

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

vorgelegt von
Dipl.-Phys. Martin Vogel
aus Freiburg im Breisgau

Tag der mündl. Prüfung: 15.12.2004

Entwicklung und Aufbau
einer modularen
Konfokal-Multiphotonen-Laserscanning-Messapparatur
(CMLTT) für
Second Harmonic Generation-, Total Internal Reflectance-
und
Laser Tweezers-Anwendungen an myofibrillären Präparaten

Gutachter: Prof. Dr. Rainer H. A. Fink
Prof. Dr. Josef Bille

Zusammenfassung

Entwicklung und Aufbau einer modularen Konfokal-Multiphotonen-Laserscanning-Messapparatur (CMLTT) für Second Harmonic Generation-, Total Internal Reflectance- und Laser Tweezers-Anwendungen an myofibrillären Präparaten

In der vorliegenden Arbeit wurde eine hochauflösende optische Messapparatur (CMLTT) entwickelt und aufgebaut, die auf einem konfokalen Multiphotonen-Laserscanning-Mikroskop basiert und eine optische Pinzette, ein Modul für innere Totalreflektionsmikroskopie (TIRFM), eine zusätzliche stationäre Multiphotonen-einkopplung sowie Positionsdetektoren enthält. Dabei wurde diese CMLTT-Gesamtapparatur so konzipiert, dass die einzelnen Module weitgehend parallel einsetzbar sind.

Der Laserstrahl des Laser tweezers- (optische Pinzette-) Moduls ist mit Hilfe von akustooptischen und elektrooptischen Modulatoren sowohl räumlich wie zeitlich modulierbar. Das TIRFM-Modul ist für zwei Anregungslichtquellen ausgelegt, die Leistung der stationären Multiphotoneinkopplung kann variiert werden. Für die Laser tweezers-Anwendungen stehen insgesamt drei Vierquadranten-Positionsdetektoren zur Verfügung, so dass eine Positionsmessung eingefangener Objekte in allen Mikroskopiemodi möglich ist.

Diese modulare CMLTT-Messapparatur wurde an Myofibrillenpräparaten und Einzelmolekülassays getestet. Sie erlaubte erstmals, hochauflösende Second Harmonic Generation Messungen der 3D-Sarkomerstruktur von Muskelzellen durchzuführen. Darüber hinaus gelang es, die Multiphotonenfreisetzung des Kalziumkäfigmoleküls DMNPE-4 zu realisieren. Auf Einzelmolekülebene wurde die CMLTT-Apparatur benutzt, um die kalziumaktivierte Motilität der molekularen Motoren Aktin und Myosin zu quantifizieren.

Abstract

Development and implementation of a modular confocal multiphoton laserscanning set up (CMLTT) for applications involving second harmonic generation, total internal reflectance and laser tweezers on myofibrillar preparations

In the present work, the development and implementation of a high-resolution optical measuring system (CMLTT) is described. This system is based on a confocal-multiphoton-laserscanning microscope and comprises an optical laser-tweezers module, total-internal-reflectance microscopy (TIRFM), an additional stationary multi-photon coupling and position detectors. The CMLTT system is designed so that each module can be used with others in parallel.

The laser beam forming the optical tweezers can be modulated both in space and time using acoustooptical and electrooptical modulators. The TIRFM module is built to accommodate two excitation light sources and the power coupling of the stationary multi photon module can be varied. For laser tweezers applications, three position detectors are available for all microscopic modes.

This modular CMLTT microscopic apparatus has been tested on myofibrillar preparations and single molecule assays. For the first time, it was possible to carry out high resolution second harmonic measurements of the three dimensional sarcomeric structure of muscle cells. Additionally, the multi photon photo release of DMNPE-4, a calcium cage molecule, has been realized. Furthermore, the CMLTT system has been used to quantify the calcium activated motility of the molecular motor proteins actin and myosin.

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
I	Grundlagen	3
2	Physiologische Grundlagen	5
2.1	Der Skelettmuskel	5
2.1.1	Aufbau des Skelettmuskels	5
2.1.2	Molekulare Bestandteile des Skelettmuskels	7
2.2	Kontraktion des Skelettmuskels	11
2.2.1	Der Mechanismus der Muskelkontraktion	11
2.2.2	Molekulares Modell der Muskelkontraktion	14
3	Optik und Laser	25
3.1	Optik	25
3.2	Geometrische Optik	29
3.3	Laseroptik	34
3.4	Optische Kräfte	40
4	Mikroskopische Methoden	49
4.1	Mikroskopie	49
4.2	Fluoreszenz	56
4.3	Konfokalmikroskopie	61
4.4	Multiphotonmikroskopie	65
4.4.1	Multiphotonfluoreszenz	65
4.4.2	Second Harmonic Generation	67
4.4.3	Multiphotonphotolyse	69
4.5	TIRFM	69

5	Optische Detektionstechniken	73
5.1	Photodioden	73
5.2	CCD-Kameras	82
5.3	Photomultiplier	86
 II Aufbau der CMLTT-Apparatur und exemplarische Anwendungen		 89
6	Das CMLTT-Basissystem	91
6.1	Überblick	91
6.2	Epifluoreszenz	93
6.3	Konfokalmodul	97
6.4	Multiphoton-Laserquelle	100
6.5	Okularkamera	101
6.6	xy-Piezotranslator	103
7	Optische Pinzette	107
7.1	Überblick	107
7.2	Laserquelle	108
7.3	Leistungsregulation	116
7.4	Strahlableitung	122
7.5	Strahleinkopplung	126
7.6	Positionsdetektion	133
8	Stationäres MP-Modul	145
8.1	Aufbau des stationären MP-Moduls	145
8.2	Testmessungen	154
9	TIRFM Modul	157
9.1	Aufbau des TIRFM Moduls	157
9.2	Testmessungen	166
10	<i>In-vitro</i> Motilitätsassay	173
11	SHG-Messungen	181
12	Diskussion und Ausblick	187
12.1	Diskussion	187
12.2	Ausblick	192

Literatur	197
Danksagung	211

Abkürzungen

AB	AperturBlende
ABCD(-Matrizen / -Schema)	vierelementige(s) Matrix(-schema) mit den Elementen A,B,C,D
AC	Alternating Current
ADP	AdenosinDiPhosphat
AOD	AkustoOptischer Deflektor
AOM	AkustoOptischer Modulator
AP	AustrittsPupille
ATP	AdenosinTriPhosphat
BMBF	Bundesministerium für Bildung und Forschung
BNC	British Naval Connector oder Bayonet Nut Connector
CCD	Charged Coupled Device
CMLTT	Confocal Multiphoton Laser Tweezers TIRF set up
cw	continuous wave
DC	Direct Current
DMNP-	DiMethoxyNitroPhenyl-
DMNPE(-4)	DMNP-EGTA(-4)
DPSSL	Diode Pumped Solid State Laser
EC-coupling	Excitation Contraction coupling
EDTA	Ethylene-Diamine-TetrAcetic acid
EGTA	Ethylene-Glycol-TetraAcetic acid
EM(-Modell)	EletroMagnetisches Modell
EOM	ElektroOptischer Modulator
EP	EintrittsPupille
FAA	Freier ArbeitsAbstand
FWHM	Full Width at Half Maximum
FTIR	Frustrated Total Internal Reflection
GB	GesichtsfeldBlende
(gr/rt)HeNe	(grüner/roter) Helium Neon (-Laser)
ICCD	Intensified Charged Coupled Device
IR	InfraRot
LB	LeuchtfeldBlende
L.E.	LeistungsEinheiten
LMM	Light MeroMyosin
HMM	Heavy MeroMyosin
MIS	Metal Insulator Semiconductor
MOS	Metal Oxide Semiconductor
MP	MultiPhoton

NA	Numerische Apertur
Nd:YAG	Neodym-Yttrium-Aluminium-Granat (-Laser)
Nd:YLF	Neodym-Yttrium-Lithiumfluorid (-Laser)
Nd:YVO ₄	Neodym-Yttrium-Vanadat (-Laser)
NEP	Noise Equivalent Power
PH	PinHole
PMT	PhotoMultiplier Tube
PSF	Point Spread Function
RO(-Modell)	Ray Optics Modell
SHG	Second Harmonic Generation
SR	Sarkoplasmatisches Retikulum
STED	STimulated Emission after Depletion
TEM	Transversaler ElektroMagnetischer mode
THG	Third Harmonic Generation
TIFF	Tagged Image File Format
TIRF(M)	Total Internal Reflection Fluorescence (Microscopy)
Ti:Sa	Titan-Saphir(-Laser)
VDI	Verband der Deutschen Ingenieure
UV	UltraViolett

Kapitel 1

Einleitung

I was born not knowing and have had
only a little time
to change that here and there.
Richard Feynman, 1918-1988

Mehrere 100 Jahre nach seiner Erfindung erlebt das Lichtmikroskop eine Renaissance und ist wieder eines der wichtigsten Messinstrumente der Biophysik, der Biologie und der Medizin. Technisch immer ausgereifter und perfektioniert, schienen die Möglichkeiten der Lichtmikroskopie in der Mitte des 20. Jahrhunderts ausgereizt. Die technische Verwirklichung des Laserprinzips, Fortschritte der (Bio-)Chemie bei der gezielten Herstellung von Fluoreszenzfarbstoffen und anderen biologischen Markern sowie perfektionierte Herstellungsverfahren für optisch aktive Kristalle und Oberflächen veränderten dies nachhaltig. Seit etwa 15 Jahren werden Lasergestützte Mikroskopieverfahren immer häufiger zur Erforschung biologischer Präparate mit Erfolg herangezogen und entwickeln sich nach und nach zu vielseitigen und regelmäßig eingesetzten Werkzeugen in diesen Wissenschaftsbereichen.

Das Forschungsobjekt, die biologische Zelle und ihre Bestandteile, ist allerdings ein hochkomplexes System. Dies gilt auch für die Skelettmuskelzelle, die auf mich eine besondere Faszination ausübt: Diese Zelle ist im Verlaufe ihres Lebens immer wieder in der Lage, als Reaktion auf einen äußeren elektrischen Reiz zu kontrahieren und chemische Energie in mechanische Arbeit umzuwandeln. Durch ihren sehr regelmäßigen Aufbau wird man darüber hinaus geradezu aufgefordert, die Zelle modellhaft in Untereinheiten aufzuteilen und die Funktionalität dieser Untereinheiten für sich zu untersuchen. Das Gesamtsystem der Zelle bleibt dennoch ausreichend komplex, um prinzipielle Erkenntnisse auf andere Zelltypen

übertragen zu können.

Lichtmikroskopische Methoden haben bei biologischen Proben den entscheidenden Vorteil, dass das Präparat im funktionell intakten Zustand untersucht und beeinflusst werden kann. Ziel dieser Arbeit war daher die Implementierung eines lasergestützten Mikroskopsystems, mit dem die Struktur und die physiologische Aktivität der Zelle oder ihrer subzellulären und molekularen Untereinheiten gemessen werden kann.

Im nächsten Kapitel beschreibe ich daher zunächst den Aufbau der Skelettmuskelzelle und den molekularen Mechanismus der Kontraktion, wie er nach heutigem Wissensstand vermutlich abläuft. Darauf folgt ein Kapitel, in dem die optischen Grundlagen für diese Arbeit erläutert werden. Kapitel 4 beschreibt die in diesem Projekt verwendeten Mikroskopiemethoden und Kapitel 5 die eingesetzten Lichtdetektionstechniken.

Das Messsystem selbst wurde um ein inverses Fluoreszenzmikroskop realisiert, das mit konfokaler Einzel- und Mehrphotonenlaserscanningeinheit ausgestattet wurde und in Kapitel 6 beschrieben wird. In das System wurden weitere Module integriert: Eine optische Pinzette (Kapitel 7), mit der die Präparate mechanisch manipuliert oder ausgemessen werden können, eine stationäre Multiphoton-Einheit (Kapitel 8), mit der biochemische Prozesse gezielt ausgelöst werden sollen sowie ein TIRF-Modul (Kapitel 9), mit dem eine Erhöhung der Sensitivität von Fluoreszenzmessungen erreicht werden sollte. Die Herausforderung dabei war, die Module so zu realisieren, dass sie möglichst gleichzeitig mit anderen Modulen einsetzbar sind.

In den Kapiteln 10 und 11 werden mit dem *in-vitro*-Motilitätsassay und SHG-, „second harmonic generation“-Messungen an Muskelzellpräparaten zwei erste Messanwendungen vorgestellt, die mit dem CMLTT-System durchgeführt werden konnten. Das Motilitätsassay besitzt dabei zunächst einen eher funktionalen, die SHG-Messungen einen eher strukturellen Charakter. In naher Zukunft sollen diese beiden Aspekte, soweit möglich, zusammengeführt werden.

Dieses Projekt wurde im Rahmen des BMBF-Verbundprojektes „Laserbiodynamik“ ausgeführt. Dem BMBF, dem VDI als Projektträger und der Leica Microsystems GmbH als Projektpartner danke ich bereits an dieser Stelle für die gewährte Unterstützung.

Teil I

Grundlagen

Kapitel 2

Physiologische Grundlagen

Wie in der Einleitung bereits erwähnt wurde, sind die Skelettmuskelzelle und die aus ihr gewonnenen subzellulären oder molekularen Präparate interessante mikroskopische Objekte. Dies liegt zum einen an der sehr regelmäßigen Struktur, die sehr leicht in funktionale Untereinheiten eingeteilt werden kann. Zum anderen treten bei Skelettmuskelzellen (bio-)chemische, elektrische und mechanische Eigenschaften gemeinsam auf und beeinflussen sich gegenseitig. Da für die vorliegende Arbeit sowohl die strukturellen Eigenschaften wie die molekularen Mechanismen der Kontraktion wichtig sind (Kapitel 10 und 11), werde ich in im nächsten Abschnitt zunächst den strukturellen wie molekularen Aufbau einer Skelettmuskelzelle beschreiben. Darauf folgt eine Darstellung des Kontraktionsmechanismus.

2.1 Der Skelettmuskel

2.1.1 Aufbau des Skelettmuskels

Betrachtet man die Muskulatur von Säugetieren im Lichtmikroskop, so kann man zwei Muskeltypen unterscheiden [RÜEGG 1995]: Der eine Typ besitzt eine regelmäßige, senkrecht zur Kontraktionsrichtung liegende, gestreifte Musterung. Zu diesen *quergestreiften* Muskeln gehört unter anderem die Skelettmuskulatur und der Herzmuskel. Im Gegensatz dazu besitzen die Muskelzellen, die die Blutgefäße und innere Hohlgane umfassen, keine Musterung dieser Art. Sie werden daher *glatte* Muskulatur genannt. Der molekulare Kontraktionsmechanismus ist bei beiden Muskeltypen ähnlich. Das Hauptinteresse der in dieser Arbeit vorgestellten Experimente gilt jedoch der Skelettmuskulatur, so dass ich mich bei der Beschreibung auf diese beschränke. Diese Bevorzugung der Skelettmuskulatur begründet sich neben der sehr geordneten Zellstruktur dadurch, dass sich der

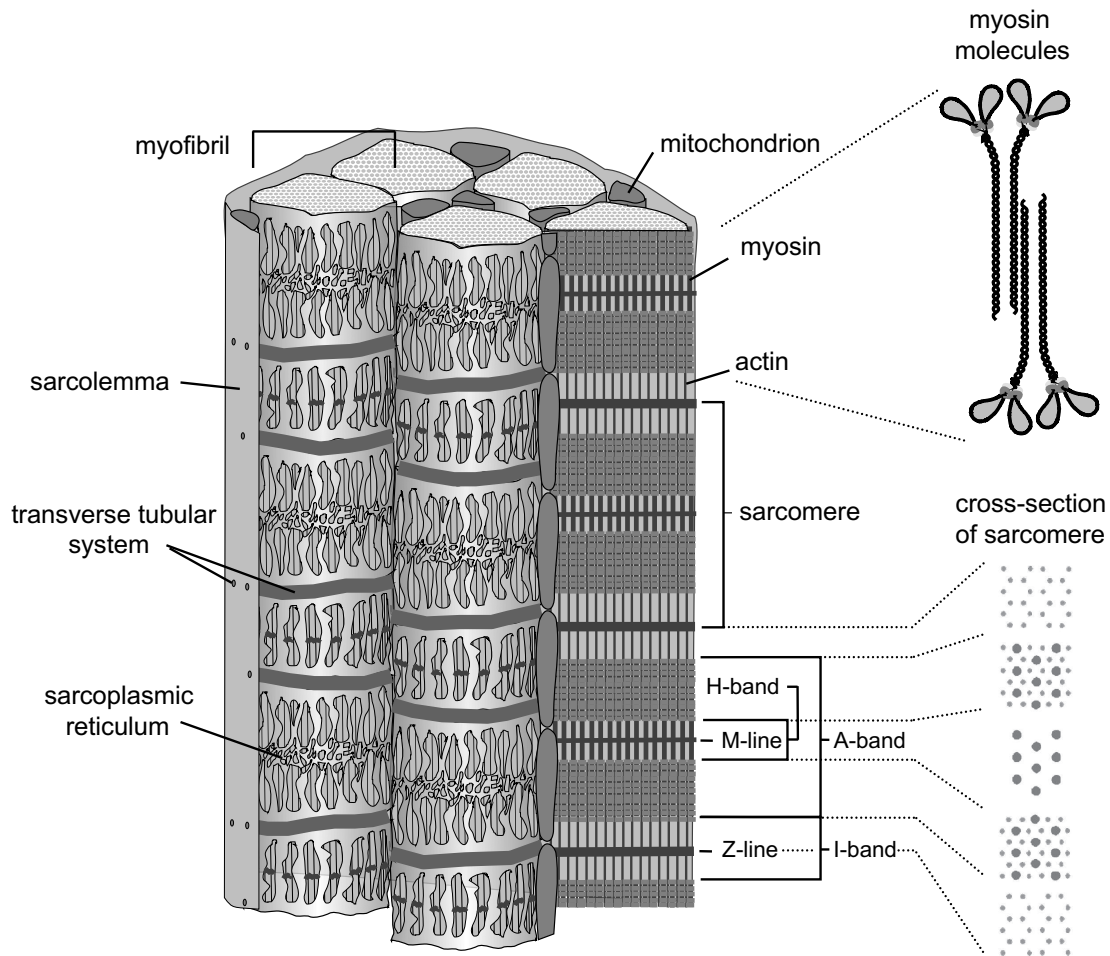


Abbildung 2.1: Aufbau einer Skelettmuskelfaser: Der linke Teil der Zeichnung zeigt den Sarkomer-Aufbau der Faser mit dem transversalen Kanalsystem — *T-Tubuli* — und das daran anschließende eher longitudinal ausgerichtete System des sarkoplasmatischen Retikulums. In der Mitte und rechts ist die Bandenstruktur der Faser und ihr molekularer Aufbau aus Proteinfilamenten und ein Querschnitt durch das Sarkomer in den verschiedenen Banden dargestellt [BOTH, VOGEL et al. 2004].

Zusammenhang zwischen makroskopischer Muskelkontraktion und molekularem Kontraktionsmechanismus besonders klar darstellen läßt.

Wie jedes Organ besteht ein quergestreifter Muskel aus einzelnen Zellen, den Muskelfasern. Abbildung 2.1 zeigt eine Zeichnung eines Querschnitts durch eine solche Faser. Die Faser besteht neben anderen Zellorganellen aus den *Myofibrillen*, die für die Kontraktion der Muskelzelle zuständig sind. Myofibrillen sind schlauchartige Gebilde. Sie sind parallel zur Kontraktionsrichtung ausgerichtet

und werden durch die *Z-Linien* — auch *Z-Scheiben* genannt — im regelmäßigen Abstand von $\approx 2,5 \mu\text{m}$ in Untereinheiten geteilt, die *Sarkomere*. Das Gewebe um eine Z-Linie herum erscheint im Lichtmikroskop hell und dreht polarisiertes Licht nicht. Es handelt sich also um optisch *isotropes* Material, man nennt den Bereich daher *I-Bande*.

Zwischen jeweils zwei I-Banden liegt dunkler erscheinendes, Licht drehendes Gewebe. Dieser optisch *anisotrope* Bereich heißt *A-Bande*. In der Mitte jeder A-Bande, also in der Mitte jedes Sarkomers, hebt sich wiederum ein etwas hellerer Bereich ab, die sogenannte *H-Bande*. In dessen Mitte schließlich kann man, allerdings nur mit elektronenmikroskopischen Verfahren, eine sehr dunkle, sehr schmale Linie beobachten, die *M-Linie*. Es sei hier bereits darauf hingewiesen, dass sich diese Struktur auch mit der sogenannten „second harmonic generation“ abbilden läßt [BOTH, VOGEL et al. 2004]. Versuche hierzu werden in Kapitel 11 vorgestellt.

Zwei weitere wichtige Strukturen in der Muskelfaser sind das System der transversalen Kanäle — in Abbildung 2.1 mit *T-Tubuli* bezeichnet — und das *sarkoplasmatische Retikulum* oder *SR*. Die T-Tubuli sind röhrenförmige Einstülpungen der Zellmembran in das Innere der Faser mit einem Durchmesser von $\approx 50 \text{ nm}$. Sie verlaufen meist senkrecht zur Faserachse (daher *transversal*) und treten in Höhe der Z-Scheibe beziehungsweise I-Bande auf.

In Faserrichtung, also senkrecht zu diesem transversalen Röhrensystem, findet man ein weiteres Schlauchsystem, das sarkoplasmatische Retikulum. Es liegt mit seinen abschließenden Bläschen, den *terminalen Zisternen*, an der Innenseite der Membran der T-Tubuli an. Im Gegensatz zu den T-Tubuli ist das SR aber nicht direkt mit dem Zellaußenraum verbunden. Es dient der Zelle als Kalziumspeicher.

2.1.2 Molekulare Bestandteile des Skelettmuskels

Die Bandenstruktur der Muskelfaser ergibt sich aus ihrem Aufbau, der im wesentlichen aus zwei Proteinfilamenten besteht: Die H-Bande beidseits der M-Linie besitzt ≈ 1000 sogenannte „dicke“ Filamente mit je einem Durchmesser von $\approx 10 \text{ nm}$, die aus dem Protein *Myosin* zusammengesetzt sind. Diese Myosinfilamente sind an einem Proteingerüst in der M-Linie befestigt, das hauptsächlich aus Myomesin besteht.

Das Myosin selbst wurde bereits 1864 von Willy Kühne entdeckt [KÜHNE 1864]. 1943 jedoch entdeckte F.B. Straub, dass das Kühnesche „Myosin“ tatsächlich aus zwei Proteinen besteht, dem eigentlichen Myosin und dem Protein *Aktin* [STRAUB 1943]. Die I-Bande setzt sich aus etwa 2000 parallel ausgerichteten Filamenten zusammen, die $\approx 5 \text{ nm}$ dick und $\approx 1 \mu\text{m}$ lang sind und beidseits der

Z-Linie borstenartig abstehen. Diese *dünnen* Filamente bestehen hauptsächlich aus polymerisiertem Aktin, das an der Z-Scheibe befestigt ist. Der dunkle Bereich der A-Bande entsteht durch die Überlappung von dünnen und dicken Filamenten in dieser Region, vergleiche die Querschnittszeichnung aus Abbildung 2.1.

Die Myofibrillenstruktur wird zusätzlich stabilisiert, da die dicken Myosinfilamente durch ein weiteres dehnbare Protein, das *Titin*, elastisch mit der Z-Scheibe verbunden sind. Titin wurde erst 1977 von K. Maruyama entdeckt [MARUYAMA et al. 1977a, MARUYAMA et al. 1977b, MARUYAMA et al. 1977c]. Es ist ein sehr großes Protein mit einer Masse von $\approx 3.000.000 - 3.700.000$ atomaren Masseneinheiten — zum Vergleich: g-Aktin und Myosin haben Massen von ≈ 42.000 bzw. ≈ 510.000 atomaren Masseneinheiten [HESCHELER und HIRCHE 1999].

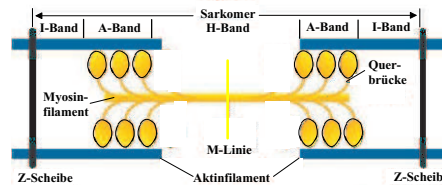
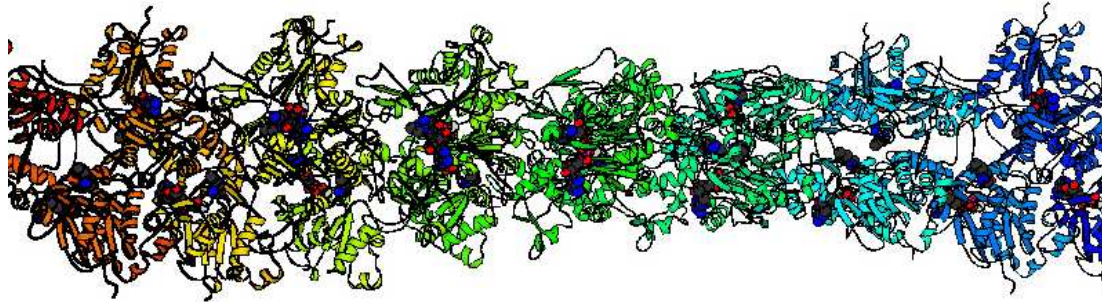


Abbildung 2.2: Aufbau der Filamentstruktur und der sich daraus ergebenden Bandenstruktur. Die H-Bande ist in Wirklichkeit deutlich kleiner, da hier exemplarisch nur wenige der tatsächlich vorhandenen Querbrücken eingezeichnet sind. Verändert nach C. Rüegg [RÜEGG 1995].

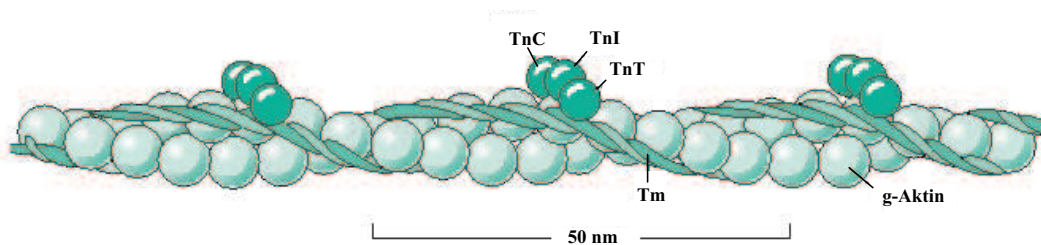
Abbildung 2.2 zeigt einen Ausschnitt aus der Filamentstruktur der Muskelfaser. Das dünne Aktinfilament ist allerdings nur schematisch angedeutet. Seine tatsächliche Struktur wird in Abbildung 2.3 dargestellt. Das dünne Filament besteht aus globulären Aktin-Monomeren, *g-Aktin*-Molekülen, die zu einer helikalen Struktur polymerisieren. Entgegen dem Augenschein handelt es sich hier allerdings nicht um eine Doppelstrangstruktur, in der zwei „Perlenketten“ umeinander gewunden sind: Jeweils 13 aufeinanderfolgende Peptide führen sechs Umdrehungen um die Polymerachse aus, was zu dem genannten Eindruck führt [HOLMES et al. 1990].

Das Polymer heißt entsprechend seiner Filamentstruktur *F-Aktin*. In der „Rille“ zwischen den „Ketten“ liegt ein weiteres Proteinpolymer, das *Tropomyosin* — in der Abbildung mit „Tm“ bezeichnet —, das die Aktinfilamentstruktur stabilisiert. An das Tropomyosin ist in regelmäßigen Abständen ein *Troponin*-Molekül gebunden. Das Troponin ist das wichtigste Regulatorprotein im Muskel und besteht aus drei Teilen: *TnT*, das das Troponinmolekül an den Tropomyosinstrang bindet, *TnI*, das als inhibitorische Komponente an Aktin bindet und *TnC* mit einer für den Regulationsprozess wichtigen Ca^{2+} -Bindungsstelle.

Die Struktur des Myosinfilaments ist in den Abbildungen 2.2 und 2.4 dargestellt. Es besteht aus einem Bündel von etwa 300-400 Myosindimeren. Eines



(a) Atommodell des F-Aktins, gewonnen aus Strukturdaten des g-Aktins [KABSCH et al. 1990] und aus Röntgenstrukturanalysen an F-Aktin [HOLMES et al. 1990, LORENZ et al. 1993]



(b) Aufbau des Aktinfilaments [HESCHELER und HIRCHE 1999]

Abbildung 2.3: Modell des Aktin-Filaments: In Panel (a) ein mit dem Programm MOLSCRIPT [KRAULIS 1991] erzeugtes Strukturbild des F-Aktin-Polymers. In Panel (b) die entsprechende Darstellung des Aufbaus eines Aktinfilaments. Zusätzlich sind hier die Proteine Troponin und Tropomyosin abgebildet.

dieser Dimere wird in Abbildung 2.6 gezeigt. Im Gegensatz zu Aktin gibt es viele verschiedenartige Myosine, die in einer Superfamilie zusammengefasst werden [HODGE und COPE 2000], die in Abbildung 2.5 dargestellt ist.

Das im Säugerskelettmuskel auftretende Myosin-II besteht aus zwei identischen Myosinmonomeren, die sich jeweils aus einer *schweren Kette* und zwei verschiedenen *leichten Ketten* zusammensetzen. Die C-terminalen Teile der schweren Ketten — dort befindet sich der Säurerest COOH — sind umeinandergewunden und bilden einen ca. 130 nm langen Schwanz, eine sogenannte „supercoil“. Dieser Teil wird auch mit *LMM*, „light meromyosin“, bezeichnet. Die N-terminalen Teile der schweren Peptidketten mit dem Basenrest NH₂ werden entsprechend *HMM*, „heavy meromyosin“ genannt. Sie bilden, immer noch umeinandergewunden, die (untere) Halsregion — „S2-Region“ —, trennen sich schließlich auf und

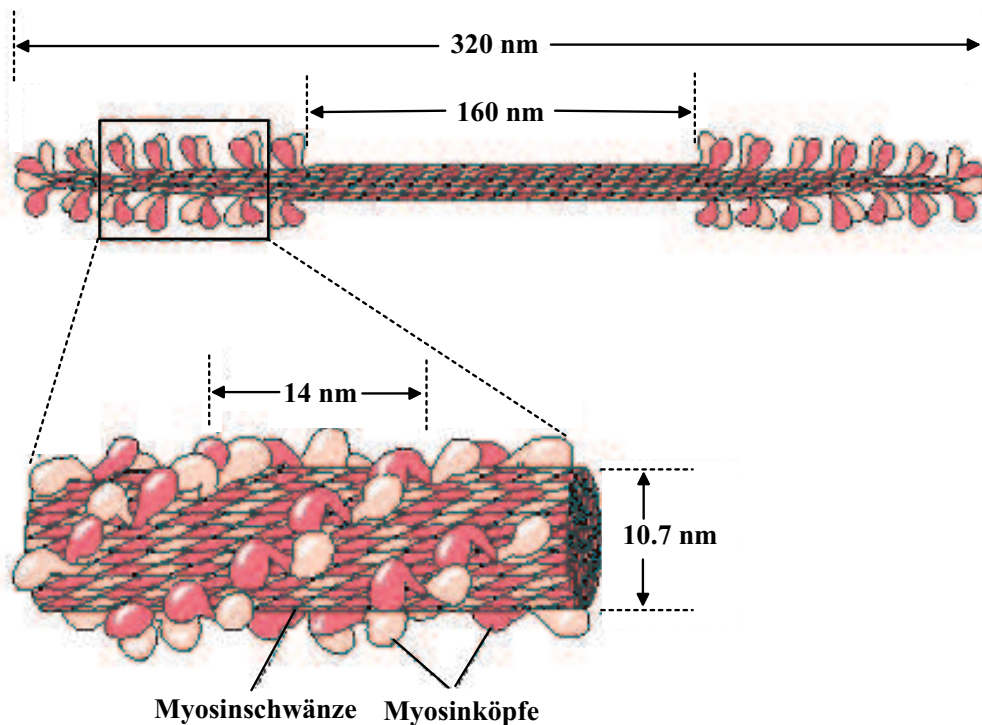


Abbildung 2.4: Aufbau des Myosinfilaments aus Myosindimeren, der Ausschnitt unten zeigt die aus dem Filament herausragenden Myosinköpfe [HESCHELER und HIRCHE 1999].

bilden zwei Kopfreionen, die „S1-Regionen“ genannt werden. Der S1-Teil selbst besteht aus einem globulären Kopf, der Bindungsstellen für Aktin besitzt und als katalytischer Bereich zur Spaltung von ATP dient. Zwischen globulärem Kopf und der S2-Region befindet sich die (obere) Halsregion, die von der helikalen schweren Kette und den beiden leichten Ketten „LK-1“ und „LK-2“ — auch „essential“ und „regulatory light chain“ genannt — gebildet wird. Die Regionen S1, S2 und die „supercoil“ sind durch zwei flexible Regionen verbunden.

Das LMM von jeweils 300-400 Myosindimeren lagert sich im Myosinfilament zu einem ca. 10 nm dicken Bündel zusammen, wobei die Kopfreionen jeweils an den beiden Enden des Filaments aus dem Bündel herausragen, siehe Abbildung 2.4. Dabei sind die Köpfe nicht zufällig, sondern schraubenförmig mit einer Ganghöhe von ca. 14 nm angeordnet. Man nennt die Köpfe auch *Querbrücken*, da sie die zueinander parallelen dünnen und dicken Filamente durch chemische Bindung verbinden können, siehe Abbildung 2.2. Dass ein Myosinkopf an das Aktin binden kann, ist eine wesentliche Voraussetzung für die Eigenschaft von Muskeln, sich zusammenziehen zu können.

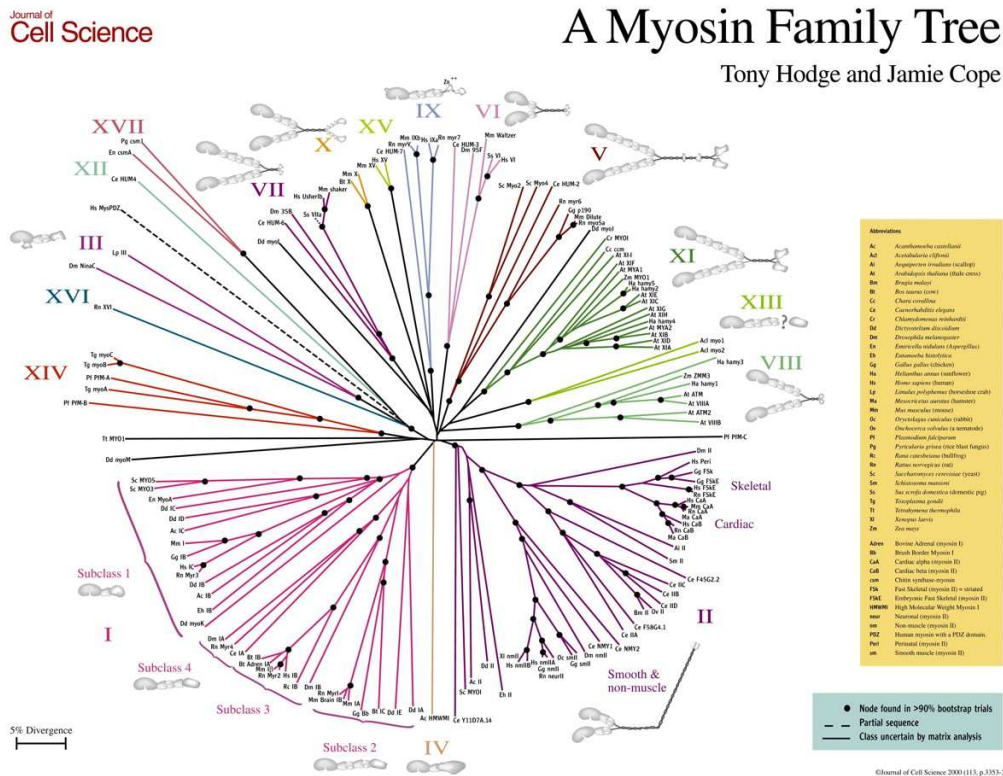


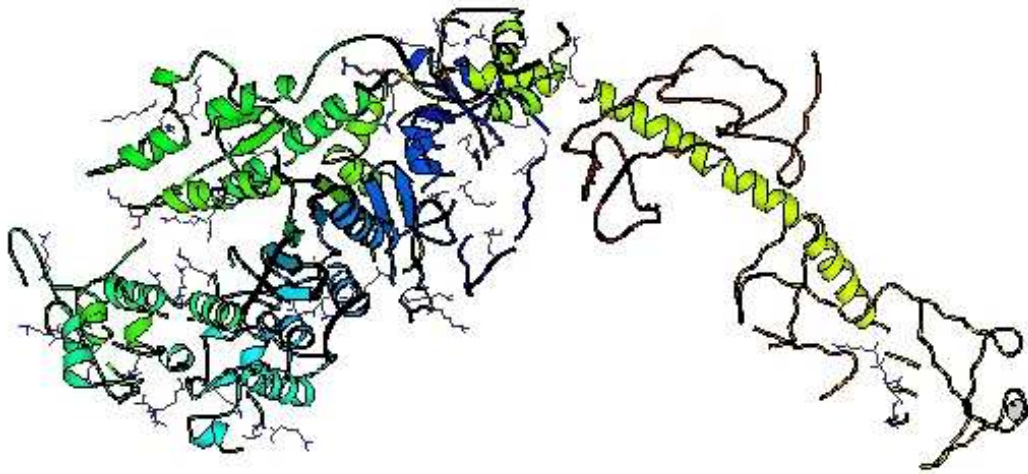
Abbildung 2.5: „Stammbaum“ der Superfamilie der Myosine [HODGE und COPE 2000].

2.2 Kontraktion des Skelettmuskels

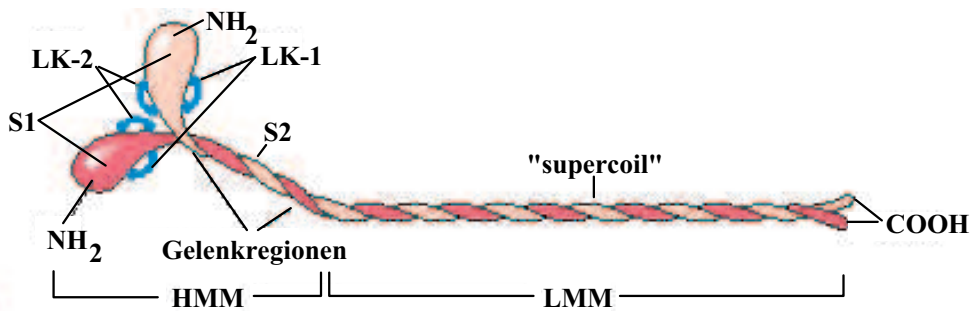
2.2.1 Der Mechanismus der Muskelkontraktion

Im Ruhezustand ist die Muskelzelle keineswegs inaktiv, da wichtige Transportvorgänge an Membranen zur Aufrechterhaltung der Ionengradienten ablaufen müssen. Sogenannte Ionenpumpen verschieben ständig Ionen durch die Zellmembran. Da dies gegen den Gradienten der Ionenkonzentration geschieht, baut sich über der Zellmembran eine elektrische Spannung von ≈ -90 mV auf. Es ist dabei Konvention, das Potential im extrazellulären Raum auf 0 mV festzulegen. Dieser Ionenpumpvorgang verbraucht Energie und stellt einen Teil des „Leerlauf“-Energieverbrauchs dar. Die Aufrechterhaltung der Ionengradienten ist jedoch Grundlage für die Erregbarkeit der Muskelzelle und damit auch Voraussetzung für die Fähigkeit zur gesteuerten Kontraktion.

Die eigentliche Aufgabe des Skelettmuskels ist jedoch die Verrichtung von



(a) Atommodell der S1-Region, gewonnen aus einer Röntgenstrukturanalyse an einem Kristall aus S1-Subdomänen [RAYMENT et al. 1993]



(b) Aufbau eines Myosindimers [HESCHELER und HIRCHE 1999]

Abbildung 2.6: Modell eines Myosindimers: In Panel (a) ein mit dem Programm MOLSCRIPT [KRAULIS 1991] erzeugtes Strukturbild der S1-Untereinheit, eines Myosinkopfes. In Panel (b) die entsprechende Prinzipzeichnung eines Myosindimers, bestehend aus *HMM* und *LMM*.

mechanischer Arbeit, das heißt, er muss Massen gegen den Widerstand äußerer Kräfte beschleunigen, also selbst eine Kraft auf diese Massen ausüben können. Diese Kraft wird durch die Kontraktion des Muskels aufgebracht. Die Kontraktion des Muskels wiederum wird durch Nervenreize initiiert, die an der motorischen Endplatte — dort befindet sich die „Schnittstelle“ von Nerv und Muskel — auftreten.

Durch diese Reize werden Botenstoffe ausgeschüttet, die die Eigenschaften

von Ionenkanälen in der Muskelzellmembran, insbesondere ihre Leitfähigkeit, beeinflussen. Auf diese Weise verändert sich das Membranpotential, was, sobald eine gewisse Schwelle überschritten wird, im Zusammenspiel mit spannungsabhängigen Kanälen zu einem sogenannten *Aktionspotential* führt. Im Verlauf dieses Aktionspotentials erreicht die lokale Membranspannung einen Maximalwert von etwa $\approx +30$ mV, bevor sie sich nach einer Hyperpolarisation, einem leichten Ausschlag unter das Ruhenniveau, wieder auf letztgenanntes einstellt.

Dieses Aktionspotential ist zunächst eine lokale Erscheinung. Jedoch werden auch in der näheren Umgebung der Reizstelle Membranströme verändert, so dass dort ebenfalls eine Umpolarisation der Membranspannung auftritt: Das Aktionspotential breitet sich als „selbsterhaltende Spannungsstörung“ mit einer Geschwindigkeit von ≈ 2 m/s über die Zellmembran aus und gelangt über die T-Tubuli, die ja kanalförmige Einstülpungen der äußeren Zellmembran sind, vergleiche Kapitel 2.1.1, in das Zellinnere.

In der Umgebung der Terminalzisternen verändert das Aktionspotential die Konformation eines spannungsabhängigen Kalziumionenkanals — des *Dihydropyridinrezeptors* —, der durch seine Konformationsänderung einen weiteren Kalziumkanal — den *Ryanodinrezeptor* — in der Membran des SR öffnet: Kalziumionen gelangen aus dem Kalziumspeicher SR in das Zellinnere und erhöhen die intrazelluläre Kalziumkonzentration von 10^{-7} mol/l auf 10^{-5} mol/l. Man beobachtet in der Folge eine Kontraktion der Muskelzelle. Diese Umsetzung von elektrischem Signal in eine Kontraktionsantwort nennt man *elektromechanische Kopplung* oder *excitation contraction coupling*, *EC-coupling*.

Bei der Kontraktion bleibt die Länge der A-Bande unverändert, die H- und I-Bande verkürzen sich. Man sieht anhand der Abbildung 2.1, dass eine Kontraktion einem Ineinandergleiten der dünnen und dicken Filamente entspricht, daher nennt man die theoretische Beschreibung dieses Kontraktionsmodell auch *Gleitfilamenttheorie* [HUXLEY und HANSON 1954].

Da in der Membran des SR ständig Kalziumpumpen aktiv sind, die die Ca^{2+} -Ionen zurück ins SR pumpen, sinkt bei Ausbleiben von weiteren Reizen der Kalziumspiegel im Zellinneren wieder, die Kontraktionstätigkeit wird beendet. Außer Kalzium muss, neben anderen Ionen und Molekülen, für eine Kontraktion vor allem ATP — *Adenosin-Triphosphat* — im Zellinneren vorhanden sein. Es dient dem Myosin als Energielieferant für das von Aktin und Myosin bewirkte Ineinandergleiten der Filamente.

2.2.2 Molekulares Modell der Muskelkontraktion

Die grundlegenden Prozesse, die bei der Kalzium-gesteuerten Kontraktion ablaufen, sind trotz intensiver Forschung noch nicht vollständig verstanden. Daher beschreibe ich hier den Stand der Forschung und die Modelle, mit denen heute der Kontraktionsvorgang beschrieben wird.

Nach der Gleitfilamenttheorie kann eine Kontraktion darauf zurückgeführt werden, dass dicke und dünne Filamente in Wechselwirkung zueinander treten und dabei ineinandergleiten. Die wichtige Frage ist nun, durch welche molekularen Reaktionen dieses Ineinandergleiten verursacht wird. Da man zwischen den beiden Filamenten die oben erwähnten Querbrücken erkennen konnte, die die beiden Filamente zum Beispiel in der Totenstarre — *Rigor*zustand — zusammenhalten, lag es nahe, die Kontraktion einer Veränderung von Querbrückeneigenschaften zuzuordnen. Ein Vorschlag war, dass sich die Querbrücken, wenn sie an das Aktinfilament gebunden sind, an einigen Punkten zusammenfallen und dadurch verkürzen [DAVIES 1963].

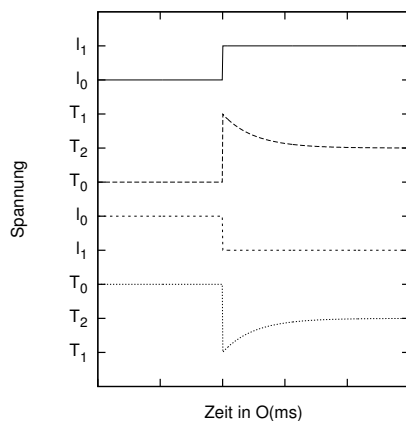


Abbildung 2.7: Spannungsänderung nach Längenänderung an einer Muskelfaser: Ganz oben und zweitunterst die Länge der Faser als Funktion der Zeit, einmal mit abrupter Verlängerung, einmal mit Verkürzung. Darunter jeweils die in der Faser herrschende Spannung. Schematisch nach Huxley und Simmons [HUXLEY und SIMMONS 1971].

Filamentabstand — immer im gleichen Winkel an das Aktinfilament heranfahren.

Eine der ersten Ideen zur bis heute bestätigten und nur leicht modifizierten Theorie der Muskelkontraktion stammen jedoch von H.E. Huxley [HUXLEY 1969]: Das Problem bestand darin, dass Muskelfasern relativ unabhängig vom Abstand der Filamente eine konstante Kraft erzeugen. Damit sollten sich die Bindungen zwischen Myosinkopf S1 und Aktin — und damit auch die Bindungswinkel — bei variablen Filamentabständen nicht sehr unterscheiden.

Huxley löste dieses Problem, in dem er postulierte, dass die Querbrücke außer einem globulären Kopf auch einen geradlinigen Anteil enthält — in Abbildung 2.6 mit „S2“ bezeichnet —, der mit beweglichen Regionen am dicken Filament und dem Myosinkopf befestigt ist. Damit kann dieser „Hals“ den Kopf — unabhängig vom

Bindet der Myosinkopf an das Filament, so wird nach Huxley eine Konformationsänderung des Kopfes hervorgerufen. Er kippt, immer noch fest an das Aktin gebunden, in Kontraktionsrichtung und zieht die Filamente aneinander vorbei. Der gerade Halsteil bleibt dabei starr und überträgt nur die Kraft auf das Myosinfilament. Da die Länge dieses „Ruderschlags“ nur in der Größenordnung der Abmessungen des Myosinkopfes sein kann — also einige Nanometer — und das Sarkomer sich bei einer Kontraktion aber um mehrere 100 nm verkürzen kann, muss sich dieser Vorgang zyklisch wiederholen. Dabei löst sich der Myosinkopf vom Aktin, dockt wieder an, entwickelt Kraft, löst sich wieder ab usw. . . .

Eine mechanische Erweiterung zu diesem Modell lieferten Huxley und Simmons [HUXLEY und SIMMONS 1971]: Sie machten Versuche mit Muskelfasern, die mit einer Vorspannung T_0 an beiden Enden mechanisch eingespannt waren. Da sich die Faser dabei im Gleichgewicht befindet, zieht sie nach dem dritten Newtonschen Axiom auch mit der Kraft T_0 an ihren Befestigungen. Dann wurde die Änderung der Spannung in der Faser gemessen, wenn man ihre Länge l_0 wenig, aber abrupt nach l_1 ändert. Bei einer Verlängerung der Faser nahm die Spannung zunächst schnell bis zu einem Spitzenwert T_1 zu, um dann wieder exponentiell auf einen Wert T_2 abzufallen, der zwischen T_0 und T_1 lag. Entsprechend fiel die Spannung bei einer Faserverkürzung schnell auf einen Wert T_1 ab und stieg dann wieder exponentiell bis zu einem größeren Endwert T_2 an. Abbildung 2.7 illustriert diesen Sachverhalt.

Huxley und Simmons erklärten dieses Verhalten mit einer Serienschaltung von einem ungedämpften, federähnlichen Element und einem gedämpften Federelement in der Querbrücke. Das ungedämpfte Element reagiert auf eine Längenänderung quasi instantan und sollte durch die Elastizität des Halses S2 realisiert sein. Das gedämpfte, exponentielle Verhalten erklären sie dadurch, dass die Myosinköpfe Ruderschläge ausführen, das heißt, sie ändern ihren Zustand von „vor Ruderschlag“ in „nach Ruderschlag“, wobei eventuell Zwischenzustände durchlaufen werden. Die Übergangsraten zwischen diesen Zuständen nehmen sie proportional zu einem Boltzmannfaktor $\exp(\Delta E/k_B T)$ an und erhalten so ein exponentielles Zeitverhalten des Querbrückenensembles beim Spannungsausgleich zwischen den beiden Elementen. Allerdings ergaben sich aus dem Modell einige Diskrepanzen, zum Beispiel eine zu hohe Anzahl an Myosinmolekülen, wenn man das Modell mit Werten aus Kraftmessungen an Muskelfasern verglich oder ein zu kleiner Energieumsatz, wenn man Werte aus kalorischen Messungen heranzog.

Es ist interessant, dass diese Schwierigkeiten vermindert werden können, wenn man das Modell etwas erweitert: G. Piazzesi und V. Lombardi zum Beispiel stellten ein Modell auf, in dem eine Querbrücke *innerhalb* des „langsamen“ Huxley-Simmons-Ruderschlags auch „schnelle“ krafterzeugende Konformationsänderungen

gen durchführen kann [PIAZZESI und LOMBARDI 1995]: Die Querbrücke bindet innerhalb eines vollständigen Ruderschlages mehrmals schnell an das Aktinfilament und löst sich wieder ab. Damit erhöht sich die effektive Anzahl der Interaktionen und damit auch die effektive Anzahl der Moleküle, wenn man je Molekül nur eine Interaktion zählt. Außerdem steigt der Energieumsatz. Allerdings ist dies nur ein mechanisches Modell, das keine Verbindungen zu den biochemischen Vorgängen herstellt. Insbesondere sagt es nichts darüber aus, wie die „schnellen“ Ruderschläge vom Myosinmolekül realisiert werden.

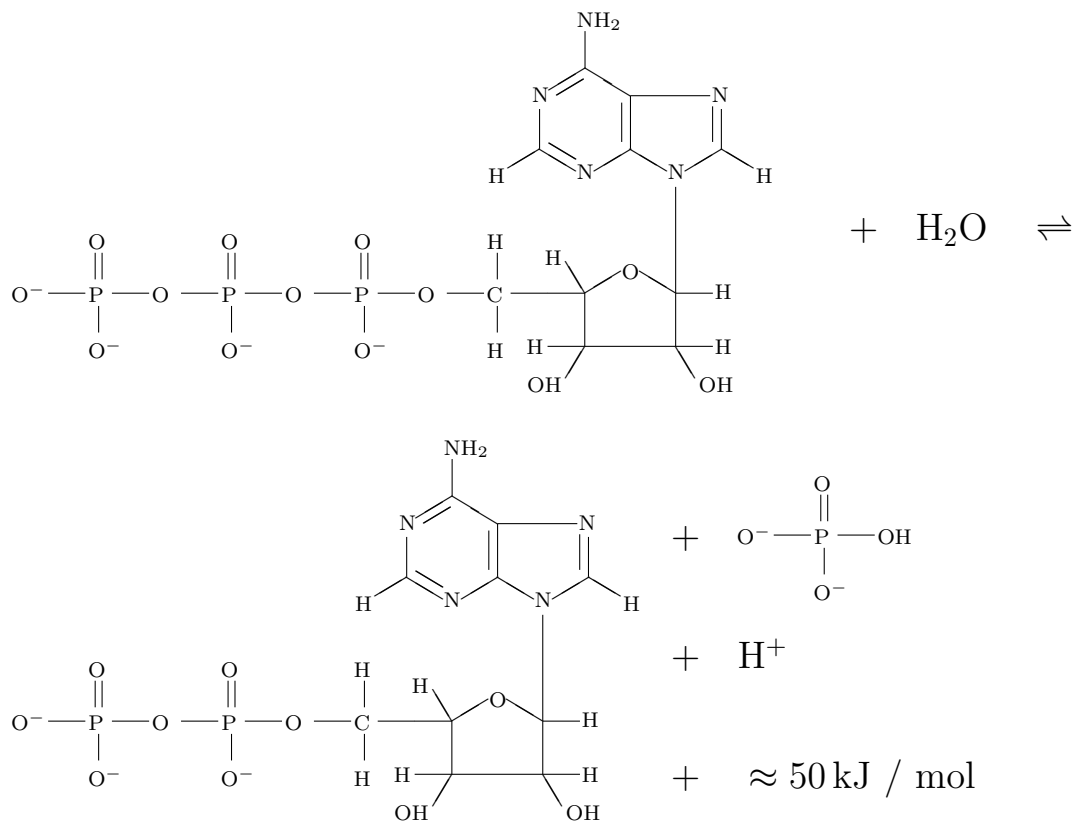
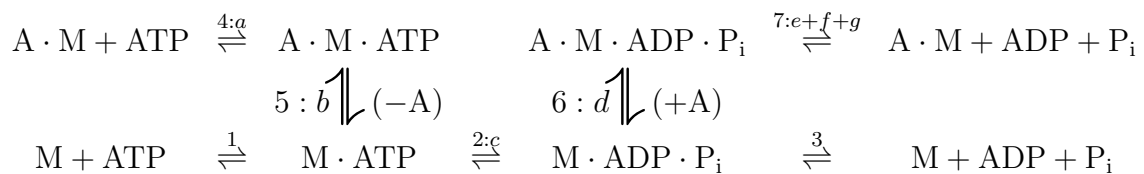


Abbildung 2.8: Die Hydrolyse von ATP (Adenosinphosphat) [BERG et al. 2002]: ATP gibt unter Energieabgabe ein Orthophosphat ab und wird zu ADP (Adenosin \ddot{a} phosphat). Die freie Energie dieser Reaktion ist nicht konstant, sondern hängt von den Konzentrationen der beteiligten Stoffe ab. Für typische physiologische Konzentrationen, ist die freie Energie, wie dargestellt, $\approx 50 \text{ kJ/mol}$ [COOKE 1997].

Eine erste vollständige biochemische Beschreibung des Querbrückenzyklus stammt von R.W. Lymn und E.W. Taylor [LYMN und TAYLOR 1971]. Dabei

spielt die in Abbildung 2.8 dargestellte Hydrolyse von ATP als energieliefernde Reaktion eine wichtige Rolle. ATP gehört, wie auch ADP, zur Stoffgruppe der Nukleotide. Charakteristisch für die Struktur der Nukleotide sind ein Zuckergerüst — hier die Pentose *Ribose* —, eine Purin- oder Pyrimidinbase — hier *Adenin* — und eine Phosphateinheit. Die negativen Ladungen an der Phosphateinheit sind mit ein Grund für die große Menge freiwerdender Energie bei der Hydrolyse, da durch die Abspaltung eines Phosphats die elektrostatische Abstoßung verkleinert wird. Daher zerfällt ATP auch sehr schnell und eignet sich nicht als Energiespeicher, wohl aber als Energieüberträger in biologischen Systemen. Ein ruhender Mensch setzt fast 2 kg ATP pro Stunde um [BERG et al. 2002]. Diese Menge kostet, je nach Reinheit, beim Chemikalienlieferanten um die 200000 Euro.

Die folgende Gleichung zeigt die Reaktionen, wie sie nach R. Lymn und E. Taylor im System von Aktin, *Myosin*, *ATP*, *ADP* und Orthophosphat — P_i — ablaufen [LYMN und TAYLOR 1971] :



Die kleinen Buchstaben über den Reaktionspfeilen beziehen sich dabei auf die Reaktionen in Abbildung 2.9. Für die jeweiligen Reaktionsratenkonstanten in Vorwärtsrichtung geben Lymn und Taylor an:

$$\begin{array}{lll}
 k_1 = 2,0 \cdot 10^6 \text{ mol}^{-1}\text{s}^{-1} & k_2 = 100 \dots 150 \text{ s}^{-1} & k_3 = 0,05 \text{ s}^{-1} \\
 k_4 = 1,0 \cdot 10^6 \text{ mol}^{-1}\text{s}^{-1} & k_5 \geq 1000 \text{ s}^{-1} & k_6 = 3,0 \cdot 10^6 \text{ mol}^{-1}\text{s}^{-1} \\
 k_7 = 10 \dots 20 \text{ s}^{-1} & &
 \end{array} \quad (2.1)$$

Die Reaktion $A \cdot M \cdot ATP \longrightarrow A + M \cdot ATP$ läuft so schnell ab, dass die Reaktionskonstante damals, 1971, nicht genau gemessen werden konnte. Ein neuerer Wert ist $k_5 = 1000 \dots 2000 \text{ s}^{-1}$ [WHITE et al. 1997]. Man sieht daran, dass eine eventuelle Bindung von Aktin und Myosin sofort gespalten wird, sobald ATP an das Aktomyosin gebunden hat. Die Spaltung des ATP findet am *freien* Myosin statt (Schritt 2) — Myosin ist daher eine *ATPase* —, die Spaltungsprodukte ADP und Phosphat bleiben jedoch (schwach) am Myosin gebunden und verhindern so zunächst die weitere Spalttätigkeit des Myosins. Ist jedoch Aktin vorhanden, so sieht man durch Vergleich des Schrittes 3 mit Schritt 7 — Schritt 6 erfolgt so schnell, dass er im Vergleich zu Schritt 3 und 7 als instantan betrachtet werden

kann — , dass die Freigaberate von ADP und P_i durch die Bindung des Myosin-ADP-Phosphat-Komplexes an das Aktin um das $k_7/k_3 \approx 200$ -fache gesteigert wird. Aktin aktiviert also die Myosin-ATPase-Tätigkeit deutlich, allerdings nicht die ATP-Spaltung, sondern die Produkt-Freigabe.

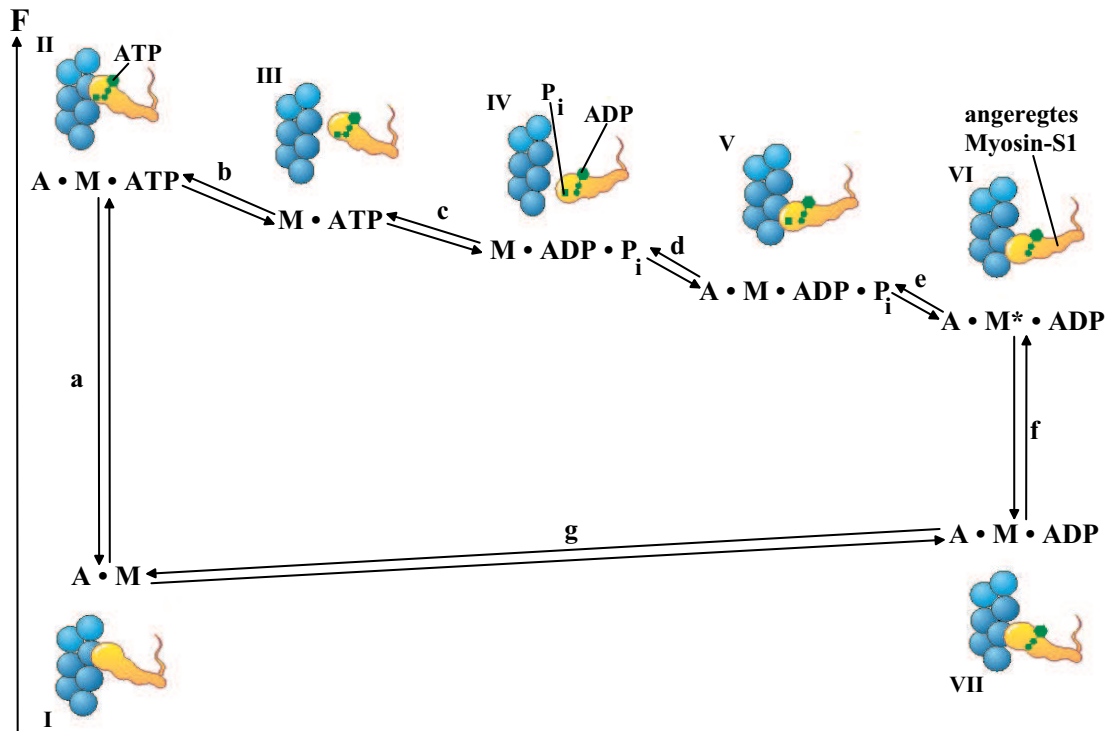


Abbildung 2.9: Arbeitszyklus des Aktin-Myosin-Systems: Dargestellt sind einzelne Konformationen und die dazu passenden Bindungszustände für einen Umlauf, der mit dem Verbrauch eines ATP-Moleküls einhergeht. Die Quasi-Gleichgewichtszustände sind nach oben hin bezüglich ihrer freien Energie angeordnet (nicht maßstäblich!). Man beachte vor allem Schritt f, der mit einem großen Abfall der freien Energie verbunden ist und dem man die eigentliche Krafterzeugung zuordnet. Der ganze Zyklus wird zeitlich in der Größenordnung von ≈ 200 ms durchlaufen. 40% der Zeit sind Aktin- und Myosin verbunden und erzeugen Kräfte in der Größenordnung von 5 – 10 pN. Erstellt nach Vorlagen von Roger Cooke und Caspar Rüegg [COOKE 1997, RÜEGG 1995].

Eine Zuordnung der einzelnen biochemischen Zustände zu bestimmten Konformations- und Bindungszuständen ist in Abbildung 2.9 dargestellt. Von besonderem Interesse an diesem Zyklus ist die Umwandlung von chemischer Energie in mechanische Arbeit. Daher sind die Zustände nach oben hin bezüglich ihrer freien Energie angeordnet, da die freie Energie als thermodynamisches Potential die

maximal mögliche Arbeitsleistung eines Systems zwischen zwei Gleichgewichtszuständen angibt [GERTHSEN und VOGEL 1993].

Der Arbeitszyklus des Aktin-Myosin-Systems beginnt links unten mit dem sogenannten *Rigor*-Zustand (Zustand I). Dieser tritt ein, wenn das ATP-Molekül gespalten und die Spaltprodukte freigegeben worden sind. Aktin und Myosin sind dabei fest aneinander gebunden. Dies entspricht auch dem Zustand in der Totenstarre, da das ATP in abgestorbenem Gewebe schnell zerfällt.

Die Bindung von ATP an die katalytische Domäne des Myosins aktiviert den Arbeitszyklus (Zustand II). Die Bindung von ATP führt sofort zur Abspaltung des Myosins vom Aktin (Zustand III). Dieser und der folgende Zustand liegen im entspannten Muskel vor, da nur in diesen beiden Zuständen keine Verbindung zwischen den Filamenten besteht und die Muskelstruktur dadurch relativ leicht dehnbar ist.

Die Hydrolyse des ATP am Myosin führt zu einer Konformationsänderung des Myosinkopfes (Zustand IV), wobei die Hydrolyseprodukte ADP und P_i zunächst schwach am Myosin gebunden bleiben. Es wird vermutet, dass diese Konformationsänderung des Myosins — sie stellt die Umkehrung des Ruderschlages dar — aus einer Drehung des globulären Kopfes besteht. Diese Drehung soll um den als Scharnier wirkenden Übergangspunkt von globulärem Kopf und oberer Halsregion stattfinden, die als Hebelarm die auftretenden Drehmomente über die steife Halsregion S2 auf das Myosinfilament überträgt. Daher nennt man diese Verfeinerung des Ruderschlagmodells von Huxley auch „swinging neck-lever model“ [UYEDA et al. 1996]. Es wird auch angenommen, dass während der Drehung des Myosinkopfes federähnliche Elemente im Kopf gespannt werden, die dann im eigentlichen Ruderschlag wieder entspannt werden [COOKE 1997]. Zu diesem Bild passt auch, dass das Scharnier eventuell das von Huxley und Simmons postulierte ungedämpfte Federelement enthält [UYEDA et al. 1996].

Dieses veränderte Myosin ist in der Lage, *schwach* an das Aktin zu binden (Zustand V). Dazu muss allerdings erst eine Bindungsstelle am Aktinfilament verfügbar sein. Dies ist erst dann der Fall, wenn, durch eine Ca^{2+} -Bindung an das oben erwähnte Troponin-C- der gesamte Tropomyosinkomplex etwas aus der Filamentrille geschoben wird, vergleiche Abbildung 2.10. Sinkt der Kalziumspiegel in der Muskelzelle wieder, gehen wieder vermehrt Kalziumionen in Lösung, reduzieren so die Anzahl der Myosinbindungsstellen und der Muskel entspannt sich. Ohne diese Kalzium-gesteuerte Regulation der Kraftentwicklung befände sich der Muskel in einem dauerhaften Krampfzustand.

Das Aktin wirkt bei der Bindung des Myosin-ADP- P_i -Komplexes als Katalysator für die Phosphatfreigabe. Das Aktomyosin bleibt in einem angeregten Zustand zurück (Zustand VI). Die Phosphatfreigabe bewirkt, so wird vermutet,

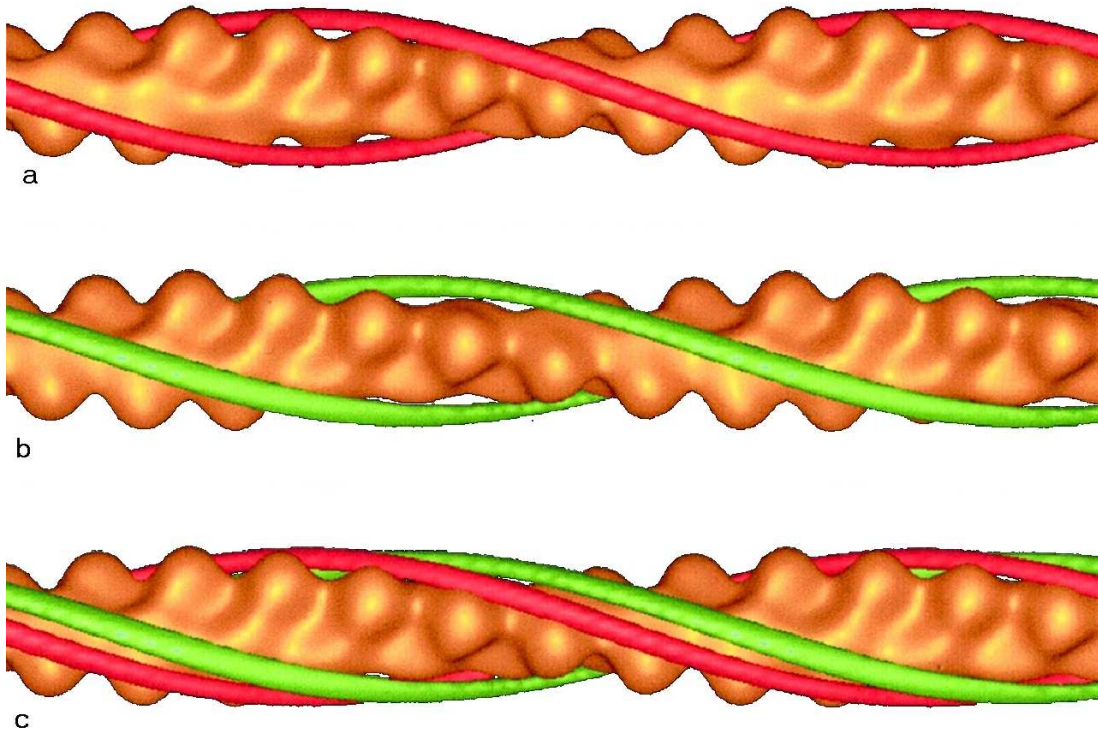


Abbildung 2.10: Verschiebung des Tropomyosins im Aktinfilament bei Ca^{2+} -Bindung: In Position (a) — rot gezeichnet — ist kein Kalzium an den Tropomyosinkomplex gebunden, es versperrt Myosinbindungsstellen. Nach Bindung von Kalzium an Troponin-C wird der gesamte Strang etwas verschoben — Position (b), grün gezeichnet — und gibt Myosinbindungsstellen frei. In Bild (c) sind beide Positionen noch einmal zum Vergleich nebeneinander abgebildet [XU et al. 1999].

kleinere Konformationsänderungen in der katalytischen Domäne, die durch den Hebelarm in eine größere, gerichtete Bewegung umgesetzt werden: Den eigentliche Ruderschlag, der Aktin- und Myosinfilament gegen den Widerstand einer äußeren Kraft verschiebt.

Das Hebelarm-Modell wird dadurch gestützt, dass die Geschwindigkeit der gegenläufigen Bewegung der Filamente bei gleichbleibendem Drehwinkel direkt proportional zur Länge des Hebelarms sein muss. Man hat dies mit Myosinen nachgewiesen, bei denen man die obere Halsregion künstlich verlängert oder verkürzt hat [UYEDA et al. 1996]. Es ist interessant, dass auch die komplette Ersetzung des Hebelarms durch künstliche „Prothesen“ mit ähnlichen *mechanischen* Eigenschaften die Krafterzeugung nicht beeinflusst [ANSON et al. 1996]. Der Hebelarm scheint also keinen Einfluß auf die Reaktionskinetik zu haben und dient

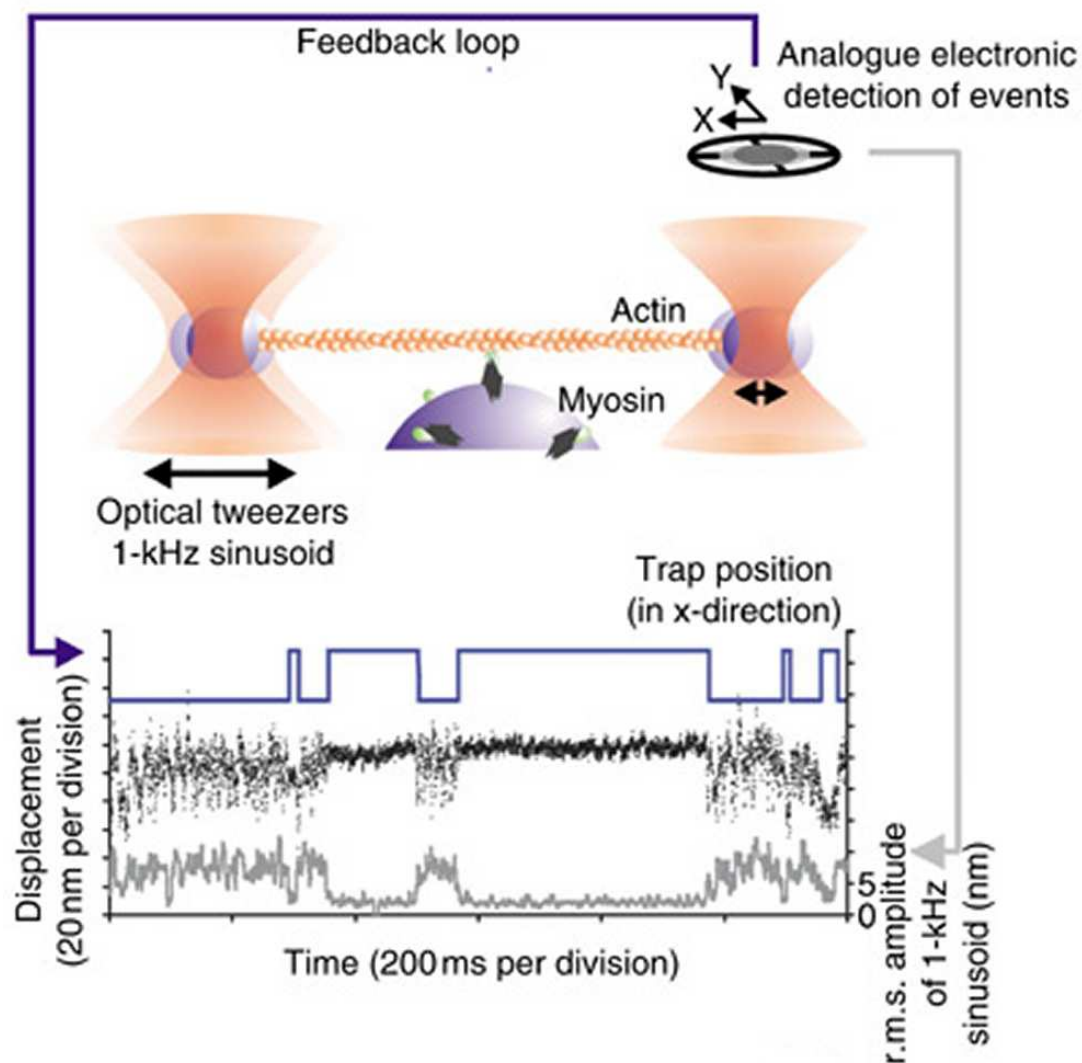


Abbildung 2.11: Illustration einer 3-Bead-Messkonfiguration zur Untersuchung der Einzelmolekül-Aktin-Myosin-Wechselwirkung [VEIGEL et al. 2003].

nur als mechanische Kopplung. Allerdings wird dies durch neuere Entdeckungen am Myosin-VI wieder in Frage gestellt, wo es gelang, die Fortbewegungsrichtung des Moleküls durch Austausch des Hebelarms umzukehren [TSAIVALIARIS et al. 2004]. Darüber hinaus konnte nachgewiesen werden, dass auch die S2-Region und das LMM keinen Beitrag zur Kraftentwicklung leisten [TOYOSHIMA et al. 1987].

In diesem Zusammenhang ist interessant, dass die Reaktionskinetik von der am Muskel angreifenden Last abhängen kann („Fenn-Effekt“ [FENN 1923]). Oben wurde erwähnt, wie Huxley und Simmons die Übergangsrate zwischen den Zuständen vor und nach dem Ruderschlag mit einem Boltzmannfaktor

$\exp(\Delta E/k_B T)$ ansetzen, wobei die Energiedifferenz ΔE mit der äußeren Last zusammenhängt. Eine Veränderung der Reaktionskinetik im Muskel bei Lastveränderungen könnte auch durch Kooperationseffekte erklärt werden. Jedoch wurden in neuerer Zeit Messungen an *einzelnen* Myosinmolekülen des glatten Muskels durchgeführt, die eine lastabhängige Reaktionskinetik nachweisen konnten [VEIGEL et al. 2003]: Die Querbrückenbindung bleibt bei hoher Belastung länger bestehen und löst sich bei geringer Belastung schneller.

Nach dem Ruderschlag und der ADP-Freigabe befindet sich das Aktomyosin wieder im Rigor, dem Ausgangszustand. Die Energie für den Ruderschlag gewinnt das Aktomyosin ursprünglich aus der Hydrolyse des ATP. Dieser Prozess findet jedoch nicht gleichzeitig mit dem Ruderschlag statt, so dass die ATP-Hydrolyse als *direkte* Energiequelle nicht in Frage kommt. Weiter oben wurde bereits darauf hingewiesen, dass während der ATP-Hydrolyse federähnliche Elemente im Myosinkopf gespannt werden, die dann während des Ruderschlags entspannt werden und mechanische Arbeit leisten können.

Daneben ist es jedoch auch möglich, dass diese Federelemente hauptsächlich durch die freie Energie gespannt werden, die durch die Verstärkung der Aktin-Myosin-Bindung während des Ruderschlags gewonnen wird [COOKE 1997]. Der Prozeß des Anspannens und Entspannens der Federelemente kann dabei je Ruderschlag mehrmals durchlaufen werden. Das bedeutet auch, dass die vom Myosin entwickelte Kraft nicht unbedingt einem linearen Kraft-Auslenkungsgesetz folgen muss, sondern dass sie in kleineren Portionen entwickelt werden könnte, eventuell verknüpft mit dem oben erwähnten schnellen Lösen und Wiederherstellen des Aktin-Myosin-Komplexes. In diese Richtung weisen Messungen von C. Veigel et al., die, allerdings am Motorprotein Myosin-I — hier entnommen aus Rattenleberpräparaten und dem Bürstensaum von Geflügeldärmen — zwei mechanische Schritte im Krafterzeugungsmechanismus auflösen konnten [VEIGEL et al. 1999].

Meines Wissens bislang unbestätigt sind Messungen von K. Kitamura et al., die am S1-Subfragment des Skelettmuskelsmyosins-II aus Geflügelpräparaten durchgeführt wurden [KITAMURA et al. 1999]. Die Autoren maßen mit Hilfe der TIRF-Mikroskopie und der optischen Pinzette bzw. einem Nadelassay einzelne ATPase-, also ATP-Spaltungsereignisse des Myosins. Dabei stellten sie fest, dass die „working strokes“ von 5,3 nm in Gruppen zu zwei bis fünf Einzelschritten auftreten können, dass allerdings für jede Gruppe nur ein ATPase-Ereignis auftrat. Dies steht natürlich im Widerspruch zum oben beschriebenen Arbeitszyklus des Aktomyosins! Aus diesen Studien heraus entstand die Idee, an unserem geplanten Mikroskopsystem zusätzlich ein TIRF-Modul zu realisieren, welches in Kapitel 9 beschrieben wird. Die Grundlagen der TIRF-Mikroskopie werden im Abschnitt 4.5 beschrieben.

Ähnliche Effekte können auch bei Myosin-V-Molekülen beobachtet werden. Myosin-V besitzt zwei Kopfreionen, die abwechselnd an ein Aktinfilament binden. Myosin-V ist ein sogenannter prozessiver Motor, der in der Lage ist, sich entlang eines Aktinfilamentes fortzubewegen [MEHTA et al. 1999]. Er wird in der Natur zum Beispiel für Vesikeltransporte eingesetzt. Die Schrittweite von ≈ 36 nm ist auf die räumliche Frequenz der „helikalen“ Aktinfilamentstruktur abgestimmt. Es zeigt sich jedoch, dass die 36 nm-Schritte unterteilt sein könnten [VEIGEL et al. 2002]: Auf einen ersten 20 nm-Schritt — „working stroke“ — der gebundenen Kopfreion folgt ein zweiter mit 5 nm. Dieser dient als Auslösemechanismus, um die ATP-Spaltung der beiden Kopfreionen zu koordinieren. Die restlichen ≈ 11 nm werden durch eine thermische Diffusionsbewegung der ungebundenen Kopfreion überbrückt, das Molekül „sucht“ quasi nach einer neuen Bindungsstelle. Ein etwas modifiziertes Modell von S. Uemura et al. [UEMURA et al. 2004] läßt allerdings auch zu, dass das Myosin-V-Molekül den 36 nm-Schritt ohne Unterschritte durchführen kann.

Ein anderer zweiköpfiger prozessiver Motor ist Myosin-VI, der sich auf einem Aktinfilament allerdings entgegengesetzt zu Myosin-II oder Myosin-V bewegt [WELLS et al. 1999]. Dieses Rückwärtslaufen kann man interessanterweise auch anderen Myosinen „beibringen“, in dem man ihre Hebelarme um 180° verdreht anbringt [TSAVALIARIS et al. 2004]. Interessant an diesem Molekül ist auch, dass die beobachtete Schrittweite von ≈ 36 nm nicht im Einklang mit der Länge des Hebelarms zu sein scheint, im Gegensatz zu dem, was man bei anderen Myosinarten findet. Eine Erklärung der Befunde ist die Existenz eines flexiblen Elements in der Hals-„S2“-Region [OKTEN et al. 2004].

Die meisten dieser Studien wurden mit Hilfe der optischen Pinzette durchgeführt, die oft mit anderen mikroskopischen Techniken TIRF, vergleiche Kapitel 9, kombiniert wird. Die Realisierung der optischen Pinzette an der hier vorgestellten Apparatur ist in Kapitel 7 beschrieben.

Zur Illustration ist in Abbildung 2.11 eine typische Messkonfiguration dargestellt: Ein Aktinfilament wird zwischen zwei Latexbeads befestigt, die selbst wiederum mit zwei optischen Pinzetten festgehalten werden. Auf eine dritte Kugel wird Myosin aufgebracht und das Aktinfilament an diese Kugel herangefahren. Tritt eine Myosin-Aktin-Interaktion ein, verändern die Latexbeads ihre Bewegungscharakteristik, die mit Vierquadrantendioden gemessen werden, vergleiche dazu Abschnitt 7.6. Die Kraftfelder der optischen Pinzetten können zeitlich modulierbar realisiert werden (Abschnitte 7.3 und 7.4).

Eine weitere Methode, die Aktin-Myosin-Interaktion auf Einzelmoleküllevel zu messen, ist das sogenannte Motilitätsassay, vergleiche Kapitel 10. Hier werden die Myosinmoleküle an der Deckglasoberfläche befestigt und Aktinfilamente in

Lösung aufgebracht. Durch die Wechselwirkung der beiden Moleküle können die Aktinfilamente beginnen, sich über die dekorierte Oberfläche zu bewegen. Die Analyse dieser Bewegung, also zum Beispiel die Geschwindigkeitsverteilung oder die Richtungsverteilung erlauben Rückschlüsse auf die Einzelmolekülinteraktion.

Kapitel 3

Optik und Laser

Die in dieser Arbeit vorgestellte CMLTT-Apparatur basiert im wesentlichen auf (laser-)optischen Methoden. Daher stelle ich in diesem Kapitel die Optik und Laseroptik vor, die zur Durchführung des Projektes benötigt wurden. Nach einer kurzen Einführung in die Wellenoptik allgemein beschreibe ich einige Aspekte der geometrischen und der Laseroptik, die unter anderem für die Berechnung von Aufweitungen und Linsen verwendet wurden. Im abschließenden Kapitel werden die optischen Kräfte vorgestellt, die die Grundlage für die optische Pinzette (Kapitel 7) bilden. Einige der hier gezogenen Schlussfolgerungen flossen in das realisierte Design ein.

3.1 Optik

(Laser-)Licht ist eines der vorherrschenden Mittel, um biomedizinische und biologische Strukturen mikroskopisch zu untersuchen. Als elektromagnetische Wellenerscheinung sind daher alle Eigenschaften des Lichts aus den Maxwellgleichungen ableitbar [BERGMANN und SCHÄFER 1993]:

$$\vec{\nabla} \cdot \vec{D}(\vec{x}, t) = \rho(\vec{x}, t) \quad (3.1)$$

$$\vec{\nabla} \cdot \vec{B}(\vec{x}, t) = 0 \quad (3.2)$$

$$\vec{\nabla} \times \vec{E}(\vec{x}, t) = -\frac{\partial}{\partial t} \vec{B}(\vec{x}, t) \quad (3.3)$$

$$\vec{\nabla} \times \vec{H}(\vec{x}, t) = \frac{\partial}{\partial t} \vec{D}(\vec{x}, t) + \vec{j}(\vec{x}, t) \quad (3.4)$$

\vec{E} und \vec{B} bezeichnen dabei das elektrische Feld und das magnetische Induktionsfeld als elementare elektromagnetische Felder. Ihre Wirkung auf elektrische Ladungsdichten ρ und Ströme $\vec{j} = \rho \vec{v}$ ergibt sich aus der Lorentzkraft

$$\vec{F} = \int_V dV \left(\rho(\vec{x}, t) \vec{E}(\vec{x}, t) + \vec{j}(\vec{x}, t) \times \vec{B}(\vec{x}, t) \right). \quad (3.5)$$

Die elektrische Verschiebung \vec{D} und das Magnetfeld \vec{H} sind durch die sogenannten Materialgleichungen mit \vec{E} und \vec{B} verbunden:

$$\vec{D}(\vec{x}, t) = \epsilon_0 \vec{E}(\vec{x}, t) + \vec{P}(\vec{E}(\vec{x}, t)) \quad (3.6)$$

$$\vec{B}(\vec{x}, t) = \mu_0 \vec{H}(\vec{x}, t) + \vec{J}(\vec{H}(\vec{x}, t)) \quad (3.7)$$

Dabei bezeichnen \vec{P} und \vec{J} die elektrische und magnetische Polarisation, ϵ_0 die elektrische Feldkonstante — auch „Dielektrizitätskonstante des Vakuums“ genannt — und μ_0 die magnetische Feldkonstante oder „Permeabilität des Vakuums“. Zusätzlich sind die Stromdichte \vec{j} im Medium und das elektrische Feld \vec{E} mit der elektrischen Leitfähigkeit σ durch das Ohmsche Gesetz

$$\vec{j}(\vec{x}, t) = \sigma(\vec{E}(\vec{x}, t)) \vec{E}(\vec{x}, t) \quad (3.8)$$

verbunden. Die mit einem elektromagnetischen Feld verbundene Energiestromdichte wird durch den Poynting-Vektor beschrieben:

$$\vec{S}(\vec{x}, t) = \vec{E}(\vec{x}, t) \times \vec{H}(\vec{x}, t) \quad (3.9)$$

In *linearen Medien* gilt

$$\vec{P}(\vec{x}, t) = \epsilon_0 \chi_e(\vec{x}, t) \vec{E}(\vec{x}, t) \Rightarrow \vec{D}(\vec{x}, t) = \epsilon_0 \epsilon_r(\vec{x}, t) \vec{E}(\vec{x}, t) \quad (3.10)$$

$$\vec{J}(\vec{x}, t) = \mu_0 \chi_m(\vec{x}, t) \vec{H}(\vec{x}, t) \Rightarrow \vec{B}(\vec{x}, t) = \mu_0 \mu_r(\vec{x}, t) \vec{H}(\vec{x}, t) \quad (3.11)$$

$$\vec{j}(\vec{x}, t) = \sigma(\vec{x}, t) \vec{E}(\vec{x}, t). \quad (3.12)$$

Die elektrische und magnetische Suszeptibilitäten χ_e und χ_m sowie die Dielektrizitätskonstante — oder „Permittivitätszahl“ — ϵ_r , die magnetische Permeabilitätszahl μ_r und die Leitfähigkeit σ sind Materialkonstanten und im allgemeinen zeitabhängige Tensoren 2. Stufe. Ist das Medium teilweise oder vollständig isotrop, reduziert sich die Anzahl der unabhängigen Tensorelemente entsprechend.

Die Energiedichte w des elektromagnetischen Feldes in linearen Medien ergibt sich zu

$$w(\vec{x}, t) = \frac{1}{2} \vec{E}(\vec{x}, t) \cdot \vec{D}(\vec{x}, t) + \frac{1}{2} \vec{H}(\vec{x}, t) \cdot \vec{B}(\vec{x}, t). \quad (3.13)$$

Aus diesem Wert kann unter Zuhilfenahme des Poyntingvektors, Gleichung (3.9) und des Gaußschen Integralsatzes die Verlustleistungsdichte p_v ermittelt werden:

$$\begin{aligned}
 p_v(\vec{x}, t) = & \frac{1}{2} \left(\vec{E}(\vec{x}, t) \cdot \frac{\partial}{\partial t} \vec{D}(\vec{x}, t) - \frac{\partial}{\partial t} \vec{E}(\vec{x}, t) \cdot \vec{D}(\vec{x}, t) + \right. \\
 & \left. \vec{H}(\vec{x}, t) \cdot \frac{\partial}{\partial t} \vec{B}(\vec{x}, t) - \frac{\partial}{\partial t} \vec{H}(\vec{x}, t) \cdot \vec{B}(\vec{x}, t) \right) - \\
 & \vec{E}(\vec{x}, t) \cdot \sigma(\vec{x}, t) \vec{E}(\vec{x}, t)
 \end{aligned} \tag{3.14}$$

Setzt man die letztgenannte Gleichung auf Null — „verlustfreie“ Medien $\Leftrightarrow p_v = 0$ —, so ergibt sich, dass ϵ_r und μ_r reell und symmetrisch sowie $\sigma = 0$ sein müssen. Für solche Medien kann ein Brechungsindex über $n = \sqrt{\epsilon_r \mu_r}$ definiert werden.

In linearen Medien bietet es sich an, die Zeitabhängigkeit der Gleichungen (3.1)-(3.4) und (3.10)-(3.12) dadurch zu separieren, in dem man für die elektromagnetischen Felder die jeweilige Fouriertransformierte, also das Amplitudenspektrum einsetzt:

$$\vec{E}(\vec{x}, t) = \frac{1}{\sqrt{2\pi}} \int_{-\infty}^{+\infty} d\omega' \vec{E}(\vec{x}, \omega') e^{i\omega' t} \tag{3.15}$$

$$\begin{aligned}
 & \Leftrightarrow \\
 \vec{E}(\vec{x}, \omega) & = \frac{1}{\sqrt{2\pi}} \int_{-\infty}^{+\infty} dt' \vec{E}(\vec{x}, t') e^{-i\omega t'} \tag{3.16}
 \end{aligned}$$

Man interpretiert damit die einzelnen Felder als lineare Überlagerung monochromatischer Felder, die sich gegenseitig nicht beeinflussen. Für die Amplitudenspektren lauten die Maxwellgleichungen aus (3.1)-(3.4) dann:

$$\vec{\nabla} \cdot \vec{D}(\vec{x}, \omega) = \tilde{\rho}(\vec{x}, \omega) \tag{3.17}$$

$$\vec{\nabla} \cdot \vec{B}(\vec{x}, \omega) = 0 \tag{3.18}$$

$$\vec{\nabla} \times \vec{E}(\vec{x}, \omega) = -i\omega \vec{B}(\vec{x}, \omega) \tag{3.19}$$

$$\vec{\nabla} \times \vec{H}(\vec{x}, \omega) = i\omega \vec{D}(\vec{x}, \omega) + \vec{j}(\vec{x}, \omega) \tag{3.20}$$

Entsprechend erhält man aus den Materialgleichungen (3.10)-(3.12) die Beziehungen

$$\vec{P}(\vec{x}, \omega) = \epsilon_0 \tilde{\chi}_e(\vec{x}, \omega) \vec{E}(\vec{x}, \omega) \Rightarrow \vec{D}(\vec{x}, \omega) = \epsilon_0 \tilde{\epsilon}_r(\vec{x}, \omega) \vec{E}(\vec{x}, \omega) \quad (3.21)$$

$$\vec{J}(\vec{x}, \omega) = \mu_0 \tilde{\chi}_m(\vec{x}, \omega) \vec{H}(\vec{x}, \omega) \Rightarrow \vec{B}(\vec{x}, \omega) = \mu_0 \tilde{\mu}_r(\vec{x}, \omega) \vec{H}(\vec{x}, \omega) \quad (3.22)$$

$$\vec{j}(\vec{x}, \omega) = \tilde{\sigma}(\vec{x}, \omega) \vec{E}(\vec{x}, \omega) \quad (3.23)$$

Wie ihre zeitabhängigen „Partner“ sind auch die fouriertransformierten Suszeptibilitäten $\tilde{\chi}_e$ und $\tilde{\chi}_m$ sowie die Permittivitätszahl $\tilde{\epsilon}_r$, die magnetische Permeabilitätszahl $\tilde{\mu}_r$ und die Leitfähigkeit $\tilde{\sigma}$ Tensoren 2. Stufe, die jetzt von der Frequenz ω abhängig sein können.

Im einfachsten Fall eines linearen, ladungsfreien, stromfreien, d.h. nichtleitendem, isotropen und homogenen Medium — also $\tilde{\rho} = 0$, $\vec{j} = 0$, $\partial_{x,y,z} \tilde{\epsilon}_r = \partial_{x,y,z} \tilde{\mu}_r = 0$ mit skalaren, ortsunabhängigen, aber frequenzabhängigen Materialparametern $\tilde{\epsilon}_r(\omega)$ und $\tilde{\mu}_r(\omega)$ — erhält man durch Anwenden des Rotationsoperators auf Gleichung (3.19) und Einsetzen von Gleichung (3.20) und (3.17) für \vec{E} die Bedingung

$$\left(\vec{\nabla}^2 + \omega^2 \tilde{\epsilon}_r(\omega) \epsilon_0 \tilde{\mu}_r(\omega) \mu_0 \right) \vec{E}(\vec{x}, \omega) = 0 \quad (3.24)$$

Hierbei handelt es sich um eine harmonische Oszillatorgleichung, die zum Beispiel von $\vec{E} = \vec{E}_0 e^{i\vec{k}\cdot\vec{x}}$ erfüllt wird. Für $\vec{E}(\vec{x}, t)$ erhält man dann mit der Transformation aus Gleichung (3.15) eine ebene Welle

$$\vec{E}(\vec{x}, t) = \vec{E}_0 e^{i(\vec{k}\cdot\vec{x} + \omega t)}, \quad (3.25)$$

wobei formal

$$\vec{E}(\vec{x}, \omega) = \vec{E}_0 e^{i(\vec{k}\cdot\vec{x} + \omega t)} \delta(\omega' - \omega)$$

einzusetzen ist. \vec{k} ist der Wellenvektor, er zeigt in die Ausbreitungsrichtung der elektromagnetischen Welle (d.b. des Lichts). Wegen Gleichung (3.9) sind elektromagnetische Wellen Transversalwellen, d.h. die Vektoren von elektrischem und magnetischem Feld liegen in der zu \vec{k} normalen Fläche. Die Lage der Vektoren innerhalb dieser Fläche ist zunächst beliebig; liegt allerdings eine bestimmte Vorzugsrichtung vor, so spricht man von einer polarisierten elektromagnetischen Welle.

Die Wellenlänge der ebenen Welle ergibt sich aus Gleichung 3.25 zum Beispiel durch den Abstand zweier Amplitudenmaxima zu $\lambda = 2\pi/|\vec{k}|$. Damit Gleichung 3.24 gültig ist, muss \vec{k} die Dispersionsrelation

$$\vec{k}^2 = \omega^2 \tilde{\epsilon}_r(\omega) \epsilon_0 \tilde{\mu}_r(\omega) \mu_0 = \frac{\omega^2}{c_n^2} = \frac{\omega^2 n^2}{c_0^2} \quad (3.26)$$

erfüllen. Dabei ist c_0 die Vakuumlichtgeschwindigkeit und $c_n = c_0/n$ die Lichtgeschwindigkeit im Medium. Das zugehörige Magnetfeld ergibt sich schliesslich aus Gleichung 3.25 und 3.19.

3.2 Geometrische Optik

Für inhomogene dielektrische Medien gilt $\partial_{x,y,z}\tilde{\epsilon}_r = 0$ nicht mehr. Entsprechend folgt aus $\vec{\nabla} \cdot \vec{D} = 0$ nicht mehr zwangsläufig, dass $\vec{\nabla} \cdot \vec{E} = 0$ ist und die rechte Seite von Gleichung 3.24 ist nicht mehr identisch zu Null. Stattdessen erhält man:

$$\left(\vec{\nabla}^2 + \vec{k}^2\right) \vec{E}(\vec{x}, \omega) = \left(\vec{\nabla}^2 + n(\vec{x}, \omega)^2 k_0^2\right) \vec{E}(\vec{x}, \omega) = \vec{\nabla} \left(\vec{\nabla} \cdot \vec{E}(\vec{x}, \omega)\right) \quad (3.27)$$

Zur Lösung dieser Gleichung wählt man einen Ansatz analog zu $\vec{E} = \vec{E}_0 e^{i\vec{k} \cdot \vec{x}}$, verallgemeinert jedoch die Ortsabhängigkeit durch eine optische Wegfunktion $L(\vec{x})$ — das sogenannte „Eikonal“ — und erhält eine quasiebene Welle:

$$\begin{aligned} \vec{E} &= \vec{E}_0 e^{ik_0 L(\vec{x})} \\ \Rightarrow \\ \vec{E} &= \vec{E}_0 e^{i(k_0 L(\vec{x}) + \omega t)} \end{aligned} \quad (3.28)$$

Die Wellenfronten sind weiterhin durch Flächen konstanter Phase gegeben, $(k_0 L(\vec{x}) + \omega t) = \text{const.}$ Da k_0 eine Konstante ist, ist dies gleichbedeutend mit Flächen konstanter Eikonalwerte, $L(\vec{x}) = \text{const.}$ Im Gegensatz zu ebenen Wellen sind diese Flächen aber gegebenenfalls gekrümmt, die lokale Ausbreitungsrichtung der Welle ist proportional zu $\vec{\nabla} L(\vec{x})$ und kann mit dem Einheitsvektor dieser Richtung beschrieben werden:

$$\vec{e}(\vec{x}) = \vec{\nabla} L(\vec{x}) / |\vec{\nabla} L(\vec{x})| \quad (3.29)$$

Der Grenzfall der geometrischen Optik ist durch $\lambda \rightarrow 0$ definiert, also $k_0 \rightarrow \infty$. Aus der oben erwähnten Nebenbedingung $\vec{\nabla} \cdot \vec{D} = \vec{\nabla} \cdot (\tilde{\epsilon}_r \epsilon_0 \vec{E}) = 0$ folgt, mit $1/k_0 \rightarrow 0$, dass $\vec{E}_0 \cdot \vec{\nabla} L = 0$, so dass die Transversalität der elektromagnetischen Welle, zumindest in dieser Näherung, erfüllt bleibt.

Setzt man den Ansatz nach Gleichung (3.28) in die Wellengleichung (3.27) erhält man, wieder im Grenzfall der geometrischen Optik und mit $\vec{E}_0 \cdot \vec{\nabla} L = 0$ die Eikonalgleichung:

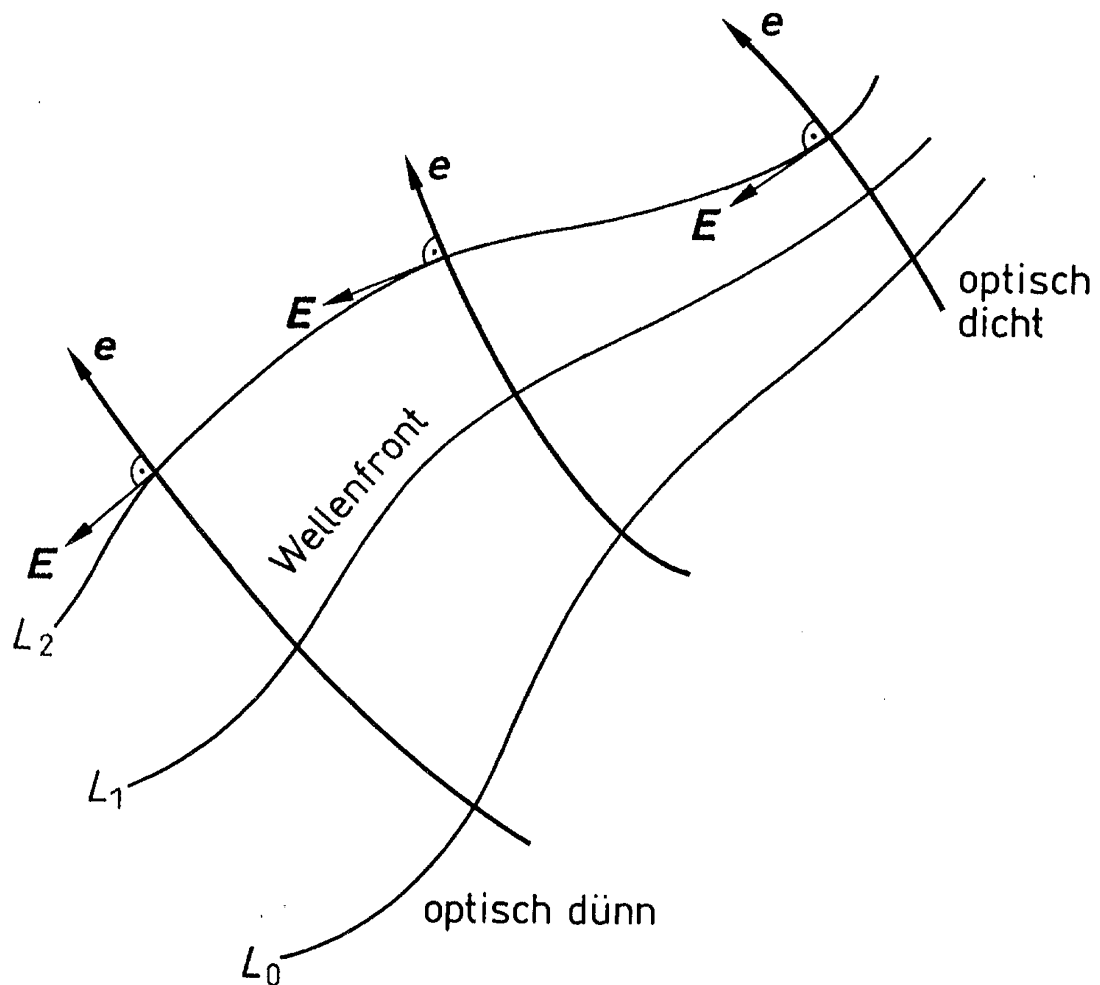


Abbildung 3.1: Geometrische Lichtstrahlen in einem inhomogenen Medium: An die Wellenfronten, d.h. an die Flächen konstanter Eikonalfunktionswerte, $L(\vec{x}) = \text{const}$, werden Normalvektoren $\vec{e}(\vec{x})$ angelegt. Diese Vektoren sind zugleich Tangentialvektoren der geometrischen Lichtstrahlen [BERGMANN und SCHÄFER 1993].

$$\left(\vec{\nabla}L(\vec{x})\right)^2 = n(\vec{x}, \omega)^2 \quad (3.30)$$

Bei bekanntem Brechungsindex $n(\vec{x}, \omega)$ — er kann frequenz- also wellenlängenabhängig sein — kann das Eikonal bestimmt werden und die Lichtwelle ist nach Gleichung (3.28) festgelegt.

Durch die in Gleichung (3.29) definierte lokale Ausbreitungsrichtung werden die Lichtstrahlen der geometrischen Optik festgelegt, wobei die Vektoren \vec{e} die

Tangentialvektoren an den Lichtstrahlen sind (siehe Abbildung 3.1). Betrachtet man entlang eines Lichtstrahls das Differential des Eikonals $dL = \vec{e} \cdot \vec{\nabla} L$, $ds = n ds$, nennt man dL den „optischen Weg“ des Lichtstrahls. Seine „optische Weglänge“ zwischen zwei Punkten ist dann das Integral über dL entlang des Lichtstrahls zwischen diesen beiden Punkten.

Die Flächen $L(\vec{x}) = \text{const}$ heißen *Wellenfronten*. Deformationen solcher Wellenfronten können mit Hilfe der sogenannten Zernikepolynome beschrieben werden [ZERNIKE 1934]. Die durch diese Deformationen verursachten Abbildungsfehler können dann mit Verfahren der adaptiven Optik teilweise korrigiert werden.

Da für beliebige Felder $A(\vec{x})$ gilt, dass $\vec{\nabla} \times (\vec{\nabla} A(\vec{x})) = 0$, sieht man mit Hilfe des Stokesschen Satzes, dass das geschlossene Linienintegral über $\vec{\nabla} L = n\vec{e}$ um eine Fläche f gleich Null ist:

$$\oint_{\partial f} n(\vec{x}) \vec{e}(\vec{x}) \cdot d\vec{s} = \oint_{\partial f} \vec{\nabla} L(\vec{x}) \cdot d\vec{s} = \int_f \underbrace{(\vec{\nabla} \times \vec{\nabla} L)}_{=0} \cdot d\vec{f} = 0 \quad (3.31)$$

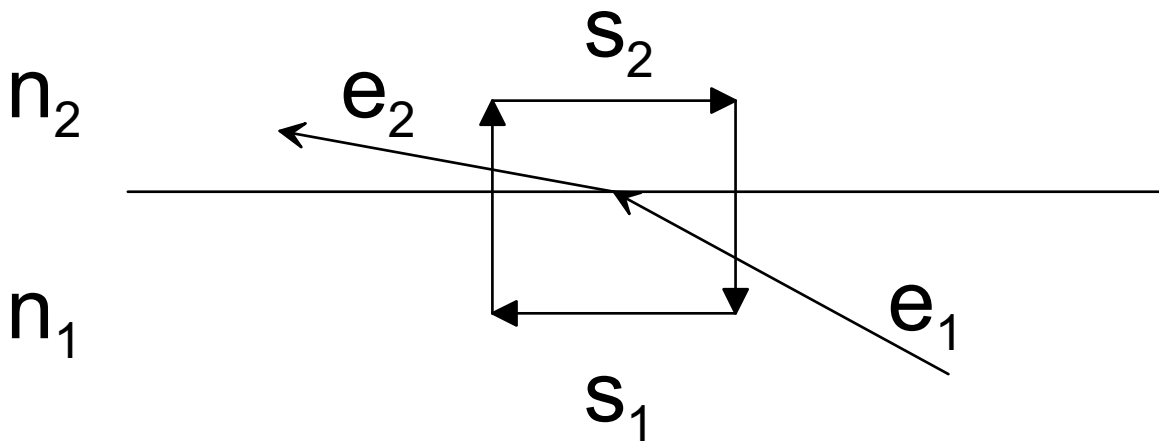


Abbildung 3.2: Ableitung des Brechungsgesetz aus Gleichung (3.31): Führt man das Linienintegral aus — wobei die unbenannten Pfade ≈ 0 seien — erhält man $n_1 \vec{e}_1 \cdot \vec{s}_1 + n_2 \vec{e}_2 \cdot \vec{s}_2 = (n_1 \cos \beta_1 - n_2 \cos \beta_2) s_1 = 0$ und damit das Brechungsgesetz $n_1 \cos \beta_1 = n_2 \cos \beta_2$. β_1 und β_2 sind hier die Winkel mit \vec{s}_1 und damit der Grenzfläche.

Aus dieser Relation kann zum einen das Fermat'sche Prinzip abgeleitet werden, wonach die optische Weglänge eines Lichtstrahls zwischen zwei Punkten immer extremal wird [BERGMANN und SCHÄFER 1993]. Zum anderen, wie in Abbil-

dung (3.2) dargestellt, erhält man das Snelliussche Brechungsgesetz für Strahlen, die eine optischen Grenzfläche passieren:

$$n_1 \sin(\alpha_1) = n_2 \sin(\alpha_2), \quad (3.32)$$

wobei α_1 und α_2 Winkel des Strahls mit der Grenzflächennormalen sind. Man nennt den Wert $NA = n \sin(\alpha)$ die „numerische Apertur“ eines Lichtstrahls. Die NA ändert sich beim Passieren einer optischen Grenzfläche nicht. Ausserdem gilt für Lichtstrahlen das einfache Reflexionsgesetz an einer spiegelnden Grenzfläche

$$\alpha_1 = \alpha_2. \quad (3.33)$$

Der einfallende und der reflektierte beziehungsweise gebrochene Lichtstrahl liegen in einer Ebene. Dies gilt daher auch bei Strahldurchgängen durch optische Elemente, deren Verhalten durch das Reflektions- und das Brechungsgesetz beschrieben werden kann. Darunter fallen beispielsweise Spiegel und Linsen.

In jedem System, das aus optischen Elementen besteht — verallgemeinert fallen darunter auch die Zwischenräume zwischen den optischen Elementen — kann eine *optische Achse* festgelegt werden. Sie ist festgelegt durch denjenigen Lichtstrahl, der beim Durchgang durch das optische System weder gebrochen noch versetzt wird. Es ist üblich, die Koordinate längs der optischen Achse mit der räumlichen z -Koordinate zusammenzulegen. Andere Lichtstrahlen werden dann in jedem Punkt z durch die Angabe ihres Abstandes $r(z)$ zur optischen Achse und ihrer Steigung $r'(z)$ bezüglich der optischen Achse beschrieben [KNEUBÜHL und SIGRIST 1995].

Bei vielen optischen Systemen genügt es, lediglich *paraxiale*, das bedeutet *achsnahe* Lichtstrahlen zu betrachten. Für die Steigung $r'(z)$ der Lichtstrahlen soll dabei die Kleinwinkelnäherung $r'(z) = \tan \beta \approx \sin \beta \approx \beta$ gelten.

Zur Berechnung des Verlaufs paraxialer Strahlen durch ein System von Linsen und Spiegeln existiert ein nützliches Rechenschema. Dabei beschreibt man den Durchgang eines Lichtstrahls durch ein optisches Element mit einem linearen Gleichungssystem, das Abstand r_1 und Steigung r'_1 des Strahls vor dem Element mit Abstand r_2 und Steigung r'_2 nach dem Element verknüpft:

$$\begin{pmatrix} r_2 \\ r'_2 \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} A & B \\ C & D \end{pmatrix} \begin{pmatrix} r_1 \\ r'_1 \end{pmatrix} \quad (3.34)$$

Die Koeffizienten dieser *ABCD-Matrix* ergeben sich dabei aus der Art des Elementes: So wird eine dünne Linse der Brennweite f durch

$$M_f(f) = \begin{pmatrix} 1 & 0 \\ -\frac{1}{f} & 1 \end{pmatrix} \quad (3.35)$$

beschrieben und die geradlinige Ausbreitung eines Lichtstrahls in einem Medium längs einer Strecke $d = \Delta z$ durch

$$M_v(d) = \begin{pmatrix} 1 & d \\ 0 & 1 \end{pmatrix}. \quad (3.36)$$

Die Brennweite f der Linse ist dabei natürlich auf das umgebende Medium zu beziehen. Die Gesamtabbildung eines Lichtstrahls durch ein optisches System wird dann einfach durch die Produktmatrix der Einzelemente beschrieben. Betrachtet man beispielsweise die Fokussierung eines Strahlenbündels (r_1, r'_1) durch eine Linse der Brennweite f , so erhält man im Brennpunkt ein Strahlenbündel der Form

$$\begin{pmatrix} r_2 \\ r'_2 \end{pmatrix} = M_v(f) M_f(f) \begin{pmatrix} r_1 \\ r'_1 \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} 0 & f \\ -\frac{1}{f} & 1 \end{pmatrix} \begin{pmatrix} r_1 \\ r'_1 \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} fr'_1 \\ r'_1 - \frac{r_1}{f} \end{pmatrix}. \quad (3.37)$$

Die Lage des Strahlenbündels ist unabhängig von r_1 und direkt proportional zur Steigung des Strahlenbündels bezüglich der optischen Achse.

Die Verwendung der genannten Matrizen setzt jedoch voraus, dass die optischen Elemente alle rotationssymmetrisch wirken, also auf der optische Achse zentriert sind und keine Winkelverkipfung aufweisen. Die Auswirkungen solcher Justage-„Fehler“ auf die optische Abbildung kann ebenfalls durch ein Matrixschema berechnet werden [SIEGMAN 1986]: Dabei wird das oben beschriebene ABCD-Schema auf ein 3x3-Matrixschema erweitert:

$$\begin{pmatrix} r_2 \\ r'_2 \\ 1 \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} A & B & E \\ C & D & F \\ 0 & 0 & 1 \end{pmatrix} \begin{pmatrix} r_1 \\ r'_1 \\ 1 \end{pmatrix} \quad (3.38)$$

Für die „neuen“ Elemente E und F ist dabei

$$E = (1 - A) \Delta_1 + (L - B) \Delta' \quad (3.39)$$

$$F = -C \Delta_1 + (1 - D) \Delta' \quad (3.40)$$

einzusetzen. A , B , C und D sind die üblichen ABCD-Matrixelemente. L bezeichnet die Länge des optischen Systems, $\Delta' = (\Delta_2 - \Delta_1)/L$ die Winkelverkipfung und Δ_1 beziehungsweise Δ_2 den Lateralversatz auf Eingangs- und Ausgangsseite.

3.3 Laseroptik

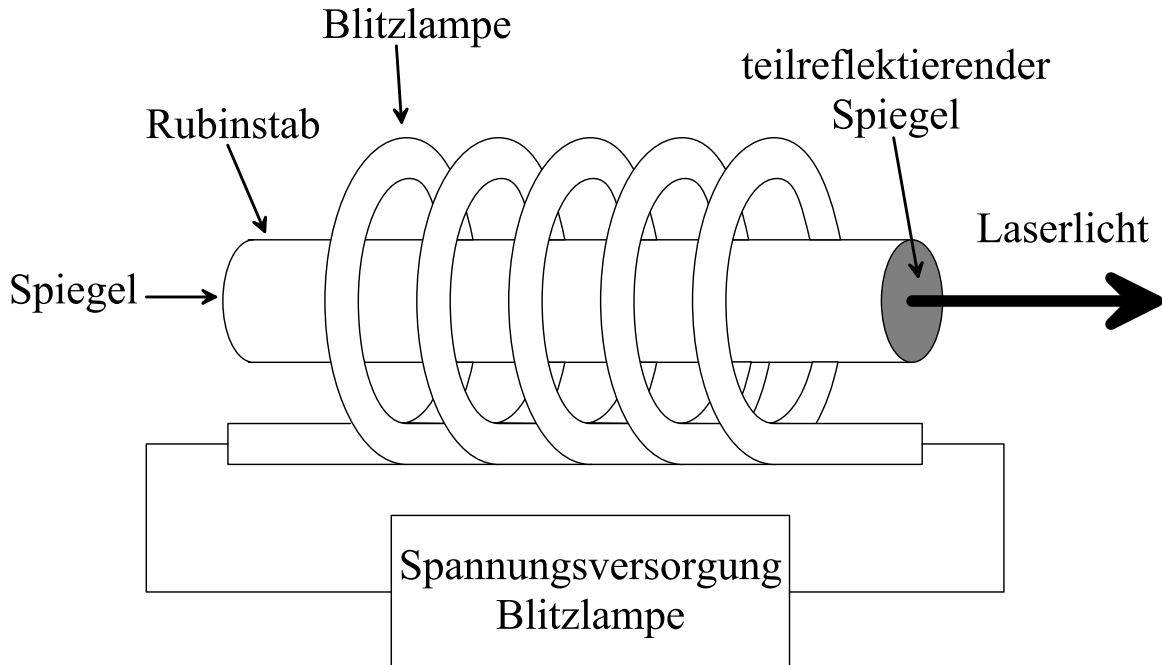


Abbildung 3.3: Aufbauprinzip eines Lasers am Beispiel des Rubinlasers (1960, Theodor Maiman): Durch Pumplicht einer Blitzlampe werden Cr^{3+} -Ionen im Rubinstab mit Wellenlängen um 404 nm und 554 nm angeregt. Der Resonator ist durch einen Vollspiegel und einen teildurchlässigen Spiegel realisiert. Die Laserstrahlung erfolgt bei 692,8 nm und 694,3 nm [KNEUBÜHL und SIGRIST 1995].

Die Entstehung von Laserlicht ist mit der Entstehung von Fluoreszenzlicht sehr verwandt: Durch Einstrahlen von sogenanntem „Pumplicht“ werden fluoreszierende Atome oder Moleküle angeregt. Bei regulärer Fluoreszenz gehen die Moleküle ohne äußere Einwirkung unter spontaner Emission eines Fluoreszenzphotons wieder in den Grundzustand über. Da ein Teil der Anregungsenergie durch innere Konversion „verbraucht“ wird, besitzt das Fluoreszenzphoton eine größere Wellenlänge (vergleiche Kapitel 4.2).

Laserlicht entsteht nun, wenn Fluoreszenzphotonen durch induzierte Emission erzeugt werden: Einzelne spontan entstandene Fluoreszenzphotonen laufen dabei in einem Resonator hin und her, in dem das fluoreszierende laseraktive Material untergebracht ist. Dabei treffen sie auf Atome oder Moleküle, die sich noch im angeregten, metastabilen Zustand befinden und regen diese katalytisch zum Zerfall an. Das anregende und das neu entstandene Photon schwingen kohärent. Die Wellenlängen der induzierten Photonen sind jedoch über einen Wellenlängenbe-

reich verteilt, dessen Breite sich aus der mittleren Lebensdauer des metastabilen Zustandes und weiterer Effekte wie zwischenmolekulare Stöße ergibt. Durch einen entsprechenden Resonator kann jedoch das Laserlicht entsprechend den Anforderungen moduliert werden. Benötigt man zum Beispiel monochromatisches Licht, kann der Resonator so realisiert werden, dass unerwünschte Wellenlängen durch Interferenz abgeschwächt werden. Das resultierende Laserlicht wird mit teildurchlässigen Spiegeln aus dem Resonator ausgekoppelt. Abbildung 3.3 zeigt den Aufbau am Beispiel des ersten, von Theodor Maiman 1960 realisierten Lasers, des Rubinlasers.

Da es sich bei Laserstrahlung um kohärente Strahlung handelt und Interferenzeffekte auftreten, kann die Näherung der geometrischen Optik ($\lambda \rightarrow 0$) zunächst nicht verwendet werden und es muss eine Lösung der Gleichung (3.24) gesucht werden. Da in dieser Gleichung die Komponenten des Vektors $\vec{E}(\vec{x}, \omega)$ unabhängig voneinander sind, kann vereinfachend davon ausgegangen werden, dass es sich bei der Lösung um polarisiertes Licht handelt und gelangt zu einer skalaren Helmholtzgleichung [BERGMANN und SCHÄFER 1993]

$$\left(\vec{\nabla}^2 + k^2\right) \tilde{E}(\vec{x}, \omega) = 0 \quad (3.41)$$

wobei \tilde{E} die elektrische Feldkomponente parallel zur gewählten Polarisationsrichtung ist. Wie oben bereits beschrieben, ist es häufig Konvention, die Ausbreitungsrichtung der Welle in Richtung der z -Koordinate zu legen, wobei der elektrische Feldvektor dann in der xy -Ebene liegt.

Für $\tilde{E}(\vec{x})$ — die ω -Abhängigkeit bleibt bestehen, wird jedoch im folgenden nicht mehr explizit genannt — bietet sich daher der folgende Ansatz [SIEGMAN 1986, KOGELNIK und LI 1966] an:

$$\tilde{E}(\vec{x}) = u(\vec{x}) e^{-ikz}. \quad (3.42)$$

$u(x, y, z_0)$ beschreibt das Feldprofil in der xy -Ebene bei $z = z_0$. Die hauptsächliche Ortsabhängigkeit der Feldamplitude in z -Richtung soll dabei im Exponentialterm stecken, u selbst soll sich nur langsam mit z ändern, das heißt

$$\frac{\partial^2}{\partial z^2} u(\vec{x}) \ll \frac{\partial^2}{\partial x^2} u(\vec{x}) \quad \text{und} \quad \frac{\partial^2}{\partial z^2} u(\vec{x}) \ll \frac{\partial^2}{\partial y^2} u(\vec{x}) \quad (3.43)$$

Benutzt man diese Näherungen und setzt den Ansatz nach Gleichung (3.42) in Gleichung (3.41) ein, so erhält man für $u(\vec{x})$ die *paraxiale Wellengleichung*

$$\frac{\partial^2}{\partial x^2} u(\vec{x}) + \frac{\partial^2}{\partial y^2} u(\vec{x}) - 2ik \frac{\partial}{\partial z} u(\vec{x}) = 0. \quad (3.44)$$

Diese Gleichung wird durch das Fresnel-Integral exakt gelöst [BERGMANN und SCHÄFER 1993]:

$$u(\vec{x}) = \frac{ik}{2\pi z} \int \int_F u(\xi, \zeta, z_0) e^{\frac{-ik}{2z}((\xi-x)^2 + (\zeta-y)^2)} d\xi d\zeta \quad (3.45)$$

Die Integration erstreckt sich dabei über die gesamte Querschnittsfläche F des Strahls bei $z = z_0$. Gleichung (3.45) verknüpft also die Feldverteilung bei $z = z_0$ mit der bei einer entfernteren Stelle z .

Zur Beschreibung eines Laserlichtstrahls wird nun eine Lösung $u(\vec{x})$ gesucht, deren Transversalprofil sich bei Propagation in z -Richtung nur um einen Skalierungsfaktor ändert und für das $u \xrightarrow{x \rightarrow \pm\infty} 0$ erfüllt ist. Ein solche Eigenlösung von Gleichung (3.45) ist der Gaußsche Strahl [SIEGMAN 1986],

$$u(x, y, z) = A(z) \cdot e^{-ik \frac{x^2 + y^2}{2\tilde{q}(z)}}, \quad (3.46)$$

wobei der Parameter \tilde{q} komplex angesetzt wird. Setzt man diesen Ansatz in die paraxiale Wellengleichung (3.44) ein, erhält man einfache Differentialgleichungen für A und \tilde{q} . Integriert man diese, so ergeben sich die einfachen Relationen

$$A(z) = A(z_0) \cdot \frac{\tilde{q}(z_0)}{\tilde{q}(z)} \quad \text{und} \quad (3.47)$$

$$\tilde{q}(z) = \tilde{q}(z_0) + z - z_0. \quad (3.48)$$

Es ist üblich, $1/\tilde{q}$ wie folgt in Real- und Imaginärteil aufzuspalten:

$$\frac{1}{\tilde{q}(z)} = \frac{1}{R(z)} - i \frac{\lambda}{\pi w^2(z)} \quad (3.49)$$

R und w sind dann *reelle* Parameter. Ihre physikalische Bedeutung ergibt sich bei Vergleich mit Gleichung (3.46) [KOGELNIK und LI 1966]: $R(z)$ ist der Krümmungsradius der Wellenfront, die die z -Achse im Punkt z schneidet. Der imaginäre Anteil $w(z)$ ist die Breite des gaußförmigen Profils in der xy -Ebene beim Punkt z . An dieser Stelle ist die Feldamplitude auf $1/e$, die Leistung auf $1/e^2 \approx 13,5\%$ abgefallen. Man nennt $w(z)$ daher auch die Strahltaile am Punkt z . Aus Gleichung (3.47) und (3.49) erhält man

$$w(z) = w(z_0) \sqrt{1 + \left(\frac{z}{z_R}\right)^2} \quad (3.50)$$

$$R(z) = z_R \left(\frac{z}{z_R} + \frac{z_R}{z}\right) \quad (3.51)$$

mit der *Rayleighlänge*

$$z_R = \pi \frac{w^2(z_0)}{\lambda}. \quad (3.52)$$

Eine allgemeinere Lösung von Gleichung (3.44) erhält man mit einem Produktansatz $u(\vec{x}) = \tilde{u}(x, z) \cdot \tilde{u}(y, z)$. Dieser Ansatz ist gerechtfertigt, da die paraxiale Wellengleichung symmetrisch gegenüber einem Austausch von x und y ist. Setzt man diesen Produktansatz ein, erhält man für $\tilde{u}(x, z)$ eine eindimensionale paraxiale Wellengleichung

$$\frac{\partial^2}{\partial x^2} \tilde{u}(x, z) - 2ik \frac{\partial}{\partial z} \tilde{u}(x, z) = 0, \quad (3.53)$$

und setzt als Lösung für diese wiederum einen von Gleichung (3.46) verallgemeinerten Ansatz ein [SIEGMAN 1986]:

$$\tilde{u}_n(x, z) = A(\tilde{q}(z)) \cdot h_n\left(\frac{x}{\tilde{p}(z)}\right) \cdot e^{-ik\frac{x^2}{2\tilde{q}(z)}}. \quad (3.54)$$

Die Parameter A und \tilde{q} behalten ihre Bedeutung und \tilde{p} ist zunächst ein freier Skalierungsfaktor. Setzt man Gleichung (3.54) in Gleichung (3.53) ein, ergibt sich für h_n eine Differentialgleichung, die von den Hermitepolynomen H_n gelöst wird.

Man erhält also als Lösung der eindimensionalen paraxialen Wellengleichung sogenannte *Hermite-Gaußsche Moden der Ordnung n*

$$\begin{aligned} \tilde{u}_n(x, z) &= \sqrt[4]{\frac{2}{\pi}} \cdot \frac{1}{\sqrt{2^n n! w(z_0)}} \cdot \sqrt{\frac{\tilde{q}(z_0)}{\tilde{q}(z)}} \left(\frac{\tilde{q}(z_0) \tilde{q}^*(z)}{\tilde{q}^*(z_0) \tilde{q}(z)} \right)^{\frac{n}{2}} \times \\ &\times H_n\left(\sqrt{2} \frac{x}{w(z)}\right) e^{-i\frac{kx^2}{2\tilde{q}(z)}}, \end{aligned} \quad (3.55)$$

mit dem Hermitepolynom H_n n -ter Ordnung. Führt man den sogenannten *Guoy-Phasenverschiebungsterm* ein,

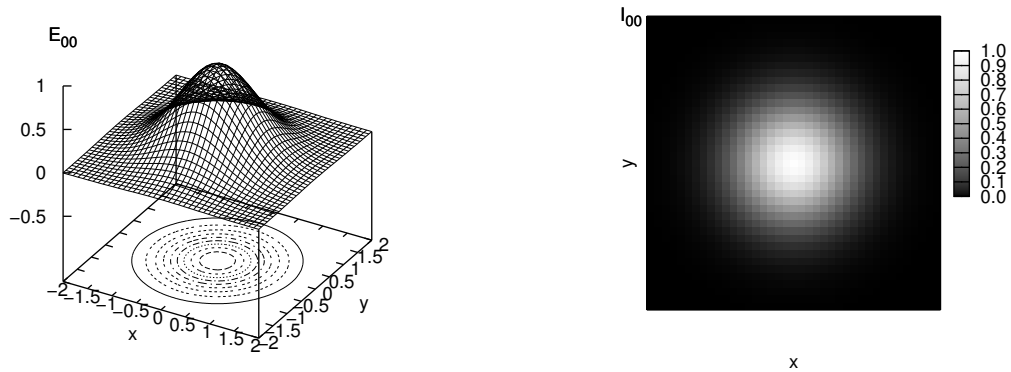
$$\psi(z) = \arctan \frac{\pi w^2(z)}{\lambda R(z)}, \quad (3.56)$$

erhalten die Hermite-Gaußschen Moden aus Gleichung (3.55) die Form

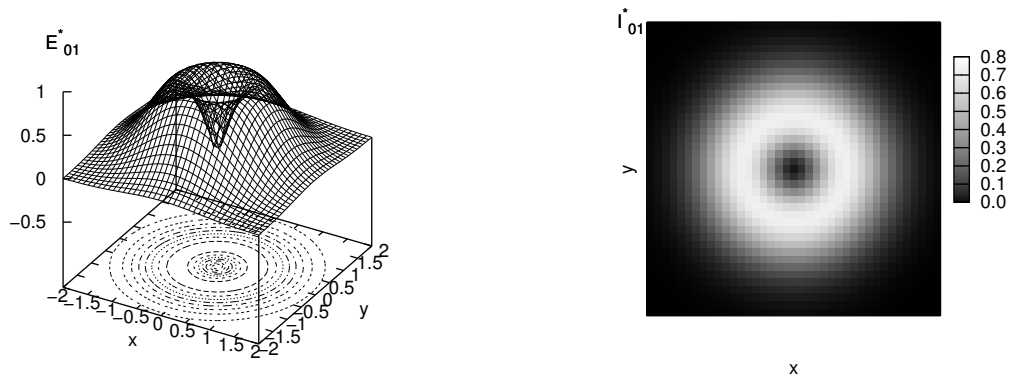
$$\begin{aligned} \tilde{u}_n(x, z) &= \sqrt[4]{\frac{2}{\pi}} \cdot \frac{1}{\sqrt{2^n n! w(z)}} e^{-i(n+1/2)(\psi(z) - \psi(z_0))} \times \\ &\times H_n\left(\sqrt{2} \frac{x}{w(z)}\right) e^{-\frac{x^2}{w^2(z)}} \cdot e^{-i\frac{kx^2}{2R(z)}} \end{aligned} \quad (3.57)$$

Die dreidimensionalen Hermite-Gauß-Moden TEM_{nm} ergeben sich aus dem oben genannten Produktansatz zu

$$u_{nm}(\vec{x}) = \tilde{u}_n(x, z) \cdot \tilde{u}_m(y, z) \quad (3.58)$$



(a) TEM_{00} -Feldamplituden- und Leistungsprofil mit $R = \infty$



(b) TEM_{01}^* -Feldamplituden- und Leistungsprofil mit $R = \infty$

Abbildung 3.4: Strahlprofile von TEM-Moden: Gezeigt sind die Feldamplituden- und Leistungsprofile der Hermite-Gauß-Moden TEM_{00} und TEM_{01}^* , jeweils bei $z = z_0$. Die Wellenlänge wurde auf 0,001 Längeneinheiten, die Strahltaile auf eine Längeneinheit und die Krümmungsradien auf unendlich festgelegt.

Dabei ist zu beachten, dass \tilde{q} , beziehungsweise R und w für die x - und y -Richtung verschieden sein können.

Die $\tilde{u}_n(x, z)$ und $\tilde{u}_m(y, z)$ bilden ein orthonormiertes Funktionensystem. Dies bedeutet, dass jede Laserlichtwelle, die durch die paraxiale Wellengleichung beschrieben werden kann, als Linearkombination von Hermite-Gaußschen Moden darstellbar ist. Die niedrigsten Moden, TEM_{00} und der „Donut“-Mode TEM_{01}^* — er ist eine rotationssymmetrische Linearkombination von TEM_{01} und TEM_{10} — treten sehr häufig als Lasermoden auf. Sie sind in Abbildung 3.4 dargestellt.

Die z -Abhängigkeit in Gleichung (3.55) ergibt sich allein aus der z -Abhängigkeit der Parameter w und \tilde{q} . Da w letztlich auch durch \tilde{q} definiert ist, ist die Ausbreitung eines Laserstrahls wegen der Relation (3.49) durch die Angabe von $\tilde{q}(z_0)$ in einem beliebig wählbaren Ausgangspunkt z_0 vollständig definiert.

Für kohärente Effekte, die auf bestimmten Phasenbeziehungen im Laserstrahl basieren — ein Beispiel ist die Second Harmonic Generation (vergleiche Kapitel 4.4.2) —, ist das Verhalten des Guoy-Phasenverschiebungsterms im Fokus wichtig: Der Krümmungsradius des Strahls im Fokuspunkt ist $R = \infty$, hinter dem Fokuspunkt hat er das Vorzeichen gewechselt, da der Strahl nun divergiert. Die Strahltaile bleibt immer endlich. Man sieht daher an der Definition des Phasenverschiebungsterms aus Gleichung (3.56), daß sich das Argument des Arkustangens beim Durchgang durch den Fokus von einem relativ großen *negativen* Wert über den Wert 0 zu einem relativ großen *positiven* Wert ändert. Die Phase ψ verschiebt sich daher relativ schnell von $\approx -\pi/2$ nach $\approx +\pi/2$ und verursacht einen zusätzlichen Phasensprung des Laserstrahls um 180° .

In der geometrischen paraxialen Optik wurden die *ABCD-Matrizen* eingeführt, die das strahlbeschreibende Tupel (r, r') dem optischen Strahlengang entsprechend transformieren, vergleiche Kapitel 3.2. Man kann zeigen, daß ein entsprechendes Gesetz auch für \tilde{q} existiert [KOGELNIK und LI 1966]: Wird ein System mit optischen Komponenten durch eine *ABCD*-Matrix beschrieben, so transformiert sich \tilde{q}_1 des Eingangsstrahls in \tilde{q}_2 des Ausgangsstrahls nach

$$\tilde{q}_2 = \frac{A\tilde{q}_1 + B}{C\tilde{q}_1 + D}. \quad (3.59)$$

Entsprechend transformieren sich die Parameter R und w bei Durchlaufen eines optischen Systems gemäß

$$w(z) = w(z_0) \sqrt{\left(A + \frac{B}{R(z_0)}\right)^2 + \left(\frac{B}{z_R}\right)^2} \quad \text{und}$$

$$R(z) = \frac{\left(A + \frac{B}{R(z_0)}\right)^2 + \left(\frac{B}{z_R}\right)^2}{C\left(A + \frac{B}{R(z_0)}\right) + \frac{D}{R(z_0)}\left(A + \frac{B}{R(z_0)}\right) + \frac{BD}{z_R^2}}. \quad (3.60)$$

Es ist jedoch nicht immer notwendig, diese Relationen anzuwenden; man kann gegebenenfalls den Verlauf eines Gaußschen Strahl auch in der Näherung der geometrischen Optik berechnen: Dazu betrachtet man ein geometrisches Strahlenbündel mit Taille ω_0 und Krümmungsradius ρ_0 . Die Randstrahlen können durch das Tupel $\pm\omega_0(1, 1/\rho)/2$ beschrieben werden. Da Randstrahlen bei Durchgang durch ein optisches System immer Randstrahlen bleiben, ergeben sich Taille ω und Krümmungsradius ρ des geometrischen Bündels *nach* dem Systemdurchgang aus den mit der ABCD-Matrix transformierten Randstrahlen. Nun vergleicht man diese, aus Gleichung (3.34) gewonnenen Werte mit denen, die man für einen Gaußschen Laserstrahl aus Gleichung (3.60) erhält. Sollen beide Werte in etwa übereinstimmen, müssen die Ungleichungen

$$\begin{aligned} \left(\frac{B}{z_R}\right)^2 &\ll \left(A + \frac{B}{r}\right)^2 \quad \text{und} \\ \left(\frac{B}{z_R}\right)^2 &\ll \frac{B}{r} \left(A + \frac{B}{r}\right) \end{aligned} \quad (3.61)$$

erfüllt sein, was häufig der Fall ist.

3.4 Optische Kräfte

Die Kraft \vec{F} , die ein elektromagnetisches Feld auf ein bestimmtes Raumvolumen V ausübt, ergibt sich aus den Maxwellgleichungen (3.1) bis (3.4) und der Lorenzkraft (3.5) zu [NOLTING 1990]

$$F_i = \int_{\partial V} d\vec{f} \cdot \vec{T}_i \quad (3.62)$$

mit F_i als i -te Komponente des Vektors \vec{F} . Das Integral wird über die Oberfläche des Volumens V gebildet. \vec{T}_i ist der i -te Zeilenvektor des *Maxwellschen Spannungstensors*

$$T_{ij} = \left(\epsilon_0 \epsilon_r E_i E_j + \frac{1}{\mu_0 \mu_r} B_i B_j - \frac{1}{2} \delta_{ij} \left(\epsilon_0 \epsilon_r E_i E_i + \frac{1}{\mu_0 \mu_r} B_i B_i \right) \right). \quad (3.63)$$

Dabei ist ϵ_r die (lokale) Permittivitätszahl und μ_r die (lokale) Permeabilitätszahl des Volumens V .

Auch im Teilchenbild trägt das elektromagnetische Feld in Form der Photonen einen Impuls — $\hbar \vec{k}$ pro Photon — den es mit anderen Teilchen oder Objekten

austauschen kann. Wegen $\vec{F} = \dot{\vec{p}}$ üben die Photonen Kräfte auf diese Objekte aus.

Dass es möglich ist, allein mit dem Strahlendruck *stabile* optische Potentiale herzustellen, in denen Teilchen dauerhaft festgehalten werden können, wurde 1970 zum ersten Mal von Arthur Ashkin experimentell nachgewiesen [ASHKIN 1970]. Er beobachtete, dass in Wasser suspendierte Latexkügelchen mit Durchmessern im Mikrometerbereich in einem TEM₀₀-Laserstrahl, wie man es intuitiv erwartet, in Ausbreitungsrichtung, aber auch — und dies erwartet man intuitiv vielleicht nicht unbedingt — *zur Strahlmitte hin* beschleunigt werden. Letzteres konnte kein thermischer Effekt sein, da in der Strahlmitte eine größere Energiedichte vorliegt, die Kügelchen werden dort eher erwärmt als in den Randgebieten des Laserstrahls und müssten infolgedessen aus der Strahlmitte herausdiffundieren. Die Wasserumgebung sorgte anscheinend für eine schnelle Energieabfuhr, so dass dieser thermische Effekt die stabile Positionierung der Latexkugel nicht zerstörte. Durch die Kombination von zwei Laserstrahlen gelang es, die axialen Beschleunigungskräfte auszugleichen und die Latexkugel in einer von A. Ashkin so benannten „optischen Flasche“ festzuhalten.

Für dielektrische Teilchen, deren Durchmesser r deutlich kleiner als die Lichtwellenlänge λ ist, $r \ll \lambda$, kann man die Kräfte des elektromagnetischen Feldes etwas einfacher als in Gleichung (3.62) darstellen: Man teilt sie dazu in zwei Komponenten auf: die *Streukraft* und die *Gradientenkraft*.

Beide basieren auf der Polarisierung des vereinfachend als kugelförmig und homogen angenommenen Teilchens durch das äußere elektrische Feld:

$$\vec{P}(t) = \alpha \vec{E}(t). \quad (3.64)$$

Die Polarisierbarkeit α ergibt sich, falls das Kügelchen mit Radius r gegenüber der Umgebung den relativen Brechungsindex $m = n_K/n_U$ besitzt, zu [GREINER 1982]

$$\alpha = \frac{m^2 - 1}{m^2 + 2} r^3. \quad (3.65)$$

Dieser Zusammenhang folgt auch aus der Formel nach *Clausius-Mossotti* für die molekulare Polarisierbarkeit. Besitzt das elektrische Feld eine sinusförmige Zeitabhängigkeit mit der Frequenz ω , so schwingt auch das induzierte Dipolmoment $\vec{P}(t)$ mit dieser Frequenz. Ein schwingender Dipol strahlt jedoch selbst wieder eine elektromagnetische Welle ab. Die Energie hierfür entnimmt er der eingestrahnten Welle. Das dielektrische Kügelchen streut also effektiv Photonen mit einem Wirkungsquerschnitt [GREINER 1982]

$$\sigma = \frac{8}{3}\pi \left(\frac{2\pi}{\lambda}\right)^4 \alpha^2 \quad (3.66)$$

aus der Ursprungsrichtung heraus. Bei dieser *Rayleighstreuung* von Photonen wird ein Impuls auf das Kügelchen übertragen, so dass sich die zeitlich gemittelte *Streukraft* $\overline{\vec{F}_{scatt}}$ direkt aus der einlaufenden Energieflussdichte \vec{S} — dies ist der *Poyntingvektor* des elektromagnetischen Feldes, vergleiche Gleichung (3.9) — und dem Wirkungsquerschnitt σ ergibt:

$$\overline{\vec{F}_{scatt}} = \frac{\sigma}{c} \vec{S}. \quad (3.67)$$

Dabei wurde benutzt, dass die Energie E und der Impuls p eines Photons über $E = pc$ zusammenhängen wobei c die Lichtgeschwindigkeit im umgebenden Medium ist.

Wegen der Impulserhaltung wirkt die Streukraft im Mittel in Richtung der Lichtausbreitung und eignet sich daher nicht zum Einfangen von Partikeln, was auch im oben beschriebenen Experiment von Ashkin deutlich wurde.

Dass ein Teilcheneinfang mit Licht möglich ist, liegt an der *Gradientenkraft*. Sie kommt zustande, weil jeder elektrische Dipol \vec{P} in einem elektrischen Feld \vec{E} die Kraft

$$\vec{F}_{grad} = \vec{\nabla}(\vec{P} \cdot \vec{E}) \quad (3.68)$$

erfährt [GREINER 1982]. Nimmt man an, dass die Polarisierbarkeit α rein reell ist, das heißt, es besteht keine Phasenverschiebung zwischen elektrischem Feld $\vec{E}(t)$ und der Polarisation $\vec{P}(t)$, ergibt sich die zeitlich über einige Schwingungen des elektromagnetischen Feldes gemittelte Gradientenkraft zu

$$\overline{\vec{F}_{grad}} = \overline{\vec{\nabla}(\vec{P} \cdot \vec{E})} = \frac{1}{2} \left(\alpha \vec{\nabla}(\vec{E}_0^2) + \vec{E}_0^2 \vec{\nabla} \alpha \right). \quad (3.69)$$

Hierbei wurde wieder die oben erwähnte sinusförmige zeitliche Abhängigkeit des elektrischen Feldes, $\vec{E}(t) = \vec{E}_0 \sin(\omega t)$ verwendet. Da die Feldenergie-dichte proportional zu \vec{E}^2 und damit proportional zu \vec{E}_0^2 ist, vergleiche Gleichung (3.13), weist die Gradientenkraft immer in die Raumgebiete, in denen eine höhere Lichtintensität oder eine höhere Polarisierbarkeit besteht.

Wenn man nun einen Laserstrahl so stark fokussiert, dass die *axiale* Gradientenkraft größer wird als die Streukraft, kann man auch mit Einzelstrahlen sogenannte „optische Fallen“ oder „optische Pinzetten“ aufbauen, die in allen drei Raumrichtungen stabil sind. Allerdings ist das Kraftfeld in der positiven z -Richtung, der Richtung der Lichtausbreitung, wegen der Streukraft immer am schwächsten.

Die optischen Kräfte aus Gleichung (3.67) und (3.69) gelten in dieser Form nur für den Größenbereich $r \ll \lambda$ der Rayleighstreuung. Man fand jedoch — zunächst experimentell — heraus, dass Objekte auch im Bereich der *Miestreuung*, $r > \lambda$, mit einzelnen Laserstrahlen eingefangen werden können [ASHKIN et al. 1986].

Zur Berechnung der optischen Kräfte in diesem Bereich existieren theoretische Modelle. Besonders anschaulich kann man die optische Pinzette für $r \gg \lambda$ verstehen [ASHKIN 1992].

In diesem Größenbereich kann die geometrische Optik unter Vernachlässigung aller Beugungseffekte verwendet werden. Der fokussierte Laserstrahl wird in einzelne Lichtstrahlen aufgeteilt, die auf der Oberfläche des einzufangenden Objektes unter einem gewissen, im allgemeinen von Strahl zu Strahl verschiedenen Winkel einfallen. Die Fresnelschen Formeln für Reflexion und Transmission [NOLTING 1990] sowie das Brechungsgesetz aus Gleichung (3.32) beschreiben dann das Verhalten jedes Strahls.

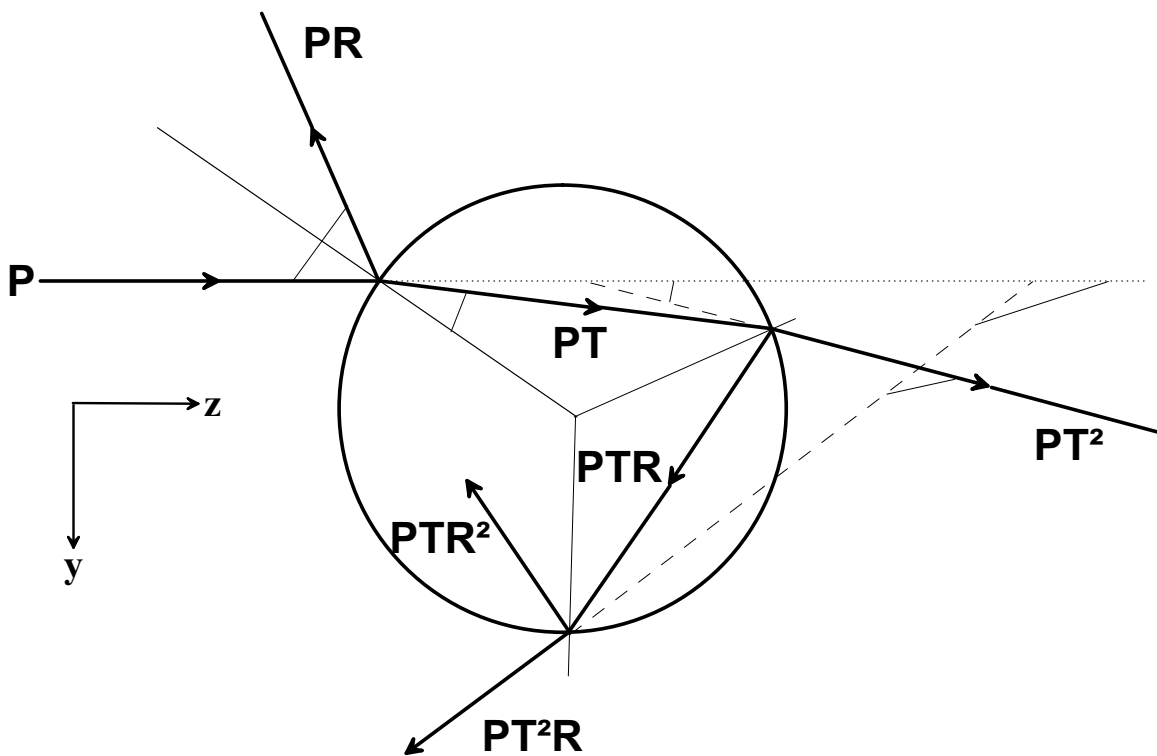


Abbildung 3.5: Verlauf eines optischen Strahls in einer dielektrischen Kugel [ASHKIN 1992]: Die eingestrahlte Leistung P wird in einen reflektierten und transmittierten Strahl aufgeteilt. Die jeweiligen Anteile und die Winkel ergeben sich aus den Fresnelschen Formeln [NOLTING 1990] und dem Brechungsgesetz aus Gleichung (3.32).

In Abbildung 3.5 ist das Verhalten eines Lichtstrahls in einer dielektrischen Kugel mit relativem Brechungsindex m exemplarisch dargestellt. Die mit dem Lichtstrahl eingestrahlte Leistung P wird auf eine Reihe von gestreuten Strahlen mit den Leistungen PR , PT^2 , PT^2R , $PT^2R^2 \dots$ verteilt. $R = R(\theta_1)$ und $T = T(\theta_1)$ sind dabei die Fresnelschen Reflexions- und Transmissionskoeffizienten, wenn ein Strahl im optisch dünneren Medium mit dem Winkel θ_1 einfällt. Die Polarisationsabhängigkeit dieser Koeffizienten wird dadurch berücksichtigt, dass der Lichtstrahl als zirkular polarisiert angenommen wird und damit die Koeffizienten für beide Polarisationsrichtungen gemittelt werden können.

Die in z -Richtung, das heißt hier in Richtung des einfallenden Strahls auf die Kugel wirkende Kraft entspricht dem aus der Ausgangsrichtung herausgestreuten Impulsfluss P/c , wobei c die Lichtgeschwindigkeit im umgebenden Medium ist.

Der erste reflektierte Strahl trägt zu diesem Impulsfluss mit $P/c \cdot (1 - R \cos(2\theta_1 + \pi))$ bei. Die Leistung PT^2 des ersten transmittierten Strahls wird um den Winkel α aus der Ursprungsrichtung herausgestreut, die Leistung PT^2R des zweiten um den Winkel $\alpha + \beta$, die Leistung PT^2R^2 des dritten um $\alpha + 2\beta$ usw. . . Zusammen erhält man für die z -Komponente der optischen Kraft [ASHKIN 1992]

$$\begin{aligned} F_z &= F_{scatt} = \frac{P}{c} \left(1 - R \cos(2\theta_1 + \pi) + \sum_{n=0}^{\infty} T^2 R^n \cos(\alpha + n\beta) \right) \\ &= \frac{P}{c} \left(1 + R \cos(2\theta_1) - \frac{T^2 [\cos(2\theta_1 - 2\theta_2) + R \cos(2\theta_1)]}{1 + R^2 + 2R \cos(2\theta_2)} \right) \quad (3.70) \end{aligned}$$

Dabei wurde von $\alpha = 2\theta_1 - 2\theta_2$ und $\beta = \pi - 2\theta_2$ Gebrauch gemacht. Die z -Komponente nennt man analog zur Rayleighstreuung auch Streukraft, da sie ebenfalls in Richtung des einfallenden Lichtstrahls wirkt. Allerdings hängt die Streukraft hier im geometrischen Fall *nicht* von der Größe des dielektrischen Objektes ab. Mit den gleichen geometrischen Überlegungen erhält man für die senkrecht zur Einfallsrichtung wirkende Kraftkomponente

$$F_y = F_{grad} = \frac{P}{c} \left(1 + R \sin(2\theta_1) - \frac{T^2 [\sin(2\theta_1 - 2\theta_2) + R \sin(2\theta_1)]}{1 + R^2 + 2R \cos(2\theta_2)} \right) \quad (3.71)$$

die man dann analog Gradientenkraft nennt. θ_2 ergibt sich hier aus dem Brechungsgesetz. Die zur Rayleighstreuung identische Bezeichnung ist auch deswegen gerechtfertigt, da man zeigen kann, dass beide Gradientenkräfte konservativ und beide Streukräfte dissipativ sind.

Es ist wegen der Form der gerade angegebenen Kräfte üblich, optische Kräfte mit einem dimensionslosen Effizienzfaktor Q zu beschreiben, der mit der Gleichung

$$F = Q \frac{P}{c} \quad (3.72)$$

definiert wird. $Q = 2$ entspricht dem Fall einer total reflektierenden Oberfläche, $Q = 0$ dem einer (gedachten) Grenzfläche zwischen Medien mit gleichem Brechungsindex.

Mit den Kräften aus den Gleichungen (3.70) und (3.71) eines *einzelnen* Lichtstrahls ergibt sich die Gesamtkraft, die ein fokussiertes Laserstrahl**ündel** auf ein dielektrisches Objekt ausübt, als Summe der Einzelkräfte. Dabei ist zu berücksichtigen, dass Gradienten- und Streukraft für jeden Lichtstrahl in eine andere Richtung zeigen können, das heißt, es muss vektoriell addiert werden. Die optische Pinzette ist dann stabil, wenn, wie oben im Fall der Rayleighstreuung, die addierte Gradientenkraft der addierten Streukraft überwiegt.

Für beliebige Positionen des Laserbrennpunktes innerhalb des Objektes bietet es sich an, diese Summation numerisch auszuführen. Wenn man dies für verschiedene relative Brechungsindizes m und für verschiedene Strahlprofile — TEM₀₀, „Gauß“ und TEM₀₁^{*}, „Donut“ — durchführt, erhält man folgende Ergebnisse [ASHKIN 1992]:

- Die rücktreibende Kraft der optischen Pinzette ist für relative Objekt- auslenkungen $\Delta s/r$ bis $\approx 1/3$ linear ($r =$ Teilchenradius). Zum Beispiel erhält man für $m = 1,2$ — dies entspricht einem Objekt mit $n_K = 1,6$ in Wasser — und einen Konvergenzwinkel von 70° — entsprechend einem Wasserobjektiv mit $NA \approx 1,2$ — bei einheitlich ausgeleuchteter Apertur $Q \approx 0,2 \dots 0,3 \cdot \Delta s/r$. Bei einer relativen Auslenkung von $s/r \approx 1/5$ und einer Lichtleistung von $P \approx 10$ mW erhält man so eine Rückstellkraft von $F \approx 8,0$ pN. Die Kraft ist auch, wie erwartet, rotationssymmetrisch um die z -Achse. In z -Richtung ergibt sich jedoch eine Asymmetrie wegen der Streukraft, so daß der Gleichgewichtspunkt etwas in Strahlrichtung verschoben ist. Außerdem wirkt auf die Kugel auch dann eine Kraft in z -Richtung, wenn sie vom Gleichgewichtspunkt aus nur lateral ausgelenkt wird. Dies wäre bei einem ideal harmonischen Kraftfeld nicht der Fall.
- Wenn die optische Pinzette mit einem Strahl gebildet wird, der ein TEM₀₀-Profil aufweist, erhält man dann das stabilste Kraftfeld, wenn die rückseitige Öffnung des fokussierenden Objektivs gleichmäßig ausgeleuchtet wird, d.h. $w = \infty$ ist. Technisch ist dies jedoch schwer zu realisieren, da man den

Laserstrahl sehr aufweiten müsste und damit die Flächenleistungsdichte sehr stark abfallen würde. Andererseits ist eine relativ gute Pinzette auch noch dann möglich, wenn die Strahltaile gerade dem Öffnungsdurchmesser des Objektivs entspricht. Allerdings geht die Pinzettenstabilität gerade in der kritischen z -Richtung zurück, wenn die Strahltaile in der Objektivöffnung weiter absinkt. Hier ist also von Fall zu Fall ein Kompromiss zwischen Ausleuchtungsdurchmesser und Leistungsdichte zu finden.

- Mit dem TEM_{01}^* („Donut“-)Profil erreicht man eine etwas bessere Pinzettenstabilität als mit einem TEM_{00} -Strahlprofil. Das ist verständlich, da für die Erzeugung eines starken Gradienten in z -Richtung vor allem die Randstrahlen wichtig sind. Diese sind im „Donut“-Profil stärker gewichtet und tragen daher besonders zur Gradientenkraft bei. Allerdings sind Laserquellen mit „Donut“-Profil relativ selten.
- Es zeigt sich, dass für eine stabile Pinzette der fokussierte Strahl einen großen Öffnungswinkel aufweisen muss. Für Konvergenzwinkel unter 30° ist kein Einfangen von Teilchen mehr möglich. Diese Forderung nach einer hohen numerischen Apertur des Objektivs geht mit der Notwendigkeit einer möglichst guten Ausleuchtung des Aperturrandes einher.

Das gerade vorgestellte „strahlenoptische“ oder „RO“-Modell (=„ray optics“) gilt, da es geometrische Optik benutzt, nur für Teilchengrößen $r \gg \lambda$. Für kleinere Teilchen muss man versuchen, die Kraft mit der genaueren, aber auch komplizierteren Methode des Maxwell'schen Spannungstensors (Gleichung (3.63)) auszurechnen. W.H. Wright und Mitarbeiter haben mit dem von J.P. Barton und Mitarbeitern entwickelten „elektromagnetischen“ oder „EM“-Modell [BARTON et al. 1988, BARTON et al. 1989, BARTON und ALEXANDER 1989] theoretische Kräfte in einem Gauß'schen TEM_{00} -Laserstrahl berechnet und die Ergebnisse für verschiedene Teilchengrößen mit dem oben vorgestellten Ashkin'schen Modell und dem Experiment verglichen [WRIGHT et al. 1993].

Sie finden eine gute Übereinstimmung von strahlenoptischem Modell und Messung für $r \geq 5 \dots 10 \mu\text{m}$. Das elektromagnetische Modell liefert gute Vorhersagen für $r < 0,5 \dots 1 \mu\text{m}$ bei einem Konvergenzwinkel $\geq 60^\circ$. Im sogenannten *intermediären Bereich* von $r = 1 \dots 10 \mu\text{m}$ liefern beide Theorien keine gute Vorhersagen. In diesem Bereich geht die Kraft von einer r^3 -Skalierung in eine r^0 -Abhängigkeit über (vergleiche Gleichung (3.65) und (3.68)). Letzteres ergibt sich daraus, dass, wie bereits oben erwähnt, die Kraft im strahlenoptischen Modell von der Größe des Teilchens unabhängig ist. Abbildung 3.6 zeigt das mit beiden Modellen gefundene Profil der axialen Kraft als Funktion der Teilchengröße. Für den inter-

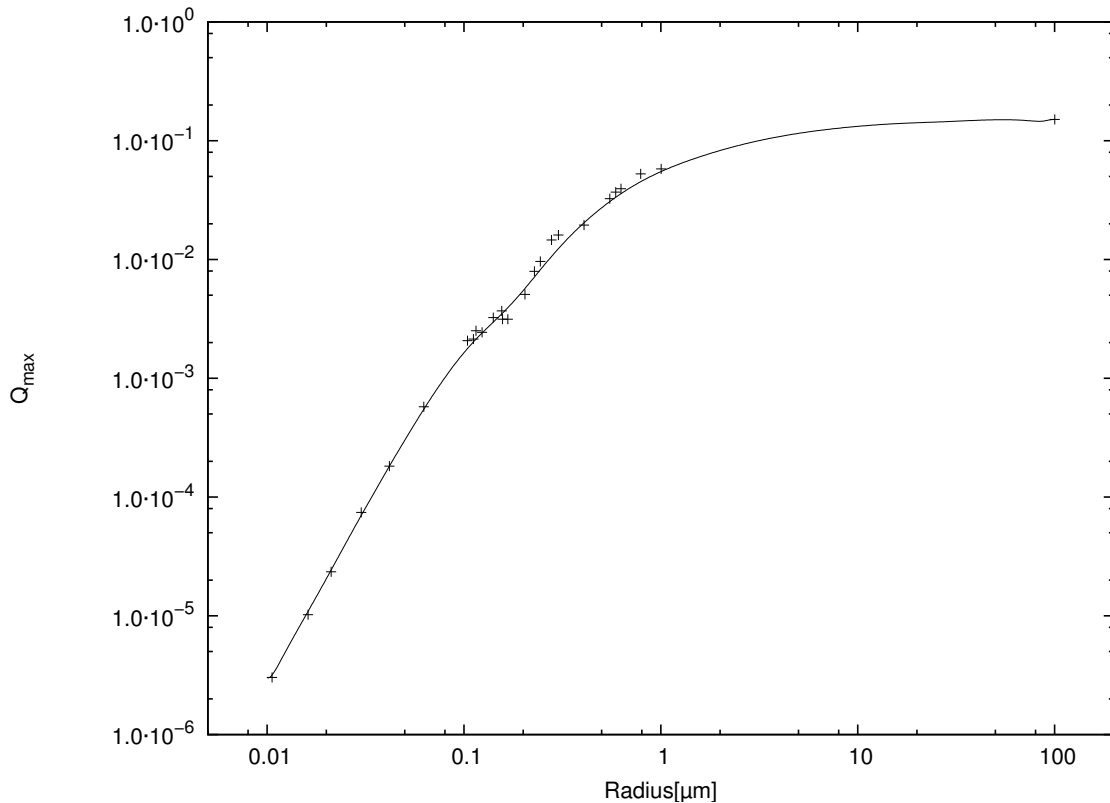


Abbildung 3.6: Verlauf der theoretischen axialen Pinzetteneffizienz bei verschiedenen Objektgrößen: Die Markierungen sind theoretisch berechnete Werte, die aus dem EM-Modell ($r < 1 \mu\text{m}$) oder dem RO-Modell ($r = 100 \mu\text{m}$) gewonnen wurden, die Kurve ist eine Interpolation [WRIGHT et al. 1993].

mediären Bereich lagen keine Modellwerte vor und es konnte nur zwischen beiden Modellen interpoliert werden.

Zellen und Organellen sind typischerweise $1 \dots 10 \mu\text{m}$ groß. Der für biologische Anwendungen interessante Größenbereich liegt daher gerade im intermediären Bereich, so dass es keine einfachen Modelle für die entstehenden Kräfte gibt. Für ein stabiles Kraftfeld erheben aber beide Modelle ähnliche Forderungen an den Strahl, wie zum Beispiel einen hohen Konvergenzwinkel und ein weitgehend ungestörtes Strahlprofil. Diese Eigenschaften können dann für den intermediären Bereich übernommen werden. Allerdings unterliegt das tatsächlich resultierende Kraftfeld des fokussierten Laserstrahls so vielen Bedingungen, wie zum Beispiel die Art der Einkopplung, die verwendeten Linsen, Leistungsschwankungen des Lasers, dass das Kraftfeld in regelmäßigen Abständen und für jedes Experiment neu kalibriert werden muss.

Die optische Pinzette bietet sich dazu an, Kräfte auf biologische Objekte wir-

ken zu lassen, ohne dass ein mechanischer Kontakt mit dem Objekt bestehen muss. Von den vielen Möglichkeiten der gezielten Manipulation dieser Objekte seien stellvertretend nur einige genannt: Dabei ist es interessant, dass die optischen Kräfte nicht nur indirekt über Latexkügelchen in die Probe eingreifen können, wie es beispielsweise bei Experimenten mit Motorproteinen gemacht wird (vergleiche hierzu das Ende des Kapitels 2.2.2 mit der Abbildung (2.11)).

Zellen oder Organelle, die sehr vereinfachend mit dielektrischen Sphären vergleichbar sind, können auch direkt mit optischen Pinzetten eingefangen und bewegt werden [ASHKIN et al. 1987] oder zur Fusion gebracht werden [STEUBING et al. 1991, VEIGEL et al. 1994]. Für biologische Experimente benutzt man in der Regel einen Laser, dessen Wellenlänge im nahen Infraroten liegt, um Strahlenschäden an den Zellen zu vermeiden. Mit dieser Infrarotfalle wurden auch Viren eingefangen [ASHKIN und DZIEDZIC 1987] oder die mechanischen Eigenschaften einzelner Organellen bei intakter Zellwand untersucht [ASHKIN und DZIEDZIC 1989, ASHKIN et al. 1990].

Bei der Realisierung der optischen Pinzette, Kapitel 7, wurde versucht, die in diesem Abschnitt erwähnten Anforderungen zu erfüllen. Im einzelnen sind dies die Forderung nach einer guten Ausleuchtung der rückseitigen Objektivapertur, eine zufriedenstellende Leistungs- und Profilstabilität sowie eine hohe Güte des Profils, dass möglichst rotationssymmetrisch sein sollte.

Kapitel 4

Mikroskopische Methoden

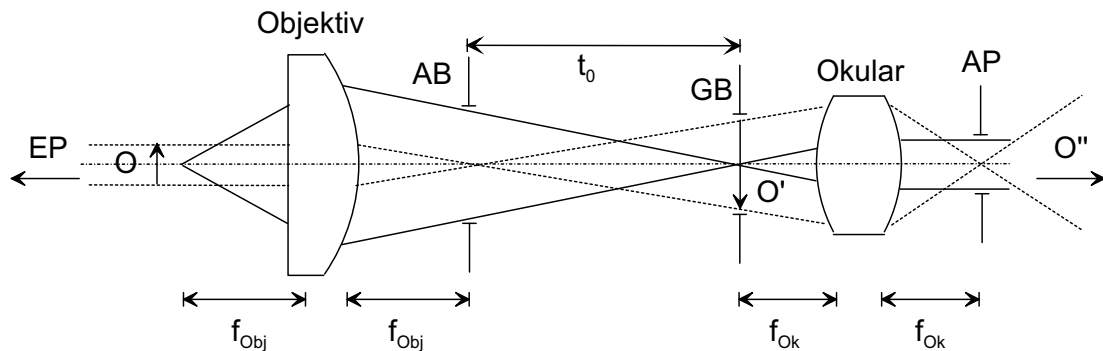
Wie einleitend betont sind mikroskopische Methoden wichtige Messinstrumente der Biomedizin und Biophysik. Ich beschreibe daher in diesem Kapitel die Mikroskopietechniken, die zentraler Teil der CMLTT-Apparatur sind. Darüber hinaus mussten optische Modifikationen am Mikroskop selbst vorgenommen werden. Aus diesem Grund stelle ich in Kapitel 4.1 das Prinzip und den Aufbau eines Mikroskops vor.

Das darauf folgende Kapitel 4.2 hat die Fluoreszenzmikroskopie zum Thema. Daran schließt sich ein Abschnitt über Konfokalmikroskopie an (4.3), bevor auf Multiphotonentechniken eingegangen wird (4.4). Dazu gehört unter anderem die sogenannte „second harmonic generation“, deren Anwendung an Muskelzellen und Myofibrillen später in Kapitel 11 vorgestellt wird. Die Grundlagen zu den TIRFM-Messungen des Kapitels 9 befinden sich schließlich im Abschnitt 4.5.

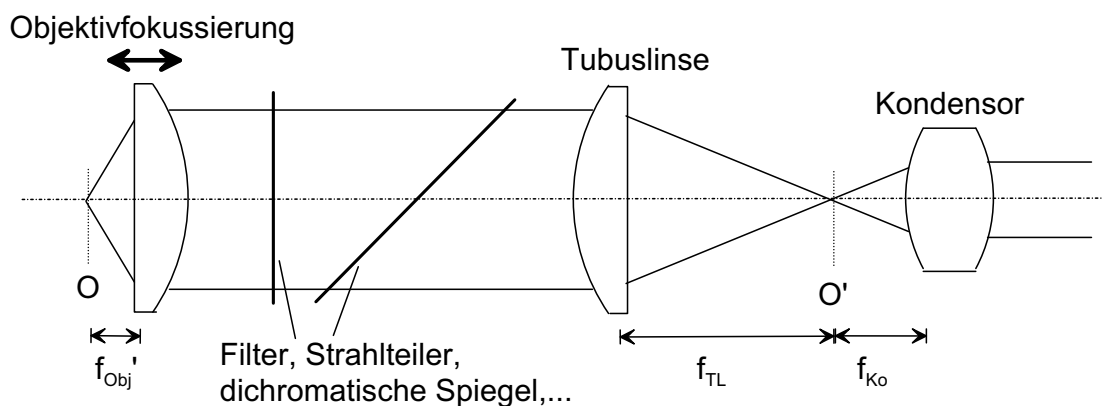
4.1 Mikroskopie

Mit Hilfe des Mikroskops als zentrales optisches Beobachtungs- und Messinstrument können Strukturen bis zu einigen 100 nm aufgelöst und dargestellt werden. Diese Auflösungsgrenze — ihre Erklärung folgt unten — galt viele Jahre als unüberwindbar. Mittlerweile sind aber (technisch recht aufwendige) Techniken entwickelt worden, darunter die sogenannte „4-Pi-Mikroskopie“, mit denen die Auflösungsgrenze um, grob gesagt, etwa eine Größenordnung verbessert werden konnte [HELL 2003]. Zur Erreichung von Auflösungen einiger 10 nm werden meist zusätzlich ausgefeilte Fluoreszenztechniken wie „stimulated emission after depletion“, „STED“, eingesetzt [DYBA et al. 2003].

Das Prinzip der klassischen optischen Abbildung im Mikroskop ist in Abbildung (4.1(a)) skizziert: Das Objekt O wird durch das Objektiv auf ein reales



(a) Prinzip der optischen Abbildung im Mikroskop

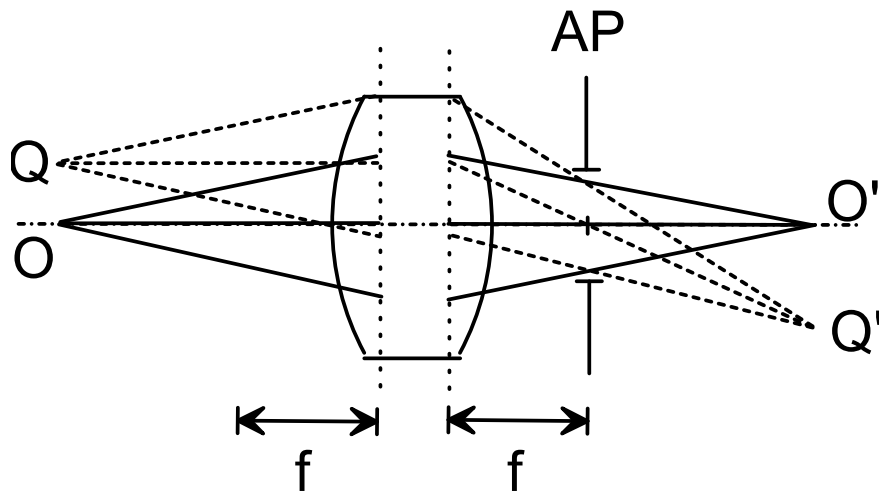


(b) Prinzip der optischen Abbildung im Mikroskop bei Unendlichoptik

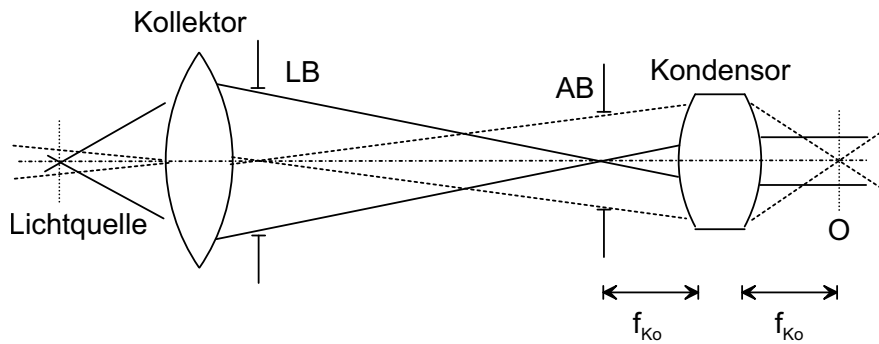
Abbildung 4.1: Optische Abbildung im Mikroskop, traditionell (oben) und mit Unendlichoptik (unten), nach [BERGMANN und SCHÄFER 1993].

Zwischenbild, das „Sehfeld“ O' abgebildet. Das Linsensystem des Objektivs wird dabei durch eine Linse dargestellt, deren Brennweite f_{Obj} und Hauptebenenabstand denen des Linsensystems entsprechen. Da sich das Objekt O nahezu im gegenstandsseitigen Brennpunkt des Objektivs befindet, ist das Zwischenbild O' entsprechend stark vergrößert. Werden Kameras zur Beobachtung und Bildaufnahme verwendet, werden sie in der Regel so montiert, dass das Zwischenbild O' oder ein anderes reales Zwischenbild direkt auf dem Film oder dem Chip auftrifft.

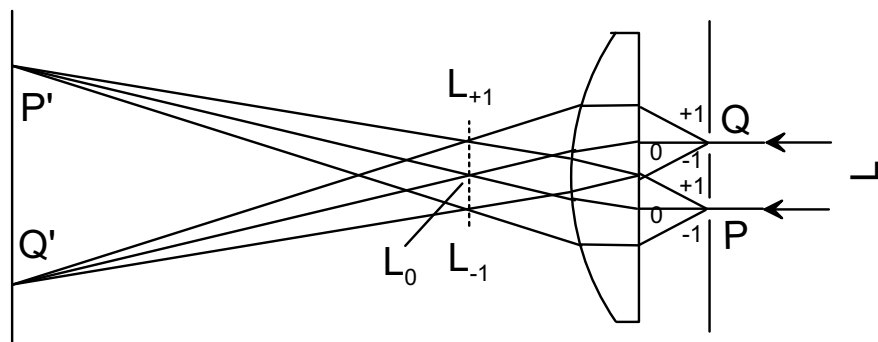
Bei der visuellen Beobachtung mit dem Auge wird das vergrößerte Zwischenbild O' jedoch durch das Okular – ein weiteres, meist weniger komplexes Linsensystem der effektiven Brennweite f_{Ok} – auf das Zwischenbild O'' abgebildet. Das Okular ist nun so montiert, dass sich das Zwischenbild O' gerade im gegenstandsseitigen Brennpunkt des Okulars befindet. Daher liegt O'' im bildseitigen Unendlichen und kann mit dem entspannten Auge bei minimaler Anstrengung betrachtet werden, das Okular wirkt als Lupe.



(a) Telezentrischer Strahlengang



(b) Durchlichtbeleuchtung eines Mikroskops



(c) Bildentstehung nach Abbe

Abbildung 4.2: Erläuterungen siehe Text, nach [BERGMANN und SCHÄFER 1993].

Die Vergrößerung des Systems aus Objektiv und Okular ergibt sich als Produkt der Objektiv- und Okularvergrößerung zu [BERGMANN und SCHÄFER 1993]

$$\beta = \beta_{Obj}\beta_{Ok} = (-t_0/f_{Obj})(-s_0/f_{Ok}) = -s_0/f_M. \quad (4.1)$$

$s_0 = 250$ mm ist dabei die sogenannte Bezugssehweite, $(-s_0/f)$ die Vergrößerung einer Lupe mit Brennweite f und $(-t_0/f_{Obj}) = (-b'/f)$ die Vergrößerung einer Linsenabbildung mit der bildseitigen Brennpunktweite $b' = b - f$ und der Brennweite f . $t_0 = b'$ wird im Fall des Mikroskops auch „optische Tubuslänge“ genannt. Die letzte Umformung der Gleichung (4.1) soll zeigen, dass man ein Mikroskop auch als Lupe mit der negativen Brennweite $f_M = f_{Obj}f_{Ok}/t_0$ auffassen kann.

Der abgebildete Ausschnitt des Objektes, das „Gesichtsfeld“, wird durch die Gesichtsfeldblende begrenzt, die mit „GB“ in Abbildung (4.1(a)) gekennzeichnet ist. Ihre Wirkung ergibt sich durch Rückabbildung ihrer Umrandung in die Objektebene. Analog wird das wirksame Strahlbündel jedes Objektpunktes durch die Aperturblende „AB“ begrenzt. Die Wirkung einer rotationssymmetrischen Aperturblende ergibt sich daraus, dass die zentralen Hauptstrahlen jedes Abbildungsstrahlbündels sich in der Mitte der Aperturblende schneiden. Wie die Gesichtsfeldblende kann die Aperturblende in den Objektraum und in den Bildraum abgebildet werden, sie heißt dort dann „Eintrittspupille“, „EP“, und „Austrittspupille“, „AP“. Eine besonders wichtige Konfiguration ist dabei der *telezentrische* Strahlengang: Hier befindet sich die Aperturblende im bildseitigen Brennpunkt des Objektivs, die Eintrittspupille befindet sich daher im gegenstandsseitigen Unendlichen. Da sich die Hauptstrahlen der objektseitig wirksamen Strahlkegel dort schneiden, liegen diese alle parallel zur optischen Achse. Damit besitzen die Strahlkegel alle die gleiche Größe und Orientierung, vergleiche Abbildung (4.2(a)), und sind damit bezüglich Streuung oder Abschwächung durch das Objekt gleichen Bedingungen unterworfen.

Mit Hilfe des telezentrischen Strahlengangs kann auch die numerische Apertur eines Objektivs festgelegt werden: Man versteht darunter die numerische Apertur der Randstrahlen des objektseitig wirksamen Strahlbündels, vergleiche Kapitel 3.2.

Durch Verschieben des Objektes wird ausgewählt, welche Ebene des Objekts mit der Gegenstandsebene O zusammenfällt und abgebildet wird. Dabei wird von Mikroskopen Parfokalität gefordert, das bedeutet, dass die gewählte Ebene bei Wechsel des Objektivs scharfgestellt bleiben muss. Aus dem so feststehenden Abstand $\overline{OO'}$ ergibt sich dann bei gewählter Objektivvergrößerung eine bestimmte Objektivbrennweite.

Etwas flexibler ist die in modernen Mikroskopen realisierte „Unendlich“-Optik. Dabei wird das Linsensystem des Objektivs aus Abbildung (4.1(a)) in

ein Objektiv und eine Tubuslinse aufgeteilt. Das Objektiv ist für die Tubuslänge $t_0 = \infty$ eingerichtet, so dass der Strahlengang zwischen Objektiv und Tubuslinse parallel ausgerichtet ist, siehe Abbildung (4.1(b)). Die Tubuslinse ist fest im Mikroskopstativ integriert. Diese Konfiguration erfüllt die Parfokalität, außerdem kann die Fokussierung nun auch durch eine Verschiebung des Objektivs erreicht werden. Darüber hinaus eignet sich der parallele Strahlengang zur abbildungsfehlerminimierenden Montage von Filtern, Strahlteilern oder dichromatischen Spiegeln. Die Vergrößerung des Objektiv-Tubuslinsensystems ergibt sich einfach als Verhältnis der beiden (effektiven) Brennweiten, also

$$\beta'_{Obj} = f_{TL}/f'_{Obj}. \quad (4.2)$$

Bei einer Vergrößerung um den Faktor β nimmt die Beleuchtungsintensität um $1/\beta^2$ ab, so dass die Objekte nicht bei normalem Tageslicht beobachtet werden können, sondern zusätzlich beleuchtet werden müssen. Dies wird in der regulären Durchlichtmikroskopie so realisiert, dass gegenüber dem Beobachtungsstrahlengang ein Beleuchtungsstrahlengang installiert wird. Die Abbildung (4.2(b)) zeigt den Aufbau eines solchen Beleuchtungsstrahlengangs:

Das Licht beispielsweise einer Halogenlampe wird durch eine Kollektorlinse auf den Brennpunkt der Kondensorlinse abgebildet, so dass diese das Beleuchtungslicht parallel auf das Objekt O einstrahlt. Damit wird vermieden, dass Details der Lampe, zum Beispiel eine Glühwendel, im Objekt erscheinen. Die Leuchtfeldblende – in der Abbildung (4.2(b)) mit „ LB “ bezeichnet – ist so angeordnet, dass sie in die Objektebene abgebildet wird. Sie dient zur Begrenzung des ausgeleuchteten Objektfeldes. Die Aperturblende „ AP “ hingegen fällt mit der Aperturblende des Beobachtungssystems zusammen. Mit ihrer Hilfe wird die Größe des wirksamen „Beleuchtungszyinders“, also die Beleuchtungsintensität festgelegt. Analog zum Objektiv wird eine numerische Apertur des Kondensors definiert, die der maximal erreichbaren numerischen Apertur der Beleuchtungsrandstrahlen am Ort der Aperturblende entspricht. Die Aperturblende dient also zur Begrenzung der wirksamen numerischen Apertur des Kondensors.

Wegen der Wellennatur des Lichts ist die Auflösung eines Mikroskops nicht beliebig groß. Bei der Ableitung des Auflösungsvermögens eines Mikroskops nach Ernst Abbe (Abbildung 4.2(c)) wird davon ausgegangen, dass die im Idealfall unendlich entfernte Lichtquelle L das Objekt kohärent mit Licht der Wellenlänge λ beleuchtet. Das Objekt selbst wird als Streugitter mit der Gitterkonstanten d aufgefasst. Von den Streuzentren – in Abbildung 4.2(c) sind zwei mit P und Q gekennzeichnet – gehen neben den Strahlen nullter Ordnung auch Strahlen höherer Ordnung m aus, die den Winkel $\phi_m = \arcsin(m\lambda/ns)$ mit der opti-

schen Achse bilden [GERTHSEN und VOGEL 1993]. n ist der Brechungsindex im Raum zwischen Objekt und Objektiv, zum Beispiel einer Immersionsflüssigkeit. Im bildseitigen Brennpunkt des Objektivs entsteht das Beugungsbild der Lichtquelle, das *primäre Bild*, in der Ebene bei P' und Q' das reale Bild des Objektes, das Abbe *sekundäres Bild* nennt. Damit im sekundären Bild Strukturen entstehen, müssen mindestens die Strahlen erster Ordnung durch das Objektiv abgebildet werden, das heißt, es muss eine primäre Bildstruktur existieren. Da mit sinkendem Gitterabstand s der Winkel ϕ_1 wächst, existiert ein minimaler Gitter- bzw. Objektabstand $s_{min} = \lambda/n \sin \phi_1$, bei dem gerade noch eine primäre Bildstruktur entsteht. $n \sin \phi_1$ kann mit der numerischen Apertur NA des Objektivs identifiziert werden und man erhält das Auflösungsvermögen

$$U = \frac{1}{s_{min}} = \frac{NA}{\lambda}. \quad (4.3)$$

Der entgegengesetzte Fall der Abbildung von selbstleuchtenden Objekten ergibt sich aus der Beugungstheorie und wurde zuerst von Hermann von Helmholtz berechnet. Zunächst betrachtet man die Fraunhofersche Beugung einer ebenen Welle an einer Blende: Von den Punkten innerhalb der Blendenöffnung geht nach dem Prinzip von Huygens jeweils eine sekundäre Kugelwelle aus. Betrachtet man die Ausbreitung dieser Kugelwellen in einem bestimmten Winkel ϕ zur optischen Achse und begibt sich in einen unendlich entfernten Punkt, so sind diese Kugelwellen dort mit ebenen Wellen identisch und interferieren zu einem Beugungsbild. Dieses virtuelle Bild kann durch Einfügen einer Linse mit der Brennweite f auf einen Schirm in die Fokalebene der Linse abgebildet werden, wobei die „Richtungsordinate“ ϕ über $\sin(\phi) = x/f$ in eine „normale“ Ortskoordinate x transformiert wird.

Im allgemeinen zeigt sich, dass die Verteilung des elektrischen Feldes $\vec{E}(\xi, \eta)$ in der Blendenöffnung mit der Feldverteilung $\vec{E}(x, y)$ auf dem Schirm über eine Fouriertransformation zusammenhängt. Speziell für den Fall einer kreisförmigen Blende mit dem Radius R erhält man eine radiale Intensitätsverteilung der Form [WILSON 1990]

$$I(\nu) \propto \left(\frac{J_1(\nu)}{\nu} \right)^2 \quad (4.4)$$

$$\nu = \frac{2\pi n R r}{\lambda f}$$

wobei $J_1(\cdot)$ die Besselfunktion 1. Ordnung bezeichnet. Der Radius r_1 des zentralen Beugungsscheibchens ergibt sich aus der ersten Nullstelle der Besselfunktion zu

$$r_1 = 0,61 \frac{\lambda f}{nR} \quad (4.5)$$

Bei mikroskopischen Punktabbildungen ist es üblich, den Radius des Beugungsscheibchens in die Objektebene zurückzuprojizieren, so dass man ein Maß für die „Beugungsverschmierung“ und damit für das Auflösungsvermögen in Objektkoordinaten erhält. Führt man dies aus, erhält man den in Gleichung (4.5) angegebenen Radius für das Beugungsscheibchen einer Punktlichtquelle. Man sieht dies wie folgt: Da sich die Punktlichtquelle im objektseitigen Brennpunkt des Objektivs befindet, vergleiche Abbildung (4.1(b)), wird das von ihr ausgehende Strahlbündel in ein paralleles Strahlbündel und damit eine ebene Welle abgebildet. Der Radius des Objektivs wirkt dabei als Blendenbegrenzung. Diese ebene Welle denke man sich durch ein gleiches Objektiv auf einen Schirm abgebildet, wobei der Abstand der beiden Blendenöffnungen gegen die im Unendlichen stattfindende Interferenz vernachlässigt werden kann.

Gleichung (4.4) bezeichnet man dann als laterale Punktabbildungsfunktion oder „point spread function“ – kurz PSF – des mikroskopischen Systems mit ν als normalisierter lateraler Koordinate. Durch eine analoge Analyse erhält man auch eine PSF in axialer Richtung [WILSON 1990]. Identifiziert man nR/f mit der numerischen Apertur des Objektivs, $NA = n \sin(\alpha)$, erhalten die laterale und axiale PSF, unter Wiederholung der Gleichung 4.4, die folgende Form:

$$I(\nu) \propto \left(\frac{J_1(\nu)}{\nu} \right)^2 \quad (4.6)$$

$$I(u) \propto \left(\frac{\sin(u)}{u} \right)^2 \quad (4.7)$$

$$\nu = \frac{2\pi}{\lambda} n \sin(\alpha) r$$

$$u = \frac{2\pi}{\lambda} n \sin^2(\alpha) / 2z$$

Analog bezeichnet hierbei u die normalisierte axiale Koordinate. Zwei Punktlichtquellen gelten nun als unterscheidbar, wenn ihr Abstand größer dem doppelten Radius $2r_1 = 1,22 \frac{\lambda}{NA}$ ist. Das Auflösungsvermögen ist dann entsprechend zu Gleichung (4.3)

$$U = \frac{1}{2r_1} = 0,82 \frac{NA}{\lambda}. \quad (4.8)$$

Dies stimmt bis auf den Vorfaktor mit dem für Nichtselbststrahler gewonnenen Wert überein. Da bei einer Vergrößerung β die abgebildete Lichtintensität

$I \propto (NA)^2 / \beta^2$ ist, sollte sowohl zur Maximierung des Auflösungsvermögens wie der abgebildeten Lichtintensität eine möglichst hohe numerische Apertur gewählt werden.

4.2 Fluoreszenz

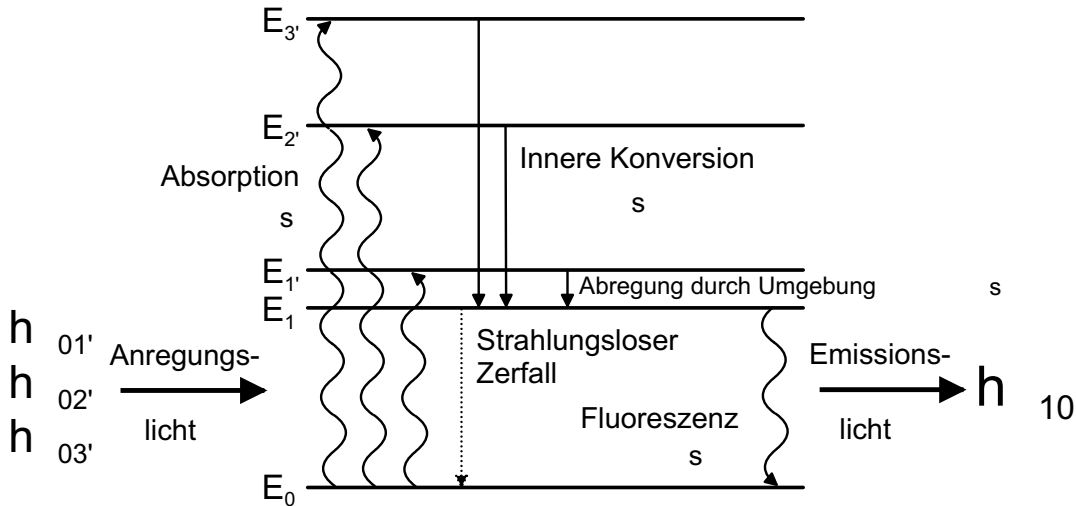


Abbildung 4.3: Beispiel für ein Energiespektrums eines Fluoreszenzmoleküls (*Jablonski Diagramm*): Ein eingestrahktes Photon mit „passender“ Energie $h\nu_{on'}$ regt das Molekül an. Dieser Prozess spielt sich typisch in einer Größenordnung von $\tau_\alpha \approx 10^{-15}\text{s}$ ab. Über innere Konversion ($\tau_i \approx 10^{-12}\text{s}$) oder Abregung durch die Umgebungsmoleküle ($\tau_p \approx 10^{-11}\text{s}$) gelangt das Molekül in einen unteren angeregten Zustand. Von dort kann die Abregung in den Grundzustand strahlungslos oder mit der Emission eines Fluoreszenzphotons verbunden sein [LAKOWICZ 1983].

Atome und Moleküle treten mit elektromagnetischen Wellen in Wechselwirkung und können dabei Photonen absorbieren und emittieren. Die Energie der Photonen $h\nu$, mit der Planckkonstante $h \approx 6,62517 \cdot 10^{-34}\text{Js}$ und der Photonenfrequenz $\nu = c/\lambda$, wird dabei in der Regel von der Elektronenschale des Moleküls aufgenommen und abgegeben. Aus der Quantenmechanik ergibt sich, dass das Elektronensystem nur gewisse diskrete Energiezustände annehmen kann. Der Grundzustand E_0 und die angeregten Zustände E_1, E_2, \dots , sind durch feste energetische Abstände voneinander getrennt. Damit kann ein Molekül nur bestimmte Photonen bestimmter Wellenlängen absorbieren und emittieren und man erhält molekülspezifische Absorptions- und Emissionspektren. Diese sind bei komple-

xeren Molekülen allerdings oft kontinuierlich, da sich die Dichte der möglichen Energiezustände mit zunehmender Elektronendichte erhöht.

Der energetische Übergang zwischen zwei Zuständen muss allerdings nicht mit Photonenabsorption oder -emission verbunden sein. Das Elektronensystem kann auch durch *innere Konversion* abgeregt werden. Wichtig ist außerdem, dass ein angeregter Zustand E_n in mehreren Schritten abgeregt werden kann, wenn dafür entsprechende Zwischenzustände $E_0 < E_{m1} < E_{m2} < \dots < E_n$ zur Verfügung stehen. Bei jedem dieser Schritte kann, soweit es von den quantenmechanischen Auswahlregeln gestattet ist, ein Photon der Energie $\Delta E_{xy} = E_x - E_y$ mit $\Delta E_{xy} > 0$ und $x, y \in \{0, m1, m2, \dots, n\}$ abgestrahlt werden. Man spricht dann von *Fluoreszenz*, wenn die Emmission „unmittelbar“ – real innerhalb von $\approx 10^{-8}$ Sekunden – nach der Photonenabsorption stattfindet. Bei einer größeren zeitlichen Verzögerung spricht man von *Phosphoreszenz*, beide Effekte werden unter dem Begriff *Lumineszenz* zusammengefasst.

Wegen der Energieerhaltung muss die Frequenz ν_{xy} eines emittierten Fluoreszenzphotons immer kleiner sein als die Frequenz ν_{0n} des anregenden Lichts. Entsprechend erhält man eine Verschiebung der abgestrahlten Wellenlänge λ_{xy} zu längeren Wellenlängen hin:

$$\begin{aligned} \lambda_{0n} &= \frac{c}{\nu_{0n}} = \frac{hc}{E_n - E_0} \\ &< \frac{hc}{E_{xy}} = \frac{c}{\nu_{xy}} = \lambda_{xy} \end{aligned} \quad (4.9)$$

Diese *Stokesverschiebung* ermöglicht es, Fluoreszenzlicht durch wellenlängenabhängige Filter vom starken Anregungshintergrund zu trennen und zu detektieren. Da darüber hinaus das Absorptions- oder Emissionsspektrum eines Fluoreszenzfarbstoffs vom physikalischen oder chemischen Zustand beeinflusst werden kann – pH, Bindung an bestimmte Ionen, elektrische Felder –, kann Fluoreszenz als optischer Detektor für diese Größen eingesetzt werden.

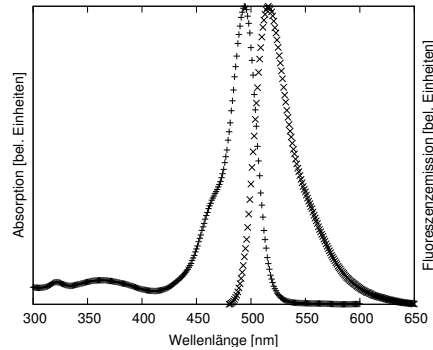


Abbildung 4.4: Absorptions- und Emissionsspektrum des gesättigten Kalziumindikator Fluo-4 bei pH= 7,2: Das Absorptionsmaximum liegt bei etwa 494 nm, das Emissionsmaximum bei ≈ 516 nm. Die Daten wurden der Website von Molecular Probes, Inc., Eugene, OR, USA, entnommen (<http://www.probes.com/>).

Die Abbildung (4.3) demonstriert den Verlauf eines Fluoreszenzvorgangs: Licht mit „passenden“ Frequenzen $\nu_{01'}, \nu_{02'}, \dots$ regt das Fluoreszenzmolekül in einen höheren Vibrationszustand $E_{1'}, E_{2'}, \dots$ an (dies folgt aus der (Dreh)impulserhaltung). Dieser Absorptionsprozess läuft zeitlich in einer Größenordnung von $\approx 10^{-15}$ Sekunden ab. Innere Konversion oder strahlungsloser Energietransfer an die umgebende Lösung folgt innerhalb der nächsten 10^{-11} bis 10^{-12} Sekunden, das Molekül befindet sich dann im untersten Vibrationszustand E_1 . Von dort regt es sich entweder durch strahlungslosen Zerfall oder unter Aussendung eines Fluoreszenzphotons in den Grundzustand ab. Das Fluoreszenzphoton und das anregende Photon besitzen dabei keinerlei Phasenbeziehung, Fluoreszenz ist ein inkohärenter Prozess ohne Vorzugsrichtung.

Für eine quantitative Beschreibung der Fluoreszenz werden die folgenden Größen benötigt: Der *Extinktionskoeffizienten* $\epsilon(\lambda)$ als Maß für die Wahrscheinlichkeit, dass ein Photon der Wellenlänge λ absorbiert wird, die *Konzentration* c des Fluoreszenzfarbstoffs in der umgebenden Lösung, die *Quanteneffizienz* q als Verhältnis von emittierten und absorbierten Photonen und die *Sensitivität* s , die durch $s(\lambda) = \epsilon(\lambda)q$ definiert ist. Die Quanteneffizienz q erhält man aus den Übergangsraten σ und k für Fluoreszenz und strahlungslosen Zerfall:

$$q \approx \frac{\sigma}{k + \sigma} = \sigma\tau_0 \quad (4.10)$$

wobei $\tau_0 = 1/(k + \sigma)$ die Lebensdauer des angeregten Fluoreszenzmoleküls ist.

Wenn der Fluoreszenzfarbstoff mit einer bestimmten, nicht allzuhohen Konzentration c in einem Lösungsmittel gelöst ist, erhält man bei der Einstrahlung eines Anregungslichtstrahls der Länge l und Intensität I_0 die Fluoreszenzintensität F mit

$$F = I_0 \cdot \epsilon(\lambda)q \cdot l \cdot Q \cdot c = f \cdot c. \quad (4.11)$$

In diesem Gesetz von *Lambert-Beer* ist Q die Geräteempfindlichkeit, so dass $1 - Q$ denjenigen Lichtanteil darstellt, der von der (Mikroskop-)Optik absorbiert oder während der Detektion verloren geht. f bezeichnet die molare Fluoreszenzintensität.

Die Relation in Gleichung (4.11) verliert ihre Gültigkeit, wenn die Konzentration c oder die Strahllänge l eine gewisse Größe überschreiten (innerer Filtereffekt): Zum einen schwächt das Lösungsmittel das Fluoreszenzlicht ab, zum anderen kann nach dem Kirchhoffschen Gesetz der Absorption und Emission ein Fluoreszenzphoton durch die Fluoreszenzmoleküle selbst wieder absorbiert werden. Darüber hinaus kann das Fluoreszenzlicht durch „Quenchen“ abgeschwächt

werden: Darunter versteht man die Interaktion des angeregten Fluoreszenzfarbstoffs mit anderen, ebenfalls in der Lösung vorhandenen Molekülen (oder mit dem Lösungsmittel selbst), die bei dem Fluoreszenzmolekül eine strahlungsfreie Abregung induzieren. Der „quenching“-Effekt führt zu einer Abänderung der Lebensdauer des angeregten Fluoreszenzfarbstoffs:

$$\tau_0 \rightarrow \tau = \frac{\tau_0}{1 + K_q \cdot c_q}, \quad (4.12)$$

wobei mit K_q eine für das quenchende Molekül spezifische Konstante bezeichnet wird. c_q ist die Konzentration dieses quenchenden Moleküls. Entsprechend erhält man die folgende *Stern-Vollmer-Gleichung* für die Fluoreszenzintensität [LAKOWICZ 1983]:

$$F_f(c_q) = \frac{F}{1 + K_q \cdot c_q} \quad (4.13)$$

Wenn die Intensität des Anregungslichts zu groß wird, kann das Farbstoffmolekül temporär oder endgültig zerstört werden. Dieser Ausbleicheffekt tritt häufig dann auf, wenn versucht wird, die Fluoreszenzintensität durch eine erhöhte Anregungsintensität zu optimieren. In diesen Fällen ist es daher besser zu versuchen, die Emissionsdetektion zu verbessern. Neben dem Farbstoff können auch biologischen Proben – diese werden häufig mit Fluoreszenztechniken untersucht – in Mitleidenschaft gezogen werden [NIEMZ 1996]. Dieser Effekt der Fotoschädigung hängt von den spektralen Absorptionseigenschaften der Probe ab. Als Faustregel gilt andererseits, dass die Fotoschädigung bei erhöhter Lichtleistung und kürzeren Wellenlängen zunimmt. Letzteres ergibt sich unter anderem auch dadurch, dass bei Strahlung kürzerer Wellenlänge die Eindringtiefe abnimmt, die absorbierte Lichtleistung also in einem kleineren Volumen deponiert wird.

Oben wurde bereits erwähnt, dass die Fluoreszenzeigenschaften eines Farbstoffmoleküls von seinem physikalischen oder chemischen Zustand abhängen kann. Zu letzterem zählt beispielsweise auch die Bindung von Ionen an das Farbstoffmolekül. Dieser Effekt kann zur Messung von Ionenkonzentrationen in Lösungen ausgenutzt werden. Bei der Ableitung dieser Abhängigkeit von gemessener Fluoreszenzintensität F und freier Ionenkonzentration $[Me]_{\text{free}}$ geht man vereinfachend davon aus, dass jedes Farbstoffmolekül nur ein Ion zu binden vermag, also nur zwei Zustände existieren, ionengebunden und ionenfrei, die jeweils mit den Konzentrationen $[FsMe]$ und $[Fs]$ in der Lösung vorhanden seien. Geht man weiter davon aus, dass die Einzelreaktionen unabhängig voneinander ablaufen, ist die zeitliche Veränderung der Konzentrationen jeweils nur proportional zu den Konzentrationen von Edukten und Produkten [HOLLEMAN und WIBERG 1964]:

$$\begin{aligned}\frac{d}{dt} [F s M e] &= -\frac{d}{dt} [F s] = -\frac{d}{dt} [M e]_{\text{free}} \\ &= k_{\text{on}} [F s] [M e]_{\text{free}} - k_{\text{off}} [F s M e]\end{aligned}\quad (4.14)$$

k_{on} und k_{off} sind dabei die Ratenkonstanten der Reaktion. Befindet sich diese in einem dynamischen chemischen Gleichgewicht, $\frac{d}{dt} [F s M e] = -\frac{d}{dt} [F s] = -\frac{d}{dt} [M e]_{\text{free}} = 0$, erhält man das Massenwirkungsgesetz

$$\frac{[F s] [M e]_{\text{free}}}{[F s M e]} = \frac{k_{\text{off}}}{k_{\text{on}}} = K_D \quad (4.15)$$

mit der Dissoziationskonstante des Farbstoffs, K_D . Das gemessene Fluoreszenzsignal F setzt sich aus Fluoreszenzlicht des ionenfreien wie des ionengebundenen Farbstoffs zusammen, $F = f_{\text{Fs}} [F s] + f_{\text{FsMe}} [F s M e]$. f_{Fs} und f_{FsMe} sind dabei die molaren Fluoreszenzintensitäten, vergleiche Gleichung (4.11). Mit einer vollständig ionenfreien Lösung erhält man die Fluoreszenzintensität $F_{\text{min}} = f_{\text{Fs}} [F s]_{\text{tot}}$, in einer vollständig ionengesättigten Lösung $F_{\text{max}} = f_{\text{FsMe}} [F s]_{\text{tot}}$. Dabei ist $[F s]_{\text{tot}} = [F s] + [F s M e]$ die totale Farbstoffkonzentration. Sind F_{min} und F_{max} bekannt, kann die zu einer gemessenen Fluoreszenzintensität F gehörende freie Ionenkonzentration $[M e]_{\text{free}}$ ermittelt werden:

$$\begin{aligned}[M e]_{\text{free}} &= K_D \frac{[F s M e]}{[F s]} \\ &= K_D \frac{[F s M e] (f_{\text{FsMe}} - f_{\text{Fs}})}{[F s] (f_{\text{FsMe}} - f_{\text{Fs}})} \\ &= K_D \frac{f_{\text{FsMe}} [F s M e] + f_{\text{Fs}} [F s] - f_{\text{Fs}} ([F s M e] + [F s])}{f_{\text{Fs}} ([F s M e] + [F s]) - (f_{\text{FsMe}} [F s M e] + f_{\text{Fs}} [F s])} \\ &= K_D \frac{F - F_{\text{min}}}{F_{\text{max}} - F}\end{aligned}\quad (4.16)$$

Werte für die Dissoziationskonstante K_D können zwar der Literatur entnommen werden, sie sollten jedoch experimentell mit bekannten Ionenkonzentrationen bestimmt werden, da sich in biologischen Proben deutliche Abweichungen ergeben können [HAUGLAND 1999]. Dies liegt unter anderem auch daran, dass in diesen Proben verschiedenste Puffer und Komplexbildner vorliegen können. Eine quantitative Analyse ist dann häufig nur noch numerisch möglich, siehe zum Beispiel bei Uttenweiler et al. [UTTENWEILER et al. 1998].

Kalzium ist einer der „vielseitigsten und universellsten Signalgeber“ [BERRIDGE et al. 1998, BERRIDGE et al. 2003]. Dies trifft natürlich auch auf Muskelzellen und Motorproteine zu, bei denen die Kontraktion durch Kalziumionen

gestartet und reguliert wird, vergleiche Kapitel 2.2. Entsprechend wichtig sind Farbstoffe, mit denen die lokale Kalziumkonzentration gemessen werden kann. Häufig werden hierfür ratiometrische Farbstoffe wie *Indo-1* oder *Fura-2* eingesetzt [GRYNKIEWICZ et al. 1985]. Bei den im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Anwendungen ist vor allem der nichtratiometrische Farbstoff *Fluo-4* von Interesse [mol 2003]: Im Gegensatz zu *Fura-2*, der im nahen UV-Bereich angeregt wird – 340 nm und 380 nm – kann er durch sichtbares Licht angeregt werden, da das Absorptionsmaximum bei etwa 494 nm liegt. Da dies mit der 488 nm Laserlinie des Argon-Lasers zusammenfällt, siehe Abbildung (4.4), bietet es sich an, *Fluo-4* als Kalziumindikator in der konfokalen Laserscanningmikroskopie einzusetzen. Bei Bindung an ein Kalziumion erhöht sich die Fluoreszenzintensität um einen Faktor $F_{\max}/F_{\min} > 100$.

4.3 Konfokalmikroskopie

Das Panel A der Abbildung (4.5) zeigt den Aufbau eines Epifluoreszenzmikroskops: Als Lichtquelle dient meist eine helle Xenon- oder Quecksilberdampfampe. Das Wellenlängenspektrum dieses Lichts enthält mehrere Maxima (Abbildung 6.3). Um eine unnötig helle Beleuchtung des Präparats zu vermeiden, wird das Licht durch einen Anregungsfilter auf das Absorptionsspektrum des verwendeten Fluoreszenzfarbstoffs eingegrenzt. Nach Passieren eines dichromatischen Spiegels wird es mit dem Objektiv fokussiert und beleuchtet die gesamte Objektebene. Die inkohärent erzeugten Fluoreszenzphotonen werden durch dasselbe Objektiv gesammelt. Der dichromatische Spiegel und ein Emissionsfilter trennen das Fluoreszenzlicht vom Anregungslicht und leiten es zum Beispiel auf eine CCD-Kamera, vergleiche Kapitel 5.2.

Die laterale Auflösung der Epifluoreszenzmikroskopie entspricht der der Lichtmikroskopie, siehe Kapitel 4.1. Auch die axiale PSF besitzt dieselbe Form. Allerdings ist diese axiale PSF nur begrenzt zur Beschreibung des axialen Auflösungsvermögens geeignet. Betrachtet man den Beleuchtungslichtkegel zwischen Objektiv und Objekt-ebene, stellt man fest, dass Fluoreszenz nicht nur in der Objektebene angeregt wird. Die Anregungslichtintensität in einer Ebene, die um Δz gegenüber der Objektebene verschoben ist, ist zwar um einen Faktor $(\Delta z)^{-2}$ abgeschwächt. Der beleuchtete Flächenanteil steigt jedoch um den gleichen Faktor, so dass, eine homogene Farbstoffkonzentration im Volumen vorausgesetzt, jede Ebene einen gleichen Beitrag zum Fluoreszenzlicht liefert. Licht- und Epifluoreszenzmikroskopie besitzen keine axiale Kontrastdiskriminierung.

Einen Ausweg bietet die Konfokalmikroskopie, vergleiche Panel B der Abbil-

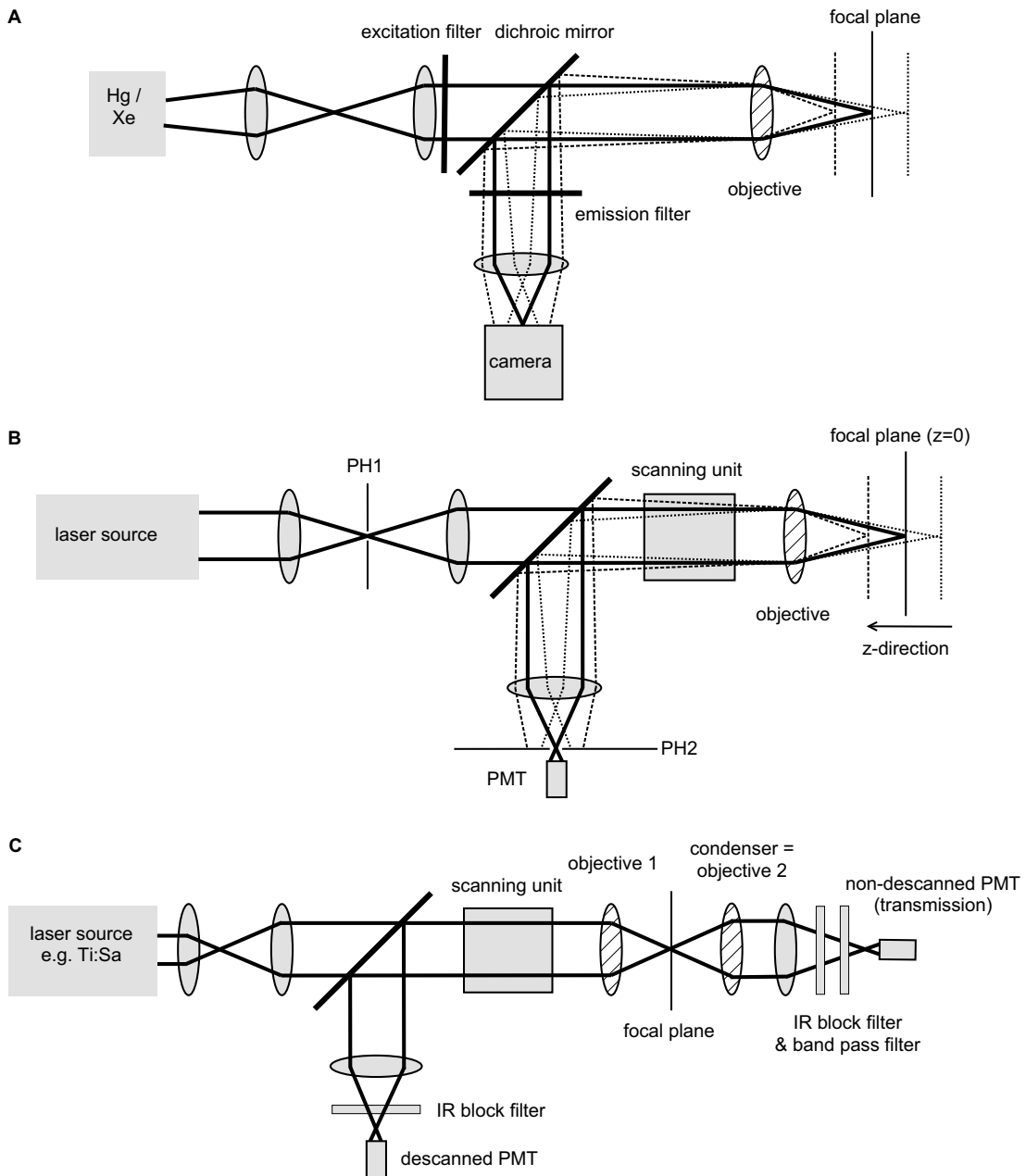


Abbildung 4.5: Techniken der Fluoreszenzmikroskopie **A** Konventionelle Epifluoreszenzmikroskopie **B** Konfokale Laserscanning Fluoreszenzmikroskopie **C** Multiphoton Laserscanning Fluoreszenzmikroskopie Beschreibung s. Text, nach D. Uttenweiler [UTTENWEILER 2003].

dung (4.5). Ein Pinhole im Emissionslichtpfad sorgt dafür, dass Licht von Nichtfokalebene nicht auf den Detektor fällt. Würde man in ein Epifluoreszenzmikroskop jedoch einfach ein Pinhole einbauen, wäre wenig gewonnen, da so nur

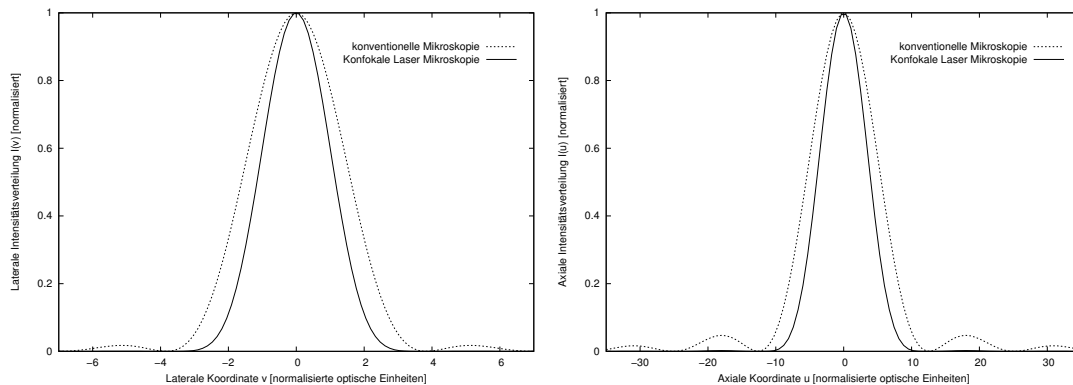


Abbildung 4.6: Laterale (links) und axiale (rechts) Punktabbildungsfunktion des konventionellen und des Konfokalmikroskops, ausgedrückt in normalisierten, systemunabhängigen lateralen und axialen Koordinaten ν und v .

ein Objektpunkt abgebildet wird. Man kann nun aber das Präparat über diesen Objektpunkt laufen lassen und so ein Bild zusammensetzen.

Alternativ dazu bietet es sich an, nur einen Punkt zu beleuchten und mit diesem Punkt das Objekt abzuscannen, wie es in Abbildung (4.5) dargestellt ist. Als Lichtquelle setzt man nun Laser ein, da sich mit diesen beugungsbegrenzte Foki herstellen lassen. Diesem Zweck dient auch das Beleuchtungspinhole PH1. Der Laserstrahl wird aufgeweitet, über eine Scanspiegeleinheit abgelenkt und mit dem Objektiv in die Objektebene nach Gleichung (3.37) abgebildet. Da das Fluoreszenzlicht über die Scanspiegeleinheit zurückläuft, kann vor den Detektor ein ortsfestes Pinhole PH2 montiert werden. Da die Fluoreszenzlichtausbeute hier geringer ist als bei der Epifluoreszenz, werden in der Regel Photomultiplier als Photodetektoren eingesetzt, vergleiche Kapitel 5.3. Die Zuordnung von Signal und Bildpunkt erfolgt dann durch die Systemsoftware, die auch die Scanspiegeleinheit ansteuert.

Da bei diesem Laserscanning-Konfokalprinzip bereits die Punktlichtquelle durch das optische System abgebildet und damit durch die PSF des Systems gefaltet wird, erhält man als Gesamt-Punktabbildungsfunktion das Quadrat der in Gleichung (4.6) angegebenen Funktionen [WILSON 1990]:

$$I(\nu) \propto \left(\frac{J_1(\nu)}{\nu} \right)^4 \quad (4.17)$$

$$I(u) \propto \left(\frac{\sin(u)}{u} \right)^4 \quad (4.18)$$

wobei ν und u wiederum die normalisierte laterale und axiale Koordinate

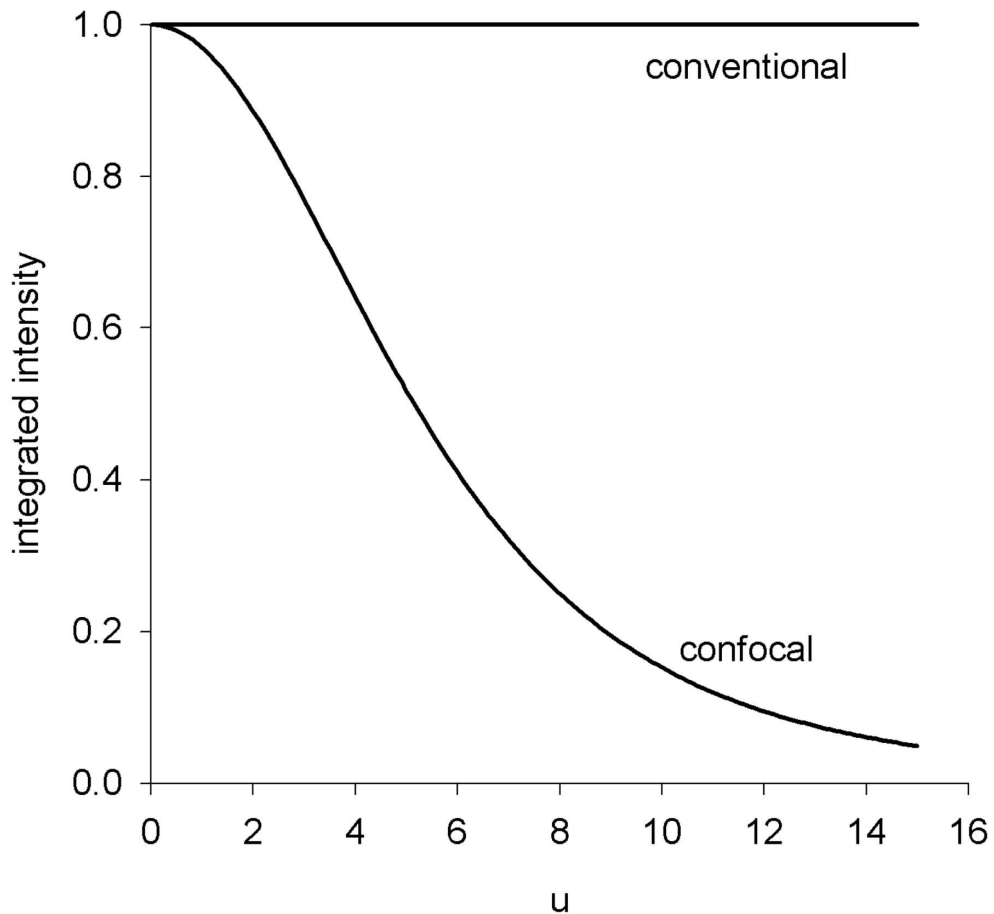


Abbildung 4.7: Integrierte Intensitätsverteilung in Abhängigkeit von der normierten axialen Koordinate u . Während im konventionellen Fall jede Ebene den gleichen Beitrag liefert, sind die Beiträge von Ebenen nahe der Fokalebene im konfokalen Fall stärker gewichtet [WILSON 1990].

bezeichnen. In Abbildung (4.6) sind beide Fälle dargestellt. Der „Radius“ dieser Funktionen, das heißt der Abstand vom zentralen Maximum zum Ort des halben Maximalwertes, ist gegenüber dem konventionellen Fall um einen Faktor ≈ 1.4 kleiner. Entsprechend erhält man auch eine um diesen Faktor verbesserte laterale Auflösung. Die oben angegebenen Punktabbildungsfunktionen gelten streng nur für punktförmige Pinholes, denn mit steigendem Öffnungsdurchmesser muss sich die PSF wieder an den konventionellen Fall angleichen. Man kann jedoch zeigen,

dass die Form der PSF im lateralen Fall bei Pinholedurchmessern

$$d_p \leq \frac{\lambda \cdot M}{2\pi \cdot \text{NA}} \quad (4.19)$$

und im axialen Fall bei Pinholedurchmessern

$$d_p \leq \frac{5\lambda \cdot M}{2\pi \cdot \text{NA}} \quad (4.20)$$

erhalten bleibt, wobei M die Gesamtvergrößerung des optischen Systems ist [WILSON und CARLINI 1987, WILSON 1995]. Zur Illustration der bereits oben erwähnten axialen Kontrastdiskriminierung betrachtet man die integrierte Intensitätsverteilung,

$$I_\Sigma(u) = \int_0^\infty I(u, v) v dv, \quad (4.21)$$

als Maß für die Fluoreszenzbeiträge jeder u - bzw. z -Ebene [WILSON 1990]. Im konfokalen Fall, vergleiche Abbildung (4.7), sind Ebenen, die weiter von der Brennebene entfernt sind, deutlich geringer gewichtet. Daher ist es mit Konfokalmikroskopie möglich, ein Objekt auch in z -Richtung abzuscanen. Man erreicht dies entweder durch Verschieben des Objektivs oder durch Verschieben des Objektes mit Hilfe eines Piezoelements.

4.4 Multiphotonmikroskopie

4.4.1 Multiphotonfluoreszenz

Die Wechselwirkung eines Moleküls mit einem elektromagnetischen Feld kann quantenmechanisch beschrieben werden, indem man einen Wechselwirkungsterm zum Hamiltonoperator des Systems hinzufügt. Analytisch wird dieser neue Term als „Störung“ aufgefasst, die zu einem bestimmten Zeitpunkt $t = t_0$ eingeschaltet wird. Wenn man den Störterm nach „kleinen“ Zeitintervallen entwickelt, erhält man zunächst Terme erster Ordnung, die die Absorption und Emission einzelner Photonen beschreiben.

Betrachtet man jedoch die restlichen, nichtlinearen Terme zweiter und höherer Ordnung, ergibt sich, dass die simultane Absorption und Emission von zwei oder mehr Photonen möglich sein sollte, solange die Summe der Photonenenergien der Energie des äquivalenten Einzelphotonprozesses entspricht, $\Delta E_{xy} = h\nu_1 + h\nu_2 + \dots$. Die theoretische Beschreibung dieser Mehrphotonenprozesse geht auf Maria Göppert-Mayer zurück [GÖPPERT 1929, GÖPPERT-MAYER 1931].

In der Praxis werden Mehrphotonenprozesse üblicherweise so realisiert, dass alle beteiligten Photonen dieselbe Energie besitzen. Da jedoch der Wirkungsquerschnitt zum Beispiel für eine Zweiphotonenabsorption verglichen mit dem für Einzelphotonabsorption enorm klein ist — typische Werte liegen bei $\sigma_1 = 10^{-16} \text{cm}^2$ und $\sigma_2 = 10^{-50} \text{cm}^4 \text{s}^{-1}$ — muss die Photonendichte im Wechselwirkungsbereich sehr hoch sein. Man erreicht dies mit fokussierten Laserpulsen, deren Länge im Piko- und Femtosekundenbereich liegt. Der in dieser Arbeit eingesetzte Titan-Saphir-Laser, siehe Kapitel 6.4, hat eine Durchschnittsleistung von etwa 1 W. Die Pulsrate beträgt etwa 100 MHz, so dass jeder der 1 ps Pulse eine Durchschnittsleistung von 10 kW aufbringt. Bei einer Wellenlänge von $\lambda \approx 1 \mu\text{m}$ wird diese Leistung auf einen Fokus mit der Fläche $\approx 1 \mu\text{m}^2$ fokussiert, so dass eine Intensität von $\approx 10^{16} \text{Wm}^{-2}$ bzw. eine Photonenintensität von $I \approx 5 \cdot 10^{30} \text{cm}^{-2} \text{s}^{-1}$ erreicht werden kann. Mit dem oben angegebenen Wirkungsquerschnitt erhält man einen wirksamen Photonenfluss von $P = \sigma_2 I^2 = 2,5 \cdot 10^{11} \text{s}^{-1}$, was einer Leistung von $\approx 50 \text{nW}$ entspricht. In einer um Δz zur Fokalebene verschobenen Ebene fällt die verfügbare Photonendichte mit Δz^{-2} ab, die wirksame Zweiphotonenleistung mit Δz^{-4} .

Diese starke Beschränkung auf ein Volumen um die Brennebene ist der Grund, warum Zweiphotonenanregung in der Laserscanning-Mikroskopie eingesetzt wird [DENK und WEBB 1990, DENK et al. 1995]: Zum einen erhält man auf „natürliche“ Weise einen Pinholeeffekt, so dass Objekte in z -Richtung abgescannt werden können, ohne dass im Emissionslichtpfad ein Pinhole montiert sein muss. Weiterhin sind Bleicheffekte auf die Objektebene beschränkt. Da bei Zweiphotonenanregung von Farbstoffen, die eigentlich mit sichtbarem Licht angeregt werden, nun Licht im nahen Infraroten verwendet werden kann, sinkt im allgemeinen auch die Gefahr der Fotoschädigung und die Eindringtiefe in biologisches Material erhöht sich. Wegen der sehr hohen Energiedichten sollte aber dennoch im Einzelfall geprüft werden, ob es zu Schädigungen am zu untersuchenden Objekt kommt [KOESTER et al. 1999].

Das Panel C der Abbildung (4.5) zeigt den Aufbau eines Mehrphotonenmikroskops. Es entspricht im wesentlichen dem des konfokalen Mikroskops, allerdings gibt es hier, wie erwähnt, keine Pinholes mehr. Fluoreszenzlicht kann bei Multiphotonmikroskopie auch in Transmissionsrichtung detektiert werden. Allerdings müssen dann Filter vor den Detektor montiert werden, die das hier besonders stark auftretende Anregungslicht abblocken.

¹Diese Einheit, die auch 1 G.-M., „Göppert-Mayer“, genannt wird, ergibt sich aus $P = \sigma_2 I^2$ mit dem absorbierten Photonenfluss P , Einheit $1/\text{s}$, und der eingestrahelten Photonenflussdichte I , die in Einheiten von $1/(\text{cm}^2 \text{s})$ angegeben wird.

4.4.2 Second Harmonic Generation

Im Kapitel 3 wurde davon ausgegangen, dass es sich bei optisch durchlässigen Medien um *lineare* Medien handelt, also die durch ein äußeres elektromagnetisches Feld induzierte elektrische und magnetische Polarisation linear von diesem Feld abhängt. Dies ist im allgemeinen Fall nicht mehr korrekt und Effekte höherer Ordnungen müssen für eine vollständige Beschreibung berücksichtigt werden. Dennoch bleiben die linearen Effekte dominant, so dass sich für die mathematische Formulierung eine Taylorentwicklung anbietet, die bei der gewünschten Ordnung abgebrochen wird. Die verallgemeinerte Form der Gleichung (3.21) lautet also [SHEN 1984, MESCHEDE 1999]:

$$\begin{aligned} \tilde{P}_i(\vec{x}, \omega) = & \sum_j \epsilon_0 \tilde{\chi}_{e,ij}^{(1)}(\vec{x}, \omega) \tilde{E}_j(\vec{x}, \omega) + \\ & \sum_{jk} \sum_{mn} \epsilon_0 \tilde{\chi}_{e,ijk}^{(2)}(\vec{x}, \omega, \omega_m, \omega_n) \tilde{E}_j(\vec{x}, \omega_m) \tilde{E}_k(\vec{x}, \omega_n) + \\ & \sum_{jkl} \sum_{mnp} \epsilon_0 \tilde{\chi}_{e,ijkl}^{(3)}(\vec{x}, \omega, \omega_m, \omega_n, \omega_p) \tilde{E}_j(\vec{x}, \omega_m) \tilde{E}_k(\vec{x}, \omega_n) \tilde{E}_l(\vec{x}, \omega_p) \end{aligned} \quad (4.22)$$

\tilde{P}_i beziehungsweise \tilde{E}_i bezeichnen hier die i -te Komponente der Vektoren \vec{P} und \vec{E} , $\tilde{\chi}_e^{(n)}$, ein Tensor der Stufe $n + 1$, ist die Suszeptibilität n -ter Ordnung. Die Summierung über m , n und p ist notwendig, weil im nichtlinearen Fall die Frequenzen ω_m , ω_n und ω_p des einlaufenden elektrischen Feldes nicht notwendigerweise mit der resultierenden Frequenz ω der elektrischen Polarisation übereinstimmen müssen.

Betrachtet man als einfachsten Fall den Term zweiter Ordnung in einem isotropen Medium, in das ein monochromatisches elektromagnetisches Feld der Frequenz ω eingestrahlt wird, so ist die Polarisation zweiter Ordnung proportional zum Quadrat des elektrischen Feldes, $P^{(2)} \propto E^2$. Wegen $(e^{i\omega t})^2 = e^{i(2\omega)t}$ besitzt $P^{(2)}$ eine Komponente, die mit der doppelten Frequenz 2ω schwingt:

$$\tilde{P}_i^{(2)}(\vec{x}, 2\omega) = \sum_j \epsilon_0 \tilde{\chi}_{e,ijj}^{(2)}(\vec{x}, 2\omega, \omega, \omega) \tilde{E}_j^2(\vec{x}, \omega) \quad (4.23)$$

Da von einer oszillierenden Polarisation wiederum eine elektromagnetische Welle ausgeht, schwingt diese ebenfalls mit der doppelten Frequenz und besitzt die halbe Wellenlänge der eingestrahnten Welle. Diese optische „Oberton“-Erzeugung nennt man „second harmonic generation“, kurz „SHG“. Entsprechend erhält man aus Termen dritter Ordnung, soweit eine Suszeptibilität dritter Ordnung vorhanden ist, eine „third harmonic generation“, „THG“. Im Gegensatz

zu THG ist das Auftreten von hyperpolarisationsbedingter SHG allerdings auf Medien mit Symmetriebruch beschränkt. In isotropen Medien führt eine Koordinateninversion zu einer deckungsgleichen Situation. Führt man eine solche Koordinateninversion in Gleichung (4.23) aus, erhält man

$$\tilde{P}_i^{(2)}(\vec{x}) = \sum_{jk} \epsilon_0 \tilde{\chi}_{e,ijk}^{(2)}(\vec{x}) \tilde{E}_j(\vec{x}) \tilde{E}_k(\vec{x}) \quad (4.24)$$

$$\begin{array}{c} \vec{x} \leftrightarrow -\vec{x} \\ \longrightarrow \\ -\tilde{P}_i^{(2)}(\vec{x}) = \sum_{jk} \epsilon_0 \tilde{\chi}_{e,ijk}^{(2)}(\vec{x}) \left(-\tilde{E}_j(\vec{x})\right) \left(-\tilde{E}_k(\vec{x})\right) \end{array} \quad (4.25)$$

Die Gleichungen (4.24) und 4.25 sind gemeinsam nur dann gültig, wenn $\tilde{\chi}_{e,ijk}^{(2)} = 0$ ist. Andersherum kann $\tilde{\chi}_{e,ijk}^{(2)}$ nur dann Werte $\neq 0$ annehmen, wenn das Medium keine räumliche Inversionssymmetrie aufweist. Der erste experimentelle Nachweis von SHG an einem nicht inversionssymmetrischen Quarzkristall gelang mit Hilfe eines Rubinlasers [FRANKEN et al. 1961]. SHG kann jedoch auch an Systemen mit Inversionssymmetrie erzeugt werden; hier handelt es sich dann jedoch um einen Quadrupoleffekt [TERHUNE et al. 1962, BLOEMBERGEN et al. 1968].

Bei biologischen Materialien wird die Bedingung des Inversionssymmetriebruchs beispielsweise von einseitig gefärbten Membranen [CAMPAGNOLA et al. 1999, MOREAUX et al. 2000b] oder helikalen Molekülen erfüllt. Besonders interessant ist hierbei, dass SHG von Strukturproteinen wie Collagen [ROTH und FREUND 1979, ROTH und FREUND 1980] und Myosin [CAMPAGNOLA et al. 2002, BOTH, VOGEL et al. 2004] erzeugt wird. Damit ist es möglich, Zellstrukturen abzubilden, ohne dass externe Farbstoffe eingesetzt werden müssen.

Mikroskopie mit SHG-„Fluoreszenz“ besitzt alle Vorteile der Multiphotonmikroskopie und kann auch mit der hier beschriebenen CMLTT-Apparatur durchgeführt werden. Im Gegensatz zu Multiphotonfluoreszenz ist SHG allerdings ein kohärenter Prozess, das heißt, anregende und emittierte Photonen besitzen eine feste Phasenbeziehung, die SHG-Signale mehrerer Streuzentren interferieren. Allerdings verursacht die Guoy-Phasenverschiebung des anregenden Laserstrahls, vergleiche Kapitel 3.3, dass das SHG-Signal in einem Winkel $\alpha/\sqrt{2}$ zur optischen Achse abgestrahlt wird [MOREAUX et al. 2000a, MOREAUX et al. 2001]. α ist dabei der halbe Öffnungswinkel des Laserlichtkegels. Daher war es sinnvoll, ein möglichst baugleiches Objektiv als Kondensator einzusetzen, das das SHG-Signal sammelt und auf einen Transmissionsdetektor abbildet, vergleiche das Panel C der Abbildung (4.5).

Da SHG ein intrinsisch gebildetes Signal ist, also auf Fluoreszenzfarbstoffe verzichtet werden kann, bahnen sich bereits erste klinische Anwendungen an. Dazu gehört zum Beispiel die Untersuchung der Netzhaut des Auges nach einer laserinduzierten Materialabtragung [HAN et al. 2004] oder die hochaufgelöste Messung der Struktur von Säugetiermuskelzellen und einzelnen Muskelfasern [BOTH, VOGEL et al. 2004]. Die zuletzt genannten Messungen wurden an der in dieser Arbeit beschriebenen CMLTT-Apparatur durchgeführt und werden im Kapitel 11 beschrieben.

4.4.3 Multiphotonphotolyse

Eine weitere wichtige Anwendung von Mehrphotonenprozessen ist die Photolyse von Käfigmolekülen. Diese sogenannten „caged compounds“ bestehen aus einem photolabilen „Käfig“, der die chemische Aktivität eines anderen Moleküls maskiert. Bei Lichteinfall allerdings wird der Käfig angeregt und gibt das „eingefangene“ Molekül frei.

Kalziumkäfige sind dabei von besonderem Interesse, da auf diese Weise Kalzium gezielt freigesetzt und der durch Kalzium vermittelte Prozess in einer Zelle gestartet werden kann. Am Beispiel der Muskelzelle bzw. der Motorproteine ist dies die Aktivierung des Kontraktionsmechanismus [VEIGEL et al. 1995].

Kalziumkäfige sind zum Beispiel *nitrophenyl-EGTA*, *DM-nitrophen* [ELLIS-DAVIES et al. 1996] oder *DMNP-EGTA* [ELLIS-DAVIES 1998], die durch Licht im UV-Bereich — ≈ 350 nm — aktiviert werden. Das DMNP-EGTA ist ein EGTA-Derivat und zeichnet sich daher, zum Beispiel im Gegensatz zu EDTA, durch eine hohe Selektivität gegenüber anderen zweiwertigen Ionen wie Magnesium aus. Da bei Versuchen mit zellulären oder molekularen Muskelzellpräparaten häufig ATP in Form von Magnesium-ATP eingesetzt wird, ist der Kalziumkäfig der Wahl für die mit der hier beschriebenen CMLTT-Apparatur geplanten Experimente.

Analog zur Zweiphotonenfluoreszenz bietet es sich an, die Photolyse durch einen Zweiphotonenprozess zu starten [DELPRINCIPE et al. 1999]. Dies hat den Vorteil, dass das Freisetzungsvolumen sehr eingegrenzt wird und dass durch die Verwendung von Anregungslicht im nahen Infraroten wiederum Bleicheffekte und Fotoschädigungen reduziert werden. Testmessungen solcher Zweiphotonenfreisetzungen sind in Kapitel 8.2 vorgestellt.

4.5 TIRFM

TIRFM, *total internal reflection fluorescence microscopy*, ist der „kleine Bruder“ der Konfokalmikroskopie. Auch mit der TIRFM-Technik gelingt es, das Fluo-

reszenzanregungsvolumen in axialer Richtung zu begrenzen. Dabei liegt dieses Volumen allerdings immer im Rand der Messkammer, direkt am Deckglas anliegend.

TIRFM wurde bereits erfolgreich in Einzelmolekül-Aktomyosin-Studien verwendet [FUNATSU et al. 1995, ISHIJIMA et al. 1998, KITAMURA et al. 1999], um einzelne ATPase-, also ATP-Spaltungs-Ereignisse von Myosin nachzuweisen. Diese Studien brachten kontrovers diskutierte Ergebnisse hervor, vergleiche Kapitel 2.2.2, da mit einem ATPase-Ereignis mehrere Ruderschläge des Myosins verbunden seien.

So lag die Idee nahe, ein TIRFM-Modul an der Messapparatur zu realisieren, das in Kapitel 9 beschrieben wird. Hier soll auf die Grundlagen der TIRFM-Technik näher eingegangen werden.

TIRFM basiert auf dem Effekt der frustrierten Totalreflektion: An der Grenzfläche zweier optischer Medien mit den Brechungsindizes n_1 und n_2 wird ein Lichtstrahl nach dem Snellius'schen Gesetz, Gleichung 3.32, gebrochen. Bewegt sich der Lichtstrahl vom optisch dickeren in das optisch dünnere Medium, $n_1 > n_2$, dann wird der Strahl totalreflektiert, wenn sein Einfallswinkel $\alpha_1 > \arcsin(n_2/n_1) = \arcsin(1/m)$ ist. Mit m wird der hier relative Brechungsindex n_1/n_2 bezeichnet.

Das elektromagnetische Feld an der Grenzfläche muss jedoch stetig verlaufen, so dass es zur Ausbildung eines „dahinschwindenden“, *evaneszenten* Feldes im zweiten Medium kommt. Wendet man das Brechungsgesetz ganz formal an, $\sin(\alpha_2) = m \sin(\alpha_1)$, wird $\cos(\alpha_2) = i\sqrt{m^2 \sin^2(\alpha_1) - 1}$ imaginär [NOLTING 1990]. Die Ortsabhängigkeit einer elektromagnetischen ebenen Welle ist durch einen Faktor $e^{i\vec{k}\cdot\vec{x}}$ gegeben, Gleichung (3.25). Im Medium 2 wird daraus

$$\begin{aligned} e^{i\vec{k}_2\cdot\vec{x}} &= e^{ik_2(x \sin(\alpha_2) + z \cos(\alpha_2))} \\ &= e^{ixk_2 m \sin(\alpha_1) - zk_2 \sqrt{m^2 \sin^2(\alpha_1) - 1}}. \end{aligned}$$

Das evaneszente Feld fällt senkrecht zur Grenzfläche im Medium 2 mit einer Längenkonstante

$$\delta = \frac{1}{k_2 \sqrt{m^2 \sin^2(\alpha_1) - 1}} = \frac{\lambda_2}{2\pi \sqrt{m^2 \sin^2(\alpha_1) - 1}} \quad (4.26)$$

ab [NOLTING 1990, BORN und WOLF 1980]. $\lambda_2 = \lambda/n_2$ ist die Wellenlänge im Medium 2. Das evaneszente Feld ist aktiv an der Totalreflektion beteiligt und führt, bei einem räumlich begrenzten Strahl, zur lateralen *Goos-Hähnchen*-Verschiebung zwischen auftreffendem und reflektiertem Lichtstrahl.

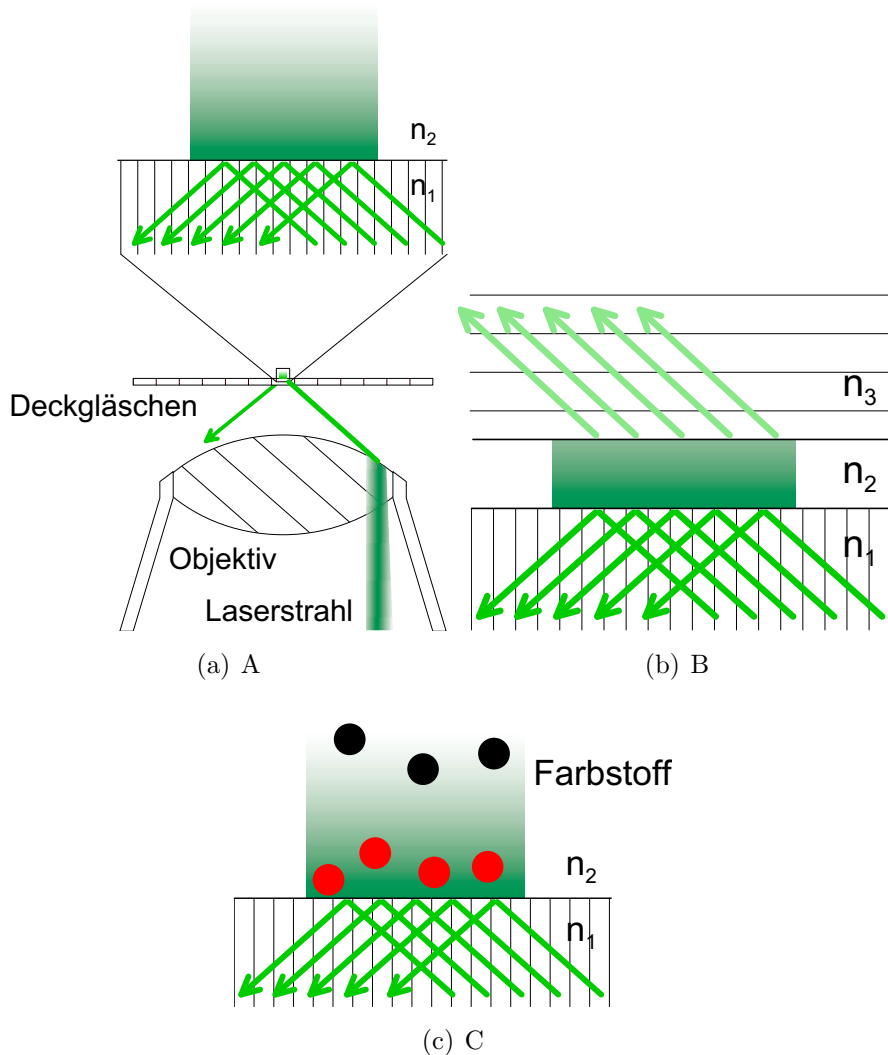


Abbildung 4.8: TIRF Mikroskopie: In Panel (a) ist eine der möglichen Realisierungen von TIRFM dargestellt: Ein (Laser-)lichtstrahl wird so in die rückseitige Apertur des Objektivs eingekoppelt, dass er an der Grenzfläche zwischen Deckgläschen und Wasser totalreflektiert wird. Auf der Wasserseite entsteht ein evaneszentes Feld. Wird in dieses Feld, Panel (b), ein drittes Medium gebracht, kann Licht durch die Wasserschicht tunnelt, wobei die Lichtmenge von der Schichtdicke abhängt. Dieses dritte Medium kann auch, Panel (c), durch Fluoreszenzfarbstoffmoleküle realisiert werden. Abbildungen nach Th. Künsting.

Wird nun ein drittes Medium mit dem Brechungsindex n_3 sehr nah an die Grenzfläche gebracht, kann Licht durch die dünne Schicht des Mediums 2 hindurchtunneln, falls $\alpha_3 = \arcsin(\sin(\alpha_1) \cdot n_1/n_3)$ nicht imaginär ist [BREKHOV-

SKIKH 1960]. Panel (b) der Abbildung (4.8) zeigt diesen Sachverhalt, der „frustrierten“ Totalreflektion.

Abhängig von der Schichtdicke z_g des Mediums 2 erhält man den Transmissionskoeffizienten

$$T = 1 - \left| \frac{(a^2 + b^2)^2}{(a^2 + b^2)^2 + 4a^2b^2 \coth^2(z_g/\delta)} \right|, \quad (4.27)$$

mit $a_{\perp} = 1/(m \cos \alpha_1)$ und $b_{\perp} = -1/\sqrt{m^2 \sin^2 \alpha_1 - 1}$ für Licht, das senkrecht zur Einfallsebene polarisiert ist, und $a_{\parallel} = \cos \alpha_1/m$ und $b_{\parallel} = \sqrt{m^2 \sin^2 \alpha_1 - 1}$ für Licht, welches parallel dazu orientiert ist [BREKHOVSKIKH 1960]. Wieder bezeichnet m den relativen Brechungsindex n_1/n_2 . Der Vergleich mit Gleichung (4.26) komplexere Zusammenhang in 4.27 und die Polarisationsabhängigkeit entsteht durch die Tatsache, dass das an der Grenzfläche $2 \rightarrow 3$ reflektierte Feld mit dem evaneszenten Feld im Zwischenmedium interferiert.

Den Effekt der abstandsabhängigen Tunneleffizienz haben wir in einem anderen Projekt dazu benutzt, Kräfte im Nanonewtonbereich zu messen [KNOBLOCH et al. 2000]. Die Medien 1 und 3 bei diesem FTIR-Transducer, „frustrated total internal reflection“, wurden hier durch angeschliffene Lichtleiter realisiert, von denen einer als Kraftarm ausgelegt war.

Für Fluoreszenzmessungen an biologischen Präparaten ist es natürlich genauso interessant, dass das dritte Medium auch durch Fluoreszenzfarbstoffe realisiert werden kann [TOOMRE und MANSTEIN 2001]. Das Lösungsmittel spielt dabei die Rolle des zweiten Mediums. Bringt man die Farbstofflösung in eine Messkammer unter das Mikroskop, kann an der Grenzschicht zwischen Deckgläschen und Lösungsvolumen eine Totalreflektion mit evaneszentem Feld hergestellt werden. Die Entstehung von Fluoreszenzlicht ist dabei auf die dünne Schicht mit dem evaneszenten Feld beschränkt, vergleiche Panel (c) der Abbildung (4.8).

Es gibt verschiedene Konfigurationen, mit denen eine geeignete Totalreflektion realisiert werden kann [CONIBEAR und BAGSHAW 2000]. Eine Möglichkeit besteht über eine Prismenvermittelte Lichteinkopplung in das Deckglas, wie sie in einer Diplomarbeit im Rahmen dieses Projektes realisiert und getestet wurde [KÜNSTING 2003].

Panel (a) der Abbildung (4.8) zeigt eine andere Konfiguration. Hier wird die Totalreflektion über Randstrahlen der Objektbeleuchtung realisiert. Dies ist möglich, wenn Objektive eine hohe numerische Apertur besitzen, die mit der verwendeten Kammerlösung nicht ausgenutzt werden kann. Diese Konfiguration wird in Kapitel 9 vorgestellt.

Kapitel 5

Optische Detektionstechniken

Für die modulare CMLTT-Apparatur mussten auch Positionsdetektoren entwickelt und gebaut werden, die auf Photodioden basieren. Einige Eigenschaften von Photodioden flossen dabei direkt in das Design der entwickelten elektronischen Schaltungen ein. Kapitel 5.1 gibt daher einen Überblick über die Funktionsweise und Eigenschaften dieser speziellen Dioden.

Darüber hinaus kommen in den Anwendungen, die in den Kapiteln 10 und 11 beschrieben werden, gängige Licht- und Bilddetektionsmethoden wie CCD-Chips und Photovervielfacher (PMT) zum Einsatz. Diese werden daher in den Abschnitten 5.2 und 5.3 kurz dargestellt.

5.1 Photodioden

Die diskreten und relativ scharf abgegrenzten Energiezustände der Elektronen in einem Atom „verschmieren“ in einer kristallinen Umgebung zu Energiebändern [IBACH und LÜTH 1995]. Die für die molekulare Bindung zuständigen äußeren Elektronen der Elektronenhülle, die Valenzelektronen, bilden dabei das sogenannte *Valenzband* aus, das höchste vollständig besetzte Energieband. Energetisch oberhalb des Valenzbandes liegt, durch einen „verbotenen“ Energiebereich der Größe E_g getrennt, das *Leitungsband* des Kristalls. Befinden sich Elektronen im nicht vollständig gefüllten Leitungsband, sind diese dort frei beweglich und das Material ist elektrisch leitfähig.

In metallischen Kristallen ist das Leitungsband von vornherein teilweise mit Elektronen gefüllt. Typische *Halbleitermaterialien* wie Silizium oder Galliumarsenid (GaAs) zeichnen sich — im reinen Zustand — dadurch aus, dass das Leitungsband zunächst leer ist. Der „verbotene“ Energiebereich zwischen Valenz- und Leitungsband beträgt jedoch nur einige wenige eV, so dass Elektronen durch

kleine thermische, mechanische, elektrische oder photonische Anregungen vom Valenzband in das Leitungsband gebracht werden können und dabei eine positiv geladene Fehlstelle im Valenzband zurücklassen. Leitungsbandelektronen und Fehlstellen fungieren dann als frei bewegliche Ladungsträger und tragen zur elektrischen Leitfähigkeit des Halbleiters bei, wobei sich, bei konstanter Anregung, ein Gleichgewicht zwischen Paarbildung und Rekombination einstellt.

Die energetische Besetzungsverteilung von Elektronen und Fehlstellen im Halbleiter ergibt sich, wie bei anderen elektronischen Bandstrukturen auch, aus der Fermiverteilung. Die Fermienergie E_F — hier befindet sich der Wendepunkt der Fermiverteilungsfunktion — liegt beim reinen Halbleiter im „verbotenen“ Bereich zwischen Valenz- und Leitungsband.

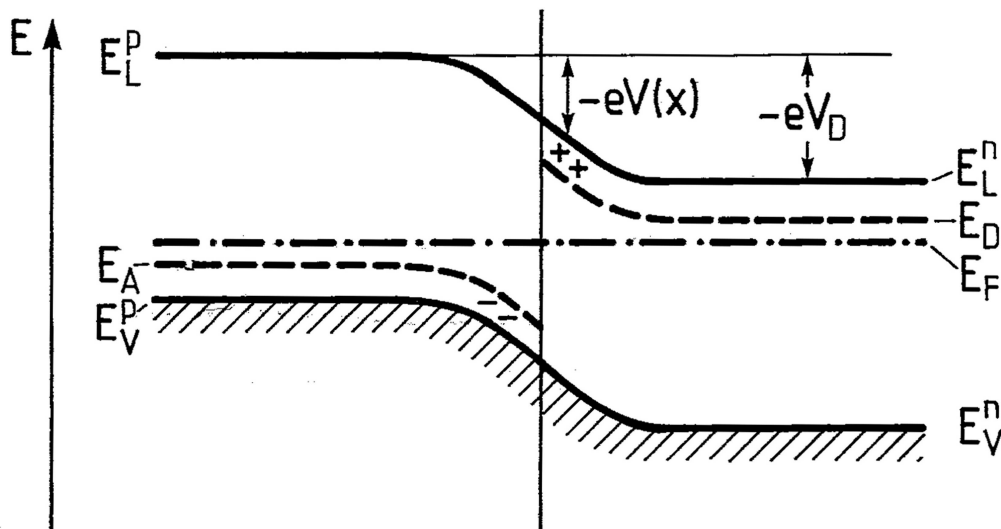


Abbildung 5.1: Übergangsbereich zwischen p -Halbleiter (links) und n -Halbleiter (rechts) bei $T \approx 300$ K. Das beiden Halbkristallen gemeinsame Fermi-niveau E_F erzwingt eine Bandverbiegung von Leitungsband E_L , Valenzband E_V , Akzeptorenniveau E_A und Donatorenniveau E_D . Durch Diffusion von frei beweglichen Ladungsträgern — Elektronen und Fehlstellen — bleiben im p -Halbleiter ionisierte Akzeptoren, im n -Halbleiter ionisierte Donatoren zurück. Durch diese ortsfeste Ladung bildet sich die Diffusionsspannung V_D zwischen den beiden Kristallhälften aus [IBACH und LÜTH 1995].

Durch *Dotierungen* kann die freie Ladungsträgerdichte im Halbleiter stark erhöht werden. Dabei werden z.B. fünfwertige *Donator*-Atome wie Phosphor in einen Silizium-Halbleiterkristall „eingebaut“. Vier der äußeren Elektronen des Phosphoratoms bilden mit den benachbarten Siliziumatomen reguläre sp^3 -

Bindungshybride, das fünfte p -Elektron ist wasserstoffähnlich an den positiv geladenen Phosphorrumpf gebunden. Energetisch liegt das Niveau E_D des p -Elektrons im „verbotenen“ Bereich nur wenige meV unterhalb des Leitungsbandes, so dass es relativ leicht in das Leitungsband ionisiert werden kann. Durch diese neuen freien Ladungsträger verschiebt sich im n -dotierten Halbleiter die Fermienergie in Richtung Leitungsband. Analog verfährt man bei p -dotierten Halbleitern, bei denen z.B. durch Einbringung dreiwertiger Akzeptor-Atome wie Bor zusätzliche, leicht ionisierbare und damit bewegliche Fehlstellen erzeugt werden. Entsprechend verschiebt hier sich die Fermienergie in Richtung Valenzband.

Einen p - n -Übergang erhält man, wenn man einen p - und einen n -Halbleiter zusammenfügt. Im Übergangsbereich bestehen zunächst hohe Dichtegradienten von frei beweglichen Ladungsträgern, Elektronen und Fehlstellen, die durch Diffusionsströme — Elektronen von n nach p , Fehlstellen von p nach n — ausgeglichen werden, der Übergangsbereich „verarmt“ an freien Ladungsträgern. Die zurückbleibenden ortsfesten ionisierten Akzeptor- und Donatoratome bilden jedoch ein elektrisches Gegenfeld aus, das einen Feldstrom freier Ladungsträger verursacht (man nennt den Übergangsbereich daher auch „Raumladungszone“). Im thermischen Gleichgewicht gleichen sich Diffusions- und Feldstrom aus, es stellt sich ein gemeinsames Fermienergie-Niveau von p - und n -Halbkristall ein. Da die Abstände von Valenz- und Leitungsband zum Fermienergie-Niveau ausserhalb des Übergangsbereichs unbeeinflusst bleiben, kommt es im Übergangsbereich zu einer sogenannten Bandverbiegung, siehe Abbildung 5.1, die sich in einer am Übergangsbereich abfallenden Diffusionsspannung V_D äußert.

Legt man zusätzlich eine äußere Spannung U an den Halbleiter, so fällt diese, wegen der Verarmung an freien Ladungsträgern, im wesentlichen am Übergangsbereich ab. Die Wahrscheinlichkeit, dass ein freier Ladungsträger diesen Potentialsprung überwindet, kann durch einen Boltzmannfaktor beschrieben werden, so dass sich letztlich die folgende Strom-Spannungs-Kennlinie des pn -Übergangs ergibt [SHOCKLEY 1951]:

$$I = I_S \left(\exp \frac{eU}{kT} - 1 \right) \quad (5.1)$$

I_S ist dabei der Sättigungssperrestrom, $k \approx 1,38 \cdot 10^{-23} \text{ J/K}$ der Boltzmannfaktor und T die Temperatur. Die Gleichung 5.1 weist einen stark asymmetrischen Verlauf auf und beschreibt den bekannten Effekt der *Stromgleichrichtung* einer pn -Diode. Die „Durchlassrichtung“ entspricht dabei der Situation, dass der p -dotierte Teil („Anode“) am Pluspol der äußeren Spannungsversorgung anliegt. Der Raumladungszone kann darüber hinaus eine Kapazität zugeordnet werden, für die man folgende Relation findet:

$$C^2 \propto \frac{A^2}{V_D - U}, \quad (5.2)$$

wobei A die Größe der pn-Grenzfläche ist. Betreibt man die Diode im Sperrbereich, kann die Kapazität durch eine Erhöhung der Sperrspannung verkleinert werden.

Diese Vorgehensweise ist insbesondere bei *Photodioden* interessant. Photodioden bestehen häufig aus einem n-dotierten Halbleitersubstrat als Kathode, auf das eine mikrometerdicke p-dotierte Halbleiterschicht als photoaktive Oberfläche und Anode aufgebracht wird.

Photodioden sind nun so optimiert, dass eintreffende Photonen des gewünschten Wellenlängenbereichs in der Lage sind, Elektron-Fehlstellenpaare im Photodiodenmaterial anzuregen. Im pn-Übergangsbereich werden die Paare durch das dortige elektrische Feld getrennt, Elektronen werden in den n-dotierten Bereich beschleunigt, Fehlstellen in den p-dotierten Bereich. Infolge dessen laden sich diese auf und durch einen externen Stromkreislauf kann eine Photospannung bzw. ein Photostrom abgegriffen werden. Typische Lichtleistung-Photostrom-Konversionsraten liegen bei $p = 0,5 \text{ A/W}$, was in etwa einer Quantenausbeute von $q = 0,4$ entspricht (bei einer Wellenlänge von $\lambda = 1 \mu\text{m}$).

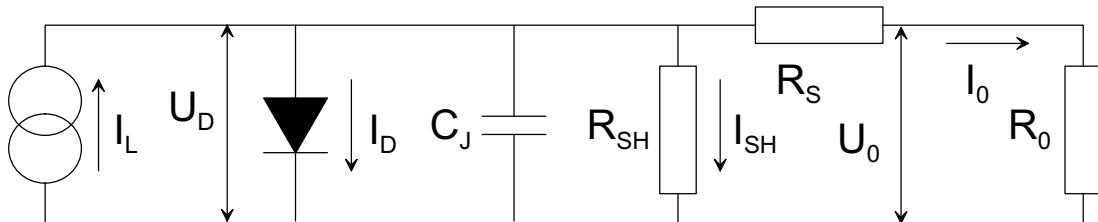


Abbildung 5.2: Äquivalenzschaltkreis einer Photodiode: Eine als ideal angenommene Stromquelle — ihr Innenwiderstand ist $R_{I_L} = \infty$ — liefert einen dem Lichteinfall proportionalen Photostrom I_L . Der pn-Übergang wird durch eine Parallelschaltung dieser Stromquelle mit einer idealen Diode modelliert. Weitere Elemente sind ein Nebenwiderstand, „shunt resistance“, R_{SH} , die Übergangskapazität, „junction capacitance“, C_J , in der auch die Streukapazitäten des Bauteils enthalten sind, sowie der Serienwiderstand R_S . Die an den Bauteilanschlüssen entstehende Photospannung U_0 wird an einen externen Lastwiderstand R_0 angeschlossen und erzeugt dort den Photostrom I_0 [ham 1999a].

Die Abbildung 5.2 zeigt einen Äquivalenzschaltkreis, mit dem das elektrische Verhalten einer Photodiode beschrieben werden kann [ham 1999a]: Der von der — als ideal angenommenen — Stromquelle erzeugte Strom I_L verteilt sich auf

die ebenfalls als ideal angenommene Diode (I_D), den Nebenwiderstand (I_{SH}) und den externen Lastwiderstand mit dem Photostrom I_0 . Für letzteren ergibt sich mit Gleichung 5.1:

$$I_0 = I_L - I_D - I_{SH} = I_L - I_S \left(\exp \frac{eU_D}{kT} - 1 \right) - I_{SH} \quad (5.3)$$

Im Grenzfall eines offenen externen Schaltkreises, d.h. im Photospannungsmodus oder „photovoltaic mode“, ergibt sich aus $R_L = \infty$, $I_0 = 0$ A und $U_0 = U_D$ eine Photospannung von

$$U_{0,oc} = \frac{kT}{e} \ln \left(1 + \frac{I_L - I_{SH}}{I_S} \right) \stackrel{I_{SH}=0}{\approx} \frac{kT}{e} \ln \left(1 + \frac{I_L}{I_S} \right) \quad (5.4)$$

Die letzte Vereinfachung gilt allerdings nur bei ausreichend großen Lichtmengen. Umgekehrt erhält man im Grenzfall des kurzgeschlossenen Lastkreises aus $R_L = 0 \Omega$, $U_0 = 0$ V und $U_D = I_{0,sc}R_S$ einen Photostrom von

$$I_{0,sc} = I_L - I_S \left(\exp \frac{eI_{0,sc}R_S}{kT} - 1 \right) - \frac{I_{0,sc}R_S}{R_{SH}},$$

beziehungsweise, unter Vernachlässigung von Termen zweiter und höherer Ordnung,

$$I_{0,sc} \approx \frac{1}{1 + R_S \left(\frac{1}{R_{SH}} + \frac{e}{kT} I_S \right)} I_L. \quad (5.5)$$

Der Serienwiderstand hat in der Praxis meist einen Wert von nur einige Ohm, wohingegen der Nebenwiderstand Werte von 1 G Ω und mehr annehmen kann.

Die lineare Relation zwischen einfallender Lichtleistung, dem erzeugten Quellphotostrom I_L und abgreifbarem Photostrom $I_{0,sc}$ ist bei realen Photodioden über viele Größenordnungen hinweg gültig. Daher liegt es nahe, zur Messung einer Lichtleistung Photodioden im Photostrommodus zu betreiben und den Photostrom durch eine Stromspannungswandlerschaltung so zu konvertieren, dass für die weitere Signalverarbeitung eine zur Lichtleistung proportionale Spannung zur Verfügung steht.

Für diese Stromspannungswandlung bietet sich eine Operationsverstärkerschaltung an. Die Abbildung 5.3 zeigt den Prinzipschaltplan: Der Operationsverstärker A ist als invertierender Verstärker beschaltet, dessen Rückkopplungsnetzwerk vom ohmschen Widerstand R_1 und der Kapazität C_1 gebildet wird. Das Eingangsspannungsrauschen des Verstärkers wird durch die Spannungsquelle u_n modelliert, das Eingangsstromrauschen durch die Stromquelle i_n . Beide sollen

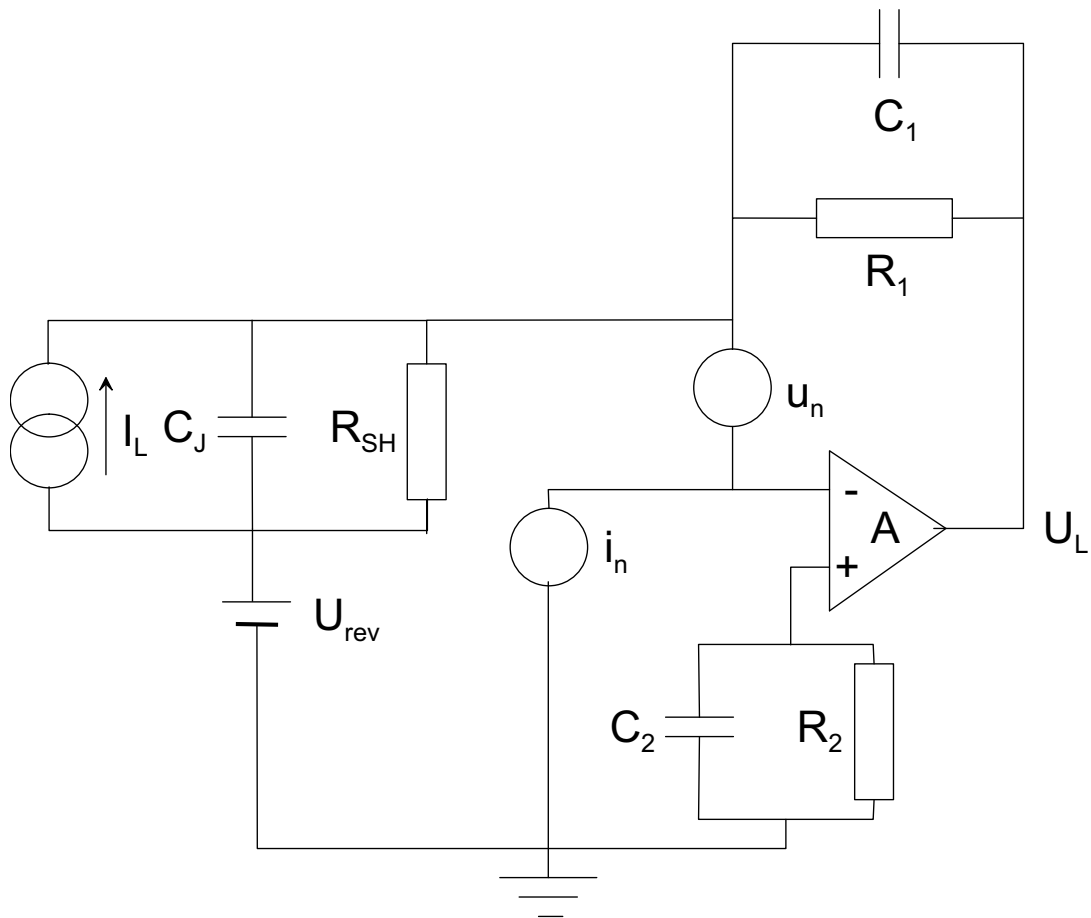


Abbildung 5.3: Prinzipbild einer Photostrom-Messschaltung: Der Photostrom I_L wird durch einen Operationsverstärker A in eine Spannung U_L konvertiert. Die Photodiode wird gegebenenfalls mit einer zusätzlichen Sperrspannung U_{rev} betrieben; u_n und i_n bezeichnen die Spannungs- und Stromrauschquellen des Verstärkerbausteins [bur 1995].

ideale Quellen sein, das bedeutet, ihr serieller beziehungsweise paralleler Innenwiderstand ist 0 bzw. unendlich hoch.

Vernachlässigt man zunächst das Netzwerk, das aus R_2 und C_2 gebildet wird, so liegt die am nicht-invertierende Eingang des Operationsverstärkers angeschlossene Spannung auf Massenniveau. Im stabilen rückgekoppelten Betrieb strebt der Verstärker danach, durch eine entsprechende Ausgangsspannung U_L beide Eingänge auf dasselbe Spannungsniveau zu heben: Der invertierende Eingang liegt dann ebenfalls auf Massenniveau, ohne allerdings direkt mit der Masse verbunden zu sein. Ursache hierfür ist der im Idealfall unendlich hohe Eingangswiderstand des Verstärkers. Man spricht in diesem Fall von der sogenannten „virtuellen Mas-

se“.

Der im Idealfall unendlich hohe Eingangswiderstand des Operationsverstärkers - in der Praxis werden Werte von $10^{12} \Omega$ und mehr erreicht - ist auch verantwortlich dafür, dass der Photostrom über das Rückkopplungsnetzwerk abfließen muss und man letztlich eine Ausgangsspannung von $U_L \approx -R_1 I_L$ erhält. Der Eingangswiderstand, wie er von der Photodiode „gesehen“ wird, beträgt hingegen nur $R_{in} = R_1/g_{ol}$ mit der „open-loop“-Verstärkung g_{ol} des Operationsverstärkers. g_{ol} liegt typischerweise bei einigen 10^6 .

Reale Operationsverstärkereingänge weisen Eingangsströme im Bereich von pA bis μA auf, wobei die beiden Eingangsströme üblicherweise in einen beiden Eingängen gemeinsamen Anteil, Eingangsbiasstrom oder „input bias current“, und einen Unterschiedsanteil, Eingangsoffsetstrom oder „input offset current“ getrennt werden. Der Offsetstrom ist in der Regel kleiner als der Biasstrom.

Der im invertierenden Eingang zu- beziehungsweise abfließende Eingangsstrom führt, da er über den Rückkopplungswiderstand R_1 abfließen muss, zu einer Verfälschung des Ausgangssignals. Abhilfe schafft hier das Netzwerk aus R_2 und C_2 : Nimmt man $R_2 = R_1$, so „sehen“ beide Eingänge den gleichen Widerstand, und der Biasstrom führt bei beiden Eingängen zu einem gleichen zusätzlichen Spannungssignal. Da Operationsverstärker eine hohe Gleichtaktunterdrückung aufweisen — typisch sind 100 dB — erscheint dieses gemeinsame Spannungssignal *nicht* im Ausgangssignal. Es ist zu beachten, dass manche Verstärkerbausteine bereits eine interne „input bias current cancellation“ besitzen, ein externes R_2 - C_2 -Netzwerk hier also eher schaden als nützen würde. Das zusätzliche Ausgangssignal, das aus dem kleineren Offsetstrom resultiert, lässt sich auf diese Weise allerdings nicht korrigieren. Es kann aber in den meisten Fällen gegen das eigentliche Signal vernachlässigt, oder, falls notwendig, durch eine experimentelle Kalibrierung herausgerechnet werden.

Die Frequenzbandbreite der Photostrommessung wird durch die Bandbreite der Photodiode selbst — typisch sind 10 MHz —, die endliche Bandbreite des Operationsverstärkers, die, je nach Bauart, ebenfalls im Bereich von einigen Megahertz liegt, und die Kapazität C_1 des Rückkopplungsnetzwerkes begrenzt. Für Rückkopplungswiderstände R_1 im $M\Omega$ -Bereich ist letzteres der wesentliche Effekt:

Für einen mit der Frequenz f schwingenden Photostrom besitzt das Rückkopplungsnetzwerk eine komplexe Impedanz von $Z_1 = R_1/(1 + 2i\pi f R_1 C_1)$. Die Ausgangsspannung schwingt dann mit einer Phasenverschiebung von $\pi + \arg(Z_1)$ und der Frequenz f . Für die Amplitude der Ausgangsspannung erhält man

$$|U_L| = -I_L \frac{R_1}{\sqrt{1 + (2\pi f R_1 C_1)^2}} = \begin{cases} -I_L R_1 & \text{für } f \ll f_c \\ -I_L \frac{1}{2\pi f C_1} & \text{für } f \gg f_c \end{cases} \quad (5.6)$$

mit $f_c = (2\pi R_1 C_1)^{-1} = (2\pi \tau_{RC})^{-1}$ als *Eckfrequenz*, an der der Graph der Funktion von einem konstanten Plateau in einen Abfall übergeht, der im logarithmisch-linearen *Bodeplot* linear verläuft, vergleiche Abbildung 5.4. τ_{RC} ist die Zeitkonstante, die man beispielsweise beim Entladen einer Kapazität über einen Widerstand erhält; beide sind ein Maß für die Reaktionsgeschwindigkeit des Photostrommesssystems. Bei der Berechnung der Eckfrequenz ist zu beachten, dass reale Bauteile immer auch Streukapazitäten im pF-Bereich besitzen. Für einen bei niedrigen Lichtleistungen nicht ungewöhnlichen Rückkopplungswiderstand von $R_1 = 10 \text{ M}\Omega$ und eine Rückkopplungskapazität von nur $C_1 = 1 \text{ pF}$ erhält man eine Zeitkonstante von $\tau_{RC} = 10 \mu\text{s}$ und eine Eckfrequenz von $f_c \approx 16 \text{ kHz}$. Die Wert für die Kapazität C_2 ist im übrigen deutlich unkritischer, da sich der Biasstromeffekt vor allem im unteren Frequenzbereich abspielt. Die Firma Burr-Brown (heute: Texas Instruments) empfiehlt hier zum Beispiel Werte im nF-Bereich [bur 1994].

Der Wert U_L wird natürlich nicht rauschfrei gemessen. Als Rauschquelle [ham 1999a, bur 1995] kann zum einen das Photostromrauschen selbst identifiziert werden:

Der in der Photodiode erzeugte Photostrom resultiert aus Elektron-Fehlstellen-Paarerzeugung und damit aus einzelnen Ereignissen. Daher besitzt der Photostrom eine statistische Varianz, die durch das sogenannte *Schrotrauschen*, „shot noise“, beschrieben wird: $\Delta I'_L = \sqrt{2eBI'_L}$. Hier ist e die Elementarladung und B die Bandbreite des Rauschens. Entsprechendes gilt für den Dunkelstrom — er entsteht aus thermisch angeregten Elektron-Fehlstellen-Paaren — als Offsetanteil des Photostroms, $\Delta I_D = \sqrt{2eBI_D}$. Zusätzlich steuert der Nebenwiderstand R_{SH} ein Widerstandsrauschen, „Johnsonrauschen“, von $\Delta I_{SH} = \sqrt{4kTB/R_{SH}}$ bei. k ist dabei die Boltzmannkonstante und T die Temperatur der Photodiode.

Die angegebenen Rauschquellen sind alle zu \sqrt{B} proportional. Da der Bandbreitenanteil des Rauschens, der am Signalausgang sichtbar ist, von der verwendeten Schaltung abhängt, ist es üblich, die Rauschpegel als Spektraldichten — Einheit $\text{A}/\text{Hz}^{1/2}$ — anzugeben: Mit $i'_L = \sqrt{2eI'_L}$, $i_D = \sqrt{2eI_D}$, $i_{SH} = \sqrt{4kT/R_{SH}}$ und der Spektraldichte i_n des Eingangsstromrauschens des Operationsverstärkers ergibt sich für eine bestimmte Bandbreite B ein Photostromrauschen von

$$\Delta I_L = \sqrt{(i'^2_L + i^2_D + i^2_{SH} + i^2_n)} B \quad (5.7)$$

Die genannten vier Stromrauschquellen werden durch den Rückkopplungswiderstand in ein Ausgangsspannungsrauschen konvertiert und in ihrer Bandbreite durch die Eckfrequenz des R_1C_1 -Netzwerks begrenzt.

Weiterhin trägt das Johnsonrauschen des Rückkopplungswiderstands zum Rauschpegel des Ausgangssignals bei: Es besitzt eine spektrale Spannungsdichte von $u_1 = \sqrt{4kTR}$. Im Gegensatz zu den Stromrauschquellen kann hier das Signal-zu-Rausch-Verhältnis durch eine Erhöhung von R_1 verbessert werden, da das Ausgangssignal proportional zu R_1 , das Rauschen hingegen proportional zu $\sqrt{R_1}$ ist. Das Johnsonrauschen wird ebenfalls durch die Eckfrequenz in seiner wirksamen Bandbreite begrenzt.

Eine Ausnahme ist diesbezüglich das Eingangsspannungsrauschen u_n des Operationsverstärkers. Dieses wird mit der Charakteristik eines nicht-invertierenden Verstärkers auf den Ausgang übertragen, wobei die Eingangsimpedanz vom Nebenwiderstand R_{SH} und der Diodenkapazität C_J , die Rückkopplungsimpedanz vom R_1C_1 -Netzwerk gebildet wird:

$$\begin{aligned} u_{L;n} &= \left(1 + \frac{R_1}{1 + 2\pi i f R_1 C_1} \cdot \frac{R_{SH}}{1 + 2\pi i f R_{SH} C_J} \right) \\ &= \begin{cases} 1 + (R_1/R_{SH}) \approx 1 & \text{für } f \ll \approx f_c \\ 1 + (C_J/C_1) & \text{für } f \gg \approx f_c \end{cases} \end{aligned} \quad (5.8)$$

Im Gegensatz zu den bisherigen Rauschquellen, deren Bandbreite durch die Eckfrequenz der Rückkopplungsschleife begrenzt war, wird das Eingangsspannungsrauschen des Operationsverstärkers letztlich nur durch die Bandbreite des Operationsverstärkers selbst begrenzt. Je nach Verhältnis von Dioden- und Rückkopplungskapazität wird das Eingangsspannungsrauschen im Frequenzbereich oberhalb der Eckfrequenz sogar besonders hoch verstärkt, man spricht von „gain peaking“. In Abbildung 5.4 ist dieser Sachverhalt dargestellt.

Das „gain peaking“ kann eine dominante Rauschquelle im Messsystem werden. Dies wird vor allem deutlich, wenn man bedenkt, dass der Graph in Abbildung 5.4 eine logarithmische f -Achsenskalierung besitzt, die Verstärkung des Eingangsspannungsrauschens also mitunter eine größere Bandbreite einnimmt als die eigentliche Signalverstärkung.

Um diesen störenden Effekt möglichst gering zu halten, sollte der Faktor $1+(C_J/C_1)$ möglichst nahe bei 1 liegen. Dies kann zum einen durch eine Erhöhung der Rückkopplungskapazität C_1 erreicht werden, oder, ist die damit verbundene Einschränkung der Signalbandbreite nicht hinnehmbar, durch eine Verringerung der Photodiodenkapazität C_J . Zu diesem Zweck (Gleichung 5.2) kann eine zusätzliche, gegenüber der Masse positive Sperrspannung U_{rev} an die Kathode

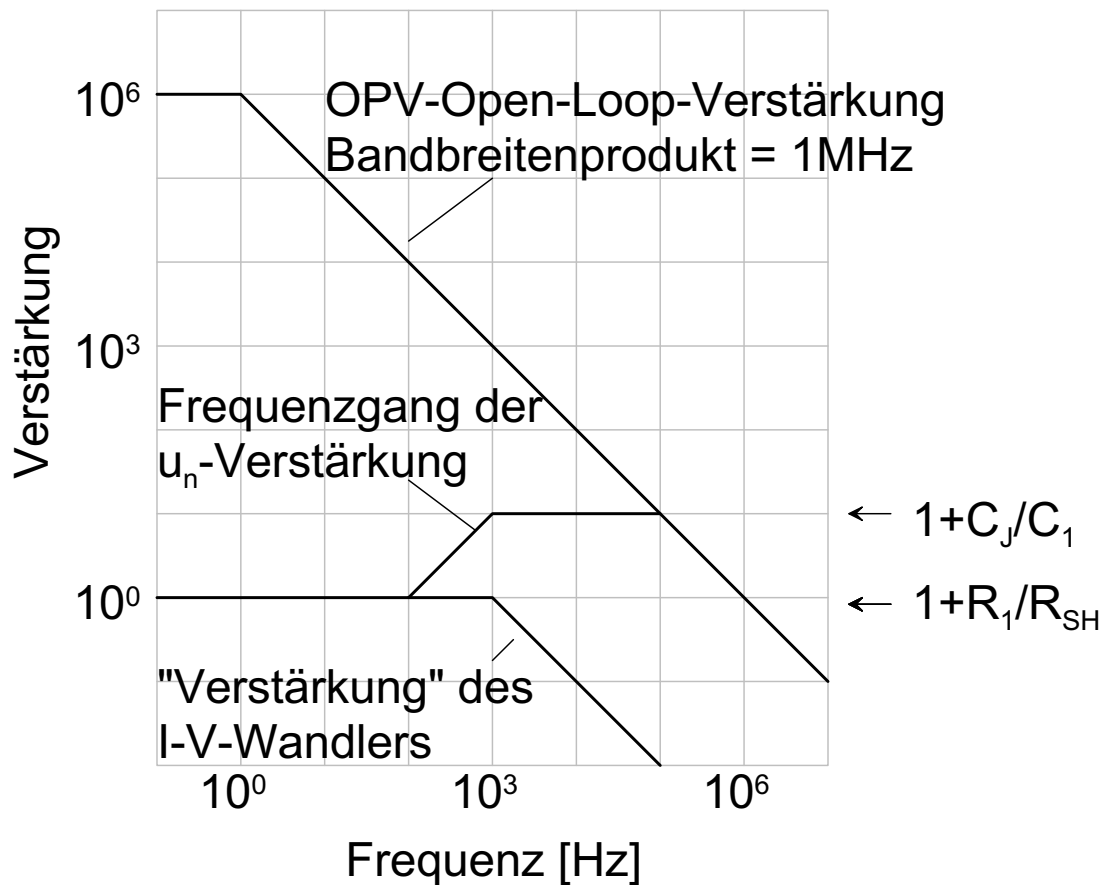


Abbildung 5.4: Photostrommessung: Frequenzgänge eines Operationsverstärker mit Verstärkungs-Bandbreitenprodukt = 1 MHz, der Verstärkung des Eingangsspannungsrauschens und der Strom-Spannungs-Wandlung. Man beachte, dass der Verstärkungsfaktor bei letzterer willkürlich auf 1 gesetzt wurde, da sich die Einheiten von Eingangs- und Ausgangsgröße unterscheiden [ham 1999a].

der Photodiode angelegt werden. Die Sperrspannung darf, bevor es zum sogenannten Zenerdurchbruch kommt, typischerweise bis zu einigen 10 V betragen. Allerdings erhöht sich mit der Sperrspannung auch der Dunkelstrom — und damit das Dunkelstromrauschen —, so dass im Einzelfall über das optimalere Vorgehen zu entscheiden ist.

5.2 CCD-Kameras

Das oben vorgestellte Prinzip der Lichtdetektion mit Halbleitern wird auch dazu benutzt, Bilder aufzunehmen. Eine Variante ist dabei das von Boyle und Smith entwickelte CCD, „charged coupled device“ [BOYLE und SMITH 1970].

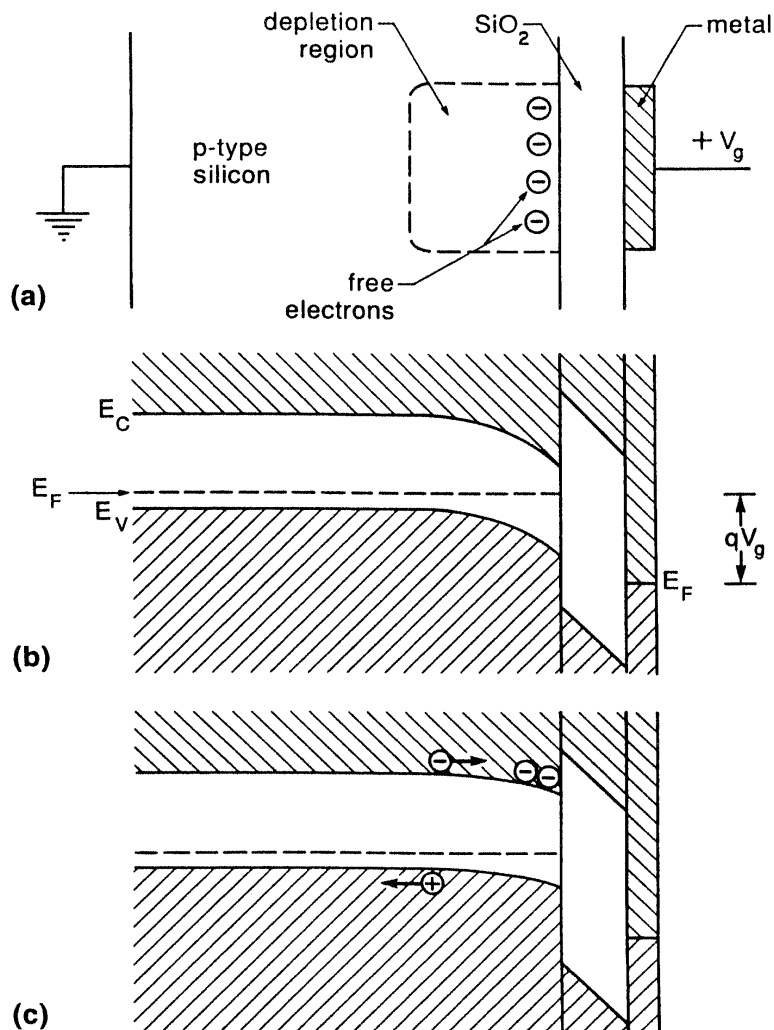


Abbildung 5.5: (a) Aufbau eines CCD-Pixels: Auf ein p-dotiertes Siliziumsubstrat wird eine dünne SiO_2 - und eine transparente Metallschicht aufgebracht (MOS-Diode). Bei Anlegen einer gegenüber dem Substrat positiven Spannung am Metall bildet sich eine Verarmungsregion im Substrat aus. (b) Bandschema der MOS-Diode unter Vorspannung: Ähnlich dem pn-Übergang erhält man im p-dotierten Silizium eine Bandverbiegung, die, da die SiO_2 -Schicht nicht leitungsfähig ist, zur Ausbildung eines Potentialtrog führt. (c) Einfallendes Licht oder Wärme erzeugt Elektron-Fehlstellen-Paare, die durch die angelegte Vorspannung getrennt werden. Die Fehlstellen diffundieren in das Substrat hinein, die Elektronen werden im Potentialtrog gesammelt [RIEKE 1996].

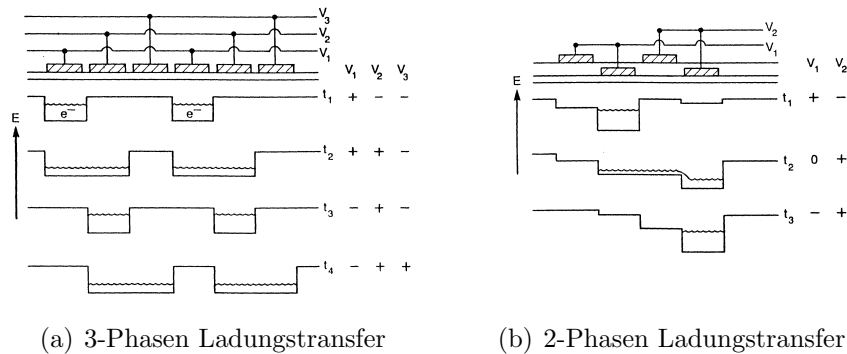


Abbildung 5.6: Auslesen der Ladungsinformation in einem CCDs: Durch Anlegen eines bestimmten Spannungsschemas an die CCD-Pixel kann erreicht werden, dass die Ladungen in Richtung Ausgang verschoben werden. Gezeigt sind zwei Beispiele für solche Schemata, links eine 3-Phasen-Ladungsverschiebung, rechts eine 2-Phasen-Ladungsverschiebung [RIEKE 1996].

Grundlage des CCD sind die sogenannten MIS-, „metal insulator semiconductor“-Dioden, also Metall-Isolator-Halbleiter-Dioden. Sie bestehen aus einem Metall und einem Halbleiter, zwischen denen eine dünne Isolationsschicht angebracht ist. Die Isolationsschicht wird aus verfahrenstechnischen Gründen häufig als Siliziumoxid ausgeführt, man spricht dann von MOS-, „metal oxide semiconductor“-Dioden. Das Panel (a) der Abbildung 5.5 zeigt den Aufbau einer solchen MOS-Diode.

Interessanterweise ergeben sich in einem dotierten Halbleiter an einem Metall-Halbleiter-Kontakt oder einem Metall-Isolator-Halbleiter-Kontakt Verhältnisse, die denen in einem „normalen“ pn-Übergängen recht ähnlich sind.

Liegen Metall und Halbleiter auf demselben Potential, so gilt dies, trotz Isolatorschicht, auch für die Fermienergie in beiden Teilsubstraten. Im gezeigten Beispiel einer CCD-MOS-Diode ist das Silizium-Substrat in der Regel p-dotiert. Liegt das Metall nun gegenüber dem Halbleiter auf positiven Potential — die Spannung liegt quasi in „Sperrrichtung“ an — so erfolgt im Halbleiter eine Bandverbiegung, vergleiche Panel (b) der Abbildung 5.5. Mit dieser Bandverbiegung entsteht ein Potentialtrog direkt an der Isolator-Halbleiter-Grenzschicht. Zusätzlich bildet sich dort eine Verarmungszone freier Ladungsträger aus, da die Fehlstellen in den Halbleiter hinein driften. Freie Elektronen driften in die entgegengesetzte Richtung, werden jedoch von der Isolatorgrenzfläche aufgehalten und im Potentialtrog gesammelt, siehe Panel (c) der Abbildung 5.5. Im Metall selbst sind die Ladungsträger — freie Elektronen — so beweglich, dass es zu keinerlei Bandverbiegung oder Ladungsträgerverarmung kommt.

Die Metallschicht ist bei CCDs für Bildaufnahmen transparent ausgeführt. Photonen ausreichender Energie regen im Silizium Fehlstellen-Elektronen-Paare an, die durch die angelegte Spannung getrennt werden. Von thermisch erzeugten Paaren abgesehen, sammelt sich auf diese Weise im Potentialtrog eine Ladungsmenge Q an, die proportional zur einfallenden Lichtleistung ist. Die MOS-Diode fungiert als Kondensator [RIEKE 1996]: Die Kapazität dieses Kondensators kann mit der Formel für den Plattenkondensator berechnet werden: Mit einer Fläche von $A = (15 \mu\text{m})^2$, der Dielektrizitätskonstante des SiO_2 von $\epsilon = 4,5$ und einer Schichtdicke des SiO_2 von $d = 0,1 \mu\text{m}$ erhält man eine Kapazität von

$$C = \frac{A\epsilon\epsilon_0}{d} \approx 100 \text{ fF}. \quad (5.9)$$

Liegt die Elektrodenspannung zum Beispiel 1,5 V über der Spannung, die zur Bildung des Potentialtrogos benötigt wird, entspricht dies einer Speicherkapazität von etwa 10^6 Elektronen.

Im CCD Chip sind solche MOS-Dioden nun in einer zweidimensionalen Struktur angeordnet. Zur Auswertung eines Bildes stellt sich nun das Problem, die Ladungen der einzelnen Pixel zu messen. Da die Tiefe eines Potentialtopfes von der Spannung am Metall abhängt, wurde die Methode der Ladungsverschiebung entwickelt: Nach einem bestimmten Schema werden an den Metall-„gates“ verschiedene Spannungen angelegt, so dass die Ladung jeder einzelnen MOS-Dioden zur nächstgelegenen weitergereicht wird, vergleiche Abbildung 5.6. Am „Ausgang“ dieses analogen Schieberegisters erhält man dann die Ladungspakete der einzelnen Pixel in einer geordneten Serie und kann diese in ein Spannungssignal oder direkt in ein Videosignal umwandeln.

Silizium fungiert sowohl in Photodioden wie in MOS-Dioden als Photokonversionsmaterial. Entsprechend erreicht man mit MOS-Dioden eine ähnliche Quanteneffizienz, die typischerweise bei $p \approx 0,5$ liegt. Eine weitere, von Photodioden bekannte Eigenschaft ist der Dunkelstrom: Thermisch angeregte Elektron-Fehlstellen-Paare erzeugen einen Dunkelstrom, der die Potentialtröge mit Elektronen füllt, so dass deren Kapazität bei Raumtemperatur nach ca. 1 Minute aufgebraucht ist [tis 2003]. Ein ähnlicher Fülleffekt tritt bei zu hoher Beleuchtung auf, der Potentialtrog „schwappt über“ und Elektronen fließen in die Potentialtröge benachbarter Pixel ab (sogenannter „blooming effect“). Abhilfe schafft hier zum einen eine Erhöhung der Ausleserate und/oder eine Kühlung des Chips zur Reduktion von thermisch erzeugten Ladungen.

Kameras, die auf solch gekühlten CCD Chips basieren, werden heute häufig, oft zusammen mit einem Vorverstärker, in der Fluoreszenzmikroskopie eingesetzt. Eine solche „intensified“-CCD-, „ICCD“-Kamera wurde zum Beispiel zur Aufnah-

me der Bildsequenzen des Motilitätsassay verwendet, das in Kapitel 10 vorgestellt wird.

5.3 Photomultiplier

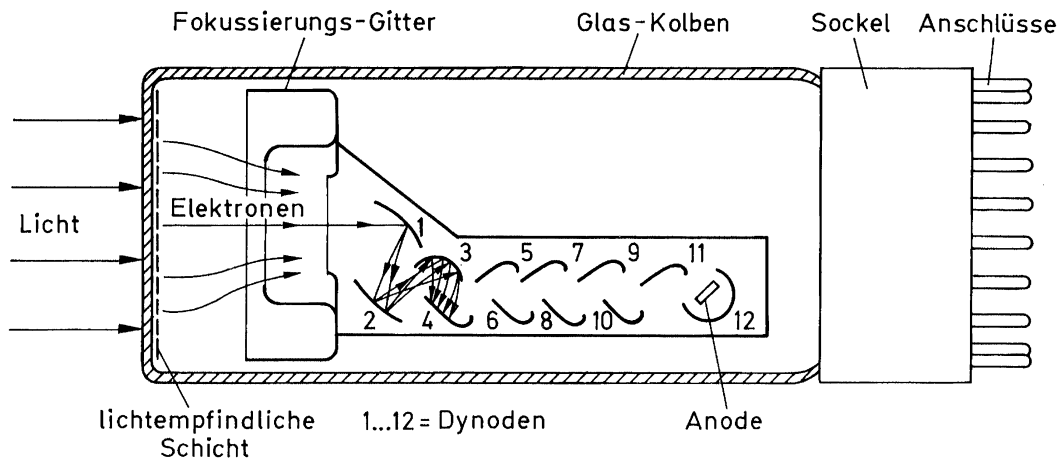


Abbildung 5.7: Prinzipskizze eines Photoelektronenvervielfachers: Eintreffende Photonen erzeugen in der als lichtempfindlichen Schicht ausgeführten Kathode durch den photoelektrischen Effekt Primärelektronen. Diese werden auf eine Kaskade von Dynoden fokussiert, wobei in jeder Stufe eine Elektronenvervielfältigung stattfindet. Die durch einen Lichtpuls erzeugte Elektronenlawine wird an der Anode in einen extern abgreifbaren Strompuls umgewandelt [BERGMANN und SCHÄFER 1993].

In Kapitel 5.1 wurde erwähnt, dass pn-Photodioden eine Quanteneffizienz von $p \approx 0,5$ besitzen, also zwei Photonen benötigt werden, um ein Photostrom-Elektron zu erzeugen. Dennoch ist es nicht möglich, mit pn-Photodioden einzelne Photonen nachzuweisen. Ursache sind dabei die oben beschriebenen Rauschquellen wie Dunkelstrom- und Schrotrauschen. Photodiodenhersteller geben daher meist eine sogenannte „rauschäquivalente Leistung“ oder „noise equivalent power“ (NEP) an. Dieser Wert gibt an, welcher einfallenden Lichtleistung das Grundsignalrauschen der Photodiode entspricht oder, andersherum, welche minimale Lichtleistung gerade noch detektiert werden kann. Ein typischer Wert ist $10^{-14} \text{ W}/\sqrt{\text{Hz}}$. Bei einer Bandbreite von $B = 10^6 \text{ Hz}$ und der Wellenlänge $\lambda = 500 \text{ nm}$ entspricht dies einem Photonenfluss von etwa $25 \cdot 10^6$ Photonen pro Sekunde.

Sollen deutlich geringere Lichtleistungen bis hin zu einzelnen Photonen quantitativ gemessen werden - dieses Problem stellt sich zum Beispiel in der konfokalen Fluoreszenzmikroskopie -, werden häufig sogenannte Photomultiplier oder Sekundärelektronenvervielfacher eingesetzt. Die Abbildung (5.7) skizziert den Aufbau eines solchen Geräts:

Auf einer Seite eines vakuumierten Glaskolbens befindet sich die Photokathode. Hier eintreffende Photonen lösen durch den photoelektrischen Effekt Elektronen aus dem Kathodenmaterial heraus. Sie besteht beispielsweise aus Alkalimetallverbindungen wie Natrium-Kalium-Antimon-Verbindungen [BERGMANN und SCHÄFER 1993] oder III-V-Halbleitern wie Galliumarsenid, auf die eine elektropositive Schicht wie Cs_2O aufgebracht wird [ham 1999b]. Diese Schicht erzeugt eine Elektronenbandverbiegung, so dass erzeugte Photoelektronen das Kathodenmaterial leichter verlassen können.

Die Kathode, die nachgeschalteten Dynoden und die Anode bilden eine Potentialkaskade. Zwischen den einzelnen Elektroden liegt eine Spannung von etwa 100 V an, so dass die Kathode gegenüber der Anode auf ein negatives Potential von 1000 – 2000 V gebracht wird.

Die aus der Kathode gelösten Primärelektronen werden in Richtung der ersten Dynode beschleunigt. Ein Fokussierungsgitter sorgt dafür, dass möglichst keine Primärelektronen verloren gehen. Das Dynodenmaterial - beispielsweise Alkali-Antimonide, Beryllium- oder Magnesiumoxid, Galliumphosphid oder Galliumarsenidphosphid auf einem Metallsubstrat [ham 1999b] - ist so beschaffen, dass beim Aufprall von Primärelektronen Sekundärelektronen leicht herausgelöst werden. Diese wiederum werden zur nächsten Dynode hin beschleunigt.

Werden an der Photokathode n_0 Photonen in $n_1 = \eta n_0$ Photoelektronen konvertiert - wobei etwaige Primärelektronenverluste bis zur ersten Dynode in der Quanteneffizienz η enthalten seien - so erreichen bei einer Kaskade von m Dynoden mit der Verstärkung d

$$n_{out} = d^m \eta n_0 \quad (5.10)$$

Elektronen die Anode und werden dort in einen messbaren Photostrom konvertiert [RIEKE 1996]. Da die Erzeugung von n_1 Primärelektronen der Poisson-Statistik unterliegt, ergibt sich eine Messunsicherheit von $\sqrt{n_1}$ Elektronen. Dieses Rauschen wird an der ersten Dynode linear mitverstärkt, zusätzlich ergibt sich eine weitere Rauschquelle, da die Erzeugung der Sekundärelektronen ebenfalls der Poisson-Statistik unterliegt. Führt man diese Rechnung für alle Dynodenstufen weiter, erhält man für das Endsignal ein Signal-zu-Rauschverhältnis von [RIEKE 1996]

$$\frac{S}{N} = \sqrt{\eta n_0 \left(\frac{d_1}{d_1 + \frac{d}{d-1}} \right)} \quad (5.11)$$

Mit d_1 wird dabei die Verstärkung der ersten Dynode, mit d die als gleich angenommenen Verstärkungen der restlichen Dynoden bezeichnet. Man erkennt an Gleichung 5.11, dass es für ein gutes Signal-zu-Rausch-Verhältnis vor allem auf eine hohe Erstverstärkung d_1 ankommt. Typische Werte für die genannten Größen sind $d_1, d \approx 10 \dots 100$ und $\eta \approx 0,01 \dots 0,25$ [ham 1999b]. η und d, d_1 sind allerdings sehr vom Elektrodenmaterial und der einfallenden Wellenlänge abhängig.

Teil II

Aufbau der CMLTT-Apparatur und exemplarische Anwendungen

Kapitel 6

Das CMLTT-Basissystem

6.1 Überblick

Die Abbildung 6.1 zeigt einen Prinzipgrundriss der CMLTT-Messapparatur, die als Resultat der hier beschriebenen Arbeit realisiert wurde. Die Messapparatur ist mit den Komponenten des Leica TCS-SP2-MP Konfokalmikroskops (Leica Microsystems Heidelberg GmbH, Mannheim) aufgebaut worden und sollte um eine optische Pinzette mit Positionsdetektion, eine stationäre Multiphotonkoppelung und ein TIRFM-Modul erweitert werden. Die Herausforderung dabei war, dass diese Erweiterungen die Grundfunktionalitäten des Systems nach Möglichkeit nicht beeinflussen, sondern weitestgehend kombinierbar sein sollten.

Zur Übersichtlichkeit sind in Abbildung 6.1 Lichtquellen einfach und Detektionseinheiten doppelt schraffiert, Filter sind als punktierte Linie dargestellt. Auf die Einzeichnung von Justagespiegeln und ähnlichen Elementen wurde verzichtet. Einige der Elemente sind nicht parallel nutzbar: Die alternativen Abzweigungen im Strahlengang sind durch gestrichelte, schräg stehende Linien dargestellt. Die Strahlengänge selbst sind durch farbige Linien gekennzeichnet und die Ausbreitungsrichtung wird gegebenenfalls durch Pfeile markiert. Es wurde versucht, die folgende Farblegende einzuhalten:

- *Gelb*: Durchlichtbeleuchtung und Durchlichtabbildung
- *Blau*: Fluoreszenzanregungslicht im konfokalen Arbeitsmodus (dies beinhaltet auch Bildgebung durch Zweiphotonenmikroskopie!)
- *Violett*: Anregungslicht der Quecksilberlampe im Epifluoreszenzmodus
- *Grün*: Anregungslicht des TIRF-Moduls (vergleiche Kapitel 9)

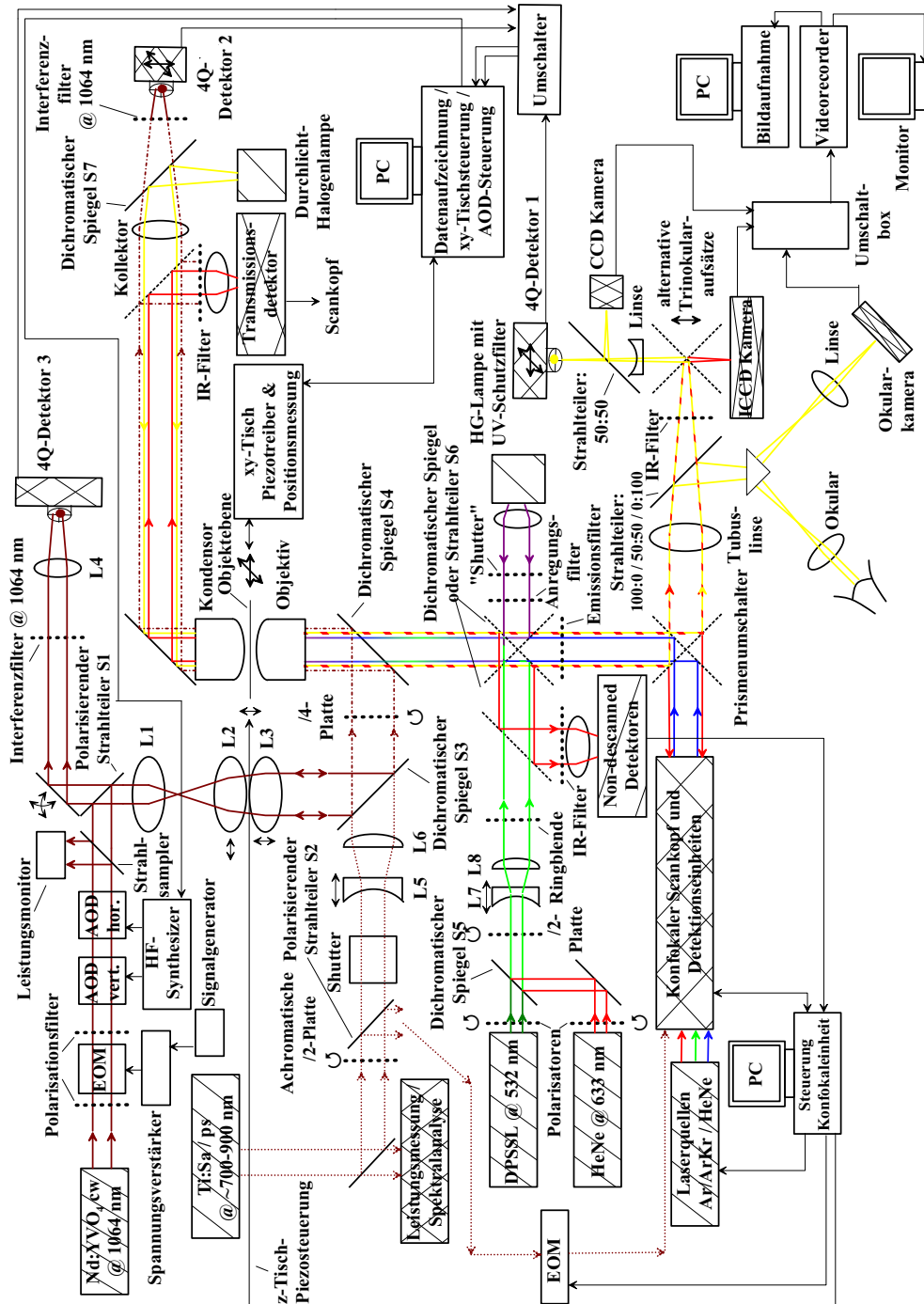


Abbildung 6.1: Aufbau der CMLTT-Messapparatur.

- *Dunkelrot*: Laserlicht der optischen Pinzette (durchgezogene Linie, Kapitel 7) und der stationären MP-Einkopplung (punktierte Linie, Kapitel 8). Die strichpunktierte Linie kennzeichnet den gemeinsamen Strahlengang.

- *Rot*: Emission von Fluoreszenzlicht, einschließlich Zweiphotonenfluoreszenz und SHG (siehe Kapitel 11)

Die Apparatur ist um ist um ein inverses DM/IRBE-Mikroskopstativ herum aufgebaut: Die Durchlichtbeleuchtung erfolgt von oben, die Beobachtung mit den Objektiven von unten. Dies hat bei biologischen Präparaten den Vorteil, dass Messkammern oben geöffnet bleiben können und so während der Messung der Zugang zum Präparat möglich ist. Als Lichtquelle im Durchlichtmodus wird eine 12 V-Halogenlampe eingesetzt, deren Helligkeit über einen Spannungsschieberegler eingestellt wird. Als Kondensoren kamen hauptsächlich zwei Optiken zum Einsatz: Ein Kondensator mit der numerischen Apertur 0,9 und einem freien Arbeitsabstand — „FAA“ — von ≈ 1 mm sowie, bei SHG-Messungen, vergleiche Kapitel 11, ein 63x-Wasserimmersionsobjektiv mit der numerischen Apertur 1,2, dessen FAA nur einige $100 \mu\text{m}$ beträgt. Eigene Versuche, den FAA durch Einsatz einer Linse der Brennweite $f = 30$ mm zu erhöhen, scheiterten an der dann zu geringen Belichtungsausbeute bei hohen Auflösungen; diese Konfiguration hatte eine numerische Apertur von $\approx 0,45$ und einen FAA von ≈ 20 mm¹.

Als Objektive standen ein immersionsfreies 10x-Objektiv, ein 63x-Wasserimmersionsobjektiv ($\text{NA} = 1,2$), ein 40x-Ölimmersionsoobjektiv ($\text{NA} = 1,2$) sowie ein 100x-Ölimmersionsoobjektiv ($\text{NA} = 1,4$) zur Verfügung. Die Fokussierung der Objektive wird mit einem Elektromotor realisiert, die laterale Objektverschiebung erfolgt durch Stellschrauben, die von Hand bedient werden.

Der optische Pfad des von den Objektiven gesammelten Lichts kann durch einen Prismenumschalter auf einen Seitenausgang — hier ist der konfokale Scankopf montiert — oder auf den Trinokularkopf geleitet werden, der auch die Tubuslinse enthält, vergleiche Kapitel 4.1. Im Trinokular kann das Licht auf die Okulare und einen Kameraausgang in den Verhältnissen 100 : 0, 50 : 50 und 0 : 100 aufgeteilt werden. Bei den Okularen handelt es sich um 10x-Okulare.

6.2 Epifluoreszenz

Die im Durchlichtmodus eingesetzte Halogenlampe ist für Fluoreszenzanregung nicht lichtstark genug. Daher kommt hier eine 50 W-Quecksilberdampfampe zum Einsatz. Da das Spektrum dieser Lampe auch potentiell gefährliche UV-Anteile besitzt, befindet sich noch im Lampenhaus ein UV-Schutzfilter. Die Abbildung 6.3 zeigt das Spektrum des Lichts der Quecksilberlampe. Es wurde mit einem sogenannten Lambdascans des Konfokalmoduls aufgezeichnet. Dabei wurde in das

¹Ungefähr 10 mm fielen durch die Konstruktion des Linseneinbaus weg.

Filterrad ein 50 : 50-Strahlteilerwürfel eingesetzt, mit dessen Hilfe ein kleiner Teil des Lampenlichts auf den Konfokalscanner gerichtet wurde.

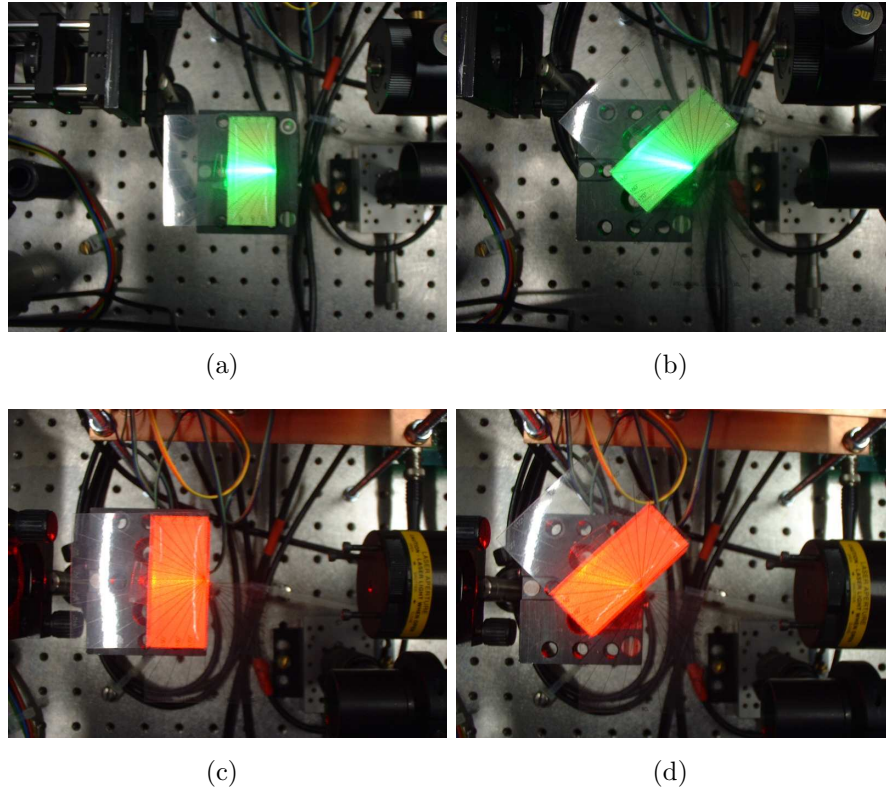


Abbildung 6.2: Lichtbrechung am Agargel: Mit Hilfe des Strahls zweier Laser wird der Brechungsindex einer mit Agar gefüllten Kammer gemessen.

Der Konfokalscanner wurde dann so konfiguriert, dass jeweils für ein Detektionsband von 5 nm eine Bildaufnahme gemacht wurde. Das Spektrum insgesamt wurde dahingehend aufgeteilt, dass der jeweils für einen Spektralbereich optimierte PMT verwendet wurde. Dabei zeigte sich, dass das Lampenlicht ausreichend divergent war, so dass es während des „Scan-“vorgangs zu keiner Ortsabhängigkeit des Signals kam. Eine Bildaufnahme entspricht damit einer Zeitfolge von $512 \cdot 512 = 262144$ Messpunkten. Von diesen Grauwerten jeweils eines Bildes wurde der Mittelwert und die Standardabweichung gebildet und zu der Abbildung 6.3 zusammengeführt. Die Spannung der vier PMTs wurde jeweils auf 1000 V eingestellt. Leider zeigte sich, dass die vier PMTs eine unterschiedliche Sensitivität besitzen, so dass es zu Unstetigkeiten in der Spektrumsdarstellung kommen musste. Qualitativ erkennt man dennoch die Peaks bei $\lambda \approx 430$ nm und bei ≈ 710 nm sowie das relativ breite Maximum um 550 nm.

Das Licht der Quecksilberlampe wird durch eine Kollimationsoptik geleitet

und durch einen Anregungsfilter, einen dichromatischen Spiegel — Bauteil „S6“ in der Abbildung 6.1 — und das Objektiv in die Objektebene abgebildet. Zusätzlich kann ein Filter als „Shutter“ in den Strahlengang des Anregungslichts geschoben werden, um unnötiges Ausbleichen des Objektes zu vermeiden, zum Beispiel in einer Messpause.

In der Quecksilberlampe wird das Licht inkohärent erzeugt, entsprechend ist der Fokus in der Objektebene nicht beugungsbegrenzt sondern nimmt den gesamten sichtbaren Bereich ein. Diese Mikroskopiemethode wird auch „Epi“-Fluoreszenz genannt. Das von den Fluoreszenzfarbstoffen in der Probe emittierte Licht wird wieder über das Objektiv gesammelt. Der dichromatische Spiegel „S6“ ist passend zum verwendeten Farbstoff ausgewählt worden, so dass das Fluoreszenzlicht über den Emissionsfilter und den Prismenumschalter auf den Trinokularkopf geleitet wird. Dort kann das Fluoreszenzbild beobachtet werden. Allerdings ist die Lichtausbeute mitunter so gering, dass für eine Bildaufzeichnung eine intensivierte, gekühlte CCD-Kamera benötigt wird. Bei den in Kapitel 10 beschriebenen Experimente kam eine solche ICCD-Kamera zum Einsatz.

Da Anregungsfilter, dichromatischer Spiegel und Emissionsfilter jeweils zu einem bestimmten Farbstoff passen müssen, werden diese drei Optiken im fertigen Filtersatz angeboten, der in das Fluoreszenzfilterrad des Mikroskops eingesetzt wird. Das DM/IRBE bietet in diesem Filterrad Platz für vier Filtersätze, so dass diese auch im laufenden Experiment einfach gewechselt werden können.

Anhand der Abbildungen 6.3 sowie 10.1(a) und 10.1(b) kann noch einmal das Prinzip der Epifluoreszenz verdeutlicht werden. Das Maximum im Emissionsspektrum der Quecksilberlampe bei 550 nm „passt“ recht gut zum Anregungsspektrum des Farbstoffs Rhodamin-Phalloidin (Abbildung 10.1(a)). Die Filtersatzoptiken, deren Transmissionsspektren in Abbildung 10.1(a) gezeigt sind, wurde passend für diesen Farbstoff zusammengestellt.

Dies ist im Rahmen dieser Arbeit vor allem deswegen wichtig, weil Rhodamin über ein Linkermolekül, Phalloidin, an das Motorprotein Aktin gebunden wer-

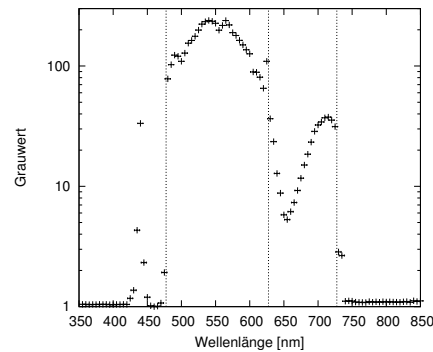


Abbildung 6.3: Spektrum der Quecksilberlampe zur Epifluoreszenzanregung: Das Spektrum wurde mit Hilfe eines sogenannten Lambdascans aufgezeichnet. Die Brüche im Spektrum erklären sich aus der unterschiedlichen Sensitivität der vier PMTs.

den kann [KRON und SPUDICH 1986]. Aktin liegt mit einem Durchmesser von etwa 5 nm weit unter der optischen Auflösungsgrenze, vergleiche Kapitel 2.1.2 und 4.1, so dass es praktisch nur mit Fluoreszenzanfärbung sichtbar gemacht werden kann.

Die praktische Auflösungsgrenze ergibt sich aus der Messung der lateralen PSF (Kapitel 4.2). Dazu gießt man fluoreszierende Nanobeads (Durchmesser ≈ 170 nm, P-7220, Molecular Probes, Inc., Eugene, OR, USA) in ein Agargel ein, damit sie ortsfest in der Messkammer fixiert sind. In dem genannten Kit sind verschiedene Beadmarkierungen vorhanden, man wählt sinnvollerweise solche, deren Anregungs- und Emissionsspektrum dem des eigentlichen Experiments ähnelt. Für Rhodamin-Phalloidin sind dies Beads mit Anregungs- und Emissionsmaxima bei 540 nm bzw. 560 nm.

Das Agargel selbst beeinflusst die PSF-Messung. Obwohl das Agarpulver mit nur 1–2 Gewichtsprozent in Wasser gelöst wird, besitzt das fertige Gel einen recht hohen Absorptionskoeffizienten und erscheint im Gegenlicht diffus. Damit jedoch ist es eine ideale Simulation für biologisches Gewebe, welches oft ein ähnlich diffuses Streuverhalten aufweist. Darüber hinaus hat der Brechungsindex n_{Agar} von Agar einen Einfluss auf die erreichbare Auflösung, da mit n_{Agar} automatisch auch die maximale NA festliegt (siehe Gleichung (4.8)).

Da in der Literatur nirgends Angaben zum optischen Brechungsindex zu finden waren, musste er selbst bestimmt werden. Dazu wurde das warme Agargel in eine quaderförmige Form gegossen, deren Seitenwände aus Deckglasmaterial bestand. In diese Form wurden unter verschiedenen Winkeln die Laserstrahlen des TIRFM-Moduls (Kapitel 9.1) eingestrahlt und der Beugungswinkel gemessen. Es ergab sich ein Wert von $n_{\text{Agar}} = 1,25 \pm 0,1$ und damit ein Wert, der dem von Wasser, $n_{\text{H}_2\text{O}} = 1,33$ recht nahe kommt.

Die eingegossenen Beads werden im Fluoreszenzmodus beobachtet und zum Beispiel mit derselben ICCD-Kamera aufgenommen, die später für die eigentlichen Fluoreszenzmessungen verwendet werden soll. Dies hat den Vorteil, dass damit auch die — immer vorhandene — Verschmierung des Signals durch die Kamera miterfasst und quantifiziert wird. Von dem digitalisierten Bild eines oder

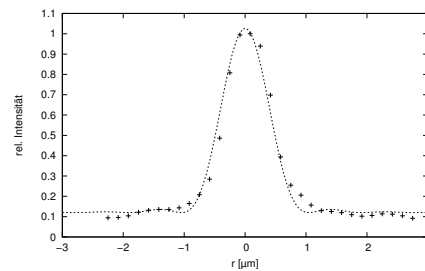


Abbildung 6.4: Bestimmung der Point-Spread-Function des Systems im Epifluoreszenzmodus durch Anpassen des Grauwertprofils an die Gleichung (4.6).

mehrerer solcher Fluoreszenzbeads misst man nun das Grauwertprofil und passt dieses an Gleichung (4.6) an.

Für das in Abbildung 6.4 gezeigte Beispiel erhält man $\nu \approx 3,7\Delta r$. Die erste Nullstelle der Besselfunktion liegt etwa bei $J_1(3,83)$, was in echten Koordinaten $\Delta r \approx 1,0\mu\text{m}$ entspricht. Das Bead als Punktlichtquelle wird in diesem Beispiel vom Gesamtsystem auf ein Beugungsscheibchen mit dem Durchmesser $\approx 2,1\mu\text{m}$ abgebildet. Dieser Wert ist etwa einen Faktor 4 schlechter als das theoretisch erreichbare Optimum aus Gleichung (4.8). Er bestätigt sich allerdings bei anderen Beadabbildungen derselben Aufnahmeserie. Eine mögliche Erklärung ist die diffuse Streuung durch das Agarigel, wie man sie makroskopisch in Abbildung 6.2 gut erkennen kann.

6.3 Konfokalmodul

Das Konfokalmodul des Leica TCS-SP2-MP-Systems ist als „black box“ konzipiert, die durch eine einheitliche Softwareoberfläche angesteuert und ausgelesen wird. So werden alle Parameter (Pinholegröße, z-Position, Aufnahmegeschwindigkeit, verwendete Laserlinien, Strahlteiler, ...) und die Bilderzeugung durch die Software abgedeckt.

Als Lichtquellen stehen ein Argon-Laser („Ar“, Ausgangsleistung $\approx 100\text{mW}$) und zwei Helium-Neon-Laser („grHeNe“, Ausgangsleistung $\approx 1,2\text{mW}$ und „rtHeNe“, Ausgangsleistung $\approx 10\text{mW}$) zur Verfügung, so dass eine Probe mit den Laserlinien 457 nm (Ar), 488 nm (Ar), 514 nm (Ar), 543 nm (grHeNe) und 633 nm (rtHeNe) beleuchtet werden kann.

Das Anregungslicht der Laserquellen wird über einen variablen Strahlteiler in den Hauptstrahlengang eingekoppelt. Bei Bedarf kann hier ein dreifacher oder sechsfacher Beamexpander zugeschaltet werden. Durch den größeren Strahldurchmesser erhöht sich dann die erreichbare Auflösung, es sinkt aber gleichzeitig die Signalausbeute. Der Anregungslichtstrahl wird auf den eigentlichen Scanner geleitet, der hier durch zwei galvanische Spiegel realisiert ist. Der Scanner verändert den Winkel des aufgeweiteten Laserstrahls zur optischen Achse. Über den Seiteneingang gelangt das Laserlicht auf die rückseitige Apertur des Objektivs und wird von diesem als Punkt in die Objektebene abgebildet. Verändert der Scanner den Winkel des aufgeweiteten Strahls, so ändert sich auch die Position des Fokus nach Gleichung (3.37).

Die Systemsoftware sorgt nun dafür, dass die Scanspiegel gerade so bewegt werden, dass das Objekt in der Objektebene Punkt für Punkt und Zeile für Zeile abgetastet werden. Da der Prismenumschalter nur alternativ arbeitet, ist dabei

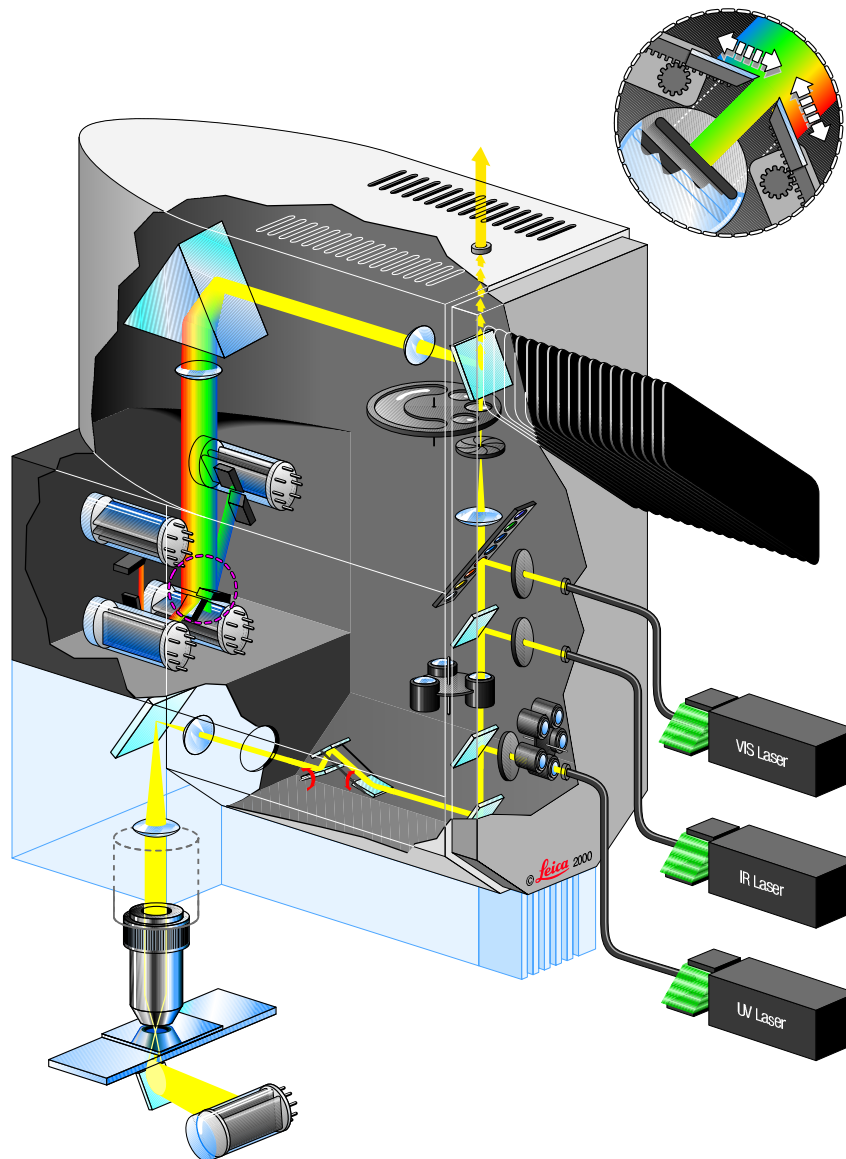


Abbildung 6.5: Konfokalscankopf Leica TCS-SP2 (Abbildung freundlich überlassen von Leica Microsystems, Mannheim).

der Trinokularkopf „stillgelegt“.

Für die konfokale Aufnahme von optischen Schnitten ist es notwendig, die Objektebene schrittweise im Bereich von ≈ 100 nm zu verändern. Der Elektromotor, der die Objektive bewegt, besitzt aber keine ausreichende Einstellgenauigkeit. Die Objektbühne ist daher mit einem piezotriebenen z-Tisch ausgestattet, der ebenfalls von der Leica-Konfokalsoftware angesteuert wird.

Das Fluoreszenzlicht wird auch hier über das Objektiv gesammelt und über die Scanspiegel zurückgeleitet. Das Fluoreszenzlicht ist „descanned“, die Scanverstellung wird rückgängig gemacht. Das Fluoreszenzlicht trifft unabhängig von der aktuellen Scanposition auf das ortsfeste Pinhole und die dahinterliegenden Detektoren, wobei es zuvor durch den Strahlteiler vom Anregungslicht abgetrennt wurde. Die Signale der Photomultiplier werden von der Software ausgelesen, mit 8 oder 12 Bit digitalisiert und über die aktuelle Scannerposition einem Bildpunkt zugeordnet. Auf diese Weise wird das fertige Bild zusammengesetzt, das im TIFF-Format abgespeichert werden kann.

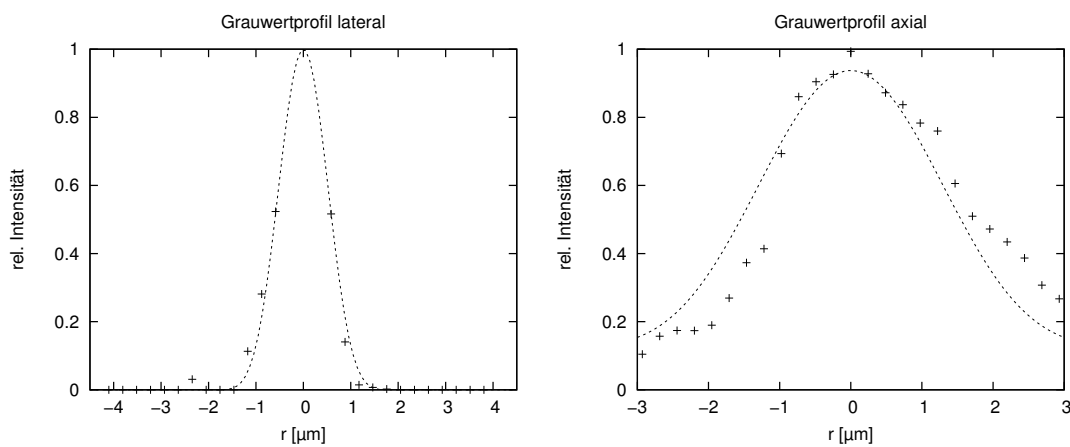


Abbildung 6.6: Bestimmung der Point-Spread-Function im Konfokalmodus über Grauwertprofile: Links in lateraler, rechts in axialer Richtung.

Das Leica-Konfokalmodul besitzt vier Photomultiplier-Tube-Detektoren. Normalerweise würde das Fluoreszenzlicht über dichromatische Spiegel auf die einzelnen Detektoren verteilt. Hier allerdings hat man die Möglichkeit, für jeden Detektionskanal einen separaten Wellenlängenbereich einzustellen, der detektiert werden soll. Technisch wird dies so erreicht, dass das Fluoreszenzlicht zunächst von einem Prisma spektral aufgespalten wird. Ein Spalt variabler Breite verteilt dann die gewählten spektralen Anteile auf die einzelnen Detektoren. Der Nachteil dabei ist allerdings, dass sich die einzelnen Wellenlängenbereiche nicht überlappen dürfen. In Figur 6.5 ist eine Zeichnung des Leica-Konfokalmoduls abgebildet.

Zum Abschluss auch hier noch ein Beispiel für eine Messung der Point-Spread-Function: Es wird das gleiche Bead-Agar-Präparat wie im vorigen Abschnitt 6.2 verwendet, dieses Mal wird die Messkammer aber konfokal beleuchtet (grHeNe mit $\lambda = 543 \text{ nm}$) und das Fluoreszenzlicht konfokal detektiert (Pinholedurchmesser $270 \mu\text{m}$). Neben dem lateralen Grauwertprofil kann durch einen z-Scan auch das axiale Profil aufgenommen werden. Abbildung 6.6 zeigt dazu jeweils ein

Beispiel.

Die gewonnenen Daten werden wieder an die theoretischen Verläufen angepasst, hier Gleichung (4.17), und man erhält $\nu \approx 1.93\Delta r$ und $u \approx 0.68\Delta z$. In der Konfokalmikroskopie ist es üblich, den vollen Durchmesser der PSF bei dem Punkt anzugeben, an dem die Maximalintensität auf die Hälfte abgefallen ist (sogenannte „full width at half maximum“, „FWHM“). In den Beispielen hier sind das etwa $\Delta r_{\text{FWHM}} \approx 1,2 \mu\text{m}$ und $\Delta z_{\text{FWHM}} \approx 3 \mu\text{m}$. Auch hier macht sich der Streubeitrag des Agargels bemerkbar.

6.4 Multiphoton-Laserquelle

Als Laserquelle für Multiphoton- und SHG-Anregung, vergleiche Kapitel 8 und 11, stand ein gepulster Titan-Saphir-Laser (Tsunami, Spectra-Physics, Mountain View, CA, USA) zur Verfügung, der hier als Pikosekundenlaser ausgelegt ist. Der „Ti:Sa“-Laser kann auch im cw-Modus gefahren werden, allerdings ist dann die effektive Photonendichte zu gering, um Mehrphotoneneffekte auszulösen.

Das Ti:Sa-Lasersystem wird selbst von einem frequenzverdoppelten Nd:YVO₄-Laser (Millenia VII, Spectra-Physics, Mountain View, CA, USA) gepumpt, der bis zu 8 W Durchschnittsleistung aufzubringen vermag. Die mittlere Leistung des Ti:Sa ist mit etwa 1 W spezifiziert, die mittlere Pulsdauer beträgt ungefähr 2 ps bei einer Pulsfrequenz von 76 MHz [spe 1999].

Die emittierte Wellenlänge wird mit Hilfe doppelbrechender Filter eingestellt, durch die die Laserstrahlung im Resonator wiederholt laufen muss. Abhängig von der Winkeleinstellung der doppelbrechenden Filter bleibt nur bei einem schmalen Wellenlängenband der Polarisationszustand erhalten, die anderen Wellenlängenbereiche werden durch Reflektion an polarisierenden Oberflächen letztlich unterdrückt. Die Pulslänge kann mit einem Gires-Tournois-Interferometer optimiert werden, dass dem zu verstärkenden Laserpuls eine zusätzliche negative Gruppendiffusion aufprägt.

Durch die Einkopplung in den konfokalen Scankopf steht der gepulste Laserstrahl neben der stationären Einkopplung (Kapitel 8) auch als Beleuchtungsquelle zur Verfügung, mit der eine Probe gescannt werden kann. Das Fluoreszenzlicht wird dann mit den vier Descanned-Detektoren aufgezeichnet. Im Kapitel 4.4 wurde jedoch bereits beschrieben, dass sich die Multiphotonmikroskopie durch einen intrinsischen Pinholeeffekt auszeichnet. Entsprechend ist es möglich, Detektoren ohne Pinhole einzusetzen, da der Ursprungsort des Fluoreszenzlichts jederzeit bekannt ist. Aus demselben Grund ist es nicht unbedingt notwendig, das Signal

über die Scanspiegel zu „descannen“.

Hinzu kommt, dass Streulicht bei kohärenten Prozessen wie SHG, vergleiche Kapitel 4.4.2, eine deutliche Richtungspräferenz aufweist und nicht isotrop abgestrahlt wird. Aus diesem Grund stehen an unserem Mikroskopsystem zwei zusätzliche Non-Descanned-Detektoreinheiten zur Verfügung, ein Transmissionsdetektor und ein Rückreflektionsdetektor. Beide werden durch Infrarotfilter vor Anregungsrestlicht geschützt.

Der Transmissionsdetektor befindet sich im Durchlicht-Beleuchtungspfad des Mikroskops, der Rückreflektionsdetektor an einem Seitenausgang, in einer Ebene mit der Epifluoreszenzbeleuchtung. Entsprechend können diese Module nur alternativ verwendet werden.

6.5 Okularkamera

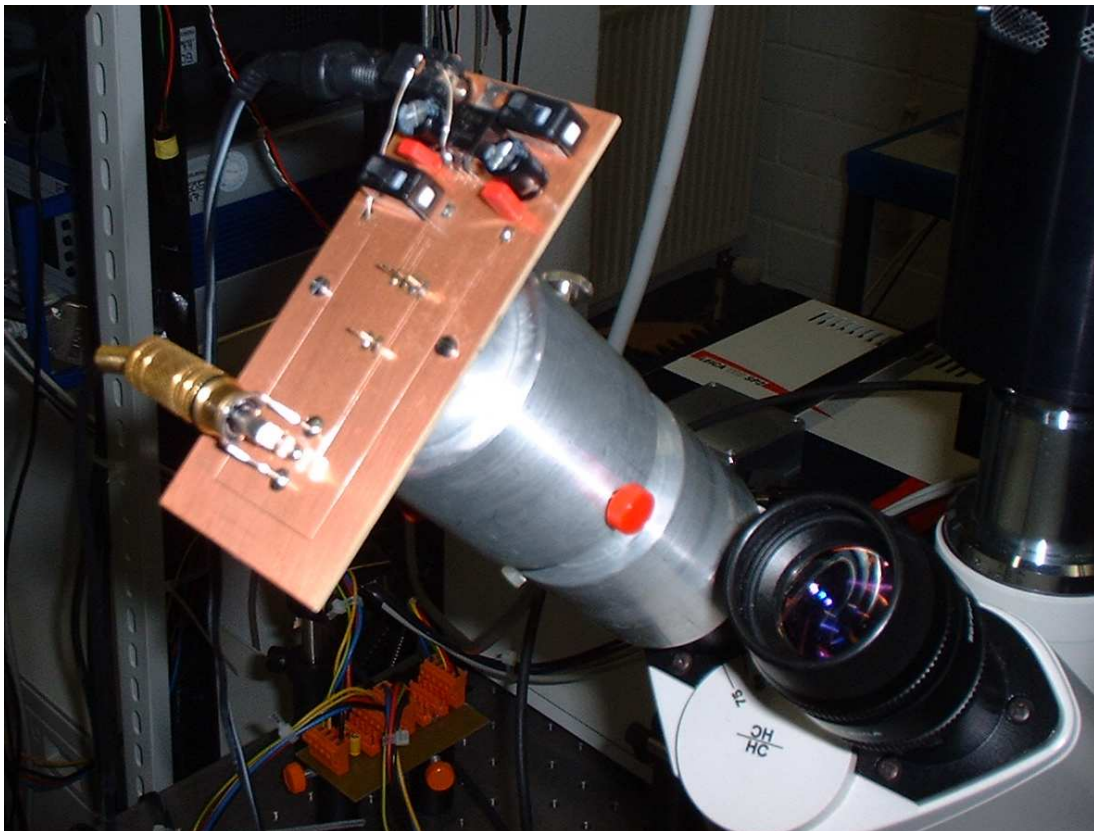


Abbildung 6.7: Okularkamera für parallelen Einsatz von Epifluoreszenz- und Durchlichtanwendungen

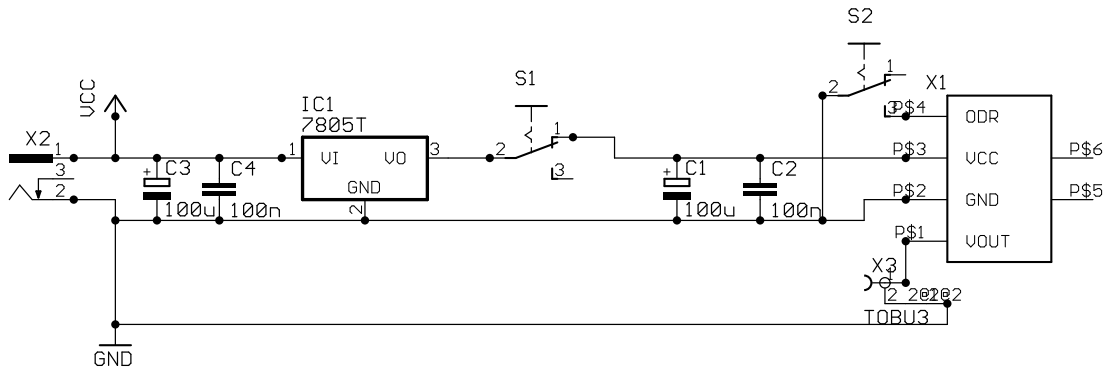


Abbildung 6.8: Schaltplan der Okularkamera

Wie weiter oben bereits beschrieben, müssen Moleküle fluoreszenzmarkiert werden, damit sie mikroskopisch beobachtet werden können. Dies gilt auch für die geplanten Kraftmessungen an Motorproteinen, unter anderem im Motilitätsassay (Kapitel 10). Für diese Kraftmessungen benötigt man allerdings Latexbeads, über die die optische Pinzette manipulativ in das Präparat eingreifen kann. Damit diese im Fluoreszenzmodus gesehen werden können, müssen sie ebenso fluoreszenzmarkiert sein.

Da diese Beads im Labor selbst angefärbt werden müssen, ergab sich ein Problem: Man sieht die Beads im Fluoreszenzmodus nur dann, wenn es im Anfärbeprozess keine Probleme gab. Sieht man nichts, könnten trotzdem Beads in der Probe sein (oder auch nicht). Leider ist die ICCD-Kamera (Luminescence Imager, Photonic Science Ltd., Robertsbridge, UK), die wir für Epifluoreszenzaufnahmen verwenden, in diesem Fall zu empfindlich. Sie kann im Durchlichtmodus nicht ohne Gefahr von Schäden verwendet werden.

Aus demselben Grund haben wir vor diese ICCD-Kamera ein Wärmeschutzfilter (KG-1, 370080, Linos Photonics, Göttingen) montiert, das jegliche Reststrahlung der eingekoppelten IR-Laser abfangen sollte. Der Nachteil dabei ist natürlich, dass man die Laserreflexe am Deckgläschen nicht mehr sieht. Dies ist vor allem bei der Strahljustage ein unschätzbare Informationsgewinn.

Nun existierte am System nur ein Kamera-Port, wo bereits die ICCD-Kamera montiert ist. Ein Austausch der Kamera im laufenden Experiment brachte mechanische Erschütterungen, so dass sich der abgebildete Ausschnitt während des Kameraaustauschs verschob und nicht mehr reproduziert werden konnte. Da der eigentliche Videoport durch den Konfokalscankopf belegt ist, blieb als einzige Möglichkeit, eine weitere Kamera an eines der beiden Okularstopfen zu montieren. Der Verlust der direkten visuellen Stereo-Beobachtungsmöglichkeit war in

diesem Zusammenhang tragbar, zumal geplant war, die Okularkamera so auszuliegen, dass sie leicht wieder entfernt werden kann. Darüber hinaus ist es bei aktiver Lasereinkopplung sowieso nicht empfehlenswert, eine visuelle Beobachtung vorzunehmen.

Da an die Kamera keine sehr großen Anforderungen bezüglich der Lichtempfindlichkeit gestellt wurden, konnte auf ein einfaches CCD-Modul (CCAM, 150001, Conrad Electronic, Hirschau) zurückgegriffen werden. Der einfache Schaltplan ist in Abbildung 6.8 dargestellt, er besteht neben dem CCD-Chipmodul im wesentlichen aus einem 5 V-Spannungsregulator (7805) und einigen Kondensatoren. Das CCD-Modul liefert ein Videosignal, das über eine Umschaltbox auf den Videorecorder und den Monitor gelegt werden kann.

Das CCD-Modul wird mit einer Plastiklinse (Brennweite $f \approx 7$ mm) ausgeliefert. Zunächst wurde daher versucht, das Modul als „künstliches Auge“ direkt auf eines der Okulare zu montieren. Es konnte zwar ein Bild erzeugt werden, der Ausschnitt war jedoch sehr klein und an den Rändern verzerrt. Auch durch Verändern des Abstandes konnte das Bild nicht verbessert werden.

In der jetzt realisierten Konfiguration wird eines der Okulare entfernt und das Zwischenbild O' , vergleiche Abbildung 4.1(a), über eine Sammellinse (Brennweite $f \approx 25$ mm, zusammengesetzt aus zwei Plankonvexlinsen mit $f \approx 50$ mm) direkt auf den CCD-Chip abgebildet. Diese Optik ist in einer Metallröhre untergebracht, die als Teleskop ausgelegt ist, damit das Kamerabild scharfgestellt werden kann. Die Metallröhre kann direkt in das für die Okulare vorgesehene Gewinde geschraubt werden, was die mechanische Stabilität des Kameramoduls zusätzlich erhöht. Es ist in Abbildung 6.7 dargestellt.

6.6 xy-Piezotranslator

Der Mikroskoptisch des Leica DM/IRBE Stativs kann lateral nur von Hand verstellt werden. Dies ist für relativ große und träge Präparate kein Problem. Aber bereits beim Einfang von mikroskopischen Objekten mit der optischen Pinzette treten Probleme auf: Die manuelle Steuerung erfolgt zwar über eine Spindel und ist relativ leichtgängig. Dennoch beginnt jede Verschiebung mit einem gewissen Ruck. Durch diese Störung werden regelmäßig Objekte aus dem Kraftfeld der optische Pinzette hinausgeschleudert.

Ein weiteres Problem war, dass man lateral keinerlei Größenverhältnisse zuordnen konnte. Nun existieren zwar Objektträger mit eingedrucktem Maßstab, so dass man sich einmalig merken kann, wie groß zum Beispiel das abgebildete Objektfeld ist. Das löst aber nicht das Problem, zum Beispiel eine exakte

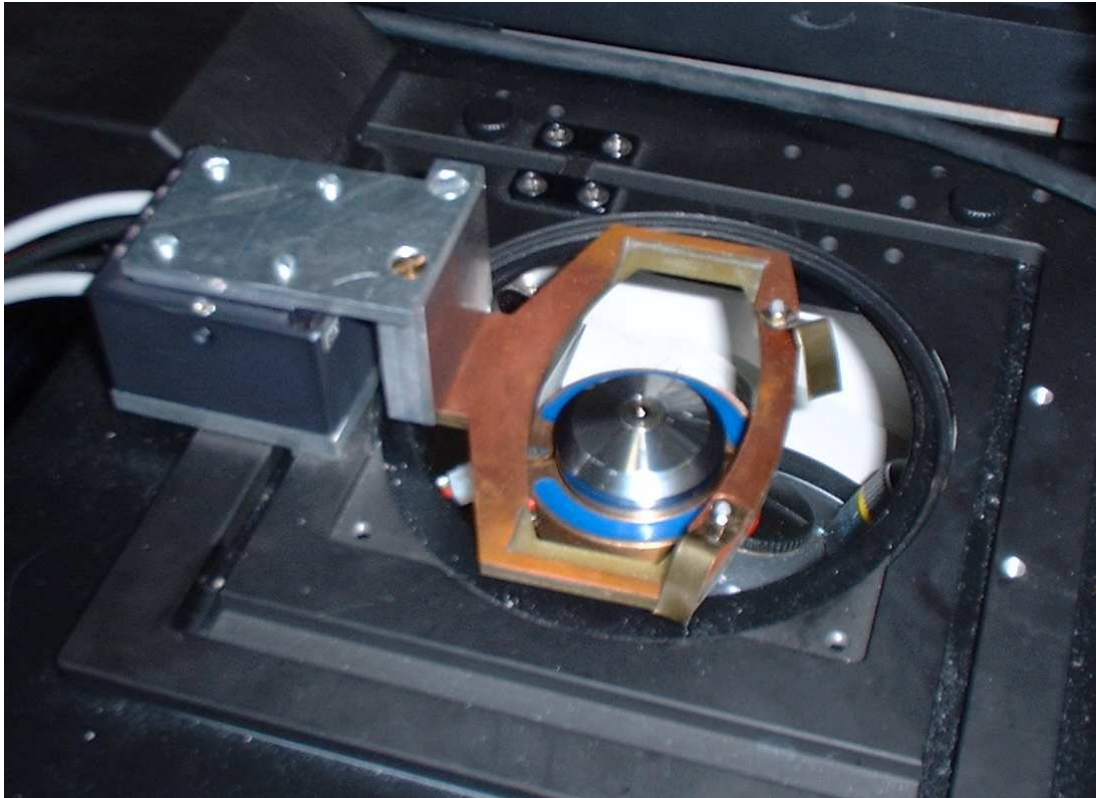


Abbildung 6.9: Piezotranslator mit Objektträgerhalterung.

Verschiebung mit definierter Geschwindigkeit zu realisieren. Die durch solch definierte Geschwindigkeiten auftretenden Strömungen werden über die Stokeskraft zur Kalibrierung des Kraftfelds der optischen Pinzette herangezogen. Daneben braucht man definierte Verschiebungen zur Kalibrierung der Positionsdetektoren.

In der CMLTT-Apparatur wird für diese Zwecke ein Zweiachsen-Niedervolt-Piezotranslator (PXY100-38, Linos Photonics, Göttingen) eingesetzt, der, als Sonderanfertigung, mit kapazitiven Positionsdetektoren ausgestattet wurde. Er besitzt einen Stellweg von jeweils $38\ \mu\text{m}$ und ist mit einer Einstellgenauigkeit von etwa $50\ \text{nm}$ spezifiziert. Die Resonanzfrequenz liegt bei $730\ \text{Hz}$, so dass Reaktionszeiten von einigen wenigen Millisekunden erreicht werden können.

Der dazugehörige Controller (ENV-40, piezosystem jena, Jena) liefert die für den Betrieb notwendige Spannung im Bereich von -10 bis $150\ \text{V}$. Darüber hinaus ist er mit einem zuschaltbaren Feedback-System ausgestattet, das die Positionsdetektoren im Piezotranslator online ausliest und bei Veränderungen entsprechend die Spannung nachregelt. Die Ausgangsspannung und im closed-loop-Modus die Regelposition können durch eine externe analoge Signalspannung von $0 - 10\ \text{V}$

moduliert werden. Weiterhin kann an einem Monitorausgang ein Spannungssignal abgegriffen werden, das proportional zur gerade anliegenden Ausgangsspannung bzw. zur gerade gemessenen Position ist.

Damit Standardobjektträger weiter verwendet werden können, wurde eine gabelförmige Halterung konstruiert, die den Objektträger auf eine für das Objektiv erreichbare Höhe herabsetzt (Abbildung 6.9). Ein Problem mit dieser Halterung war zunächst, dass die Gabel weiter ausladend war als es jetzt der Fall ist. Dies machte sich im Konfokalmodus bemerkbar, wenn der z -Piezotisch des Konfokalmoduls eingeschaltet wurde. Da dieser einen Großteil der Objektbühne anhebt — und damit auch den xy-Piezotranslator — versetzten bereits leichte Stöße am Ende der Objektträgerhalterung den z -Piezotisch in Schwingung. Offensichtlich ist dieser ebenfalls mit einer Rückkopplung ausgestattet, deren Reaktion aber so langsam erfolgte, dass sie die Schwingung eher anstieß denn dämpfte. Die vorgenommene Verkürzung der Objektträgerhalterung hat dieses Problem behoben, so dass, mit dem z -Tisch des Konfokalmoduls, das Präparat in allen drei Raumrichtungen mit einer Genauigkeit von einigen 10 nm verschoben werden kann.

Kapitel 7

Optische Pinzette

7.1 Überblick

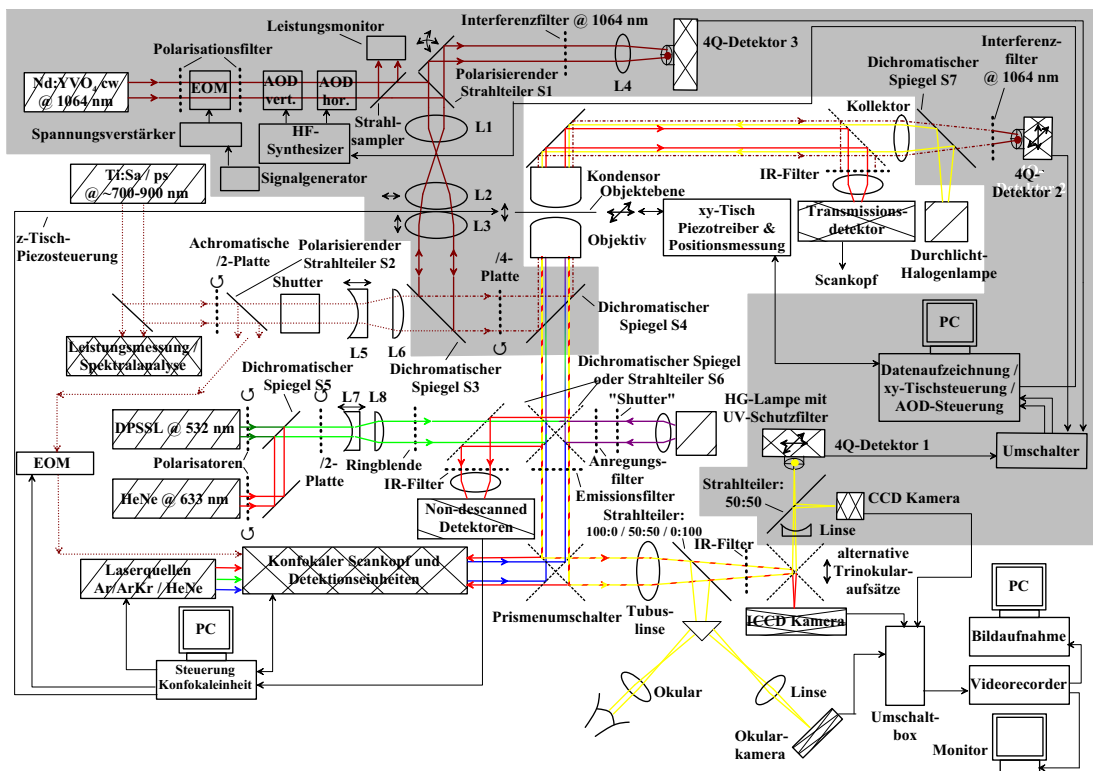


Abbildung 7.1: Laser tweezers-Modul der CLMTT-Messapparatur, die grau unterlegten Elemente sind Teil dieses Moduls: Ein diodengepumpter Festkörperlaser ($\lambda = 1064\text{nm}$), ein elektrooptischer Modulator, zwei akustooptische Modulatoren, ein Leistungsmonitor, Aufweitungs- und Einkoppeloptik, drei Vierquadrantendetektoren und ein Steuerungs-PC.

Abbildung 7.1 gibt einen Überblick über die optischen Elemente, die zum Laser tweezers-Modul gehören. Dieses Modul ist sehr umfangreich, daher sollen die einzelnen Teile in den folgenden Abschnitten detailliert beschrieben werden. Zusammengefasst besteht das Modul aus

- einer *Laserquelle*, die durch einen diodengepumpten Nd:YVO₄-cw-Festkörperlaser der Wellenlänge $\lambda = 1064$ nm realisiert ist (Kapitel 7.2),
- einem *elektrooptischen Modulator* zur Regulierung der Laserlichtleistung (Kapitel 7.3),
- einem zweiteiligen *akustooptischen Modulator* zur Strahlablenkung (Kapitel 7.4),
- einer *Aufweitungs- und Einkoppeloptik* (Kapitel 7.5)
- sowie drei *Vierquadrantendetektoren*, mit denen die Position von Objekten in der optischen Pinzette gemessen werden kann (Kapitel 7.6).

7.2 Laserquelle

Im Kapitel 3.4 wurden bereits einige der Anforderungen an den Laserstrahl formuliert, die für einen stabilen Betrieb der optischen Pinzette notwendig sind. Darunter fallen Profilgüte, Profilstabilität, Positionsstabilität und Leistungsstabilität. Außerdem ist auf eine ausreichend hohe Leistungsreserve zu achten. Daraus ergibt sich auch die Forderung, dass das einzufangende Objekt im verwendeten Wellenlängenbereich wenig Absorption aufweisen sollte.

Biologisches Material weist im allgemeinen im nahen Infraroten, das heißt bei Wellenlängen um $1 \mu\text{m}$, eine geringere Lichtabsorption auf als zum Beispiel im sichtbaren Wellenlängenbereich¹. Optische Pinzetten in biomedizinischen Anwendungen werden daher in der Regel mit Laserwellenlängen im genannten Bereich realisiert. Als besonders geeignet haben sich dabei auf Neodym basierte Festkörperlaser erwiesen.

Neodym wird als Dotierung — die typische Konzentration liegt im unteren Prozentbereich — in einen Wirtskristall eingebracht [DAVIES 2000]. Dort besitzt es die interessante Eigenschaft, dass sein Absorptionsband bei ≈ 800 nm mit dem

¹Wasser hingegen ist im sichtbaren Wellenlängenbereich transparenter; es existiert jedoch ein „Fenster“ leicht erhöhter Transparenz im genannten Bereich um $1 \mu\text{m}$ [DIETRICH et al. 1975].

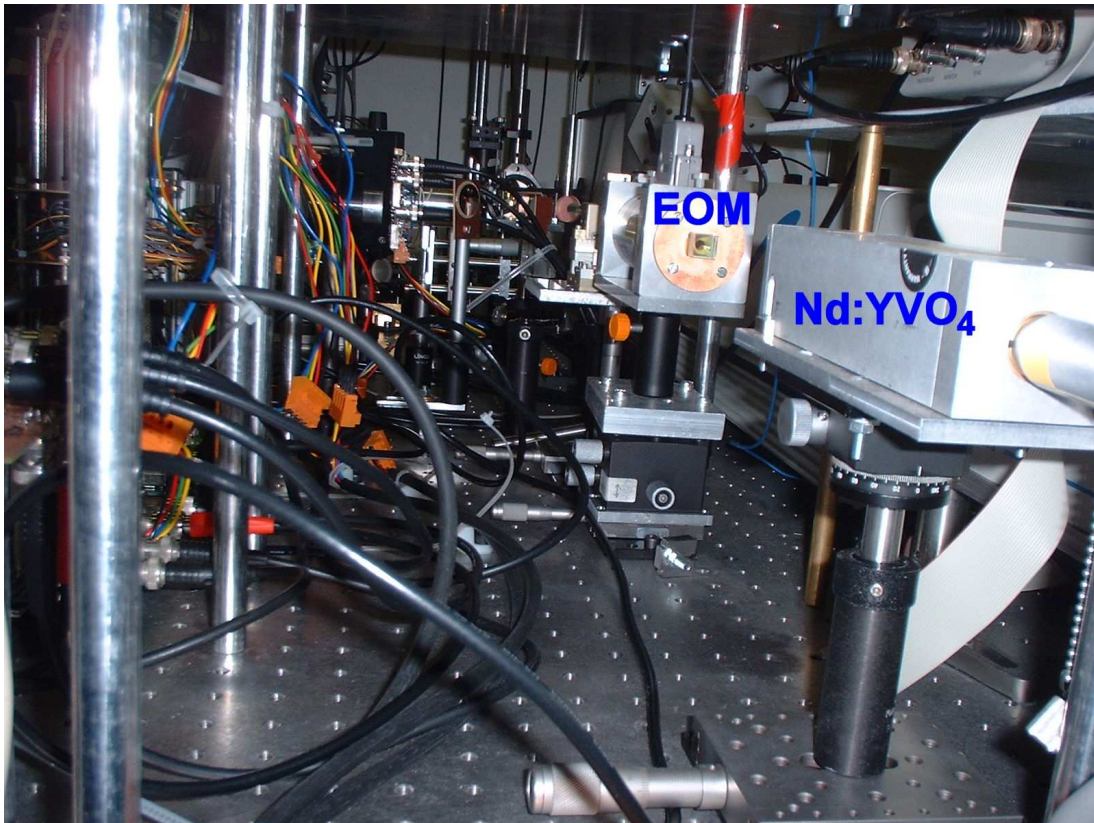


Abbildung 7.2: Laser tweezers-Modul der CMLTT-Messapparatur: Rechts im Bild der Kopf des Nd:YVO₄-Lasers (Abschnitt 7.2), davor links der elektrooptische Modulator (Abschnitt 7.3).

Emissionsmaximum von leistungsstarken Aluminium-Galliumarsenid- (AlGaAs-) Diodenlaserarrays zusammenfällt, die deshalb bevorzugt als Pumplichtquellen für Neodym-Laser eingesetzt werden. Dieser Lasertyp wird daher auch mit „DPSSL“ („diode pumped solid state laser“) bezeichnet. Die Ausgangsleistung der DPSSL wird dann über den elektrischen Diodenstrom geregelt, mit dem das Diodenlaserarray gespeist werden.

Die am häufigsten verwendeten und mit Neodym dotierten Kristalle, Nd:YAG („Yttrium-Aluminium-Granat“), Nd:YLF („Yttrium-Lithiumfluorid“) und Nd:YVO₄ („Yttrium-Vanadat“) regen sich darüber hinaus relativ schnell aus dem unteren Laserniveau in den Grundzustand ab, so dass eine hohe Laserverstärkung möglich wird und — im cw-Modus — Ausgangsleistungen im Wattbereich erreicht werden können. Aus dem Emissionsband im 1 μ m-Bereich sind insbesondere die Linien bei 1047 nm, 1053 nm (Nd:YLF) und 1064 nm (Nd:YAG und Nd:YVO₄) interessant.

Im hier beschriebenen Aufbau kommt ein Nd:YVO₄-Laser (J20-BL106C-2, Spectra-Physics, Mountain View, CA, USA) mit einer Ausgangsleistung von maximal ≈ 4 W zum Einsatz. Die Ausgangsleistung wird, wie oben beschrieben, über den Diodenstrom des Diodenlaserarrays geregelt. Laseraktivität stellt sich ab etwa $I_D = 10$ A ein, der maximale Diodenstrom liegt bei etwas über $I_D = 22$ A. Der Diodenstrom kann im laufenden Betrieb geändert werden, allerdings dauert es einige Sekunden, bis sich ein neu eingestellter Wert stabilisiert hat.

Das Diodenlaserlicht wird über ein Faserbündel in das Laserkopfstück eingekoppelt (siehe Abbildung 7.2), in dem sich auch der Nd:YVO₄-Kristall mit dem Laserresonator befindet. Diese zweigeteilte Konfiguration hat den Vorteil, dass die Vibrationen der Lüfter, mit denen das Diodenlaserarray gekühlt wird, mechanisch vom Laserkopfstück entkoppelt sind und aus dem eigentlichen optischen Aufbau „herausgehalten“ werden können.

Der Laserstrahl selbst besitzt laut Herstellerspezifikation eine Wellenlänge von 1064 nm, ein TEM₀₀-Strahlprofil mit einer Strahlellipse < 10 %, einen Strahldurchmesser von 0,42 mm, eine Halbwinkelstrahldivergenz von 1,7 mrad und ist vertikal polarisiert ($> 100 : 1$).

Die optische Pinzette war mit anderen lichtmikroskopischen Techniken zu kombinieren. Da diese vornehmlich mit Licht im sichtbaren Wellenlängenbereich arbeiten, ergab sich aus der verwendeten Wellenlänge von 1064 nm ein weiterer, technischer Vorteil: Das Laserlicht der optischen Pinzette konnte mit wellenlängenabhängigen, „dichromatischen“ Spiegeln quasi ohne Beeinträchtigung der sonstigen Funktionalität in die mikroskopische Apparatur eingekoppelt werden. Darüber hinaus werden viele optische Elemente (Antireflexbeschichtungen, Kristalloptiken) serienmäßig für diese Wellenlänge hergestellt; es mussten keine teureren Spezialanfertigungen beschafft werden.

Um zu überprüfen, dass der verwendete Laser die geforderten Stabilitätseigenschaften besitzt, wurden die im folgenden beschriebenen Testmessungen durchgeführt. Dabei wurde ein Teil des Laserstrahl über einen „Beamsampler“ (44-2426, Coherent, Inc., Santa Clara, CA, USA) ausgekoppelt — das Reflektions-Transmissionsverhältnis entsprach hier ≈ 5 % — und über einen Abschwächer auf ein Laserprofilmessgerät gelenkt. Das Profilmessgerät (BeamMaster BM-7, Coherent, Inc., Santa Clara, CA, USA) ist in der Lage, Gesamtleistung, Intensitätsprofil (zweidimensional und eindimensional) sowie Position eines Laserstrahls auszumessen.

Das Profilmessgerät wurde mit zwei Abschwächfiltern, „ND-4“ und „ND-9“ ausgeliefert, die zuvor individuell vom Hersteller ausgemessen werden. Die BeamMaster-Software rechnet dann von gemessenen Werten auf reale zurück. Leider stellte sich heraus, dass die Datei, die den ND-9-Filter beschreibt, feh-

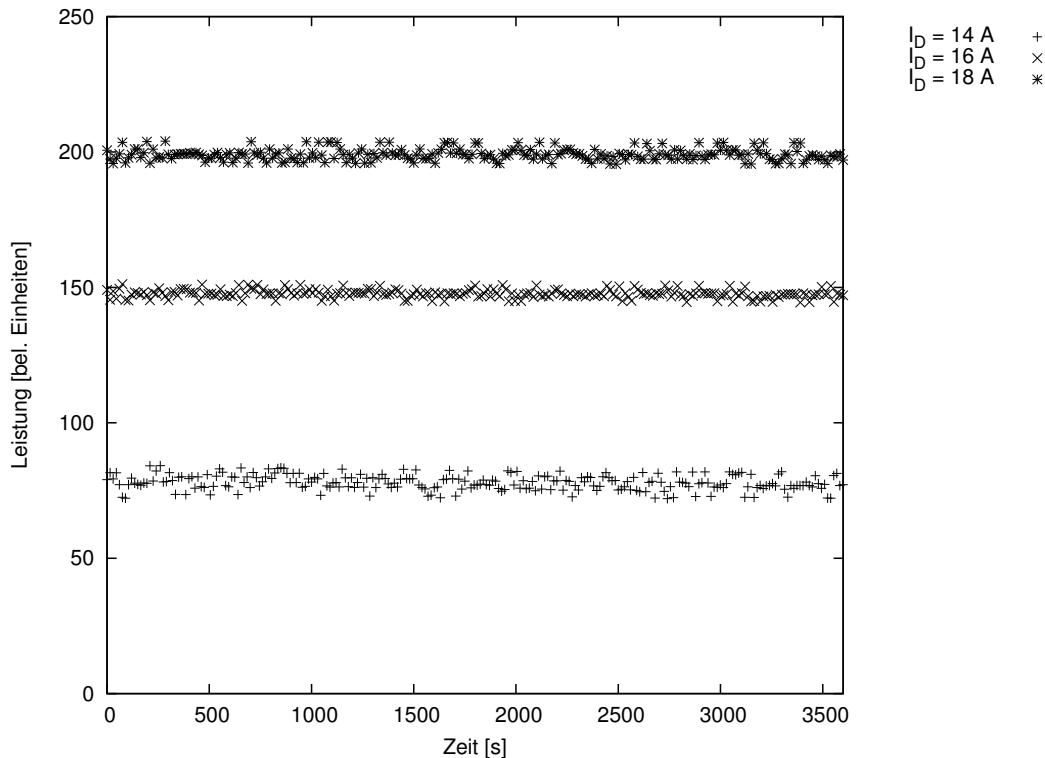


Abbildung 7.3: Stabilitätstest der Ausgangsleistung des Nd:YVO₄-Lasers bei Pumpdiodenströmen von $I_D = 14\text{ A}$, $I_D = 16\text{ A}$ und $I_D = 18\text{ A}$. Die Daten wurden jeweils über einen Zeitraum von einer Stunde in 15-Sekunden-Intervallen aufgezeichnet.

lerhaft war. Daher können Leistungsmesswerte, die mit diesem Filter gewonnen werden, nicht absolut interpretiert werden. Für relative Bewertungen sind die Daten jedoch anwendbar. Ich werde daher im folgenden von relativen Leistungseinheiten, „L.E.“, Gebrauch machen.

Zunächst wurde die Stabilität der Laserausgangsleistung geprüft. Dazu wurde bei Diodenströmen von $I_D = 14\text{ A}$, $I_D = 16\text{ A}$ und $I_D = 18\text{ A}$ — nach einem Vorlauf von etwa 15 Minuten — über jeweils eine Stunde die Gesamtleistung des Teststrahls in Intervallen von 15 Sekunden gemessen.

Als Ergebnis der zeitlichen Stabilitätsmessung ergab sich für $I_D = 14\text{ A}$ eine Leistung von $77,96 \pm 2,77\text{ L.E.} (\equiv \pm 3,57\%)$, für $I_D = 16\text{ A}$ eine Leistung von $147,66 \pm 1,51\text{ L.E.} (\equiv \pm 1,02\%)$, und für $I_D = 18\text{ A}$ eine Leistung von $199,09 \pm 2,16\text{ L.E.} (\equiv \pm 1,09\%)$, siehe auch Abbildung 7.3. Man erkennt, dass für eine stabile Laseraktivität der Diodenstrom eher auf $I_D = 16\text{ A}$ und höher einzustellen ist. Die damit zu erreichende Stabilität im Prozentbereich ist sehr zufriedenstellend.

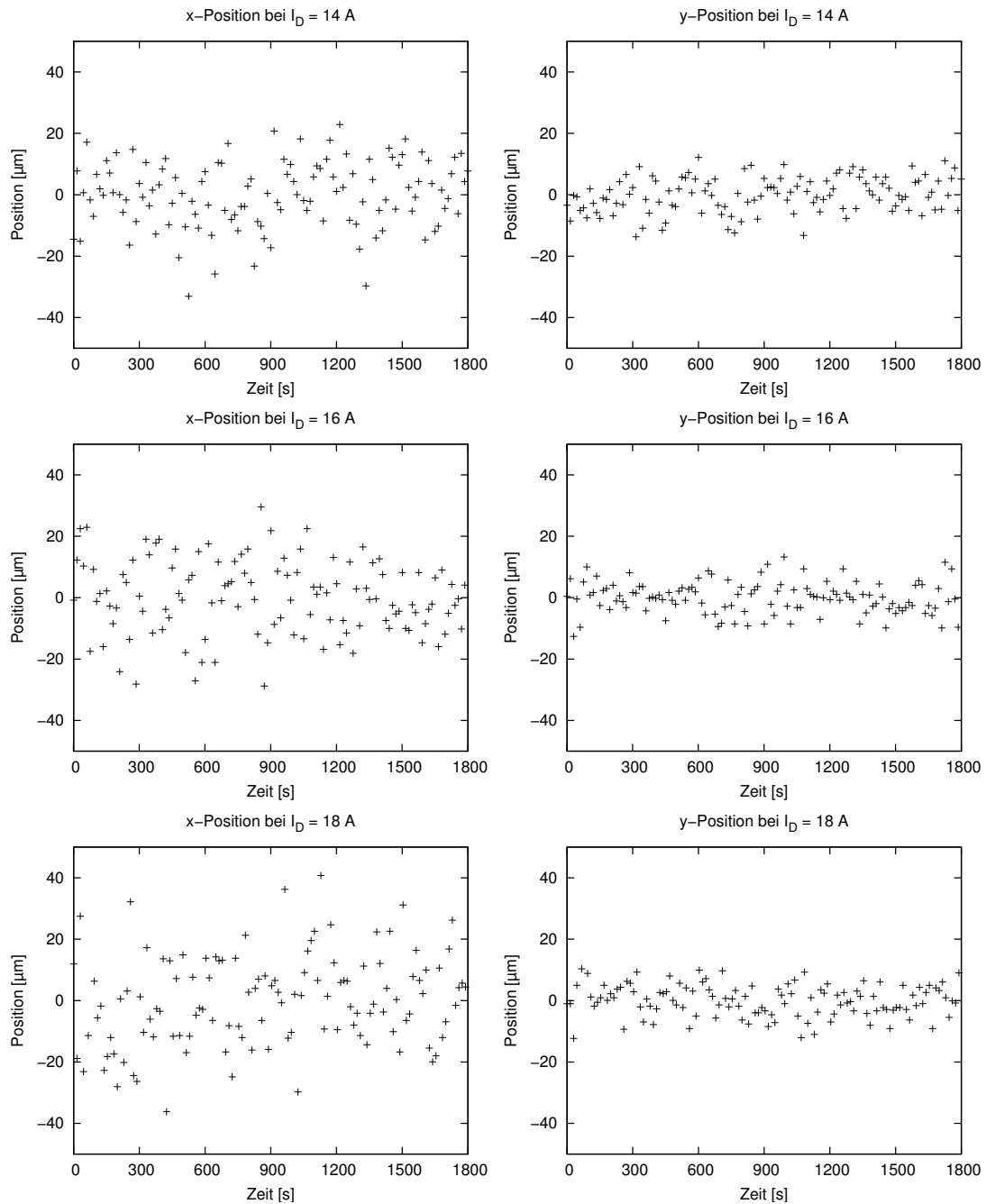


Abbildung 7.4: Positionsstabilität des Nd:YVO₄-Lasers: Dargestellt sind die x - und y -Koordinaten des Strahlzentrums bei Pumpdiodenströmen von $I_D = 14$ A, $I_D = 16$ A und $I_D = 18$ A, wobei der Mittelwert auf eine Relativposition von $y = 0$ gesetzt wurde. Die Messzeit betrug jeweils eine halbe Stunde; die Daten wurden in 15-Sekunden-Intervallen erhoben.

Eine weitere Testmessung betraf die Lagestabilität des Laserstrahls. Wiederum mit dem BeamMaster wurden die x - und y -Koordinate des Strahlzentrums bei Pumpdiodenströmen von $I_D = 14\text{ A}$, $I_D = 16\text{ A}$ und $I_D = 18\text{ A}$ jeweils eine halbe Stunde lang aufgezeichnet. Die in Intervallen von 15 Sekunden erhobenen Daten sind in Abbildung 7.4 dargestellt.

Bei einem Diodenstrom von $I_D = 14\text{ A}$ erhält man als Standardabweichung der x - und y -Werte $\Delta x = 10,9\ \mu\text{m}$ und $\Delta y = 5,8\ \mu\text{m}$, bei $I_D = 16\text{ A}$ $\Delta x = 12,0\ \mu\text{m}$ und $\Delta y = 5,2\ \mu\text{m}$ sowie bei $I_D = 18\text{ A}$ $\Delta x = 14,8\ \mu\text{m}$ und $\Delta y = 5,1\ \mu\text{m}$. Zunächst fällt die in etwa doppelt- bis dreifache Stabilität in y -Richtung auf. Hierfür konnte jedoch keine schlüssige Erklärung gefunden werden, zumal der Laserkopf keine aktive Kühlung besitzt (siehe oben), was eine erhöhte Vibration in x -Richtung hätte erklären können.

Die Positionsmessung wurde etwa auf halber Strecke zwischen Laserkopf und Mikroskopobjektiv (Gesamtstrecke insgesamt etwa 2 m) durchgeführt. Eine Positionierungsungenauigkeit von $15\ \mu\text{m}$ entspricht daher an der rückwärtigen Öffnung des Objektivs einer Winkelungenauigkeit von $15\ \mu\text{rad}$ und ergibt bei einer Objektivbrennweite von $\approx 2\text{ mm}$ eine Fokuspositionsungenauigkeit von $\approx 30\text{ nm}$. Diese driftfreie Schwankung führt letztlich zu einer gewissen „Verschmierung“ des Kraftfeldes der optischen Pinzette und ist daher neben anderen Störquellen in der Kalibrierung des Kraftfeldes enthalten.

Unter denselben Bedingungen wie die Strahlmittenposition wurde auch der Strahldurchmesser einem Stabilitätstest unterzogen. Die Messungen wurden wiederum in 15-Sekunden-Intervallen über jeweils eine halbe Stunde bei Diodenströmen von $I_D = 14\text{ A}$, $I_D = 16\text{ A}$ und $I_D = 18\text{ A}$ durchgeführt. Als Durchmesser wurden in v und w -Richtung — das bedeutet, entlang die ersten und zweiten Winkelhalbierenden — die vollen Strahlbreiten bei 80 %, 50 % und 13,5 %² der Maximalintensität aufgezeichnet, siehe Abbildung 7.5. Die Ergebnisse sind in Tabelle 7.1 zusammengefasst.

Die Strahldurchmesser zeigen eine hervorragende zeitliche Stabilität. Die Werte für die 13,5%-Durchmesser stimmen auch gut mit den Herstellerangaben von Elliptizität, Ausgangsdurchmesser und Divergenz überein. Negativ fällt jedoch auf, dass die Strahldurchmesser, wenn auch nur leicht, bei Erhöhung des Diodenstroms ebenfalls zunehmen. Diese Beobachtung spricht, neben der langsamen Reaktion auf neue Diodenstromwerte, gegen eine Leistungsregulation über den Diodenstrom. Es ist allerdings auch möglich, dass es sich hier um ein Messgeräteartefakt handelt und eine gewisse Laserleistung erreicht sein muss, um eine

²Der Durchmesser, bei dem die Maximalintensität auf 13,5 % abgefallen ist, entspricht wegen $e^{-2} \approx 0,135$ dem Gaußschen Strahldurchmesser w aus Gleichung (3.55). Man beachte, dass die genannte Gleichung das Profil der elektrischen Feldgröße und nicht das der Intensität angibt.

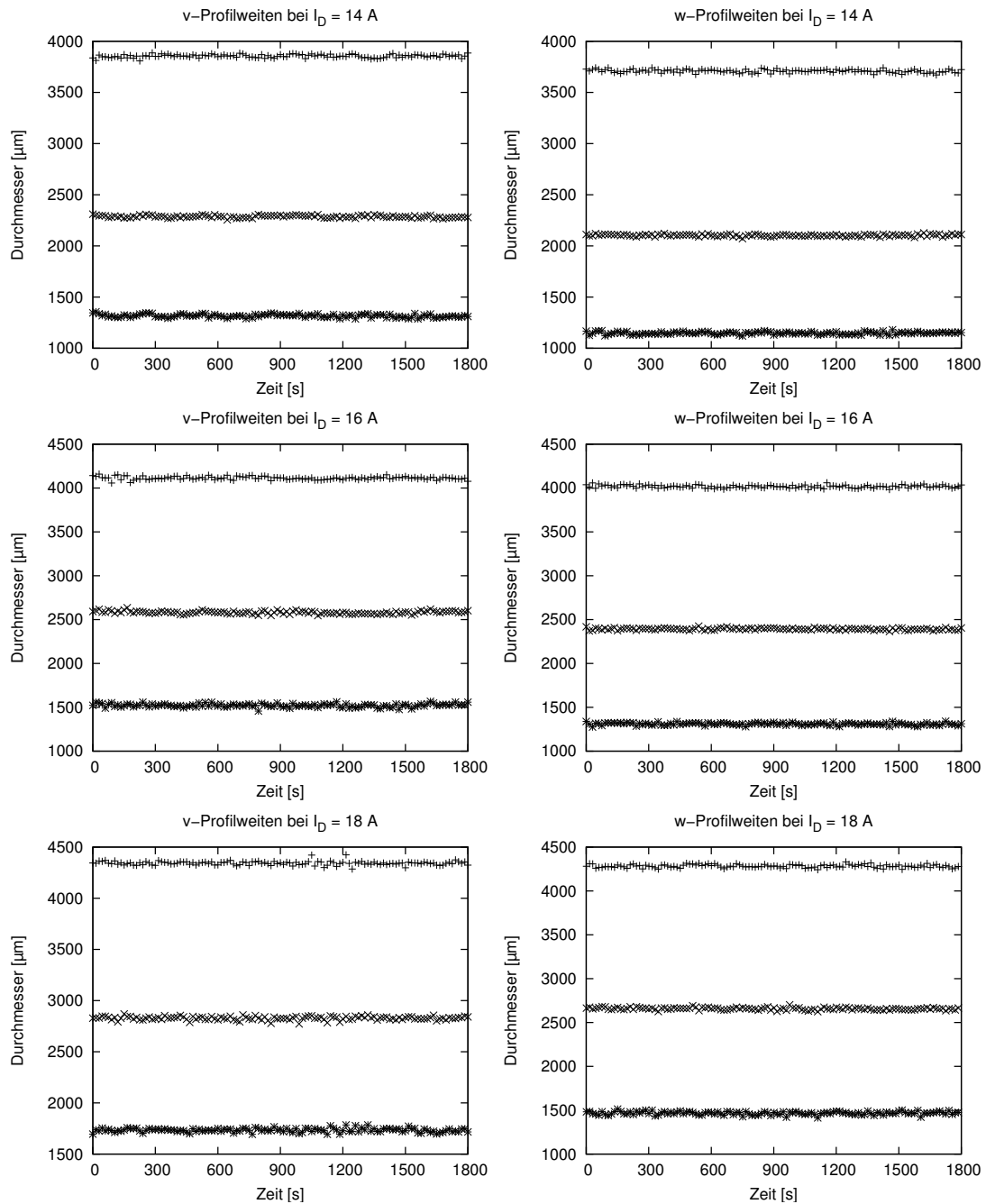


Abbildung 7.5: Profilstabilität des Nd:YVO₄-Lasers: Die Strahldurchmesser — volle Durchmesser bei 80 %, 50 % und 13,5 % Maximalleistung — wurden über jeweils eine halbe Stunde bei einem Diodenstrom von $I_D = 14 \text{ A}$, $I_D = 16 \text{ A}$ und $I_D = 18 \text{ A}$ aufgezeichnet.

Durchmesser bei	80 %	50 %	13,5 %
v ($I_D = 14$ A)	1316.6 ($\pm 1,1$ %)	2286.6 ($\pm 0,5$ %)	3855.2 ($\pm 0,4$ %)
v ($I_D = 16$ A)	1521.7 ($\pm 1,3$ %)	2581.9 ($\pm 0,6$ %)	4113.3 ($\pm 0,4$ %)
v ($I_D = 18$ A)	1733.5 ($\pm 1,1$ %)	2828.3 ($\pm 0,6$ %)	4342.6 ($\pm 0,4$ %)
w ($I_D = 14$ A)	1147.7 ($\pm 1,1$ %)	2103.4 ($\pm 0,4$ %)	3708.6 ($\pm 0,4$ %)
w ($I_D = 16$ A)	1309.9 ($\pm 1,0$ %)	2392.9 ($\pm 0,4$ %)	4017.4 ($\pm 0,4$ %)
w ($I_D = 18$ A)	1466.8 ($\pm 1,2$ %)	2657.4 ($\pm 0,5$ %)	4282.6 ($\pm 0,4$ %)

Tabelle 7.1: Volle Strahldurchmesser in v - und w -Richtung bei 80 %, 50 % und 13,5 % der Maximalintensität, jeweils bei einem Diodenstrom von $I_D = 14$ A, $I_D = 16$ A und $I_D = 18$ A.

gewisse Detektionsschwelle zu überschreiten.

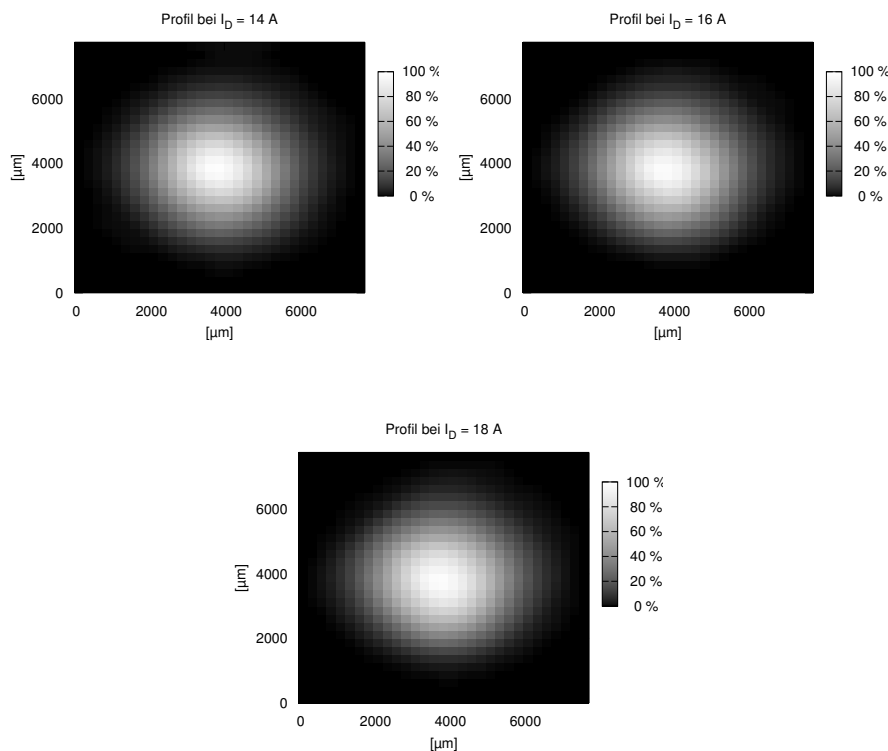


Abbildung 7.6: Zweidimensionales Profil des Nd:YVO₄-Laserstrahls bei $I_D = 14$ A, $I_D = 16$ A und $I_D = 18$ A: Die Profilschnitte sind von ausreichender Güte und Rotationssymmetrie.

Abbildung 7.6 zeigt einen zweidimensionalen Schnappschuss des Laserinten-

sitätsprofils bei den üblichen drei Testeinstellungen des Diodenstroms. Die Profile sind, mit kleinen Abweichungen (vgl. Werte in Tabelle 7.1), zufriedenstellend rotationssymmetrisch.

Abbildung 7.7 schließlich zeigt eindimensionale Schnitte des Intensitätsprofils in v - und w -Richtung, wiederum bei einem Diodenstrom von $I_D = 14$ A, $I_D = 16$ A und $I_D = 18$ A. Zusätzlich wurde, da es sich bei den Profilen um ein TEM₀₀-Profil handeln muss, für jeden Profilschnitt eine Anpassung an eine Gauss-Funktion durchgeführt. Die Regressionskoeffizienten sind in der Abbildung aufgeführt und bestätigen eine hervorragende Strahlmodenqualität.

7.3 Leistungsregulation

Die Leistungsregulation des Nd:YVO₄-Laserstrahls wird mit einem elektrooptischen Modulator, kurz „EOM“, durchgeführt (LM0202IR, 502052, LINOS Photonics, Göttingen). Modulatoren dieser Art basieren auf dem transversalen elektrooptischen Effekt: Dabei wird an einen doppelbrechenden Kristall — hier KD*P — mit Hilfe einer Art Plattenkondensator ein elektrisches Feld angelegt. Die Feldrichtung liegt dabei in einer Ebene senkrecht zur Lichtausbreitungsrichtung.

Mit der angelegten Spannung verändert sich — zum Beispiel durch Ausrichtung von Dipolen im Kristall — die optische Dichte und damit der Brechungsindex des Kristalls in Richtung des elektrischen Feldes. Die Wirkung des Modulationskristalls auf polarisiertes Licht entspricht der einer Halbwellenplatte. Der Winkel zwischen der optischer Achse der Halbwellenplatte und der Polarisationsrichtung wird durch die angelegte Spannung verändert.

Breibt man einen solchen Modulator zwischen parallel ausgerichteten Polarisatoren, so wird eintretendes Licht zunächst polarisiert. Abhängig von der anliegenden Spannung wird die Polarisationsachse des Lichts gedreht, so dass durch den zweiten Polarisationsfilter, den Analysator, nur ein Teil der Lichtintensität austreten kann. Die Polarisationsfilter sind hier mit polarisierenden Strahlteilerwürfeln realisiert, da absorptive Filter wegen der hohen Lichtleistungen nicht verwendet werden können. Der abgelenkte Strahl wird in einem „Kamm“ von Rasierklingen „vernichtet“.

Der vorliegende Modulator wird von einem Verstärker (LAV400, LINOS Photonics, Göttingen) durch einen dreipoligen Anschluss mit der Modulationsspannung versorgt. Der mittlere der Anschlüsse liegt auf Masse, die beiden anderen, die Verstärkerspannung U_{amp} und die Offsetspannung U_{off} sind unabhängig voneinander in einem Bereich von 0 – 400 V einstellbar. Entsprechend können die am Kristall anliegenden Spannungsdifferenzen $\Delta U = U_{\text{amp}} - U_{\text{off}}$ von –400

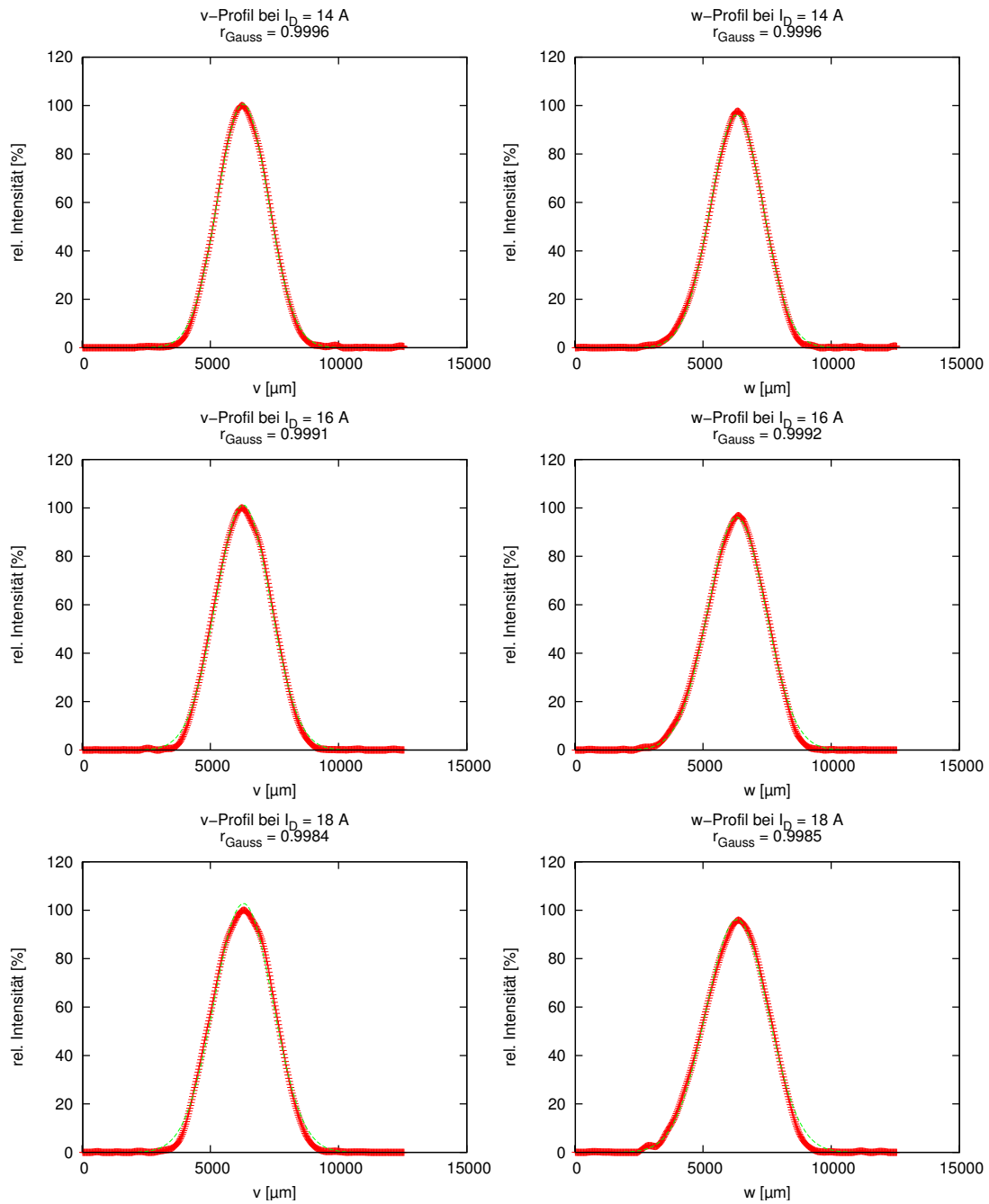


Abbildung 7.7: Eindimensionale Profilschnitte des Nd:YVO₄-Lasers in v- und w-Richtung bei $I_D = 14 \text{ A}$, $I_D = 16 \text{ A}$ und $I_D = 18 \text{ A}$. Zusätzlich ist jeweils der Regressionskoeffizient angegeben, der sich bei der Anpassung des Intensitätsprofils an eine Gaussfunktion $I(x) = a \exp\left(-\left(\frac{x-b}{c}\right)^2\right)$ ergibt.

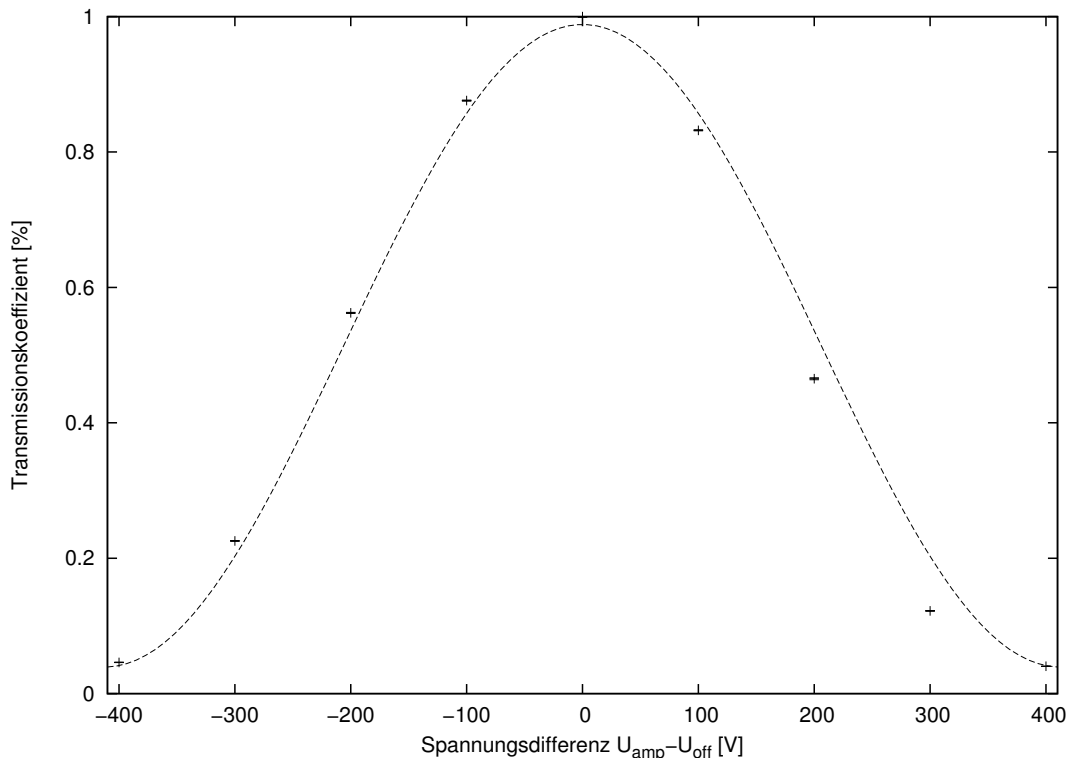


Abbildung 7.8: Leistungstransmissionskoeffizient des elektro-optischen Modulators in Abhängigkeit der Spannungsdifferenz, die an den Elektroden anliegt: Eine Anpassung der Daten an die Funktion aus Gleichung (7.1) ergab eine Halbwellenspannung von $\Delta U_{\lambda/2} \approx 412$ V und eine Resttransmission bei $\Delta U = \Delta U_{\lambda/2}$ von $I_c/I_0 \approx 4\%$.

bis +400 V betragen. Die Abhängigkeit des Transmissionskoeffizienten von der Spannungsdifferenz ΔU ergibt sich aus der Analogie zur Halbwellenplatte:

$$I(\Delta U) = I_0 \cos^2 \left(\frac{\pi}{2} \Delta U / \Delta U_{\lambda/2} \right) + I_r. \quad (7.1)$$

I_0 ist dabei die in den Modulator eintretende Lichtintensität, $\Delta U_{\lambda/2}$ die sogenannte *Halbwellenspannung*, bei der die Polarisationssebene gerade um 90° gedreht wird und I_r ist die Restleistungstransmission. Abbildung 7.8 zeigt die bei verschiedenen Spannungsdifferenzen aufgenommenen Transmissionskoeffizienten. Dabei wurde die transmittierte Leistung des Nd:YVO₄-Laserstrahls — wieder mit Hilfe des BeamMaster — gemessen und auf die gemessene Leistung bei $\Delta U = 0$ V bezogen. Diese Daten wurde an Gleichung (7.1) angepasst, was eine Halbwellenspannung von $\Delta U_{\lambda/2} \approx 412$ V und eine Resttransmission bei $\Delta U = \Delta U_{\lambda/2}$ von $I_c/I_0 \approx 4\%$ ergab.

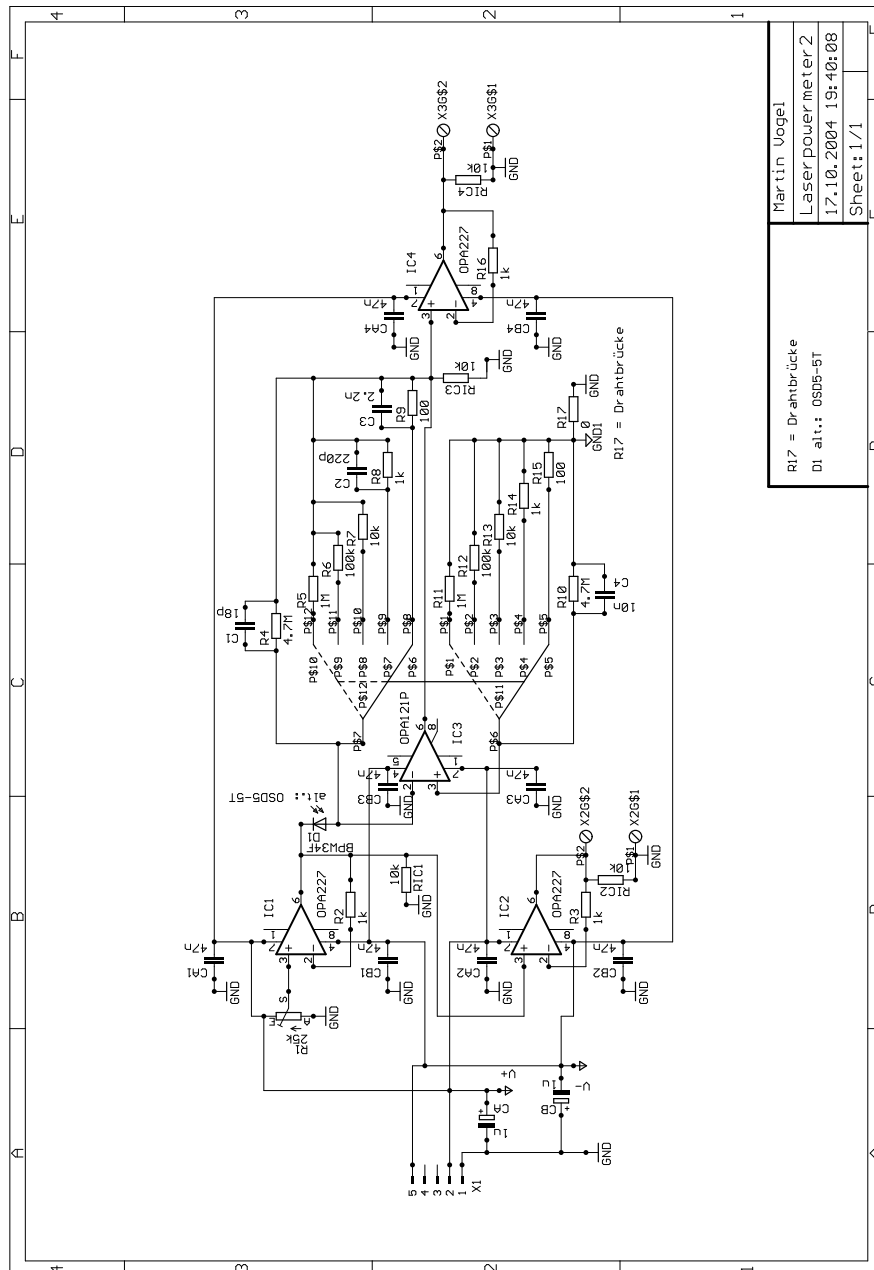
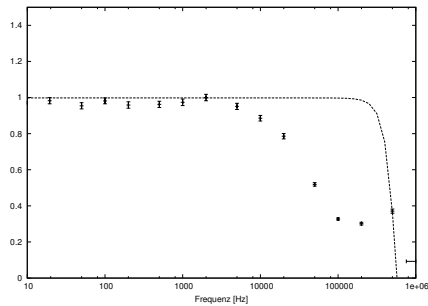
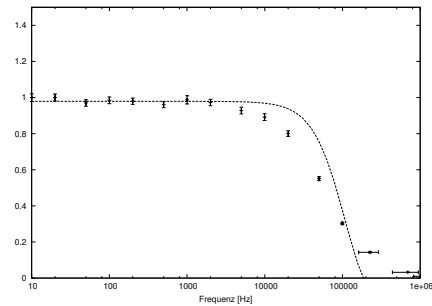


Abbildung 7.9: Schaltplan des Laserleistungsmessgeräts

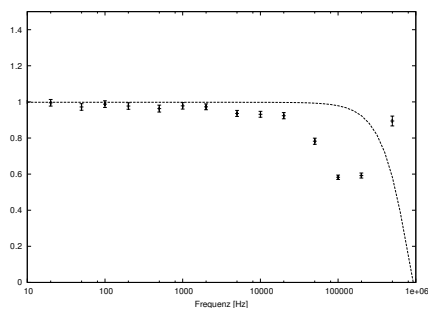
Die Verstärkungsspannung, die der Spannungsverstärker für den EOM liefert, kann durch eine externe Signalspannung eingestellt werden. Dies ist vor allem dann sinnvoll, wenn man dem Laserstrahl eine Intensitätsmodulation aufprägen will. Damit diese Modulation möglichst linear abgebildet wird, stellt man die Offsetspannung auf $U_{\text{off}} = 1/2\Delta U_{\lambda/2}$ ein. Da man sich nun im Anstiegsbereich der \cos^2 -Abhängigkeit befindet, ist der Transmissionskoeffizient im wesentlichen



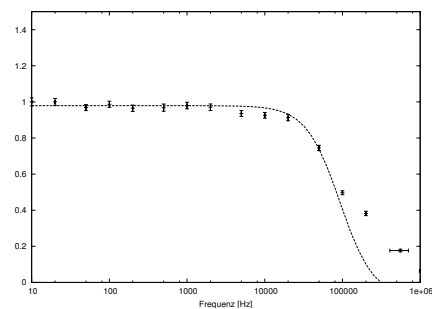
(a) Frequenzgang des Leistungsmonitors bei $U_{\text{rev}} \approx 40 \text{ mV}$ und $R_4 = 10 \text{ k}\Omega$



(b) Frequenzgang des Leistungsmonitors bei $U_{\text{rev}} \approx 40 \text{ mV}$ und $R_4 = 100 \text{ k}\Omega$



(c) Frequenzgang des Leistungsmonitors bei $U_{\text{rev}} \approx 14 \text{ V}$ und $R_4 = 10 \text{ k}\Omega$



(d) Frequenzgang des Leistungsmonitors bei $U_{\text{rev}} \approx 14 \text{ V}$ und $R_4 = 100 \text{ k}\Omega$

Abbildung 7.10: Frequenzgang des Leistungsmonitors in vier verschiedenen Einstellungen: Zusätzlich sind jeweils die Simulationsdaten des SPICE-Programms eingezeichnet.

linear von der — nicht allzugroßen — Verstärkungsspannung abhängig.

Damit die Laserleistung laufend kontrolliert werden kann, wurde ein Laserleistungsmonitormodul entwickelt. Dieses besteht zunächst aus einer Fotodiode (BPW34F, Infineon AG, München), die im Fotostrommodus betrieben wird (vergleiche Kapitel 5.1). Der Schaltplan dieses Moduls ist in Abbildung 7.9 dargestellt:

Der Photostrom der Photodiode D1 wird über den Operationsverstärker IC3 (OPA121, Burr-Brown, Tucson, AZ, USA) in eine Spannung konvertiert. Der OPA121 wurde gewählt, weil er ein geringes Eingangsspannungs- und Stromrauschen (typisch $10 \text{ nV}/\sqrt{\text{Hz}}$ und $1 \text{ fA}/\sqrt{\text{Hz}}$) sowie kleine Eingangsoffset- und Eingangsbiasströme aufweist, die im Bereich von 1 pA liegen. Sein Verstärkungsbandbreiten-Produkt liegt dennoch bei 2 MHz .

Als Rückkopplungswiderstand des IC3 wurde eine Widerstandsdekade zwischen 100Ω und $1 \text{ M}\Omega$ eingebaut, aus der der gewünschte Widerstand mit einem mechanischen Schalter ausgewählt werden kann. Parallel zum Rückkopplungswi-

derstand wird der Widerstand der „input bias current cancellation“ eingestellt (Kapitel 5.1). Dies wäre angesichts der niedrigen Biasströme eigentlich nicht notwendig. Die Schaltung war aber zunächst so allgemein geplant, dass beliebige Verstärkerbausteine verwendet werden konnten. Letzten Endes stellte sich aber heraus, dass die Schaltung in dieser Konfiguration problemlos eingesetzt werden kann. IC1 (OPA227, Burr-Brown, Tucson, AZ, USA) dient zum Einstellen der Photodiodesperrspannung, IC2 und IC4 sind Puffer, an denen die gerade eingestellte Sperrspannung beziehungsweise das Photospannungssignal abgegriffen werden kann.

Etwa 5 % der Leistung des Laserstrahls wird über den bereits oben erwähnten „Beamsampler“ (44-2426, Coherent, Inc., Santa Clara, CA, USA) ausgekoppelt und auf die Photodiode des Leistungsmonitors geworfen. Um die Bandbreite des Leistungsmonitors zu testen, wurde ein Signalgenerator an den Verstärker des EOM angeschlossen. Die Offsetspannung des EOM war zuvor, wie oben erwähnt, auf die halbe Halbwellenspannung eingestellt worden.

Mit dem Signalgenerator wurden sinusförmige Signale mit 10 Hz, 20 Hz, 50 Hz, 100 Hz, . . . , 1 MHz erzeugt, die mit dem EOM-Verstärker in eine Verstärkerspannung und damit in eine Intensitätsmodulation des Laserstrahls übersetzt wurden. Mit Hilfe eines Oszilloskops wurde das Spannungssignal des Leistungsmonitors und der Monitorausgang des EOM-Verstärkers — er liefert laut Handbuch genau 1 % der Verstärkerspannung als Kontrolle — im AC-Modus gemessen. Die Amplituden der Signale auf dem Oszilloskop wurden gemessen und zueinander ins Verhältnis gesetzt. Dies wurde mit je zwei verschiedenen Rückkopplungswiderständen und Photodiodesperrspannungen durchgeführt.

Abbildung 7.10 zeigt das Resultat. Bei den Messungen mit $R_f = 10 \text{ k}\Omega$ ist ein deutlicher Einbruch etwa bei $f = 10 \text{ kHz}$ zu erkennen. Auffällig ist weiterhin, dass das Signalspektrum nach diesem Einbruch wieder ansteigt. Diese Effekte existieren vermutlich auch bei $R_f = 100 \text{ k}\Omega$, sie werden dort jedoch von der „regulären“ Bandbreitenbegrenzung unterdrückt. Darüber hinaus kann der Einfluss einer höheren Sperrspannung beobachtet werden, die Detektionsschaltung wird schneller.

Um zu überprüfen, wo der ungewöhnliche Einbruch und Wiederanstieg seine Ursache hat, wurde der Schaltkreis mit Hilfe des SPICE-Programms berechnet. Die Photodiode wurde dabei mit dem in Abbildung 5.2 gezeigten Äquivalenzschaltplan simuliert, wobei die Photodiodekapazität — abhängig von der gewählten Sperrspannung — dem Datenblatt entnommen wurde. Das Resultat dieser Simulation wurde in die Graphen der Abbildung 7.10 mit übernommen, sie zeigen keinerlei Auffälligkeiten. Ein Austausch von Photodiode und ICs brachte ebenfalls keinen Erfolg. Letzten Endes wurde sogar die Photodiode entfernt und

der Verstärkungsschaltkreis getestet, in dem das Testsignal des Signalgenerators über einen Eingangswiderstand von $R_i = 1 \text{ k}\Omega$ direkt an den negativen Eingang des IC3 angeschlossen wurde. Der gemessene Frequenzgang brach, wie erwartet, bei etwa 200 kHz ab und zeigte auch keinen Wiederanstieg. Die Vermutung geht nach all diesen Tests und Überlegungen dahin, dass der Monitorausgang des EOM-Verstärkers fehlerhaft arbeitet. So herum gesehen könnte das fehlerhafte Monitor-signal mit hier aufgezeichneten Werten korrigiert werden.

Wie im Kapitel 7.2 erwähnt, ist für die Funktionalität der optischen Pinzette eine Leistungs-, Positions- und Profilstabilität des Laserstrahls eine wichtige Voraussetzung. Daher wurden diese Tests mit eingeschaltetem EOM wiederholt, wobei keine Verschlechterung festgestellt werden konnte (Daten nicht gezeigt).

7.4 Strahlableitung

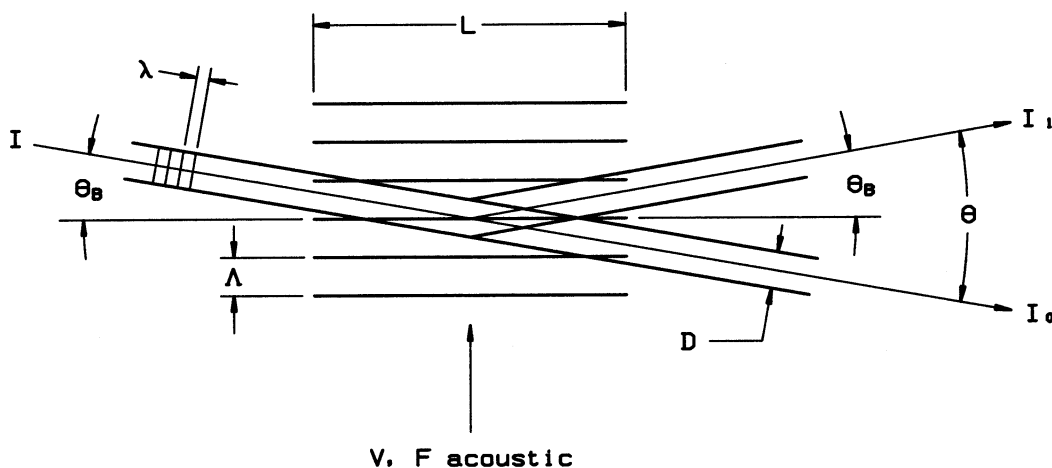
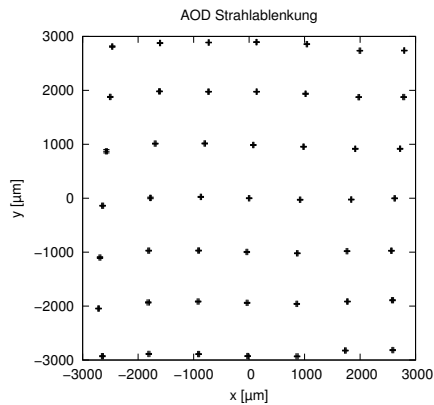
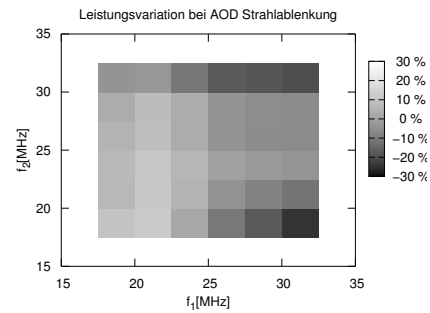


Abbildung 7.11: Prinzip des akustooptischen Modulators: Der einfallende Laserstrahl wird an den Netzebenen der stehenden Schallwelle Bragg-reflektiert [int].

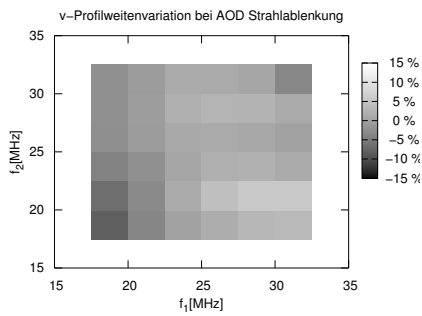
Für viele Anwendungen und Experimente ist es sinnvoll, den Fokus und damit das Kraftfeld der optischen Pinzette lateral verschiebbar zu machen. Mitunter ist es auch notwendig, zwei oder mehr optische Pinzetten zur Verfügung zu haben. Ein Beispiel ist hier die Versuchsanordnung, die in Abbildung 2.11 gezeigt wird. Man kann nun entweder zwei Laserquellen einkoppeln oder eine Laserquelle aufspalten und jeden Teilstrahl über Spiegel mechanisch-manuell einstellen. Über diese Winkelverstellung ergibt sich dann nach Gleichung (3.37) eine laterale Verschiebung des Fokus.



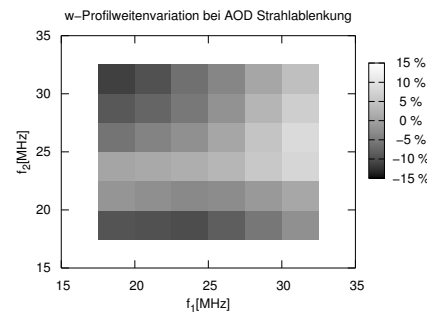
(a) Positionierungstest



(b) Test der Leistungsveränderung



(c) Test der v-Profilvariation



(d) Test der w-Profilvariation

Abbildung 7.12: AOD Strahlableitung: Zunächst wurde getestet, ob die Positionierung des Strahls linear von den Steuerfrequenzen abhängt (a). Darüber hinaus wurde getestet, inwieweit Leistung (b) und Strahlprofil (c), (d) durch die Strahlableitung beeinflusst werden.

Eine elegantere Lösung sind die sogenannten akustooptischen Deflektoren, „AOD“. AOD sind Spezialfälle von akustooptischen Modulatoren, „AOM“, und basieren wie diese auf der Streuung des Laserlichts an einer akustischen stehenden Welle, die in einem Kristall erzeugt wird. Der entscheidende Vorteil dieser Methode ist, dass es sich um einen nicht-mechanischen Effekt handelt, der sehr schnell variiert werden kann. Das obere Limit ist lediglich durch die Schallgeschwindigkeit im verwendeten Kristall gegeben, so dass typische Schaltzeiten im Bereich einiger weniger Mikrosekunden durchaus erreicht werden können. Zwei oder mehr unabhängige Foki erreicht man entweder durch Einstrahlen mehre-

rer Schallfelder oder durch schnelles Multiplexen verschiedener Frequenzen. Bei der zuletzt genannten Methode springt der Strahl dann schnell von einer Position zur nächsten, so dass von der (langsam reagierenden) Probe effektiv mehrere Kraftfelder gesehen werden [MOLLOY 1998].

Abbildung 7.11 zeigt das Funktionsprinzip eines AOD. Ein Laserstrahl mit dem Durchmesser D und der Wellenlänge λ wird unter einem Winkel θ_B in einen Kristall der Länge L eingestrahlt. Über Piezokristalle wird eine Schallwelle der Frequenz F in den Kristall eingestreut, wobei die Ausbreitungsrichtung dieser Schallwelle ungefähr senkrecht zur Ausbreitungsrichtung des Laserstrahls liegt. Läuft die Schallwelle im Kristall mit der Geschwindigkeit V und wird sie an der Grenzfläche totalreflektiert, entsteht eine stehende Schallwelle der Wellenlänge $\Lambda = V/F$, das heißt die Netzebenen des stehenden Schallfeldes haben den Abstand Λ . Braggreflektion entsteht nun dann, wenn der Gangunterschied der Strahlen, die an den einzelnen Netzebenen der stehenden Schallwelle reflektiert werden, gerade ein ganzzahliges Vielfaches der Wellenlänge λ sind. Durch einfache geometrische Überlegung erhält man die Braggbedingung [KITTEL 1993]

$$\sin(\theta_B) = \frac{n\lambda}{2\Lambda} = \frac{nF\lambda}{2V} \approx \theta_B. \quad (7.2)$$

Dabei wurde von der Kleinwinkelnäherung Gebrauch gemacht. Anhand der Formel sieht man, dass der Ablenkwinkel des Strahls erster Ordnung, $n = 1$, proportional zur Frequenz des anliegenden Schallfeldes ist. Allerdings müsste der Kristall für jede Frequenzänderung nachjustiert werden, damit die Braggbedingung erfüllt bleibt. Ein Ausweg ist, die Schallwelle nicht longitudinal, sondern transversal einzustrahlen [els], so dass der Kristall bei Veränderung der Frequenz — in einem gewissen Rahmen — nicht nachjustiert werden muss. Dabei bleibt die genannte Relation erhalten, der Strahl erster Ordnung wird um den Winkel $\theta = 2\theta_B$ vom Ursprungsstrahl separiert.

Als Leistungsbeugungseffizienz des AOD-Kristalls ergibt sich [int]

$$\frac{I_1}{I} = \sin^2 \left(\frac{2.22}{\lambda} \sqrt{\frac{LM_2P_a}{H}} \right), \quad (7.3)$$

hierbei ist H die Breite des Schallfeldes, M_2 eine Materialkonstante und P_a die eingestreurte Schalleistung. Ein Aspekt dieser Formel ist, dass eine Erhöhung der Schalleistung über die der maximalen Beugungseffizienz hinaus wieder zu einer Verringerung der Beugungseffizienz führt. Beobachtet man im Experiment daher eine unzureichende Beugungseffizienz, so kann dies neben einer zu geringen auch an einer zu hohen Schalleistung liegen.

In der CMLTT-Apparatur kommt ein Zweiachsen-Ablenkungssystem (DTD-274HA6, IntraAction, Bellwood, IL, USA) zum Einsatz. Dieses besteht aus zwei gekreuzten, separat „beschallbaren“ AOD-Kristallen aus Tellurdioxid (TeO_2). Das System ist für die Wellenlänge $\lambda = 1064 \text{ nm}$ des Nd:YVO₄-Lasers optimiert. Es besitzt eine Apertur von $4 \times 4 \text{ mm}^2$ und ist mit einer Beugungseffizienz von $\eta \approx 0,5$ spezifiziert. Der AOD-Kristall muss zur Erreichung optimaler Ergebnisse mit polarisiertem Licht bestrahlt werden, die Polarisationsrichtung des abgelenkten Strahls ist um 90° gedreht. Da der Laserstrahl zwei Kristalle durchquert, besitzen sowohl der ursprüngliche wie der zweifach abgelenkte Strahl dieselbe Polarisationsvorzugsrichtung.

Dass der Strahl nullter Ordnung also nach wie vor existiert, ist von Vorteil: Mit diesem Strahl kann die Leistungskontrolle durchgeführt werden (wie in Kapitel 7.3 beschrieben). Dabei ändert sich die Position der Strahls auf der Photodiode nicht, was zwangsläufig zu verfälschten Messungen führen würde. Zwar hätte man den Leistungsmonitor auch zwischen EOM und AOD installieren können. Aus Energieerhaltungsgründen muss die Leistungssumme von gebeugtem und ungebeugtem Strahl aber konstant bleiben. In dem man nun die Leistung des ungebeugten Strahls misst, hat man auch gleichzeitig eine Kontrolle über die Leistung des gebeugten Strahls, der schließlich im Mikroskop das Kraftfeld erzeugen wird.

Die Zentralfrequenz liegt bei $F_c = 25 \text{ MHz}$, der zentrale Ablenkungswinkel bei $\theta_c = 45 \text{ mrad}$. Als nutzbarer Frequenzbereich ist $\Delta F = 15 \text{ MHz}$ spezifiziert, was einem nutzbaren Ablenkungsbereich von $\Delta\theta = 25 \text{ mrad}$ entspricht.

Die Hochfrequenz-Steuerspannung für die Piezokristalle wird von einem Verstärker geliefert (DPA-502, IntraAction, Bellwood, IL, USA), dessen Eingangssignal wiederum von einer PCI-Steckkarte (DVE-4010C9, IntraAction, Bellwood, IL, USA) im Steuerungs-PC (Abbildung 7.1) erzeugt wird. Für die PCI-Karte stehen ein Steuerprogramm und ein Treiber-API zur Verfügung. Darüber hinaus existieren LabView-Komponenten, die jedoch noch nicht in das Laser tweezers-Kontrollprogramm aufgenommen wurden. Dies soll aber in naher Zukunft geschehen.

Für allgemeine Tests steht aber, wie erwähnt, das herstellereigene Steuerprogramm zur Verfügung. Zunächst wurden die AODs mit der Zentralfrequenz von $f_c = 25 \text{ MHz}$ angesteuert. Dann wurde an Stelle des Leistungsmonitors das Strahlprofilmessgerät (BeamMaster Si-7, Coherent, Inc., Santa Clara, CA, USA) montiert. Hierbei wurde die Montage aber so vorgenommen, dass sich der *abgelenkte* Strahl im Zentrum des Messgeräts befindet. Der Abstand zwischen AOD und Messgerät betrug etwa 200 mm . Die Steuerfrequenzen wurden nun im Bereich $f_c = 17,5 - 32,5 \text{ MHz}$ in Schritten von $\Delta f_c = 2,5 \text{ MHz}$ abgeändert. Bei jeder Konfiguration wurde die Leistung, die Position und die Profildbreite mit

1 S/s über jeweils eine Minute gemessen.

Zunächst wurde getestet, ob die Strahlablenkung tatsächlich linear von der an den AOD-Kristallen anliegenden Hochfrequenz abhängt. Das Resultat ist in Abbildung 7.12(a) dargestellt. Man erkennt tatsächlich ein quadratisches Punktmuster, das allerdings gewisse Abweichungen aufweist. Interessanterweise sind diese Abweichungen zum Teil systematisch, für eine feste x -Koordinate weisen zum Beispiel die y -Abweichungen in die gleiche Richtung. Die Ursache für diese systematischen Abweichungen konnte noch nicht geklärt werden.

Von den Randbereichen abgesehen liegen die relativen Abweichungen bei einigen Prozent. Sollte sich diese Abweichung in den späteren Versuchen als zu groß herausstellen, kann dieses Problem durch eine zusätzliche Rückkopplung gelöst werden. Dabei wird die Position nicht über die AOD-Frequenz vorgegeben, sondern nach den aktuellen Daten nachgestellt, die permanent von einem der Positionsdetektoren geliefert werden.

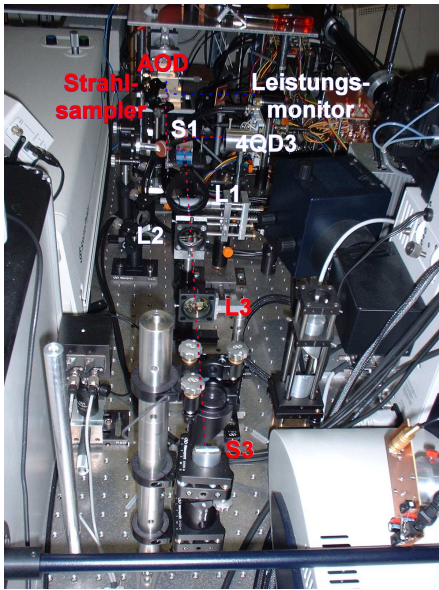
In Abbildung 7.12(b) ist gezeigt, um welchen Prozentsatz sich die Leistung bei Strahlablenkung ändert. Der Bezugspunkt ist dabei der Zentralpunkt mit $f_c = 25$ MHz. Man erkennt, dass die Laserleistung bei Ablenkungen im Randbereich zwar besonders stark absinkt (bis zu 25 – 30 %), im Zentralbereich jedoch nicht mehr als wiederum einige Prozent. Daneben führen Ablenkungen auch zu Veränderungen der Profildicke (Abbildungen 7.12(c) und 7.12(d)), die sich in einem ähnlichen Rahmen bewegen.

Auch hier gilt, dass es möglich ist, diese Leistungsvariation durch eine Rückkopplung zu minimieren. Dies könnte mit Hilfe des EOM und des Leistungsmonitors (Abschnitt 7.3) relativ einfach realisiert werden. Für die Strahlbreiten existiert eine solche Möglichkeit leider nicht.

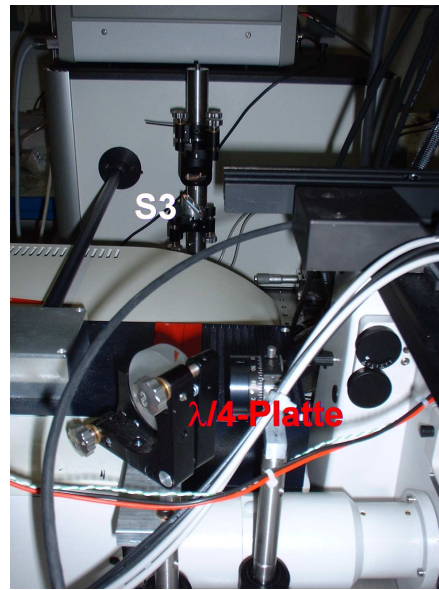
7.5 Strahleinkopplung

Nachdem der Laserstrahl der optischen Pinzette die beiden gekreuzten aktiven AOD durchlaufen hat, existieren vier Strahlen mit ungefähr derselben Intensität, der Ursprungsstrahl, die zwei einfach und der doppelt abgelenkte Strahl. Daneben gibt es noch Strahlen höherer Ordnung, deren Intensität jedoch vernachlässigbar ist. Ein Teil des Ursprungsstrahl wird, wie oben bereits erwähnt, über den Strahlsammler auf die Photodiode des Leistungsmonitors abgebildet. Der zweifach abgelenkte Strahl wird über einen Spiegel und den polarisierenden Strahlteilerwürfel „S1“ auf die Aufweitungseinheit gelenkt.

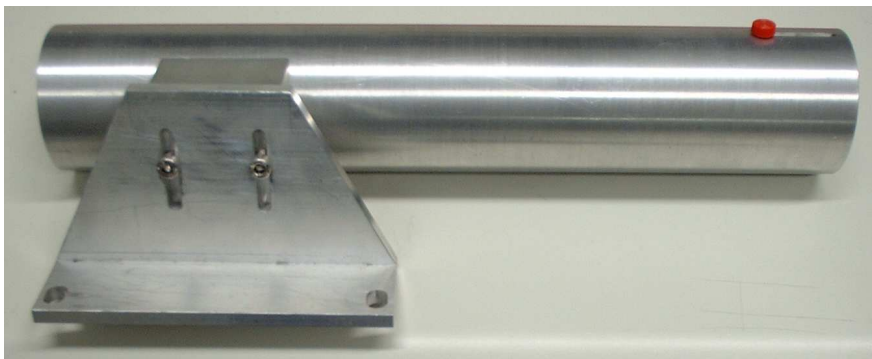
Das Restlicht des Ursprungsstrahls sowie die beiden einfach abgelenkten Strahlen werden verworfen. Will man nur eine stationäre optische Pinzette nut-



(a) Laser tweezers Modul: Der vom AOD abgelenkte Strahl wird über den Spiegel S1 auf die Aufweitungseinheit (Linsen L1, L2, L3) gelenkt.



(b) Laser tweezers / stationäres MP-Modul: Der Laserstrahl der optischen Pinzette wird mit dem Ti:Sa-Strahl des stationären MP-Moduls bei dem dichromatischen Spiegel „S3“ vereinigt.



(c) Laser tweezers Modul / stationäres MP-Modul: Vorbereitetes 1:-1-Teleskop zur Montage zwischen „S3“ und Viertelwellenplatte.

Abbildung 7.13: Einkopplungsoptik

zen, können die AOD-Kristalle abgeschaltet werden. In diesem Fall wird der Ursprungsstrahl durch Verstellen eines Justagespiegels auf die Aufweitungseinheit gelenkt. Da sowohl der doppelt abgelenkte wie der ursprüngliche Strahl vertikal polarisiert sind, können beide von dem Strahlteilerwürfel „S1“ abgelenkt werden.

Die Aufweitungseinheit dient dazu, den Durchmesser des Laserstrahls an den Durchmesser der rückseitigen Objektivapertur anzupassen. Im Falle des 100x-

Öl-immersionsobjektive sind dies etwa 7 mm. Strahlaufweitungen werden normalerweise mit zwei Linsen der Brennweiten f_1 und f_2 realisiert, deren Brennpunkte zusammenfallen. Der Linsenabstand beträgt dann $d_{12} = f_1 + f_2$, der Strahl wird um den Faktor $v = f_2/f_1$ aufgeweitet. Für Konkavlinsen ist dabei eine negative Brennweite einzusetzen. Diese Konfiguration hat den Nachteil, dass der Aufweitungsfaktor unveränderlich ist. Zur Erreichung eines anderen Aufweitzungsverhältnisses müsste eine der Linsen ausgetauscht werden.

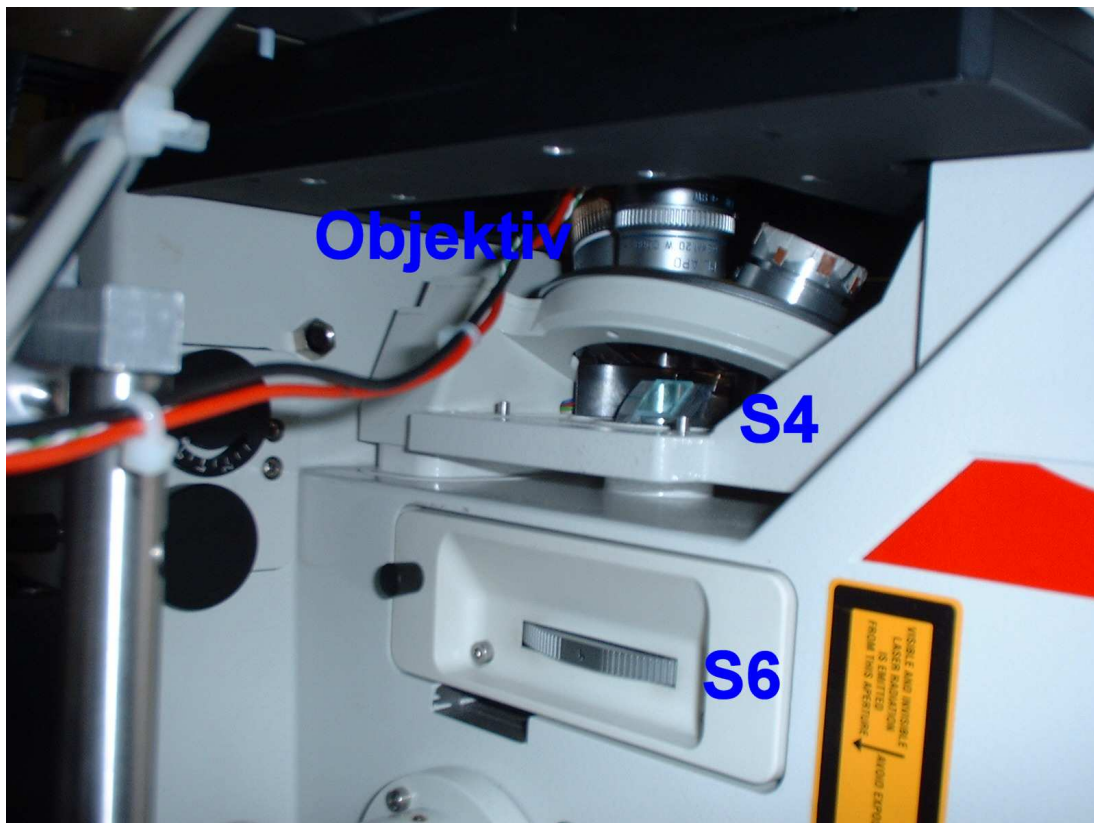


Abbildung 7.14: Laser tweezers / stationäres MP-Modul: Die Laserstrahlen der optischen Pinzette und des stationären MP-Moduls werden durch den dichromatischen Spiegel „S4“ in den Strahlengang des Mikroskops eingekoppelt.

Bei optischen Pinzetten gibt es aber nicht unbedingt *die* optimale Einstellung zwischen möglichst einheitlicher Ausleuchtung der rückseitigen Objektivapertur und möglichst hoher Lichtintensität (Optimierung des einen verschlechtert das andere und umgekehrt, vergleiche Kapitel 3.4). Daher wird hier ein variables Zoomsystem verwendet, das aus drei Linsen „L1“, „L2“ und „L3“ besteht [CHUANG et al. 1995]. Mit Hilfe der in Kapitel 3.2 beschriebenen Matrixoptik berechnet man, dass für einen vorgegebenen Aufweitungsfaktor v die

Abstände d_{12} und d_{23} zwischen den Linsen so gewählt werden müssen, dass

$$d_{12} = f_1 + f_2 + \frac{vf_1f_2}{f_3} \quad (7.4)$$

$$d_{23} = f_2 + f_3 + \frac{f_2f_3}{vf_1}, \quad (7.5)$$

wobei f_1 , f_2 und f_3 die Brennweiten der Linsen sind. Im Aufbau hier wurden Linsen der Brennweiten $f_1 = 250$ mm, $f_2 = 50$ mm und $f_3 = 100$ mm ausgewählt. Dabei werden die benötigten Abstände zwischen den Linsen kürzer, wenn man eine Strahlspiegelung, das heißt $v < 0$, zulässt. Da der Laserstrahl bei der Position der ersten Linse bereits ungefähr einen Meter Luftweg zurückgelegt hat und nach der dritten Linse noch etwas mehr als ein halber Meter zusätzlich zurückzulegen ist, wurde ein Aufweitungsfaktor $v = -1,5$ gewählt. Damit sind dann auch die Linsenabstände auf $d_{12} \approx 113$ mm und $d_{23} \approx 123$ mm festgelegt.

Der Abstand zwischen dritter Linse und Objektiv kann bei Verwendung der AOD-Ablenkung zu dem Problem führen, dass der Laserstrahl die Objektivrückapertur nicht mehr zentral trifft. Daher wurde ein 1:–1-Teleskop vorbereitet, das zwischen „S3“ und die Viertelwellenplatte montiert werden kann (Abbildung 7.13(c)). Es enthält zwei Sammellinsen der Brennweite $f = 150$ mm, die in Grundstellung einen Abstand von 300 mm haben. Ein solches Teleskop bildet eine Ebene im Abstand d zur ersten Linse auf eine Ebene ab, die den Abstand $2f - d$ zur zweiten Linse hat. Auf diese Weise kann der Laserstrahl eine Strecke von 600 mm ohne Lateralversatz überbrücken.

Durch Änderung der Linsenabstände um Δ_{12} und Δ_{23} kann auch die axiale Lage des Fokus der optischen Pinzette verändert werden. Nach einfacher, aber etwas längerer Rechnung erhält man, in erster Ordnung, eine Fokusverschiebung um

$$\Delta_{obj} = \left(\frac{f_{obj}}{f_3} \right)^2 (\Delta_{12} - \Delta_{23}). \quad (7.6)$$

Dabei verschiebt sich der Fokus zum Objektiv hin, wenn $\Delta_{obj} < 0$ ist. Die effektive Brennweite des 100x-Objektivs ist etwa $f_{obj} \approx 2$ mm, so dass eine Veränderung der Linsenabstände um 1 mm eine Fokusverschiebung von etwa 400 nm erzeugt. Interessanterweise ist die Gleichung 7.6 nicht von der Zoomvergrößerung v abhängig.

Zur Justage der Fokalebene genügt es, wenn eine der Linsen, hier „L3“, verschiebbar ist. Der aufgeweitete Nd:YVO₄-Strahl wird am dichromatischen Spiegel „S3“ mit dem Ti:Sa-Strahl des stationären MP-Moduls vereinigt (vergleiche Kapitel 8.1). Der Spiegel „S3“ (950DCSP, Chroma Technology Corp., Rockingham,

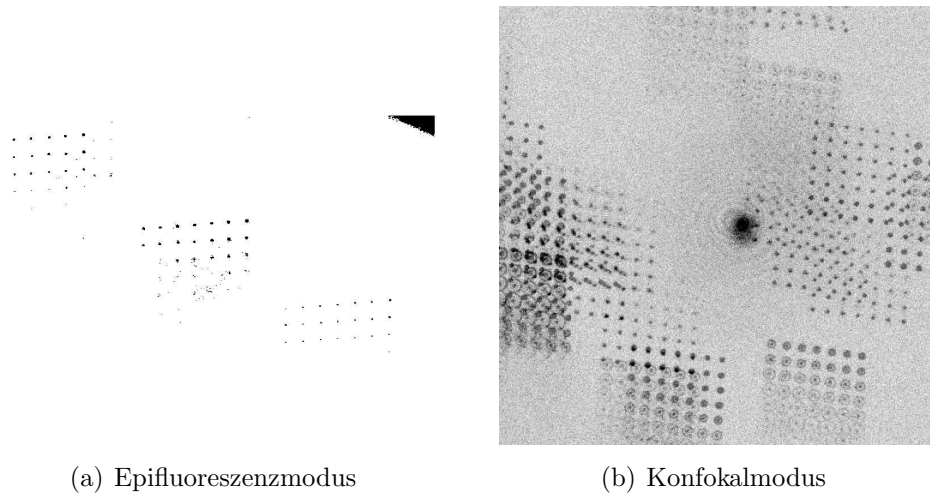


Abbildung 7.15: Test der Abbildungsverzerrung (Grauwerte aus Darstellungsgründen invertiert): Es wurde geprüft, ob sich die Existenz des Spiegels „S4“ in den Abbildungseigenschaften dergestalt niederschlägt, dass es zu lateralen Verzerrungen kommt (Erläuterung s. Text).

VT, USA) besitzt einen Transmissionskoeffizienten $T > 0,9$ für Licht mit Wellenlängen von 500 – 850 nm und wird, nach einen Übergangsbereich, hochreflektierend für das Licht des Nd:YVO₄ mit einem Reflektionskoeffizienten $R > 0,9$.

Beide Laserstrahlen werden so justiert, dass sie an dieser Stelle nach Ort und Lage zusammenfallen. Dies gelingt man einfachsten, in dem man den obersten Justagespiegel des Strahlperiskops (auf der Photographie in Abbildung 7.13(b) im hinteren Bereich zu erkennen) entfernt und beide Strahlen so einstellt, dass sie in einiger Höhe immer noch zentral über dem Periskopzentrum stehen. Dann kann der Justagespiegel wieder montiert werden.

Die Einkopplung in den Strahlengang des Mikroskops erfolgt über einen weiteren dichromatischen Spiegel. Dieser Spiegel (675DCSPXR, Chroma Technology Corp., Rockingham, VT, USA) — er ist in Abbildung 7.1 mit „S4“ gekennzeichnet — ist durchlässig ($T > 0,9$) für Licht der Wellenlängen 450 – 650 nm und reflektiert Licht mit Wellenlängen von 700 – 1100 nm, $R > 0,9$.

Für diesen Spiegel wurde eine eigene Halterung konstruiert, die am Rahmen des DM/IRBE befestigt wurde und sich direkt unterhalb des Objektivs befindet, noch vor dem Fluoreszenzfilterrad (siehe Abbildung 7.14). Die Schwierigkeit bei der Montage dieses Spiegels lag darin, dass durch die bewegliche Objektivbühne nur wenig Spielraum zur Verfügung stand. Dies galt sowohl für das potentielle Montagevolumen unterhalb des Objektivs als auch für den Zwischenraum, den die Laserstrahlen zur Verfügung haben, ohne mit der Objektivbühne zu kollidieren.

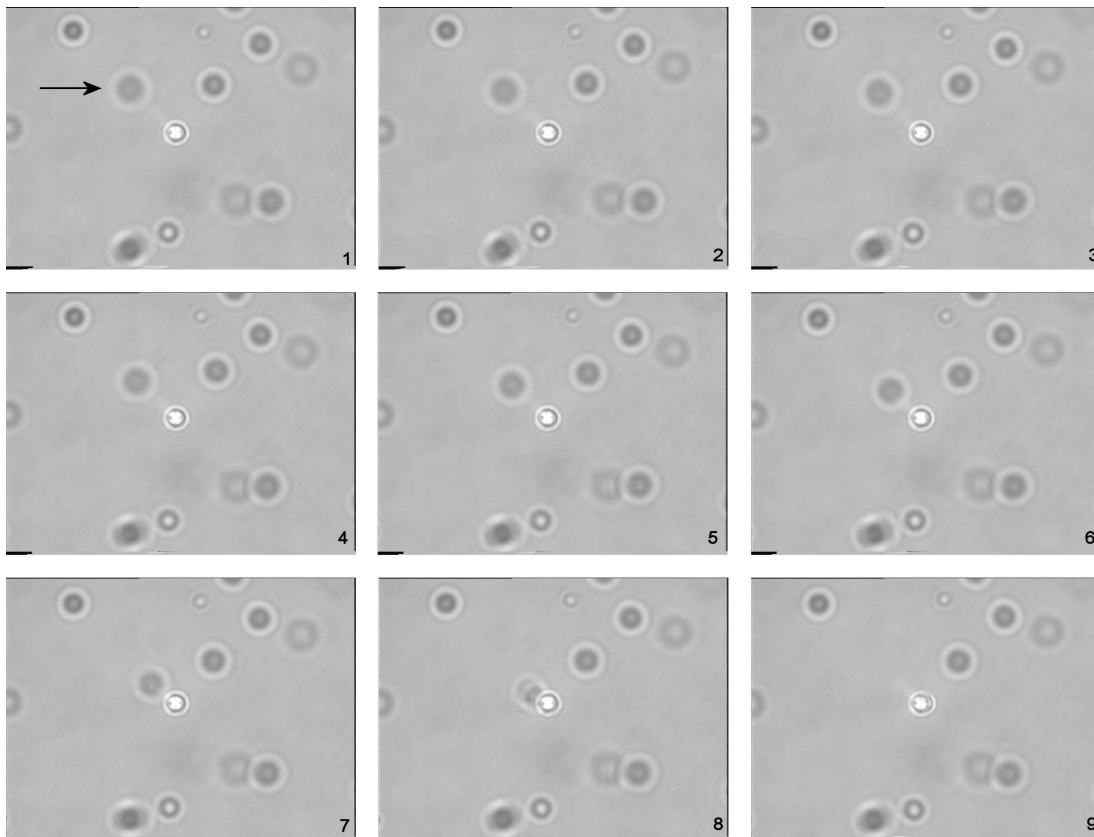


Abbildung 7.16: Laser tweezers: Ein Bead (Durchmesser $6\ \mu\text{m}$, Pfeilmarkierung) wird von dem Kraftfeld der optischen Pinzette angezogen. Die Bildfolge wurde aus einer Videosequenz digitalisiert, der zeitliche Abstand zwischen den einzelnen Bildern ist 40 ms.

Als Alternative wurde auch angedacht, die Laserstrahlen über den Strahlengang der Quecksilberlampe einzukoppeln. Dieser Plan wurde jedoch verworfen, da sich in diesem Strahlengang Linsen und Blenden befinden, die nicht genauer spezifiziert werden konnten.

Die Halterung des Spiegels „S4“ ist zweiteilig konstruiert, so dass der Spiegel mit einem Teil der Halterung jederzeit aus dem Strahlengang entfernt werden kann. Eine Schwalbenschwanzkonstruktion erlaubt aber einen positionsgenauen Wiedereinbau. Auf diese Weise könnten in Zukunft auch mehrere Halterungen mit verschiedenen Spiegeln vorrätig gehalten werden. Dies wäre zum Beispiel interessant, wenn man das stationäre MP-Modul zusammen mit Multiphoton-Scan-Anwendungen kombinieren will. Hierzu müsste man dann einen polarisationsabhängigen Spiegel montieren.

Der „S4“ ist in seiner Halterung nicht beweglich. Die Einkopplung der beiden

Infrarot-Laser erfolgt daher mit Hilfe von zwei Justagespiegeln. Der erste Spiegel ist auf das Strahlvereinigungsperiskop montiert, der zweite, sein Gegenstück, liegt auf Höhe der Einkopplung (in Abbildung 7.13(b) direkt links neben der $\lambda/4$ -Platte). Im Durchlichtmodus wird dann zunächst mit Hilfe des zweiten Spiegels die Aperturblende auf den ersten Spiegel so zentral abgebildet, dass die dort auftreffenden Laserstrahlen und das Bild der Aperturblende auf der Oberfläche des Spiegels zusammenfallen. Der Spiegel „S4“ ist zwar für sichtbare Licht durchlässig, eine kleine Menge wird aber dennoch reflektiert, die im abgedunkelten Raum problemlos zu erkennen ist.

Die weitere Justage erfolgt dann mit dem Periskopspiegel: Anstelle des Objektivs wird eine Metallröhre eingebaut. An deren Ende ist eine Photodiode mit Verstärkerschaltung montiert (Schaltplan siehe Abbildung 7.9), wobei die Photodiode im Zentrum der kreisförmigen Röhrenöffnung sitzt. Der Periskopspiegel wird nun so lange justiert, bis die maximale Intensität auf die Photodiode geworfen wird. Ist dies erreicht, sind die Laser justiert. Nun baut man das Objektiv wieder ein und beobachtet den Laserreflex mit Hilfe der Okularkamera (vergleiche Kapitel 6.5) und führt gegebenenfalls eine Feinjustage durch, um den Laserreflex in das Zentrum des Bildes zu schieben.

Um die Fokusebene der Laser einzustellen, verwendet man eine normale Objektträger-Deckglas-Kammer und füllt diese mit Wasser. Man fokussiert im Durchlichtmodus auf die obere, in das Kammerinnere zeigende Seite des Deckgläschens. Die Fokusebene der Laser wird nun so eingestellt, dass der Durchmesser des mit der Kamera sichtbaren Reflexes minimal wird.

Um sicher zu gehen, dass der Spiegel „S4“ die normale Abbildung im Mikroskop nicht stört und Verzerrungen verursacht, wurde geprüft, ob eine definierte laterale Verschiebung des Objektes auch eine ebensolche Verschiebung im Bild nach sich zieht. Der Spiegel besitzt immerhin eine Dicke von 2 mm und liegt unter 45° im Strahlengang. Das bedeutet, dass die Strahlenbündel der Objekte lateral versetzt werden. Diese Versetzung an planparallelen Oberflächen sollte sich bei einem parallelen Strahlenbündel zwar nicht auf die Abbildung niederschlagen, aber ein Test schien zweckmäßig, um Zweifel auszuräumen.

Zur Durchführung des Tests wurde eine Kammer mit Agargel gefüllt, das zuvor mit fluoreszierenden Beads versetzt worden war. Diese Kammer wurde mit Hilfe des xy-Piezotranslators (vergleiche Kapitel 6.6) in Schritten von $5 \mu\text{m}$ um bis zu $30 \mu\text{m}$ in beide lateralen Richtungen verschoben. In jedem Schritt wurde sowohl im Epifluoreszenzmodus wie im Konfokalmodus ein Bild aufgenommen. Diese Bilder wurden am Ende übereinandergelegt, Abbildung 7.15 zeigt das Ergebnis: Für jedes Bild eines Beads entsteht eine regelmäßige Struktur. Bei der Aufnahme wurde darauf Wert gelegt, vor allem die Randbereiche abzudecken. Wie man

an der Abbildung sieht, scheinen keine wesentlichen lateralen Verzerrungen zu existieren.

Am Ende dieses Abschnitts stelle ich noch kurz die optische Pinzette „in Aktion“ vor: Abbildung 7.16 zeigt einen Ausschnitt aus einer Videosequenz, die ich mit einer Kamera ohne Wärmeschutzfilter aufgenommen habe. Hierauf ist zu sehen, wie ein Latexbead (Durchmesser $6\ \mu\text{m}$) von dem Kraftfeld der optischen Pinzette angezogen wird. Im Zentrum der Pinzette ist bereits ein Bead festgehalten. Man sieht sehr schön, wie sich das Laserlicht auf der Oberfläche dieses Beads spiegelt.

7.6 Positionsdetektion

Mit der optischen Pinzette können nun mikroskopische Objekte eingefangen und verschoben werden. Bei vielen Experimenten, wie beispielsweise bei den am Ende von Kapitel 2.2.2 vorgestellten Studien oder den in Kapitel 10 erwähnten „escape force“-Experimenten, ist es jedoch notwendig, gleichzeitig die Position oder die Positionsverschiebung der festgehaltenen Objekte zu messen. Diese Information wird auch zur Kalibrierung des optischen Kraftfeldes benötigt.

Eine Methode, die häufig zu diesem Zweck eingesetzt wird, basiert auf sogenannten Quadrantendioden [SVOBODA und BLOCK 1994, MEHTA et al. 1998, STOUT und WEBB 1998]. Dabei handelt es sich um eine „viergeteilte“ Photodiode, also ein kleines Photodiodenarray, das aus vier unabhängig arbeitenden Photodioden besteht. Diese Dioden sind aber auf einem Substrat aufgebracht und besitzen daher die gleichen Eigenschaften. Der räumliche Abstand zwischen den einzelnen photoaktiven Oberflächen beträgt in der Regel nur wenige $10\ \mu\text{m}$.

Das Prinzip der Positionsdetektion — oder besser: Detektion einer Verschiebung — beruht nun darauf, dass ein Objekt auf das Array abgebildet wird. Verschiebt sich dieses Objekt, verändern sich auch die Lichtanteile, die auf jede der vier Dioden fallen. Wenn man die Photoströme jedes Quadranten einzeln in eine Spannung umwandelt und dann die Überkreuz-Differenzen bildet, erhält man Signale, die einer kleinen Objektauslenkung proportional folgen.

Die erste Möglichkeit, das Objekt auf die Vierquadrantendiode abzubilden, besteht darin, die reguläre (Durchlicht-)Mikroskopabbildung zu benutzen und die Diode zum Beispiel an einer für CCD-Kameras vorgesehenen Stelle zu montieren. Der erste der drei Positionsdetektoren der CMLTT-Apparatur — „4Q-Detektor 1“ — basiert auf diesem Prinzip.

Er ist Bestandteil eines selbst hergestellten Trinokularaufsatzes, der das Licht im Verhältnis 50 : 50 auf den Detektor und eine weitere CCD-Kamera aufteilt.

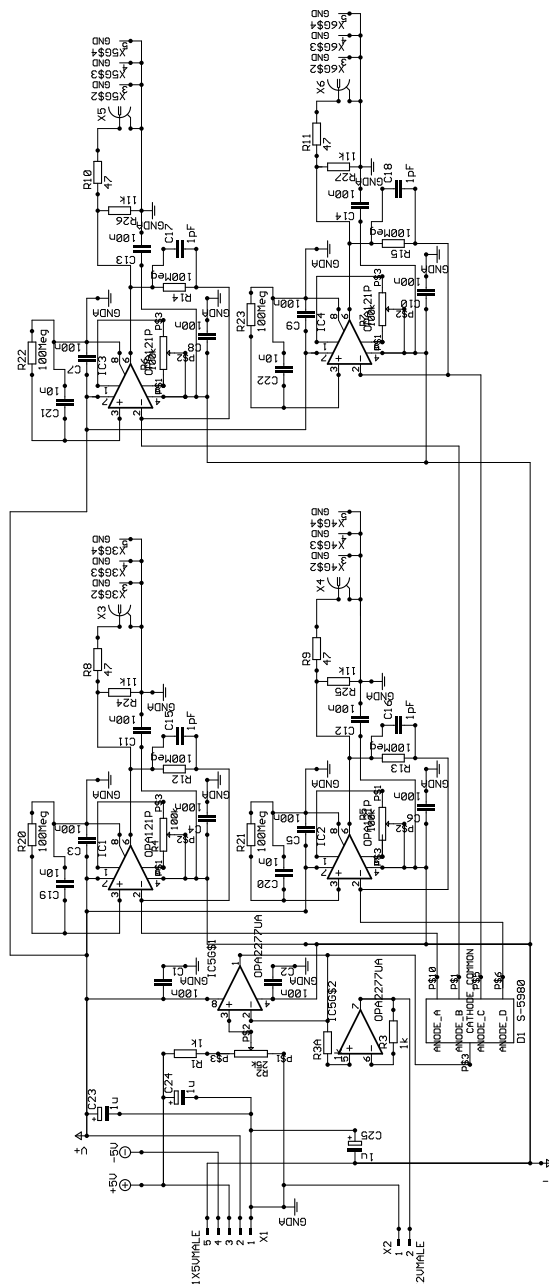


Abbildung 7.17: Schaltplan des Trinokular-Vierquadrantenverstärkers.

Allerdings muss man hier noch eine Konkavlinse einbauen ($f \approx -170$ mm), da die Zwischenbildebene im selbstgebauten Aufsatz etwas höher liegen muss als es die Mikroskopoptik zulässt.

Der Schaltplan des Detektors ist in Abbildung 7.17 gezeigt: Das Herzstück der Schaltung ist die Vierquadrantendiode (S5980, Hamamatsu, Hamamatsu City, Japan). Sie besitzt eine aktive Fläche von je etwa 5×5 mm². Die allen Quadranten

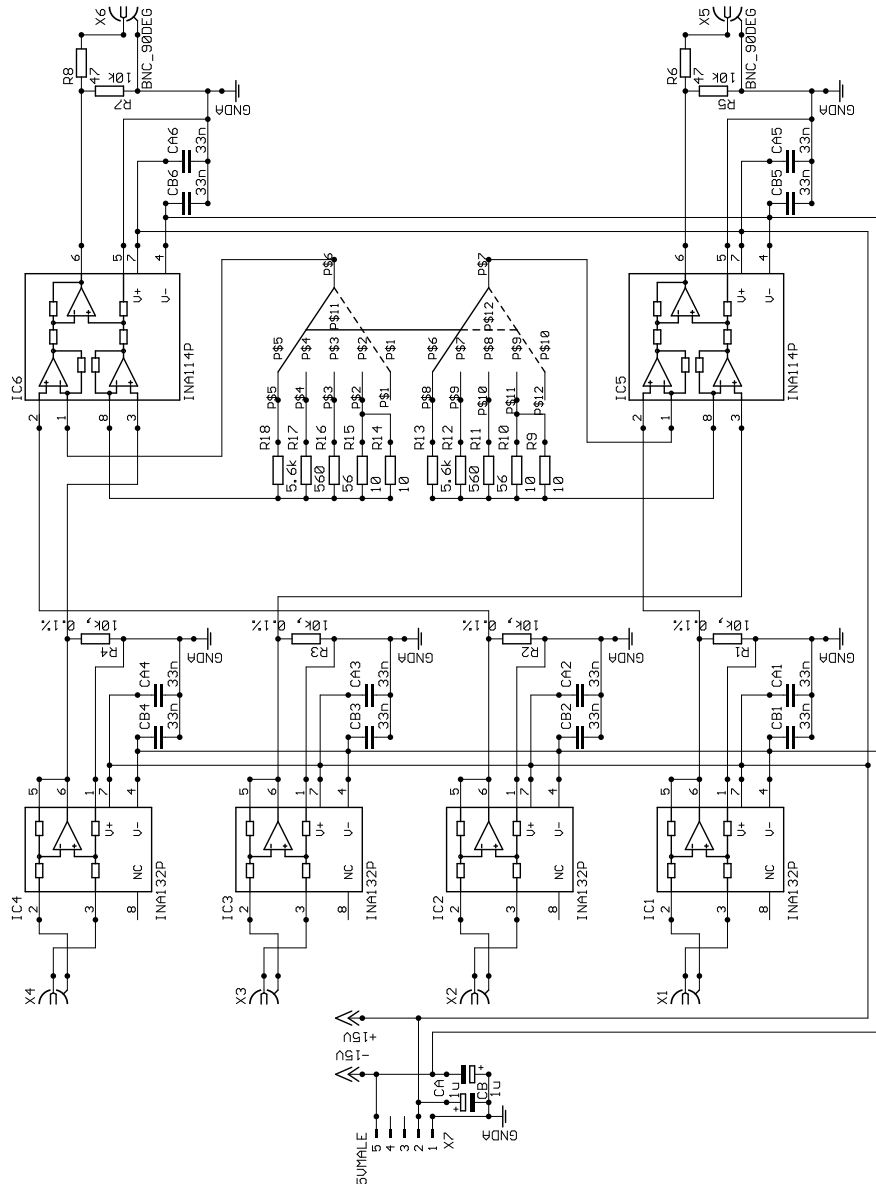


Abbildung 7.18: Schaltplan der Differenzstufe des Trinokular-Vierquadrantendetektors.

gemeinsame Kathode kann — wie schon bei dem Leistungsmonitor beschrieben, vergleiche Abbildung 7.9 — mit einer Sperrspannung gespeist werden. Die vier Anoden sind jeweils mit einem Stromspannungswandler verbunden, der mit dem OPA121 (Burr-Brown, Tucson, AZ, USA) und einem Rückkopplungswiderstand von $100\text{ M}\Omega$ arbeitet. Dem recht hohen Rückkopplungswiderstand ist nur eine kleine Kapazität von 1 pF parallel zugeschaltet, damit die Bandbreite nicht allzu klein wird. Für eine detailliertere Besprechung dieser Problematik verweise ich

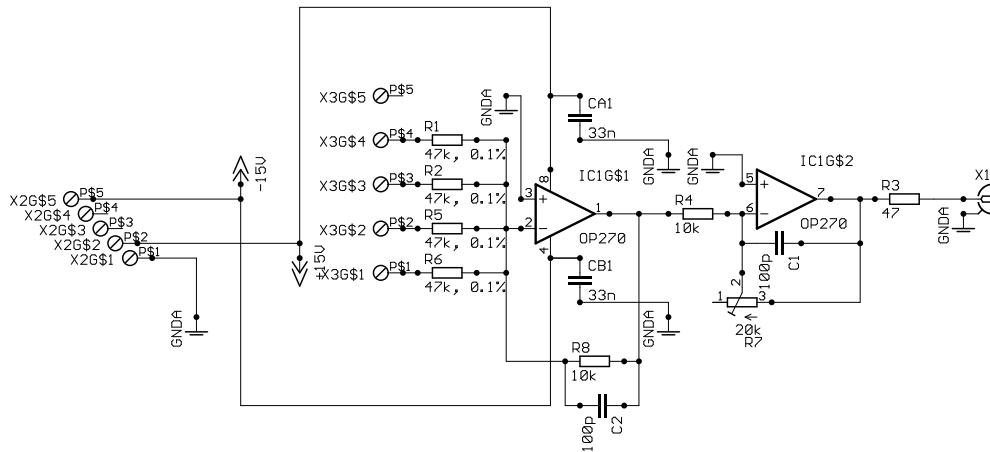


Abbildung 7.19: Schaltplan der Additionsstufe des Trinokular-Vierquadrantendetektors.

auf Kapitel 5.1.

Dieser hohe Rückkopplungswiderstand ist notwendig, da die auf die Diode abgebildete Lichtintensität recht gering ist. Eine weiteres Problem ist, dass ein Widerstandsbauteil dieser hohen Impedanz wie eine Antenne wirkt und Störsignale in das System einbringt. Daher wurde die eigentlich ebenfalls zur Auswerteelektronik gehörende Differenzschaltung ausgegliedert und das kompakte Stromspannungswandlerboard so weit wie möglich abgeschirmt. Die einzigen Verbindungen nach außen sind dann die Spannungsversorgung und die vier BNC-Kabel, die die Spannungssignale der vier Quadranten fortleiten. Letzteres ist unkritisch, da das Signal, wenn es das Stromspannungswandlerboard verläßt, in den Voltbereich verstärkt worden ist. Es dürfte auf äußere Störungen nicht mehr empfindlich reagieren.

Der Schaltplan der Differenzstufe ist in Abbildung 7.18 dargestellt. Die Signale der vier Quadranten werden jeweils über eine Differentialstufe entgegengenommen. Dies ist notwendig und sinnvoll, um Masseschleifen zu verhindern, da nicht garantiert werden kann, dass sich der Stromspannungswandler und die Differenzstufe auf exakt dem gleichen Massenniveau befinden. Die Signaldifferenz wird jeweils überkreuz gebildet, das heißt zwischen dem ersten und dritten und zwischen dem zweiten und vierten Quadranten. Dafür wird ein Instrumentenverstärker verwendet (INA114, Burr-Brown, Tucson, AZ, USA). Der Verstärkungsfaktor dieses Bausteins kann über einen externen Widerstand eingestellt werden. Die Schaltung wurde so konzipiert, dass die für eine Verstärkung von 1, 10, ... notwendigen Widerstände parallel für beide Kanäle über einen Schalter ausgewählt werden können. Man beachte außerdem, dass die Stützwiderstände an den Eingängen

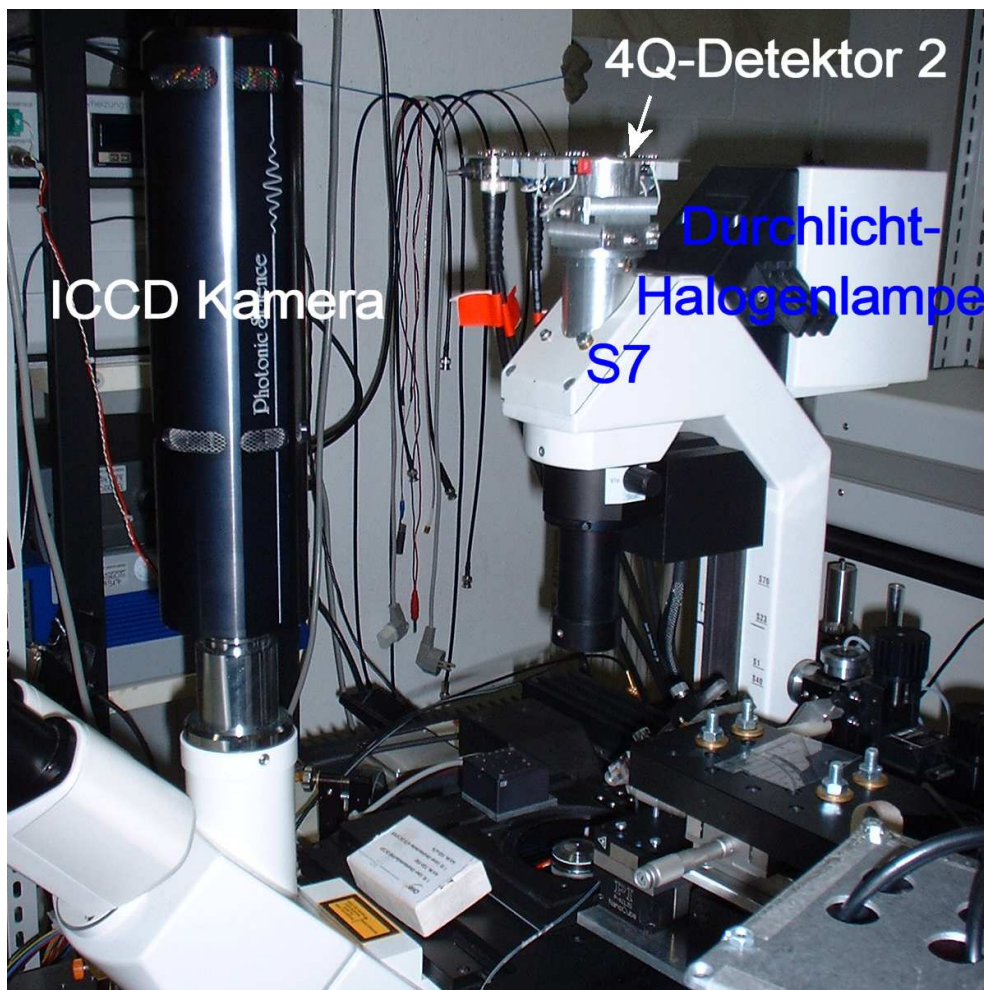


Abbildung 7.20: Vierquadrantendetektor „4Q-Detektor 2“

des Instrumentenverstärker Präzisionswiderstände (0,1%) sind, die verhindern sollen, dass es durch die Eingangsbiasströme zu Abweichungen in der Differenzbildung kommt.

In der Literatur findet man oft noch eine zusätzliche Additionsstufe [SIMMONS et al. 1996, ALLERSMA et al. 1998, MEHTA et al. 1998]: Sind Q_1 bis Q_4 die Spannungssignale der einzelnen Quadranten, so werden von den dort vorgestellten Schaltungen die Signale $x = (Q_1 + Q_4) - (Q_2 + Q_3)$ und $y = (Q_1 + Q_2) - (Q_3 + Q_4)$ gebildet. Die hier beschriebene Schaltung bildet $v = (Q_1 - Q_3)$ und $w = (Q_2 - Q_4)$. Dies ist meines Erachtens einfacher und weniger fehleranfällig, da auf elektronische Bauteile verzichtet werden kann. Beide Koordinatenpaare können über $x = v - w$ und $y = v + w$ ineinander umgerechnet werden. Alternativ kann man auch die Quadrantendiode um 45° verdreht montieren und erhält x

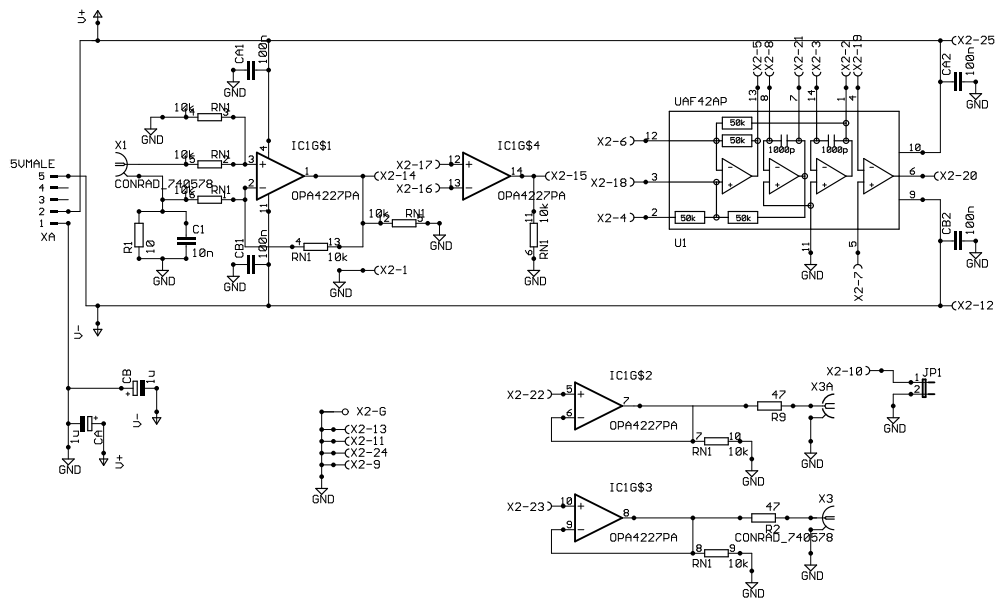


Abbildung 7.21: Schematik des variabel beschaltbaren Filterboards

und y direkt.

Um eine Kontrolle über die aktuellen Beleuchtungsverhältnisse zu haben, ist es oft sinnvoll, die Summe aller Quadrantensignale zu bilden und mit aufzuzeichnen. Der Schaltplan dieser Additionsstufe ist in Abbildung 7.19 dargestellt. Hier fehlt die differentielle Eingangsstufe, da sich dieses Schaltungsteil im selben Gehäuse befindet wie die Differenzstufe. Man beachte hier die Präzisionswiderstände R1, R2, R5 und R6, die dafür sorgen, dass die Einzelsignale bei der Summenbildung gleich gewichtet werden.

Ursprünglich sollte der gerade beschriebene selbst gebaute Trinokularaufsatz auch im Epifluoreszenzmodus benutzt, und das Licht zwischen Quadrantendetektor und ICCD-Kamera, wie beschrieben, im Verhältnis 50 : 50 aufgeteilt werden. Dies konnte nicht realisiert werden. Zum einen lag dies an der dann zu geringen Fluoreszenzlichtausbeute für die ICCD-Kamera. Weiter reichte das Fluoreszenzlicht zum Betrieb des Positionsdetektors nicht aus, man musste die Objekte im Durchlichtmodus abbilden. Der Durchlichtmodus war wiederum mit der ICCD-Kamera nicht kompatibel.

Die Lösung ist, die zu detektierenden Objekte nicht mit Durchlicht zu beleuchten sondern mit dem Laserlicht der optischen Pinzette selbst [STOUT und WEBB 1998]. Das eingefangene Objekt wirkt wie eine Infrarotlichtquelle, die durch die Durchlichtbeleuchtungsoptik auf eine Zwischenbildebene oberhalb des Kollektors abgebildet wird. Diese Ebene kann durch Verstellen des Kondensors gewählt werden. Dies führt zwar zum Verlust der Köhlerschen Beleuchtung, diese wird aber

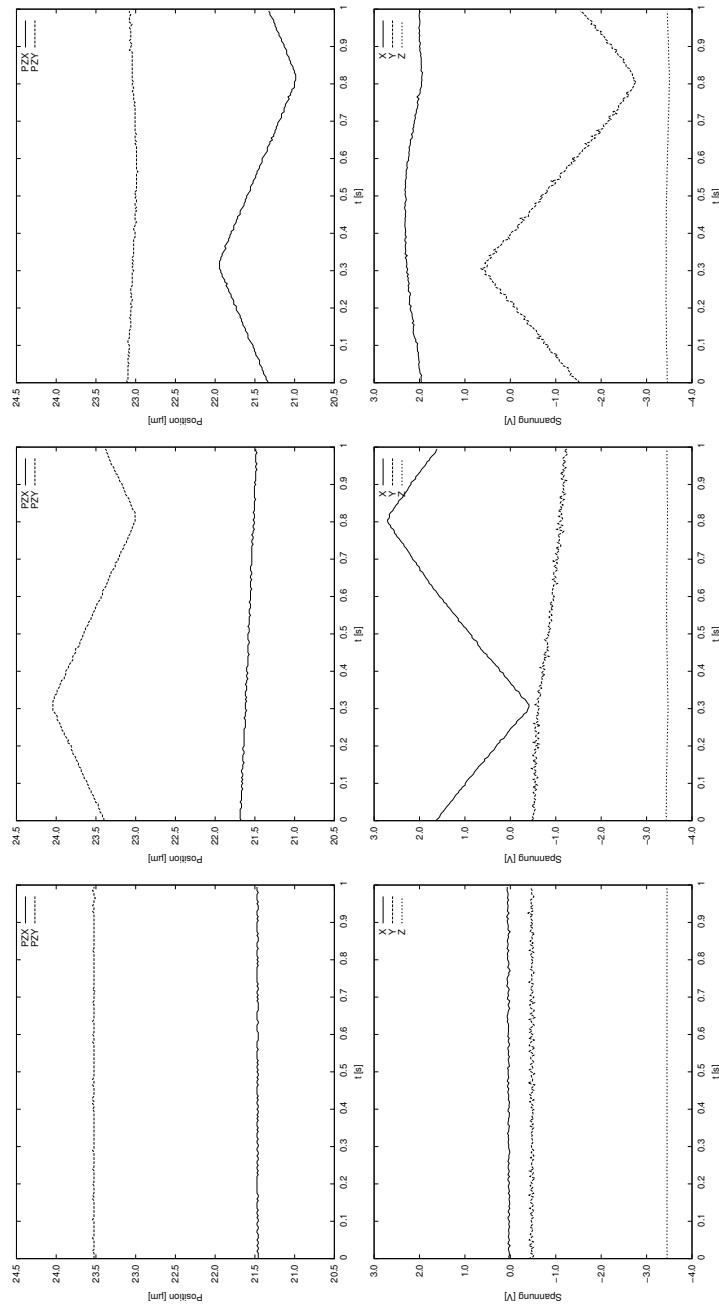


Abbildung 7.22: Positionsdetektion von $6\ \mu\text{m}$ -Beads in Agargel. Mit PZX und PZY sind die umgerechneten Positionsdaten des xy-Piezotranslators, mit X, Y und Z die Spannungssignale des Quadrantendetektors gekennzeichnet.

im Fluoreszenzmodus nicht benötigt.

Der Quadrantendetektor kann also oberhalb des Kollektors montiert werden. Dazu wurde der Umlenkspiegel zwischen Durchlichtlampe und Kollektor durch

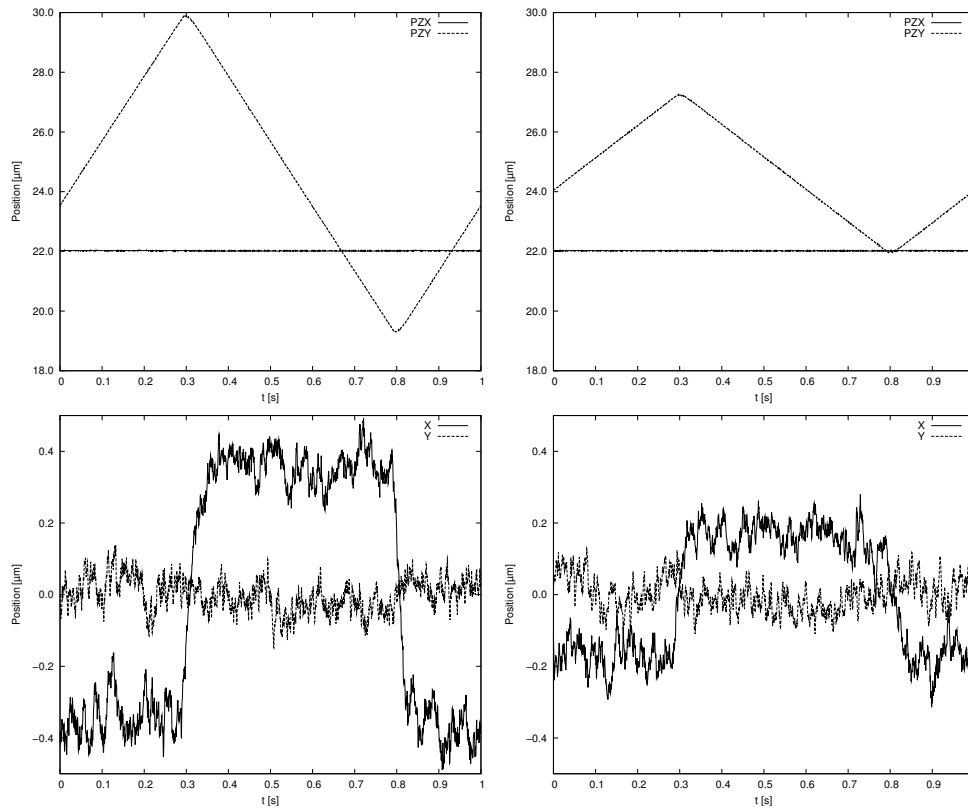


Abbildung 7.23: Positionsdetektion von $6\ \mu\text{m}$ -Beads in der optischen Pinzette: Durch die gleichförmige Verschiebung der Messkammer in y -Richtung entsteht eine Strömung, die das Kügelchen auslenkt.

einen dichromatischen Spiegel — „S7“ — ersetzt und eine Öffnung in das Mikroskop gebohrt. In senkrechter Fortsetzung des Beleuchtungstubus wurde eine Metallröhre montiert, an deren Ende der Quadrantendetektor angebracht ist. Da hier die verfügbare Lichtleistung deutlich höher ist, kann auf die Aufteilung der Schaltung verzichtet und alles kompakt auf ein Board montiert werden. Entsprechend können mit $1\ \text{M}\Omega$ hier auch kleinere Rückkopplungswiderstände für die Stromspannungswandler verwendet werden. Abbildung 7.20 zeigt diese Konstruktion.

Mit diesem zusätzlichen Detektor gelingt es, Positionsmessungen im Epifluoreszenzmodus oder im Konfokalmodus durchzuführen. Wird allerdings der Transmissionsdetektor benötigt, wie es bei Multiphoton-Scan-Anwendungen der Fall ist, funktioniert auch diese neue Option nicht.

Der Ausweg für dieses Problem war, nicht das vorwärts gestreute Laserlicht zu detektieren, sondern das zurückgestreute. Diese Option wird zwar von A.L. Stout and W.W. Webb als prinzipielle Möglichkeit diskutiert [STOUT und WEBB 1998],

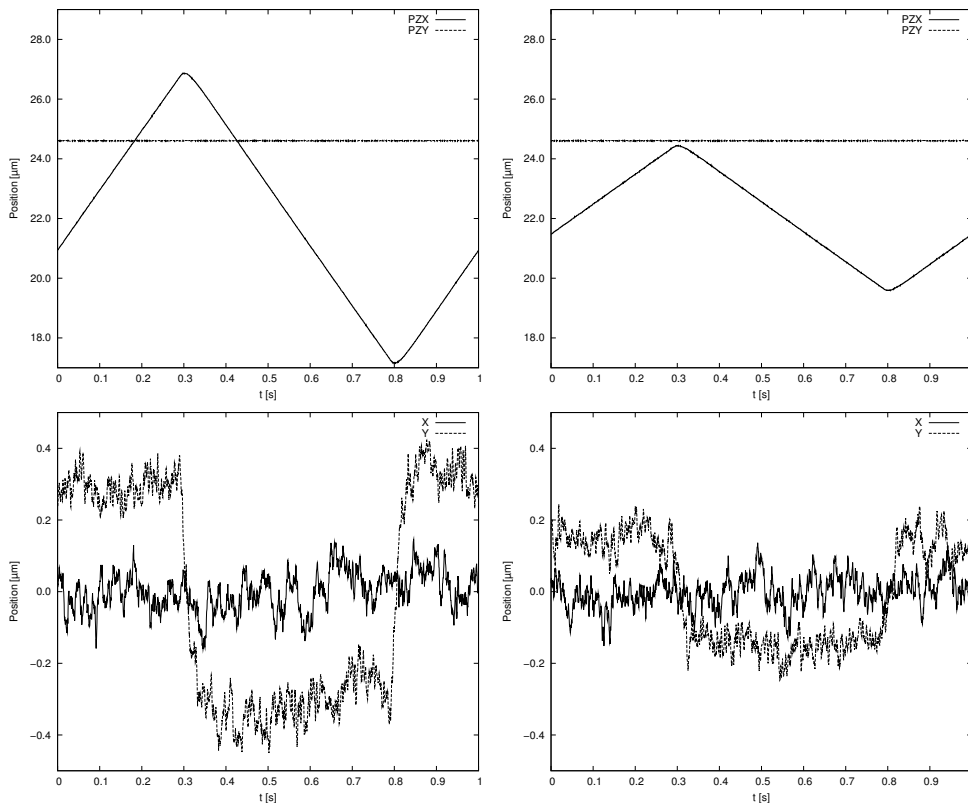


Abbildung 7.24: Positionsdetektion von $6\ \mu\text{m}$ -Beads in der optischen Pinzette: Wieder entsteht durch die gleichförmige Verschiebung der Messkammer, hier in x -Richtung, eine Strömung, die das Kügelchen auslenkt.

meines Wissens wurde sie aber noch nirgends realisiert. In Abbildung 7.16 sieht man schön, wie ein eingefangenes Bead das Laserlicht der optischen Pinzette zurückreflektiert. Das Problem, dieses Licht von dem des Nd:YVO₄-Lasers zu trennen, habe ich mit Hilfe einer Viertelwellenplatte gelöst. Laserlicht, das von dem eingefangenen Objekt zurückreflektiert wird, muss diese Viertelwellenplatte zweimal passieren, sie wirkt dann wie eine Halbwellenplatte. Bei entsprechender Winkelstellung der Viertelwellenplatte dreht sich die Polarisationssebene des eingekoppelten und wieder zurückreflektierten Lichts um 90° . Am Spiegel „S1“, einem polarisierenden Strahlteilerwürfel, läuft das Reflektionslicht geradeaus weiter und kann auf den dritten Quadrantendetektor abgebildet werden.

Zur Digitalisierung der Daten, die von den drei Positionsdetektoren geliefert werden, steht eine PC-Analog-Digital-Wandler-Karte zur Verfügung (PCI-MIO-16E-1, National Instruments Corp., Austin, TX, USA). Diese Karte kann gleichzeitig acht analoge Spannungen einlesen und mit 12 Bit digitalisieren, außerdem stehen zwei analoge Ausgänge zur Verfügung. Diese Karte wurde mit Hilfe

der LabView-Software (National Instruments Corp., Austin, TX, USA) programmiert.

Durch die beiden analogen Ausgänge der PCI-Karte wird der xy-Piezotranslator angesteuert, zwei der analogen Eingänge nehmen das Monitorsignal des Translators entgegen. Derzeit nimmt die Software aus Performancgründen nur noch drei weitere Analogspannungen auf, ein „ x “-Signal, ein „ y “-Signal und ein „ z “-Signal, die mit einem selbstgebaute Umschalter ausgewählt werden können. Obwohl es möglich ist, das x -Signal zum Beispiel des Trinokulardetektors „4QD1“ mit dem z -Signal des rückwärtigen Quadrantendetektors „4QD3“ gemeinsam aufzuzeichnen, wird der häufigste Fall derjenige sein, wo das gesamte Signalset *eines* Detektors aufgezeichnet werden soll.

Um Probleme bei der nachfolgenden Interpretation der digitalisierten Daten zu vermeiden, wurde ein analoges Filterboard entwickelt. Dieses basiert auf dem universalen Filterbaustein UAF42 (Burr-Brown, Tucson, AZ, USA), mit dem viele verschiedene analoge Filter implementiert werden können. Um sich nicht einschränken zu müssen, habe ich das Filterboard so konzipiert, dass die variablen Bauteile — das sind diejenigen, die die Filtereigenschaften definieren — auf ein eigenes kleines Steckboard gelötet werden. Das Steckboard ist mit einem D-Sub-25-Stecker versehen, das Filterboard mit den entsprechenden Buchsen. Beim Bau neuer Filter muss lediglich die Pinbelegung des D-Sub-25-Steckers beachtet werden. Abbildung 7.21 zeigt eine Schematik dieses variabel beschaltbaren Filterboards.

Zum Abschluss soll ein Beispiel einer Positionsmessung vorgestellt werden, die mit dem Trinokulardetektor „4QD1“ an Latexbeads mit dem Durchmesser $6\ \mu\text{m}$ durchgeführt wurde: Zunächst wurden diese Beads in Agargel eingegossen und eine mit diesem Agargel präparierte Kammer auf das Mikroskop gelegt. Nach Scharfstellen des Bildes auf ein Bead wurde der Positionsdetektor so eingestellt, dass das x - und y -Signal etwa $0\ \text{V}$ betrug. Dann wurde mit Hilfe des xy-Piezotranslators die Messkammer einer Dreiecksbewegung unterworfen. Das Messresultat ist in Abbildung 7.22 dargestellt. Der entsprechende Positionskanal des Quadrantendetektors folgt den Vorgaben des Translators. Ein Translatorhub von $1\ \mu\text{m}$ wird in einen Signalthub von $\approx 3,1\ \text{V}$ des x -Kanals bzw. $\approx 3,4\ \text{V}$ des y -Kanals umgesetzt.

Als nächstes wird in eine neue Kammer eine wässrige Beadlösung eingefüllt und ein Bead mit der optischen Pinzette eingefangen. Wenn man nun diese Messkammer eine Dreiecksbewegung ausführen lässt, folgt das Bead der Bewegung nicht, sondern wird auf eine feste Position ausgelenkt, vergleiche Abbildungen 7.23 und 7.24. Durch die gleichförmige Bewegung des Translators entsteht eine laminare Strömung in der Kammer. Auf die Beads wirkt dann Stokes'sche

Reibungskraft $F = 3\pi\eta dv$ mit der Viskosität des Wassers $\eta \approx 10^{-3}\text{Ns/m}^2$, dem Teilchendurchmesser $d = 6\mu\text{m}$ und der Strömungsgeschwindigkeit v . Im ersten Panel der Abbildung 7.23 beträgt diese Strömungsgeschwindigkeit zum Beispiel etwa $20\mu\text{/s}$. Rechnet man nun die Spannungssignale des Quadrantendetektors mit der oben beschriebenen Kalibrierung um, sieht man, dass das Bead um etwa 350nm ($\pm 10\%$) ausgelenkt wurde. An dieser Stelle müssen Stokeskraft und Rückstellkraft des optischen Kraftfeldes vom Betrag her gleich groß sein.

Die Stokeskraft ergibt sich zu $F \approx 1,13\text{pN}$. Man kann nun annehmen, dass das Kraftfeld linear ist. Das sieht man auch am rechten Panel der Abbildung, in dem nur die halbe Strömungsgeschwindigkeit vorliegt und entsprechend nur die halbe Auslenkung erfolgt. Unter dieser Linearitätsannahme erhält man für das optische, dann harmonische Kraftfeld eine Federkonstante von $\kappa \approx 3,2\text{pN}/\mu\text{m}$ ($\pm 10\%$).

Kapitel 8

Stationäres MP-Modul

8.1 Aufbau des stationären MP-Moduls

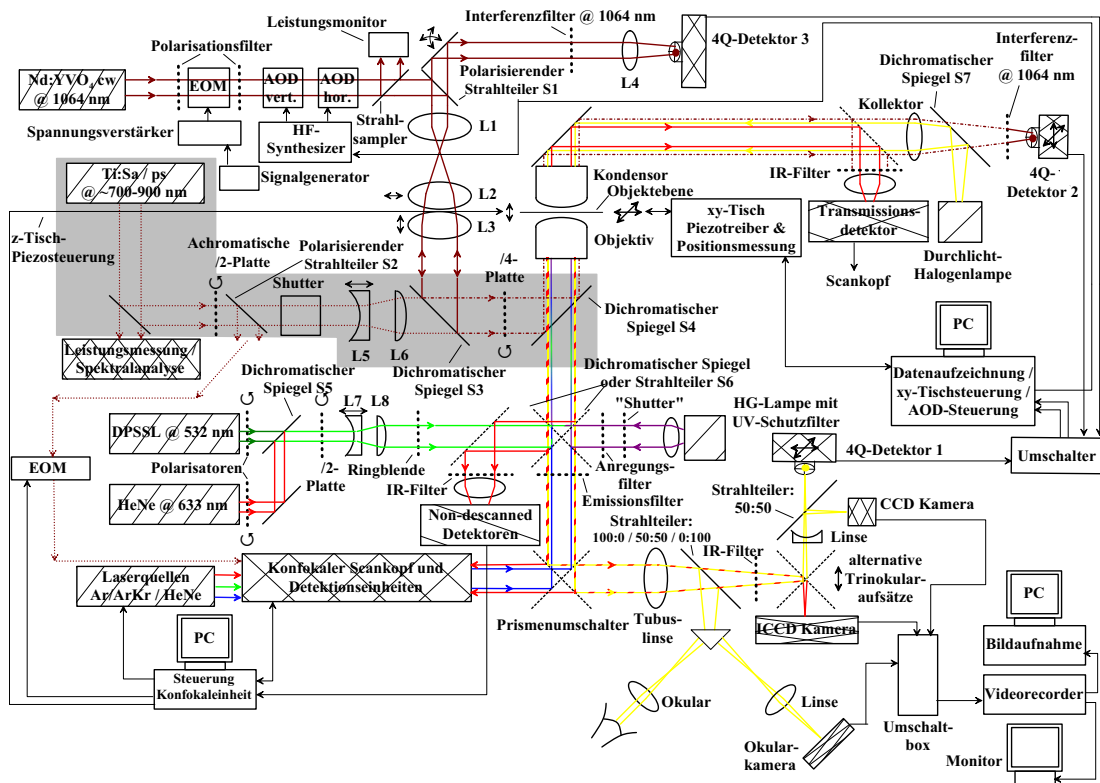


Abbildung 8.1: Stationäres MP-Modul der CMLTT-Apparatur, die grau unterlegten Elemente sind Teil dieses Moduls: Der Ti:Sa-ps-Laser ($\lambda = 700 - 950$ nm), eine achromatische Halbwellenplatte, ein Shutter und die Aufweitungs- und Einkoppeloptik.

In Kapitel 6.4 wurde bereits beschrieben, dass mit Hilfe von Laserpulsen Käfigmoleküle in lokaler Eingrenzung freigesetzt werden können. Für myofibrilläre Präparate sind vor allem Kalziumkäfige von großem Interesse, da man so über eine lokale Erhöhung der Kalziumkonzentration den Kontraktionsmechanismus gezielt auslösen kann.

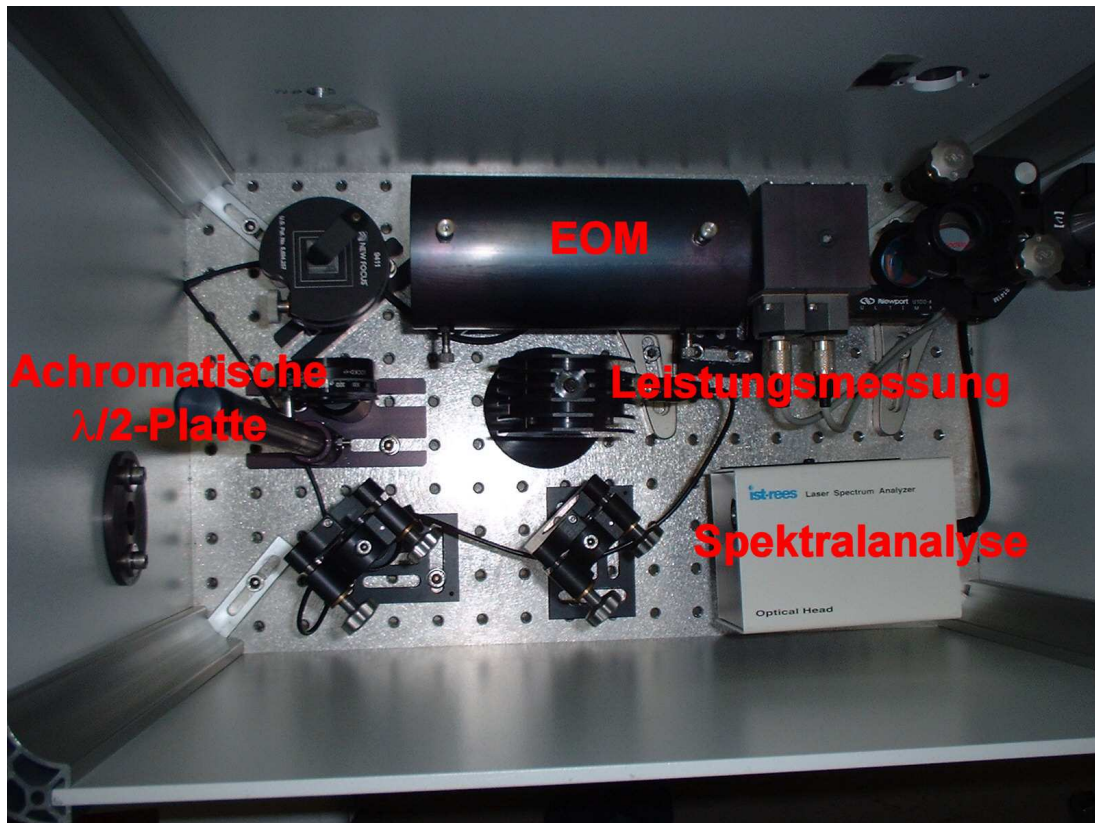


Abbildung 8.2: Blick in die sogenannte „safety box“: Hier verläuft der Ti:Sa-Strahl offen, daher ist dieser Bereich aus Sicherheitsgründen umschlossen.

Für Multiphotonphotolyse steht hier der Titan-Saphir-Pikosekunden-Laser zur Verfügung, der in Kapitel 6.4 kurz beschrieben wurde. Benutzt man allerdings die Einkopplung des Laserstrahls über den Konfokalscankopf, ergeben sich zwei Probleme: Bei gleichzeitigem Einsatz des Konfokalmoduls muss das System so programmiert werden, dass der Freisetzungsstrahl an der gewünschten Position kurz eingeschaltet und direkt danach wieder abgeschaltet wird, damit der eigentliche konfokale Scanvorgang starten kann. Allerdings kann so keine permanente Freisetzung realisiert werden, da ein Scanvorgang für ein Bild mehrere 100 ms dauern kann. Auf der anderen Seite wird der konfokale Messvorgang regelmäßig

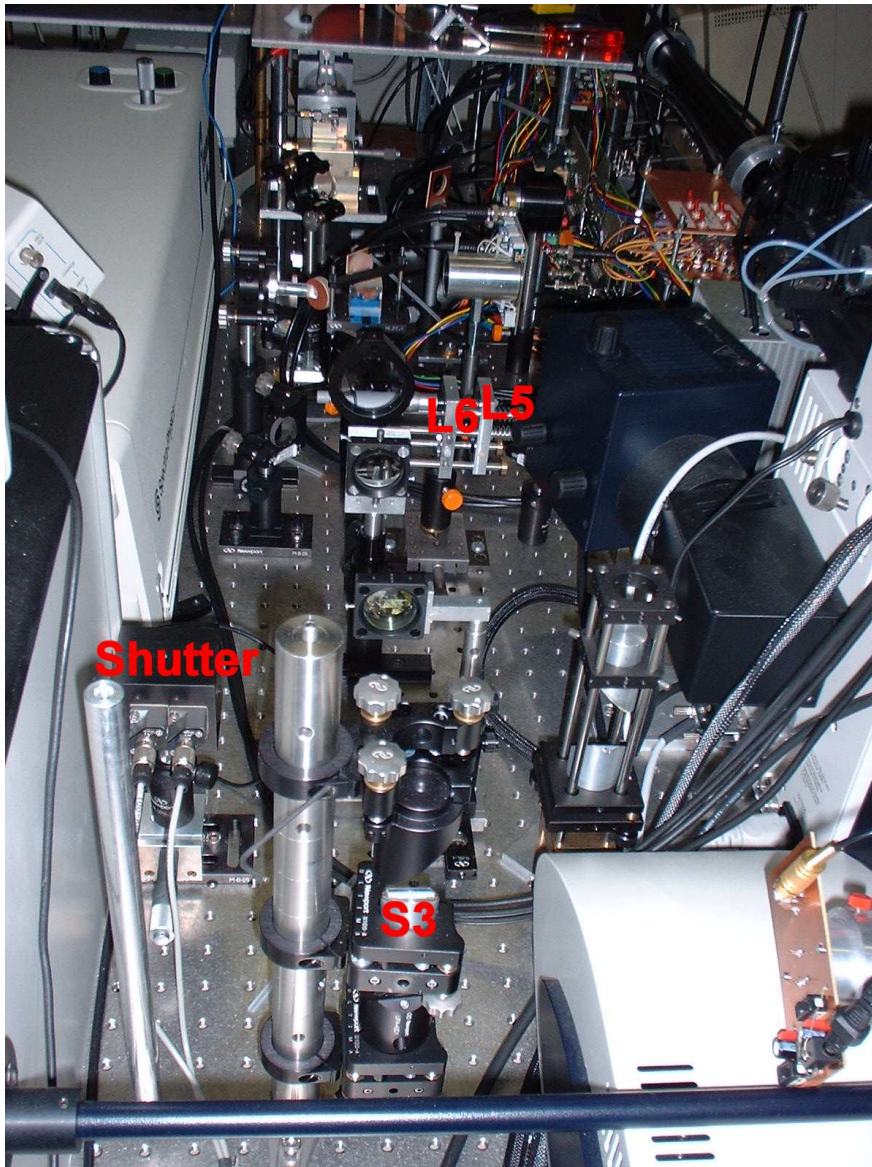


Abbildung 8.3: Stationäres MP-Modul: Der Ti:Sa-Strahl läuft vom Shutter aus durch die Aufweitungsoptik der Linsen L5 und L6 und wird bei dem dichromatischen Spiegel S3 mit dem Laserstrahl der optischen Pinzette vereinigt.

unterbrochen und die zeitliche Auflösung verschlechtert. Alternativ könnte der Freisetzungsstrahl während des Scanvorgangs mitlaufen; er würde dann allerdings das gesamte Präparat überstreichen. Ein dynamisches Gleichgewicht, also zum Beispiel eine konstante Kalziumquelle, ist so nicht realisierbar.

Eine andere Möglichkeit wäre, den Scankopf in den „bleach“-Modus zu schal-

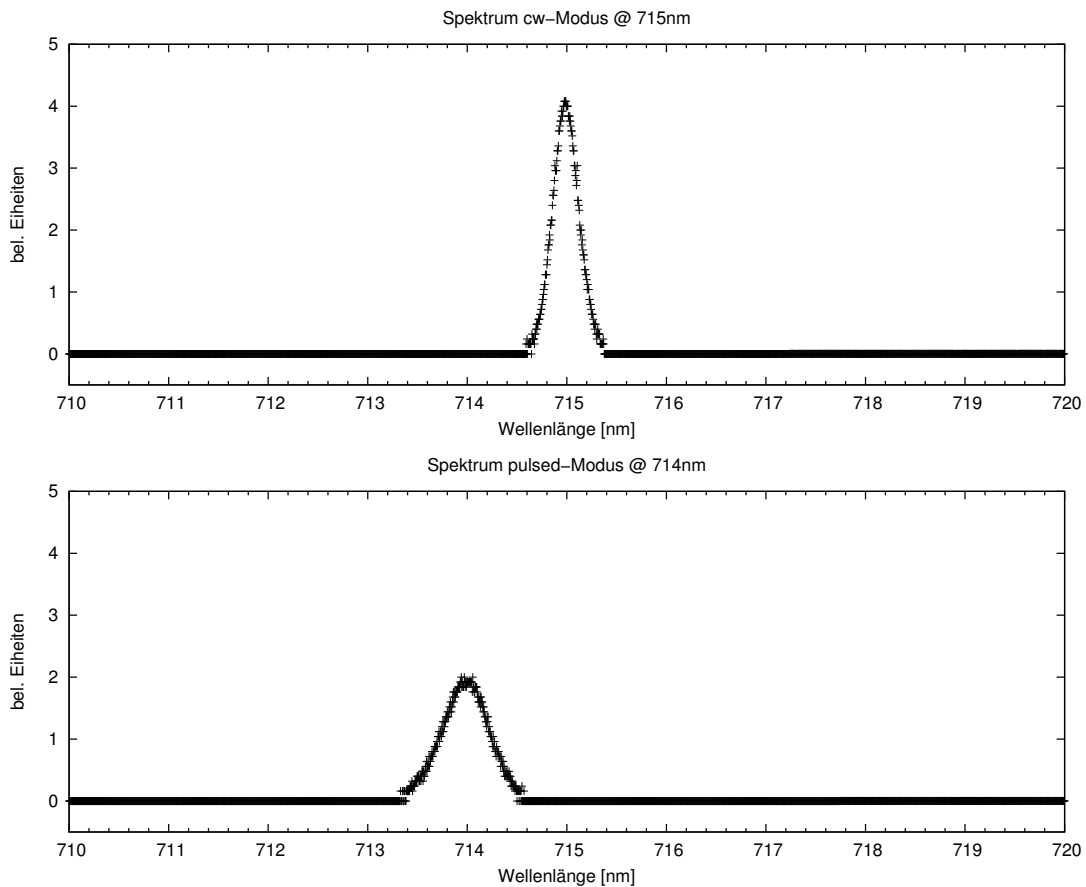


Abbildung 8.4: Wellenlängenspektrum des Ti:Sa-Strahls im cw- und gepulsten Modus: Man erkennt die spektrale Verbreiterung der Pulse.

ten. Dabei bleibt die Scanspiegelposition unverändert. Allerdings könnte so das Ergebnis der Freisetzung überhaupt nicht mehr beobachtet werden, weder konfokal noch über Epifluoreszenz. Da nun geplant war, für den Laserstrahl der optischen Pinzette einen eigenen Port herzustellen, war es sinnvoll, den Pikosekundenlaserstrahl an einer geeigneten Stelle „anzuzapfen“ und über den Laser-Tweezers-Port in das Mikroskop einzukoppeln.

Diese Konfiguration wurde im Rahmen dieses Projektes in einer Diplomarbeit aufgebaut und getestet [HENZE 2003]. Allerdings stand zu diesem Zeitpunkt der dichromatische Spiegel „S4“ zur Einkopplung von stationärem MP-Strahl *und* optischer Pinzette nicht zur Verfügung. Das nun vollständige Modul soll im folgenden beschrieben werden:

Der Laserstrahl des Ti:Sa verläßt das Gehäuse mit einer senkrechten Polarisationsvorzugsrichtung und wird direkt in die sogenannte „safety box“ geleitet,

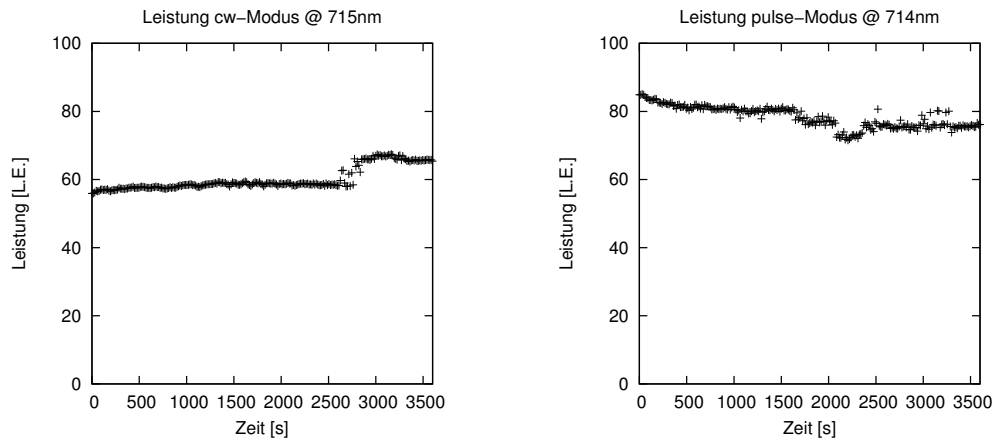


Abbildung 8.5: Leistungstabilitätstest des Ti:Sa im cw- und gepulsten Modus: Die Laserleistungen wurden jeweils über einen Zeitraum von einer Stunde in 15-Sekunden-Intervallen aufgezeichnet.

vergleiche Abbildung 8.2. Wie in Kapitel 6.4 bereits beschrieben, wird direkt an dieser Stelle ein Teil des Strahls, etwa 10 %, für die Spektrums- und Leistungsanalyse abgezweigt. Die „safety box“ umschließt den Bereich, in dem der Strahl immer offen verläuft.

Die Intensitätsaufteilung zwischen stationärem MP-Modul und dem Multiphotonenmodul der Konfokaleinheit sollte variabel einstellbar sein. Daher wird die restliche Laserintensität, also etwa 90 %, durch eine achromatische Halbwellenplatte (Sonderanfertigung für 700 – 1200 nm, B. Halle Nachfl. GmbH, Berlin) auf einen polarisierenden Strahlteiler (5812, New Focus, San Jose, CA, USA) geleitet, der in Abbildung 8.1 mit „S2“ gekennzeichnet ist. Die Halbwellenplatte ist verdrehbar montiert, so dass die Polarisationssebene des Laserstrahls ebenso verdreht und das Aufteilungsverhältnis am Strahlteilerwürfel verändert werden kann.

Der senkrecht polarisierte Strahlanteil wird nach rechts abgelenkt und durch einen elektro-optischen Modulator, „EOM“, (Linos Photonics, Göttingen) und einen elektromechanischen Shutter (OEM-Anfertigung, Leica Microsystems, Mannheim) geführt, bevor er in den Konfokalscankopf eingekoppelt wird. Der EOM und der Shutter werden zentral von der Konfokalsoftware angesteuert.

Der waagrecht polarisierte Strahlanteil verläßt die „safety box“ durch eine Öffnung, vor der direkt ein weiterer elektromechanischer Shutter (OEM-Anfertigung, Leica Microsystems, Mannheim) montiert ist. Dieser Shutter wird durch Spannungspulse von 15 V bei 150 mA angesteuert, so dass eine Elektronik gebaut wurde, die TTL-Pulse in diese Spannungspulse umsetzt. Die Shutter

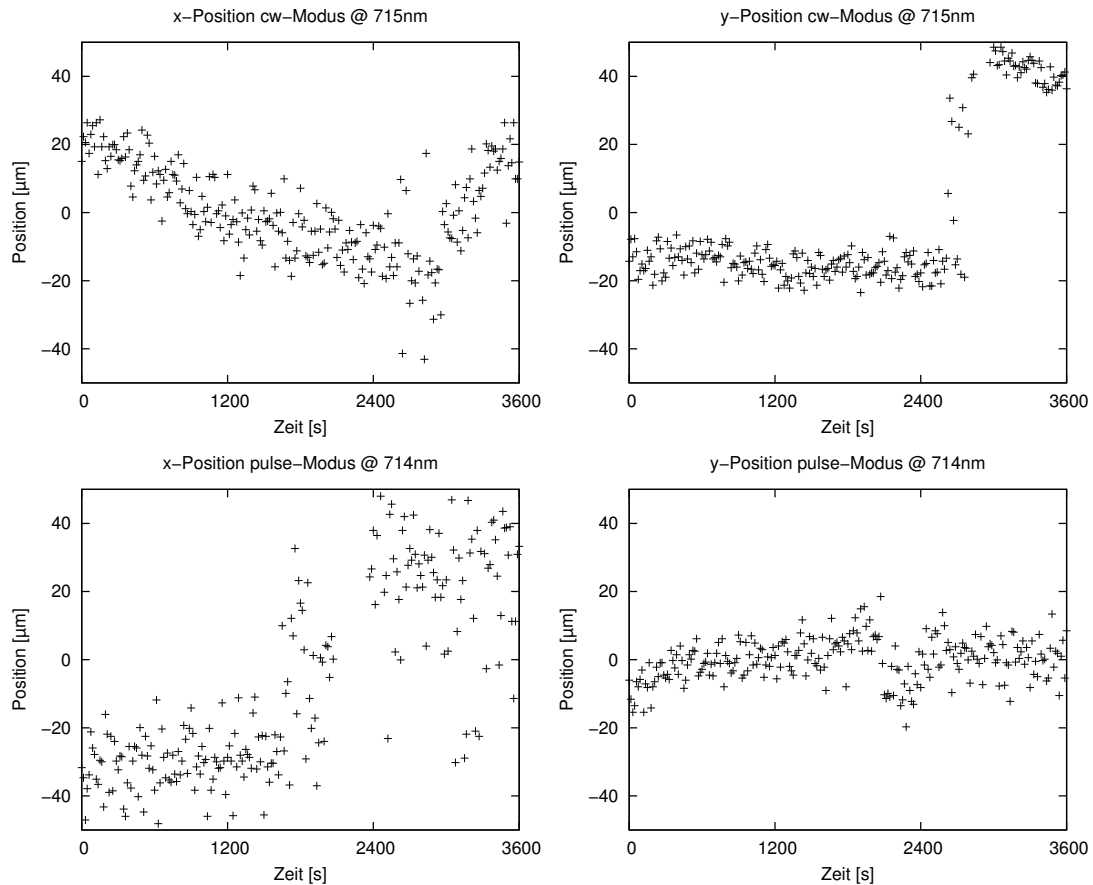


Abbildung 8.6: Positionsstabilitätstest des Ti:Sa im cw- und gepulsten Modus: Die Strahlpositionen wurden jeweils über einen Zeitraum von einer Stunde in 15-Sekunden-Intervallen aufgezeichnet.

kann so von Hand oder durch eine externe TTL-Quelle angesteuert werden. Da der Shutter mechanisch arbeitet und damit eine gewisse Trägheit besitzt, existiert eine Mindestöffnungszeit von etwa 15 ms, die Öffnungspulsfrequenzen sind also auf einige 10 Hz beschränkt [HENZE 2003].

Der Laserstrahl befindet sich nun etwa auf einer Höhe von 140 mm. Um die spätere Zusammenführung mit dem Strahl der optischen Pinzette, Bauhöhe etwa 180 mm, zu vereinfachen, wird der Ti:Sa-Laserstrahl durch ein Periskop aus zwei Spiegeln auf eine Höhe von etwa 110 mm gebracht.

Wie bei der optischen Pinzette muss zur Bildung eines beugungsbegrenzten Fokus in der Objektebene die rückseitige Apertur der Objektive — sie beträgt mehrere Millimeter — ausreichend ausgeleuchtet sein. Da der Laserstrahl an dieser Stelle aber nur einen Durchmesser von etwa 2 mm besitzt, vergleiche Abbildung 8.9, wird sein Durchmesser durch eine Strahlaufweitung in Galilei-

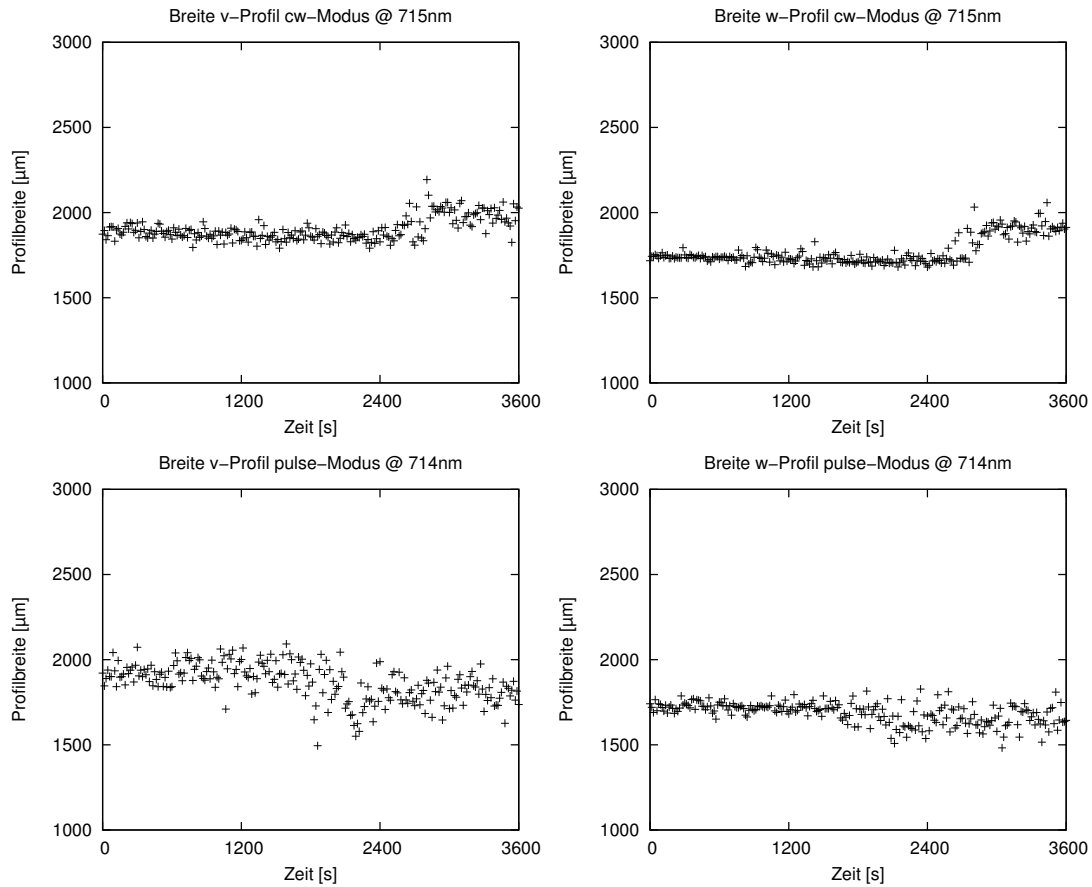


Abbildung 8.7: Profilstabilitätstest des Ti:Sa im cw- und gepulsten Modus: Die Strahlprofilbreiten wurden jeweils über einen Zeitraum von einer Stunde in 15-Sekunden-Intervallen aufgezeichnet.

Anordnung erhöht. Die Konkavlinse hat dabei eine Brennweite von $f_1 = -16$ mm, die Sammellinse eine Brennweite $f_2 = 100$ mm.

Die Linsen sind so montiert, dass ihr Abstand verändert werden kann. Mit Hilfe der in Kapitel 3.2 vorgestellten Matrizenoptik berechnet man, dass eine Abstandsänderung Δd der Linsen zu einer Verschiebung der Objektebene um $-(f_{\text{obj}}/f_2)^2 \Delta d$ führt, vergleiche Gleichung (7.6). Die Anpassung der Brennebene wird — wie in Kapitel 7.5 beschrieben — so durchgeführt, dass der Durchmesser des auf die Okularkamera abgebildeten Rückreflektionsflecks des Laserstrahls minimiert wird (s. unten).

Durch einen weiteren Justagespiegel wird der Ti:Sa-Strahl auf das Vereinigungssperiskop gelenkt (siehe Abbildung 8.3). Um ihn und den Laserstrahl der optischen Pinzette deckungsgleich auf den oberen Spiegel des Periskops zu lenken, wird der obere Spiegel noch einmal entfernt, vergleiche Kapitel 7.5 und der

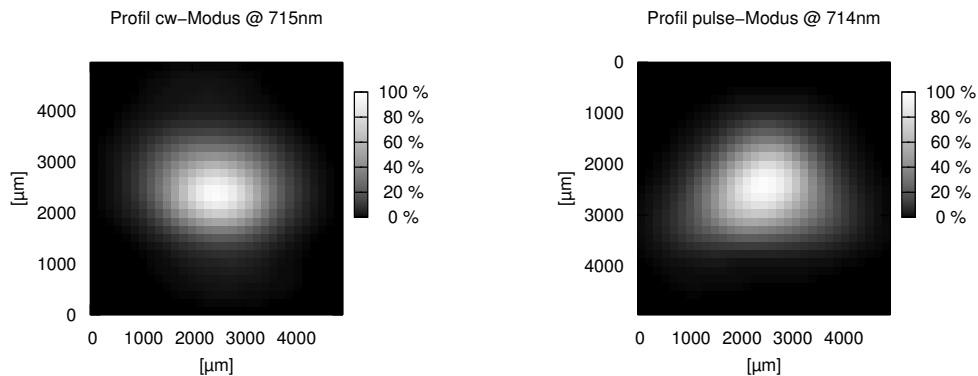


Abbildung 8.8: Zweidimensionale Profilschnitte des Ti:Sa-Strahls im cw- und gepulsten Modus.

Ti:Sa-Strahl mit dem Justagespiegel und dem unteren Periskopspiegel so eingestellt, dass er möglichst exakt auf der Periskopachse verläuft. Der obere Periskopspiegel wird dann wieder wie in dem genannten Kapitel 7.5 eingestellt, so dass nun beide Laserstrahlen zentral in das Mikroskopobjektiv eingekoppelt sind. Die Feinabstimmung der lateralen Fokusposition erfolgt mit dem Rückreflektionsbild, das mit der Okularkamera aufgenommen und auf dem Monitor angezeigt wird.

Abbildung 8.4 zeigt die Wellenlängenspektren, wie sie mit dem Spektralanalysator (Laser Spectrum Analyzer E201, ist-Imaging & Sensing Technology Corporation, Horseheads, NY, USA) aufgenommen wurden. Dabei wurde der Ti:Sa-Strahl auf eine Wellenlänge von etwa 715 nm eingestellt, wie sie bei der Multiphoton-Photolyse benutzt wird. Das Spektrum wurde einmal im cw-Modus und einmal im gepulsten Modus aufgezeichnet. Das Spektralanalysegerät ist mit einer Messgenauigkeit von 0,3 nm spezifiziert, was relativ genau der gemessenen Linienbreite im cw-Modus entspricht. Das Licht ist hier quasi monochromatisch. Im gepulsten Modus misst man eine Linienbreite von etwa 0,4 nm, der man über die Energie-Zeit-Unschärfe eine Pulslänge von etwa 1 ps zuordnen kann.

Der Ti:Sa-Laserstrahl wurde außerdem Stabilitätstests unterzogen, wie sie zuvor auch an dem Nd:YVO₄-Laserstrahl der optischen Pinzette durchgeführt wurden. Zu diesem Zweck wurde das Profilmessgerät (BeamMaster BM-7, Coherent, Inc., Santa Clara, CA, USA) an die Position des elektromechanischen Shutters montiert. Aufgrund der hohen Leistung musste wiederum der ND-9-Filter vorgeschaltet werden, so dass auch hier die Leistungsdaten nicht absolut bewertet werden können.

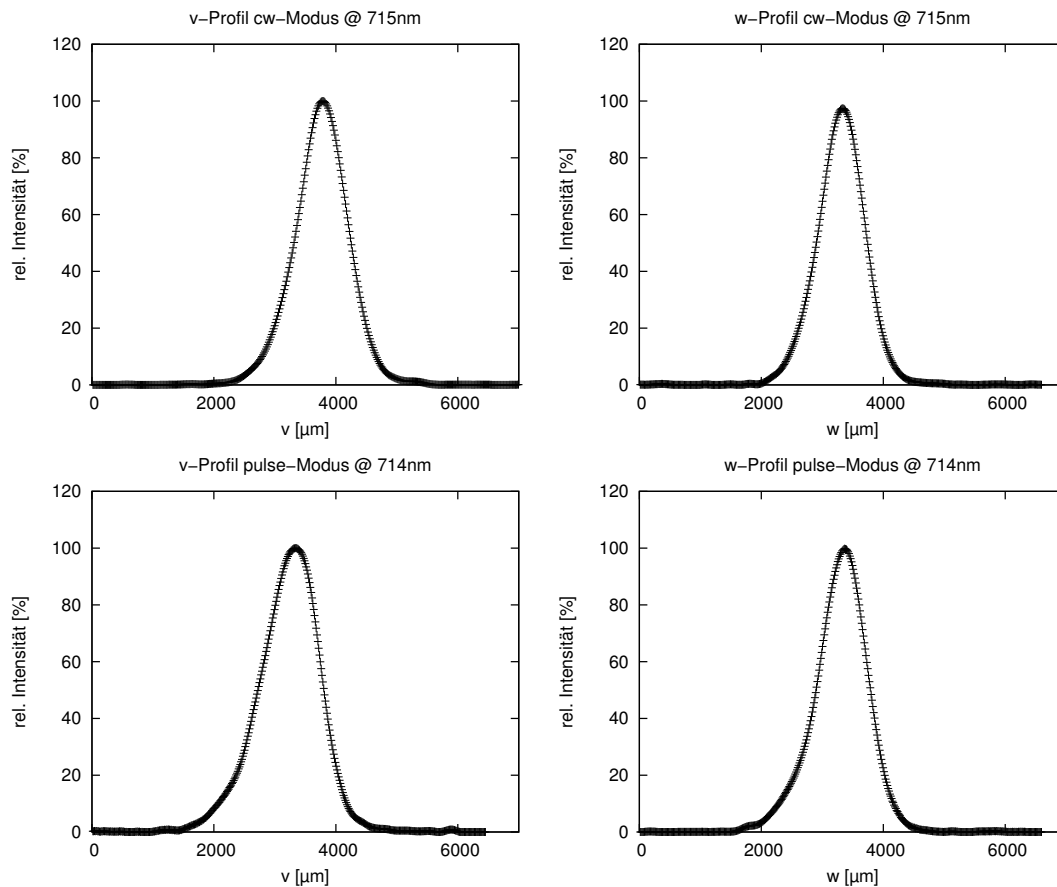


Abbildung 8.9: Eindimensionale Profilschnitte durch den Strahl des Ti:Sa-Lasers im cw- und gepulsten Modus.

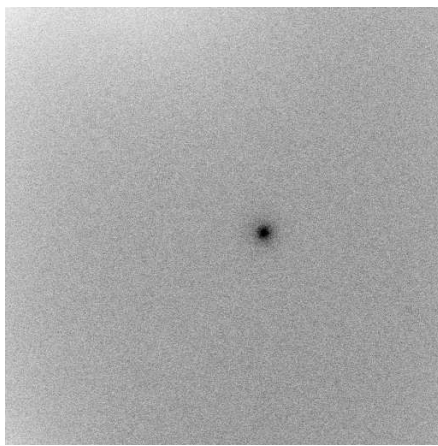
Der Test (Leistungs-, Positions- und Profilstabilität) wurde sowohl im cw-Modus — hier wurde das Modelocking abgeschaltet — wie im gepulsten Modus durchgeführt, die Wellenlänge wurde etwa auf 715 nm eingestellt. Die genannten Daten wurden in Abständen von 15 Sekunden über den Zeitraum von einer Stunde aufgezeichnet.

Die Abbildungen 8.5, 8.6 und 8.7 zeigen die Ergebnisse dieser Tests. Die Messspuren sind über gewisse Zeiträume hinweg ausreichend stabil, allerdings kann man in den Spuren Sprünge entdecken. Hieran sieht man sehr schön, dass der Ti:Sa-Laser zwar stabil läuft, aber spontane Zustandsänderungen aufweist. Dies ist keine ungewöhnliche Beobachtung und liegt auch daran, dass der Laser mit einer eingestellten Wellenlänge von 715 nm im Randbereich seiner Spezifikation betrieben wird. Während Experimente laufen, sollte der Laser daher in festen Abständen kontrolliert und gegebenenfalls nachgestellt werden.

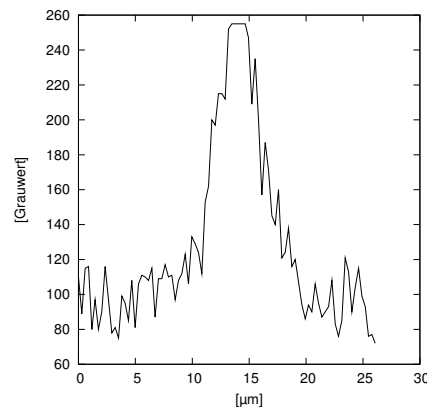
Abschliessend zeigen die Abbildungen 8.8 und 8.9 das Profil des Strahls, wie-

der in beiden Modi. Die Profilschnitte sind quasi gaußförmig, allerdings erkennt man bei näherem Hinsehen eine leichte Ausbeulung. Die Ursache hierfür ist nicht bekannt.

8.2 Testmessungen



(a) Freisetzung von Ca^{2+}



(b) Freisetzungsprofil

Abbildung 8.10: Kalziumfreisetzung mit dem stationären MP-Modul: Links ist ein konfokales Fluoreszenzbild des Kalziumfarbstoffs Fluo-4 abgebildet. Aus Darstellungsgründen wurde der Grauwertkontrast vergrößert und das Bild invertiert. Das rechte Panel zeigt ein Grauwertprofil durch das zentrale Intensitätsmaximum.

In Kapitel 4.4.3 wurde bereits erwähnt, dass es möglich ist, chemische Bindungen in photolabilen Käfigmolekülen mit Zweiphotonenanregung aufzubrechen. Eine für unsere Präparate sehr interessante Anwendung ist die Photolyse von Kalziumkäfigen.

Für Testmessungen stand der Kalziumkäfig DMNPE-4 zur Verfügung. Dieses Molekül ist ein Kalziumpuffer, dessen Affinität zu Kalzium normalerweise mit UV-Licht im Bereich um 350 nm stark herabgesetzt wird. Hier sollte nun geprüft werden, ob mit der vorgenommenen stationären MP-Einkopplung eine Freisetzung von Kalzium erfolgt. Die Wellenlänge des Ti:Sa-Lasers wurde hierfür auf etwa 710 – 715 nm eingestellt.

Da zum Test der Kalziumfreisetzung der kalziumsensitive Farbstoff Fluo-4 verwendet werden sollte, wurde in einem Vorversuch untersucht, ob Fluo-4 nicht selbst von dem Ti:Sa-Strahl zur Fluoreszenz angeregt wird. Dies konnte verneint werden.

Dann wurde eine Testlösung hergestellt, die denen bei Versuchen mit myofibrillären Präparaten ähnelt. Die Grundlösung enthielt 10 mM EGTA, 25 mM KCl, 25 mM Hepes (pH 7,4) und 4 mM MgCl_2 („AB“-Puffer). Einem Teil dieser Lösung wurde 10 mM CaCO_3 hinzugefügt („AB+“-Puffer). „AB+“- und „AB“-Puffer wurden nun in verschiedenen Verhältnissen gemischt, so dass sich Lösungen mit bestimmten totalen Kalziumkonzentrationen ergaben. Diesen Lösungen wurde 0,06 mM Fluo-4 und 2 mM DMNPE-4 hinzugegeben.

Diese Lösungen wurden jeweils in eine Messkammer eingefüllt und konfokal bei $\lambda = 488 \text{ nm}$ angeregt, da der Farbstoff hier ein Anregungsmaximum besitzt (vergleiche Abbildung 4.4). Das Detektionsspektrum lag zwischen 500 und 570 nm. Nun wurde der stationäre Ti:Sa-Laserstrahl an- und wieder abgeschaltet. Tatsächlich konnte an einer Stelle eine erhöhte Fluo-4-Fluoreszenz festgestellt werden, siehe Abbildung 8.10.

Gleichzeitig zur Fluo-4-Fluoreszenzdetektion wurde mit einem anderen Detektionskanal der Bereich ab etwa 720 nm abgedeckt. Bei dieser Einstellung kann man den Fokusfleck des Ti:Sa-Laser sehr gut sehen. Durch Vergleich der beiden Detektionskanäle stand fest, dass die erhöhte Fluo-4-Fluoreszenz an dem Ort stattfand, an den der Ti:Sa-Laser fokussiert wurde.

Für quantitative Messungen müsste man den Farbstoff nun korrekt kalibrieren, das heißt die Fluoreszenz muss bei genau definierten freien Kalziumkonzentrationen gemessen werden. Dabei sind die anderen Reagenzien, die in den „echten“ Lösungen dann auftreten werden, nach Möglichkeit hinzuzugeben, es sei denn, eine Wechselwirkung kann ausgeschlossen werden. Allerdings bilden diese Stoffe in der Regel ein sehr komplexes Reaktionsnetzwerk, das meist nur noch numerisch beherrscht werden kann.

Kapitel 9

TIRFM Modul

9.1 Aufbau des TIRFM Moduls

Wie bereits in den Abschnitten 2.2.2 und 4.5 erwähnt, ergab sich aus der Tatsache, dass TIRFM erfolgreich in Einzelmolekül-Aktomyosin-Studien verwendet wurde [FUNATSU et al. 1995, ISHIJIMA et al. 1998, KITAMURA et al. 1999], die Idee, unser Leica TCS-SP2-System um ein TIRF-Modul zu erweitern. Neben der eventuellen Möglichkeit, einzelne ATPase-, also ATP-Spaltungsereignisse sichtbar zu machen, sprach generell dafür, dass sich viele Motorprotein-Experimente wie das in Kapitel 10 vorgestellte *in-vitro*-Motilitätsassay im oberflächennahen Bereich am Deckglas abspielen. TIRFM bietet eine höhere Sensitivität als Epifluoreszenz [TOOMRE und MANSTEIN 2001], da die Anregung von Fluoreszenzfarbstoffen auf den genannten oberflächennahen Bereich beschränkt bleibt und die im Lösungsvolumen vorhandenen Farbstoffmoleküle keine störenden Signalbeiträge liefern.

Zunächst wurde versucht, TIRFM durch eine prismengestützte Einkopplung herzustellen. Dabei wird ein Prisma auf ein Deckglas geklebt und ein Laserstrahl über dieses Prisma in das Deckglas eingekoppelt. Bei entsprechender Wahl

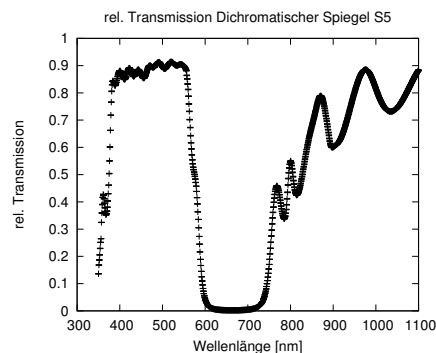


Abbildung 9.2: Transmissionsspektrum des dichromatischen Spiegels, der zur Strahlvereinigung von DPSSL-Strahl und Helium-Neon-Laserstrahl dient. Das Spektrum ist bei Lichteinfall unter 45° mit einem Spektrophotometer (DU-640, Beckman Instruments, Inc., Fullerton, CA, USA) aufgenommen.

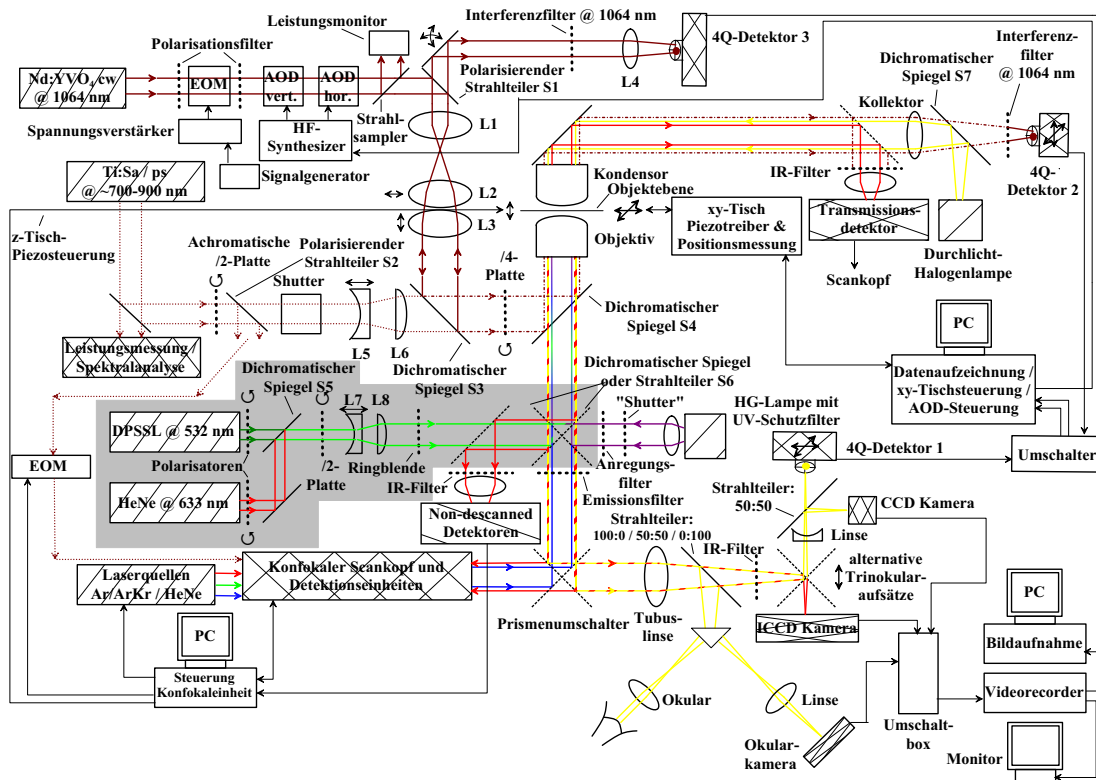


Abbildung 9.1: TIRFM-Modul des Leica TCS-SP2-Mikroskopsystems: Die grau unterlegten Elemente sind Teil des TIRFM-Moduls: Ein diodengepumpter Festkörperlaser ($\lambda = 532 \text{ nm}$), ein Helium-Neon-Laser ($\lambda = 633 \text{ nm}$), jeweils ein Polarisator, ein dichromatischer Spiegel zur Strahlvereinigung, eine Halbwellenplatte, eine Strahlaufweitung sowie eine Ringblende. Der TIRFM-Laserstrahl wird über einen umgebauten Epifluoreszenzport in das Mikroskop eingekoppelt.

des Einkoppelwinkels läuft der Laserstrahl im Zick-Zack zwischen den Glasoberflächen hin und her und erzeugt an den Oberflächen ein evaneszentes Feld. Diese Konfiguration wurde im Rahmen dieses Projektes in einer Diplomarbeit realisiert und getestet [KÜNSTING 2003]. Ein Nachteil dieser Konfiguration bestand aber darin, dass das Deckglas mit diesem TIRFM-Modul fest verbunden sein muss und nicht einfach ausgetauscht werden kann. Für die *in-vitro*-Motilitätsversuche muss das Deckglas aber mit Nitrozellulose vorbehandelt werden, siehe Kapitel 10, und ist nach einem abgeschlossenen Versuch nicht wiederverwendbar.

Als technische Lösung, die keinerlei Anforderung an die Messkammern stellte, wurde daher die in Kapitel 4.5 beschriebene Objektivmethode realisiert. Dabei wird der Laserstrahl am Rand eines Objektivs mit hoher numerischer Apertur eingekoppelt, wie zum Beispiel des Leica HCX PL APO 100x-Objektiv, das eine



Abbildung 9.3: Modifikationen des Fluoreszenzfilterrads zur Nutzung des TIRFM-Moduls: Im linken Panel rechts der Strahlteilereinsatz für parallele TIRFM- / Konfokalanwendungen, im rechten Panel der Filtersatzhalter, mit dem vorhandene Fluoreszenzfiltersätze im TIRF-Modus verwendet werden können.

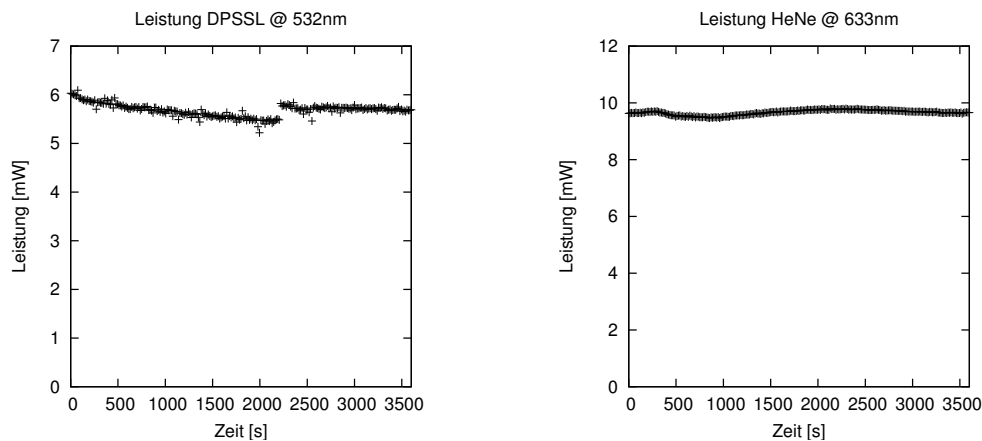


Abbildung 9.4: Leistungstabilitätstest des DPSSL und des Helium-Neon-Lasers: Die Laserleistungen wurden jeweils über einen Zeitraum von einer Stunde in 15-Sekunden-Intervallen aufgezeichnet.

numerische Apertur von bis zu 1,4 besitzt.

Dieses Objektiv ist ein Ölimmersionsobjektiv, wobei der Brechungsindex des Öls auf den von Glas abgestimmt ist, $n \approx 1,52$. Daher verläuft ein Lichtstrahl, der direkt am Rand der rückseitigen Apertur des Objektivs eingekoppelt wird, im Deckgläschen unter einem Winkel $\alpha_1 = \arcsin(1,4/1,52) \approx 67^\circ$ gegen die optische Achse. Der Grenzwinkel am Deckglas-Wasser-Übergang beträgt hingegen $\alpha_g = \arcsin(1,33/1,52) \approx 61^\circ$.

Der Durchmesser der rückseitigen Objektivapertur beträgt etwa 7 mm. Vereinfacht man das Objektiv zu einer dünnen Linse, so erhält man eine Brennweite

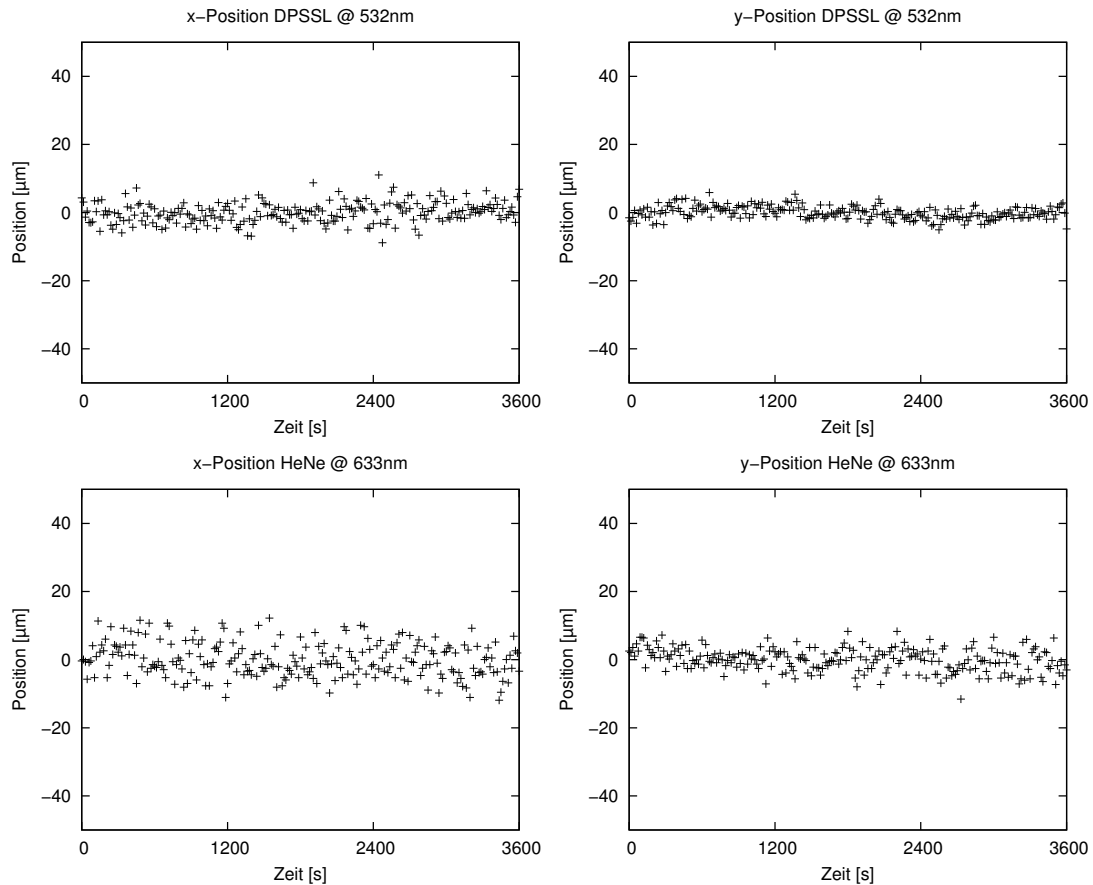


Abbildung 9.5: Positionsstabilitätstest des DPSSL und des Helium-Neon-Lasers: Die Strahlpositionen wurden jeweils über einen Zeitraum von einer Stunde in 15-Sekunden-Intervallen aufgezeichnet.

von $f \approx 3,5 / \tan(67^\circ) \approx 1,49$. Den Strahlen, die gerade noch in das Wasservolumen eindringen können, kann dann rückseitig ein Öffnungsradius von etwa $f \cdot \tan(61^\circ) \approx 2,68$ mm zugeordnet werden. In diesem vereinfachten Modell werden Strahlen, die im „Ring“ zwischen $r_{min} = 2,68$ mm und $r_{max} = 3,5$ mm eingekoppelt werden, an der Deckglas-Wasser-Grenzfläche totalreflektiert und dienen als Quelle für ein evaneszentes Feld im Wasservolumen.

Die Abbildung 9.1 skizziert den aus diesen Überlegungen folgenden Aufbau des TIRFM-Moduls. Als Lichtquelle können zwei Laser verwendet werden: Ein diodengepumpter Festkörperlaser oder „diode-pumped solid state laser“, „DPSSL“, mit einer Wellenlänge von $\lambda = 532$ nm und ein Helium-Neon-Laser, „HeNe“ mit einer Wellenlänge $\lambda = 633$ nm.

Der „grüne“ Laser (GLM-100, Roithner Lasertechnik, Wien, Österreich) wurde ausgewählt, weil seine Wellenlänge gut zum Anregungsspektrum von Fluores-

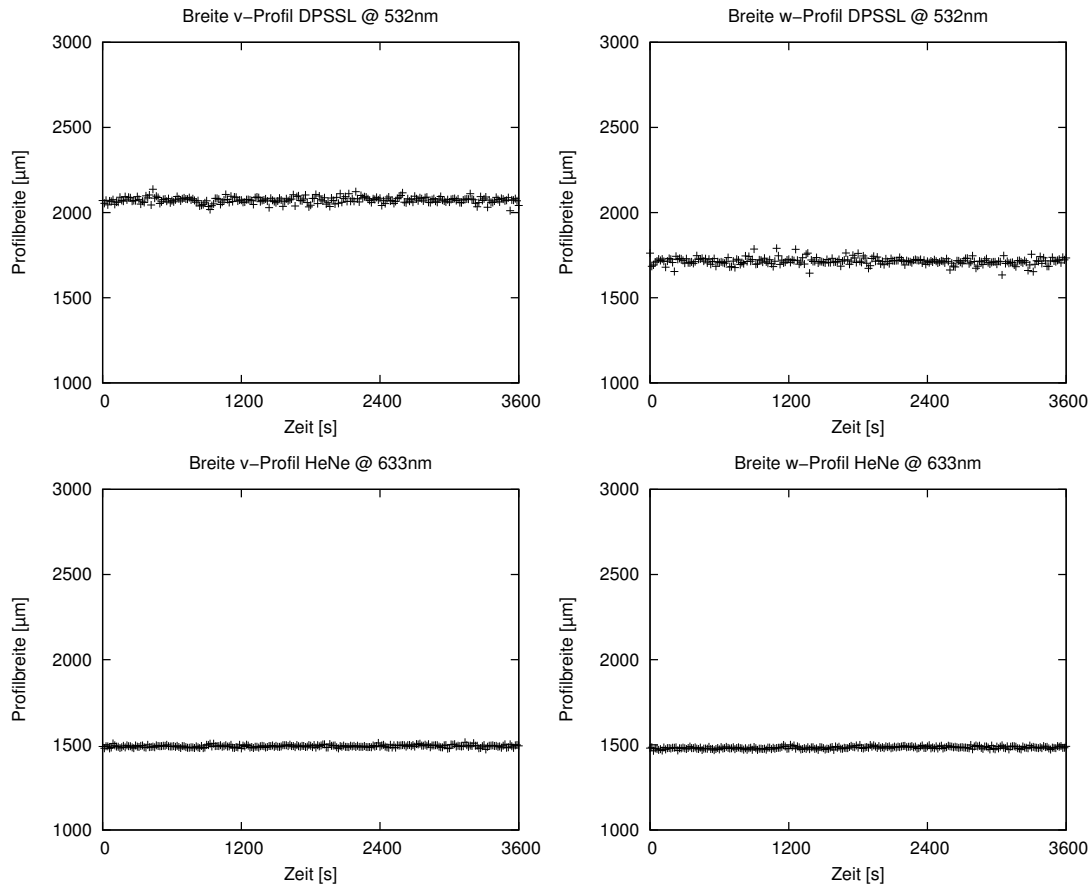


Abbildung 9.6: Profilstabilitätstest des DPSSL und des Helium-Neon-Lasers: Die Strahlprofilbreiten wurden jeweils über einen Zeitraum von einer Stunde in 15-Sekunden-Intervallen aufgezeichnet.

zenzfarbstoffen wie Rhodamin-Phalloidin passt, vergleiche Abbildung 10.1(a), mit denen das Motorpartnerprotein Aktin angefärbt wird. Der „rote“ Helium-Neon-Laser (1147P, Optlectra, Feldkirchen-Westerham) kann dann für einen zweiten Farbstoff verwendet werden.

Der DPSSL ist mit einer Ausgangsleistung von $\approx 100 \text{ mW}$ spezifiziert. Allerdings benötigt er, entgegen ursprünglicher Angaben des Herstellers, eine aktive Kühlung! Diese Kühlung wird durch einen Lüfter realisiert. Der Lüfter brachte mechanische Erschütterungen in das System ein, so dass schliesslich eine Faserkopplung zwischen Laserkopf und Messsystem realisiert wurde. Durch diese Faserkopplung geht etwa 95 % der Leistung verloren, jedoch wurden die mechanischen Störungen damit weitgehend beseitigt. Außerdem liegt diese Restleistung immer noch deutlich über der der entsprechenden Konfokallaserquelle, vergleiche

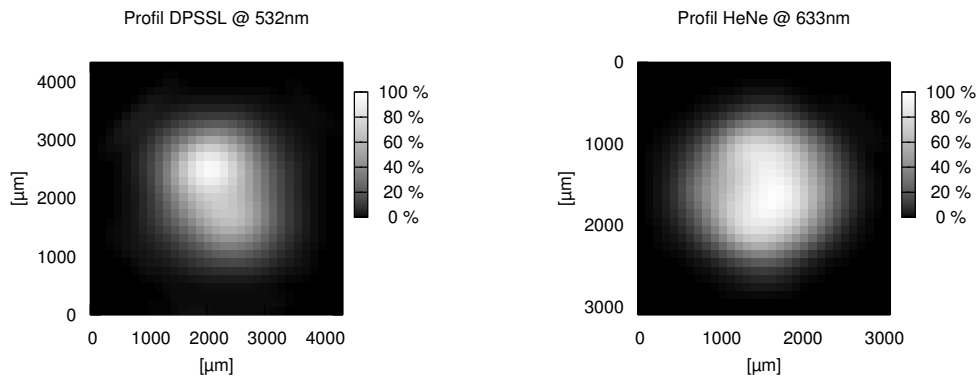


Abbildung 9.7: Zweidimensionale Profilschnitte des DPSSL-Strahls und des Helium-Neon-Laserstrahls.

Kapitel 6.3.

In Kapitel 4.5 wurde beschrieben, dass die Lichttransmission bei der frustrierten Totalreflektion von der Polarisation des Lichtstrahls abhängt. Diese Abhängigkeit ergibt sich zwar durch die Reflektion des evaneszenten Feldes an der zweiten Grenzfläche zwischen Medium 2 und 3, jedoch kann ein Polarisationsseffekt auch bei TIRF nicht von vornherein ausgeschlossen werden. Es wurde daher eine Option realisiert, mit der die Polarisation der beiden Laserstrahlen kontrolliert werden kann. Diese Option ist allgemein auch dann sinnvoll, wenn man eine einfache Möglichkeit sucht, die Leistung der Laserstrahlen zu regulieren. Diese lässt sich durch den Einbau eines weiteren Polarisators leicht realisieren.

Da durch die Faserkopplung auch die Polarisation des Laserstrahl gestört wird beziehungsweise sich durch mechanische Schwingungen in der Faser ständig verändern kann, wird das aus der Faser austretende Laserlicht direkt mit einem polarisierenden Strahlteilerwürfel (44-4422, Ealing Catalog Inc., Rocklin, CA, USA) gefiltert und repolarisiert. Faserende und Strahlteilerwürfel sind gemeinsam in einer Fassung untergebracht, die in ihrer Halterung gedreht werden kann. Die Polarisation des DPSSL-Strahls lässt sich so leicht verändern, ohne dass der Strahl zu sehr dejustiert wird.

Dies trifft auf den Helium-Neon-Laser in dieser Form nicht zu. Er ist zwar mit einer Ausgangspolarisation von 500 : 1 spezifiziert, jedoch müsste zur Drehung der Polarisationsebene der gesamte Laserkopf auf seiner Länge von über einem halben Meter gedreht werden. Daher wird der Laserkopf fest montiert und davor ein drehbarer Polarisationsfilter (374400, Linos Photonics, Göttingen) angebracht.

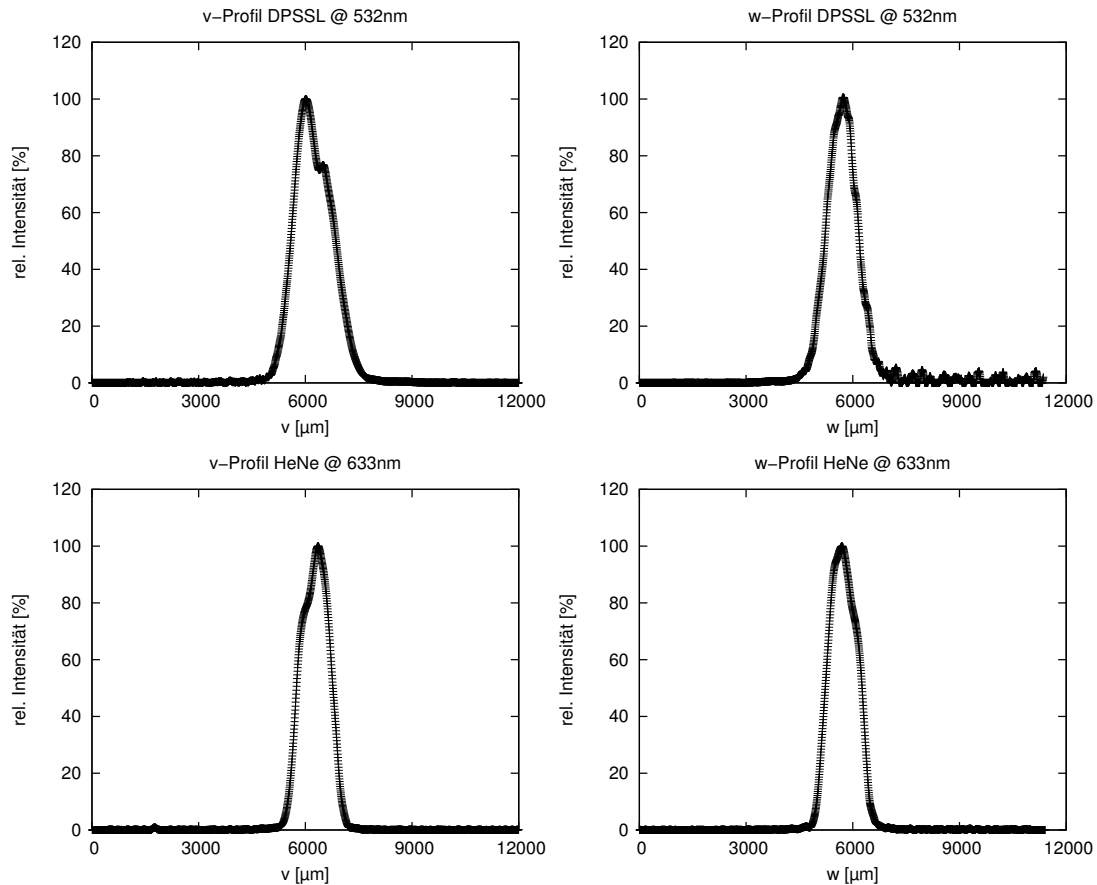


Abbildung 9.8: Eindimensionale Profilschnitte durch den Strahl des DPSSL und des Helium-Neon-Lasers. Im Gegensatz zum Nd:YVO₄-Strahl wurde hier keine Anpassung an ein Gaußprofil vorgenommen.

Durch eine drehbare Halbwellenplatte (374403, Linos Photonics, Göttingen), die im vereinten Strahlengang montiert ist, kann schliesslich jede beliebige Kombination von Polarisationsrichtungen eingestellt werden.

Beide Laserquellen sind im Aufbau höhenverstellbar montiert, zusätzlich kann der DPSSL-Strahl seitlich versetzt werden. Durch einen Justagespiegel und einen dichromatischen Spiegel (43957, Edmund Industrie Optik GmbH, Karlsruhe) werden beide Strahlen zusammengeführt. Abbildung 9.2 zeigt das Transmissionspektrum des dichromatischen Spiegels bei Lichteinfall unter 45°, das mit einem Spektrophotometer (DU-640, Beckman Instruments, Inc., Fullerton, CA, USA) aufgenommen wurde.

Auf die schon oben erwähnte Halbwellenplatte folgt eine Strahlaufweitung in Galilei-Anordnung, die durch eine Konkavlinse der Brennweite $f_1 = -12$ mm und eine Sammellinse der Brennweite $f_2 = 60$ mm realisiert wird. Diese Fünffach-

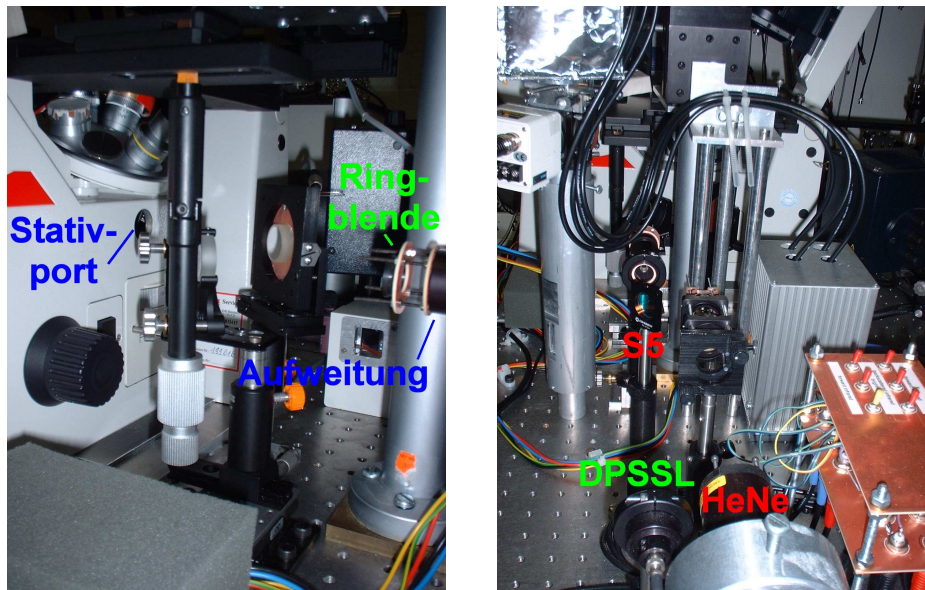


Abbildung 9.9: TIRFM-Modul: Auf den Bildern sind die Laserquellen, der dichromatische Spiegel, die Aufweiteinheit und der Stativport dargestellt.

Aufweitung ist notwendig, damit die nachfolgende Ringblende ausreichend beleuchtet wird. Die Ringblende selbst besitzt einen Durchmesser von etwa 6 mm bei einer Spaltbreite von etwa einem halben Millimeter.

Das entstehende Ringmuster wird über zwei Justagespiegel in den Port des Stativs eingekoppelt, an dem auch die Non-Descanned-Rückreflektionsdetektoren befestigt sind. Zunächst wurde versucht, die Einkopplung so zu realisieren, dass die Detektionseinheit montiert bleiben kann. Dies wird allerdings dadurch sehr erschwert, dass sich im Detektionsstrahlengang zusätzliche Linsen befinden, deren Wirkung auf die TIRFM-Strahlen nur schwer korrigierbar war. In den weiter unten beschriebenen Testmessungen wurde die Detektionseinheit daher einfach entfernt. Allerdings soll hier weiter an einer technisch zufriedenstellenden Lösung gearbeitet werden.

Da das TIRFM-Modul möglichst mit den anderen Modulen — soweit sinnvoll — parallel nutzbar sein sollte, wurden, um das Ringmuster schliesslich in das Objektiv einzukoppeln, am Fluoreszenzfilterrad zwei Modifikationen vorgenommen. Zum einen wurde ein Filtereinsatz gebaut, in dem eine 50:50-Strahlteilerplatte (45316, Edmund Industrie Optik GmbH, Karlsruhe) eingeklebt wurde. Dieses Element ermöglicht zum Beispiel die gemeinsame Nutzung von TIRFM-Modul und konfokaler Scaneinheit. Die Testmessungen in Kapitel 9.2 sind in diesem Modus aufgezeichnet worden.

Als Alternative dazu wurde ein Ersatz für den Filtersatzhalter gebaut, mit

dem die fertigen Filtersätze um 90° verdreht in das Filtrerrad eingebaut werden können. In dieser Konfiguration kann das mit dem TIRF-Licht angeregte Fluoreszenzlicht zum Beispiel mit der ICCD-Kamera am Trinokularkopf aufgezeichnet werden. Die Abbildung 9.3 zeigt die gerade beschriebenen Modifikationen.

Die Laserquellen wurden, ähnlich dem Nd:YVO₄-Laser der optischen Pinzette, vergleiche Kapitel 7.2, zunächst Stabilitätstests unterzogen, die wiederum mit dem Profilmessgerät (BeamMaster BM-7, Coherent, Inc., Santa Clara, CA, USA) durchgeführt wurden. Im Gegensatz zu den Messungen mit dem Nd:YVO₄ fand der ND-9-Filter hier keine Verwendung, so dass die gemessenen Leistungsdaten auch absolut interpretierbar sind.

Die Abbildung 9.4 zeigt die Daten des Leistungsstabilitätstests. Nach einer Vorlaufzeit von etwa 15 Minuten wurde die Leistung in 15-Sekunden-Intervallen über jeweils eine Stunde hinweg aufgezeichnet. Das Profilmessgerät wurde dabei und bei den folgenden Tests vor der Halbwellenplatte montiert.

Der DPSSL-Strahl lieferte eine Leistung von $5,68 \pm 0,13$ mW, der Helium-Neon-Laserstrahl $9,66 \pm 0,09$ mW, was einem unkritischen Rauschpegel von 2,3% beziehungsweise 0,9% entspricht. Auffallend ist jedoch beim DPSSL das langsame Absinken, das durch einen recht abrupten Anstieg beendet wird. Dieser Effekt kann dadurch erklärt werden, dass sich der Laser zu Beginn erwärmt und dabei in der Leistung abfällt. An einem gewissen Punkt springt der Lüfter an und die Leistungsfähigkeit wird wiederhergestellt.

Weitere Testmessungen betrafen die Positionsstabilität, Abbildung 9.5, und die Profilstabilität, Abbildung 9.6. Als Standardabweichung der Positionsdaten erhielt man im Fall des DPSSL $3,03 \mu\text{m}$ in horizontaler und $1,82 \mu\text{m}$ in vertikaler Richtung. Die gleiche Messung beim Helium-Neon-Laser ergab $5,07 \mu\text{m}$ beziehungsweise $3,34 \mu\text{m}$. Diese Positionsgenauigkeit ist absolut zufriedenstellend, vor allem im Hinblick auf die Fasereinkopplung des DPSSL.

Bei der Messung der Profiltbreiten wurde der doppelte Abstand zwischen zentralem Maximum und demjenigen Ort gemessen, an dem die Leistung auf 13,5% abgefallen war. Als Profiltbreiten des DPSSL wurden $(2073,0 \pm 17,9) \mu\text{m}$ in v -Richtung, das heißt entlang der ersten Winkelhalbierenden, und $(1713,8 \pm 20,9) \mu\text{m}$ in w -Richtung, der zweiten Winkelhalbierenden, gemessen. Die entsprechenden Werte für den Helium-Neon-Laser waren $(1492,0 \pm 6,6) \mu\text{m}$ und $(1483,3 \pm 7,1) \mu\text{m}$. Da die relativen Abweichungen maximal um ein Prozent liegen, kann davon ausgegangen werden, dass die Profile sich nicht wesentlich ändern. Dies ist wichtig im Hinblick darauf, dass eine Veränderung der Randbereiche der Strahlen sich in dem nachfolgend erzeugten Ringmuster besonders niederschlagen würde.

Abschliessend sind zur Dokumentation die zweidimensionalen Profile und die

Profilschnitte dargestellt, Abbildungen 9.7 und 9.8. Auffällig ist, dass das Profil des DPSSL eine ausgesprochene Asymmetrie besitzt. Dies ist vermutlich der Faserkopplung geschuldet. Auch das Profil des Helium-Neon-Lasers weist eine gewisse Abweichung von der Rotationssymmetrie auf. Dies wird ebenfalls in den Profilschnitten deutlich. Allerdings besitzt die Profilgüte hier keinesfalls die Bedeutung, die ihr bei der optischen Pinzette zukommt, so dass sich hieraus keine Probleme ergeben dürften. Entsprechend wurde an den Profilschnitten auch keine Anpassung an eine Gaußprofilfunktion vorgenommen.

In Figur 9.9 sind abschließend zwei Photographien mit den wesentlichen Bauteilen des TIRFM-Moduls abgebildet.

9.2 Testmessungen

Der Test des TIRF-Moduls sollte zwei Ergebnisse hervorbringen: Zum einen sollte es möglich sein, mit der oben beschriebenen Einkopplung prinzipiell Fluoreszenz im Kammervolumen anzuregen und diese zu detektieren. Weiter sollte sich herausstellen, dass das angeregte Volumen in axialer Richtung begrenzt oder zumindest ein deutlicher Intensitätsabfall festzustellen ist.

Um zu testen, ob mit der Einkopplung des TIRFM-Moduls Fluoreszenz ausgelöst werden kann, wurde die Strahlaufweitung und die Ringblende entfernt und der Laserstrahl zentral in die rückseitige Apertur des Objektivs eingekoppelt. In das Filterradd wurde dabei der in Kapitel 9.1 beschriebene Strahlteilereinsatz eingebaut, damit das Mikroskopsystem im konfokalen Modus betrieben werden konnte.

Für den Fluoreszenztest stand der Farbstoff *5-TAMRA* (C300, Molecular Probes, Inc., Eugene, OR, USA) zur Verfügung. Bei diesem Farbstoff handelt es sich um einen Rhodaminfarbstoff, dessen Anregungsspektrum ein Maximum bei Licht der Wellenlänge 520-550 nm besitzt, vergleiche dazu die Darstellung des Spektrums in Abbildung 10.1(a). Daher sollte dieser Farbstoff mit dem DPSSL-Strahl (Wellenlänge $\lambda = 532$ nm) prinzipiell anregbar sein. In das Testkammervolumen zwischen Objektträger und Deckglas — Höhe etwa $100 \mu\text{m}$, Breite und Länge einige Millimeter — wurde eine 10 mikromolare, wässrige Lösung des Farbstoffs eingefüllt, die zusätzlich etwa 0,4 Volumen-% Methanol enthielt, um die Löslichkeit des Farbstoffs zu verbessern.

Die Fluoreszenz des Farbstoffs wurde mit dem Konfokalmodul im Wellenlängenbereich von $\lambda = 563$ -622 nm detektiert. Dabei war der Pinholedurchmesser auf $0,182 \mu\text{m}$, die Spannung des PMT auf etwa 580 V und der softwareseitige Zoom auf 4 eingestellt. Um die z -Diskriminierung zu erhöhen, und weil ausreichend Signalintensität vorhanden war, wurde zusätzlich die sechsfache

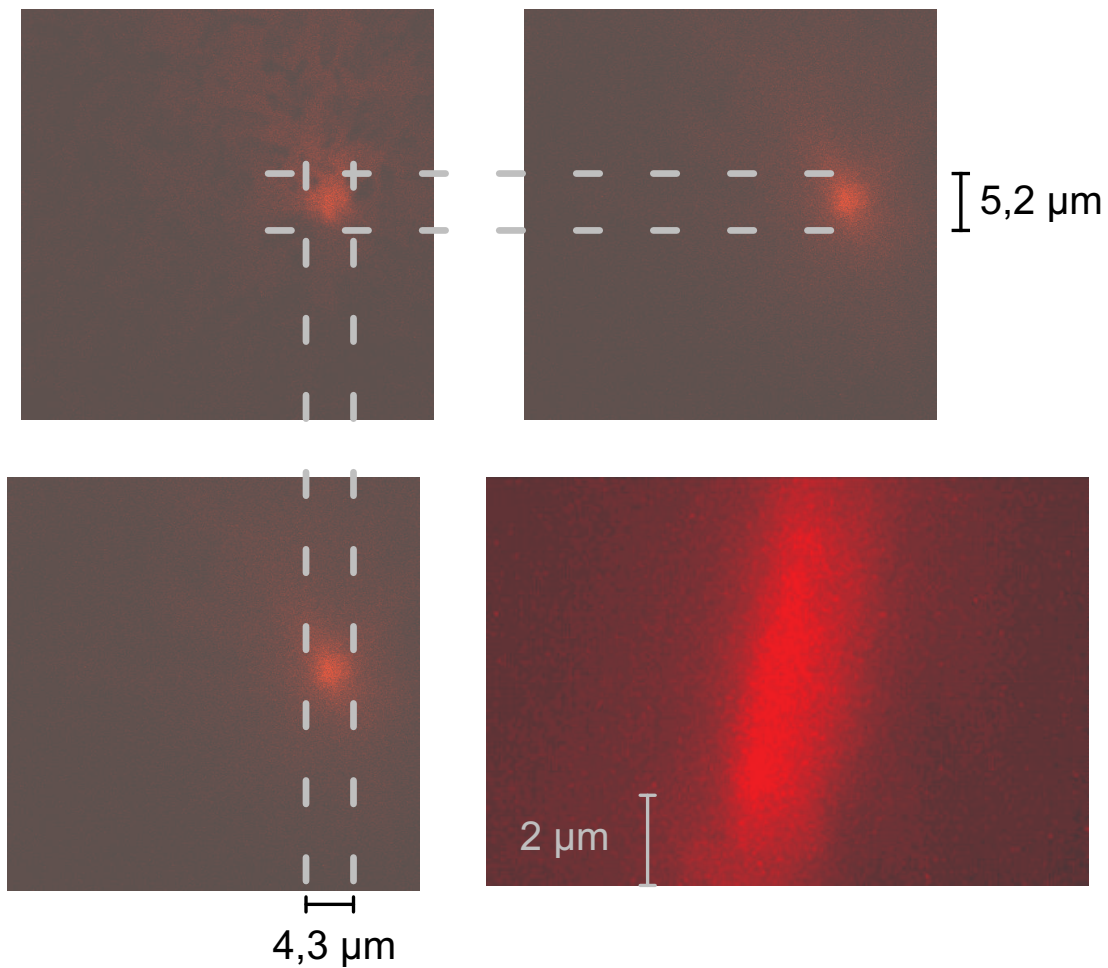


Abbildung 9.10: 5-TAMRA-Fluoreszenzsignal bei zentraler Einkopplung des nicht aufgeweiteten DPSSL-Strahls: Links oben ein Schnitt bei einer relativen z -Position von $1,3 \mu\text{m}$, rechts oben und links unten ein Schnitt bei $z = 9,2 \mu\text{m}$. Man erkennt, dass sich der Durchmesser des Fluoreszenzflecks kaum verändert, der Laserstrahl verläuft geradlinig durch das Kammervolumen. Dies ist auch aus der Seitenansicht des Bildstapels ersichtlich, die rechts unten dargestellt ist.

Strahlaufweitung eingeschaltet. In dieser Konfiguration wurde ein z -Tisch-Scan mit 124 Schnitten bei feststehendem Objektiv durchgeführt. Das Voxelvolumen betrug etwa $0,073 \mu\text{m} \times 0,073 \mu\text{m} \times 0,086 \mu\text{m}$, das gescannte Volumen damit etwa $37,5 \mu\text{m} \times 37,5 \mu\text{m} \times 10,6 \mu\text{m}$. Wie oben erwähnt, wurden diese Messungen mit dem der 50:50-Strahlteilerplatte (45316, Edmund Industrie Optik GmbH, Karlsruhe) als Fluoreszenzfilterradeinsatz durchgeführt. Der dichromatische Spiegel „S4“ wurde auch hier *nicht* entfernt.

Abbildung 9.10 zeigt zwei Schnitte dieses 3D-Bildstapels, einen in Deck-

glasnähe und einen etwa $8\ \mu\text{m}$ davon entfernten. Man erkennt, dass der DPSSL-Strahl Fluoreszenzlicht anregt und sich der Durchmesser des Fluoreszenzflecks in axialer Richtung kaum verändert. Der Laserstrahl verläuft anscheinend tatsächlich geradlinig durch das Kammervolumen und hinterläßt einen Fluoreszenzlichtzylinder. Eine Seitenansicht dieses Zylinders ist im rechten unteren Panel der Abbildung dargestellt. Dieser Zylinder ist etwas zur Seite geneigt, was aber auf die Lasereinkopplung selbst zurückgeführt werden kann.

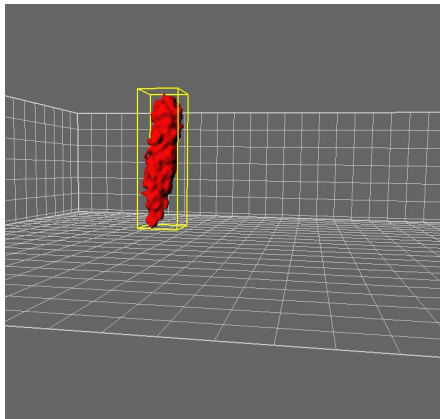


Abbildung 9.11: 5-TAMRA-Fluoreszenzsignal bei zentraler Einkopplung des nicht aufgeweiteten DPSSL-Strahls: Die Abbildung zeigt eine dreidimensionale Rekonstruktion des entstehenden Fluoreszenzlichtzylinders.

Die Unebenheiten in der Zylinderoberfläche sind vermutlich auf mechanische Störungen zurückzuführen.

Um zu testen, ob mit dem TIRFM-Modul eine Anregung über ein evaneszentes Feld realisierbar ist, wurde die Aufweitung und die Ringblende wieder in den Strahlengang des DPSSL-Strahls montiert. Die Testkammer mit der Farbstofflösung blieb unverändert.

Wiederum wurde ein z -Bildstapel mit dem Konfokalmodul aufgezeichnet. Zur Optimierung des Signal-zu-Rauschverhältnisses wurde der Detektionswellenbereich auf $\lambda = 570\text{-}629\ \text{nm}$ und die PMT-Spannung auf etwa $760\ \text{V}$ eingestellt und die Sechsfach-Strahlauflösung abgeschaltet. Der Pinhole-Durchmesser blieb unverändert bei $0,182\ \mu\text{m}$, der Zoomfaktor bei 4. Der Bildstapel umfasste wieder 124 Bilder, deren Gesamtvolumen hier allerdings etwa $37,5\ \mu\text{m} \times 37,5\ \mu\text{m} \times 14,8\ \mu\text{m}$ einschloss. Die Vergrößerung des Volumens in z -Richtung wurde vorgenommen, da hier während der Messung die Deckglasgrenze nicht

Abbildung 9.11 zeigt eine dreidimensionale Rekonstruktion des Bildstapels, die mit der Imaris-Software (Imagic Bildverarbeitung AG, Glattbrugg, Schweiz) erstellt wurde. Dabei berechnete die Software eine Isograuwert-Oberfläche aus den vorhandenen 125 Schnitten. Am unteren Ende des Zylinders erkennt man eine Verjüngung, die darauf zurückzuführen ist, dass hier die Scanebene noch ganz oder teilweise im Deckgläschen liegt, wo natürlich keine Fluoreszenzanregung möglich ist. Entsprechend ist das Fluoreszenzsignal in diesen Ebenen geringer, die Isograuwertfläche verjüngt sich in Richtung der Strahlachse. Die Un-

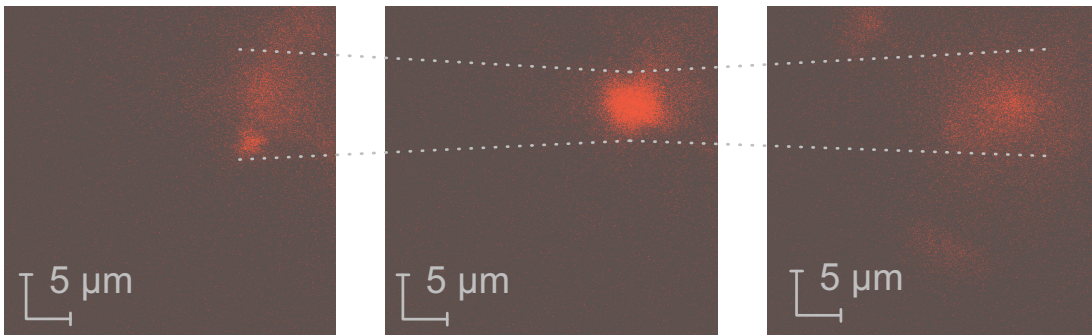


Abbildung 9.12: 5-TAMRA-Fluoreszenzsignal bei Einkopplung des aufgeweiteten DPSSL-Strahls über die Ringblende: Links ein Schnitt bei einer relativen z -Position von $\approx 12,0 \mu\text{m}$, in der Mitte ein Schnitt bei $z \approx 18,0 \mu\text{m}$, rechts bei $z \approx 24,0 \mu\text{m}$. Man erkennt die Zu- und Wiederabnahme der Intensität und, umgekehrt, der Abnahme und Wiederzunahme des Radius des Fluoreszenzflecks.

so leicht per Augenschein festzulegen war, der interessante Messbereich aber auf jeden Fall abgedeckt sein sollte. Die Voxelgröße betrug entsprechend etwa $0,073 \mu\text{m} \times 0,073 \mu\text{m} \times 0,12 \mu\text{m}$.

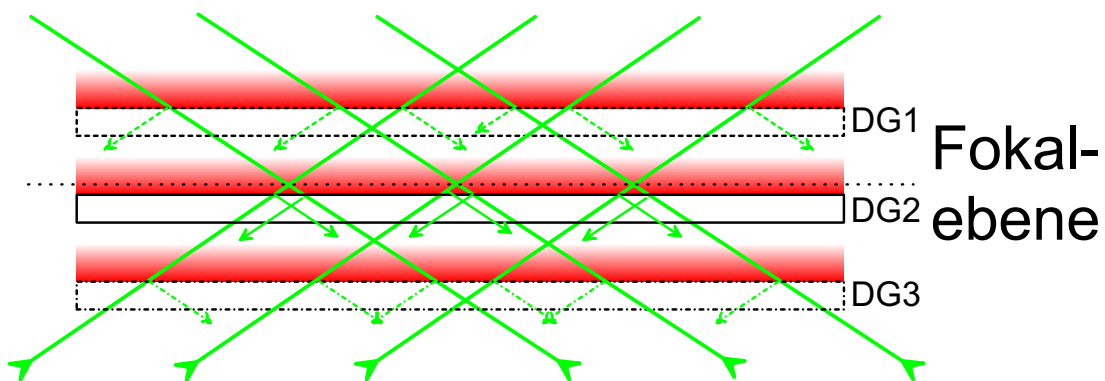


Abbildung 9.13: Signalentstehung im z -Scan bei vorhandener oder nicht vorhandener Totalreflektion. Details siehe Text.

Abbildung 9.12 zeigt drei Schnitte dieses Bildstapels, die axial jeweils etwa $6 \mu\text{m}$ auseinander liegen. Man erkennt, dass die Zentralintensität zu- und wieder abnimmt und dass der Radius des Fluoreszenzflecks ab- und wieder zunimmt. Dies ist ein deutlicher Hinweis, dass hier, zumindest teilweise, ein Totalreflektionseffekt wirksam ist. Ich versuche, dies anhand Abbildung 9.13 zu erläutern.

In der genannten Abbildung sind zunächst schematisch die Strahlen des Laserlichts dargestellt, die, von den Randbereichen kommend, in die Fokalebene fokussiert werden und dort einen Fokalfleck bilden. Es ist wichtig, dass Licht,

das mit der Konfokaleinheit detektiert wird, seinen Ursprung immer in einem Volumen um diese Ebene hat. DG1 bis DG3 kennzeichnen drei Positionen des Deckgläschens während der Aufnahme eines z -Stapels und die kleineren Pfeile deuten die Totalreflektion der einzelnen Lichtstrahlen an.

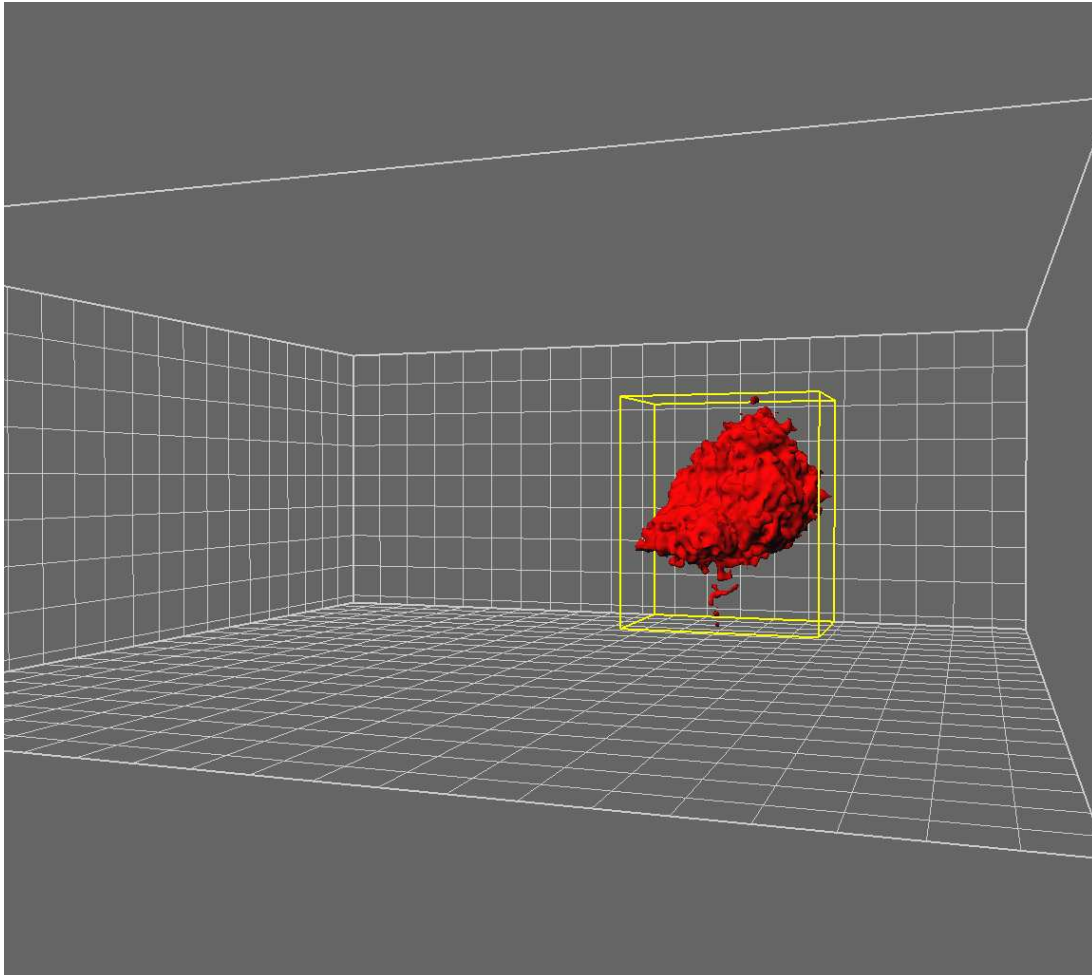


Abbildung 9.14: 5-TAMRA-Fluoreszenzsignal bei Einkopplung des aufgeweiteten DPSSL-Strahls über die Ringblende: Die Abbildung zeigt eine dreidimensionale Rekonstruktion des in dieser Konfiguration aufgezeichneten z -Stapels.

Zunächst nehme man an, es würde an der Grenzfläche zwischen Deckgläschen und wässriger Farbstofflösung zu *keiner* Totalreflektion kommen. Dann müsste das Konfokalm modul in den Stellungen DG2 und DG3 im wesentlichen das gleiche Signal detektieren. In Stellung DG1 dagegen wäre eine Verbreiterung des Lichtflecks bei gleichzeitigem Absinken der Zentralintensität sichtbar. Diese Situation wäre sehr ähnlich zu der oben beschriebenen bei zentraler Strahleinkopplung.

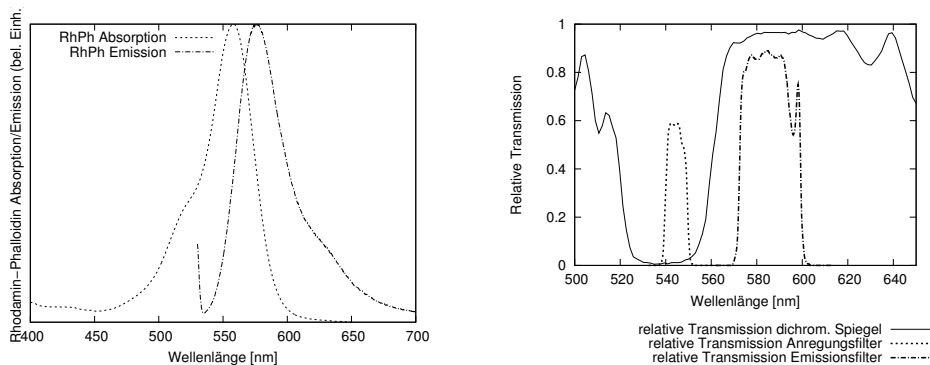
Werden die Lichtstrahlen dagegen an der Grenzfläche reflektiert, entsteht das Signal in der Stellung DG3 durch die Beleuchtung des Farbstoffs im evaneszenten Feld. Die laterale Ausdehnung des Fluoreszenzflecks wächst und die Zentralintensität sinkt ab. Die Verhältnisse in der Stellung DG1 sind symmetrisch zu denen in DG3, theoretisch sollte das gleiche Signal gemessen werden. In der Praxis treten aber sicherlich noch Streulichteffekte hinzu. Man erhält dann zwar die oben beschriebene und gezeigte Ab- und Wiederzunahme des Fluoreszenzfleckradius und die Zu- und Wiederabnahme der Zentralintensität. Die Abhängigkeit von z wird aber eine asymmetrische sein.

Das ist in Abbildung 9.14 zu sehen. Hier wurde wiederum eine 3D-Rekonstruktion des Bildstapels vorgenommen und eine Grauwert-Isofläche berechnet. Vor allem der rechte Rand des entstehenden 3D-Körpers weist auf die genannte Zu- und Abnahme der Zentralintensität hin. Die „Zacke“ im linken Rand ist wohl Streulichteffekten oder wieder einer nicht perfekten Einkopplung des Strahls geschuldet.

Darüber hinaus wurde keine quantitative Analyse des Signals durchgeführt, weil es sich ja bei den Lichtstrahlen real um eine Mischung verschiedener Winkel handelt, so dass das reale evaneszente Feld hier keine einfache Ortsabhängigkeit nach Gleichung (4.26) aufweisen dürfte. Weiterhin wurde keine Polarisationsabhängigkeit des Signals erwartet, da die hier verwendete Anordnung eine rotationssymmetrische Geometrie besitzt.

Kapitel 10

In-vitro Motilitätsassay



(a) Absorptions- und Emissionsspektrum des Farbstoffs Rhodamin-Phalloidin (R-415, Molecular Probes, Eugene, OR, USA). Die Grafik wurde mit Daten des Herstellers erstellt.

(b) Transmissionspektren der Filteratzoptiken für Rhodamin-Phalloidin-Fluoreszenz. Die Grafik wurde mit Daten des Herstellers, Omega Optical Inc., Brattleboro, VT, USA, erstellt.

Abbildung 10.1: Rhodamin-Phalloidin-Fluoreszenz

Eine der ersten Anwendungen, die wir mit dem CMLTT-System durchgeführt haben, ist das *in-vitro*-Motilitätsassay. Dieses Assay ist von zentraler Bedeutung für funktionelle Tests an Motorproteinen. Es wurde zuerst von S.J. Kron und J.A. Spudich sowie von Y. Harada und Mitarbeitern erarbeitet [KRON und SPUDICH 1986, HARADA et al. 1987] und später um die Kalziumregulation des Troponin-Tropomyosin-Komplexes erweitert [HOMSHER et al. 1996, GORDON et al. 1997].

Das Assay wird wie folgt durchgeführt [OBER, VOGEL et al.]: Ein Objekträger und ein Deckgläschen werden mit doppelseitigem Klebeband zu einer Messkammer verbunden, so dass der Innenraum eine Höhe von etwa $100\ \mu\text{m}$ besitzt, das

Kammervolumen beträgt etwa $10\ \mu\text{l}$. Das Deckgläschen wird zuvor mit Nitrozellulose (Wolff Cellulosics, Walsrode) bedeckt.

Myosin oder HMM, der funktionelle Teil des Myosins mit den Regionen S1 und S2, vergleiche Kapitel 2.2.1, wird nach Margossian und Lowey [MARGOSSIAN und LOWEY 1982] beziehungsweise Kron et al. [KRON et al. 1991] aus der Skelettmuskulatur von Hasen hergestellt. Aus demselben Präparat wird F- und g-Actin nach Pardee und Spudich extrahiert [PARDEE und SPUDICH 1982] und ein Teil mit dem Fluoreszenzfarbstoff Rhodamin-Phalloidin (R-415, Molecular Probes, Eugene, OR, USA) gefärbt. Das Anregungs- und das Emissionsspektrum dieses Farbstoffs ist in Abbildung 10.1(a) dargestellt.

Troponin wird nach der Methode von Potter [POTTER 1982], Tropomyosin nach der von Smillie [SMILLIE 1982] hergestellt. Der Aktin-Troponin-Tropomyosin-Komplex wird durch Mischung von Aktin, Troponin und Tropomyosin in Pufferlösung rekombiniert.

Die in einem vorangegangenen Schritt erzeugte Lösung mit Myosin oder HMM wird dann in die Messkammer eingespült, wobei die Myosinmoleküle teilweise an der Nitrozelluloseschicht haften bleiben. Danach wird eine Lösung mit hochfragmentiertem, ungefärbtem Aktin hinzugefügt, gefolgt von einer ATP-haltigen Lösung. Danach wird noch zweimal mit einer Pufferlösung nachgespült. Der Zweck dieser Prozedur liegt darin, zunächst alle Myosinbindungsstellen mit Aktin abzudecken (Rigorzustand) und diese Bindung mit ATP wieder zu lösen. Die Rigorbindung nicht funktioneller Myosinmoleküle bleibt dabei bestehen, diese Moleküle können das Assay im weiteren Versuchsverlauf nicht mehr stören.

Die Lösung mit dem gefärbten Aktin (mit und ohne Troponin-Tropomyosin-Komplex, je nach Fragestellung) wird nun in die Messkammer gegeben und das Aktin bindet an der Myosin-dekorierten Deckglasoberfläche. Zum Abfangen von Sauerstoffradikalen, die den Fluoreszenzfarbstoff bleichen könnten, werden Glukose und Enzyme wie Glukoseoxidase und Katalase hinzugegeben. Zusätzliche Methylzellulose verhindert, dass die Aktinfilamente, wenn sie sich von den Myosinköpfen lösen, in das Lösungsvolumen hineingetrieben werden [UYEDA et al. 1990].

Die so vorbereitete Messkammer wird auf das Mikroskop gelegt, wobei das Leica HCX PL APO 100x-Objektiv mit der numerischen Apertur von 1,4 verwendet wird. Da das Motilitätsassay in späteren Studien zusammen mit der optischen Pinzette und dem stationären Multiphotonmodul verwendet werden soll, vergleiche Kapitel 7 und 8, wurde der dichromatische Spiegel „S4“ *nicht* entfernt.

Mit Hilfe einer Objektivheizung wird die Messkammer konstant auf eine Temperatur von etwa 30°C gehalten. Die Probe wird mit der Quecksilberdampfampe beleuchtet — vergleiche deren Spektrum in Abbildung 6.3 —, wobei zuvor ein

passender Filtersatz, bestehend aus Anregungsfilter (XF1020/546DF10), Emissionsfilter (XF3022/580DF30) und dichromatischem Spiegel (XF2062/555DRLP, alle Omega Optical Inc., Brattleboro, VT, USA), in das Filterradd eingesetzt wurde. Die Transmissionsspektren dieser Filtersatzoptiken sind in Abbildung 10.1(b) dargestellt.

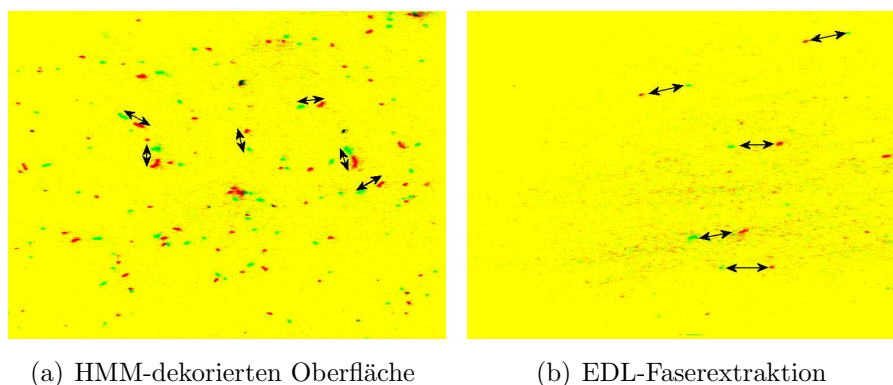


Abbildung 10.2: Fluoreszenzmarkierte Aktinfilamente im *in-vitro*-Motilitätsassay: Zur Darstellung der Bewegung wurden jeder Videosequenz je zwei Bilder im zeitlichen Abstand von 1 s entnommen. Der Grauwertkontrast wurde aus Darstellungsgründen erhöht, die Bilder invertiert und zu einem Farbbild zusammengesetzt. Das erste Bild diente dabei als Quelle für den Rot-Kanal, das zweite für den Grün-Kanal. Gelbe Bereiche sind somit zeitlich konstante Bereiche. Zur Verdeutlichung sind mit Pfeilen die Bewegungen einiger Filamente eingezeichnet. Der Bildausschnitt hat eine Größe von $\approx 127 \times 100 \mu\text{m}^2$.

Sind die Myosinmoleküle funktionell intakt, muss eine Bewegung der Aktinfilamente über die Myosin-dekorierte Oberfläche zu sehen sein. Das Fluoreszenzlicht der Aktinfilamente wird über eine an den Trinokularkopf montierte ICCD-Kamera (Luminescence Imager, Photonic Science Ltd., Robertsbridge, UK) detektiert und die Videosequenzen auf Band aufgezeichnet. Diese Sequenzen können dann mit einem Framegrabber (Meteor, Matrox Electronic Systems Ltd., Dorval, Kanada) digitalisiert und abgespeichert werden. Abbildung 10.2(a) zeigt zwei solche Fluoreszenzbilder, die im Abstand von einer Sekunde aufgenommen wurden.

Eine bessere bildliche Darstellung der Bewegung gelingt mit einer 3D-Rekonstruktion, die mit der Imaris-Software (Imagic Bildverarbeitung AG, Glattbrugg, Schweiz) durchgeführt wurde. Dieses Verfahren wird eigentlich auf *xyz*-Bildstapel angewandt, die mit Konfokal- oder Multiphotonenmikroskopie gewonnen werden, um eine dreidimensionale Objektdarstellung zu erhalten. Man kann aber auch die zeitliche Koordinate als räumliche *z*-Koordinate interpretieren und dasselbe Verfahren auf *xyt*-Sequenzen anwenden.

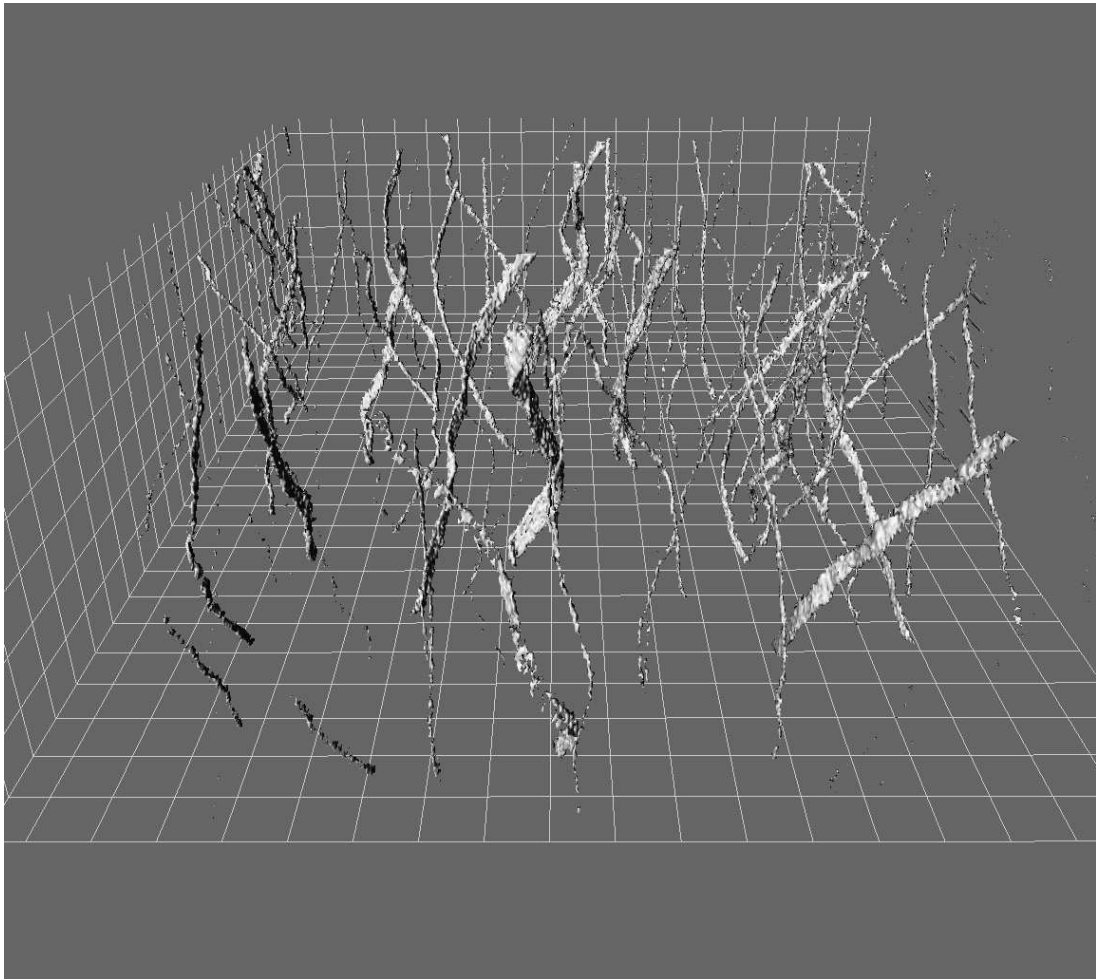


Abbildung 10.3: 3D-Rekonstruktion einer Bildsequenz von fluoreszenzmarkierten Aktinfilamenten im *in-vitro*-Motilitätsassay, die auf einer HMM-dekorierten Oberfläche entlanglaufen: Man erkennt die nichtorientierte Bewegung der Filamente an der Richtung und Neigung der bandartigen Objekte.

Abbildung 10.3 zeigt eine solche Rekonstruktion anhand der Sequenz, aus der die Bilder in Abbildung 10.2(a) stammen. Die sich bewegenden Aktinfilamente werden durch Berechnung einer Isograuwert-Oberfläche zu bandartigen Objekten, deren Achse die Bewegungsrichtung angibt. Die lokale Neigung der Achse gegen die z -Achse ist ein Maß für die Geschwindigkeit der Filamente. Man erkennt an der Abbildung auch, dass sich die Filamente ungerichtet, also ohne Vorzugsrichtung, über die Oberfläche bewegen.

Das *in-vitro* Motilitätsassay ist ein Standard-Funktionalitätstest für Motorprotein-Präparationen. Ein Kritikpunkt ist jedoch, dass die Anordnung der beliebig orientierten Myosinmoleküle auf der Oberfläche mit der physiologischen

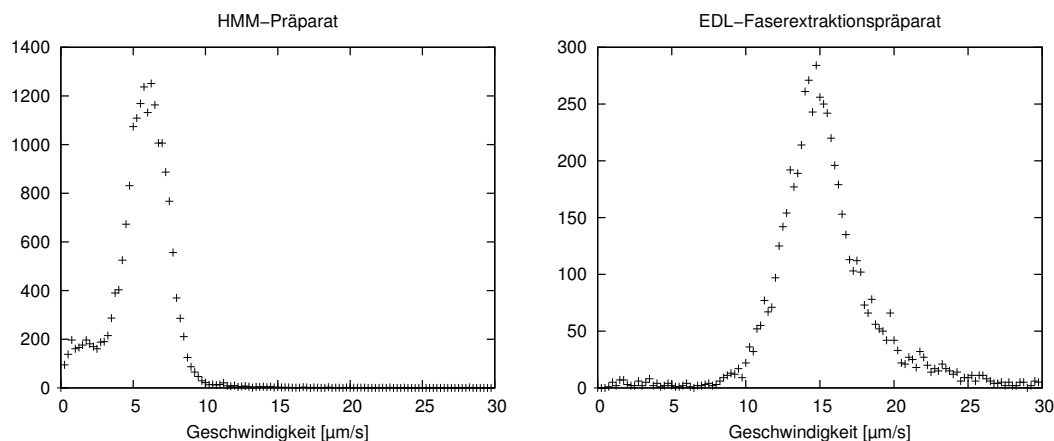


Abbildung 10.4: Geschwindigkeitshistogramme, die aus in Abbildung 10.2(a) und 10.2(b) in Ausschnitten gezeigten Bildsequenzen gewonnen wurde. Dabei kam ein auf dem Strukturtensorverfahren basierender Algorithmus zum Einsatz, siehe Text.

Situation in der Muskelzelle nicht übereinstimmt, wo die Myosinköpfe im dicken Filament ausgerichtet angeordnet sind.

Höök und Mitarbeiter haben aus diesem Grund eine Methode entwickelt, mit der Myosin aus Einzelfasern direkt in die Messkammer hinein extrahiert werden kann [HOOK et al. 1999, HOOK und LARSSON 2000]. Mit diesem Verfahren gelingt es, Myosinmoleküle im Assay ausgerichtet an der Oberfläche zu befestigen. In unserem Labor gelang es, dieses Verfahren zu etablieren und auf EDL-, „extensor digitorum longus“- und Soleus-Muskelfasern aus Mauspräparaten anzuwenden [OBER, VOGEL et al.]. Dieses Myosinpräparat kann zusätzlich mit dem reguliertem Troponin-Tropomyosin-Aktin-Komplex kombiniert werden.

Abbildung 10.2(b) zeigt zwei Bilder einer Sequenz im Abstand von einer Sekunde, die mit einem solchen EDL-Motilitätspräparat gewonnen wurden. Die gerichtete Bewegung der Filamente, die sich in diesem Präparat einstellt, ist besser wiederum in einer 3D-Rekonstruktion zu erkennen. Abbildung 10.5 zeigt eine solche Rekonstruktion, die wiederum mit Hilfe einer Isograuwert-Oberfläche erstellt wurde.

Eine weitere Besonderheit des Faserextraktionspräparats erkennt man, wenn man die Geschwindigkeit der Aktinfilamente ausmisst. Dies führen wir per Computer mit Hilfe eines halbautomatischen Algorithmuses durch, der mit einer Strukturtensor-basierten Orientierungsanalyse arbeitet [UTTENWEILER et al. 2000]. Dabei werden die in den Abbildungen 10.3 und 10.5 gezeigten bandartigen Objekte für je 7 Bilder der Sequenz vom Programm detektiert und die

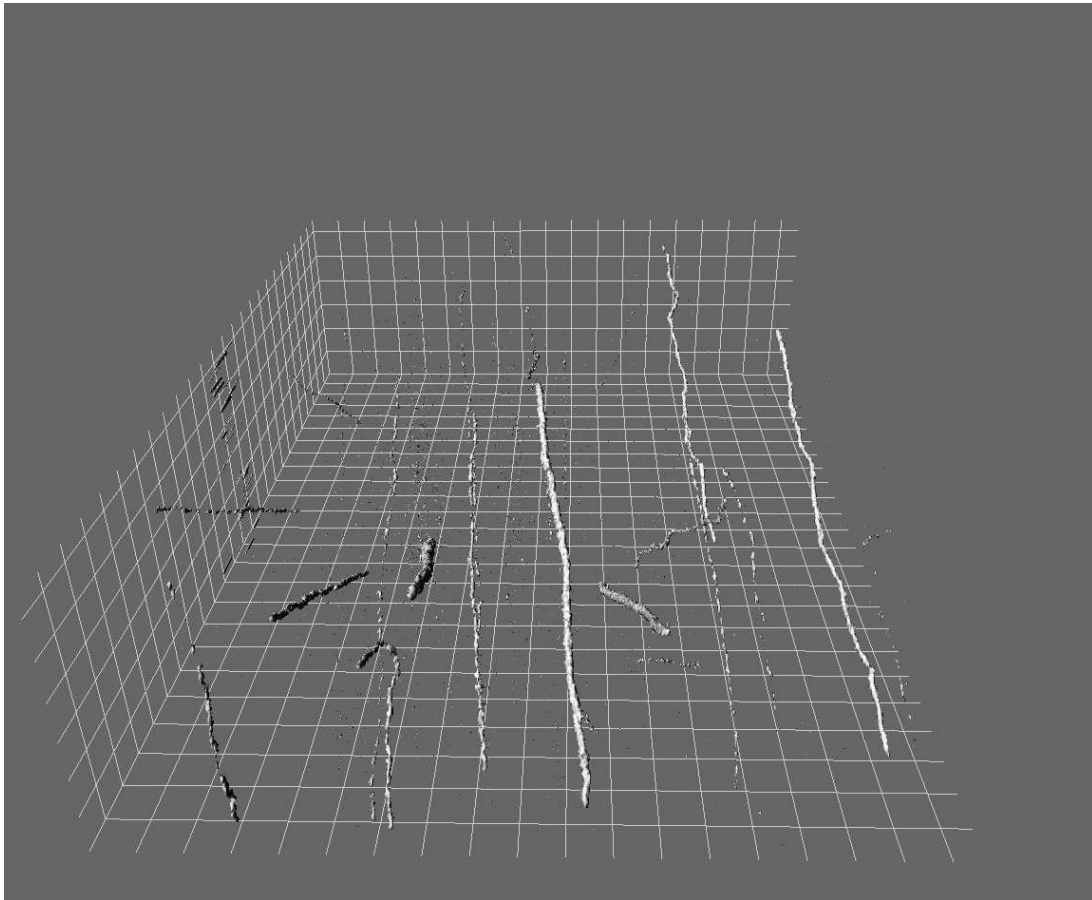


Abbildung 10.5: 3D-Rekonstruktion einer Bildsequenz, die von fluoreszenzmarkierten Aktinfilamenten im *in-vitro*-Motilitätsassay aufgenommen wurde, das mit einer EDL-Faserextraktion hergestellt wurde. Man erkennt hier die im Gegensatz zu Abbildung 10.5 gerichtete Bewegung der Filamente.

Neigung dieser Objekte gegen die Zeitachse ausgemessen.

Die Ergebnisse dieser Auswertung sind Geschwindigkeitshistogramme, die für die hier gezeigten Bildsequenzen in Abbildung 10.4 dargestellt sind. Man sieht, dass die Filamentgeschwindigkeit im Faserextraktionspräparat im Mittel deutlich schneller ist und daher die Situation in der Muskelzelle besser abbildet.

Es soll allerdings nicht unerwähnt bleiben, dass das Programm keine echte Filamentdetektion vornimmt. Die Bilder werden vielmehr in Umgebungen eingeteilt, innerhalb derer dann die Orientierung des optischen Flusses gemessen wird. Bei kurzen Filamenten, die nur einige Pixel umfassen — so wie sie hier vorliegen —, ist das eher unproblematisch. Ein weiterer Nachteil besteht jedoch darin, dass nur Absolutbeträge der Geschwindigkeit gemessen werden. Gerade im

Fall der Faserextraktionspräparate wäre eine Richtungsangabe jedoch wünschenswert. Diese Nachteile sollen in einer nächsten Version des Programms behoben werden [VOGEL, OBER et al.].

Ein weiteres geplantes Projekt sind Messungen zu den molekularen Kräften, die im Motilitätsassay auftreten. Dazu werden mikrometergroße „Beads“, Kügelchen, aus Latex fluoreszenzmarkiert — man verwendet hier sinnvoll den gleichen Farbstoff wie für die Aktinfilamente — und „klebt“ diese Kügelchen über ein speziell modifiziertes Myosin, das sogenannte NEM-Myosin, an die Aktinfilamente. Abbildung 10.6 zeigt ein solches Aktin-Bead-Ensemble. Wenn nun das Aktinfilament mit an-

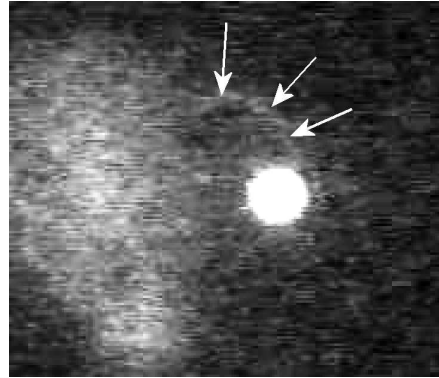


Abbildung 10.6: Fluoreszenzmarkiertes Latexbead (Durchmesser $3\ \mu\text{m}$) mit angeklebtem Aktinfilament (s. Pfeile).

gebundenem Bead über die myosindekorierte Oberfläche läuft, kann das Bead mit der optischen Pinzette festgehalten werden, vergleiche Kapitel 7. Regelt man dann langsam das Kraftfeld der Pinzette herunter, kann sich das Filament dann losreißen, wenn die zwischenmolekulare Kraft zwischen Aktin und den Myosinköpfen größer ist als die Rückhaltekraft der optischen Pinzette.

Kapitel 11

SHG-Messungen

In Kapitel 4.4.2 wurde beschrieben, dass biologische Moleküle wie Collagen oder Myosin in der Lage sind, an eingestreutem Licht eine Frequenzverdopplung vorzunehmen, die sogenannte „second harmonic generation“. In diesem Kapitel beschreibe ich die Messungen von SHG-Signalen, die an Muskelfasern und einzelnen Myofibrillen an der CMLTT-Messapparatur durchgeführt wurden [BOTH, VOGEL et al. 2004]:

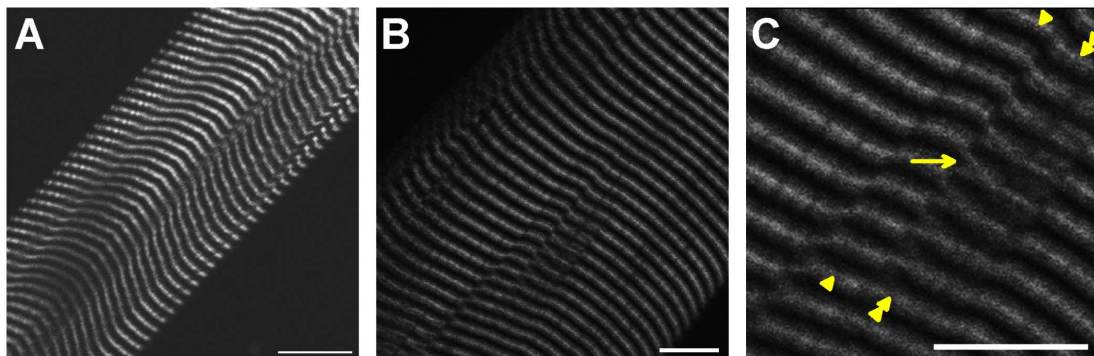


Abbildung 11.1: Intrinsisches SHG-Signal an nicht-fluoreszenzgefärbten Skelettmuskelzellen: In Panel A und B sind zwei Zellen mit unterschiedlichem Durchmesser und Sarkomerlänge dargestellt. Panel C ist eine Vergrößerung von B. Mit den gelben Pfeilen ist eine Versatzstelle, „vernier“, markiert. Skalen: $25 \mu\text{m}$ (A) und $10 \mu\text{m}$ (B+C) [BOTH, VOGEL et al. 2004].

Da sich herausstellte, dass das SHG-Signal von Muskelfasern polarisationsabhängig ist, wurde versucht, die Relation aus Gleichung 4.24 an die Versuchsbedingung anzupassen. Dabei geht man ähnlich wie Freund und Mitarbeiter vor [FREUND et al. 1986]:

Zunächst ergibt sich eine Vereinfachung von $\tilde{\chi}_{e,ijk}^{(2)}$ dadurch, dass die Reihen-

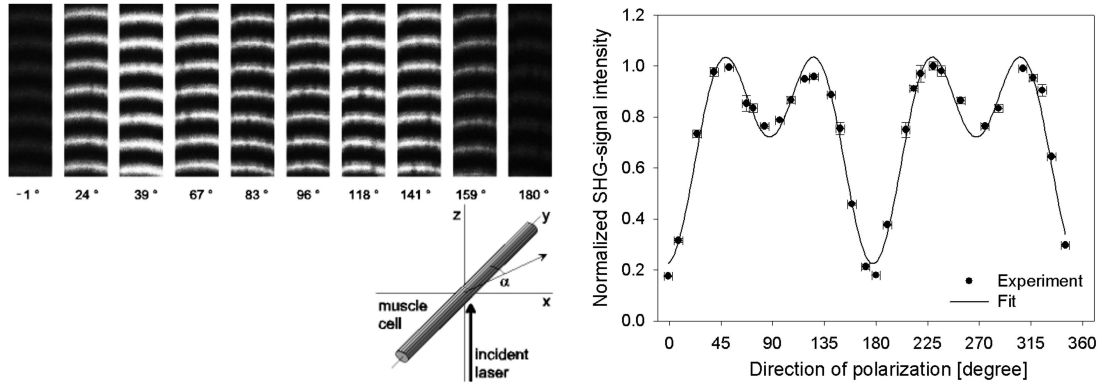


Abbildung 11.2: Polarisationsabhängigkeit des SHG-Signals: Im linken Panel sind jeweils Bilder desselben Präparatausschnitts gezeigt, die unter verschiedenen Polarisationswinkeln aufgenommen wurden. Die Orientierungsverhältnisse ergeben sich aus der Zeichnung darunter. Rechts ist die SHG-Signalintensität in Abhängigkeit des Winkels dargestellt. Diese Daten wurden an die Funktion aus Gleichung 11.2 angepasst; man erhält $\gamma = 0,39$ [BOTH, VOGEL et al. 2004].

folge der Multiplikation mit \tilde{E}_j und \tilde{E}_k vertauschbar ist. Weiterhin erhält man in einem verlustfreien Material, das bedeutet, $\oint \vec{P}^{(2)} d\vec{E} = 0$ bzw. $\vec{\nabla}_{\vec{E}} \times \vec{P}^{(2)} = 0$, die Kleinmansche Symmetrieregeln [KLEINMAN 1962], nach der die ersten beiden Indizes von $\tilde{\chi}_{e,ijk}^{(2)}$ vertauschbar sind. Nimmt man weiter an, dass die Muskelfaser zylindersymmetrisch in y -Richtung liegt, reduziert sich Gleichung 4.24 insgesamt auf

$$\tilde{P}^{(2)} = \tilde{\chi}_{e,yyy}^{(2)} \left(\vec{E} \cdot \hat{e}_y \right)^2 \hat{e}_y + \tilde{\chi}_{e,yxx}^{(2)} \left(\vec{E} \cdot \hat{e}_x \right)^2 \hat{e}_y + 2\tilde{\chi}_{e,yxx}^{(2)} \left(\vec{E} \cdot \hat{e}_x \right) \left(\vec{E} \cdot \hat{e}_y \right) \hat{e}_x. \quad (11.1)$$

Dabei wurde angenommen, dass das elektromagnetische Licht, also der Laserstrahl, in z -Richtung verläuft. Definiert man das Verhältnis der beiden unabhängigen Elemente $\gamma = \tilde{\chi}_{e,yyy}^{(2)} / \tilde{\chi}_{e,yxx}^{(2)}$ und den Winkel α zwischen der y -, also Faserachse und der Polarisationsrichtung des einfallenden Lichts, ergibt sich die Intensität des gemessenen SHG-Signals zu

$$I_{SHG} \propto \left(\tilde{P}^{(2)} \right)^2 \propto (\sin^2 \alpha + \gamma \cos^2 \alpha)^2 + (\sin 2\alpha)^2. \quad (11.2)$$

Das relative Verhalten des Signals wird durch den γ -Faktor vollständig beschrieben. Er ist eine Eigenschaft des frequenzverdoppelnden Moleküls und kann daher prinzipiell genutzt werden, um verschiedene molekulare Strukturen zu unterscheiden [ROTH und FREUND 1982, OSTROVERKHOV et al. 2001].

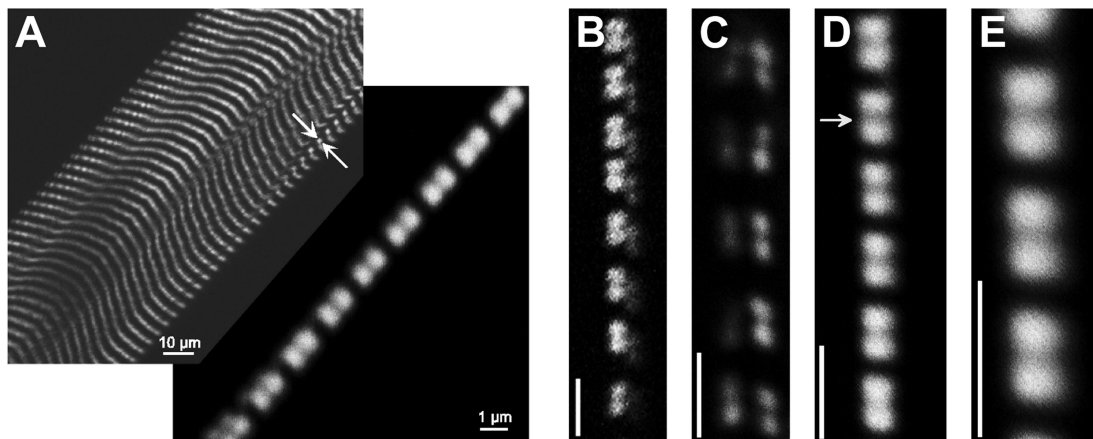


Abbildung 11.3: SHG-Signale von einzelnen isolierten Myofibrillen: Panel A zeigt die Größenverhältnisse einer Myofibrille innerhalb einer Muskelzelle. In den Panelen B bis E sind vier solcher Myofibrillen in unterschiedlicher Vergrößerung dargestellt (Skala jeweils $2,5 \mu\text{m}$). Im Zentrum jedes Signalmaximums kann ein kleiner verdunkelter Streifen ausgemacht werden (Pfeil in Panel D) [BOTH, VOGEL et al. 2004].

Die Messkonfiguration entsprach der in Panel C der Abbildung 4.5. Als Objektiv und Kondensator wurden zwei 63x-Wasserimmersionsobjektive (PL APO 63x/1.20W CORR, Leica, Wetzlar) in einer symmetrischen Konfiguration eingesetzt. Der Titan-Saphir-Laser wurde auf eine Wellenlänge von $\lambda \approx 880 \text{ nm}$ eingestellt, und, da die Messung über das Konfokalm modul erfolgte, die dichromatischen Spiegel „S4“ und „S6“ aus dem Strahlengang entfernt. Passend dazu wurden im Transmissionslichtpfad ein Bandpassfilter ($450 \pm 25 \text{ nm}$) und ein Kurzpassfilter ($\lambda_f \approx 650 \text{ nm}$) eingefügt, um Multiphoton-Autofluoreszenz- und Anregungslicht abzufangen. Die Detektion des SHG-Signals erfolgte mit dem Transmissionsdetektor. Parallel dazu wurde mit einem Descanned-Detektor kontrolliert, ob es sich bei dem gemessenen Signal um SHG oder Zweiphotonenfluoreszenz handelt. Im Falle der Fluoreszenz hätte ein gleichwertiges Signal auch auf dem Descanned-Detektor sichtbar sein müssen.

Mit Hilfe eines Polarisationsfilters und des Strahlprofilmessgeräts (BeamMaster BM-7, Coherent, Inc., Santa Clara, CA, USA) wurde die Durchschnittsleistung an der rückseitigen Apertur des Objektivs gemessen, $P_{avg} \approx 50 - 100 \text{ mW}$, und eine lineare Polarisation des Laserstrahls von mindestens $30 : 1$ festgestellt. Um sicherzugehen, dass verschiedene Scanspiegeleinstellungen die Polarisation nicht verändern, wurde diese Messung mit verschiedenen Scanspiegelorientierungen durchgeführt, aber keine Veränderung festgestellt.

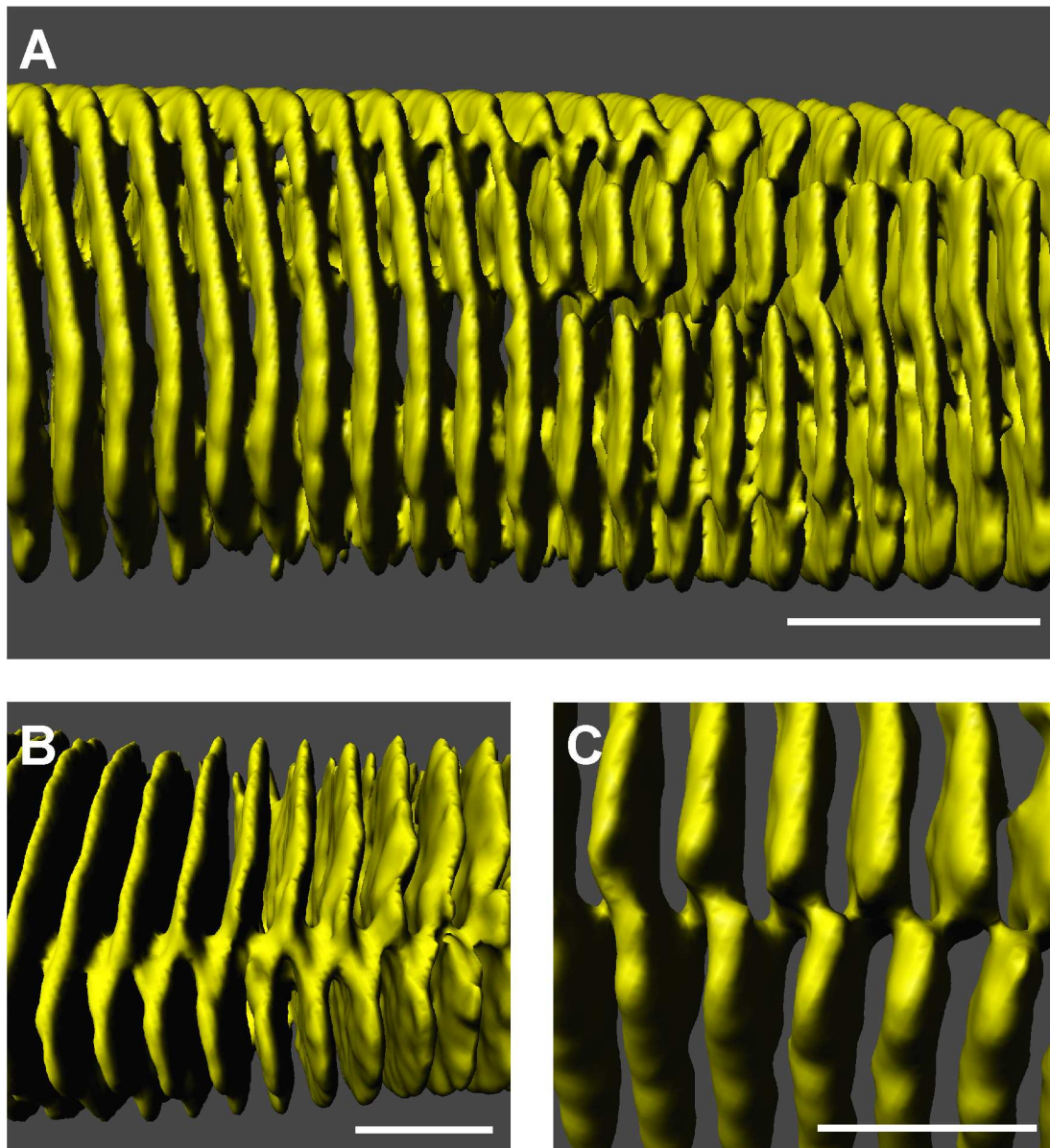


Abbildung 11.4: 3D-Rekonstruktion eines SHG- z -Scans an einer Muskelzelle. Das dargestellte Volumen in Panel A beträgt etwa $120 \times 120 \times 33,5 \mu\text{m}^3$, die Sarkomerlänge etwa $2 \mu\text{m}$. Panel B und C sind Vergrößerungen. Skalen: $10 \mu\text{m}$ (A), $5 \mu\text{m}$ (B+C) [BOTH, VOGEL et al. 2004].

Mit Hilfe von 100 nm -Fluoreszenzbeads (FluoSpheres, Molecular Probes, Eugene, OR, USA) wurde zunächst die Zweiphotonen-Punktabbildungsfunktion („PSF“) des Systems gemessen, wobei hier das Signal sowohl mit dem Transmissionsdetektor wie mit dem Descanned-Detektor des Konfokalmoduls aufgezeichnet

wurde. Die laterale Auflösung ergab sich ohne signifikanten Unterschied zwischen beiden Kanälen zu $(397 \pm 13 \text{ nm})$, die axiale Auflösung zu $(1251 \pm 38 \text{ nm})$. Es kann angenommen werden, dass die PSF für SHG von gleicher Größenordnung ist [MOREAUX et al. 2001].

Abbildung 11.1 zeigt Beispiele für intrinsische SHG-Signale von nicht-fluoreszenzmarkierten Skelettmuskelzellen aus Maus-EDL, „extensor digitorum longus“. Vergleicht man diese Bilder mit der Struktur aus der Zeichnung in Abbildung 2.1, folgt das Signal der Sarkomerstruktur und deren Abstand. Tatsächlich kann durch eine Kolokalisationsanalyse von SHG-Signal und angefärbten Aktinfilamenten gezeigt werden, dass das SHG-Signal von den Myosinfilamenten oder dem Aktomyosinkomplex stammt.

Da das SHG-Signal eine Polarisationsabhängigkeit nach Gleichung 11.2 zeigen sollte, wurde die SHG-Intensität desselben Präparatausschnitts unter verschiedenen Polarisationsrichtungen gemessen. Die Ergebnisse sind in Abbildung 11.2 dargestellt: Tatsächlich erhält man eine Polarisationsabhängigkeit, die an die gerade genannte Funktion angepasst werden kann. Aus dieser Anpassung ergab sich das Verhältnis der beiden unabhängigen $\tilde{\chi}^{(2)}$ -Elemente zu $\gamma = 0,39$.

SHG-Signale können auch bei einzelnen isolierten Myofibrillen gemessen werden. Abbildung 11.3 zeigt einige Beispiele. Interessanterweise kann die oben erwähnte Polarisationsabhängigkeit hier nicht nachvollzogen werden. Das gleiche gilt für die Abhängigkeit des SHG-Signals von der Sarkomerlänge (Daten nicht gezeigt, siehe Both et al. [BOTH, VOGEL et al. 2004]). Eine Begründung für dieses Verhalten steht noch aus.

Als Mehrphotonenprozess besitzt SHG einen intrinsischen Pinhole-Effekt, vergleiche Kapitel 4.4. Entsprechend können mit SHG Bildstapel aufgenommen und dreidimensional rekonstruiert werden. Abbildung 11.4 zeigt ein Beispiel für eine solche Rekonstruktion, das mit der Imaris-Software (Imagic Bildverarbeitung AG, Glattbrugg, Schweiz) erstellt wurde. Das rekonstruierte Volumen betrug hier etwa $120 \times 120 \times 33,5 \mu\text{m}^3$, wobei die 105 Bilder einen z -Abstand von etwa $0,33 \mu\text{m}$ besaßen.

Kapitel 12

Diskussion und Ausblick

12.1 Diskussion

In der vorliegenden Arbeit wurde der Aufbau der CMLTT-Apparatur beschrieben. Diese ist als modulares mikroskopisches Messsystem konzipiert, mit dem verschiedene mikroskopische Techniken kombiniert werden können. Zu diesen Techniken zählen Konfokalmikroskopie, Laserscanningmikroskopie, Epifluoreszenzmikroskopie, TIRFM, optische Pinzette und Photolyse von Käfigmolekülen. Die Herausforderung bei der Implementierung der Apparatur lag darin, dass die einzelnen Module sich möglichst gegenseitig nicht behindern sondern kombiniert einsetzbar sein sollten.

Motivation für eine solche modulare Apparatur waren Fragestellungen aus dem Gebiet der Biophysik muskulärer Zell- und Molekülpräparate. Diese Präparate zeichnen sich gegenüber anderen Zellpräparaten dadurch aus, dass es sich um Präparate mit geordneter Struktur handelt, in denen sich chemische, elektrische und mechanische Vorgänge gegenseitig bedingen. Hieraus ergab sich der Wunsch, mit der Apparatur nicht nur mikroskopische *Beobachtungen* durchzuführen, sondern gezielt mechanisch oder chemisch in das Präparat *eingreifen* zu können.

Die CMLTT-Apparatur wurde um die Komponenten eines Leica TCS-SP2-MP-Mikroskopsystems herum aufgebaut. Solch ein Um- und Ausbau ist natürlich nicht ohne Risiken: Zum einen läuft man immer Gefahr, Geräteteile in der Bauphase zu zerstören. Dies ist zum Glück nicht geschehen, wäre aber rückblickend durchaus im Rahmen des Möglichen gewesen.

Darüber hinaus kann durch einen Umbau die Leistungsfähigkeit eines Teilmoduls herabgesetzt werden. Dies gilt hier insbesondere für die zusätzlichen Optikelemente, die in die Strahlengänge eingebracht werden mussten. Ein weiteres Problem war, dass manche Module kaum oder nicht dokumentiert waren.

Die hier präsentierte Konfiguration einzelner Module entspricht oft nicht der ursprünglichen Planung. Von den Problemen, die sich während des Aufbaus ergaben, möchte ich hier die wichtigsten diskutieren.

Optische Pinzette

Zu Beginn war geplant, die optische Pinzette durch den Port der Quecksilberdampfampe in das Mikroskop einzukoppeln, so dass das Licht der Quecksilberlampe und der Strahl des Nd:YVO₄-Lasers einen gemeinsamen Strahlengang besessen hätten. Es war bekannt, dass sich in diesem Strahlengang eine Linse befindet, so dass eine entsprechende Korrekturoptik berechnet und montiert werden musste. Darüber hinaus wurde die Lampenmontage verändert, so dass dort ein dichromatischer Spiegel eingeklebt werden konnte, der das Lampenlicht und den Laserstrahl zusammenführen sollte. Es stellte sich dann allerdings heraus, dass sich in diesem Strahlengang im Innern des Stativs auch eine Streuscheibe befindet. Da die optische Pinzette wesentlich von der Qualität des Laserstrahlprofils abhängt, kam eine Verwendung dieses Strahlengangs nicht mehr in Betracht.

Als Alternative kam dann die jetzt realisierte Konfiguration in Betracht, in der der Spiegel direkt unterhalb des Objektivs montiert wird. Der Spiegel sollte dabei auf jeden Fall so eingebaut werden, dass er jederzeit wieder entfernt werden kann. Dies wurde in einem ersten Anlauf so realisiert, dass der Spiegel am Ende einer zweizinkigen Gabelkonstruktion montiert wurde. Diese Konstruktion wiederum war über einen kleinen Verschiebetisch am Objektisch befestigt (vergleiche hierzu Abbildung 7.14). Der Abstand der beiden Gabelzinken entsprach dem Durchmesser des Spiegels (etwa 12 mm).

Mit dieser Konstruktion gelang es, den Laser in das Objektiv einzukoppeln und einen gewissen Pinzetteneffekt zu erzielen: Die Objekte wurden lateral angezogen, axial jedoch durch den Fokus hindurchgesaugt, in dieser Richtung stellte sich kein stabiles Gleichgewicht ein. Wie sich später herausstellte, wurde das Problem durch die teilweise Reflektion des Laserstrahls an den Gabelzinken verursacht. Auf diese Weise entstand im Strahl eine Überlagerung mehrerer Krümmungsradien, der vom Objektiv erzeugte Fokus wurde axial verzerrt.

In diese gleiche Richtung geht auch ein Problem, das durch den fehlerhaften Einbau des EOM im laser tweezers Modul verursacht wurde (vergleiche Kapitel 7.3): Mit dem Hersteller wurde vereinbart, den Nd:YVO₄-Strahl vor Einkopplung in dem EOM aufzuweiten. Dies erzeugte letztlich jedoch den gleichen Effekt wie die oben beschriebenen Gabelzinken. Der Strahl wurde an den Innenseiten der Kristallhalterung teilweise reflektiert. Wiederum trat beim Versuch, mikroskopische Objekte einzufangen, der beschriebene axiale Saugeffekt auf. Nach Entfernen

der Voraufweitung war dieses Problem behoben.

Schließlich konnte nachgewiesen werden, dass die optische Pinzette und die drei Quadrantendetektoren funktionieren und einsatzbereit sind. Die 3×3 Signale der Detektoren werden über eine Umschaltbox auf die sechs freien Eingangskanäle der Analog-Digital-Wandler-Karte gelegt. Das selbstgeschriebene LabView-Programm wiederum zeichnet von diesen sechs Kanälen aus Geschwindigkeitsgründen nur drei auf. Denn zusätzlich werden über zwei Kanäle die Positionsdaten des xy-Piezotranslators (Kapitel 6.6) mitgeschrieben, so dass zum Beispiel bei einer Samplingrate von 20 kS/s mehrere Megabyte Daten pro Sekunde auflaufen und auf die Festplatte geschrieben werden müssen.

Die AOD-Steuerung wurde aus diesen Gründen noch nicht in das LabView-Programm integriert. Dies wäre allerdings sinnvoll zur Bildung einer Rückkopplungsschleife zwischen Positionsdetektion und Position des optischen Kraftfeldes. Die in Abschnitt 7.4 geschilderten Abweichungen bei der Strahlableitung könnten auf diese Weise leicht behoben werden.

Multiphoton-Photolyse

Mit dem Titan-Saphir-Laser sollte Multiphotonphotolyse von Kalziumkäfigmolekülen durchgeführt werden (vergleiche Kapitel 4.4.3 und 6.4). Da der Ti:Sa-Laserstrahl zunächst nur über den Konfokalscankopf eingekoppelt war, wurde versucht, die Freisetzung in dieser Konfiguration zu realisieren. Dieser Versuch war erfolgreich, die gleichzeitige Messung des freigesetzten Kalziums musste jedoch mit einem Trick bewerkstelligt werden: Da die Freisetzung nicht in der gesamten Objektfläche ausgelöst werden sollte, der Ti:Sa-Strahl aber mit dem Scankopf mitläuft, musste die Systemsoftware so eingestellt werden, dass der Ti:Sa-Strahl mit Hilfe des EOM, vergleiche Abbildung 8.2, kurzzeitig ein- und wieder ausgeschaltet wurde. Dies war jedoch nur unter bestimmten Bedingungen möglich, zum Beispiel zu Beginn eines Messlaufs, so dass eine Alternative zu dieser unbefriedigenden Situation benötigt wurde.

Als Lösung bot sich die in Kapitel 8.1 beschriebene stationäre Direktauskopplung an. Ein eher logistisches Problem war nun aber, dass der Ti:Sa-Strahl die „safety box“ auf einer Höhe verließ, die mit dem Nd:YVO₄-Strahl der optischen Pinzette kollidierte. Da beide vereinigt und über einen gemeinsamen Strahlengang in das Objektiv eingekoppelt werden sollten, blieb als einziger Ausweg, die Bauhöhe der optischen Pinzette um etwa 20 mm zu erhöhen. Leider mussten dafür einige Elementhalterungen neu gebaut werden, die speziell angefertigt worden waren.

Die Photolyseaktivität des stationär gekoppelten Strahls wurde qualitativ

nachgewiesen (Abbildung 8.10). Die Freisetzung kann mit diesen Daten allein allerdings nicht quantifiziert werden. Dazu muss der Farbstoff in der entsprechenden Lösung kalibriert werden, vergleiche Gleichung (4.16). Diese Aufgabe ist nicht trivial, da sich zwischen den verschiedenen Puffern in der Lösung ein kompliziertes Gleichgewicht einstellen wird, das in der Regel nur numerisch berechnet werden kann.

TIRFM

Das TIRFM-Modul sollte aufgebaut werden, um ein kleines oberflächennahes Wechselwirkungsvolumen mit Fluoreszenzlicht beleuchten zu können. Dieses Modul wurde, wie im Abschnitt 9.1 erwähnt, durch Experimente inspiriert, bei denen zur Messung einzelner ATPase-Aktivitäten des Myosinmoleküls diese Technik angewendet wurde.

Es wurden im Verlaufe des Projektes verschiedene Konfigurationen realisiert. Keine dieser Konfigurationen, bis auf die aktuelle, lieferte jedoch ausreichend befriedigende Resultate. Zu diesen Konfigurationen zählten prismengestützte Einkopplungen in Deckgläser oder die Erzeugung des evaneszenten Feldes an Prismenoberflächen.

Letztendlich wurde die hier vorgestellte Konfiguration realisiert, bei der der Laserstrahl als Randstrahl in das Objektiv eingekoppelt wird. Mit Hilfe der in Kapitel 9.2 vorgestellten Methode wurde versucht zu begründen, dass in dieser Konfiguration tatsächlich ein evaneszentes Feld mit TIRF-Anregung gemessen werden konnte. Dieses Feld ist allerdings lateral begrenzt, da die Probe mit Laserlicht beleuchtet wird. Dies kann bei Anwendungen ein Nachteil sein, bei denen die Fluoreszenzanregung zwar axial begrenzt, lateral aber im gesamten Gesichtsfeld sichtbar sein soll. Für Versuche zum Nachweis einzelner Molekülumsätze dagegen ist die laterale Einschränkung ein Vorteil, da so störendes Streulicht aus anderen Bereichen unterdrückt wird.

Ein besserer Nachweis gelänge mit Hilfe von Fluoreszenzbeads, die in Agargel eingegossen sind. Hier müsste dann die einzelne Intensität eines jeden Beads in axialer Richtung abnehmen. Da man weiss, dass jedes Bead bei gleicher Beleuchtung auch gleich fluoreszieren sollte, könnte man auf diese Weise das axiale Profil des evaneszenten Feldes direkt ausmessen. Allerdings müssten die Beads dafür in einer deutlich höheren Konzentration vorliegen, als sie hier zur Verfügung stand.

Motilitätsassay

Eine der ersten biophysikalischen Anwendungen der CMLTT-Apparatur war das *in-vitro*-Motilitätsassay (vergleiche Kapitel 10). Hier werden fluoreszenzmarkierte

Aktinmoleküle mit Hilfe einer intensivierten Kamera (ICCD) sichtbar gemacht. Als eine der nächsten Anwendungen ist geplant, das Motilitätsassay mit der optischen Pinzette zu kombinieren, um Kraftmessungen an einzelnen Aktinfilamenten vorzunehmen.

Für diese Messungen wird ein Quadrantendetektor benötigt, um Positionsveränderungen der an den Filamenten befestigten Beads zu messen. Der Detektor sollte zunächst mit am Trinokular montiert werden, so dass ein Trinokularaufsatz mit zwei Ports gebaut wurde. Der Strahlengang wird in diesem Aufsatz im Verhältnis 50 : 50 auf die beiden Ports aufgeteilt.

Allerdings stellte sich dabei das Problem, dass die Fluoreszenzlichtausbeute im Assay so gering ist, dass ein Verlust von 50 % der Lichtleistung nicht tragbar war. Darüber hinaus stellte sich heraus, dass die Beads — sie werden ebenfalls fluoreszenzmarkiert, damit man sie zusammen mit den Filamenten beobachten kann — von dem Quadrantendetektor nicht gesehen wurden.

Das Problem wurde durch einen weiteren Quadrantendetektor gelöst, der das von dem eingefangenen Objekt in Vorwärtsrichtung gestreute Laserlicht detektiert. Ein dritter Detektor schließlich misst das zurückgestreute Laserlicht.

SHG

Als eine weitere der bereits realisierten biophysikalischen Anwendungen wurden SHG-Messungen an Muskelzellen und isolierten Myofibrillen beschrieben (Kapitel 11, [BOTH, VOGEL et al. 2004]). Mit diesen Messungen konnte nachgewiesen werden, dass sich SHG-Signale zur dreidimensionalen Darstellung der Zellstruktur eignen. Dabei müssen keine extrinsischen Farbstoffe eingesetzt werden, es handelt sich um ein Signal des Myosinfilaments.

Ein weiterer Diskussionspunkt betraf die Länge der Laserpulse, mit denen das SHG-Signal angeregt wird. In der Regel werden für SHG-Anwendungen Laserpulse im Femtosekundenbereich eingesetzt, unser Titan-Saphir-Laser erzeugt hingegen Pulse im Pikosekundenbereich. Die SHG-Signalintensität pro Puls skaliert mit [MOREAUX et al. 2001, CAMPAGNOLA et al. 2002]

$$i_{SHG} \propto \left(\frac{p^2}{a\tau} \right) N^2, \quad (12.1)$$

wobei p die Pulsenergie, a die Fläche des Fokus, τ die Pulslänge und N die Anzahl der SHG-Streuzentren ist. Die quadratische Abhängigkeit von der Zahl der molekularen Streuzentren ergibt sich daraus, dass die Polarisation $\tilde{P}^{(2)}$ eine kohärente Überlagerung und damit die Summe der Polarisierungen der einzelnen Streufelder ist. Mit der Pulswiederholrate f_{rep} erhält man dann die Gesamtintensität

$$I_{SHG} \propto i_{SHG} f_{rep} \propto \left(\frac{P_{avg}^2}{a\tau f_{rep}} \right) N^2, \quad (12.2)$$

wobei $P_{avg} = pf_{rep}$ die Durchschnittsleistung des Lasers ist. Man sieht an dieser Gleichung, dass eine größere Pulslänge τ durch eine größere Durchschnittsleistung wettgemacht werden kann: Nach Angaben des Herstellers [spe 1999], vergleiche Kapitel 6.4, erzeugt der Titan-Saphir-Laser Pulse einer Länge von $\tau \approx 2$ ps bei einer Wiederholrate von etwa $f_{rep} \approx 80$ MHz.

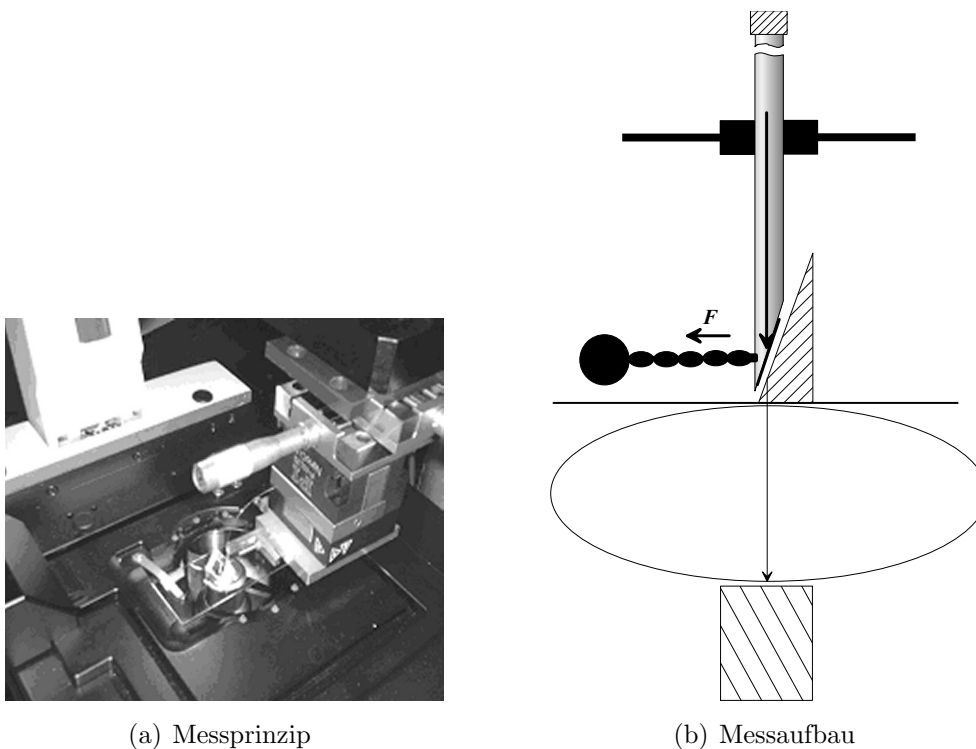
In Kapitel 11 wurde erwähnt, dass die Durchschnittsleistung an der rückseitigen Apertur des Objektivs etwa $P_{avg} \approx 50 - 100$ mW beträgt. Rechnet man dies auf einen einzelnen Puls zurück, und nimmt an, dass dieser durch ein Gaußsches Wellenpaket realisiert ist, so besitzt der Puls eine Spitzenleistung von $500 - 1000$ W. Vergleicht man dies mit typischen Werten für Femtosekunden-Pulse [CAMPAGNOLA et al. 2002], $\tau = 100$ fs, $P_{avg} = 1 - 50$ mW und $f_{rep} = 76$ MHz dann ist die zu erwartende SHG-Signalintensität — einen ähnlichen Wellenlängenbereich und Fokusfläche vorausgesetzt — von gleicher Größenordnung.

12.2 Ausblick

In dieser Arbeit wurde nachgewiesen, dass die einzelnen Module der CMLTT-Apparatur prinzipiell funktionsfähig und einsatzbereit sind. Es gilt nun, die in den Kapiteln 10 und 11 vorgestellten ersten biophysikalischen Anwendungen (Motilitätsassay, SHG) weiter auszubauen und die zusätzlichen Möglichkeiten der Apparatur auszuschöpfen.

Im Bereich der SHG-Mikroskopie an Myofibrilpräparaten wäre zum Beispiel eine Kombination mit der optischen Pinzette sinnvoll, um lokal definierte Kräfte auf das Präparat auszuüben und zu überprüfen, ob sich dabei die Intensität des SHG-Signals ändert. In diesem Zusammenhang ist auch interessant, dass SHG auch von potentialabhängigen Farbstoffen erzeugt wird [CAMPAGNOLA und LOEW 2003, NEMET et al. 2004]. So kann man auch die elektrischen Aspekte von Muskelzellpräparaten optisch bearbeiten.

Den Bereich der Einzelmolekülpräparate betreffend wurde bereits erwähnt, dass die optische Pinzette für Kraftmessungen an einzelnen Filamenten genutzt werden kann. Dies wird besonders interessant im Hinblick auf kalziumregulierte Aktinfilamente, wenn man das stationäre MP-Modul hinzunimmt. Es wird dann möglich, gezielt eine Kalziumfreisetzung zu starten und zu messen, inwieweit das regulierte Einzelmolekülpräparat auf diese lokale Erhöhung der Kalziumkonzentration reagiert.



(a) Messprinzip

(b) Messaufbau

Abbildung 12.1: FTIR-Transducer: Die Abbildung zeigt einen Versuch, den bestehenden Prototypen des FTIR-Transducers weiter zu verbessern, Erläuterungen s.Text.

Zum Abschluss soll noch ein weiteres Modul vorgestellt werden, das an die CMLTT-Apparatur angebaut werden soll. Dabei handelt es sich um einen Krafttransducer, der vor allem für sogenannte isometrische Kraftmessungen eingesetzt werden kann. Bei isometrischen Kraftmessungen ist es wichtig, dass der Kraftarm sehr steif ist, sich also bei der Kraftmessung möglichst nicht auslenkt. Diese Bedingung ist bei der optischen Pinzette nicht gegeben.

Die physikalische Grundlage für diesen Kraftmesser ist die frustrierte Totalreflektion, wie sie in Kapitel 4.5 bereits vorgestellt wurde. Es ist in unserem Labor bereits gelungen, einen Prototyp dieses Kraftmessers zu bauen und zu testen [KNOBLOCH et al. 2000]. Dieser Prototyp basierte auf zwei angeschliffenen Lichtleitern.

Eine andere Konfiguration ist in Abbildung 12.1 gezeigt. Diese besitzt gegenüber der ursprünglichen Anordnung den Vorteil, dass einer der Lichtleiter durch ein Prisma ersetzt wird und die Anordnung dadurch an Stabilität gewinnt. Eine weitere Alternative wäre, auch den zweiten Lichtleiter zu entfernen und durch einen angeschliffenen Glasstab zu ersetzen. Der Test dieser Konfiguratio-

nen steht noch aus.

Eigene Veröffentlichungen

Artikel in Zeitschriften

KNOBLOCH, K. U., M. VOGEL und R. H. A. FINK (2000). *A new transducer based on the evanescent field effect for high-resolution displacement and force measurements*. Pflügers Arch., 441(1):32–8.

FRIEDRICH, O., T. EHMER, D. UTTENWEILER, M. VOGEL, P.H. BARRY und R. H. A. FINK (2001). *Numerical Analysis of Ca²⁺ Depletion in the Transverse Tubular System (TTS) of Mammalian Muscle*. Biophys.J., 80(5):2046–2055.

BOTH, MARTIN, M. VOGEL, R. H. A. FINK und D. UTTENWEILER (2003). *Second harmonic generation imaging in muscle fibers*. Proc. SPIE, 5139:112–120.

BOTH, MARTIN*, M. VOGEL*, O. FRIEDRICH, F. v. WEGNER FV, T. KUNSTING, R. H. A. FINK und D. UTTENWEILER (2004). *Second harmonic imaging of intrinsic signals in muscle fibers in situ*. J.Biomed.Opt., 9(5):882–92.

Buchartikel

M. VOGEL und R. H. A. FINK (2004). *Laser*. In: WINK, MICHAEL, Hrsg.: *Molekulare Biotechnologie*. Wiley-VCH, Weinheim.

in Vorbereitung

OBER, T.*, M. VOGEL*, C. WEBER und R. FINK. *A motility assay reproducing the sliding velocity of muscle*. In preparation.

VOGEL, M.*, T. OBER*, D. UTTENWEILER und R. FINK. *A Structuretensor-based method for orientational velocity analysis in microscopy*. In preparation.

Literaturverzeichnis

- [els] *Akusto-Optik*. ELS Elektronik Laser System GmbH.
- [int] *Model DTD-274HA6 2 Axis Acousto-Optic Deflection System*. IntraAction Corp.
- [bur 1994] (1994). *Designing Photodiode Amplifier Circuits with OPA128*. Burr-Brown Corporation, Tucson,AZ,USA.
- [bur 1995] (1995). *Photodiode Monitoring with OP Amps*. Burr-Brown Corporation, Tucson,AZ,USA.
- [ham 1999a] (1999a). *Photodiodes*. Hamamatsu Photonics K.K., Solid State Division, Hamamatsu City, Japan.
- [ham 1999b] (1999b). *Photomultiplier Handbook*. Hamamatsu Photonics K.K., Solid State Division, Hamamatsu City, Japan.
- [spe 1999] (1999). *Tsunami - Mode locked Ti:sapphire Laser*. Spectra Physics, Mountain View, CA, USA.
- [mol 2003] (2003). *Fluo Calcium Indicators*. Molecular Probes, Inc., Eugene, OR, USA.
- [tis 2003] (2003). *Introduction to Cameras*.
- [ALLERSMA et al. 1998] ALLERSMA, M. W., F. GITTES, M. J. DECASTRO, R. J. STEWART und C. F. SCHMIDT (1998). *Two-dimensional tracking of ncd motility by back focal plane interferometry*. *Biophys.J.*, 74(2 Pt 1):1074–85.
- [ANSON et al. 1996] ANSON, M., M. A. GEEVES, S. E. KURZAWA und D. J. MANSTEIN (1996). *Myosin motors with artificial leverarms*. *EMBO J.*, 15(22):6069–74.

- [ASHKIN 1970] ASHKIN, A. (1970). *Acceleration and trapping of particles by radiation pressure*. Physical Review Letters, 24(4):156–159.
- [ASHKIN 1992] ASHKIN, A. (1992). *Forces of a single-beam gradient laser trap on a dielectric sphere in the ray optics regime*. Biophysical.Journal., 61(2):569–582.
- [ASHKIN und DZIEDZIC 1987] ASHKIN, A. und J. M. DZIEDZIC (1987). *Optical trapping and manipulation of viruses and bacteria*. Science, 235(4795):1517–20.
- [ASHKIN und DZIEDZIC 1989] ASHKIN, A. und J. M. DZIEDZIC (1989). *Internal cell manipulation using infrared lasertraps*. Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A., 86(20):7914–8.
- [ASHKIN et al. 1986] ASHKIN, A., J. M. DZIEDZIC, J. E. BJORKHOLM und S. CHU (1986). *Observation of a single-beam gradient force optical trap for dielectric particles*. Optics Letters, 11(5):288–290.
- [ASHKIN et al. 1987] ASHKIN, A., J. M. DZIEDZIC und T. YAMANE (1987). *Optical trapping and manipulation of single cells using infrared laser beams*. Nature, 330(6150):769–71.
- [ASHKIN et al. 1990] ASHKIN, A., K. SCHÜTZE, J. M. DZIEDZIC, U. EUTENEUER und M. SCHLIWA (1990). *Force generation of organelle transport measured in vivo by an infrared laser trap*. Nature, 348(6299):346–8.
- [BARKS 1948] BARKS, CARL (1948). *The Crazy Quiz Show*. Walt Disney's Comics and Stories, 99:3–12.
- [BARTON und ALEXANDER 1989] BARTON, J. P. und D. R. ALEXANDER (1989). *Fifth-order corrected electromagnetic field components for a fundamental Gaussian beam*. Journal of Applied.Physics., 66(7):2800–2802.
- [BARTON et al. 1988] BARTON, J. P., D. R. ALEXANDER und S. A. SCHAUB (1988). *Internal and near-surface electromagnetic fields for a spherical particle irradiated by a focused laser beam*. Journal of Applied.Physics., 64(4):1632–1639.
- [BARTON et al. 1989] BARTON, J. P., D. R. ALEXANDER und S. A. SCHAUB (1989). *Theoretical determination of net radiation force and torque for a spherical particle illuminated by a focused laser beam*. Journal of Applied.Physics., 66(10):4594–4602.

- [BERG et al. 2002] BERG, JEREMY M., J. L. TYMOCZKO und L. STRYER (2002). *Biochemistry*. W.H.Freeman and Company, New York.
- [BERGMANN und SCHÄFER 1993] BERGMANN, LUDWIG und C. SCHÄFER (1993). *Optik*, Bd. 3 d. Reihe *Lehrbuch der Experimentalphysik*. de Gruyter, Berlin, New York.
- [BERRIDGE et al. 1998] BERRIDGE, M. J., M. D. BOOTMAN und P. U. . P. LIPP (1998). *Calcium—a life and death signal*. Nature, 395(6703):645–8.
- [BERRIDGE et al. 2003] BERRIDGE, MICHAEL J., M. D. BOOTMAN und H. L. RODERICK (2003). *Calcium signalling: dynamics, homeostasis and remodeling*. Nat.Rev.Mol.Cell Biol., 4(7):517–29.
- [BLOEMBERGEN et al. 1968] BLOEMBERGEN, N., R. K. CHANG, S. S. JHA und C. H. LEE (1968). *Optical Second-Harmonic Generation in Reflection from Media with Inversion Symmetry*. Physical Review, 174(3):813–822.
- [BORN und WOLF 1980] BORN, M. und E. WOLF (1980). *Principles of Optics*. Pergamon, Oxford.
- [BOTH, VOGEL et al. 2004] BOTH, MARTIN, M. VOGEL, O. FRIEDRICH, F. V. WEGNER FV, T. KUNSTING, R. H. A. FINK und D. UTTENWEILER (2004). *Second harmonic imaging of intrinsic signals in muscle fibers in situ*. J.Biomed.Opt., 9(5):882–92.
- [BOYLE und SMITH 1970] BOYLE, W. S. und G. E. SMITH (1970). *Charge coupled semiconductor devices*. Bell System Technical Journal, 49(4):587–593.
- [BREKHOVSKIKH 1960] BREKHOVSKIKH, LEONID M. (1960). *Waves in layered media*, Bd. 6 d. Reihe *Applied mathematics and mechanics*. Academic Press, New York, San Francisco, London.
- [CAMPAGNOLA et al. 1999] CAMPAGNOLA, P. J., M. D. WEI, A. LEWIS und L. M. LOEW (1999). *High-resolution nonlinear optical imaging of live cells by second harmonic generation*. Biophys.J., 77(6):3341–9.
- [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):1356–60.

- [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.
- [CHUANG et al. 1995] CHUANG, F-M, M.-W. CHANG und S. G. SHIUE (1995). *Solution areas of three-component afocal zoom system*. Optik., 101(1):10–16.
- [CONIBEAR und BAGSHAW 2000] CONIBEAR, P. B. und C. R. BAGSHAW (2000). *A comparison of optical geometries for combined flash photolysis and total internal reflection fluorescence microscopy*. J.Microsc., 200 Pt 3:218–29.
- [COOKE 1997] COOKE, R. (1997). *Actomyosin interaction in striated muscle*. Physiol.Rev., 77(3):671–97.
- [DAVIES 2000] DAVIES, CHRISTOPHER C. (2000). *Lasers and Electro-Optics*. Cambridge University Press, Cambridge, New York, Melbourne, Madrid.
- [DAVIES 1963] DAVIES, R. E. (1963). *A Molecular Theory of Muscle Contraction: Calcium-dependent Contractions with Hydrogen Bond Formation plus ATP-dependent Extensions of Part of the Myosin-Actin Cross-Bridges*. Nature, 199:1068–74.
- [DELPRINCIPE et al. 1999] DELPRINCIPE, F., M. EGGER, E.-D. GC und E. NIGGLI (1999). *Two-photon and UV-laser flash photolysis of the Ca²⁺ cage, dimethoxynitrophenyl-EGTA-4*. Cell Calcium, 25(1):85–91.
- [DENK et al. 1995] DENK, W., D. PISTON und W. WEBB (1995). *Two-Photon Molecular Excitation in Laser-Scanning Microscopy*. In: PAWLEY, JAMES B., Hrsg.: *The handbook of biological confocal microscopy*, Kap. 28. Plenum Press, New York.
- [DENK und WEBB 1990] DENK, WINFRIED und W. W. WEBB (1990). *Optical measurement of picometer displacements of transparent microscopic objects*. Applied.Optics., 29(16):2382–2391.
- [DIETRICH et al. 1975] DIETRICH, GÜNTHER, K. KALLE, W. KRAUSS und G. SIEDLER (1975). *Allgemeine Meereskunde*. Gebrüder Bornträger, Berlin, Stuttgart.
- [DYBA et al. 2003] DYBA, MARCUS, S. JAKOBS und S. W. HELL (2003). *Immunofluorescence stimulated emission depletion microscopy*. Nat.Biotechnol., 21(11):1303–4.

- [ELLIS-DAVIES et al. 1996] ELLIS-DAVIES, G. C., J. H. KAPLAN und R. J. BARSOTTI (1996). *Laser photolysis of caged calcium: rates of calcium release by nitrophenyl-EGTA and DM-nitrophen*. *Biophys.J.*, 70(2):1006–16.
- [ELLIS-DAVIES 1998] ELLIS-DAVIES, G. C. R. (1998). *Synthesis of photosensitive EGTA derivatives*. *Tetrahedron Letters*, 39(9):953–956.
- [FENN 1923] FENN, W. O. (1923). *A quantitative comparison between the energy liberated and the work performed by the isolated sartorius muscle of the frog*. *Journal of Physiology*, 58:175–203.
- [FRANKEN et al. 1961] FRANKEN, P. A., A. E. HILL, C. W. PETERS und G. WEINREICH (1961). *Generation of Optical Harmonics*. *Physical Review Letters*, 7(4):118–120.
- [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.
- [FUNATSU et al. 1995] FUNATSU, T., Y. HARADA, M. TOKUNAGA, K. SAITO und T. YANAGIDA (1995). *Imaging of single fluorescent molecules and individual ATP turnovers by single myosin molecules in aqueous solution*. *Nature*, 374(6522):555–9.
- [GERTHSEN und VOGEL 1993] GERTHSEN, CHRISTIAN und H. VOGEL (1993). *Physik*. Springer, Berlin, Heidelberg, New York.
- [GÖPPERT 1929] GÖPPERT, M. (1929). *Über die Wahrscheinlichkeit des Zusammenwirkens zweier Lichtquanten in einem Elementarakt*. *Die Naturwissenschaften.*, 17:932.
- [GÖPPERT-MAYER 1931] GÖPPERT-MAYER, M. (1931). *Über Elementarakte mit zwei Quantensprüngen*. *Annalen der Physik (5.F.)*, 9:273–294.
- [GORDON et al. 1997] GORDON, A. M., M. A. LAMADRID, Y. CHEN, Z. LUO und P. B. CHASE (1997). *Calcium regulation of skeletal muscle thin filament motility in vitro*. *Biophys.J.*, 72(3):1295–307.
- [GREINER 1982] GREINER, WALTER (1982). *Elektrodynamik*, Bd. 3 d. Reihe *Theoretische Physik*. Thun, Frankfurt/Main.

- [GRYNKIEWICZ et al. 1985] GRYNKIEWICZ, G., M. POENIE und R. Y. U. . P. TSIEN (1985). *A new generation of Ca²⁺ indicators with greatly improved fluorescence properties*. J.Biol.Chem., 260(6):3440–50.
- [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):760–6.
- [HARADA et al. 1987] HARADA, Y., A. NOGUCHI, A. KISHINO und T. YANAGIDA (1987). *Sliding movement of single actin filaments on one-headed myosin filaments*. Nature, 326(6115):805–8.
- [HAUGLAND 1999] HAUGLAND, RICHARD P. (1999). *Handbook of Fluorescent Probes and Research Products*. Molecular Probes, Inc., Eugene, OR, USA, 9th ed. Aufl.
- [HELL 2003] HELL, STEFAN W. (2003). *Toward fluorescence nanoscopy*. Nat.Biotechnol., 21(11):1347–55.
- [HENZE 2003] HENZE, STEPHAN (2003). *Aufbau eines Systems zur Zweiphotonenphotolyse von Kalziumkomplexen an einem konfokalen Mikroskop*. Diplomarbeit, Fakultät für Physik und Astronomie der Universität Heidelberg.
- [HESCHELER und HIRCHE 1999] HESCHELER, JÜRGEN und H. HIRCHE (1999). *Muskulatur*. In: DEETJEN, PETER und E.-J. SPECKMANN, Hrsg.: *Physiologie*, S. 155–176. Urban & Fischer, München,Suttgart,Jena,Lübeck,Ulm.
- [HODGE und COPE 2000] HODGE, T. und M. J. COPE (2000). *A myosin family tree*. J.Cell Sci., 113 Pt 19:3353–4.
- [HOLLEMAN und WIBERG 1964] HOLLEMAN, ARNOLD F. und E. WIBERG (1964). *Lehrbuch der anorganischen Chemie*. de Gruyter.
- [HOLMES et al. 1990] HOLMES, K. C., D. POPP, W. GEBHARD und W. KABSCH (1990). *Atomic model of the actin filament*. Nature, 347(6288):44–9.
- [HOMSHER et al. 1996] HOMSHER, E., B. KIM, A. BOBKOVA und L. S. TOBACMAN (1996). *Calcium regulation of thin filament movement in an in vitro motility assay*. Biophys.J., 70(4):1881–92.
- [HOOK und LARSSON 2000] HOOK, P. und L. LARSSON (2000). *Actomyosin interactions in a novel single muscle fiber in vitro motility assay*. J.Muscle Res.Cell Motil., 21(4):357–65.

- [HOOK et al. 1999] HOOK, P., X. LI, J. SLEEP, S. HUGHES und L. LARSSON (1999). *In vitro motility speed of slow myosin extracted from single soleus fibres from young and old rats*. J.Physiol., 520 Pt 2:463–71.
- [HUXLEY und SIMMONS 1971] HUXLEY, A. F. und R. M. SIMMONS (1971). *Proposed mechanism of force generation in striated muscle*. Nature, 233(5321):533–8.
- [HUXLEY und HANSON 1954] HUXLEY, H. und J. HANSON (1954). *Changes in the cross-striations of muscle during contraction and stretch and their structural interpretation*. Nature, 173(4412):973–6.
- [HUXLEY 1969] HUXLEY, H. E. (1969). *The mechanism of muscular contraction*. Science, 164(886):1356–65.
- [IBACH und LÜTH 1995] IBACH, HARALD und H. LÜTH (1995). *Festkörperphysik*. Springer, Berlin, Heidelberg, New York.
- [ISHIJIMA et al. 1998] ISHIJIMA, A., H. KOJIMA, T. FUNATSU, M. TOKUNAGA, H. HIGUCHI, H. TANAKA und T. YANAGIDA (1998). *Simultaneous observation of individual ATPase and mechanical events by a single myosin molecule during interaction with actin*. Cell, 92(2):161–71.
- [KABSCH et al. 1990] KABSCH, W., H. G. MANNHERZ, D. SUCK, E. F. PAI und K. C. HOLMES (1990). *Atomic structure of the actin:DNase I complex*. Nature, 347(6288):37–44.
- [KITAMURA et al. 1999] KITAMURA, K., M. TOKUNAGA, A. H. IWANE und T. YANAGIDA (1999). *A single myosin head moves along an actin filament with regular steps of 5.3 nanometres*. Nature, 397(6715):129–34.
- [KITTEL 1993] KITTEL, CHARLES (1993). *Einführung in die Festkörperphysik*. Oldenbourg, München, 10. Auflage Aufl.
- [KLEINMAN 1962] KLEINMAN, D. A. (1962). *Nonlinear Dielectric Polarization in Optical Media*. Physical Review, 126(6):1977–1979.
- [KNEUBÜHL und SIGRIST 1995] KNEUBÜHL, FRITZ KURT und M. W. SIGRIST (1995). *Laser*. Teubner, Stuttgart, 4 Aufl.
- [KNOBLOCH et al. 2000] KNOBLOCH, K. U., M. VOGEL und R. H. FINK (2000). *A new transducer based on the evanescent field effect for high-resolution displacement and force measurements*. Pflugers Arch., 441(1):32–8.

- [KOESTER et al. 1999] KOESTER, H. J., D. BAUR, R. UHL und S. W. HELL (1999). *Ca²⁺ fluorescence imaging with pico- and femtosecond two-photon excitation: signal and photodamage*. *Biophys.J.*, 77(4):2226–36.
- [KOGELNIK und LI 1966] KOGELNIK, H. und T. LI (1966). *Laser Beams and Resonators*. *Appl.Opt.*, 5:1550–1567.
- [KRAULIS 1991] KRAULIS, P. J. (1991). *MOLSCRIPT: a program to produce both detailed and schematic plots of protein structures*. *Journal of Applied Crystallography.*, 24(5):946–950.
- [KRON und SPUDICH 1986] KRON, S. J. und J. A. SPUDICH (1986). *Fluorescent actin filaments move on myosin fixed to a glass surface*. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.*, 83(17):6272–6.
- [KRON et al. 1991] KRON, S. J., Y. Y. TOYOSHIMA, T. Q. UYEDA und J. A. SPUDICH (1991). *Assays for actin sliding movement over myosin-coated surfaces*. *Methods Enzymol.*, 196:399–416.
- [KÜHNE 1864] KÜHNE, W. (1864). *Untersuchungen über das Protoplasma und die Contractilität*. Verlag Wilhelm Engelmann, Leipzig.
- [KÜNSTING 2003] KÜNSTING, THOMAS (2003). *Aufbau einer modularen TIR-FM Einheit an einem konfokalen Mikroskop mit Multiphotonenerweiterung*. Diplomarbeit, Fakultät für Physik und Astronomie der Universität Heidelberg.
- [LAKOWICZ 1983] LAKOWICZ, JOSEPH R. (1983). *Principles of Fluorescence Spectroscopy*. Plenum Press, New York, London.
- [LORENZ et al. 1993] LORENZ, M., D. POPP und K. C. HOLMES (1993). *Refinement of the F-actin model against X-ray fiberdiffraction data by the use of a directed mutation algorithm*. *J.Mol.Biol.*, 234(3):826–36.
- [LYMN und TAYLOR 1971] LYMN, R. W. und E. W. TAYLOR (1971). *Mechanism of adenosine triphosphate hydrolysis by actomyosin*. *Biochemistry*, 10(25):4617–24.
- [MARGOSSIAN und LOWEY 1982] MARGOSSIAN, S. S. und S. LOWEY (1982). *Preparation of myosin and its subfragments from rabbit skeletal muscle*. *Methods Enzymol.*, 85 Pt B:55–71.
- [MARUYAMA et al. 1977a] MARUYAMA, K., S. KIMURA, M. KURODA und S. HANDA (1977a). *Connectin, an elastic protein of muscle. Its abundance in cardiac myofibrils*. *J.Biochem.(Tokyo)*, 82(2):347–50.

- [MARUYAMA et al. 1977b] MARUYAMA, K., S. MATSUBARA, R. NATORI, Y. NONOMURA und S. KIMURA (1977b). *Connectin, an elastic protein of muscle. Characterization and Function*. J.Biochem.(Tokyo), 82(2):317–37.
- [MARUYAMA et al. 1977c] MARUYAMA, K., F. MURAKAMI und K. OHASHI (1977c). *Connectin, an elastic protein of muscle. Comparative Biochemistry*. J.Biochem.(Tokyo), 82(2):339–45.
- [MEHTA et al. 1999] MEHTA, A. D., R. S. ROCK, M. RIEF, J. A. SPUDICH, M. S. MOOSEKER und R. E. CHENEY (1999). *Myosin-V is a processive actin-based motor*. Nature, 400(6744):590–3.
- [MEHTA et al. 1998] MEHTA, AMIT D., J. T. FINER und J. A. SPUDICH (1998). *Reflections of a lucid dreamer: Optical Trap Design Considerations*. Methods Cell Biol., 55:47–69.
- [MESCHÉDE 1999] MESCHÉDE, D. (1999). *Optik, Licht und Laser*. Teubner, Stuttgart, Leipzig.
- [MOLLOY 1998] MOLLOY, J. E. (1998). *Optical chopsticks: digital synthesis of multiple optical traps*. Methods Cell Biol., 55:205–16.
- [MOREAUX et al. 2000a] MOREAUX, L., O. SANDRE, M. BLANCHARD-DESCE und J. MERTZ (2000a). *Membrane imaging by simultaneous second-harmonic generation and two-photon microscopy*. Optics.Letters., 25(5):320–322.
- [MOREAUX et al. 2001] MOREAUX, L., O. SANDRE, S. CHARPAK, M. BLANCHARD-DESCE und J. MERTZ (2001). *Coherent scattering in multi-harmonic light microscopy*. Biophys.J., 80(3):1568–74.
- [MOREAUX et al. 2000b] MOREAUX, L., O. SANDRE und J. MERTZ (2000b). *Membrane imaging by second-harmonic generation microscopy*. Journal of the.Optical.Society.of America.B Optical.Physics., 17(10):1685–1694.
- [NEMET et al. 2004] NEMET, BOAZ A., V. NIKOLENKO und R. YUSTE (2004). *Second harmonic imaging of membrane potential of neurons with retinal*. J.Biomed.Opt., 9(5):873–81.
- [NIEMZ 1996] NIEMZ, MARKOLF (1996). *Laser-Tissue Interactions*. Springer, Berlin, Heidelberg, New York.
- [NOLTING 1990] NOLTING, WOLFGANG (1990). *Elektrodynamik*. Zimmermann-Neufang, Ulmen.

- [OBER, VOGEL et al.] OBER, T., M. VOGEL, C. WEBER und R. FINK. *A motility assay reproducing the sliding velocity of muscle. In preparation.*
- [OKTEN et al. 2004] OKTEN, ZEYNEP, L. S. CHURCHMAN, R. S. ROCK und J. A. SPUDICH (2004). *Myosin VI walks hand-over-hand along actin.* Nat.Struct.Mol.Biol., 11(9):884–7.
- [OSTROVERKHOV et al. 2001] OSTROVERKHOV, V., K. D. SINGER und R. G. PETSCHKEK (2001). *Second-harmonic generation in nonpolar chiral materials: relationship between molecular and macroscopic properties.* J. Opt. Soc. Am. B, 18(12):1858–1865.
- [PARDEE und SPUDICH 1982] PARDEE, J. D. und J. A. SPUDICH (1982). *Purification of muscle actin.* Methods Cell Biol., 24:271–89.
- [PIAZZESI und LOMBARDI 1995] PIAZZESI, G. und V. LOMBARDI (1995). *A cross-bridge model that is able to explain mechanical and energetic properties of shortening muscle.* Biophys.J., 68(5):1966–79.
- [POTTER 1982] POTTER, J. D. (1982). *Preparation of troponin and its subunits.* Methods Enzymol., 85 Pt B:241–63.
- [RAYMENT et al. 1993] RAYMENT, I., W. R. RYPNIEWSKI, K. SE, R. SMITH, D. R. TOMCHICK, M. M. BENNING, D. A. WINKELMANN, G. WESENBERG und H. M. HOLDEN (1993). *Three-dimensional structure of myosin subfragment-1: a molecular motor.* Science, 261(5117):50–8.
- [RIEKE 1996] RIEKE, GEORGE HENRY (1996). *Detection of Light: From the Ultraviolet to The Submillimeter.* Cambridge University Press, Cambridge, 1.paperback ed. Aufl.
- [ROTH und FREUND 1979] ROTH, S. und I. FREUND (1979). *Second harmonic generation in collagen.* Journal of Chemical Physics., 70(4):1637–1643.
- [ROTH und FREUND 1980] ROTH, S. und I. FREUND (1980). *Coherent optical harmonic generation in rat-tail tendon.* Optics Communications., 33(3):292–296.
- [ROTH und FREUND 1982] ROTH, S. und I. FREUND (1982). *Second harmonic generation and orientational order in connective tissue: a mosaic model for fibril orientational ordering in rat-tail tendon.* Journal of Applied Crystallography., 15(1):72–78.

- [RÜEGG 1995] RÜEGG, C. (1995). *Muskel*, S. 67–87.
- [SHEN 1984] SHEN, Y.R. (1984). *The principles of nonlinear optics*. John Wiley & Sons, New York, Chichester, Brisbane, Toronto, Singapore.
- [SHOCKLEY 1951] SHOCKLEY, WILLIAM (1951). *Electrons and holes in semiconductors*. Van Nostrand, Toronto, 2 Aufl.
- [SIEGMAN 1986] SIEGMAN, ANTHONY E. (1986). *Lasers*. University Science Books, Mill Valley, CA, USA.
- [SIMMONS et al. 1996] SIMMONS, R. M., J. T. FINER, S. CHU und J. A. SPUDICH (1996). *Quantitative measurements of force and displacement using an optical trap*. *Biophys.J.*, 70(4):1813–22.
- [SMILLIE 1982] SMILLIE, L. B. (1982). *Preparation and identification of alpha- and beta-tropomyosins*. *Methods Enzymol.*, 85 Pt B:234–41.
- [STEUBING et al. 1991] STEUBING, R. W., S. CHENG, W. H. WRIGHT, Y. NUMAJIRI und M. W. BERNS (1991). *Laser induced cell fusion in combination with optical tweezers: the laser cell fusion trap*. *Cytometry*, 12(6):505–10.
- [STOUT und WEBB 1998] STOUT, ANDREA L. und W. W. WEBB (1998). *Optical Force Microscopy*. *Methods in Cell Biology.*, 55:99–116.
- [STRAUB 1943] STRAUB, F. B. (1943). *Actin*. II. Studies from the Inst. of Med. Chem. Univ. Szeged, 3:23–37.
- [SVOBODA und BLOCK 1994] SVOBODA, K. und S. M. U. . P. BLOCK (1994). *Biological applications of optical forces*. *unmapped;OWN - NLM*. *Annu.Rev.Biophys.Biomol.Struct* *unmapped;FAU.Svoboda,.K* *unmapped;FAU.Block,.S.M* *unmapped;LR.20001218.*, 23 *unmapped;PMID-7919782* *unmapped;EDAT- 1994/01/01* *unmapped;IS - 1056-8700:247–85*.
- [TERHUNE et al. 1962] TERHUNE, R. W., P. D. MAKER und C. M. SAVAGE (1962). *Optical Harmonic Generation in Calcite*. *Physical Review Letters*, 8(10):404–406.
- [TOOMRE und MANSTEIN 2001] TOOMRE, D. und D. J. MANSTEIN (2001). *Lighting up the cell surface with evanescent wave microscopy*. *Trends Cell Biol.*, 11(7):298–303.

- [TOYOSHIMA et al. 1987] TOYOSHIMA, Y. Y., S. J. KRON, E. M. McNALLY, K. R. NIEBLING, C. TOYOSHIMA und J. A. SPUDICH (1987). *Myosin subfragment-1 is sufficient to move actinfilaments in vitro*. Nature, 328(6130):536–9.
- [TSAVALIARIS et al. 2004] TSAVALIARIS, GEORGIOS, S. FUJITA-BECKER und D. J. MANSTEIN (2004). *Molecular engineering of a backwards-moving myosin motor*. Nature, 427(6974):558–61.
- [UEMURA et al. 2004] UEMURA, SOTARO, H. HIGUCHI, A. O. OLIVARES, E. M. DE LA CRUZ und I. ISHIWATA (2004). *Mechanochemical coupling of two substeps in a single myosin V motor*. Nat.Struct.Mol.Biol., 11(9):877–83.
- [UTTENWEILER 2003] UTTENWEILER, D. (2003). *Mathematical Modelling and High Resolution Fluorescence Imaging for Studying Calcium Regulation*. Lecture Notes in Physics, 623:201–230.
- [UTTENWEILER et al. 2000] UTTENWEILER, D., C. VEIGEL, R. STEUBING, C. GOTZ, S. MANN, H. HAUSSECKER, B. JAHNE und R. H. FINK (2000). *Motion determination in actin filament fluorescence images with a spatio-temporal orientation analysis method*. Biophys.J., 78(5):2709–15.
- [UTTENWEILER et al. 1998] UTTENWEILER, D., C. WEBER und R. H. FINK (1998). *Mathematical modeling and fluorescence imaging to study the Ca²⁺ turnover in skinned muscle fibers*. Biophys.J., 74(4):1640–53.
- [UYEDA et al. 1996] UYEDA, T. Q., P. D. ABRAMSON und J. A. SPUDICH (1996). *The neck region of the myosin motor domain acts as a lever arm to generate movement*. Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A., 93(9):4459–64.
- [UYEDA et al. 1990] UYEDA, T. Q., S. J. KRON und J. A. SPUDICH (1990). *Myosin step size. Estimation from slow sliding movement of actin over low densities of heavy meromyosin*. J.Mol.Biol., 214(3):699–710.
- [VEIGEL et al. 1999] VEIGEL, C., L. M. COLUCCIO, J. D. JONTES, J. C. SPARROW, R. A. MILLIGAN und J. E. MOLLOY (1999). *The motor protein myosin-I produces its working stroke in two steps*. Nature, 398(6727):530–3.
- [VEIGEL et al. 1994] VEIGEL, C., R. W. STEUBING, A. HARIM, C. WEBER, K. O. GREULICH und R. H. FINK (1994). *New cell biological applications of the laser microbeam technique: the microdissection and skinning of muscle fibers and the perforation and fusion of sarcolemma vesicles*. Eur.J.Cell Biol., 63(1):140–8.

- [VEIGEL et al. 1995] VEIGEL, C., R. D. v.MAYDELL, R. WIEGAND-STEUBING, R. GOODY und R. H. A. FINK (1995). *The influence of ionic strength upon relaxation from rigor induced by flash photolysis of caged-ATP in skinned murine skeletal muscle fibres*. Pflugers Arch., 430(6):994–1003.
- [VEIGEL et al. 2003] VEIGEL, CLAUDIA, J. E. MOLLOY, S. SCHMITZ und J. KENDRICK-JONES (2003). *Load-dependent kinetics of force production by smooth muscle myosin measured with optical tweezers*. Nat.Cell Biol., 5(11):980–6.
- [VEIGEL et al. 2002] VEIGEL, CLAUDIA, F. WANG, M. L. BARTOO, J. R. SELTERS und J. E. MOLLOY (2002). *The gated gait of the processive molecular motor, myosin V*. Nat.Cell Biol., 4(1):59–65.
- [VOGEL, OBER et al.] VOGEL, M., T. OBER, D. UTTENWEILER und R. FINK. *A Structure tensor-based method for orientational velocity analysis in microscopy. In preparation.*
- [WELLS et al. 1999] WELLS, A. L., A. W. LIN, L. Q. CHEN, D. SAFER, S. M. CAIN, T. HASSON, B. O. CARRAGHER, R. A. MILLIGAN und H. L. SWENEY (1999). *Myosin VI is an actin-based motor that moves backwards*. Nature, 401(6752):505–8.
- [WHITE et al. 1997] WHITE, H. D., B. BELKNAP und M. R. WEBB (1997). *Kinetics of nucleoside triphosphate cleavage and phosphate release steps by associated rabbit skeletal actomyosin, measured using a novel fluorescent probe for phosphate*. Biochemistry, 36(39):11828–36.
- [WILSON 1990] WILSON, T. (1990). *Confocal Microscopy*. Academic Press, New York.
- [WILSON 1995] WILSON, T. (1995). *The role of the pinhole in confocal microscopy*. In: PAWLEY, JAMES B., Hrsg.: *The handbook of biological confocal microscopy*, Kap. 11. Plenum Press, New York.
- [WILSON und CARLINI 1987] WILSON, T. und A. R. CARLINI (1987). *Size of the detector in confocal imaging systems*. Optics.Letters., 12(4):227–229.
- [WRIGHT et al. 1993] WRIGHT, W. H., G. J. SONEK und M. W. BERNS (1993). *Radiation trapping forces on microspheres with optical tweezers*. Applied.Physics.Letters., 63(6):715–517.

[XU et al. 1999] XU, C., R. CRAIG, L. TOBACMAN, R. HOROWITZ und W. LEHMAN (1999). *Tropomyosin positions in regulated thin filaments revealed by cryoelectron microscopy*. Biophys.J., 77(2):985–92.

[ZERNIKE 1934] ZERNIKE, F. (1934). *Beugungstheorie des Schneidenverfahrens und seiner verbesserten Form, der Phasenkontrastmethode*. Physica, 1:689–701.



Abbildung 13.1: Donald Duck, bei der Literaturrecherche [BARKS 1948].

Danksagung

Zum Abschluss möchte ich all diejenigen nicht unerwähnt lassen, die mich in den vergangenen Jahren unterstützt und auf ihre Art zu dieser Dissertation beigetragen haben:

Als erstes danke ich Herrn Prof. Dr. Rainer Fink, dass er mir dieses Projekt übertragen hat und ich diese Arbeit in seinem Labor durchführen konnte. Besonders bedanke ich mich für das Vertrauen, das er mir damit entgegengebracht hat. Ich habe in dieser Zeit viel gelernt, nicht nur wissenschaftlich, und konnte mich, bei allen Freiräumen, die er mir gelassen hat, auf seine Rückendeckung und Unterstützung verlassen.

Weiterer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Josef Bille, dessen Bereitschaft, die Betreuung und Begutachtung von Seiten der physikalischen Fakultät zu übernehmen, diese Arbeit erst möglich gemacht hat.

Großen Dank schulde ich auch Herrn Prof. Dr. Joachim Spatz für die großzügige Unterstützung in einer schwierigen Situation. Ohne seine Hilfe hätte ich diese Arbeit nicht in dieser Form zu Ende bringen können. From his group, another special “thank you” is to Dr. Jennifer E. Curtis for very helpful advices that led to a real breakthrough!

Herrn Prof. Dr. Michael Wink danke ich für die Aufnahme in das Graduiertenkolleg „Biotechnologie“. Die interessanten Kurse und Aktivitäten in diesem GK waren eine echte Bereicherung, aus denen ich viel mitnehmen werde.

Eine ganz besondere Erfahrung war dabei unser deutsch-französischer Biotechnologie-Workshop „BioVenue2002“. Hier danke ich vor allem Frau Dr. Marit-Saskia Wahrendorf und Herrn Dr. Heiko Berke für die super Zusammenarbeit im Organisationsteam. Es hat mir großen Spaß gemacht!

Aus der Arbeitsgruppe Fink danke ich zuallererst Frau Cornelia Weber “for just being there”. Vieles wäre ohne ihre Hilfe und ihr großes Engagement nicht realisierbar gewesen.

Herrn Dr. in spe Tobias Ober danke ich für seine große Hilfsbereitschaft, seine Zuverlässigkeit, eine tolle Zusammenarbeit, die wir, bevor er sich auf seine politische Karriere konzentriert (gell?), hoffentlich noch etwas verlängern können,

sowie für die tägliche Durchgabe des Mensaspiseplans.

Herrn Dr. Martin Both danke ich für die Einführung in die nichtlineare Mikroskopie, Hilfe, wenn ich sie brauchte, und eine gute Kongresszeit in Jena und Boston.

Herrn Dr. Dr. Oliver Friedrich danke ich für gute Zusammenarbeit, Gleichmut und den Literaturtipp. Ich werde „FaD“ lesen, bestimmt!

Herrn Dr. Martin Weber danke ich für eine super Zeit als direkter Schreibtischnachbar, viele gute Gespräche und das finale Antriggern!

Herrn PD Dr. Dietmar Uttenweiler danke ich für die gute Zeit, Rat und Tat, viel Unterstützung, noch viel mehr aufmunternde Worte, gemeinsame OEG-Fahrten und die Überlassung des Büros.

Den Herren Dipl.-Phys. Stephan Henze und Dipl.-Phys. Thomas Künsting danke ich für gute Zusammenarbeit, die mir sehr Spass gemacht hat, und wertvolle Hilfe an diesem Projekt.

Den vorgenannten und allen anderen (Ex-)„Finken“ (Dr. Friederike Beker, Ruth Wagner, Simon Gaul, Benjamin Becker, Gunnar Schramm, Frederic von Wegner, Erich Schulzke, Dr. Thomas Ehmer, Dr. Uwe Knobloch, Dr. Wolfgang Kirsch) danke ich für eine super Arbeitsatmosphäre und eine gute Zeit!

Darüber hinaus danke ich allen Kolleginnen und Kollegen im Institut für die mir in den letzten Jahren geleistete Hilfe. Besonders danke ich dabei Herrn Rainer Förderer für vielen Ideen und die präzise Ausführung aller feinmechanischen Arbeiten.

Den Mitarbeitern von Leica Microsystems, Mannheim, insbesondere Herrn Dr. Werner Knebel, Frau Gabriele Burger, Herrn Dr. Heinrich Ulrich sowie Herrn Volker Leimbach danke ich für wertvolle Vorschläge und Hilfestellungen.

Thanks to Carl Barks for that he was “the good artist”.

Meiner Familie, meinen Freunden und meinen Eltern, besonders meiner Mutter, danke ich für ihre Unterstützung, das Jammern-Dürfen und das Mutmachen.

Ganz besonders aber danke ich Annette. Sie hat die Höhen und Tiefen der letzten Jahre direkt miterlebt, mitgelitten, sich mitgefrenut. Dafür, dass sie das so wollte, liebe ich sie!