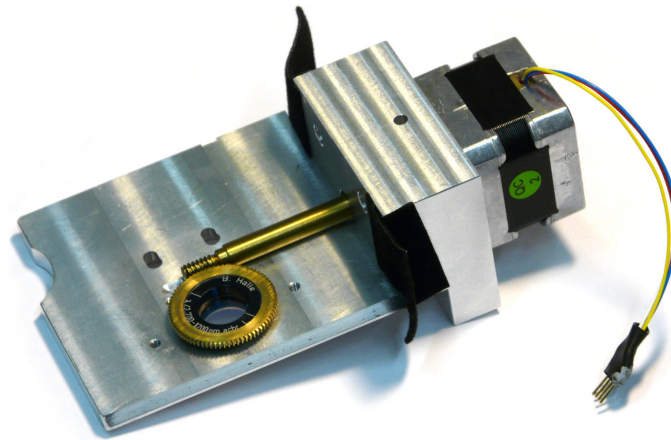
**Abbildung 3.3 Gauss'sches Strahlprofil.** Intensitätsprofil des verwendeten Spectra-Physics Tsunami ps-Lasers in der Apertur ebene des Objektivs gemessen mit einem Coherent BeamMaster. (A, B) Nur kleine Abweichungen von der Gauss-Form. Die Breite des Laserstrahls bei Intensität  $1/e^2$  (ca. 13%) beträgt ohne Strahlaufweitung etwa 5,5 mm (A-C). (D) Mit eingesetzter Strahlaufweitung im Mikroskop-Scanner (BeamExpander 3) vergrößert sich der Durchmesser auf etwa 9,5 mm.

Der freie Arbeitsabstand liegt bei  $220 \mu\text{m}$ , was die Dicke der Proben abhängig von ihrem Brechungsindex auf etwa  $400 \mu\text{m}$  limitiert. Die Rückapertur misst ca.  $9,5 \text{ mm}$ .

Das Anregungslicht wurde mit einem  $700 \text{ nm}$  Kurzpass-Filter blockiert. Bei gleichzeitiger Verwendung von Fluoreszenzfarbstoffen wurde das SHG Signal mit einem  $440 \pm 20 \text{ nm}$  Bandpass gefiltert. Für die Detektion der SHG-Signale wurde der Photomultiplier des Transmissionskanals verwendet (Hamamatsu R9624). Die Quanteneffizienz des Detektors für die Wellenlänge  $440 \text{ nm}$  liegt bei ca. 28%.

### 3.3.2 Polarisationsabhängige Messungen

Um die Orientierungsabhängigkeit des SHG-Signals zu untersuchen, wurde die Polarisations ebene des Lasers vor der Rückapertur des Objektivs mit Hilfe einer  $\lambda/2$ -Verzögerungsplatte (Achromat 600-1200 nm, B. Halle, Berlin) gedreht. Gegenüber der in früheren Messungen verwendeten Verzögerungsplatte (ThorLabs) erhält die  $\lambda/2$ -Platte von B. Halle wesentlich besser die lineare Polarisation des Lasers. Die Po-



**Abbildung 3.4 Modul mit Verzögerungsplatte.** Mit Hilfe des Schrittmotor-Antriebs kann die  $\lambda/2$ -Platte präzise rotiert werden. Das Modul wird an Stelle des Filterrades ins Mikroskop eingeschoben.

larisation ist hier für jeden Winkel besser als 50:1 (Leistungsmessung mit einem polarisierenden Strahlteilerwürfel).

Für die  $\lambda/2$ -Platte wurde ein Modul mit Schrittmotor-Antrieb entwickelt (Abbildung 3.4), das an Stelle des Fluoreszenzfilterrades in das Mikroskop geschoben werden kann. Die Rotation der Schrittmotorachse wird über ein Schneckengewinde auf das Zahnrad übertragen, in das die Verzögerungsplatte eingepasst ist. Die Anordnung erlaubt eine präzise Rotation der  $\lambda/2$ -Platte (minimale Schrittweite ca.  $0,012^\circ$ ).

Die Steuerung des Schrittmotors erfolgt über ein Treiberboard mit PC-Anschluss. In der Software wurden für den größten Teil der Messungen folgende Werte eingestellt: -200 Schritte bei 400 Schritten pro Sekunde, dann 10 Sekunden Wartezeit. Der Zyklus wurde 75-mal ausgegeben. In der Praxis ergab das eine Rotation der  $\lambda/2$ -Platte von jeweils  $2,4^\circ$  innerhalb einer Zeitspanne von jeweils 4 Sekunden, zusammengekommen also eine Drehung um genau  $180^\circ$ . Die Polarisationssebene des Lasers wurde entsprechend immer um den doppelten Winkel gedreht, also je Schritt um  $4,8^\circ$  und insgesamt um  $360^\circ$ .

### 3.3.3 Einstellungen am Mikroskop

Am Mikroskop wurden Bildausschnitte mit möglichst einzeln und gerade liegende Myofibrillen gewählt, die direkt am Deckglas hafteten. Der Zoomfaktor wurde zwischen  $2\times$  und  $5\times$  gewählt, so dass die Pixelgröße zwischen  $0,1\times 0,1\ \mu\text{m}$  und  $0,2\times 0,2\ \mu\text{m}$  lag. Für die polarisationsabhängigen Messungen wurde eine Bildgröße

von  $512 \times 512$  px gewählt und jedes Bild als 2-Frame Average aufgezeichnet. Bildserien wurden als  $xyt$ -Stapel mit Schritten von 4 Sekunden aufgenommen. Nach Abschluss des ersten Bildscans wurde parallel das Schrittmotor-Script gestartet, so dass die Polarisationsrichtung des Lasers jeweils zwischen zwei Scans rotiert wurde.

Die Laserleistung wurde in der Regel zwischen 60 und 100% EOM-Spannung so eingestellt, dass bei einer PMT-Spannung zwischen 700 V und 850 V der komplette dynamische Bereich des Detektors genutzt werden konnte.

Der PMT-Offset wurde auf den kleinsten Wert eingestellt, bei dem das Hintergrundrauschen des Detektors noch komplett aufgezeichnet werden konnte. Die PMT-Spannung wurde auf den maximalen Wert eingestellt, bei dem nach 2-Frame Average keine Pixel übersättigt waren (in der gesamten Polarisationsserie). Der Detektor wurde im 12-bit Modus betrieben (4096 Graustufen).

## 3.4 SHG Mikroskopie an der Haut

### 3.4.1 Hautschnitte

Hautschnitte von Tumoren wurden hergestellt wie in Abschnitt 3.2.4 beschrieben und dann mit Vergrößerung  $10 \times$  (Objektiv: Leica PL APO 10x NA 0,4) oder alternativ  $63 \times$  (Objektiv: Leica HCX PL APO 63x 1.2 W Corr.) an dem in Abschnitt 3.3.1 beschriebenen System mikroskopiert. Zweiphotonen Anregung von Autofluoreszenz und SHG wurde mit dem TiSa-Laser bei 880 nm realisiert.

SHG wurde im Transmissionskanal mit 700 nm Kurzpass-Filter und  $440 \pm 20$  nm Bandpass Filter aufgezeichnet, Autofluoreszenz über die spektrale Detektionseinheit des Mikroskopscanners im Wellenlängenbereich von 470-600 nm. Der Farbstoff Hoechst wurde, wenn eingesetzt, mit Zweiphotonen Anregung bei 880 nm verwendet und im gleichen Farbkanal mit der Autofluoreszenz registriert. Der Farbstoff To-Pro-3 wurde, wenn verwendet, mit einem 633 nm Helium-Neon Laser angeregt und bei 645-690 nm detektiert.

Hautschnitte von Sklerodermie-Proben waren mit Hämatoxylin-Eosin gefärbt. Von dieser Färbung wurden zunächst Übersichtsaufnahmen im Durchlicht bei zehnfacher Vergrößerung gemacht (Objektiv: Leica PL APO 10x NA 0,4 trocken). Die hochaufgelösten SHG Aufnahmen wurden dann bei 63-facher Vergrößerung erstellt (Objektiv: Leica HCX PL APO 63x 1.2 W Corr.). Die Lage der aufgezeichneten Bildausschnitte wurde im Übersichtsbild markiert.

### 3.4.2 *In vivo* Mikroskopie

Tumore in der ventralen Haut und am Ohr von C57BL6-Mäusen wurden auch *in vivo* mikroskopiert. Dazu wurden die Mäuse mit Ketamin/Xylazin anästhesiert. Während der Narkose wurde Körpertemperatur der Mäuse durch eine Wärmedecke oder Wärmeplatte stabilisiert.

Die betreffende Hautpartie wurde zunächst mit handelsüblicher Enthaarungscreme depiliert und gereinigt, und dann mit einem Tropfen Wasser auf einem Deckglas positioniert. Das Deckglas war in einem Halterungsrahmen auf dem Verschiebetisch des Mikroskops montiert. Durch das Deckglas wurde die Haut von unten mit einem 10× Trockenobjektiv (Leica PL APO), 63× Wasserimmersions-Objektiv (Leica HCX PL APO) oder einem 40× Wasserimmersions-Objektiv mit langem Arbeitsabstand (Leica HCX APO L 40x 0.8 W) mikroskopiert. Die Anregungswellenlänge war zwischen 800 nm und 880 nm eingestellt. Die Laserleistung wurde auf 50 mW bis maximal 100 mW an der Rückapertur des Objektivs eingestellt.

Detektiert wurde mit den zwei *non-descanned Detektoren* („NDD“, Hamamatsu R9624 PMT) des Mikroskops direkt unter dem Objektiv. Dazu wurde mit einem dichroitischen Strahlteiler das sichtbare Licht < 700 nm ausgekoppelt und über einen 650 nm Kurzpassfilter auf die NDD PMTs gelenkt. Hier wurde entweder das gesamte Licht auf einem PMT detektiert oder mit einem Strahlteiler (Kante: 458 nm) in SHG Signale (< 450 nm, z.B. 440 nm bei 880 nm Anregung) und Autofluoreszenz (Großteil > 480 nm) getrennt.

Durch die dünne Haut von Mausohren war auch eine Durchlichtbeleuchtung des Tumors über eine Halogenleuchte und das Kondensator-Objektiv des Mikroskops möglich. Die Bildakquisition wurde über eine CMOS Kamera am Kameraport vor dem Okular oder über PMTs in der Detektoreinheit des Konfokalscanners in verschiedenen Farbeinstellungen realisiert.

Aufgenommen wurden Bilder in der lateralen Ebene ( $xy$ ), also parallel zur Hautoberfläche, sowie Bildstapel ( $xyz$ ) über mehrere Tiefen und schnelle Scans durch die Hautebenen ( $xz$ ). Das Anpassen bzw. Scannen der  $z$ -Richtung geschah über den vorgesehenen Piezo-Antrieb des Mikroskoptischs.

## 3.5 CARS Mikroskopie

Die CARS-Messungen wurden am Center for Nanoscale Systems der Harvard Universität in Cambridge, USA zusammen mit Dr. Martin Vogel durchgeführt.

Als Laserquelle diente ein Nd:YVO Laser (High-Q Laser GmbH) der Wellenlänge 1064 nm (Pulslänge 7 ps, Pulsrate 76 MHz, maximale Leistung 10 W). Eine Aus-

kopplung dieses Lasers pumpte einen optisch parametrischen Oszillator, OPO (APE GmbH), der im Wellenlängenbereich von 800-900 nm einstellbar war (Pulslänge 5-6 ps, max. Leistung 1 W). Für die Messungen wurde eine Wellenlänge von 817 nm gewählt, passend zu CH<sub>2</sub>-Schwingungsresonanzen bei 2850 cm<sup>-1</sup>.

Der OPO diente als Pumplaser, der Nd:YVO Laser als Stokes-Laser für den CARS Prozess. Beide Laserstrahlen wurden kollinear auf optimale räumliche und zeitliche Überlagerung der Laser-Pulse hin justiert und in die Scanning Einheit (Zeiss LSM 510) eines inversen Mikroskops (Zeiss Axiovert 200 M) eingekoppelt. Zur Fokussierung auf die Probe wurde ein Wasserimmersions-Objektiv mit 63-facher Vergrößerung (Zeiss C-Apochromat, NA 1,2) verwendet, zur Detektion in Vorwärtsrichtung ein Kondensor mit NA 0,8.

In der beschriebenen Konfiguration können im Präparat sowohl CARS Signale bei einer Wellenlänge von 663 nm als auch SHG Signale bei einer Wellenlänge von 408 nm entstehen. Um die Signale einzeln zu detektieren, wurden Bandpassfilter (Chroma Filters) für die Wellenlängenbereiche 640-670 nm bzw. 406±25 nm verwendet.

Als Präparate dienten Gefrierschnitte von intracutan gewachsenen B16 und RMA Tumoren (siehe Abschnitt 3.2.4). Die Schnitte waren in Aqua-Polymount eingebettet oder mit PBS-Lösung überschichtet.

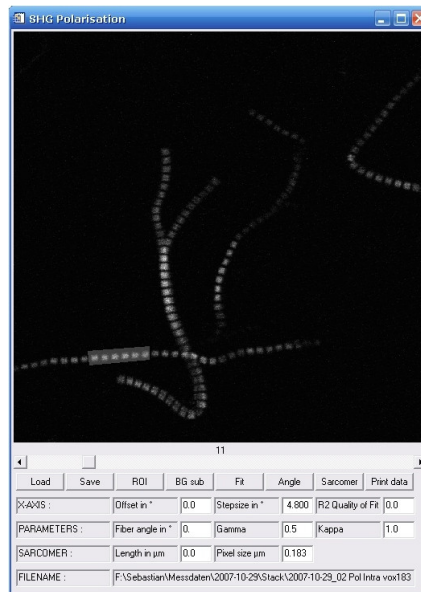
## 3.6 Bildverarbeitung

### 3.6.1 SHG Polarisationsabhängigkeit

Die Auswertung der polarisationsabhängigen Messungen wurden mit Hilfe von IDL (ITT Corporation) durchgeführt. Dazu wurde eine grafische Benutzeroberfläche (siehe Abbildung 3.5) programmiert, die alle Schritte der Auswertung unterstützt. Die Funktionen sollen im folgenden kurz dokumentiert werden: Erster Schritt ist der Import von Bildserien aus dem Leica-Mikroskop (Einzelbilder, 12-bit), die später als Multi-Tiff (16-bit) gespeichert werden können. Beim Laden der Bilder errechnet das Programm die Schrittgröße zwischen den Bilder in Grad als 360° durch Anzahl der Bilder. Ist das Messprotokoll anders angelegt muss hier von Hand korrigiert werden. Des weiteren entnimmt das Programm dem Dateinamen die Pixelgröße in µm, wenn diese in den letzten sechs Zeichen benannt wurde.

Im Bildfenster wurde dann eine Region of Interest (ROI) um einen Teil einer Myofibrille gewählt, der möglichst gerade und eben ausgerichtet war. Dort wurde die mittlere Helligkeit für jedes Bild der Serie gemessen. Zusätzlich wurde eine Region ohne Myofibrillen zur Bestimmung des Hintergrundes markiert.





**Abbildung 3.5 Auswertung mit IDL.** Grafische Benutzeroberfläche zum Betrachten der Bildserien, Auswählen einer Region of Interest (ROI), Messen der Faserorientierung und Fitten der Modellfunktion. Programmiert in IDL.

Nun wurde mit Hilfe von Gleichung 3.13 ein Least-Squares Fit (Methode der kleinsten Quadrate) an die Messdaten abzüglich des Hintergrunds gelegt. Die Fitparameter  $\gamma$ ,  $\kappa$  und  $\varphi$ , sowie das  $R^2$ -Maß für die Fitqualität, wurden dabei im Fenster ausgegeben. Der Winkel  $\varphi$  bezieht sich hier immer auf das erste Bild der Serie. Da die Nullposition des  $\lambda/2$ -Plättchens nicht fest kalibrierbar war, kann hier ein Offset gegenüber der Orientierung der Myofibrille im Bild entstehen. Aus diesem Grund wurde die Orientierung der Myofibrille in der ROI zusätzlich aus den Eigenvektoren des Grauwertensors bestimmt (Trägheitstensor-Methode). Der Winkel wurde immer nach oben zur Vertikalen hin gemessen (Wertebereich: 0-180°). Um die Orientierung mit dem Winkel  $\varphi$  der Fitfunktion in Einklang zu bringen, wurde ein Offset für die Winkel-Achse errechnet, der den unterschiedlichen Startpositionen für das  $\lambda/2$ -Plättchen Rechnung trägt.

Neben den Fitparametern wurde noch die Sarkomerlänge der Myofibrille in der ROI gemessen. Dies geschah mit Hilfe einer Fouriertransformation, aus der die stärkste Frequenz in dem Bereich ermittelt wurde, der 1 bis 4  $\mu\text{m}$  Wellenlänge entspricht. Diese Frequenz wurde mit einem Gaußfit ermittelt und in die Sarkomerlänge umgerechnet. Schließlich wurde jede ROI als 1-Bit Tiff gespeichert und die zugehörigen Messwerte und Fitergebnisse in einer Textdatei gespeichert. Die einzelnen Textdateien wurden gesammelt und statistisch ausgewertet. Die Datenfits für das erweiterte E-Feld Modell mit Gleichung 3.20 wurden in MATLAB durchgeführt.

Um verschiedene Fitmodelle vergleichen zu können, wurde ein F-Test durchgeführt [ZHANG und WANG, 1997]. Zu diesem Zweck wurde bei jedem Fit die Summe der quadratischen Abweichungen ausgegeben. Zusammen mit der Anzahl der Messpunkte pro Bildserie und der Anzahl der freien Fitparameter als Freiheitsgrade beim Fit, konnte daraus die Größe  $F$  berechnet werden.

### 3.6.2 Sklerodermie

Zur Auswertung der mikroskopischen Aufnahmen von Sklerodermie-Hautschnitten wurden die Software ImageJ (<http://rsbweb.nih.gov>) eingesetzt. Die Bilder der Fouriertransformierten wurden mit Hilfe der FFT Funktion als logarithmische Falschfarbendarstellung erzeugt.

Zur Detektion von Ecken wurde das Plugin „Harris Corner Detector“ von Wilhelm Burger und Mark Burge eingesetzt (<http://rsbweb.nih.gov/ij/plugins>). Die Methode basiert auf der Grundlage, dass der Grauwert einer Ecke einen starken Gradienten in mehrere Richtungen besitzt. Ein Maß für diese Gradienten bilden die Eigenwerte  $\lambda_1, \lambda_2$  des Strukturensors, die bei einer Ecke beide große positive Werte annehmen. Es wird die Größe  $Q = \lambda_1 \lambda_2 - \alpha (\lambda_1 + \lambda_2)^2$  berechnet und mit einem Schwellenwert verglichen. Für den konstanten Faktor  $\alpha$  wurden Werte von 0,01 oder 0,05 gewählt und als Schwelle wurden Werte von 5000, 10.000 und 20.000 getestet.

Die zusammengesetzten Bilder im Ergebnisteil wurden aus je drei Einzelbildern mit Hilfe des Plugins „2D-Stitching“ von Stephan Preibisch erstellt.

# Kapitel 4

## Ergebnisse

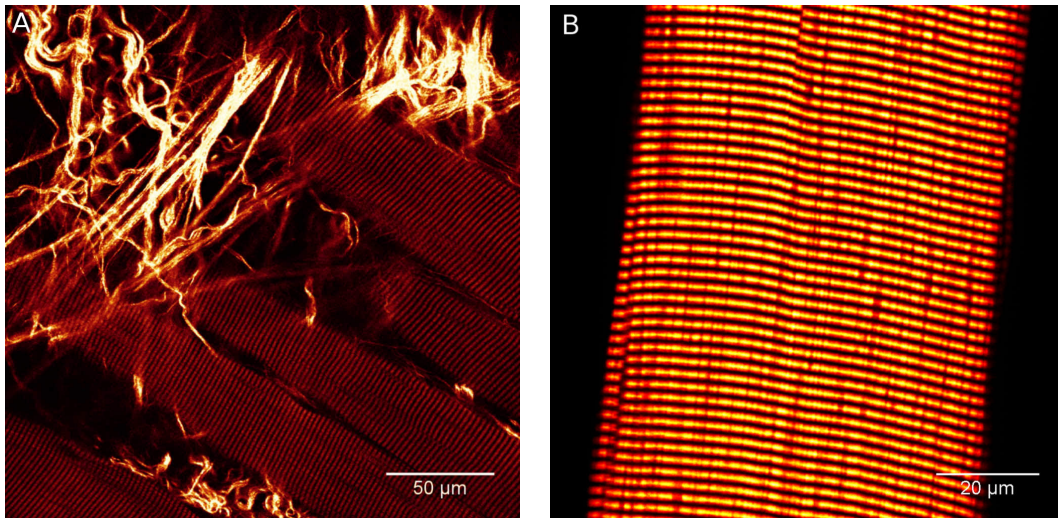
In diesem Kapitel werden die Ergebnisse der durchgeführten Experimente und Modellrechnungen dargestellt. Zunächst werden die Resultate zur SHG Mikroskopie am Skelettmuskel gezeigt, insbesondere die Abhängigkeit der SHG Signale von Myofibrillen von der Polarisation des Lasers. Hier wurde eine unterschiedliche Charakteristik für die physiologischen Zustände *Relaxed* und *Rigor* gefunden. Die Auswertung der Daten wurde mit Hilfe der vorgestellten Modellfunktionen durchgeführt. Weitere Ergebnisse der Modellrechnungen werden in Abschnitt 4.2 dargestellt.

Neben den Messungen am Skelettmuskel wurden auch Hautproben mit Hilfe von SHG Mikroskopie untersucht. Die Ergebnisse in Abschnitt 4.3 beinhalten Erkenntnisse zur Mikroskopie von Hauttumoren in histologischen Schnitten und *in-vivo*, sowie zur SHG Mikroskopie für das Krankheitsbild der Sklerodermie. Abschließend werden in Abschnitt 4.4 die Ergebnisse der Arbeit mit CARS-Mikroskopie vorgestellt.

### 4.1 SHG Mikroskopie am Skelettmuskel

Im Skelettmuskel werden SHG Signale von den Muskelzellen selbst und von der Extrazellulärmatrix aus Collagen-I emittiert. Abbildung 4.1 A zeigt rückgestreute SHG Signale von einem kompletten, intakten EDL-Muskel der Maus. Die Bildebene liegt in der obersten Schicht von Muskelzellen, in der auch ein Teil der den Muskel umhüllenden Fascie aus Collagen gut sichtbar ist. Die stärksten Signale stammen vom Collagen-I. Insbesondere im Epi-Detektionsmodus überstrahlen sie die SHG Signale von den Muskelzellen deutlich.

Die SHG Signale aus den Muskelzellen zeigen die für den Skelettmuskel charakteristische Querstreifung. Der Abstand der SHG Banden entspricht der Sarkomerlänge.

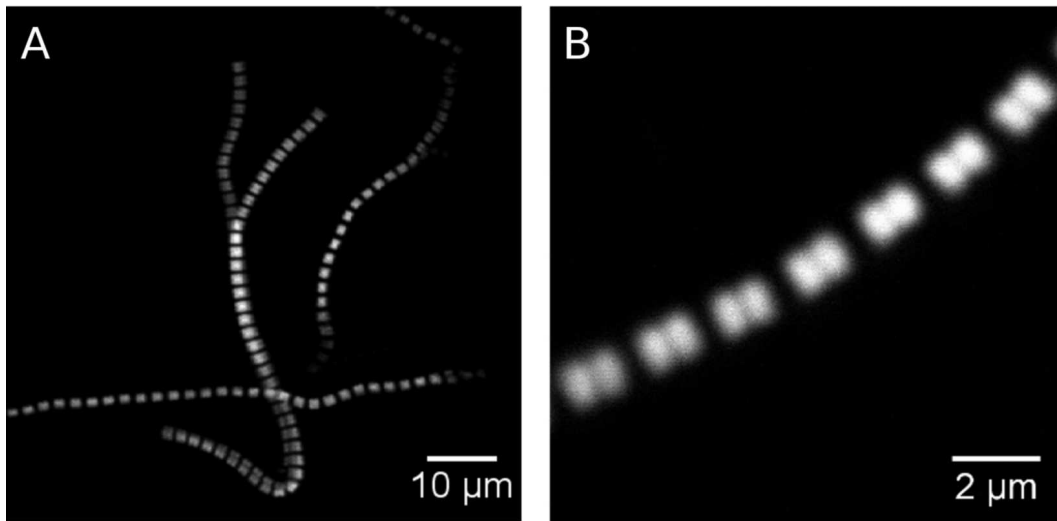


**Abbildung 4.1 SHG am Skelettmuskel.** (A) Rückgestreutes SHG Signal von einem kompletten, intakten EDL-Muskel der Maus. Deutlich zu sehen sind die Querstreifung der Muskelzellen und die starken SHG Signale der extrazellulären Collagen-Matrix. (B) Vorwärtsgestreutes SHG Signal einer einzelnen, glycerinierten EDL Muskelfaser.

Wie bereits gezeigt wurde [SCHÜRMAN et al., 2007, PLOTNIKOV et al., 2006], entsteht SHG hauptsächlich am LMM-Teil der Myosin-Moleküle, also in den dicken Filamenten des Skelettmuskels (vgl. Kapitel 2.4). Die SHG Mikroskopie ist damit sehr gut geeignet für die Detektion struktureller Veränderungen am Muskel, wie beispielsweise für das Krankheitsbild der Duchenne-Dystropie [FRIEDRICH et al., 2010]. Wichtige strukturelle Eigenschaften, wie die Sarkomerlänge oder Verzweigungen in der myofibrillären Struktur (*vernices*), lassen sich direkt aus den SHG Aufnahmen gewinnen. Die mittlere Sarkomerlänge der in Abbildung 4.1 B gezeigten einzelnen EDL Muskelfaser ergibt sich mit der in Abschnitt 3.6.1 beschriebenen FFT Methode beispielsweise als  $2,38 \pm 0,01 \mu\text{m}$ .

Einzelne Myofibrillen sind besonders geeignet, um Eigenschaften des SHG Signals unverfälscht zu untersuchen. Wie in Abbildung 4.2 gut zu sehen ist, werden hier die SHG Signale aus einem einzelnen Sarkomer nicht im Gewebe gestreut und kaum von anderen Signalen überlagert.

Auf der Ebene von einzelnen Myofibrillen wird beispielsweise deutlich, dass jeder Querstreifen des SHG Signalmusters tatsächlich eine Doppelbande im Bereich der Myosin-Filamente ist. Die reduzierte Signalintensität im Bereich der M-Linien ist wahrscheinlich auf die antiparallele und damit inversionssymmetrische Anordnung der Myosinrods in diesem Bereich zurückzuführen (siehe auch Abschnitt 2.4.3) [SCHÜRMAN et al., 2007, PLOTNIKOV et al., 2006].

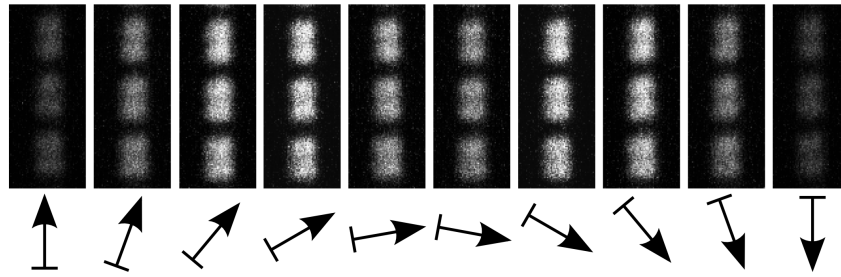


**Abbildung 4.2 SHG an Myofibrillen.** (A) Bündel von etwa 5-20 Myofibrillen auf einem Deckglas. (B) Einzelne Myofibrille. Die SHG Signale werden von den dicken Filamenten emittiert. Im Bereich der M-Linien (Mitte jeder Doppelbande) entstehen keine SHG Signale. Die Myosinmoleküle sind dort antiparallel angeordnet.

#### 4.1.1 Polarisationsabhängigkeit des SHG Signals

Die Intensität des SHG Signals hängt von der Orientierung der Myofibrillen gegenüber der Polarisationsrichtung des anregenden Laserstrahls ab. Dieser Effekt lässt sich einfach untersuchen, indem man mit einer  $\lambda/2$ -Platte die Polarisationsachse des Lasers dreht (Abbildung 4.3). Dabei zeigt sich, dass die SHG Signalintensität dann minimal ist, wenn der Laser genau parallel zur Faserachse polarisiert ist. Dreht man nun die Polarisationsachse des Lasers, wird die Signalstärke zunächst stärker bis zu einem Maximum bei etwa  $50^\circ$  und reduziert sich dann wieder auf ein lokales Minimum bei einem Winkel von  $90^\circ$  zur Faserachse.

Die Abhängigkeit der SHG Intensität vom Winkel der Laserpolarisation wird gut deutlich anhand der Messwerte in Abbildung 4.4. Die Gesamtintensität wird hier durch die roten Punkte beschrieben. Dieser Kurvenverlauf ist charakteristisch für den Skelettmuskel und bestätigt sich in allen Messungen. Abbildung 4.4 enthält zudem noch zusätzliche Information, da die Komponenten des SHG Signals parallel und senkrecht zur Faserachse hier einzeln mit Hilfe eines Polarisationsfilters ermittelt wurden. Auffällig ist, dass die SHG Signalintensität parallel zur Faserachse nicht null wird und sich mit einer Periode von  $180^\circ$  wiederholt. Die Intensität senkrecht zur Faserachse hingegen wiederholt sich mit einer Periode von  $90^\circ$  und geht bei einem Winkel von  $0^\circ$  und  $90^\circ$  auf null zurück. Die beiden Maxima von  $I_\perp$  bei  $45^\circ$  und  $135^\circ$  haben ungefähr die gleiche Intensität wie das Maximum von  $I_\parallel$  bei  $90^\circ$ .



**Abbildung 4.3 Orientierungsabhängigkeit des SHG Signals.** Die Intensität des SHG Signals einer Myofibrille hängt von der Polarisationsrichtung des eingestrahnten Lasers (Pfeile) gegenüber der Faserachse ab.

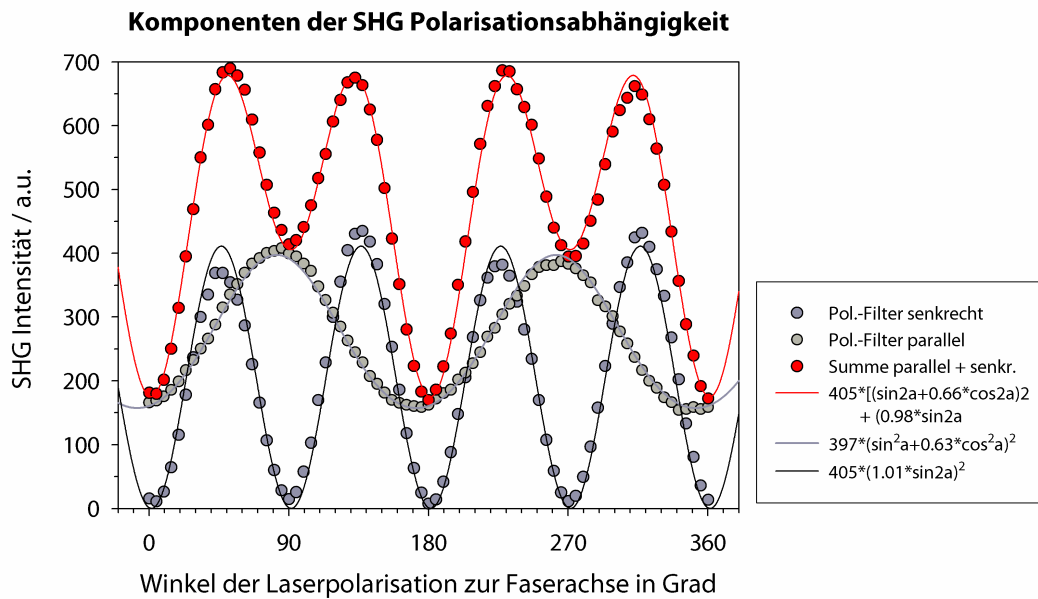
Die gesamte Abhängigkeit der SHG Intensitäten vom Winkel der Laserpolarisation lässt sich sehr genau durch Gleichung 3.14 beschreiben, die in Kapitel 3.1 aus Symmetrie-Überlegungen abgeleitet wurde. Kleinman-Symmetrie soll hier zunächst als gegeben angenommen werden. Bei den Daten in Abbildung 4.4 liegt die Faserachse im Winkel  $\varphi = 0^\circ$  und der Hintergrund wurde schon abgezogen. Daher kann Gleichung 3.14 vereinfachend geschrieben werden als:

$$I_{\text{ges}}(\alpha) = B \left[ (\sin^2 \alpha + \gamma \cos^2 \alpha)^2 + (\sin 2\alpha)^2 \right]$$

Wie leicht zu sehen ist, hat der zweite Term in Klammern mit  $\sin 2\alpha$  im Vergleich zum ersten Term nur die halbe Periode. Dieser zweite Term ergab sich aus  $P_x$ , der Komponente senkrecht zur Faserachse. Die experimentellen Ergebnisse bestätigen also sehr gut den berechneten Zusammenhang. Dies gilt ebenso für den ersten Term, abgeleitet aus  $P_y$ , und die Übereinstimmung mit der parallelen Komponente  $I_{\parallel}$ .

Die Parameter  $B$  und  $\gamma$  lassen sich direkt aus den Daten ablesen. Den Skalierungsfaktor  $B$  kann man aus dem Wert bei  $\alpha = 90^\circ$  gewinnen, denn hier werden die Ausdrücke mit  $\cos \alpha$  und  $\sin 2\alpha$  null. Aus der Intensität bei  $\alpha = 0^\circ$  ergibt sich der Faktor  $\gamma$ , da hier der Sinus null wird.

Der Faktor  $\gamma$  war als das Verhältnis der Tensorkomponenten  $\chi_{yyy}$  und  $\chi_{yxx}$  definiert worden. In dieser Messung wird die Bedeutung dieser Größen auch anschaulich klar. Die Faserachse liegt hier längs der  $y$ -Achse (Winkel  $0^\circ$ ). Das E-Feld soll in erster Näherung nur Komponenten in der vorgegebenen Richtung des Winkels haben, bei  $0^\circ$  also nur in  $y$ -Richtung. Mit parallelem Polarisationsfilter untersuchen wir die  $y$ -Komponente des SHG Signals,  $P_y$ . Dieser Fall wird durch  $\chi_{yyy}$  beschrieben: wie groß ist  $P_y$ , wenn die Faser mit  $E_y$  angeregt wird? Für den Winkel  $90^\circ$  gilt Entsprechendes mit  $\chi_{yxx}$ : wie groß ist  $P_y$ , wenn die Faser mit  $E_x$  angeregt wird? Das Verhältnis  $\gamma = \chi_{yyy}/\chi_{yxx}$  lässt sich also auch direkt aus den Intensitäten bei  $0^\circ$  und bei  $90^\circ$  ablesen als  $\gamma^2 = I_{\parallel}(0^\circ)/I_{\parallel}(90^\circ)$ . Da  $I_{\perp}$  bei diesen Winkeln jeweils null ist, gilt auch ohne



**Abbildung 4.4** Komponenten der SHG Polarisationsabhängigkeit. Anteile des Signals parallel und senkrecht zur Myofibrillenachse, gemessen mit einem Polarisationsfilter. Fit der Messdaten nach Gleichung 3.13.

Polarisationsfilter:  $\gamma^2 = I(0^\circ) / I(90^\circ)$ . Genauere Werte erhält man allerdings, wenn alle Messpunkte in die Berechnung mit einbezogen werden. Daher werden Fits an die Daten durchgeführt, aus denen sich  $\gamma$  als Fitparameter ergibt.

Für den Winkel  $45^\circ$  sind die Komponenten  $E_x$  und  $E_y$  des E-Feldes gleich groß. Hier findet man das Maximum von  $P_x$ , das durch die Tensorkomponente  $\chi_{xxy}$  bestimmt wird, die sich im Parameter  $\kappa$  bzw.  $k$  wiederfindet. Wenn wir Kleinman-Symmetrie voraussetzen, ist  $\chi_{xxy} = \chi_{yxx}$  und  $\chi_{xyz} = 0$ . Es muss dann also  $\kappa = 1$  und  $k = 1$  sein. In dieser Messung ist  $I_\perp(45^\circ)$  etwa genauso groß wie  $I_\parallel(90^\circ)$ , also ist hier tatsächlich  $k \approx 1$ . Wenn  $\gamma$  bekannt ist, lässt sich der Parameter  $k$  aus dem Wert  $I_{ges}(45^\circ)$  konkret berechnen. Sinnvoller ist aber auch hier wieder, alle Messpunkte mit einzubeziehen und  $k$  als Fitparameter aus Gleichung 3.13 zu gewinnen. Auf diese Weise wird in Abschnitt 4.1.4 die Gültigkeit von Kleinman-Symmetrie in den Experimenten genauer untersucht.

Im konkreten Beispiel von Abbildung 4.4 soll zunächst  $k = 1$  sein. Die beiden anderen Fitparameter für die Funktion  $I_{ges}(\alpha)$  ergeben sich dann als:  $\gamma = 0,66$  und  $B = 405$  (rote Kurve). Betrachtet man die Komponenten einzeln, ergeben sich ähnliche Werte. Ein Fit an die Daten der parallelen Komponente mit  $I_\parallel(\alpha) = B(\sin^2 \alpha + \gamma \cos^2 \alpha)$  ergibt  $\gamma = 0,63$  und  $B = 397$ . Für die senkrechte Komponente ergibt sich mit  $I_\perp(\alpha) = B(\sin 2\alpha)^2$  ein Wert von  $B = 408$ . Insgesamt zeigt sich eine sehr gute Über-

einstimmung der gefitteten Funktionen mit den Messdaten. Die Abweichungen, insbesondere die leichte Asymmetrie der Peaks von  $I_{\perp}$  und die geringe Verschiebung der Extremwerte bei  $90^{\circ}$  lassen sich gut dadurch erklären, dass die Polarisationsfilter nicht perfekt parallel oder senkrecht zur Faserachse orientiert waren. Insgesamt sind die Abweichungen jedoch sehr gering.

Zu den Zahlenwerten für die Fitparameter ist noch anzumerken, dass alle bisherigen Überlegungen auf dem einfachsten Modell für die E-Feld Verteilung basieren. Eine Berücksichtigung der Fokussierung durch das Objektiv erfolgt erst später in Abschnitt 4.1.5. Auf Kleinman-Symmetrie und den Fitparameter  $k$  wird in Abschnitt 4.1.4 detaillierter eingegangen.

### 4.1.2 Unterschiede im Relaxed- und Rigor-Zustand

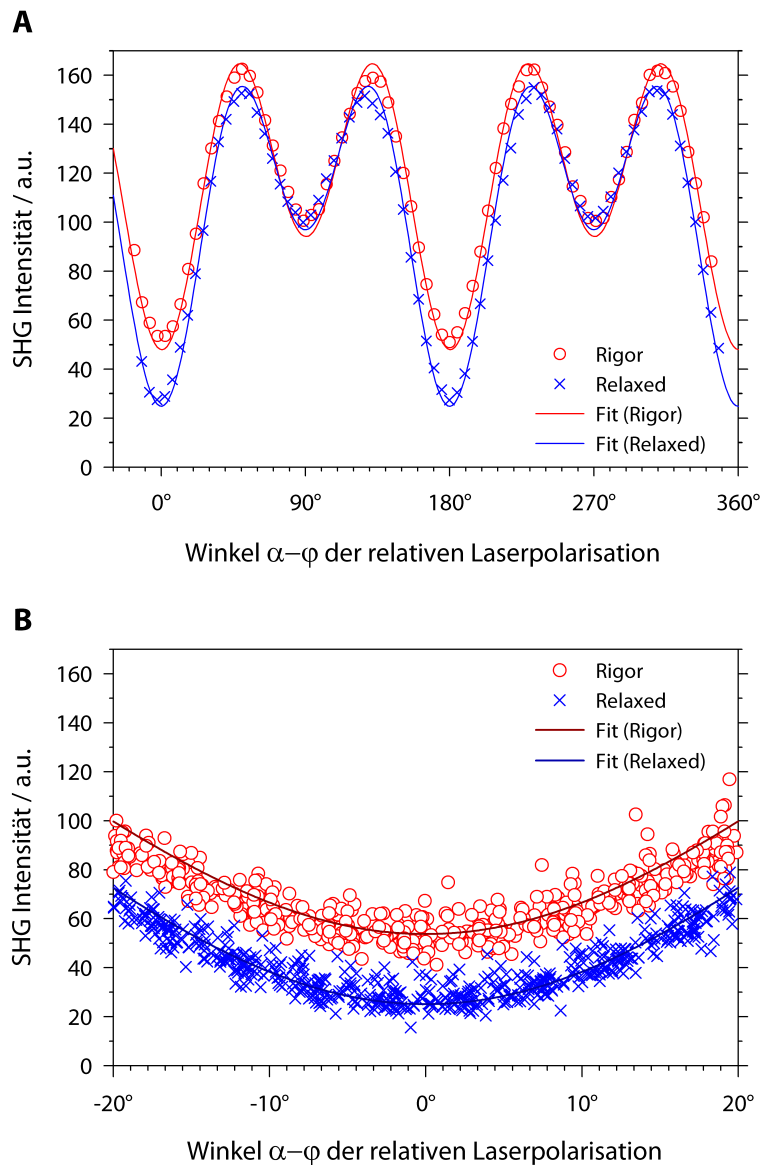
Wie gesehen, hängt die Intensität des SHG Signals einer Myofibrille in charakteristischer Weise von der Polarisationsrichtung des Lasers gegenüber der Faserachse ab. Ein hochinteressantes Ergebnis ist nun, dass diese Abhängigkeiten für die beiden physiologischen Zustände *Relaxed* und *Rigor* unterschiedlich ausfallen.

Abbildung 4.5 A zeigt zwei typische Kurvenverläufe für Myofibrillen im Rigor- oder Relaxed-Zustand, in denen die SHG Signalintensität abhängig vom Winkel der Laserpolarisation beschrieben wird. Um die relativen Unterschiede zwischen beiden Fällen deutlich werden zu lassen, wurden die Messwerte auf einen Wert von 100 für das lokale Minimum bei  $90^{\circ}$  (also bei Polarisation senkrecht zur Faserachse) skaliert. Der Hintergrund war zuvor abgezogen worden. In dieser Darstellung ist ein ausgeprägter Unterschied im Bereich des Minimums beider Kurven offensichtlich. Der Parameter  $\gamma$ , der das Verhältnis von absolutem Minimum (bei  $0^{\circ}$ ) zu lokalem Minimum (bei  $90^{\circ}$ ) ausdrückt, ist im Rigor deutlich größer als im Relaxed-Zustand. Im Bereich der Maxima sind die Unterschiede in der SHG Intensität hingegen geringer.

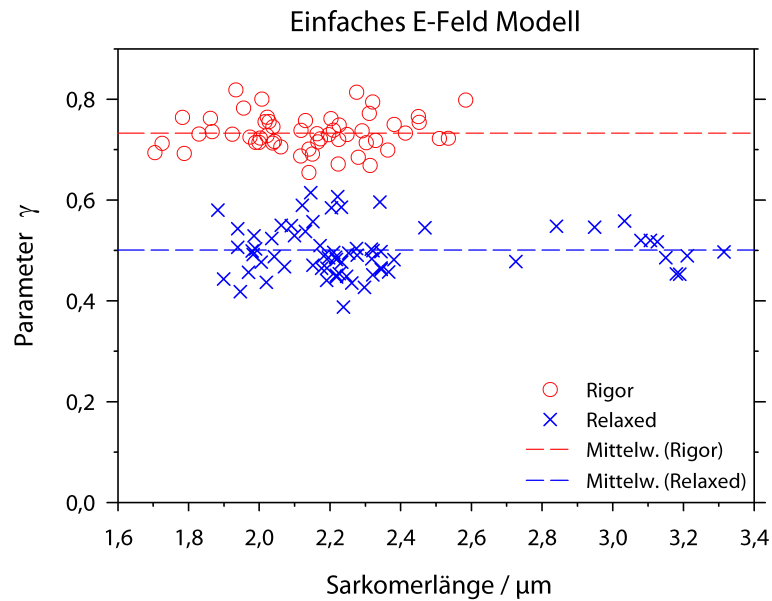
Wie deutlich zu sehen ist, ist die Übereinstimmung der Fitfunktion mit den Datenpunkten sehr hoch. Für alle Fits war die Güte  $R^2 > 0,9$  und im Durchschnitt sogar  $R^2 > 0,95$ . Die Standardfehler der einzelnen Fitparameter waren im Durchschnitt kleiner als 0,1%.

Im Relaxed- und Rigor-Zustand ergeben sich also unterschiedliche Werte für den Parameter  $\gamma$ . Um dieses Ergebnis systematisch zu untersuchen, wurden insgesamt 54 Bildserien von SHG an Myofibrillen aufgenommen und 70 ROIs für den Relaxed-, sowie 55 ROIs für den Rigor-Zustand ausgewertet. An alle Messdaten wurde jeweils gemäß Gleichung (3.13) eine Kurve mit den freien Parametern  $\gamma$ ,  $\varphi$  und  $B$  gefittet. Der Skalierungsfaktor  $B$  drückt die Gesamtintensität des SHG Signals aus, die durch die Mikroskopeigenschaften oder die Dicke des untersuchten Myofibrillenbündel beeinflusst wird. Der Winkel  $\varphi$  beschreibt die Orientierung der untersuchten Myofibrille





**Abbildung 4.5 SHG Polarisationsabhängigkeit im Relaxed- und Rigor-Zustand.** Die gemessenen SHG Intensitäten wurden auf einen Wert von 100 bei Laserpolarisation senkrecht zur Faserachse (Winkel  $90^\circ$ ) normalisiert. (A) Die zwei Datensätzen für den Rigor und den Relaxed-Zustand zeigen deutlich die unterschiedlichen Polarisationsabhängigkeiten des SHG Signals. (B) Die gesammelten Datenpunkte aus allen Messungen, vergrößert dargestellt im Bereich um  $0^\circ$ . Der Unterschied zwischen Relaxed und Rigor-Zustand ist für alle Messwerte deutlich sichtbar.



**Abbildung 4.6** Messergebnisse für Parameter  $\gamma$ . Für Relaxed und Rigor-Zustand ergeben sich zwei deutlich voneinander getrennte Verteilungen mit Mittelwerten von  $\gamma_{rig} = 0,733 \pm 0,005$  ( $s_m, n = 55$ ) für den Rigor-Zustand und  $\gamma_{rel} = 0,501 \pm 0,006$  ( $s_m, n = 70$ ) für den Relaxed-Zustand. Eine Abhängigkeit von der Sarkomerlänge ist nicht erkennbar.

im gewählten Koordinatensystem. Beide Werte haben im Gegensatz zu  $\gamma$  also keine physiologische Relevanz in der Statistik. Aus diesem Grund können die Kurven ohne Beschränkung auch auf  $B = 100$  skaliert und auf  $\varphi = 0^\circ$  verschoben werden.

Die auf diese Weise gesammelten Messdaten sind in Abbildung 4.5 B im Bereich des Minimums um  $0^\circ$  aufgetragen. Der Unterschied zwischen den Werten für den Rigor- und den Relaxed-Zustand ist hier deutlich sichtbar. Beide Punktverteilungen sind deutlich voneinander getrennt.

Dieses Ergebnis spiegelt sich auch in den Fitergebnissen für den Parameter  $\gamma$  wieder. Abbildung 4.6 zeigt die ermittelten Werte für  $\gamma$  im Relaxed- oder Rigor-Zustand in Abhängigkeit von der Sarkomerlänge der Myofibrille in der ROI. Wie gut zu sehen ist, ergeben sich zwei deutlich voneinander getrennte Verteilungen für den Rigor-Zustand (rot) und den Relaxed-Zustand (blau). Die Mittelwerte sind  $\gamma_{rig} = 0,733 \pm 0,005$  ( $s_m, n = 55$ ) für den Rigor-Zustand und  $\gamma_{rel} = 0,501 \pm 0,006$  ( $s_m, n = 70$ ) für den Relaxed-Zustand.

Eine Abhängigkeit von der Sarkomerlänge ist nicht erkennbar, das heißt die geringere Überlappung von Myosin- und Aktinfilamenten bei großen Sarkomerlängen scheint keinen Einfluss auf  $\gamma$  im Relaxed- und Rigor-Zustand zu haben.

### 4.1.3 Weak-binding Zustand

*Rigor* und *Relaxed* sind zwei Extremzustände, in denen die Mehrzahl der Querbrücken entweder verbunden (*Rigor*) oder gelöst ist (*Relaxed*). Um zu ermitteln, ob der Parameter  $\gamma$  von der Myosin-Aktin Bindung abhängt, soll nun ein Zustand schwacher Bindung untersucht werden. Der *weak-binding* Zustand kann durch  $\text{Ca}^{2+}$ -aktivierende Lösung in Kombination mit dem Myosin-Blocker BTS (siehe Abschnitt 2.4.5) besetzt werden. Hier bindet Myosin zwar an Aktin, der Kraftschlag wird aber verhindert, so dass die molekulare Konformation des Myosins eher dem *Relaxed* Zustand entspricht (siehe Abbildung 2.16). Wenn nun die Bindung an Aktin ausschlaggebend für die Polarisationsabhängigkeit ist, sollte das Resultat für  $\gamma_{\text{BTS}}$  eher bei  $\gamma_{\text{rig}}$  als bei  $\gamma_{\text{rel}}$  liegen.

Aus den Messungen an  $n = 9$  Myofibrillen in aktivierender HA+BTS Lösung ergab sich ein Mittelwert von  $\gamma_{\text{HA+BTS}} = 0,492 \pm 0,017$ . Im Rahmen der Standardabweichung entspricht dies dem Wert  $\gamma_{\text{rel}}$  für den *Relaxed*-Zustand.

Zusätzlich wurde einige Myofibrillen mittels Lösungswechsel in verschiedenen Zuständen mikroskopiert: zunächst in relaxierender HR+BTS Lösung, anschließend in aktivierender HA+BTS Lösung. Bei diesen Experimenten war ein minimaler Anstieg in den Ergebnissen für  $\gamma$  von „relaxed“ zu „aktiviert“ zu beobachten. Der Mittelwert für  $\gamma$  in HR+BTS lag bei  $\gamma_{\text{HR+BTS}} = 0,456 \pm 0,014$  ( $n = 7$ ).

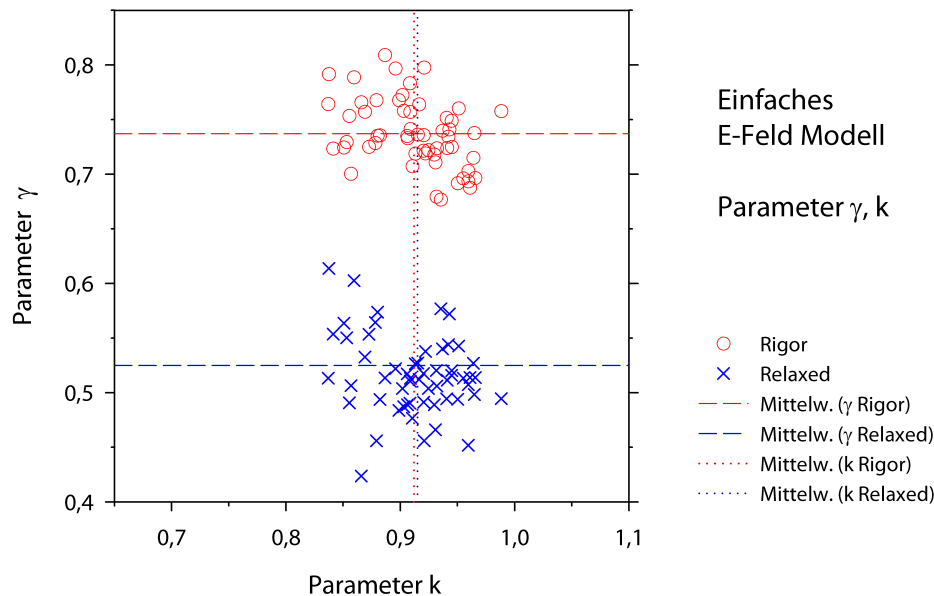
### 4.1.4 Kleinman-Symmetrie

Bisher wurde vorausgesetzt, dass SHG am Muskel verlustfrei stattfindet und damit Kleinman-Symmetrie gilt. Wie in Abschnitt 3.1.2 diskutiert, ist der zweite Fitparameter  $k^2 = \kappa^2 + \zeta^2$  aus Gleichung 3.13 dann gleich 1 und man erhält die bisher verwendete, vereinfachte Fitfunktion 3.14.

Nun soll überprüft werden, ob sich  $k = 1$  auch im Fit an die gezeigten experimentellen Daten ergibt, wenn  $k$  als Parameter frei gelassen wird. Die Fitergebnisse für die beiden Parameter  $\gamma$  und  $k$  sind in Abbildung 4.7 gegeneinander aufgetragen.

Wie deutlich zu sehen ist, sind die Ergebnisse für  $k$  alle kleiner als 1. Die Mittelwerte waren  $k_{\text{rig}} = 0,912 \pm 0,005$  für den *Rigor*-Zustand und  $k_{\text{rel}} = 0,915 \pm 0,004$  für den *Relaxed*-Zustand. In den Ergebnissen für den Parameter  $\gamma$  zeigt sich dabei eine kleine Verschiebung gegenüber den in Abbildung 4.6 gezeigten Resultaten. Als Mittelwerte für  $\gamma$  ergaben sich mit freiem  $k$  aus den Fits:  $\gamma_{\text{rig}} = 0,737 \pm 0,004$  für den *Rigor*-Zustand und  $\gamma_{\text{rel}} = 0,525 \pm 0,005$  für den *Relaxed*-Zustand.

Die Güte der Fits mit freiem  $k$  (Gleichung 3.13) war insgesamt noch besser als mit  $k = 1$  (Gleichung 3.14). Im Durchschnitt war nun  $R^2 > 0,98$ . Um zu bewerten, ob die



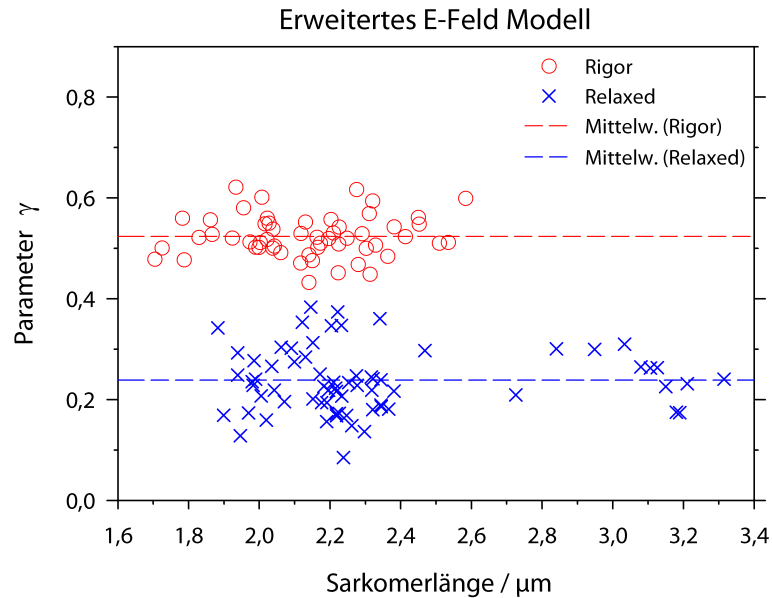
**Abbildung 4.7 Messergebnisse für Parameter  $\gamma$  und  $k$ .** Wenn Kleinman-Symmetrie nicht vorausgesetzt wird, enthält die Modellfunktion einen weiteren freien Parameter  $k$ . Dieser sollte bei Bedingungen für Kleinman-Symmetrie den Wert  $k = 1$  annehmen, jedoch  $k < 1$  für alle Messwerte. Die Mittelwerten sind  $\gamma_{rig} = 0,737 \pm 0,004$ ,  $k_{rig} = 0,912 \pm 0,005$  für den Rigor-Zustand und  $\gamma_{rel} = 0,525 \pm 0,005$ ,  $k_{rel} = 0,915 \pm 0,004$  für den Relaxed-Zustand.

besseren Fitergebnisse ausschließlich auf die höhere Zahl von Fitparametern zurückzuführen ist, wurde ein F-Test zum Vergleich der beiden Fitfunktionen durchgeführt.

Durch die Größe  $F$  wurde die Änderung in der Summe der quadratischen Abweichungen mit der Änderung der Zahl der Freiheitsgrade für jeden Fit verglichen. Es ergaben sich sehr hohe Werte für  $F$  mit einem Mittelwert von  $F = 64$ . Wenn die einfachere Fitfunktion genauso gut zutreffend wäre wie die kompliziertere, würde man hier Werte von  $F \approx 1$  erwarten. Die zu  $F$  gehörenden  $p$ -Werte waren in 95% der Fits  $p < 0,05$ , das heißt die Wahrscheinlichkeit, dass die einfache Funktion nur zufällig ein schlechteres Fitergebnis lieferte, war bei 95% der Fits kleiner als 5%. Gleichung 3.13 mit freiem  $k$  beschreibt die Messwerte also signifikant besser als Gleichung 3.14, für die Kleinman-Symmetrie vorausgesetzt worden war.

#### 4.1.5 Ergebnisse mit erweitertem E-Feld Modell

Die bisher gezeigten Ergebnisse basieren auf dem in Abschnitt 3.1.3 beschriebenen einfachen E-Feld Modell, in dem das elektrische Feld keine Komponenten in Ausbreitungsrichtung des Lasers hat ( $E_z = 0$ ). Da diese Annahme bei Objektiven mit



**Abbildung 4.8** Messergebnisse für  $\gamma$  im erweiterten E-Feld Modell. Für den Rigor- und den Relaxed-Zustand ergeben sich weiterhin zwei eindeutig voneinander getrennte Verteilungen, die gegenüber dem einfachen Modell aber deutlich nach unten verschoben sind, mit Mittelwerten von  $\gamma_{rig} = 0,524 \pm 0,006$  für den Rigor-Zustand und  $\gamma_{rel} = 0,239 \pm 0,008$  für den Relaxed-Zustand.

hoher numerischer Apertur für die Umgebung des Fokus nicht zutreffend ist, wurde in Abschnitt 3.1.4 ein erweitertes Modell entwickelt, das die komplette Verteilung des elektrischen Feldes im Fokus berücksichtigt.

Aus diesem Modell resultiert die erweiterte Fitfunktion in Gleichung 3.20. Die darin enthaltenen Koeffizienten  $\eta_{f,g}$  werden in numerischen Berechnungen ermittelt, deren Ergebnisse in Abschnitt 4.2.1 gezeigt werden.

Die Anwendung der erweiterten Fitfunktion 3.20 auf die bereits gezeigten experimentellen Daten führt für den Parameter  $\gamma$ , wie in Abbildung 4.8 ersichtlich wird, zu deutlich verschobenen Ergebnissen gegenüber dem einfachen E-Feld Modell (vgl. Abbildung 4.6). Die Mittelwerte im erweiterten Modell sind  $\gamma_{rig} = 0,524 \pm 0,006$  ( $s_m$ ,  $n = 55$ ) für den Rigor und  $\gamma_{rel} = 0,239 \pm 0,008$  ( $s_m$ ,  $n = 70$ ) für den Relaxed-Zustand.

An dem grundsätzlichen Ergebnis zweier deutlich voneinander getrennter Verteilungen des Parameters  $\gamma$  für den Rigor und den Relaxed-Zustand ändert die erweiterte Fitfunktion also nichts. Der Abstand der beiden Mittelwerte ist hier etwas größer. Die Verteilungen selbst sind etwas breiter, haben also eine etwas größere Standardabweichung.

## 4.2 Modelle zur SHG Polarisationsabhängigkeit

In diesem Abschnitt werden einige Ergebnisse der Berechnungen mit den in Abschnitt 3.1 entwickelten Modellen vorgestellt. Zunächst geht es um das erweiterte E-Feld Modell, das eine exaktere Berechnung von  $\chi^{(2)}$  Komponenten erlaubt, dann um zwei Modelle, die die Polarisationsabhängigkeit von SHG an Myofibrillen erklären sollen.

### 4.2.1 Berücksichtigung der Feldverteilung im Fokus

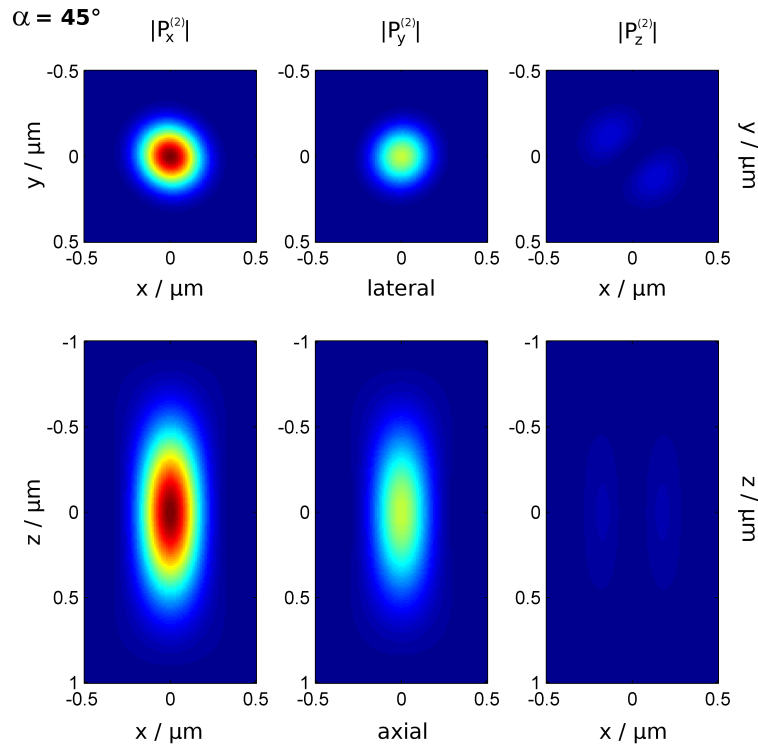
Im Experiment wird der Laserstrahl durch das Objektiv auf die Probe fokussiert und erzeugt dort SHG Signale, die sich weiter ausbreiten, durch das Kondensorobjektiv gesammelt und im Detektor registriert werden. Dieser Prozess lässt sich in gleicher Weise auch simulieren.

Der Laserstrahl wird durch sein elektrisches Feld mit Gaußförmigem Strahlprofil beschrieben (Strahldurchmesser z. B. 5,5 mm,  $\lambda = 880$  nm). Die Eigenschaften des Objektivs, wie Vergrößerung (63 $\times$ ), numerische Apertur (1,2), Aperturdurchmesser (9,5 mm) und Immersion ( $n=1,33$ ), bestimmen die Verteilung des elektrischen Feldes im Fokus. Für verschiedene Ausgangssituationen wurden die Eigenschaften als Konfigurationen zusammengefasst, mit den gerade genannten Werten als Standardkonfiguration (siehe auch Abschnitt 3.1.4).

Mit Hilfe der bereits erwähnten MATLAB EFF-Toolbox kann daraus das elektrische Feld im Bereich des Fokus in einem geeigneten Raster numerisch berechnet werden. Über den grundlegenden Zusammenhang (2.9) kann nun für jeden Punkt die Polarisation 2. Ordnung ermittelt werden, wenn man den  $\chi^{(2)}$ -Tensor vorgibt. Für einen  $\chi^{(2)}$ -Tensor mit Rotationssymmetrie um die  $y$ -Achse und  $\gamma = 0,5 / \kappa = 1 / \zeta = 0$  (geeignetes Modell für Myofibrillen) zeigt Abbildung 4.9 die berechneten Komponenten  $P_x^{(2)}$ ,  $P_y^{(2)}$ ,  $P_z^{(2)}$  des SHG Signals. Der einfallende Laserstrahl war hier im Winkel  $\alpha = 45^\circ$  zur  $x$ -Achse polarisiert, die Komponenten  $E_x$  und  $E_y$  des eingestrahnten elektrischen Feldes waren also gleich groß. Dennoch ist  $P_x^{(2)}$  erkennbar größer als  $P_y^{(2)}$ . Dies ist eine direkte Konsequenz aus der Vorgabe für den  $\chi^{(2)}$ -Tensor, der bei gegebenem E-Feld die Charakteristik des SHG Signals bestimmt.

Dies ist das Prinzip der polarisationsabhängigen Messungen: Im Experiment beobachtet man die Veränderung des SHG Signals und kann daraus rückwärts auf die Beschaffenheit des  $\chi^{(2)}$ -Tensors schließen.

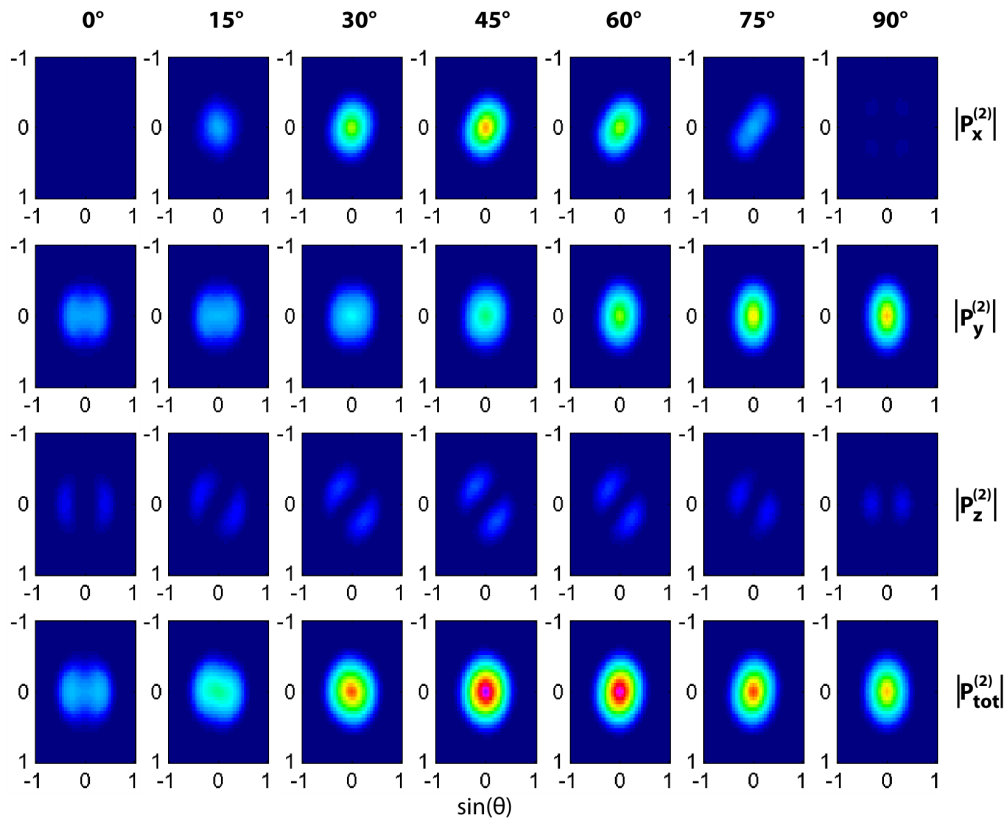
Beobachtet wird allerdings nicht der Fokus selbst, sondern ein aufsummiertes Signal im Fernfeld durch das Kondensorobjektiv. Die Signalverteilung in der Kondensorebene ist in Abbildung 4.10 zu sehen. Die Ebenen zeigen jeweils eine Kugelfläche im



**Abbildung 4.9** SHG Signalverteilung im Fokus. Berechnete Intensität der 3 Komponenten  $P_x^{(2)}$ ,  $P_y^{(2)}$ ,  $P_z^{(2)}$  des SHG Signals einer um die  $y$ -Achse rotationssymmetrischen Probe mit Eigenschaft  $\gamma = 0,5$  im Fokus eines  $63\times$ -Objektivs bei einer Laserpolarisation im Winkel  $\alpha = 45^\circ$  zur  $x$ -Achse. Berechnung mit MATLAB und der Standard Konfiguration aus 3.1.4. Lineare Farbskala.

Fernfeld mit Koordinaten in Einheiten von  $\sin \theta$ . Für jeden Punkt der Fläche wurden alle SHG Signale aus dem numerischen Fokusbereich in Richtung dieses jeweiligen Punktes phasengerecht aufsummiert.

Es ist nun sehr interessant, die hier simulierten Intensitäten im Fernfeld mit den zuvor experimentell gemessenen Intensitäten aus Abbildung 4.4 zu vergleichen. Die unterste Reihe in Abbildung 4.10 zeigt den Verlauf der Gesamtintensität mit einem Minimum bei  $0^\circ$  (parallel zur Symmetrieachse) einem Maximum in der Nähe von  $45^\circ$  und einem lokalen Minimum bei  $90^\circ$  entsprechend der roten Kurve in Abbildung 4.4. Die Komponente senkrecht zur Faserachse ist  $P_x^{(2)}$ , die parallele Komponente ist  $P_y^{(2)}$ . In diesen beiden Verläufen spiegeln sich die Messergebnisse mit Polarisationsfilter (graue Kurven) wieder. In der Simulation zeigt sich überdies auch noch eine  $z$ -Komponente, deren Signal aber deutlich schwächer ist als das der  $x$ - und  $y$ -Komponenten.



**Abbildung 4.10 SHG Signalverteilung im Fernfeld.** In MATLAB berechnete Komponenten  $P_x^{(2)}$ ,  $P_y^{(2)}$ ,  $P_z^{(2)}$  des SHG Signals im Fernfeld (Kondensorebene) für eine Probe mit Rotationssymmetrie um die y-Achse und  $\gamma = 0,5$ . Zu sehen ist die Abhängigkeit vom Winkel der Laserpolarisation zur Faserachse.

Insgesamt kann man feststellen, dass die simulierten SHG Intensitäten gut mit den Messwerten übereinstimmen. Der vorgegebene  $\chi^{(2)}$  Tensor beschreibt also treffend die reale Situation bei Myofibrillen. Dieses Ergebnis ist bei korrekten Berechnungen natürlich zu erwarten, da die Vorgaben für den  $\chi^{(2)}$ -Tensor in Anlehnung an die Fitergebnisse aus den Messdaten getroffen wurden.

Die Anwendung des in Abschnitt 3.1.4 entwickelten erweiterten E-Feld Modell erfolgt in etwas abgewandelter Weise. Die Multiplikation mit den  $\chi^{(2)}$  Tensorkomponenten ist hier unter der Annahme einer homogenen Probe aus der Berechnung des elektrischen Feldes und der Summationen im Fernfeld herausgelöst. Jene beiden Berechnungen gehen in die Fitfunktion (3.20) in Form der Koeffizienten  $\eta_{f,g}$  ein. Mit Hilfe dieser Fitfunktion können nun die unabhängigen Komponenten des  $\chi^{(2)}$  Tensors in Form des Parameters  $\gamma$  unter Berücksichtigung der Felder im Fokus und ihrer Ausbreitung direkt aus experimentellen Daten ermittelt werden.



**Tabelle 4.1 Koeffizienten im erweiterten E-Feld Modell.** Numerisch ermittelte Werte für die  $\eta_{f,g}$  Koeffizienten aus Gleichung 3.20 in verschiedenen Konfigurationen des optischen Systems. Die Standardkonfiguration wird in Abschnitt 3.1.4 erläutert. Werte  $<0,005$  wurden vereinfachend gleich null gesetzt.

Konfiguration	$\eta_{0,0}$	$\eta_{2,0}$	$\eta_{2,1}$	$\eta_{2,2}$	$\eta_{4,0}$	$\eta_{4,1}$	$\eta_{4,2}$
<i>Einfaches E-Feld Modell</i>	1,00	2,00	2,00	0,00	-3,00	-2,00	1,00
Erweitertes Modell: Standardkonfig.	1,11	2,75	2,09	0,01	-3,73	-1,74	0,99
Strahldurchmesser: 5,0 mm	1,10	2,68	2,08	0,01	-3,67	-1,76	0,99
Strahldurchmesser: 6,0 mm	1,12	2,81	2,10	0,01	-3,78	-1,72	0,99
Strahlelliptizität: 0,02*	1,19	2,60	2,02	0,05	-3,58	-1,67	0,95

\* In dieser Konfiguration ist zusätzlich:  $\eta_{0,2} = -0.04$

### Die Koeffizienten $\eta_{f,g}$

Wie bereits erwähnt, beschreiben die Koeffizienten  $\eta_{f,g}$  aus Gleichung 3.20 den Einfluss der Feldverteilung im Fokus auf die SHG Intensität im Fernfeld. Die konkrete numerische Berechnung der Koeffizienten für verschiedene Konfigurationen führte zu den im folgenden gezeigten Ergebnissen.

In Tabelle 4.1 sind die Resultate für einige Konfigurationen zusammengefasst. Werte kleiner als 0,005 wurden hierbei vernachlässigt und näherungsweise auf Null gesetzt. Grundlage der Standard-Konfiguration sind die in Abschnitt 3.3.1 ermittelten Eigenschaften des Mikroskopie Systems. Da z. B. die Messung des Strahldurchmessers mit einer Unsicherheit von  $\pm 0,5$  mm behaftet ist, wurden Konfigurationen mit 5,5 mm, 5 mm und 6 mm simuliert, um die Auswirkungen von Abweichungen in den Ausgangswerten auf die Koeffizienten zu untersuchen.

Gegenüber dem einfachen E-Feld Modell ohne axiale oder senkrechte Feldkomponenten ergeben sich deutliche Abweichung bei den Koeffizienten  $\eta_{f,g}$ . Wie bereits in Abschnitt 4.1.5 vorweggenommen, führt dies in der Anwendung des Modells auch zu einer signifikanten Verschiebung der Fitresultate für  $\gamma_{rig}$  und  $\gamma_{rel}$ .

Durch kleinere Variationen der Parameter aus der Standard-Konfiguration ergeben sich hingegen kaum nennenswerte Veränderungen. Die Annahme eines  $\pm 0,5$  mm veränderten Laserstrahldurchmessers führt letztlich nur zu einer leichten Verschiebung aller  $\gamma$  Werte von  $\mp 0,03$ .

Die Annahme einer leichten elliptischen Polarization des Lasers von 0,02 (entspricht dem in 3.3.1 ermittelten Wert von  $<1:50$ ), bewirkt um 0,04 kleinere  $\gamma$  Werte. Eine Veränderung der Voxelgröße des numerischen Fokusvolumens von  $25 \times 25 \times 50 \text{ nm}^3$  auf  $50 \times 50 \times 100 \text{ nm}^3$  oder  $75 \times 75 \times 150 \text{ nm}^3$  hatte fast keinerlei Auswirkung ( $<0,01$ ) auf die Koeffizienten  $\eta_{f,g}$ .

Die Berechnungen wurden zunächst unter der Annahme einer im gesamten Fokusbereich homogenen Probe durchgeführt. Zum Vergleich wurde der SHG erzeugende Bereich dann mit einer Verteilungsfunktion für eine zylinderförmige Probe eingeschränkt. Für einen Probendurchmesser von  $1\ \mu\text{m}$  führt diese Annahme zu um ca. 0,05 größeren  $\gamma$  Werten. Schränkt man die Probengröße noch weiter ein (dieser Fall tritt bei Myofibrillen real nicht auf) und lässt das Probenvolumen gegen null gehen, so nähern sich die Koeffizienten  $\eta_{f,g}$  denen für das einfache E-Feld Modell an. Dieses Ergebnis bestätigt nochmals die Konsistenz des erweiterten E-Feld Modells mit dem bestehenden einfachen Modell für die Polarisationsabhängigkeit des SHG Signals.

## 4.2.2 SHG aus helicalen Strukturen

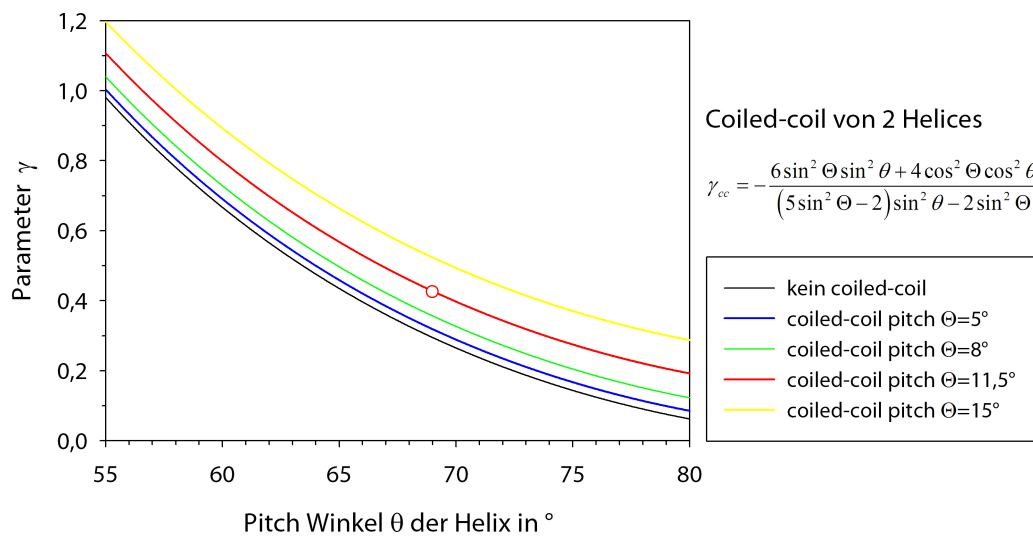
In Abschnitt 3.1.5 wurde ein Modell vorgestellt, in dem einzelne SHG Dipole entlang der Windung einer Helix angeordnet sind. In diesem Modell wird der  $\chi^{(2)}$ -Tensor des Gesamtsystems allein durch den Gangwinkel  $\theta$  der Helix bestimmt. Die beiden einzigen unabhängigen Tensorkomponenten lassen sich durch den Parameter  $\gamma$  ausdrücken.

In Abbildung 4.11 zeigt die schwarze Kurve, die Abhängigkeit des Parameters  $\gamma$  vom Gangwinkel  $\theta$  im Modell der einfachen Helix. Der Kurvenverlauf ist hier durch  $\gamma(\theta) = 2/\tan^2\theta$  gegeben. Für die  $\alpha$ -Helix (siehe Abschnitt 2.4.3) lässt sich aus den bekannten Maßen für den Radius und die Ganghöhe (*Pitch*) der Helix der Gangwinkel  $\theta_\alpha = 69^\circ$  berechnen. Daraus ergibt sich also ein  $\gamma_\alpha = 0,30$ .

Wie bereits in Abschnitt 2.4.3 erläutert, besteht die Rod-Domain eines Myosin Moleküls aus zwei  $\alpha$ -Helices, die zu einem Coiled-Coil, also einer Doppelwendel verdrillt sind. Im Modell wird dies durch den Gangwinkel  $\Theta$  des Coiled-Coils berücksichtigt. Die farbigen Kurven in Abbildung 4.11 zeigen, wie sich das erneute Verdrillen einer Helix mit Gangwinkel  $\theta$  zu einem Coiled-Coil mit Gangwinkel  $\Theta$  auf den Parameter  $\gamma$  des Gesamtsystems auswirkt.

Die Situation im Myosinmolekül kann annähernd beschrieben werden mit  $\theta = 69^\circ$  und  $\Theta = 11,5^\circ$ . In dieser Konfiguration (als Punkt im Diagramm markiert) ergibt sich ein  $\gamma_{cc} = 0,43$ . Dieser Wert liegt zwischen den Messwerten für  $\gamma_{rig}$  und  $\gamma_{rel}$ , die über die Fitfunktion des erweiterten E-Feld Modells ermittelt wurden.

Aus dem Diagramm 4.11 können in umgekehrter Weise auch zu gemessenen  $\gamma$ -Werten die zugehörigen Winkel im Modell abgelesen werden. Im einfachen Helix Modell kann man  $\gamma_{rig} = 0,524$  in  $\theta = 62,9^\circ$  und  $\gamma_{rel} = 0,239$  in  $\theta = 70,9^\circ$  übersetzen. Nimmt man zusätzlich eine Coiled-Coil Struktur an, so ergeben sich entsprechend größere Winkel.



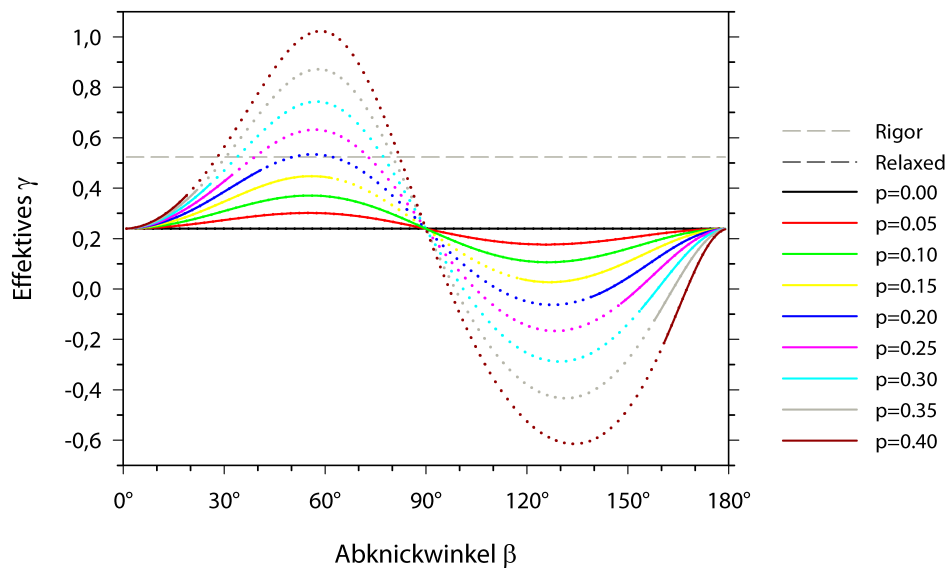
**Abbildung 4.11 SHG im Modell verdrehter Helices.** Die Größe von  $\gamma$  hängt vom Gangwinkel  $\theta$  der Einzelhelix, und vom Gangwinkel  $\Theta$  der übergeordneten Helix ab. Im Myosinrod ist ungefähr  $\theta = 69^\circ$  und  $\Theta = 11,5^\circ$  (markiert als roter Punkt).

### 4.2.3 Auslenkungen von der Filamentachse

In Abschnitt 3.1.6 wurde ein Modell vorgestellt, das Änderungen im Wert  $\gamma$  für ein rotationssymmetrisches System untersucht, in dem ein Teil  $p$  der Moleküle um einen Winkel  $\beta$  von der Symmetrieachse ausgelenkt wird. Die Ergebnisse für das berechnete effektive  $\gamma$  sind in Abbildung 4.12 zu sehen.

Als Ausgangswert  $\gamma_0$  für das System ohne Auslenkungen wurde in diesem Graphen der mit Hilfe des erweiterten E-Feld Modells ermittelte Wert  $\gamma_{rel}$  für den Relaxed-Zustand gewählt. Die farbigen Kurven zeigen die Abhängigkeit des effektiven  $\gamma$  vom Winkel  $\beta$  für verschieden große Anteile  $p$  des ausgelenkten Teils am gesamten Molekül. Das Maximum jeder Kurve liegt etwa bei  $60^\circ$  Auslenkung. In diesem Winkel ergibt sich also die größte Änderung im  $\gamma$ . Die Amplitude der Änderung wird erwartungsgemäß größer, je größer der rotierte Anteil des Moleküls wird. Grundsätzlich wird der Bereich der beobachteten  $\gamma$ -Werte von  $\gamma_{rel}$  bis  $\gamma_{rig}$  vollständig durch das Modell abgedeckt.

Um die Aussagekraft des Modells zu bewerten, muss es jedoch in Bezug gesetzt werden zur Situation im Myosinmolekül mit seinen bekannten Abmessungen (siehe Abschnitt 2.4.2). Die wichtigste Konformationsänderung zwischen den untersuchten Zuständen Relaxed und Rigor findet, wie in Abbildung 2.16 zu sehen war, in der Lever-arm Region mit den beiden leichten Ketten statt. Diese Region ist nur etwa 8 nm lang, was im Vergleich zur Länge des gesamten Myosinrods von  $l = 150$  nm ei-



**Abbildung 4.12 Änderung von  $\gamma$  im Abknickmodell.** Berechnet wurde das effektive  $\gamma$  für ein rotationssymmetrisches System, in dem ein Teil  $p$  der Moleküle um einen Winkel  $\beta$  von der Symmetrieachse ausgelenkt wird. Als Ausgangswert  $\gamma_0$  wurde hier der ermittelte Wert von  $\gamma_{rel}$  gewählt. Die gepunkteten Linien markieren den Bereich einer möglichen Beschränkung durch die Lage der Aktin-Filamente im Muskel. Grundsätzlich erscheint das Modell geeignet, Änderungen im  $\gamma$  der beobachteten Größenordnung zu erklären.

nem Anteil von  $p = 0,05$  entspricht. Dies gilt natürlich nur unter der Annahme, dass pro Längeneinheit des Moleküls der gleiche Beitrag zum SHG Signal erzeugt wird.

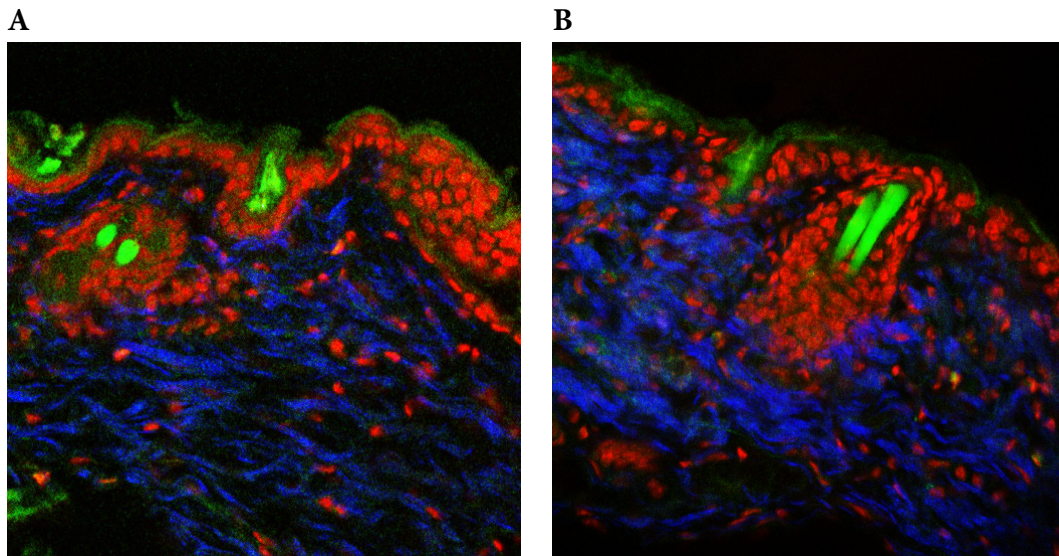
In Abbildung 4.12 kann anhand der roten Kurve abgelesen werden, welchen Einfluss das Abknicken von 5% des Moleküls auf das berechnete effektive  $\gamma$  hat. Die Amplitude ist deutlich zu klein, um die experimentell beobachteten  $\gamma$ -Werte zu erklären. Damit die Amplitude in der richtige Größenordnung läge, müsste man dem Lever-arm gegenüber der einfachen Längenberechnung eine zwei- bis vierfach höhere Gewichtung zuordnen (d. h. in diesem Bereich müsste ein entsprechend größerer Beitrag zum SHG Signal entstehen), so dass  $p = 0,1$  bis  $0,2$  wäre. Selbst unter dieser Annahme besteht jedoch noch ein weiteres Problem. Wie bereits erwähnt, liegt das Maximum der berechneten effektiven  $\gamma$ -Werte im Bereich von etwa  $60^\circ$ . Für den Lever-arm ist dies ungefähr der Winkelbereich, den man für den Relaxed Zustand erwartet. Hier wurde das kleinere  $\gamma$  beobachtet. Im Rigor-Zustand erwartet man für den Lever-arm einen Winkel  $>100^\circ$ . Hier sagt das Abknickmodell die minimalen  $\gamma$ -Werte voraus.

Eine zweite Möglichkeit, das Abknickmodell auf das Myosinmolekül anzuwenden, gründet sich auf die Beobachtung, dass die gesamte 60 nm lange S2 Domain von der

LMM Achse abgeklappt sein kann. Bevorzugt tritt das Abknicken in einer Region (*hinge region*) auf, die etwa 44 nm vom Myosinkopf entfernt ist [SUGGS et al., 2007].

Auf das Modell bezogen, bedeutet die Umrechnung der Längenangaben Anteile von  $p = 0,4$  für S2 bzw.  $p = 0,3$  bis zur Hinge Region. Der potentielle Effekt auf  $\gamma$  ist hier jeweils sehr hoch. Allerdings sind die möglichen Winkelbereiche für  $\beta$  durch die Umgebung des Moleküls eingeschränkt. Betrachtet man die hexagonale Anordnung von dicken und dünnen Filamenten im Querschnitt (vgl. Abbildung 2.10) mit dem erwähnten 1,0 Gitterebenen Abstand von 39 nm, so wird deutlich, dass zwischen den Achsen eines benachbarten dicken und dünnen Filaments nur ein Abstand von etwa 26 nm besteht. Unter Einbeziehung der einzelnen Filamentdurchmesser und der Größe des Myosinkopfes verbleibt ein freier Abstand  $f < 20$  nm, in den S2 ausgelenkt werden kann. Daraus ergibt sich für das Modell die Einschränkung  $p \sin \beta < f/l$ .

In Abbildung 4.12 ist diese Beschränkung dadurch kenntlich gemacht, dass die Kurven nur innerhalb der 20 nm Grenze als Linie gezeichnet und außerhalb gepunktet dargestellt sind. Mit dieser Einschränkung ist der maximale Wert für  $\gamma$  bei  $p = 0,2$  und einem Winkel von  $\beta = 40^\circ$  zu finden. Der gemessene Werte für den Rigor-Zustand wird dann also nicht ganz erreicht. Allerdings muss an dieser Stelle noch einmal darauf hingewiesen werden, dass die einfachen geometrisch Berechnungen auf der Annahme basieren, dass die Dichte von SHG Streuzentren pro Längeneinheit des Moleküls immer gleich ist. Wenn andere Gewichtungen gewählt werden, wirkt sich auch die Beschränkung durch die Gitterstruktur des Muskels anders aus. Auch der Ausgangswert  $\gamma_0$  für die Berechnungen kann natürlich einen anderen Wert annehmen als das hier eingesetzte  $\gamma_{rel}$ .



**Abbildung 4.13** Schnitt durch gesunde Haut einer Maus. (A,B) Im Bild *blau* das SHG Signal von Collagen, *rot* die mit ToPro3 gefärbten Zellkerne, und *grün* die Autofluoreszenz, vor allem von Keratin. Jeweils oben im Bild die Epidermis mit hoher Dichte von Zellkernen, und unten die Dermis, die hauptsächlich aus Collagen besteht. Die Grenze zwischen beiden Bereichen markiert die Lage der Basalmembran. (siehe Aufbau der Haut in Abbildung 2.17). *Bildausschnitt: 238  $\mu\text{m}$ .*

### 4.3 SHG Mikroskopie an Hautproben

In der Haut wird SHG von Filamenten aus Collagen-I erzeugt, die als extrazelluläre Matrix einen Hauptbestandteil der Dermis bilden. Im Kontext von Hautkrebs wurden diese Filamentstrukturen an Mäusen untersucht - zunächst an Hautproben und später auch *in vivo*. Im Zusammenhang mit dem Krankheitsbild der Sklerodermie wurden Gewebeschnitte menschlicher Haut mikroskopiert.

#### 4.3.1 Schnitte von Hauttumoren

Zunächst wurden Gefrierschnitte von Hautproben aus der ventralen Haut von Mäusen untersucht. Zwei Bildbeispiele für gesunde Haut sind in Abbildung 4.13 zu sehen. Hier wurden SHG Signale vom Collagen (blau dargestellt) aufgezeichnet, sowie Autofluoreszenz von endogenen Hautproteinen (grün) wie Keratin [PENA et al., 2005], und schließlich Fluoreszenz von Zellkernen (rot), die mit einem DNA-Marker (To-Pro-3) speziell angefärbt worden waren.

Der in Abbildung 2.17 skizzierte Aufbau der Haut ist auch in Abbildung 4.13 leicht wiederzufinden. Am oberen Bildrand befindet sich die Epidermis, in der die äußere Schicht von fluoreszierendem Keratin auffällt. Die Epidermis ist bei dieser Probe recht dünn. Zum einen ist die Haut bei Mäusen insgesamt dünner als beim Menschen, zum anderen können sich die obersten Hautschichten auch bei der Präparation ablösen, entweder bei der Enthaarung im ersten Schritt der Präparation oder später beim Einfrieren und Anfertigen der Gefrierschnitte.

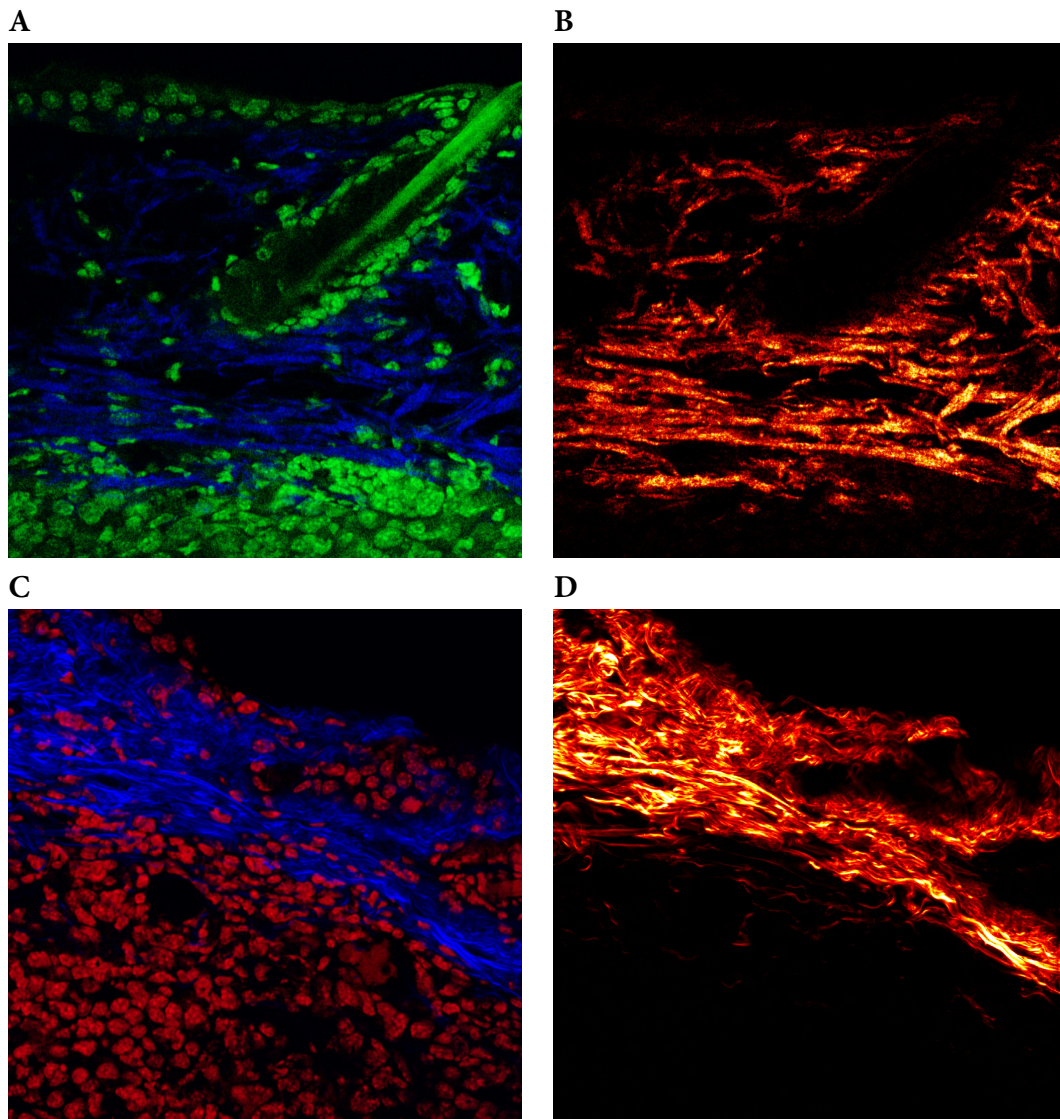
Im unteren Bereich der Epidermis sieht man eine große Zahl von Zellkernen (rot) in der Basalzellen-Schicht. Hier befindet sich die Basalmembran. Auf der anderen Seite dieser Membran beginnt die Dermis, in der deutlich weniger Zellen zu finden sind, die zudem eher vereinzelt liegen und nicht im Verbund. In diesem Bereich ist das dichte Collagen-Netzwerk der Dermis gut zu sehen.

Die stärkste Autofluoreszenz ist bei Haaren zu beobachten (A: im Bild links, B: in der Bildmitte). Die Haarwurzeln sind in der Dermis verankert. Die Haarfollikel erscheinen als Ausstülpungen der Epidermis mit vielen Zellkernen (gut zu sehen in der Bildmitte von B). Insgesamt war bei Hautschnitten sehr viel weniger Autofluoreszenz zu beobachten, als bei frisch entnommenen kompletten Hautproben.

Nach den Vergleichsproben aus gesunder Haut, wurden Gewebeschnitte intracutan gewachsener Tumore (Präparation siehe Abschnitt 3.2.4) untersucht. Abbildung 4.14 zeigt einige Aufnahmen. In Abbildung A sind einige bereits erwähnte Strukturen wiederum gut zu erkennen: die Epidermis am oberen Bildrand (Autofluoreszenz und gefärbte Zellkerne diesmal beide im grünen Farbkanal), die Dermis mit ihrer Collagenmatrix (blau dargestellt) im zentralen Bereich des Bildes und ein Haar (grün) mit Haarfollikel.

Im Bild ganz unten zeigt sich nun allerdings ein Bereich mit sehr vielen Zellkernen. Hier beginnt der Tumor. Der Bereich der Collagenmatrix endet an dieser Stelle, wie im Kanal der SHG Signale (einzeln dargestellt in Abbildung B) zu erkennen ist. Wesentlich deutlicher zeigt sich dieser Zusammenhang noch in Abbildung C und D. Der Tumor nimmt hier fast die gesamte untere Bildhälfte ein. In Abbildung C sind die Zellkerne wieder im roten Farbkanal abgebildet und das Collagenetzwerk im blauen Farbkanal. Die Epidermis ist bei diesem Schnitt abgelöst und nicht im Bild zu sehen.

Abbildung D zeigt ausschließlich den SHG Kanal und damit die Informationen, die sich ohne Zuhilfenahme von externen Markern wie Fluoreszenzfarbstoffen gewinnen lassen. Durch die Kapsel aus Collagen, die sich um den Tumor herum gebildet hat, ist die Grenze des Tumors auch hier gut sichtbar.



**Abbildung 4.14 Gefrierschnitte durch ein B16-Melanom.** Der intracutan in der ventralen Haut einer Maus gewachsene Tumor enthält selbst kein Bindegewebe, ist aber dicht von Collagen eingekapselt. Die Tumorgrenze ist dadurch gut sichtbar. (A) Oben im Bild die Epidermis, in der Mitte die Dermis (Collagen SHG in *blau*) mit einem Haarbalg (*grün*) und unten der Tumor (Zellkerne in *grün*). (B) SHG Signale vom Collagen einzeln dargestellt. (C) Epidermis hier beim Anfertigen des Gefrierschnitts abgelöst. SHG-Signale vom Collagen in *blau*, Zellkerne in *rot*. (D) Die Position des Tumors ist auch in der Einzeldarstellung der Collagen SHG Signale sichtbar. *Bildausschnitt*: 238  $\mu\text{m}$ .



### 4.3.2 Native Hautproben

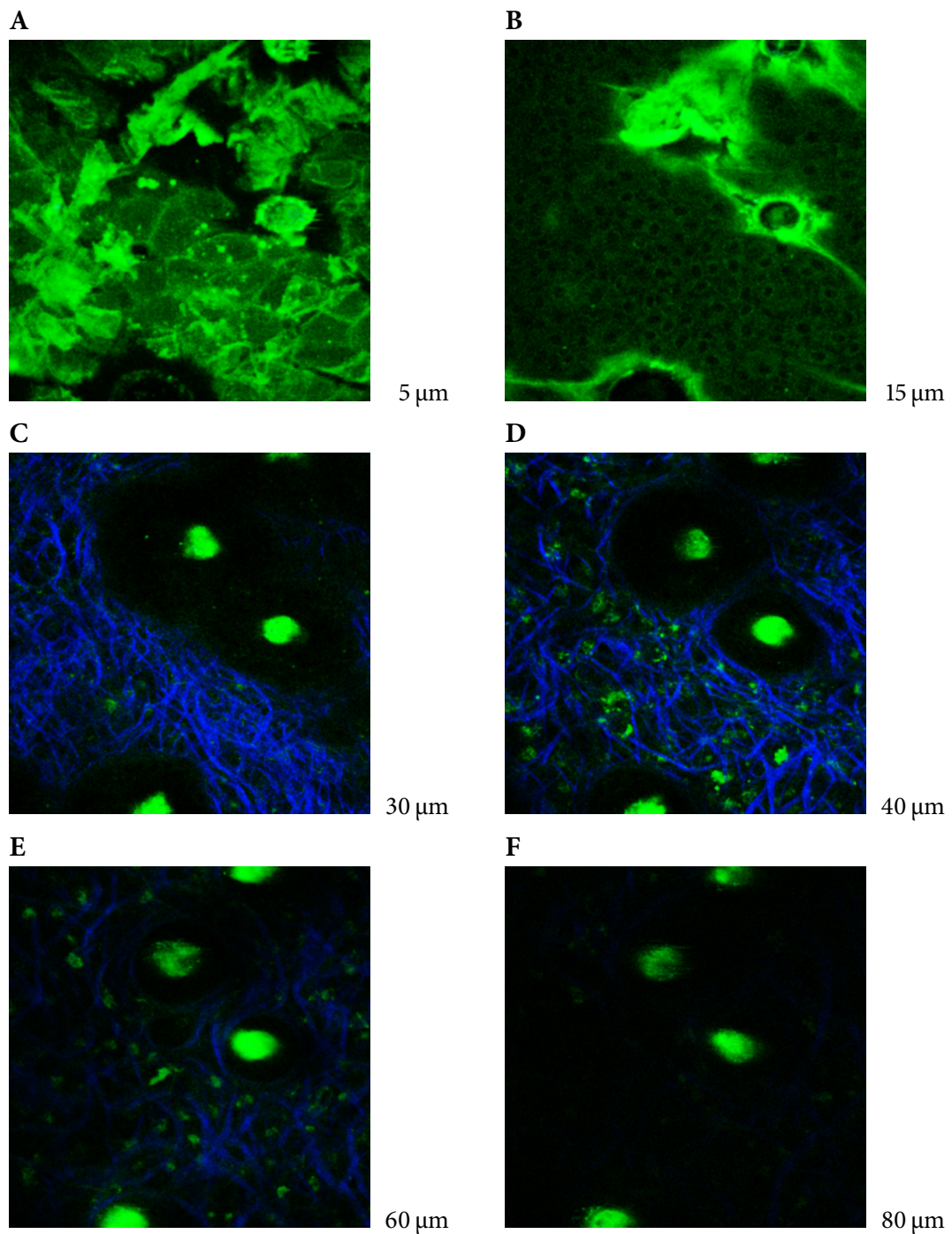
Aus SHG Signalen und Autofluoreszenz lassen sich, wie gesehen, einige Informationen über die Struktur einer Hautprobe gewinnen. Dies ist natürlich vor allem für native Hautproben und spätere *in vivo* Anwendungen interessant. Ein Multiphotonen Mikroskop bietet hier die Möglichkeit, jeweils dünne Schichten einer Probe zu einem Bildstapel aufzunehmen, der die dreidimensionale Struktur wiedergibt.

In Abbildung 4.15 sind einige Ebenen aus einem Bildstapel zu sehen, der an einer *post mortem* Biopsie der dorsalen Haut einer Maus aufgenommen wurde. Im Gegensatz zu den bisher gezeigten Hautschnitten, sind hier Schichten parallel zur Hautoberfläche abgebildet. Durch die Größe des Fokusbereichs wird bei dem verwendeten 63 $\times$ -Objektiv und der Wellenlänge von 880 nm jeweils eine etwa 1,5  $\mu$ m dicke Schicht zu Fluoreszenz oder SHG angeregt. Die gezeigten Bilder wurden aus 3-5 Ebenen mit Abstand 1  $\mu$ m gemittelt.

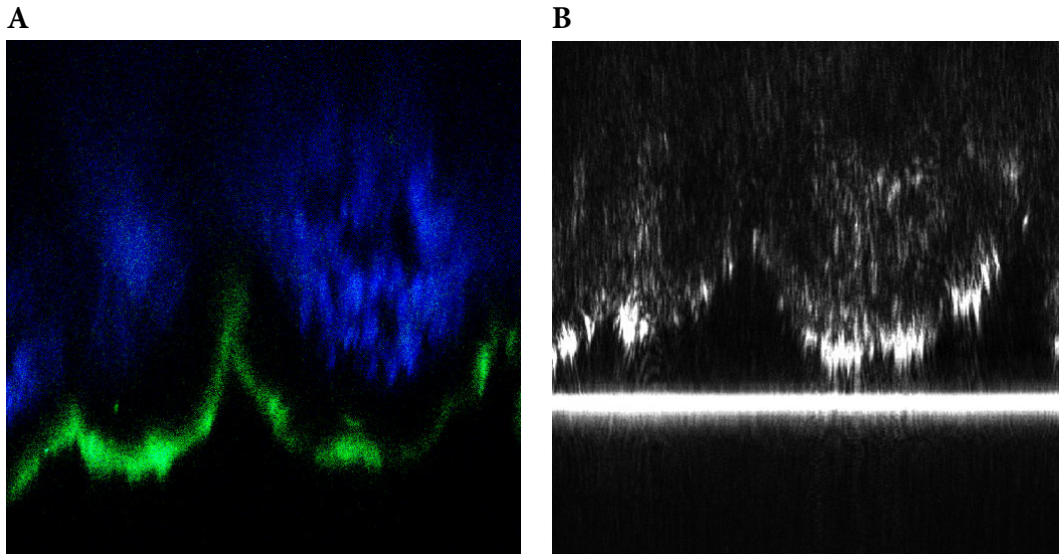
Die Anatomie der Haut ist auch in diesem Bildstapel gut erkennbar. An der Hautoberfläche (A) ist ein starkes Fluoreszenzsignal von großen, plattenförmigen Strukturen erkennbar. Dies sind abgeflachte, tote Hornzellen (Korneozyten) mit ihrem hohen Anteil an Keratin. In der darunterliegenden Schicht (B) der Epidermis liegen die kleineren, lebenden Keratinozyten und Basalzellen, deren Zellkerne hier gut als dunklere Bereiche in der Mitte der Zellen zu erkennen sind.

In einer Tiefe von etwa 30  $\mu$ m liegt die Bildebene (C) bereits innerhalb der Dermis. Hier zeigen sich wieder die SHG Signale vom dichten Collagen-Netzwerk. Die hell fluoreszierenden Bereiche sind die Querschnitte durch drei Haare, die mit ihren Haarfollikeln in der Collagenmatrix eingebettet sind. Das Collagennetzwerk setzt sich in tiefere Schichten der Dermis (D) fort. Zwischen den Collagenfasern finden sich dort vermehrt einzeln liegende, grün fluoreszierende Zellen - besonders gut sichtbar in (E). Dies sind vor allem Zellen des Immunsystems, wie Macrophagen und dendritische Zellen [DUPASQUIER et al., 2004].

Mit zunehmender Tiefe werden die SHG und Fluoreszenz-Signale deutlich schwächer. In einer Tiefe von 80  $\mu$ m (F) sind nur noch die sehr hell fluoreszierenden Haare deutlich zu erkennen. Das SHG Signal der Collagenfasern ist nur noch schwach zu erkennen. Übertragen auf den Hautschnitt in Abbildung 4.14 A entsprechen 80  $\mu$ m dort etwa einem Drittel der Bildhöhe. Der Tiefenbereich, ab dem nur noch sehr wenig Intensität registriert wird, läge bei diesem Schnitt also ungefähr bei der Hälfte des Bildes und damit deutlich höher als die Grenze des Tumors in dieser Probe. Der abnehmende Bildkontrast in tieferen Bildebenen wird bei der Untersuchung von eingepflanzten Tumoren in Mäusen also möglicherweise ein Problem darstellen.



**Abbildung 4.15 Native Hautprobe.** Autofluoreszenz (*grün*) und SHG Signale (*blau*) aus einer *post mortem* Biopsie der dorsalen Haut einer Maus. Scans aus verschiedenen tiefen Ebenen parallel zur Hautoberfläche. (A,B) Epidermis: Starke Autofluoreszenz vom Keratin. (C-F) Dermis Weitere Erläuterungen im Text. *Bildausschnitt*: 238 μm.

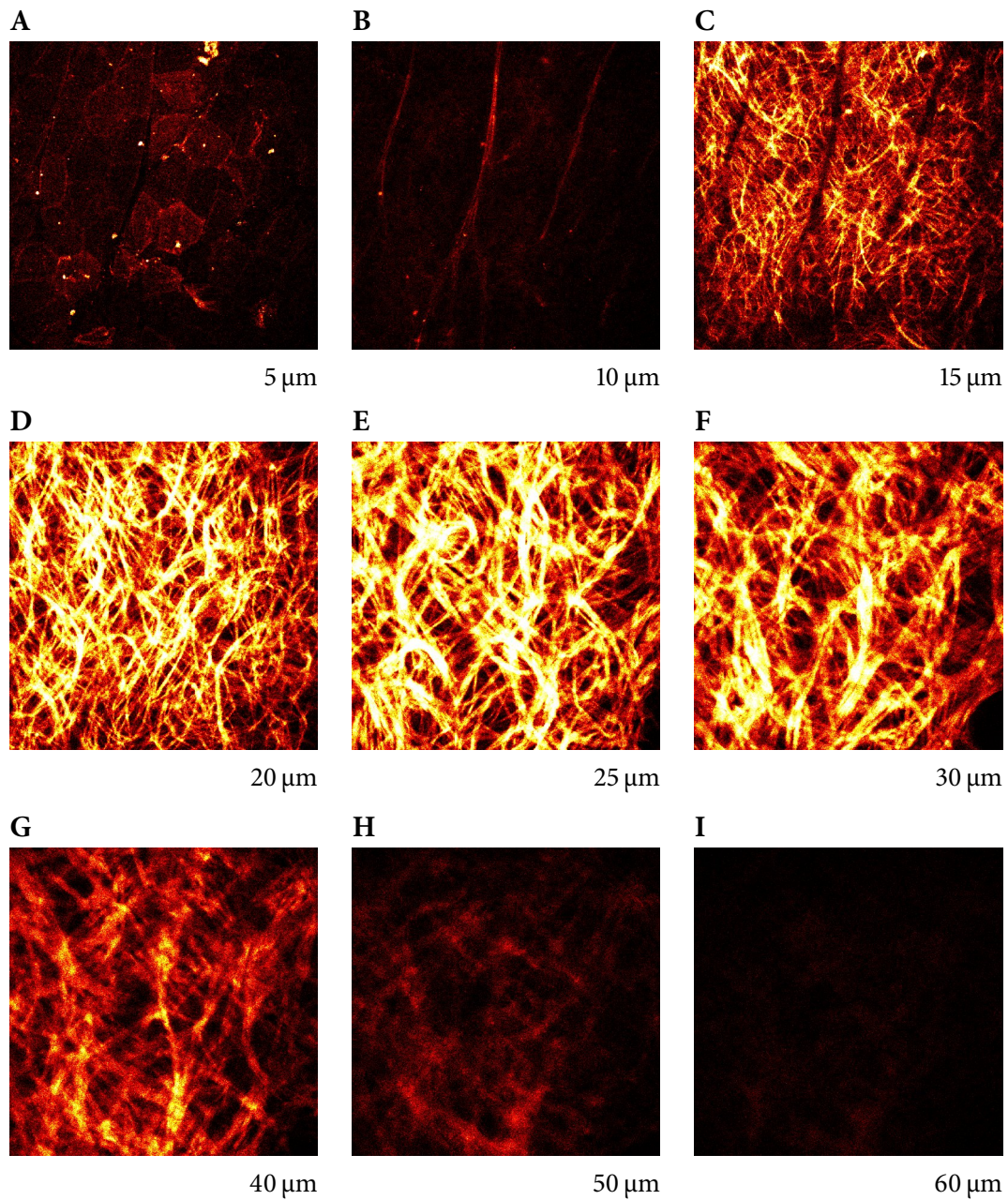


**Abbildung 4.16 Schneller xz-Scan *in vivo*.** Die ventrale Haut der Maus liegt auf einem Deckglas auf. Der Laser scannt von unten ein Linie, während die Fokusebene verschoben wird. (A) Zweiphotonen Anregung von SHG (*blau*) aus der Dermis und Autofluoreszenz (*grün*) aus der Epidermis mit 820 nm Wellenlänge. (B) Zum Vergleich reflektiertes Licht eines Lasers bei 633 nm. *Bildausschnitt*: 125 µm.

### 4.3.3 *In vivo* SHG Mikroskopie

Auch am lebenden Tier konnten mit Hilfe der SHG Mikroskopie die obersten Hautschichten abgebildet werden. Abbildung 4.16 zeigt einen Linescan über verschiedenen Tiefen des Präparats, hier der ventralen Haut einer anästhesierten Maus, die mit dem Bauch auf einem Deckglas auflag. Mit Zweiphotonen Anregung (Laser bei 820 nm Wellenlänge) ist in (A) unten im Bild durch die Autofluoreszenz im grünen Farbkanal deutlich die Epidermis zu sehen. Davon getrennt zeigt sich darüber das SHG Signal vom Collagen (*blau*) im mittleren Bildbereich. Die untere Grenze der Collagenmatrix markiert die Lage der Basalmembran. Im Vergleich zur Zweiphotonen Mikroskopie liefert die einfache Detektion der Reflektionen eines Laserstrahls (Wellenlänge: 633 nm) in (B) weniger Informationen über das Gewebe. Zwar ist die Lage der Haut gegenüber dem Deckglas (hellste Reflektion) gut erkennbar, jedoch sind Zellverbund und extrazelluläre Matrix hier nicht zu unterscheiden.

In Bezug auf die Eindringtiefe des Lichts bzw. die Tiefe aus der Fluoreszenz oder SHG Signale noch detektiert werden, offenbaren sich in diesem Gewebe keine größeren Vorteile durch die größere Wellenlänge bei der Multiphotonen Anregung. Aus den Bildabmessungen von 125×125 µm kann man in (A) und (B) auf eine maximale Tiefe von etwa 60-80 µm schließen.



**Abbildung 4.17** Bildstapel SHG Mikroskopie *in vivo*. Aufnahmen von Autofluoreszenz und SHG Signalen (gemeinsamer Farbkanal) aus der ventralen Haut einer anästhesierten Maus. Scans aus verschiedenen tiefen Ebenen ( $xy$ ) parallel zur Hautoberfläche mit Laserwellenlänge 860 nm. Weitere Erläuterungen im Text. *Bildausschnitt*: 238  $\mu\text{m}$ .

Der xz-Scan bietet eine schnelle Möglichkeit, einen Querschnitt durch die Haut abzubilden. Die Netzwerkstrukturen des Collagens werden hier aber kaum sichtbar. Die mögliche Bildqualität von SHG Mikroskopie offenbart sich wesentlich besser in Abbildung 4.17.

Hier wurde ein Bildstapel (xyz) von Ebenen parallel zur Hautoberfläche aufgenommen. Das untersuchte Gewebe ist erneut die ventrale Haut einer anästhesierten Maus. SHG Signale und Autofluoreszenz wurden hier gemeinsam in einem Farbkanal aufgenommen. An der Hautoberfläche sind die abgeflachten Kerneozyten gut sichtbar. In tieferen Hautschichten ist deutlich das extrazelluläre Collagennetzwerk zu erkennen. Die einzelnen Faserbündel heben sich kontrastreich ab. Insgesamt sind die SHG Signale vom Collagen deutlich stärker als die Autofluoreszenz aus der Epidermis. Ab einer Tiefe von 50  $\mu\text{m}$  nimmt die Intensität der SHG Signale stark ab und es sind kaum noch Details erkennbar.

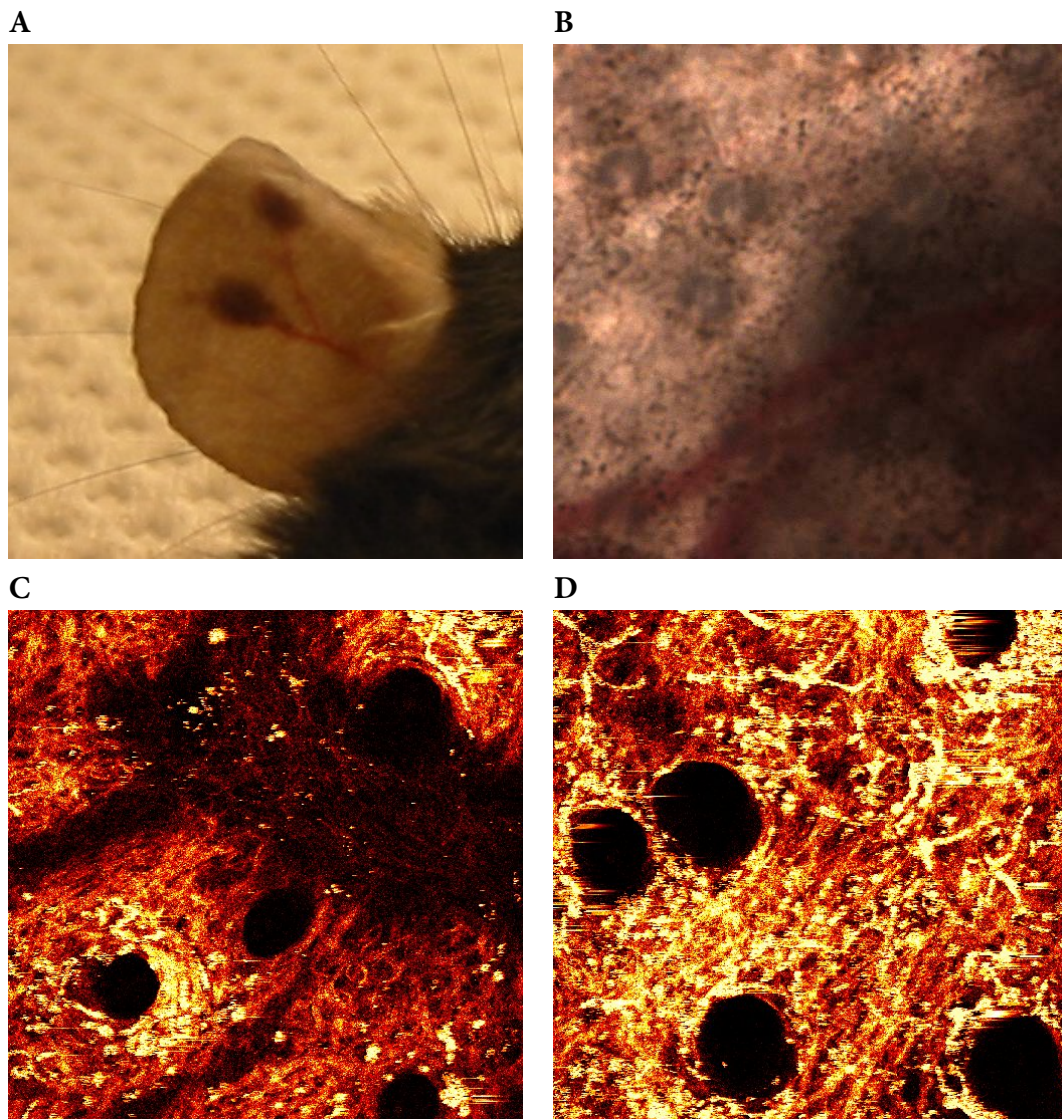
Im Vergleich zu den *ex vivo* erstellten Aufnahmen (Abbildung 4.15) wurde für diesen Bildstapel eine deutlich geringere Laserleistung verwendet (etwa 80 mW statt 250 mW an der Rückapertur des Objektivs), so dass weniger Details, wie einzelne Keratinozyten und Basalzellen in einer Tiefe von 10-15  $\mu\text{m}$ , sichtbar sind. Ziel war es, das Gewebe einer geringeren Laserintensität auszusetzen. Allgemein konnten in den Experimenten bei den verwendeten Intensitäten keine Schädigungen der Haut durch Lasereinwirkung festgestellt werden.

### **Problem der Tumorerkennung**

Insgesamt funktioniert die *in vivo* Bildgebung am SHG Mikroskop sehr gut. Sowohl bei Aufnahmen der Haut am Bauch, als auch an der Ohrmuschel, gab es kaum Schwierigkeiten durch Bewegungsartefakte, wie sie durch die Atmung oder den Herzschlag hervorgerufen werden können. Große Probleme bereitete allerdings die Erkennung der Grenzen eines intracutan gewachsenen Tumors.

Abbildung 4.18 zeigt einen sehr vielversprechenden Ansatz. Hier war es gelungen, zwei Melanome in der dünnen Haut der Ohrmuschel einer Maus wachsen zu lassen. Die beiden Tumore sind als dunkle Flecken mit einem Durchmesser von ca. 1,0-1,5 mm mit bloßem Auge (Foto in Abb. 4.18 A) gut erkennbar. Auffällig sind auch die großen Blutgefäße, die die Tumore versorgen.

Unter dem Mikroskop ist der Tumor bei Durchlichtbeleuchtung (B) wiederum klar als dunkler Bereich zu erkennen. In den SHG Aufnahmen, die in einem Bereich neben dem Tumor (C) und genau über dem Tumor (D) gemacht wurden, sind allerdings kaum Unterschiede auszumachen. In beiden Fällen ist die Collagenmatrix gut erkennbar. Die runden Freiräume zeigen die Positionen der Haarwurzeln an.



**Abbildung 4.18 Melanome in der Ohrmuschel einer Maus.** (A) Foto eines Ohrs einer BL6 Maus mit zwei intracutan gewachsenen B16-Melanomen. Die dunklen Flecken (Durchmesser ca. 1,0-1,5 mm) sind gut sichtbar. Auffällig sind auch die großen Blutgefäße zur Versorgung des Tumors. (B) Mikroskopische Aufnahme mit Durchlicht-Beleuchtung. Der schwarze Bereich des Tumors und die Blutgefäße sind wiederum gut sichtbar. (C) SHG Signale aus einem Bereich neben dem Tumor. Insgesamt wenig Unterschiede erkennbar zu: (D) SHG Signale aus einem Bereich über dem Tumor. Helle, überstrahlte Bereiche sind wahrscheinlich auf Melanin zurückzuführen, das durch starke Laserabsorption lokale thermische Schädigungen hervorruft. *Bildausschnitt B: 780  $\mu\text{m}$ . C,D: 375  $\mu\text{m}$ .*

Die gezeigten Bildebenen liegen etwa in einer Tiefe von 30  $\mu\text{m}$ . Mit zunehmender Tiefe wurde die Intensität der detektierten SHG Signale jeweils deutlich schwächer, ähnlich wie es in Abbildung 4.17 G-I zu sehen war. Unterschiede zwischen den Bereichen neben und über dem Tumor ließen sich hierbei nicht feststellen. Die Tiefe, aus der keine SHG Signale mehr registriert werden konnten, war für beide Bereiche ungefähr gleich.

Auffällig sind in beiden Aufnahmen die hell überstrahlten Pixel, die sich zum Teil sogar als übersättigte Spur in eigentlich dunkle Bildregionen ziehen. Diese Bereiche sind wahrscheinlich auf Ansammlungen von Melanin zurückzuführen, die durch starke Laserabsorption lokale thermische Schädigungen hervorrufen, welche sehr hell leuchtend sichtbar werden. In diesem Präparat treten solche Bereiche viel häufiger auf als in den zuvor gezeigten Aufnahmen. Zudem kann man feststellen, dass sie über dem Tumor (D) deutlich zahlreicher zu beobachten sind als neben dem Tumor (C).

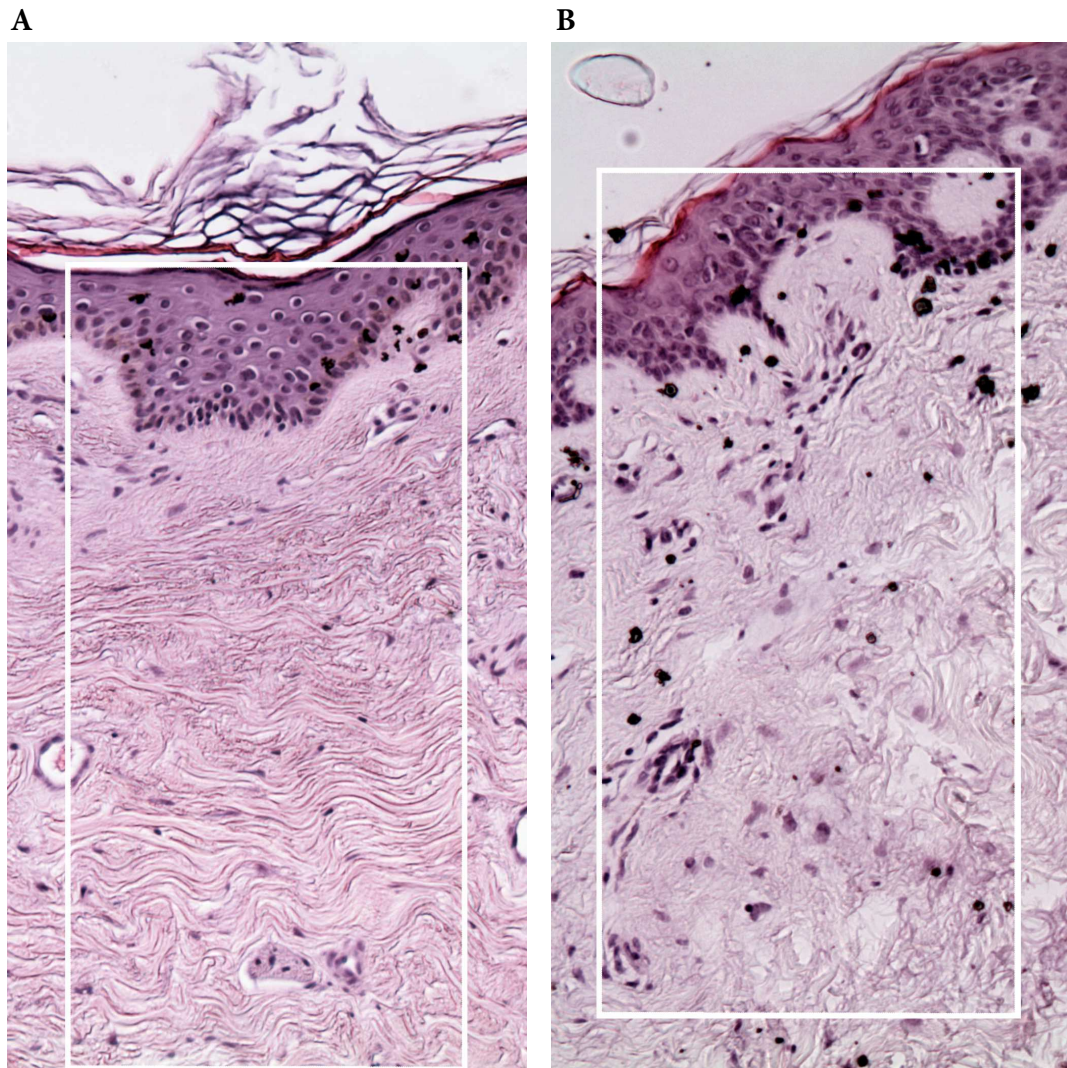
Eine deutliche Grenze des Tumors mit einer Kapsel aus Collagen, wie sie sich bei Hautschnitten zeigte (Abbildung 4.14), konnte allerdings *in vivo* nicht sichtbar gemacht werden.

#### 4.3.4 Sklerodermie

Um die Veränderungen an der Collagenstruktur der Haut im Krankheitsbild der Sklerodermie zu untersuchen, wurden Hautbiopsien von Patienten in Form dünner Paraffinschnitte untersucht. Dabei wurden zunächst Übersichtsaufnahmen der Hämatoxylin-Eosin Färbung angefertigt. In Abbildung 4.19 sind zwei solche Aufnahmen einer Sklerodermie Hautprobe (A) und einer Vergleichsprobe normaler Haut (B) gezeigt.

Bei der HE-Färbung werden durch Hämatoxylin vor allem die Zellkerne blau angefärbt. Eosin färbt Proteinstrukturen rot, also vor allem auch die extrazelluläre Matrix, wie anhand der Schnitte gut zu erkennen ist. Die Epidermis oben im Bild erscheint eher blau aufgrund der großen Zahl von Zellkernen, die Dermis unten dagegen im Wesentlichen rot. Zum Teil sind auch einzelne Collagenfilamente erkennbar. Insgesamt kann man feststellen, dass die Collagenmatrix der Dermis in (A) mehr parallele Strukturen aufweist und insgesamt deutlich kompakter wirkt als in (B).

Die Details lassen sich nun gut anhand der SHG Aufnahmen in Abbildung 4.20 erkennen. Hier wurde jeweils aus drei Einzelbildern ein Bild zusammengesetzt, das den in Abbildung 4.19 weiß eingerahmten Bereich der Probe zeigt. Die SHG Aufnahmen können die Details der Collagenstruktur im Vergleich wesentlich höher auflösen. Dies liegt zum einen an dem verwendeten Objektiv (63 $\times$  NA 1,2 gegenüber 10 $\times$  NA 0,4 in der Übersicht im Hellfeld), zum anderen aber auch an der Tatsache, dass

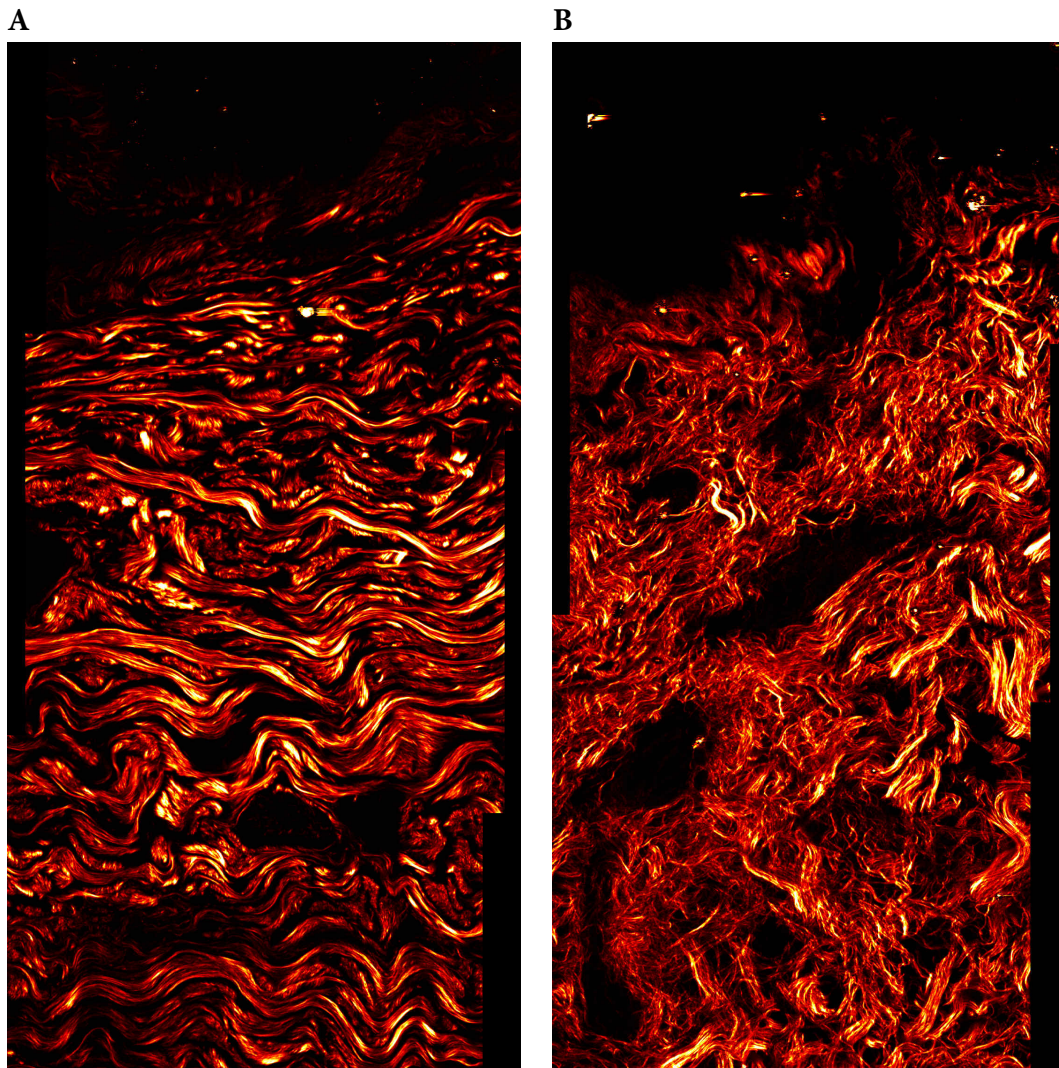


**Abbildung 4.19 HE-Färbung zweier Hautschnitte.** (A) Sklerodermie. (B) Vergleichsprobe. Der weiße Rahmen markiert den Bereich der SHG Aufnahmen. *Breite: 255  $\mu\text{m}$ .*

SHG spezifisch ausschließlich das Collagen sichtbar macht. Auf diese Weise lässt sich hier ein höherer Kontrast erzielen, als in den Hellfeldaufnahmen der HE-Färbung.

Man kann nun erkennen, dass in dem Sklerodermie Hautschnitt (A) viele Collagenfasern in Form dicker kompakter Bündel über den gesamten Bildausschnitt parallel zueinander liegen. In der Vergleichsprobe (B) bilden die Collagenfasern ein isotropes Netz, das sich auch durch eine feinere Strukturierung auszeichnet. Dicke Collagenbündel konnten hier nur in tieferen Hautschichten in größerer Zahl beobachtet werden (im Bildausschnitt nicht zu sehen). Faserbündel, die über große Bereiche parallel liegen wie in (A), konnten bei der Vergleichsprobe nicht festgestellt werden.

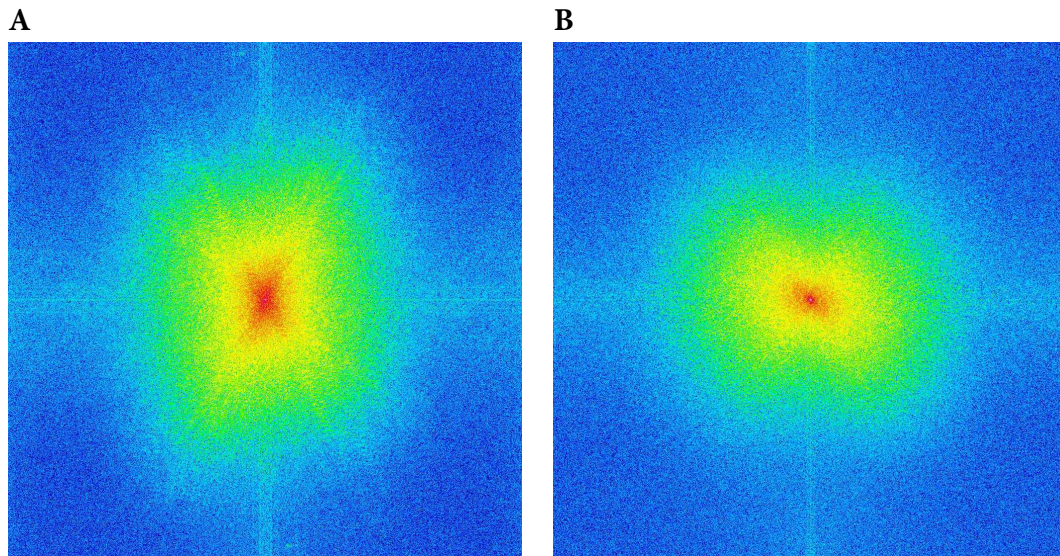




**Abbildung 4.20 SHG Signale der Hautschnitte.** (A) Sklerodermie. (B) Vergleichsprobe. Montiert aus je drei Einzelbildern. *Bildbreite:* 255  $\mu\text{m}$ .

Insgesamt bieten sich mehrere Kriterien, anhand derer sich die beiden gezeigten Hautschnitte unterscheiden lassen, u. a. parallele Ausrichtung gegenüber isotroper Verteilung oder dicke Faserbündel gegenüber einem feinfaserigen Netzwerk. Die Aufgabe wird nun sein, Methoden zu finden, diese Kriterien quantitativ vergleichbar zu machen. Eine automatisierte Detektion mit Hilfe von Bildverarbeitungsalgorithmen wäre ideal um auch größere Studien mit statistischer Aussagekraft durchführen zu können.

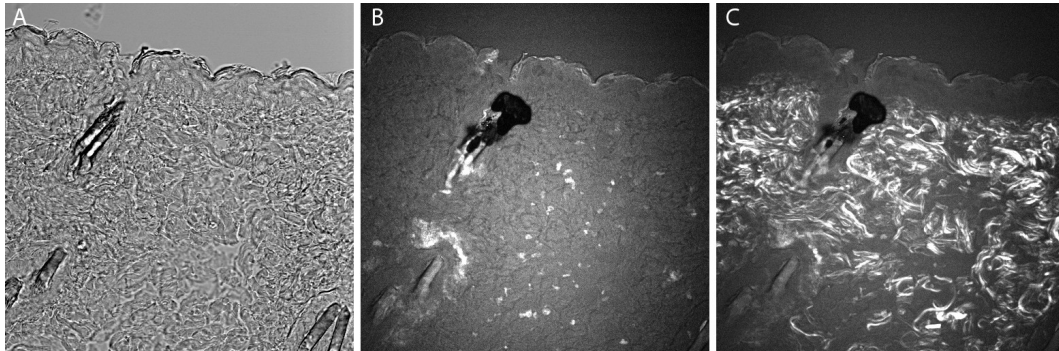
Einen möglichen Ansatzpunkt dafür könnte die Analyse der Fouriertransformierten bilden [DE VRIES et al., 2000]. Abbildung 4.21 zeigt die Amplitudenspektren, die



**Abbildung 4.21** Fouriertransformierte der SHG Bilder. (A) Sklerodermie. (B) Vergleichsprobe. Amplitudenspektrum der zentralen Bildbereiche aus Abbildung 4.20 (FFT der Originalbilder).

durch schnelle Fouriertransformation (FFT) aus den SHG Aufnahmen in Abbildung 4.20 gewonnen wurden. Genauer wurden hierzu die Originalaufnahmen aus der Mitte der zusammengesetzten Bilder verwendet. Die Struktur aus gerichteten, parallelen Collagenbündeln spiegelt sich in (A) in den strahlenförmigen Bereichen wider, die in (B) aufgrund der isotropen Verteilung der Collagenfasern nicht zu beobachten sind. Auffällig ist auch, dass der orange-rot eingefärbte Bereich im Zentrum der Fouriertransformierten in (A) größer ist als in (B), d. h. das (A) in diesem Bereich mehr höherfrequente Anteile aufweist. Mit welchen Strukturen im Bild sich einzelne Merkmale im Frequenzraum genau assoziieren lassen, muss durch detailliertere Analysen geklärt werden.

Weitere Möglichkeiten zum Vergleich der beiden SHG Aufnahmen in Abbildung 4.20 ergeben sich durch Bildverarbeitungsalgorithmen, die lokale Gradienten des Grauwerts untersuchen. Eine dieser Methoden ist das Auffinden von Ecken mit der *Harris corner detection*. Eine Auswertung der Bilder mit dieser Methode ergab bei verschiedenen gesetzten Parametern in (B) eine mindestens doppelt so hohe Zahl von Ecken wie in (A), z. B. bei  $\alpha=0,05$  und Schwelle 20000 eine Zahl von 1154 in (A) und 2334 in (B). Auch hier muss die Zuverlässigkeit der Methode aber noch genauer untersucht werden.



**Abbildung 4.22 CARS Mikroskopie von Hautschnitten.** Überblick mit (A) Durchlichtbeleuchtung Hellfeld. Oben im Bild die Epidermis, darunter die Dermis mit intracutan gewachsenem RMA-Tumor. Auffällige Strukturen sind die Haarwurzeln. (B) CARS Signale. Der nichtresonante Hintergrund macht die gesamte Probe sichtbar. Starke Signale vor allem von kleinen Fetteinschlüssen. (C) Gleichzeitige Aufnahme von CARS und SHG. Das SHG Signal zeigt deutlich die Grenze der Dermis zur Epidermis. Keine deutliche Abgrenzung der Tumorgrenzen beim RMA Tumor zu beobachten. (Größe des Bildausschnitts: 240  $\mu\text{m}$ )

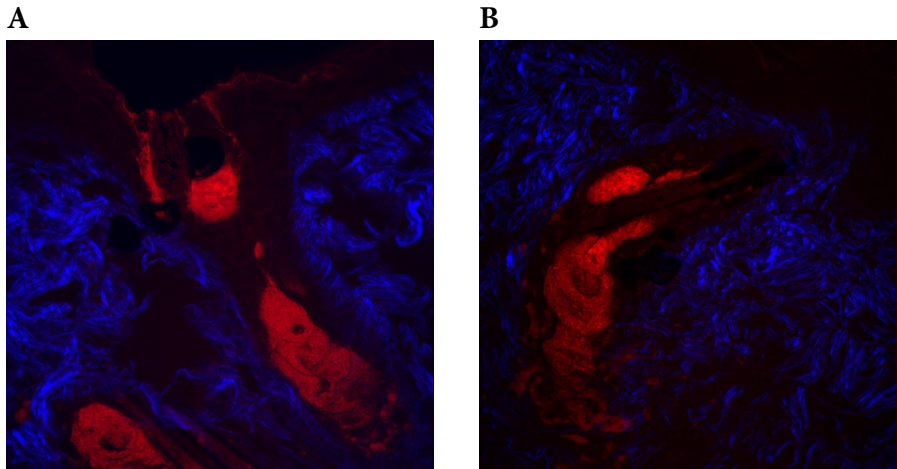
## 4.4 CARS Mikroskopie

Die Messungen mit Coherent Anti-Stokes Raman Scattering (CARS) Mikroskopie wurden an Hautschnitten mit intracutan gewachsenen RMA-Tumoren durchgeführt. Dabei sollte die Frage beantwortet werden, ob das Kontrastverfahren dieser speziellen Mikroskopietechnik eine Unterscheidung zwischen Tumor und gesundem Gewebe ermöglichen kann.

Abbildung 4.22 zeigt einen Hautschnitt mit drei verschiedenen Kontrastverfahren: Hellfeld (A), CARS (B) und CARS+SHG (C). Die Epidermis ist jeweils oben im Bild zu sehen, die Grenze zur Dermis ist anhand des SHG Signals in (C) gut erkennbar. Durch CARS ist die Gewebestruktur insgesamt grob sichtbar (B), wohl aufgrund des allgemeinen nichtresonanten Hintergrunds. Der Bereich des Tumors (unten) lässt sich aber nicht von anderem Gewebe abgrenzen.

Starke CARS Signale waren in der verwendeten Konfiguration (siehe Abschnitt 3.5) besonders von Fetteinschlüssen zu beobachten. Sehr gut dargestellt werden auf diese Weise die Talgdrüsen an den Haarfollikeln (siehe Abbildung 4.23). Beide Abbildungen zeigen hier detailreiche Strukturen ohne den Einsatz von Farbstoffen. Die Epidermis ist am oberen Bildrand jeweils schwach erkennbar.

Abbildung 4.24 zeigt Aufnahmen, die mit CARS und SHG Mikroskopie an einzelnen Muskelfasern aufgenommen wurden. Die Laserwellenlängen waren wieder auf die Frequenz der  $\text{CH}_2$  Resonanz abgestimmt. In den CARS Aufnahmen (A,B) heben sich



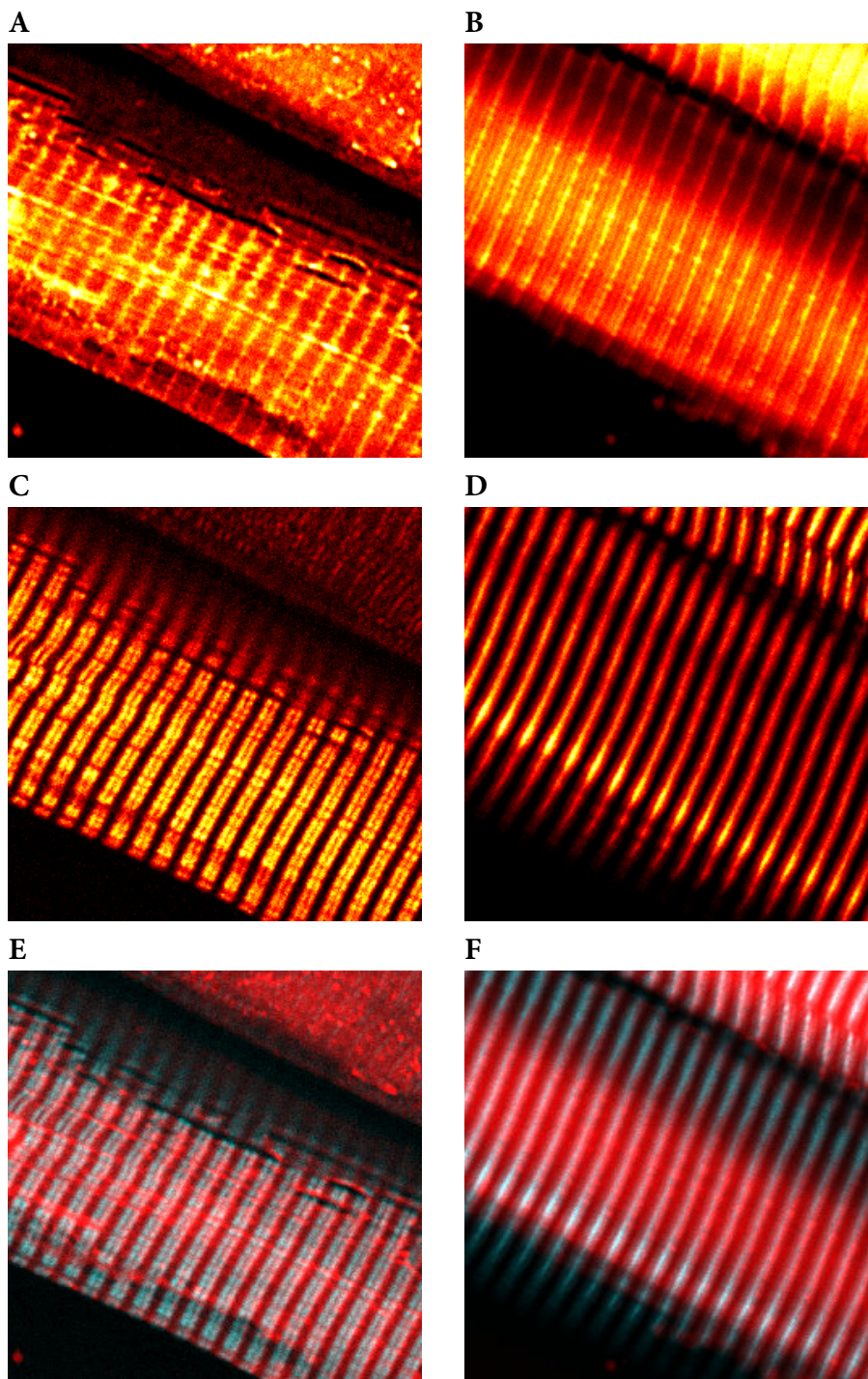
**Abbildung 4.23 CARS Aufnahme eines Haarfollikels.** Ein starkes CARS Signal (*roter Farbkanal*) wird von den Talgdrüsen am Haarfollikel erzeugt. Das SHG Signal (*blau*) vom Collagen verdeutlicht die Einbettung der Haarfollikel in die Dermis. (A,B) Hautschnitte mit Epidermis am oberen Bildrand. *Bildausschnitt*: 160  $\mu\text{m}$ .

also vor allem Lipide deutlich vom nichtresonanten Hintergrund ab. Dadurch wird u. a. die äußere Zellmembran der Muskelfaser sichtbar (A). Im Inneren der Muskelfaser zeigen sich Strukturen mit charakteristischer Querstreifung (B), wobei die hellsten Banden jeweils neben den im SHG Kanal sichtbaren Banden (C,D) liegen, wie sich anhand der Überlagerung von CARS und SHG Aufnahmen (E,F) erkennen lässt.

Die SHG Signale von der Oberfläche der Muskelfaser (C) zeigen deutlich die Form einer Doppelbande, wie sie auch bei Myofibrillen erkennbar war (siehe Abschnitt 4.1). Wie bereits diskutiert, stammen die SHG Signale von den Myosinfilamenten und die Mitte der Doppelbande markiert die Lage der M-Linie im Sarkomer. In der Mitte der Muskelfaser (D) überlagern sich die SHG Signale jeweils zu einer einzelnen Bande.

In den CARS Signalen lassen sich bei genauerer Betrachtung in (B) drei Banden pro Sarkomer ausmachen - eine helle Bande mit zwei benachbarten schwächeren Banden. In anderen Bildebenen ist von diesen jeweils nur die helle Bande erkennbar. Inwiefern Überlagerungen aus verschiedenen  $z$ -Ebenen hier eine Rolle spielen, müsste noch näher untersucht werden.

Als Quelle für die hellen CARS Banden in den Muskelfasern kommen u. a. die Mitochondrien und das Transvers-Tubuläre Membransystem in Frage. Mitochondrien sind kleine Zellorganellen mit großen, gefalteten Membranflächen in ihrem Inneren. Sie sind für die Energieversorgung der Zellen in Form von ATP verantwortlich und daher im Muskel in großer Zahl vorhanden. In der elektronenmikroskopischen Aufnahme in Abbildung 2.9 B liegen die ellipsenförmig angeschnittenen



**Abbildung 4.24 CARS an Muskelzellen.** (A,B) CARS Signale bei Anregung von  $\text{CH}_2$  Resonanzen. (C,D) SHG Signale als Referenz. (E,F) Überlagerung von CARS (rot) und SHG Bildern (blau). (A,C,E) Oberfläche der Muskelzelle. (B,D,F) Bildebene in  $15\ \mu\text{m}$  Tiefe in der Muskelfaser. *Bildausschnitt:  $39\ \mu\text{m}$ .*

---

Mitochondrien etwa auf Höhe der I-Banden zwischen den Myofibrillen. Dies passt zu der Beobachtung, dass die CARS Signale nicht genau mit den SHG Signalen kolo-kalisieren, sondern neben diesen abgestrahlt werden. Die T-Tubuli sind Einstül-pungen der äußeren Zellmembran, die die gesamte Muskelzelle wie ein Netzwerk durchziehen. Detaillierte elektronenmikroskopische Aufnahmen findet man z. B. in [OGATA und YAMASAKI, 1997]. Zu einer umfassenderen Diskussion der möglichen Quellen der CARS Signale im Muskel werden weitere experimentelle Daten nötig sein.

# Kapitel 5

## Diskussion

Wie die durchgeführten Experimente zeigen, ist SHG Mikroskopie hervorragend geeignet, um hochaufgelöste und kontrastreiche Aufnahmen von Haut und Skelettmuskel ohne den Zusatz externer Marker zu gewinnen. Am Muskel kann mit Hilfe der Polarisationsabhängigkeit des SHG Signals überdies der funktionelle Zustand der Querbrücken ermittelt werden.

An der Haut erlaubt die SHG Mikroskopie eine Darstellung der Struktur der Cutis auch *in vivo*. Als besonders hilfreich könnte sich die SHG Mikroskopie bei der Untersuchung von Sklerodermie erweisen, da sich die Veränderungen der Collagenstrukturen der Dermis in diesem Krankheitsbild direkt in den vom Collagen emittierten SHG Signalen widerspiegeln.

### 5.1 SHG Emission von Myofibrillen

In Myofibrillen erzeugte SHG Signale haben ihren Ursprung in den Myosin Filamenten, wie bereits durch eigene Experimente und andere Arbeiten gezeigt wurde [PLOTNIKOV et al., 2006]. Aus welchem Teil des Myosin Moleküls die SHG Signale stammen und von welchen molekularen Strukturen sie erzeugt werden, ist allerdings noch teilweise unklar. Bisher konnte bereits an Parakristallen aus Myosinrods gezeigt werden, dass der LMM Teil des Myosinmoleküls eine Quelle von SHG Emissionen ist [SCHÜRMAN et al., 2007]. Ob auch die Myosinköpfe einen Beitrag zum SHG Signal leisten, ist eine noch offene Frage. Die Konformationsänderung in den Myosinköpfen ist hauptverantwortlich für die Kontraktion des Muskels. Daher kommt der Frage, ob der Zustand der Querbrücken Einfluss auf die SHG Signale vom Myosin hat, eine wichtige Bedeutung zu.

### SHG Signale offenbaren den Querbrückenzustand

Im Rahmen dieser Arbeit wurden nun Experimente durchgeführt, die signifikante Unterschiede in der Polarisationsabhängigkeit der SHG Intensität für die beiden Zustände *Relaxed* und *Rigor* zeigen. Diese zentrale Erkenntnis ist deutlich in den Abbildungen 4.6–4.8 erkennbar in Form zweier eindeutig voneinander getrennter Verteilungen der Fitergebnisse für den Parameter  $\gamma$ . Dieser Parameter bezeichnet das Verhältnis der beiden unabhängigen Komponenten des Suszeptibilitätstensors  $\chi^{(2)}$  und ist damit in rotationssymmetrischen Strukturen das zentrale Charakteristikum für die SHG Emission.

Die Experimente belegen also, dass die optischen Eigenschaften des Muskels unterschiedlich sind für zwei verschiedene physiologische Zustände und zeigen dadurch eine Möglichkeit auf, die Besetzung molekularer Zustände der Motorprotein Interaktion mit Hilfe eines rein optischen Verfahrens zu ermitteln. Diese Informationen können an einem Multiphotonen Mikroskop ohne den Einsatz externer Marker direkt aus den intrinsischen SHG Signalen von Myofibrillen gewonnen werden.

Die Frage, ob die Polarisationsabhängigkeit des SHG Signals durch den Myosin-Zustand beeinflusst wird, wurde bisher erst in zwei Publikationen angesprochen [PLOTNIKOV et al., 2006, NUCCIOTTI et al., 2007]. Plotnikov et al. konnten an Myofibrillen aus der Jakobsmuschel nur kleine Abweichungen zwischen den Rigor-Zustand und einem mit *AMPPNP* (ein nicht-hydrolysierbarer ATP Ersatz) getriggerten Relaxed-Zustand beobachten und zogen daraus die Schlussfolgerung, dass es keinen signifikanten Unterschied zwischen den Zuständen gäbe. Da diese Frage kein zentraler Bestandteil der Untersuchung war, wurde dort nur eine Bildserie gezeigt, in der fünf Messpunkte aufgenommen worden waren. Dem gegenüber bedeuten die hier gezeigten Ergebnisse eine deutliche Verbesserung mit einer Gesamtzahl von 125 ausgewerteten Bildbereichen und jeweils 76 Messpunkten pro Bildserie.

In der Studie von Nucciotti et al. wurden polarisationsabhängige Messungen an einer ganzen Muskelzelle vom Froschmuskel durchgeführt. Dort wurde der Unterschied zwischen der ruhenden und der aktiv kontrahierenden Muskelzelle untersucht. Mit Hilfe einer Fitfunktion, die Gleichung 3.14 für das einfache E-Feld Modell bei Kleinman-Symmetrie entspricht, kamen die Autoren auf Ergebnisse von  $\gamma_{rel} = 0,273 \pm 0,003$  für die ruhende Faser und  $\gamma_{act} = 0,583 \pm 0,003$  für den aktiven Zustand. Das letztere Ergebnis liegt im Bereich zwischen den hier gefundenen Werten von  $\gamma_{rig} = 0,733 \pm 0,005$  für den Rigor-Zustand und  $\gamma_{rel} = 0,501 \pm 0,006$  für den Relaxed-Zustand, was auch zu erwarten wäre für aktive Querbrücken, die zyklisch zwischen diesen beiden Extremzuständen hin und her wechseln. Der Wert für den Relaxed-Zustand ist allerdings deutlich geringer als der hier ermittelte Wert. Dies könnte auf die Tatsache zurückzuführen sein, dass dort ganze Muskelzellen verwendet wurden, die wesentlich dicker sind und daher mit einer höheren Wahrchein-



lichkeit das SHG Signal verändern können, z. B. durch Streuung oder Anisotropie des Gewebes. Zudem wurden die Experimente von Plotnikov und Nucciotti nicht am Säugetiermuskel durchgeführt, was eventuell weiteren Einfluss auf die Ergebnisse haben könnte.

Generell stellte sich in den Experimenten eine Reihe von Faktoren als wesentlich bei der Durchführung und Auswertung dar. Zunächst muss der optische Aufbau die lineare Polarisation des Lasers an der Rückapertur des Objektivs sicherstellen. Die  $\lambda/2$ -Platte zur Rotation der Polarisationssebene sollte so ausgewählt werden, dass höchstens kleinste elliptische Polarisationskomponenten bei der gewählten Anregungswellenlänge entstehen. Desweiteren sollte die Anzahl der Bilder in jeder aufgenommenen Serie ausreichend hoch sein, um genügend Datenpunkte für stabile Fitergebnisse zu liefern, insbesondere im Bereich der Minima und Maxima der Polarisationskurve. Schließlich war auch die große Zahl von Messungen hilfreich, um signifikante Unterschiede zwischen den physiologischen Zuständen festzustellen.

### **Exaktere Messung von $\gamma$ durch das erweiterte E-Feld Modell**

Bei der Mikroskopie mit Objektiven hoher numerischer Apertur weist das elektrische Feld des Lasers im Objektivfokus axiale Komponenten auf, die bei der Betrachtung von SHG nicht vernachlässigt werden können. Aus diesem Grund wurde ein numerischer Ansatz entwickelt, um das bisherige skalare Modell durch ein Modell zu ergänzen, das die komplette dreidimensionale Feldverteilung im Fokus berücksichtigt. Aus diesem Modell wurde für verschiedene optische Konfigurationen jeweils ein Satz von Parametern  $\eta_{f,g}$  abgeleitet, der den Einfluss des abbildenden Systems in Form der speziellen Feldverteilung im Fokus auf das detektierte SHG Signal widerspiegelt. Die numerisch berechneten Werte für die  $\eta_{f,g}$  gingen dann in eine generalisiertere Modellfunktion zur Beschreibung der Polarisationsabhängigkeit des SHG Signals ein. Die allgemeine Annahme, dass der  $\chi^{(2)}$  Tensor in der Probe homogen im Bereich des Fokusvolumens sein soll, bleibt auch in diesem Modell bestehen.

Mit Hilfe der erweiterten Modellfunktion können Werte für  $\gamma$  durch einen Fit an dieselben Datensätze ermittelt werden, wie im einfachen E-Feld Modell. Es zeigte sich, dass das erweiterte Modell einen deutlichen Einfluss auf die Fitresultate für  $\gamma$  hat. Zum einen waren die Werte von  $\gamma_{rig} = 0,524 \pm 0,006$  für den Rigor-Zustand und  $\gamma_{rel} = 0,239 \pm 0,008$  für den Relaxed-Zustand insgesamt deutlich kleiner als im einfachen Modell, zum anderen vergrößerte sich der Abstand dieser beiden Werte leicht.

Insgesamt liegen die im erweiterten E-Feld Modell gefundenen Werte sicher deutlich näher an den realen physischen Größen. Trotz dieser Verbesserungen handelt es sich natürlich um ein theoretisches Modell mit einer numerischen Simulation des Fokusvolumens, das die reale Situation nicht vollständig abbilden kann.

### Indizien gegen die Gültigkeit von Kleinman-Symmetrie

Wenn der Prozess der SHG Erzeugung nicht-resonant, ohne Energieabsorption abläuft, können durch die Kleinman-Symmetrie einige Vereinfachungen bei der Berechnung des Suszeptibilitätstensors  $\chi^{(2)}$  gemacht werden. In diesem Fall hat der Parameter  $k$  aus Gleichung 3.13 den Wert 1. Wenn  $k$  beim Fitten der experimentellen Daten als Fitparameter frei gelassen wurde, ergaben sich jedoch immer Resultate kleiner 1 mit Mittelwerten von  $k = 0,91$  sowohl im Relaxed- als auch im Rigor-Zustand.

Ein Vergleich der beiden Fitfunktionen mit  $k = 1$  und freiem  $k$  mit Hilfe eines F-Tests ergab zudem, dass letztere eine signifikant bessere Beschreibung der experimentellen Daten darstellt. Die erwartete experimentelle Bestätigung, dass die Annahme von Kleinman Symmetrie bei SHG an Myofibrillen gerechtfertigt ist, blieb also aus. Da es sich hierbei um eine Standardannahme für SHG Messungen an biologischen Präparaten handelt, sollte diese Problematik auf jeden Fall noch weiter untersucht werden.

### Abknickmodell kann unterschiedliche $\gamma$ -Werte erklären

Zur Deutung der beobachteten Werte von  $\gamma_{rel}$  und  $\gamma_{rig}$  können die beiden vorgestellten Modelle von Dipolen auf einer Helix und der Auslenkungen von Molekülteilen eine Hilfestellung leisten. Im Helixmodell ergaben sich Werte für  $\gamma$  die insgesamt gut mit dem Bereich der gemessenen Werte übereinstimmten: die Simulation eines Coiled-Coil mit den Gangwinkeln des Myosinrods resultierte in einem  $\gamma_{cc} = 0,43$ , das also zwischen den Messwerten für Relaxed und Rigor liegt. Am Collagen, das eine Helix mit größerer Ganghöhe (Winkel  $44,7^\circ$ ) besitzt, errechnet sich anhand des Modells ein Winkel von  $\theta \approx 50^\circ$  aus Messwerten für  $\gamma$  [PLOTNIKOV et al., 2006]. Die unterschiedlichen Helixwinkel von Myosin und Collagen findet man also in den jeweiligen Messwerten für  $\gamma$  wieder. Dies kann als Hinweis darauf gewertet werden, dass die SHG Signale an diesen Proteinen tatsächlich von Dipolen entlang der Windung der Helix ausgehen könnten.

Die beobachteten Unterschiede zwischen  $\gamma_{rel}$  und  $\gamma_{rig}$  können im Helixmodell allerdings schwerlich erklärt werden. Hierzu wäre eine Vergrößerung des Helixwinkels nötig, die einer Dehnung des Myosinmoleküls um 40%, also etwa 58 nm entspräche. Da die Helix in Richtung ihrer Hauptachse sehr steif ist (etwa 60-80 pN/nm) [ADAMOVIC et al., 2008], wären dazu Kräfte im nN-Bereich nötig, also fast drei Größenordnungen mehr als durch ein einzelne Querbrücke produziert wird (5-6 pN) [ISHIJIMA et al., 1996].

Deutlich besser lassen sich die verschiedenen Werte für  $\gamma$  im Relaxed- und Rigor-Zustand durch das Abklappen von Molekülteilen von der Symmetrieachse des Filaments erklären. Das hier entwickelte, einfache Abknickmodell sagt Änderungen im

effektiven Wert für  $\gamma$  voraus, die umso größer ausfallen, je größer der abklappende Teil des Moleküls ist. Wie schon in Abschnitt 4.2.3 diskutiert, drängen sich zwei Assoziationen von Modellsystem und Myosinmolekül auf. Die erste bezieht sich auf das Umklappen der Lever-arm Region beim Kraftschlag, die mit einem Anteil von  $p = 0,05$  an der Gesamtlänge des Moleküls aber so kurz ist, dass sie im Modell nur geringe Änderungen des  $\gamma$  Werts hervorruft. Die zweite vorgestellte Idee ist, dass im Rigor Zustand ein Teil der S2 Region von der Filamentachse weggebogen wird, möglicherweise an einer bekannten Gelenkstelle, 44 nm von der Verbindungsstelle mit S1 entfernt. Dies entspricht einem Anteil  $p = 0,30$  und führt zu deutlich größeren Änderungen im Ergebnis für  $\gamma_{\text{eff}}$ . Allerdings ist hier der Winkel  $\beta$  der Auslenkung durch den freien Abstand zu den Aktinfilamenten eingeschränkt.

Insgesamt sagt das Abknickmodell in seiner einfachen Form Veränderungen des Parameters  $\gamma$  in der richtigen Größenordnung voraus, kann die gemessenen Werte für  $\gamma_{\text{rel}}$  und  $\gamma_{\text{rig}}$  aufgrund der räumlichen Einschränkungen jedoch nicht vollständig erklären. Löst man sich von der Annahme einer streng homogenen Verteilung der SHG-Emitter entlang des Moleküls, bietet das Modell noch einigen Raum für Erweiterungen.

### Der Parameter $\gamma$ hängt von der sterischen Konfiguration der Myosinköpfe ab

Veränderungen des Parameters  $\gamma$  lassen sich also teilweise durch ein Abknicken in der S2 Region des Myosinmoleküls erklären. Eine interessante Frage ist nun, ob diese Auslenkung während der Bindung von Myosin an Aktin stattfindet oder erst durch den Kraftschlag im Querbrückenzyklus. Um diese Frage zu beantworten, wurden Experimente mit Hilfe des Myosin-Inhibitors BTS durchgeführt. Der Haupteffekt von BTS ist die Unterdrückung der Phosphatfreisetzung, so dass sich die Myosinmoleküle bei Aktivierung des Muskels mit  $\text{Ca}^{2+}$  bevorzugt im Zustand  $\text{A}\cdot\text{M}\cdot\text{ADP}\cdot\text{P}_i$  schwacher Bindung an Aktin sammeln. Auch wenn sich dadurch das Gleichgewicht mit dem ungebundenen  $\text{A}+\text{M}\cdot\text{ADP}\cdot\text{P}_i$  Zustand verschiebt, muss der *weak binding* Zustand deutlich stärker besetzt sein als im Relaxed Zustand, in dem die Bindungsstelle am Aktin in Abwesenheit von  $\text{Ca}^{2+}$  durch den Troponin-Tropomyosin Komplex blockiert ist.

Wenn  $\gamma$  im Myosin nun von der Bindung an Aktin selbst abhinge, würde man erwarten, dass  $\gamma$  im weak binding Zustand deutlich zum Wert  $\gamma_{\text{rig}}$  hin verschoben wäre. Tatsächlich zeigten sich aber keine signifikanten Änderungen gegenüber  $\gamma_{\text{rel}}$ . Da die sterische Ausrichtung des Myosinkopfes im Zustand schwacher Bindung abgesehen von der Verbindung mit Aktin eher dem Relaxed Zustand ähnelt, kann man schlussfolgern, dass der Wert  $\gamma$  im Muskel ein Maß für die Zahl von Myosinköpfen in Rigor-Konfiguration darstellt.

## 5.2 SHG Mikroskopie an der Haut

Die Haut ist ein besonders interessanter Anwendungsbereich für SHG Mikroskopie, da sie für Standardobjektive direkt zugänglich ist und somit potentiell sogar *in vivo* Anwendungen am Menschen möglich sind. Die in dieser Arbeit vorgestellten Messungen an Hautschnitten, an kompletten nativen Hautproben und schließlich die erfolgreich durchgeführte Mikroskopie der Haut von lebenden Mäusen untermauern deutlich das Potential dieser Mikroskopietechnik.

Ohne zusätzliche Anfärbung mit Farbstoffen zeigte die Zweiphotonen Mikroskopie wesentliche Details der zellulären und extrazellulären Struktur der Haut und lieferte so ein dreidimensional aufgelöstes Bild der obersten Hautschichten. Durch SHG Signale vom Collagen waren auch *in vivo* Aufnahmen vom extrazellulären Netzwerk der Dermis mit hohem Signalkontrast möglich. Komplementär dazu zeigten Autofluoreszenzsignale den Zellverbund in der Epidermis und einzelne Zellen in tieferen Hautschichten. Mit Hilfe spektral aufgelöster Detektionsverfahren ließe sich die Fülle von Informationen, die man aus Autofluoreszenzsignalen gewinnen kann, zudem noch deutlich steigern [PALERO et al., 2007].

### Mikroskopie von Hauttumoren

Die Mikroskopie von Hautkrebs könnte eine wichtige Anwendungsmöglichkeit von SHG Imaging sein. Die untersuchten Hautschnitte von intracutan in Mäusen gewachsenen Melanomen zeigten, dass im Innern der Tumore kaum Collagen zu finden war. Der Tumor war jedoch von einem dichten Collagennetzwerk eingekapselt, dass die Begrenzung des Tumors in SHG Aufnahmen deutlich hervortreten ließ. Dieses vielversprechende Merkmal zur Detektion der Grenze von Tumor und gesundem Gewebe konnte aber bisher *in vivo* oder an nativen Hautproben nicht nutzbar gemacht werden. Der Grund dafür liegt sicherlich in einer zu geringen Eindringtiefe des Laserlichts bzw. zu großer Lichtstreuung in der Dermis.

In den Experimenten wurden die SHG Signale ab einer Tiefe von etwa 60  $\mu\text{m}$  deutlich schwächer. In 100  $\mu\text{m}$  Tiefe konnten keinerlei Strukturen mehr aufgelöst werden. Die Eindringtiefe der Multiphotonen Mikroskopie ist in der Haut also um ein zehnfaches geringer als beispielsweise im Gehirn. Aus diesem Grund sind im Tiermodell intracutan transplantierte Tumore problematisch zu detektieren. Hier werden Krebszellen zunächst in Zellkultur gezüchtet und dann als Zellsuspension in die Haut der Maus injiziert. An dieser Stelle wächst infolgedessen ein Tumor heran. Um erfolgreich einen Tumor zu setzen, der innerhalb eines überschaubaren Zeitraumes heranwächst, ist hier eine gewisse Zahl von Zellen und damit auch ein entsprechendes Injektionsvolumen nötig. Eine Transplantation in eine Tiefe von 20-50  $\mu\text{m}$ , die für die *in vivo* Mikroskopie ideal wäre, erscheint daher kaum möglich.

Interessanterweise würde diese Beschränkung bei natürlich, spontan gewachsenen Tumoren keine Rolle spielen. Wie in Kapitel 2.5 erwähnt, bildet sich Hautkrebs zuerst in der Epidermis und breitet sich erst in späteren Stadien in tiefere Hautschichten aus. Das Problem der optischen Eindringtiefe würde hier also zunächst nicht ins Gewicht fallen. In Biopsien von Basalzellkarzinomen konnten Tumore deutlich von der umgebenden Haut abgegrenzt werden, vor allem durch erhöhte Autofluoreszenz [CICCHI et al., 2007].

Von besonderem Interesse ist bei natürlich wachsenden Tumoren das Stadium, in dem der Tumor die Basalmembran durchbricht. Ab diesem Zeitpunkt steigt die Wahrscheinlichkeit drastisch an, dass Tumorzellen in das Lymphsystem oder die Blutgefäße gelangen und sich Metastasen bilden. In den gezeigten experimentellen Daten wurde dieser wichtige Bereich um die Basalmembran besonders gut abgebildet. Gerade die Schicht der papillären Dermis direkt unterhalb der Basalmembran wurde durch das starke SHG Signal des Collagennetzwerkes mit hohem Kontrast dargestellt.

Insgesamt kann die SHG Mikroskopie als nicht-invasive Technik zum Studium von Hautkrebs also durchaus als aussichtsreich bewertet werden. Eine Anwendung bei transplantierten Tumoren im Tiermodell erscheint allerdings zunächst wenig vielversprechend. Weiter führen könnten hier minimal invasive Methoden, die den Tumor durch eine kleine Inzision für optische Methoden zugänglich machen könnten, eventuell auch für den Einsatz dünner mikroendoskopischer Linsen. Wichtige Anwendungsbereiche für solche Weiterentwicklungen wären beispielsweise Forschungen zur Bildung von Metastasen in den Lymphknoten [HOSHIDA et al., 2006, HAGENDOORN et al., 2006] oder potentielle *in situ* Studien der Wirkungsweise immunologischer Therapieansätze wie des Antigen Targetings [MAHNKE et al., 2005, JOHNSON et al., 2008].

Was die Anwendung von Laser Scanning Mikroskopie als potentielles diagnostisches Werkzeug angeht, sind eine Reihe weiterer Probleme zu erwarten, insbesondere bei der Differenzierung zwischen Tumoren und gutartigen Nävi [BUSAM et al., 2005, PELLACANI et al., 2005]. Als Ergänzung des Spektrums diagnostischer Methoden im Vorfeld einer histologischen Untersuchung könnte die Zweiphotonen Mikroskopie als Verfahren zur „optischen Biopsie“ aber durchaus in Frage kommen.

### **Sklerodermie**

Ein besonders interessanter Anwendungsbereich für die SHG Mikroskopie zeigte sich im Krankheitsbild der Sklerodermie, bei dem sich die Collagenstrukturen der Dermis verändern. Durch SHG Signale vom Collagen konnten diese Strukturen mit hoher Auflösung an Hautschnitten dargestellt werden.

Gegenüber einer Vergleichsprobe waren in der Sklerodermie-Biopsie eine Reihe von Unterschieden festzustellen. Es zeigten sich hier dicke, kompakte Collagenbündel, die über den gesamten Bildausschnitt in paralleler Anordnung lagen. In der Vergleichsprobe waren die Collagenbündel deutlich schmaler und ihr Netzwerk wesentlich feinmaschiger und isotroper orientiert.

Es wurden zwei Ansätze präsentiert, um diese offensichtlichen Unterschiede mit einer automatisierten Bildverarbeitung quantifizieren zu können. Zum einen war dies eine Analyse der Fouriertransformierten beider Bilder, zum anderen ein Algorithmus zur Detektion von Ecken. In der Fouriertransformierten fanden sich bei der Sklerodermie-Probe strahlenförmige Bereiche entlang der Hauptrichtungen der großen Collagenbündel. Das Vorhandensein großer Bereiche gerichteter periodischer Strukturen, die in der Fouriertransformierten deutlich sichtbar werden, könnte also als ein Indikator für die Sklerodermie genutzt werden.

Das Amplitudenspektrum der Vergleichsprobe war insgesamt deutlich homogener. Die grobe Form ähnelte einer liegenden Acht, was darauf hinweisen würde, dass hier mehr senkrechte periodische Strukturen zu finden sind. Möglicherweise wird dies aber auch durch den Effekt der Polarisationsabhängigkeit des SHG Signals verursacht. Die maximale SHG Intensität wird beim Collagen durch Anregung parallel zur Faserachse erzeugt. Bei den gezeigten experimentellen Daten sind die Strukturen in vertikaler Orientierung.

Um den Einfluss dieser Abhängigkeit zu minimieren, empfiehlt es sich zukünftig in mindestens zwei verschiedenen Polarisationsrichtungen anzuregen und die Ergebnisse zu mitteln. Überdies wirken sich auch größere Bereiche ohne Collagen, etwa dort wo in der Dermis Blutgefäße oder Haarwurzeln liegen, auf die Fouriertransformierte der SHG Bilder aus.

Allgemein müssen zu einem aussagekräftigen Vergleich von Proben ausreichend große Bildbereiche und auch verschiedene Positionen innerhalb einer Probe untersucht werden. Um zu bewerten, in welcher Ausprägung einzelne Kriterien charakteristisch für das gesamte Krankheitsbild sind, müssen dann viele Patientenproben quantifiziert werden, eventuell auch unter Berücksichtigung anderer Parameter wie des Alters der Patienten. Für eine größer angelegte Studie dieser Art sind passende Algorithmen zur Auswertung essentiell.

Grundsätzlich erscheinen die beiden vorgestellten Methoden der Bildverarbeitung dazu geeignet zu sein. Auch die zweite Methode, die *Harris Corner Detection*, offenbarte deutliche Unterschiede zwischen beiden Proben mit mehr als doppelt so vielen detektierten Ecken in der Vergleichsprobe. Beide Methoden lassen sich zudem noch weiter optimieren, z. B. durch andere Parameter oder über segmentierte Auswertungen einzelner Bildbereiche. Die Evaluation weiterer Bildverarbeitungsalgorithmen kann die Zahl möglicher Unterscheidungskriterien noch vervielfältigen.

Ein besonderer Vorteil der SHG Mikroskopie ist, dass mit diesem Verfahren auch die dreidimensionale Struktur der Collagenmatrix aufgezeichnet werden kann, wie in dieser Arbeit sogar *in vivo* gezeigt wurde. Gegenüber zweidimensionalen Hautschnitten lassen sich also noch deutlich mehr Informationen über Veränderungen in der Dermis gewinnen. Eine quantitative Bildverarbeitung ist an dreidimensionalen Bildstapeln gleichermaßen möglich.

## 5.3 Ausblick

Die im Rahmen dieser Arbeit gefundenen Ergebnisse bieten eine Reihe von Anknüpfungspunkten für zukünftige Projekte.

Aus der Polarisationsabhängigkeit des SHG Signals von Myofibrillen konnten in Verbindung mit den vorgestellten Modellen bereits einige neue Erkenntnisse über die Beschaffenheit des  $\chi^{(2)}$ -Tensors von Myosinfilamenten gewonnen werden. Nun wäre es interessant, die Beiträge der einzelnen Bestandteile des Myosinmoleküls zum SHG Signal näher aufzuschlüsseln. Gemessen werden soll beispielsweise die SHG Polarisationsabhängigkeit von Filamenten aus aufgereinigtem LMM oder Myosinrod ohne Beiträge von Myosinköpfen, das heißt letztlich die Größe  $\gamma_0$ , welche als Ausgangsbasis für das gezeigte Abknickmodell dient. Diese Messungen wären sehr hilfreich, um das Modell weiter präzisieren zu können. Aufschlussreich könnte in diesem Zusammenhang auch eine detailliertere Betrachtung der vorhandenen atomaren Strukturmodelle des Myosins sein.

Weitere interessante Anwendungsgebiete für die SHG Mikroskopie am Muskel ergeben sich zum einen auf der Ebene einzelner Muskelzellen und zum anderen auch auf der Ebene des intakten Muskels oder sogar der *in vivo* Anwendungen. An Muskelzellen soll beispielsweise der Prozess der Entstehung von Myosinfilamenten bei der Ausdifferenzierung von Myoblasten nicht-invasiv mit Hilfe von SHG Signalen beobachtet werden. Für spätere Untersuchungen am intakten Muskel soll zunächst die Charakterisierung des rückgestreuten Anteils der SHG Signale und die Entwicklung von mikroendoskopischen Detektionsverfahren mit Hilfe von Gradientenindexlinsen vorangetrieben werden.

Für Anwendungen der SHG Mikroskopie an der Haut ist es sinnvoll, die Qualität der Abbildungen aus tieferen Hautschichten zu verbessern. Hier sollen verschiedene Immersionsmedien untersucht werden, die in die Haut einziehen und dort den Brechungsindex günstig verändern, um die Lichtstreuung zu reduzieren. Weiterführen könnten hier zusätzlich auch Methoden der adaptiven Optik.

Als besonders vielversprechend erscheint die SHG Mikroskopie im Zusammenhang mit krankhaften Veränderungen der Collagenmatrix, wie sie bei Sklerodermie auf-

treten. Hier soll zunächst die Auswahl und Optimierung von Algorithmen zum Vergleich der aufgenommenen Bilder weitergeführt werden, um anschließend eine große Zahl von Hautschnitten vergleichend untersuchen zu können.

Ein großer Vorteil der SHG Mikroskopie liegt in der Möglichkeit zur dreidimensionalen Detektion und Analyse. Daher würde es sich für weitere Studien anbieten, auch native Hautproben in die Analyse mit einzubeziehen. Wenn es langfristig gelingt, die Veränderungen der Collagenmatrix auch an diesen Proben zuverlässig quantitativ zu beschreiben, könnten sich daraus letztlich Möglichkeiten für eine *in vivo* Diagnostik mit Hilfe der SHG Mikroskopie ergeben.



# Literaturverzeichnis

- [ADAMOVIC et al., 2008] ADAMOVIC, IVANA, S. M. MIJAILOVICH und M. KARPLUS (2008). *The elastic properties of the structurally characterized myosin II S2 subdomain: a molecular dynamics and normal mode analysis.* Biophys J, 94(10):3779–3789.
- [AL-KHAYAT et al., 2006] AL-KHAYAT, HIND A, E. P. MORRIS, R. W. KENSLER und J. M. SQUIRE (2006). *3D structure of relaxed fish muscle myosin filaments by single particle analysis.* J Struct Biol, 155(2):202–217.
- [AL-KHAYAT und SQUIRE, 2006] AL-KHAYAT, HIND A und J. M. SQUIRE (2006). *Refined structure of bony fish muscle myosin filaments from low-angle X-ray diffraction data.* J Struct Biol, 155(2):218–229.
- [ASATRYAN et al., 2004] ASATRYAN, ARA A., C. J. R. SHEPPARD und C. M. DE STERKE (2004). *Vector treatment of second-harmonic generation produced by tightly focused vignetted Gaussian beams.* J. Opt. Soc. Am. B, 21(12):2206–2212.
- [AU, 2004] AU, Y. (2004). *The muscle ultrastructure: a structural perspective of the sarcomere.* Cell Mol Life Sci, 61:3016–3033.
- [BALCH et al., 2009] BALCH, CHARLES M, J. E. GERSHENWALD, S.-J. SOONG, J. F. THOMPSON, M. B. ATKINS, D. R. BYRD, A. C. BUZUID, A. J. COCHRAN, D. G. COIT, S. DING, A. M. EGGERMONT, K. T. FLAHERTY, P. A. GIMOTTY, J. M. KIRKWOOD, K. M. McMASTERS, M. C. MIHM, D. L. MORTON, M. I. ROSS, A. J. SOBER und V. K. SONDAK (2009). *Final version of 2009 AJCC melanoma staging and classification.* J Clin Oncol, 27(36):6199–6206.
- [BARRAL und EPSTEIN, 1999] BARRAL, J. M. und H. F. EPSTEIN (1999). *Protein machines and self assembly in muscle organization.* Bioessays, 21(10):813–823.
- [BECK und BRODSKY, 1998] BECK, K. und B. BRODSKY (1998). *Supercoiled protein motifs: the collagen triple-helix and the alpha-helical coiled coil.* J Struct Biol, 122(1-2):17–29.

- [BERGMANN, 1993] BERGMANN, SCHAEFER (1993). *Lehrbuch der Experimentalphysik Band 3 Optik*. de Gruyter.
- [BOTH et al., 2004] BOTH, MARTIN, M. VOGEL, O. FRIEDRICH, F. VON WEGNER, T. KÜNSTING, R. H. A. FINK und D. UTTENWEILER (2004). *Second harmonic imaging of intrinsic signals in muscle fibers in situ..* J Biomed Opt, 9(5):882–892.
- [BROWN et al., 2008] BROWN, JERRY H, Y. YANG, L. RESHETNIKOVA, S. GOURINATH, D. SÜVEGES, J. KARDOS, F. HÓBOR, R. REUTZEL, L. NYITRAY und C. COHEN (2008). *An unstable head-rod junction may promote folding into the compact off-state conformation of regulated myosins..* J Mol Biol, 375(5):1434–1443.
- [BUSAM et al., 2005] BUSAM, KLAUS J, A. A. MARGHOOB und A. HALPERN (2005). *Melanoma diagnosis by confocal microscopy: promise and pitfalls..* J Invest Dermatol, 125(3):vii.
- [CAMPAGNOLA und LOEW, 2003] CAMPAGNOLA, PAUL J und L. M. LOEW (2003). *Second-harmonic imaging microscopy for visualizing biomolecular arrays in cells, tissues and organisms..* Nat Biotechnol, 21(11):1356–1360.
- [CAMPAGNOLA et al., 2002] CAMPAGNOLA, PAUL J, A. C. MILLARD, M. TERASAKI, P. E. HOPPE, C. J. MALONE und W. A. MOHLER (2002). *Three-dimensional high-resolution second-harmonic generation imaging of endogenous structural proteins in biological tissues..* Biophys J, 82(1 Pt 1):493–508.
- [CHEUNG et al., 2002] CHEUNG, A., J. A. DANTZIG, S. HOLLINGWORTH, S. M. BAYLOR, Y. E. GOLDMAN, T. J. MITCHISON und A. F. STRAIGHT (2002). *A small-molecule inhibitor of skeletal muscle myosin II..* Nat Cell Biol, 4(1):83–88.
- [CHEW und SQUIRE, 1995] CHEW, M. W. und J. M. SQUIRE (1995). *Packing of alpha-helical coiled-coil myosin rods in vertebrate muscle thick filaments..* J Struct Biol, 115(3):233–249.
- [CICCHI et al., 2007] CICCHI, R., D. MASSI, S. SESTINI, P. CARLI, V. D. GIORGI, T. LOTTI und F. S. PAVONE (2007). *Multidimensional non-linear laser imaging of Basal Cell Carcinoma.* Opt. Express, 15(16):10135–10148.
- [CLARK et al., 2002] CLARK, KATHLEEN A, A. S. MCELHINNY, M. C. BECKERLE und C. C. GREGORIO (2002). *Striated muscle cytoarchitecture: an intricate web of form and function..* Annu Rev Cell Dev Biol, 18:637–706.
- [COLBY, 1971] COLBY, RICHARD H. (1971). *Intrinsic Birefringence of Glycerinated Myofibrils.* J Cell Biol, 51:763–771.

- [CRAIG und WOODHEAD, 2006] CRAIG, ROGER und J. L. WOODHEAD (2006). *Structure and function of myosin filaments..* Curr Opin Struct Biol, 16(2):204–212.
- [CYVIN et al., 1965] CYVIN, S. J., J. E. RAUCH und J. C. DECIUS (1965). *Theory of Hyper-Raman Effects.* J Chem Phys, 43(11):4083–4095.
- [DAVIS, 1986] DAVIS, J. S. (1986). *A model for length-regulation in thick filaments of vertebrate skeletal myosin..* Biophys J, 50(3):417–422.
- [DISTLER und GAY, 2010] DISTLER, O. und S. GAY (2010). *[Scleroderma].* Internist (Berl), 51(1):30–38.
- [DOMBECK et al., 2003] DOMBECK, DANIEL A, K. A. KASISCHKE, H. D. VISHWAS-RAO, M. INGELSSON, B. T. HYMAN und W. W. WEBB (2003). *Uniform polarity microtubule assemblies imaged in native brain tissue by second-harmonic generation microscopy..* Proc Natl Acad Sci U S A, 100(12):7081–7086.
- [DUDOVICH et al., 2002] DUDOVICH, NIRIT, D. ORON und Y. SILBERBERG (2002). *Single-pulse coherently controlled nonlinear Raman spectroscopy and microscopy..* Nature, 418(6897):512–514.
- [DUPASQUIER et al., 2004] DUPASQUIER, MARCEL, P. STOITZNER, A. VAN OUDENAREN, N. ROMANI und P. J. M. LEENEN (2004). *Macrophages and dendritic cells constitute a major subpopulation of cells in the mouse dermis..* J Invest Dermatol, 123(5):876–879.
- [EVANS et al., 2005] EVANS, CONOR L, E. O. POTMA, M. PUORIS’HAAG, D. CÔTÉ, C. P. LIN und X. S. XIE (2005). *Chemical imaging of tissue in vivo with video-rate coherent anti-Stokes Raman scattering microscopy..* Proc Natl Acad Sci U S A, 102(46):16807–16812.
- [FISCHER et al., 2005] FISCHER, STEFAN, B. WINDSHÜGEL, D. HORAK, K. C. HOLMES und J. C. SMITH (2005). *Structural mechanism of the recovery stroke in the myosin molecular motor..* Proc Natl Acad Sci U S A, 102(19):6873–6878.
- [FRANKEN, 1961] FRANKEN, P.A. (1961). *Generation of optical Harmonics.* Phys Rev Lett, 7(4):118–119.
- [FREUND et al., 1986] FREUND, I., M. DEUTSCH und A. SPRECHER (1986). *Connective tissue polarity. Optical second-harmonic microscopy, crossed-beam summation, and small-angle scattering in rat-tail tendon..* Biophys J, 50(4):693–712.
- [FRIEDRICH et al., 2010] FRIEDRICH, O., M. BOTH, C. WEBER, S. SCHÜRMAN, M. D. H. TEICHMANN, F. VON WEGNER, R. H. A. FINK, M. VOGEL, J. S. CHAMBERLAIN und C. GARBE (2010). *Microarchitecture is severely compromised but*

- motor protein function is preserved in dystrophic mdx skeletal muscle..* Biophys J, 98(4):606–616.
- [GANNAWAY und SHEPPARD, 1978] GANNAWAY, J. N. und C. J. R. SHEPPARD (1978). *Second-harmonic imaging in the scanning optical microscope.* Optical and Quantum Electronics, 10:435–439.
- [GARBE et al., 2007] GARBE, CLAUS, A. HAUSCHILD, M. VOLKENANDT, D. SCHAENDORF, W. STOLZ, U. REINHOLD, R.-D. KORTMANN, C. KETTELHACK, B. FRIEDRICH, U. KEILHOLZ, R. DUMMER, G. SEBASTIAN, W. TILGEN, G. SCHULER, A. MACKENSEN und R. KAUFMANN (2007). *Evidence and interdisciplinary consensus-based German guidelines: diagnosis and surveillance of melanoma..* Melanoma Res, 17(6):393–399.
- [GOEPPERT-MAYER, 1931] GOEPPERT-MAYER, MARIA (1931). *Über Elementarakte mit zwei Quantensprüngen.* Annalen der Physik, 9:273–294.
- [HAGENDOORN et al., 2006] HAGENDOORN, JEROEN, R. TONG, D. FUKUMURA, Q. LIN, J. LOBO, T. P. PADERA, L. XU, R. KUCHERLAPATI und R. K. JAIN (2006). *Onset of abnormal blood and lymphatic vessel function and interstitial hypertension in early stages of carcinogenesis..* Cancer Res, 66(7):3360–3364.
- [HAN et al., 2004] HAN, MENG, L. ZICKLER, G. GIESE, M. WALTER, F. H. LOESEL und J. F. BILLE (2004). *Second-harmonic imaging of cornea after intrastromal femtosecond laser ablation..* J Biomed Opt, 9(4):760–766.
- [HELL, 2007] HELL, STEFAN W (2007). *Far-field optical nanoscopy..* Science, 316(5828):1153–1158.
- [HELL und STELZER, 1992] HELL, STEFAN W. und E. H. K. STELZER (1992). *Fundamental improvement of resolution with a 4Pi-confocal fluorescence microscope using two-photon excitation..* Opt. Commun., 93:277–282.
- [HELL und WICHMANN, 1994] HELL, STEFAN W. und J. WICHMANN (1994). *Breaking the diffraction resolution limit by stimulated emission..* Opt. Lett., 19:780–782.
- [HOLMES, 1997] HOLMES, K. C. (1997). *The swinging lever-arm hypothesis of muscle contraction..* Curr Biol, 7(2):R112–R118.
- [HOLMES und LEHMAN, 2008] HOLMES, KENNETH C und W. LEHMAN (2008). *Gestalt-binding of tropomyosin to actin filaments..* J Muscle Res Cell Motil, 29(6-8):213–219.

- [HOSHIDA et al., 2006] HOSHIDA, TOHRU, N. ISAKA, J. HAGENDOORN, E. DI TOMASSO, Y.-L. CHEN, B. PYTOWSKI, D. FUKUMURA, T. P. PADERA und R. K. JAIN (2006). *Imaging steps of lymphatic metastasis reveals that vascular endothelial growth factor-C increases metastasis by increasing delivery of cancer cells to lymph nodes: therapeutic implications..* Cancer Res, 66(16):8065–8075.
- [HOUDUSSE et al., 1999] HOUDUSSE, A., V. N. KALABOKIS, D. HIMMEL, A. G. SZENT-GYÖRGYI und C. COHEN (1999). *Atomic structure of scallop myosin subfragment S1 complexed with MgADP: a novel conformation of the myosin head..* Cell, 97(4):459–470.
- [ISHIJIMA et al., 1996] ISHIJIMA, A., H. KOJIMA, H. HIGUCHI, Y. HARADA, T. FUNATSU und T. YANAGIDA (1996). *Multiple- and single-molecule analysis of the actomyosin motor by nanometer-piconewton manipulation with a microneedle: unitary steps and forces..* Biophys J, 70(1):383–400.
- [JOHNSON et al., 2008] JOHNSON, THERON S, K. MAHNKE, V. STORN, K. SCHÖNFELD, S. RING, D. M. NETTELBECK, H. J. HAISMA, F. L. GALL, R. E. KONTERMANN und A. H. ENK (2008). *Inhibition of melanoma growth by targeting of antigen to dendritic cells via an anti-DEC-205 single-chain fragment variable molecule..* Clin Cancer Res, 14(24):8169–8177.
- [KATSURA und NODA, 1973] KATSURA, ISAO und H. NODA (1973). *Structure and Polymorphism of Light Meromyosin Aggregates.* Journal of Biochemistry, 73:257–268.
- [KLEINMAN, 1962] KLEINMAN, D.A. (1962). *Nonlinear Dielectric Polarisation in optical media.* Phys Rev Lett, 126:1977–1979.
- [KONIG und RIEMANN, 2003] KONIG, KARSTEN und I. RIEMANN (2003). *High-resolution multiphoton tomography of human skin with subcellular spatial resolution and picosecond time resolution..* J Biomed Opt, 8(3):432–439.
- [KOVÁCS et al., 2004] KOVÁCS, MIHÁLY, J. TÓTH, C. HETÉNYI, A. MÁLNÁSI-CSIZMADIA und J. R. SELLERS (2004). *Mechanism of blebbistatin inhibition of myosin II..* J Biol Chem, 279(34):35557–35563.
- [KREUTER et al., 2009] KREUTER, ALEXANDER, T. KRIEG, M. WORM, J. WENZEL, T. GAMBICHLER, A. KUHN, E. ABERER, K. SCHARFFETTER-KOCHANEK, N. HUNZELMANN und D. D. GESELLSCHAFT (2009). *[AWMF Guideline no. 013/066. Diagnosis and therapy of circumscribed scleroderma].* J Dtsch Dermatol Ges, 7 Suppl 6:S1–14.

- [LEMMER et al., 2008] LEMMER, P., M. GUNKEL, D. BADDELEY, R. KAUFMANN, A. URICH, Y. WEILAND, J. REYMANN, P. MÜLLER, M. HAUSMANN und C. CREMER (2008). *SPDM: light microscopy with single-molecule resolution at the nanoscale*. Appl Phys B, 93:1–12.
- [LEUTENEGGER et al., 2006] LEUTENEGGER, MARCEL, R. RAO, R. A. LEITGEB und T. LASSER (2006). *Fast focus field calculations*. Opt. Express, 14(23):11277–11291.
- [LEUTENEGGER et al., 2008] LEUTENEGGER, MARCEL, R. RAO, R. A. LEITGEB und T. LASSER (2008). *Fast focus field calculations*. Proc. SPIE, 6861(23):68610R.
- [LI et al., 2003] LI, YU, J. H. BROWN, L. RESHETNIKOVA, A. BLAZSEK, L. FARKAS, L. NYITRAY und C. COHEN (2003). *Visualization of an unstable coiled coil from the scallop myosin rod..* Nature, 424(6946):341–345.
- [LLEWELLYN et al., 2008] LLEWELLYN, MICHAEL E, R. P. J. BARRETTO, S. L. DELP und M. J. SCHNITZER (2008). *Minimally invasive high-speed imaging of sarcomere contractile dynamics in mice and humans..* Nature, 454(7205):784–788.
- [MAHNKE et al., 2005] MAHNKE, KARSTEN, Y. QIAN, S. FONDEL, J. BRUECK, C. BECKER und A. H. ENK (2005). *Targeting of antigens to activated dendritic cells in vivo cures metastatic melanoma in mice..* Cancer Res, 65(15):7007–7012.
- [MESENTEAN et al., 2007] MESENTEAN, SIDONIA, S. KOPPOLE, J. C. SMITH und S. FISCHER (2007). *The principal motions involved in the coupling mechanism of the recovery stroke of the myosin motor..* J Mol Biol, 367(2):591–602.
- [MILLMAN, 1998] MILLMAN, B. (1998). *The filament lattice of striated muscle*. Phys Rev Lett, 78:359–391.
- [MOREAUX et al., 2000] MOREAUX, L., O. SANDRE und J. MERTZ (2000). *Membrane imaging by second-harmonic generation microscopy*. J. Opt. Soc. Am. B, 17(10):1685.
- [NOVOTNY, 1997] NOVOTNY, LUKAS (1997). *Allowed and forbidden light in near-field optics. II. Interacting dipolar particles*. J. Opt. Soc. Am. A, 14(1):105–113.
- [NUCCIOTTI et al., 2007] NUCCIOTTI, V., C. STRINGARI, L. SACCONI, F. VANZI, C. T. N. PIRODDI, C. POGGESI, C. CASTIGLIONI, A. MILANI, M. LINARI, G. PIAZZESI, V. LOMBARDI und F. PAVONE (2007). *Study of skeletal muscle cross-bridge population dynamics by Second Harmonic Generation*. Proc. of SPIE, 6442:644219–1–8.
- [OFFER und SESSIONS, 1995] OFFER, G. und R. SESSIONS (1995). *Computer modeling of the alpha-helical coiled coil: packing of side-chains in the inner core..* J Mol Biol, 249(5):967–987.

- [OGATA und YAMASAKI, 1997] OGATA, T. und Y. YAMASAKI (1997). *Ultra-high-resolution scanning electron microscopy of mitochondria and sarcoplasmic reticulum arrangement in human red, white, and intermediate muscle fibers..* Anat Rec, 248(2):214–223.
- [PALERO et al., 2007] PALERO, JONATHAN A, H. S. DE BRUIJN, A. VAN DER PLOEG VAN DEN HEUVEL, H. J. C. M. STERENBORG und H. C. GERRITSEN (2007). *Spectrally resolved multiphoton imaging of in vivo and excised mouse skin tissues..* Biophys J, 93(3):992–1007.
- [PARRY et al., 2008] PARRY, DAVID A D, R. D. B. FRASER und J. M. SQUIRE (2008). *Fifty years of coiled-coils and alpha-helical bundles: a close relationship between sequence and structure..* J Struct Biol, 163(3):258–269.
- [PAULING et al., 1951] PAULING, LINUS, R. B. COREY und H. BRANSON (1951). *The structure of proteins: two hydrogen-bonded helical configuration of the polypeptide chain.* Proc Natl Acad Sci USA, 37:205–211.
- [PDQ, 2009] PDQ, PHYSICIAN DATA QUERY (2009). *Information about Melanoma.*
- [PELLACANI et al., 2005] PELLACANI, GIOVANNI, A. M. CESINARO und S. SEIDENARI (2005). *Reflectance-mode confocal microscopy for the in vivo characterization of pagetoid melanocytosis in melanomas and nevi..* J Invest Dermatol, 125(3):532–537.
- [PENA et al., 2005] PENA, A.-M., M. STRUPLER, T. BOULESTEIX, G. GODEAU und M. SCHANNE-KLEIN (2005). *Spectroscopic analysis of keratin endogenous signal for skin multiphoton microscopy.* Optics Express, 13:6268.
- [PLOTNIKOV et al., 2006] PLOTNIKOV, S.V., A. MILLARD, P. CAMPAGNOLA und W. MOHLER (2006). *Characterization of the myosin-based source for second-harmonic generation from muscle sarcomeres.* Biophys J, 90(2):693–703.
- [POTMA und XIE, 2004] POTMA, ERIC O. und S. X. XIE (2004). *Cars microscopy for biology and medicine.* Optics and Photonics News, 15:40.
- [RICHARDS und WOLF, 1959] RICHARDS, B. und E. WOLF (1959). *Electromagnetic diffraction in optical systems II. Structur of the image field in an aplanatic system.* Proceedings of the Royal Society of London. Series A, 253:289–438.
- [ROGERS et al., 2010] ROGERS, HOWARD W, M. A. WEINSTOCK, A. R. HARRIS, M. R. HINCKLEY, S. R. FELDMAN, A. B. FLEISCHER und B. M. COLDIRON (2010). *Incidence estimate of nonmelanoma skin cancer in the United States, 2006..* Arch Dermatol, 146(3):283–287.

- [ROTH und FREUND, 1978] ROTH, S. und I. FREUND (1978). *Second Harmonic Generation in collagen*. J Chem Phys, 70(4):1637–1643.
- [RUFF et al., 2001] RUFF, C., M. FURCH, B. BRENNER, D. J. MANSTEIN und E. MEYHÖFER (2001). *Single-molecule tracking of myosins with genetically engineered amplifier domains*. Nat Struct Biol, 8(3):226–229.
- [SCHENKE-LAYLAND et al., 2005] SCHENKE-LAYLAND, KATJA, I. RIEMANN, U. A. STOCK und K. KÖNIG (2005). *Imaging of cardiovascular structures using near-infrared femtosecond multiphoton laser scanning microscopy*. J Biomed Opt, 10(2):024017.
- [SCHMIDT und THEWS, 1997] SCHMIDT, ROBERT F. und G. THEWS (1997). *Physiologie des Menschen*. Springer Verlag.
- [SCHÜRSMANN et al., 2007] SCHÜRSMANN, SEBASTIAN, C. WEBER, R. H. FINK und M. VOGEL (2007). *Myosin rods are a source of second harmonic generation signals in skeletal muscle*. Proc. SPIE, 6442:64421U.
- [SHAW et al., 2003] SHAW, M. ALEXANDER, E. M. OSTAP und Y. E. GOLDMAN (2003). *Mechanism of inhibition of skeletal muscle actomyosin by N-benzyl-p-toluenesulfonamide*. Biochemistry, 42(20):6128–6135.
- [SHEN, 1984] SHEN, Y.R. (1984). *The Principles of Nonlinear Optics*. John Wiley & Sons.
- [SPUDICH, 2001] SPUDICH, J. A. (2001). *The myosin swinging cross-bridge model*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2(5):387–392.
- [STEWART und EDWARDS, 1984] STEWART, M. und P. EDWARDS (1984). *Length of myosin rod and its proteolytic fragments determined by electron microscopy*. FEBS Lett, 168(1):75–78.
- [STOLLER et al., 2002] STOLLER, PATRICK, B.-M. KIM, A. M. RUBENCHIK, K. M. REISER und L. B. D. SILVA (2002). *Polarization-dependent optical second-harmonic imaging of a rat-tail tendon*. J Biomed Opt, 7(2):205–214.
- [STRAIGHT et al., 2003] STRAIGHT, AARON F, A. CHEUNG, J. LIMOUZE, I. CHEN, N. J. WESTWOOD, J. R. SELLERS und T. J. MITCHISON (2003). *Dissecting temporal and spatial control of cytokinesis with a myosin II Inhibitor*. Science, 299(5613):1743–1747.
- [STRAUSSMAN et al., 2005] STRAUSSMAN, RAVID, J. M. SQUIRE, A. BEN-YA'ACOV und S. RAVID (2005). *Skip residues and charge interactions in myosin II coiled-coils: implications for molecular packing*. J Mol Biol, 353(3):613–628.



- [SUGGS et al., 2007] SUGGS, JENNIFER A, A. CAMMARATO, W. A. KRONERT, M. NIKKHOY, C. M. DAMBACHER, A. MEGIGHIAN und S. I. BERNSTEIN (2007). *Alternative S2 hinge regions of the myosin rod differentially affect muscle function, myofibril dimensions and myosin tail length..* J Mol Biol, 367(5):1312–1329.
- [VOLKMER et al., 2001] VOLKMER, ANDREAS, J.-X. CHENG und X. S. XIE (2001). *Vibrational Imaging with High Sensitivity via Epidetected Coherent Anti-Stokes Raman Scattering Microscopy.* Physical Review Letters, 87:023901–1–023901–4.
- [DE VRIES et al., 2000] VRIES, H. J. DE, D. N. ENOMOTO, J. VAN MARLE, P. P. VAN ZUIJLEN, J. R. MEKKES und J. D. BOS (2000). *Dermal organization in scleroderma: the fast Fourier transform and the laser scatter method objectify fibrosis in nonlesional as well as lesional skin..* Lab Invest, 80(8):1281–1289.
- [WARD und MURRAY, 1990] WARD, R. und J. M. MURRAY (1990). *Three-dimensional structure of frozen-hydrated paracrystals of myosin rod..* J Muscle Res Cell Motil, 11(5):403–418.
- [WILLIAMS et al., 2005] WILLIAMS, REBECCA M, W. R. ZIPFEL und W. W. WEBB (2005). *Interpreting second-harmonic generation images of collagen I fibrils..* Biophys J, 88(2):1377–1386.
- [YASUI et al., 2004] YASUI, TAKESHI, Y. TOHNO und T. ARAKI (2004). *Characterization of collagen orientation in human dermis by two-dimensional second-harmonic-generation polarimetry..* J Biomed Opt, 9(2):259–264.
- [YEW und SHEPPARD, 2006] YEW, ELIJAH und C. SHEPPARD (2006). *Effects of axial field components on second harmonic generation microscopy.* Opt. Express, 14(3):1167–1174.
- [ZHANG und WANG, 1997] ZHANG, JIN und X. WANG (1997). *Selecting the Best Regression Equation via the P-Value of F-Test.* Metrika, 46:33–40.
- [ZUMBUSCH et al., 1999] ZUMBUSCH, A., G. HOLTOM und S. XIE (1999). *Three-Dimensional Vibrational Imaging by Coherent Anti-Stokes Raman Scattering.* Phys Rev Lett, 82:4142–4145.



# Eigene Veröffentlichungen

SCHÜRMAN, SEBASTIAN, F. v. WEGNER, R.H.A. FINK, O. FRIEDRICH und M. VOGEL (2010). *Second harmonic generation probes different states of motor protein interaction in myofibrils*. Eingereicht.

SCHÜRMAN, SEBASTIAN, C. WEBER, R.H.A. FINK und M. VOGEL (2007). *Myosin rods are a source of second harmonic generation signals in skeletal muscle*. Proc. SPIE, 6442:6442IU.

FRIEDRICH, OLIVER, M. BOTH, C. WEBER, S. SCHÜRMAN, M. D. H. TEICHMANN, F. v. WEGNER, R. H. A. FINK, M. VOGEL, J. S. CHAMBERLAIN und C. GARBE (2010). *Microarchitecture is severely compromised but motor protein function is preserved in dystrophic mdx skeletal muscle*. Biophys J, 98: 606–616.

WEGNER, FREDERIC v., S. SCHÜRMAN, R.H.A. FINK, M. VOGEL und O. FRIEDRICH (2009). *Motor protein function in skeletal muscle - a multiple scale approach*. IEEE Trans Med Imaging, 28:1632-1642.

WEGNER, FREDERIC v., T. OBER, C. WEBER, S. SCHÜRMAN, R. WINTER, O. FRIEDRICH, R.H.A. FINK und M. VOGEL (2008). *Velocity distributions of single F-actin trajectories from fluorescence image series using trajectory reconstruction and optical flow mapping*. Journal of Biomedical Optics, 13, 054018.

SCHNEE, SANDRO, F. v. WEGNER, S. SCHÜRMAN, H. LUDWIG, R.H.A. FINK und O. FRIEDRICH (2008). *Microdomain Ca<sup>2+</sup> dynamics in mammalian muscle following prolonged high pressure treatments*. Journal of Physics Conf. Ser., 121, 112003

VOGEL, MARTIN, S. SCHÜRMAN, O. FRIEDRICH, F. v. WEGNER, M. BOTH und R.H.A. FINK (2006). *Scanning multi photon microscopy of SHG signals from single myofibrils of mammalian skeletal muscle*. Proc. SPIE, 6089:60891J.

VOGEL, MARTIN, D. HAHN, S. SCHÜRMAN, M. LANG, F. v. WEGNER, O. FRIEDRICH, J. ENGELHARDT, S. W. HELL und R.H.A. FINK (2006). *4Pi-SHG imaging of mammalian myofibrillar structures*. Proc. SPIE, 6089:60891Q.



# Danksagung

Diese Dissertation wurde ermöglicht durch ein Stipendium der Landesgraduiertenförderung Baden-Württemberg.

Zum Abschluss möchte ich allen herzlich danken, die zu dieser Arbeit beigetragen haben.

Prof. Dr. Rainer Fink danke ich dafür, dass ich diese Doktorarbeit in seiner Arbeitsgruppe am Institut für Physiologie und Pathophysiologie durchführen konnte. Ich danke ihm besonders für das große Vertrauen, das er mir entgegengebracht hat, für die vielen Freiheiten, die er mir gelassen hat, und dafür dass ich immer wusste, dass der Erfolg meiner Arbeit ihm ehrlich am Herzen liegt.

Prof. Dr. Dr. Christoph Cremer danke ich für die Unterstützung meines Projekts, für die freundlichen Gespräche und dafür, dass er abschließend die Betreuung und Begutachtung meiner Arbeit übernommen hat.

Prof. Dr. Josef Bille danke ich für die vorhergehende Betreuung dieser Arbeit von Seiten der Physik und vor allem für seine Unterstützung zu Beginn meines Promotionsvorhabens.

Dr. Martin Vogel danke ich für seine Hilfe bei der Modellierung und allen Fragen zur Mikroskopie, für viel Lob und Zuspruch und die neue Motivation, die er mir dadurch gegeben hat. Danke dafür, dass das Manuskript nun endlich fertiggestellt und eingereicht ist und auch nochmal Danke für die Wochen in Harvard.

Prof. Dr. Dr. Oliver Friedrich danke ich für seine Hilfe bei physiologischen Fragestellungen, für die produktiven wissenschaftlichen Kaffeetrinken im Botanik und für ein Angebot, das ich nicht ablehnen kann.

Dr. Frederic von Wegner danke ich für die Einführung in die IDL Programmierung, seine Hilfe in Fragen der Bildverarbeitung und für die gute Zeit, die wir gemeinsam in einem Büro hatten.

Prof. Dr. Karsten Mahnke und Dr. Sabine Ring danke ich für ihre Unterstützung des Projekts „SHG Mikroskopie von Hauttumoren“, sowohl bei der Planung als auch im

Labor. Danke auch an alle Doktoranden des Forschungslabors Hautklinik für die Hilfsbereitschaft im Labor und für Nachhilfe bei Fragen zur Immunologie.

Prof. Dr. Peter Helmbold und Dr. Sabine Rinck für das gemeinsame Anschieben des Projekts Sklerodermie und PD Dr. Christoph Garbe für seine Beiträge zur Bildverarbeitung bei diesem Thema.

Dr. Dorothea Sauter und Dr. Johann Engelhardt danke ich für hilfreiche Diskussionen über die Berechnung elektrischer Felder im Objektivfokus.

Cornelia Weber danke ich für die viele Hilfe im Labor und für ihre gute Laune – und vielleicht klappt es ja doch nochmal mit LMM & Co..

Besonders danken möchte ich nun noch allen Diplomanden und Doktoranden der Arbeitsgruppe Fink, mit denen ich die Arbeit, die Pausen und die Freizeit teilen durfte. Es war wirklich eine gute Zeit hier im Labor und das lag vor allem auch an euch!

Das Korrekturlesen der Arbeit haben Martin Vogel und meine Ehefrau Saskia übernommen. Dafür nochmal ein besonderes Dankeschön!

Zum Schluss möchte ich noch meinen Eltern danken für ihre Unterstützung über all die Jahre. Und meiner Schwester und meinen Freunden fürs Daumen drücken und für die aufbauenden Worte. Es ist schön zu wissen, dass ihr für mich da seid.

Meiner Ehefrau Saskia danke ich von ganzem Herzen für ihre Liebe, ihr Verständnis und ihre Unterstützung. Dafür dass sie Freude und Frust mit mir geteilt hat und mich motiviert hat bis zu dieser letzten Seite.

