

Fs-Laser-Transfektion - Gen-Transfer mittels ultrakurzer Laserpulse

Von der Fakultät Mathematik und Physik
der Gottfried Wilhelm Leibniz Universität Hannover

zur Erlangung des Grades
Doktorin der Naturwissenschaften
Dr. rer. nat.
genehmigte Dissertation

von
Dipl.-Phys. Judith Baumgart
geboren am 04.04.1980 in Hannover

2009

Referent: Prof. Dr. Alexander Heisterkamp
Korreferent: Prof. Dr. Anaclet Ngezahayo
Tag der Promotion: 29.04.2009

Zusammenfassung

Der Gen-Transfer von exogener Desoxiribonukleinsäure (DNA) in eine Zelle ist eine unverzichtbare Methode der Zellbiologie. Alle derzeit etablierten Methoden besitzen jeweils verschiedene Nachteile, wobei allen gemein ist, dass sie speziell für Stamm- und Primärzellen oft nicht geeignet sind. Eine neuartige Methode ist die Verwendung von ultrakurzen Laserpulsen zur Permeabilisierung der Zellmembran. Aufgrund der Nichtlinearität der Wechselwirkung ist es mittels der laserbasierten Zellchirurgie möglich, sehr präzise und schonend zu manipulieren und so die Zellmembran zu eröffnen. Darüber hinaus verspricht dieses Verfahren unabhängig vom Zelltyp zu sein, so dass es als Transfektionsmethode universell einsetzbar ist.

Ziel dieser Arbeit war es, die Transfektion mittels ultrakurzer Laserpulse zu etablieren und zu charakterisieren. Der Mechanismus dieses Verfahrens wurde mittels optischer und elektrophysiologischer Methoden untersucht, und es wurde anhand von verschiedenen Zelltypen erfolgreich angewendet. Darüber hinaus wurden die chemischen Nebeneffekte der Transfektion mittels fs-Laserpulsen untersucht, mit dem Ziel, die Begleiterscheinungen der Behandlung zu minimieren und damit die Effizienz und die Viabilität der Zellen zu steigern.

Die Transfektion wurde erfolgreich mit einer Effizienz von 70%, unter Verwendung der ermittelten optimalen Laserparametern für die Perforation (0,9 nJ, 40 ms, 90 MHz) an verschiedenen Zelllinien etabliert, wobei eine Viabilität von 90% erreicht wurde. Mittels der Patch-Clamp Technik konnte die Membranpotentialänderung bestimmt werden, die Aufschluß auf die maximale Permeabilisierungszeit von etwa 60 ms gab und eine Quantifizierung der Transfektion ermöglichte (relativer Volumenaustausch 40%), die mittels Fluoreszenzmikroskopie und vorhergehender Kalibrierung experimentell verifiziert wurde.

Der laserinduzierte Nebeneffekt der Erzeugung von Sauerstoffradikalen (ROS) konnte bei der Zellchirurgie in Abhängigkeit von der verwendeten Pulsenergie und der Repetitionsrate des Lasers nachgewiesen werden. Die mehrfache Bestrahlung einer Zelle zeigte, dass bei der ROS-Erzeugung im kHz- und im MHz-Regime unterschiedliche Reaktionen ausschlaggebend waren. Insgesamt wurde bei Verwendung von kHz-Pulszügen weniger ROS produziert als bei MHz-Pulszügen. Die Membranpermeabilisierung wurde zusätzlich bezüglich des Einflusses der Calcium-Konzentrationsänderung (Ca^{2+}) auf das molekulare Gleichgewicht der Zellen untersucht. Dabei wurde die Ca^{2+} -Konzentration im kHz-Regime stärker erhöht als im MHz-Regime; die Störung des Gleichgewichtes äußerte sich in Ca^{2+} -Oszillationen. Als effektive und wichtige Möglichkeit die Störung der Ca^{2+} -Homöostase und die ROS-Erzeugung zu unterdrücken stellte sich die Perforation der Zellen in Ca^{2+} -freiem Medium sowie die Zugabe von Ascorbinsäure heraus.

Die Kombination aus Streulichtdetektion, Kurzzeitphotographie und Patch-Clamp Technik ermöglichte die Detektion und Verifizierung der Entstehung einer Gasblase als visuelles Signal für eine erfolgreiche Permeabilisierung der Membran. MHz-Pulszüge erzeugten dabei einen größeren Volumenaustausch für den Gen-Transfer als kHz-Pulse. Die erfolgreiche Transfektion von rekombinanten Vektorplasmiden zeigte die Funktionalität der DNA. In einer Langzeitstudie konnte zudem gezeigt werden, dass die codierten Proteine bereits wenige Stunden nach der Behandlung exprimiert werden können. Die Sensitivität und Selektivität dieser Methode konnte mit der erfolgreichen Transfektion primärer Neuronen in Mischkultur mit Gliazellen erstmalig demonstriert werden.

Durch die in dieser Arbeit gewonnenen Erkenntnisse wurden die Mechanismen und die zeitliche Einordnung der Abläufe der Transfektion auf einer Zeitskala von wenigen Millisekunden bis mehrere Tage untersucht. Die Zugabe von geeigneten Adjuvantien eröffneten darüber hinaus die Möglichkeit, die Effizienz der Transfektion weiter zu erhöhen. Insbesondere wurden neben etablierten Zelllinien sogar sensible Primärzellen erfolgreich transfiziert. Die fs-Laser-basierte Transfektion konnte somit im Rahmen dieser Dissertation als hervorragend geeignete Methode mit hoher Effizienz und großem Potential etabliert, charakterisiert und optimiert werden.

Schlagnworte: Transfektion, Zellchirurgie, Femtosekundenlaser, ROS, Calcium, Primärzellen

Abstract

Gene transfer of exogene deoxyribonucleic acid (DNA) in cells is an important method used in cell biology. The established techniques have all several disadvantages, especially, that they are not suitable for the use with stem and primary cells. The use of ultrashort laser pulses to permeabilize the cell membrane is a new method for transfection. Due to the nonlinearity of the interaction, the membrane can be opened precisely and gently by using laser-based cell surgery. Additionally, this technique might be independent of the cell type, and therefore ubiquitously applicable.

The objective of this study was to establish and characterize the transfection using ultrashort laserpulses. The mechanism of this technique was investigated using optical and electrophysiological methods, and was successfully applied to different cell types. Additionally, the chemical side effects of fs-laser based transfection were investigated in order to minimize the implications and, thus, to increase the efficiency and the viability of the cells.

The transfection was successfully established and performed on different cell types, achieving an efficiency of 70% and a viability of 90% at the determined optimum laser parameters for perforation (0.9 nJ, 40 ms, 90 MHz). The membrane potential was measured using the patch-clamp technique, which gives information about the maximum time of permeabilization of 60 ms on average, and which provides the possibility of a quantification of transfection (relative exchanged volume of 40%), which was experimentally verified by fluorescence microscopy and previous intensity calibration.

The reactive oxygen species (ROS) formation as a side effect of the laser irradiation was determined in dependence of the pulse energy and the repetition rate. A multiple exposure of the cell showed a difference between the mechanisms of ROS formation due to kHz pulse trains and MHz pulse trains. Altogether, in the kHz regime, fewer ROS were produced compared to the MHz regime. Additionally, the effects of the calcium (Ca^{2+}) concentration change during membrane permeabilization were investigated regarding the cellular homeostasis. The increase of Ca^{2+} concentration was less during the exposure of MHz pulse trains, compared to kHz pulse trains; the disturbance of the Ca^{2+} homeostasis was expressed by Ca^{2+} oscillations. The perforation in Ca^{2+} free medium and the addition of ascorbic acid turned out to be a very important and effective method to suppress the disturbance of the Ca^{2+} homeostasis.

The combination of scattered light detection, high speed photography and patch-clamp technique provided the detection and verification of gas bubble formation as a visual signal for successful membrane permeabilization. The amount of volume exchange for the gene transfer was larger due to MHz pulse trains compared to kHz pulse trains. The functionality of the transferred DNA was demonstrated by successful transfection of recombinant vector plasmids. A time lapse experiment showed that the proteins the DNA was coded for were expressed only a few hours after the treatment. The sensitivity and selectivity of the technique was demonstrated by the successful transfection of primary neurons in mixed culture with glial cells.

The scientific findings of this work the mechanisms and the temporal placement of the sequences of transfection on a time scale between several milliseconds to several days were studied. The addition of adequate additives offers the opportunity to increase the efficiency of transfection. Established cell types in particular sensitive primary cells were successfully transfected. Within the scope of this work, the fs-laser based transfection method was established, characterized and optimized as an excellent technique with high efficiency and a wide potential.

Keywords: transfection, cell surgery, femtosecond laser, ROS, calcium, primary cells

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung	iii
Abstract	v
1 Einleitung	1
1.1 Gen-Transfer in der Biologie	1
1.2 Klassische Transfektionsmethoden	2
1.3 Laserbasierte Transfektion	5
2 Ultrakurzpuls laser in der Zellchirurgie	11
2.1 Propagation ultrakurzer Pulse in transparenten Medien	11
2.1.1 Nichtlineare Wechselwirkung von Laserstrahlung mit biologischem Gewebe	12
2.1.2 Abtragsmechanismen bei Repetitionsraten im kHz- und MHz-Regime . .	16
2.1.3 Nichtlineare Effekte	17
2.1.4 Auswirkungen der nichtlinearen Effekte in der Mikroskopie und Zellchirurgie	21
2.2 Lasersystem	24
2.2.1 Titan-Saphir-Laser	24
2.2.2 Akusto-optischer Modulator	27
2.3 Multiphotonenmikroskopie	27
2.3.1 Nichtlineare Fluoreszenzanregung	28
2.3.2 Vergleich mit konventioneller und konfokaler Mikroskopie	29
3 Die eukaryotische Zelle	33
3.1 Aufbau der eukaryotischen Zelle	33
3.1.1 Die Zellmembran	35
3.1.2 Der Zellkern	37
3.1.3 Die Mitochondrien	38
3.2 Molekulare Signalwege der Zelle	41
3.2.1 Reaktive-Sauerstoffspezies-Signale	41
3.2.2 Calcium-Signale	42
3.2.3 Aktivationskaskade der Apoptose	43
3.3 Das Membranpotential	45

4	Messung der molekularen Reaktion der Zelle auf die Applikation von fs-Laserpulsen	49
4.1	Experimenteller Aufbau und Versuchsdurchführung	49
4.2	Nebeneffekte bei der Kernmanipulation	51
4.2.1	Abhängigkeit der ROS-Erzeugung von der Repetitionsrate	52
4.2.2	Einfluss von vorhergehenden Pulszügen im kHz und MHz Regime	54
4.3	Nebeneffekte bei der Mitochondriendisruption	57
4.3.1	Erzeugung von ROS durch fs-Laserpulse im kHz und MHz Regime	58
4.3.2	Apoptose durch Mitochondrienmanipulation	61
4.4	Nebeneffekte bei der Membranperforation	62
4.4.1	ROS-Erzeugung durch fs-Laser Pulse im kHz und MHz Regime	63
4.4.2	Calcium-Influx durch fs-Laser Pulse im kHz und MHz Regime	65
4.5	Fazit der ROS- und Ca^{2+} -Studie und Auswirkungen auf die Zellchirurgie	69
5	Fs-Laser basierter Gen-Transfer	71
5.1	Mechanismus der Membranperforation	71
5.1.1	Experimenteller Aufbau und Patch-Clamp Technik	72
5.1.2	Untersuchungen zur Membranpermeabilisierung	74
5.1.3	Untersuchung der Blasenenerzeugung und der Membranpotentialänderung	76
5.1.4	Berechnung des Volumenaustauschs nach Nernst und Goldman	80
5.1.5	Experimenteller Nachweis des Volumenaustauschs	81
5.2	Viabilität der Zellen und Effizienz der Membranperforation	84
5.2.1	Viabilitäts- und Effizienznachweis durch Propidium Jodid	84
5.2.2	Langzeitnachweis von Apoptose durch Annexin V	86
5.3	Gen-Transfer von DNA	88
5.3.1	Transfektion und Funktionalitätsnachweis der rekombinanten und nicht-rekombinanten GFP-Plasmide	89
5.3.2	Transfektion von Primärzellen	91
5.4	Fazit der Opto-Poration als Transfektionsmethode	92
6	Diskussion und Ausblick	95
	Literaturverzeichnis	107
A	Eigenschaften und Merkmale der Farbstoffe und Herstellung der Plasmide	121
B	Präparation der Zellen	125
C	Liste der Veröffentlichungen	129
D	Lebenslauf	131

1 Einleitung

Das Einbringen von exogener DNA (engl. *desoxyribonucleic acid*, Desoxyribonukleinsäure) in eine lebende Zelle, die so genannte Transfektion, ist eine häufig angewendete Methode in der Molekularbiologie. Die Bedeutung dieser Technologie wurde unterstrichen durch die Verleihung des Nobelpreises 2008 für die Entwicklung von GFP (engl. *green fluorescent protein*, grün fluoreszierendes Protein), das als Lebendfarbstoff fungiert und in Form von DNA in die Zelle gebracht wird. Die Zellen stellen dann die fluoreszierenden Proteine selbst her, so dass keine toxischen Farbstoffe benötigt werden.

1.1 Gen-Transfer in der Biologie

Damit fremde DNA in die Zelle gelangen kann, muss zunächst die Zellmembran überwunden werden, die die gesamte Zelle umschließt. Diese ist impermeabel für die DNA-Moleküle, da die Zelle grundsätzlich ihr eigenes Genom vor Veränderung schützt. Die DNA kann dennoch über unterschiedliche Hilfsmittel durch die Membran hindurch geschleust werden. Anschließend muss diese in den Kern gelangen und wird dort wie die endogene DNA behandelt.

Bei der Transfektion sind die Effizienz des Gen-Transfers und die Überlebensrate der Zellen von entscheidender Bedeutung. Viele Methoden wurden hierfür entwickelt, die jeweils Vor- und Nachteile haben. Typischerweise sind Verfahren, die wenige oder einzelne Zellen transfizieren in ihrer Effizienz und Überlebensrate sehr gut, aber auf einen kleinen Durchsatz limitiert. Methoden für große Zellpopulationen sind häufig wenig effizient und haben prozentual hohe Verluste durch Apoptose¹ oder Nekrose². Insbesondere Primär- und Stammzellen sind nicht prädestiniert oder gar nicht mit diesen Methoden zu transfizieren, da die geringe Population dieser Zellen keine großen Verluste erlaubt. Im Folgenden werden die am häufigsten verwendeten chemischen, biologischen und physikalischen Verfahren für die Transfektion beschrieben. Unterschieden wird dabei von der Transduktion, die den virusvermittelten Gentransfer bezeichnet.

¹Programmierter Zelltod.

²Zelltod, der durch akute Schädigung verursacht wurde.

1.2 Klassische Transfektionsmethoden

Als chemische Verfahren gelten die Calcium-Phosphat-Präzipitation, die Lipofektion und die Zuhilfenahme von kationischen Polymeren. Die Calcium-Phosphat-Präzipitation, die nur bei adhärennten Zellen angewendet werden kann, wurde 1973 von F.L. Graham und A.J. van der Eb entwickelt [Gra73]. Die einzubringende DNA bindet sich in einem Gemisch aus Calciumchlorid und Natriumphosphat an ausfallendes, kristallines Calciumphosphat, welches in das Zellmedium gegeben wird. Die Kristalle setzen sich auf den adhärennten Zellen ab und werden durch Endozytose³ von diesen aufgenommen [Loy82, Wil97].

Bei der Lipofektion wird die DNA mit Hilfe von Liposomen⁴ in die Zelle eingebracht (siehe Abbildung 1.1) [Gra77, Wil79, Fra80, Fel87, Fel95]. Dabei wird die DNA in das Lumen unilamellarer Phospholipidvesikel eingeschlossen oder an der Oberfläche kationischer Lipidvesikel gebunden. Das älteste und in der Regel verträglichste der chemischen Verfahren ist die Komplexierung von Plasmid-DNA mit kationischen Polymeren oder Dendrimeren. Die positiv geladenen und stark verzweigten Polymere werden von den Zielzellen aufgenommen [Vah65, McC68, War68, Bur68, Nic72, Las96]. Grundsätzlich sind bei den chemischen Verfahren die Effizienz, die Toxizität und die Reproduktivität kritische Parameter [Wol99, Sti03].

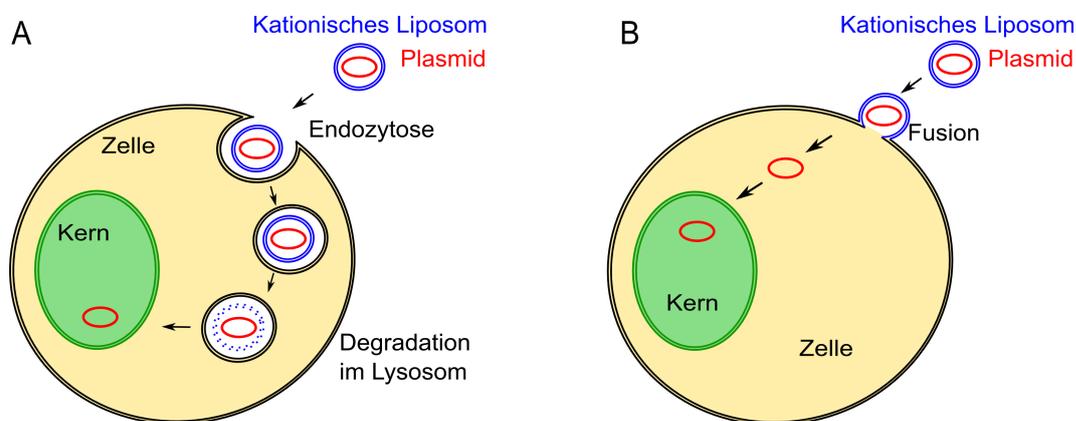


Abbildung 1.1: Schematische Darstellung der zwei Hauptwege der Lipofektion. A) Über Endozytose und B) direkte Fusion mit der Zellmembran. Der endozytotische Weg geschieht durch die Formierung von Endosomen, die eventuell zur Zerstörung der Plasmid-DNA führen kann, bevor diese ins Zytoplasma gelangen kann (nach [Tem02]).

³Einstülpungsvorgang der Biomembran, bei dem sich eine Einzelzelle oder ein Kompartiment einen Flüssigkeitstropfen, bestimmte darin gelöste Substanzen, Makromoleküle oder größere Nahrungsteilchen bis hin zu kleineren anderen Zellen, einverleibt.

⁴Bestimmte, kugelförmige Anordnung von oberflächenaktiven Molekülen in einer Flüssigkeit.

Zu den biologischen Methoden zählen die Transferrinfektion und die Antikörper vermittelte Transfektion. Für die Transferrinfektion wird ein Konjugat aus dem Eisentransportprotein Transferrin und kationischem Poly-Lysin hergestellt, welches Plasmid-DNA bindet. Die Zelle transportiert dieses Konjugat in die Lysosomen⁵, wo die DNA freigesetzt wird und durch die lysosomale Membran hindurch in den Zellkern gelangt [Wag90, Zen90, Zat92]. Dieses Verfahren hat eine besonders hohe Effizienz für Zelllinien mit hoher Dichte an Transferrinrezeptoren.

Bei der Antikörper-vermittelten Transfektion wird für das Konjugat anstatt des Transferrins ein Antikörper verwendet. Antikörper haben eine besonders hohe Spezifität und binden daher nur an Moleküle, die an ihre Antigen bindende Stelle passt. Die für die Transfektion genutzten Antikörper sind gegen ein für die Zielzelle spezifisches Membranprotein kodiert und über dieses wird die daran gebundene Plasmid-DNA in die Zelle transportiert [Str69, Hav70, Fel72, Chi04].

Die klassischen physikalischen Verfahren sind die Mikroinjektion, die Partikel-Pistole und die Elektroporation. Bei der Mikroinjektion wird mit Hilfe von einer Glaskapillare die Plasmid-DNA in das Zytoplasma oder direkt in den Vorkern injiziert (siehe Abbildung 1.2) [Mue78, Gra79a, Gra79b, Cap80, She82]. Die Transfektionseffizienz für diese Methode ist nahezu 100% und kann im Gegensatz zu anderen Verfahren auch mit mitotisch ruhenden Zellen umgesetzt werden, da die Kernmembran mit der Kapillare überwunden wird. Allerdings ist die Anzahl der so transfizierten Zellen mit 60 bis 200 Zellen pro Stunde sehr gering.



Abbildung 1.2: Die Injektion einer DNA haltigen Lösung in den Vorkern eines einzelligen Mausembryos [DKF08].

Für die Partikelpistole wird die DNA an Projektile adsorbiert, z.B. Wolframpartikel, die auf einem Träger fixiert werden (siehe Abbildung 1.3). Der Träger wird durch vorkomprimiertes Gas beschleunigt und durch ein grobmaschiges Aufprallsieb abrupt gebremst. Dabei lösen sich die Partikel vom Träger, die erst an der Zelle abgebremst werden, so dass sich die DNA löst [Kle87, Yan90, Che93, Qiu96, Hay96]. Diese Methode ist durch die große mechanische Kraft

⁵Membranvesikel, die körperfremde Proteine und Substanzen durch enzymatische Prozesse verdauen.

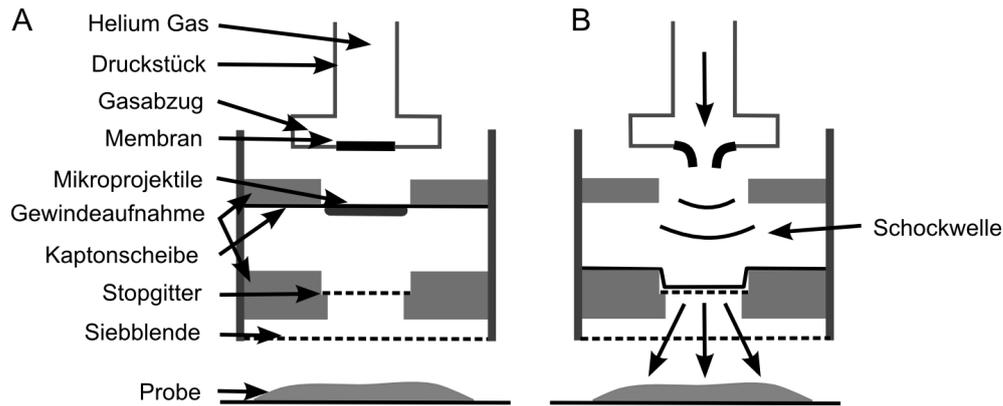


Abbildung 1.3: Schematische Darstellung der Partikelpistole. Die DNA ist an die Mikroprojekteile gebunden, die sich an der Kaptonscheibe befinden. Durch expandierendes Gas (z.B. Helium) wird eine Schockwelle ausgelöst, die die Partikel durch das Stoppgitter hinweg beschleunigt, das die Kaptonscheibe zurückhält. Hinter der Siebblende treffen die Partikel auf die Probe und durchdringen die Zellmembran, wobei sich die DNA von den Partikeln löst. A) Aufbau vor dem Abschuss, B) Ablauf der Transfektion durch die Projektilen, die durch die gasinduzierte Schockwelle beschleunigt werden.

resultierend aus der starken Beschleunigung besonders für Pflanzenzellen geeignet. Diese besitzen eine dicke Zellwand, die eine Barriere darstellt, die für die anderen beschriebenen Methoden zu stark ist [Ye90, Ogu05], während die Methode für sensible Zellen jedoch zu invasiv ist.

Die Elektroporation permeabilisiert die Zellmembran, indem die Zellen Spannungspulsen ausgesetzt werden (siehe Abbildung 1.4) [Won82, Shi88, Wea96]. Die Zellmembran kann modellhaft als Plattenkondensator beschrieben werden, denn die Doppel-Lipid-Schicht wirkt wie ein Isolator, der keinen (bzw. einen geregelten) Ionenfluss zwischen intra- und extrazellulärer Lösung zulässt. Elektrischer Strom kann demnach solange nicht durch die Zelle fließen, bis Poren entstanden sind. Durch eine Spannung von 0,4 bis 1 V kommt es zu lokalen Störungen der Membranintegrität und somit zu einer Porenbildung mit einer Lebensdauer von wenigen Millisekunden bis einige Minuten [Kin79, Che83, Neu89]. In dieser Zeit diffundiert die in der extrazellulären Lösung befindliche DNA in die Zelle hinein. Anschließend reorganisiert die Membran sich selbst, so dass die Zelle überleben kann [Sau91]. Allerdings sterben hierbei etwa 50 bis 80% der Zellen, wodurch die Elektroporation insbesondere für Primär- oder Stammzellen aufgrund ihrer limitierten Zellpopulationen ungeeignet ist [Men05].

Eine weitere Methode des Gentransfers ist die so genannte Transduktion. Die DNA oder RNA wird in Viruspartikel eingebaut und über diese in die Zelle injiziert. Die Transduktion bedient sich der für Viren typischen Eigenschaft, über Rezeptoren gezielt in Wirtszellen einzudringen [Wal00]. Hierzu werden je nach Anwendung Adeno-assoziierte Viren (AAV), Adenoviren, Herpesviren

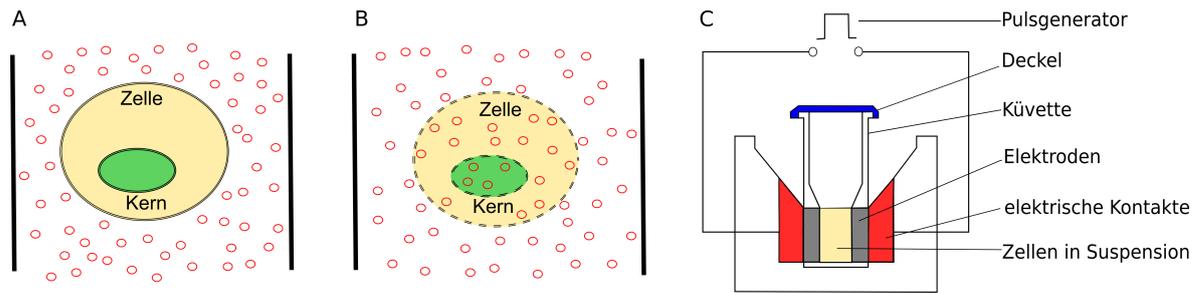


Abbildung 1.4: Permeabilisierung der Zellmembran durch elektrische Pulse. A) Die Plasmid-DNA befindet sich im extrazellulären Medium und B) diffundiert durch die permeabilisierte Membran. C) Schematische Darstellung des Aufbaus für die Elektroporation. Elektrische Pulse werden vom Pulsgenerator über die Elektroden an die Zellsuspension weiter geleitet und damit die Zellmembran permeabilisiert.

und Retroviren (Lentiviren) eingesetzt. Der Nachteil dieser Methode liegt in der Verwendung von Viruspartikeln, die in die Zelle eingebracht werden. Es kann dabei nicht ausgeschlossen werden, dass diese die Zelle und deren weitere Entwicklung verändern und beispielsweise eine Immunreaktion auslösen [Wol99, Sti03]. Deshalb ist diese Methode insbesondere für humane Anwendungen nicht geeignet.

Zusammenfassend bieten die beschriebenen Methoden jeweils für ihre spezifische Anwendung eine gute Umsetzung der Transfektion. Da die unterschiedlichen Verfahren jedoch alle deutliche Nachteile bei Verwendung für Primär- und Stammzellen vorweisen, ist diesbezüglich weitere Entwicklung von schonenden Methoden notwendig. Insbesondere fehlt ein Verfahren, das universell für alle Zelllinien anwendbar ist. Eine optische Transfektion mittels Lasermanipulation bietet hierfür ein viel versprechendes Potential.

1.3 Laserbasierte Transfektion

Die laserbasierte Transfektion beruht, ähnlich wie die Elektroporation, auf dem Prinzip der Perforation der Zellmembran, um eine Diffusion der im extrazellulären Medium befindlichen DNA in die Zelle zu erreichen.

Der Laserstrahl wird dazu auf die Membran der zu transfizierenden Zelle fokussiert (siehe Abbildung 1.5). Durch die Wechselwirkungen zwischen der Strahlung und den Membranmolekülen wird die Struktur der Doppel-Lipid-Schicht aus dem Gleichgewicht gebracht [Tir02, Vog05, Ste06]. Die Lasereigenschaften und -parameter spielen bei dieser Methode eine große Rolle. Die so genannte Opto-Poration der Membran wurde sowohl mit sichtbaren bis ultravioletten cw-

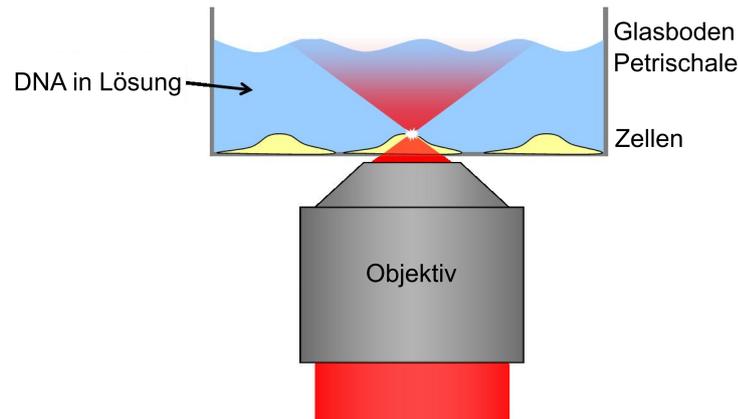


Abbildung 1.5: Schematische Darstellung der laserbasierten Transfektion. Der Laser wird auf die Zellmembran fokussiert und durch die entstandene Perforation der Membran diffundiert die im extrazellulären Medium befindliche Plasmid-DNA in die Zelle hinein.

Lasern oder gepulsten Lasern bis einige Nanosekunden-Pulsen [Tsu84, Tao87, Pal96, Moh03, Ter04, Pat05] als auch mit nahinfraroten Ultrakurzpulslasern (fs-Laser) durchgeführt [Tir02, Koh05, Ste06, Pen07, Zei07, Bro08, Uch08]. Dabei liegt der große Vorteil von den sichtbaren Lasern im Anschaffungspreis. Für die Viabilität der Zellen hat jedoch der fs-Laser deutliche Vorteile. Bei Verwendung von nahinfraroten Ultrakurzpulslasern beruht die Wechselwirkung zum Abtrag auf nichtlinearer Absorption, da die lineare Absorption in diesem Spektralbereich vernachlässigbar klein ist. Die nichtlinearen Effekte sind auf das fokale Volumen beschränkt, da nur dort eine ausreichend hohe Photonendichte herrscht, um Mehrphotonenprozesse anzuregen. Die Perforation der Zellmembran ist demnach auf die Einstrahlfläche des Laserfokus limitiert [Tir02, Vog05, Hei05a]. Für die Zelle bedeutet dies eine wesentlich schwächere Schädigung als im Vergleich zur Elektroporation, bei der die gesamte Membran perforiert wird. Dennoch muss ein Kompromiss aus der kleinsten Schädigung und der höchsten Effizienz für DNA-Transfer in die Zelle eingegangen werden.

Durch Verwendung von UV-Lasern sind zusätzlich zum großen Wechselwirkungsvolumen aufgrund von linearer Absorption Schädigungen der DNA möglich, die durch die nahinfrarote Wellenlänge von fs-Lasern umgangen wird [Tad03, Vel05, Cal06]. Eine Schädigung der exogenen DNA im Fokusvolumen kann durch einen Funktionalitätsnachweis über die exprimierten Moleküle nachgewiesen werden. Wie bei der Mikroinjektion ist die laserbasierte Transfektion höchst selektiv und auf einzelne Zellen beschränkt. Da die Permeabilisierung nur von der nichtlinearen Absorption abhängig ist, besteht keine Beschränkung für die Anwendung auf bestimmte Eigenschaften der Zelllinie.

Während der fs-Laser-basierten Zellmanipulation werden unerwünschte photochemische Nebeneffekte erzeugt, die gegebenenfalls Apoptose oder Nekrose auslösen können. Bereits bei kleiner Durchschnittsleistung ab etwa 7 mW bei einer Wellenlänge von 800 nm werden reaktive Sauerstoffspezies (ROS) erzeugt [Tir01b]. Während der Dissoziation von Material im Laserfokus entstehen ebenfalls ROS [Koe99a, Tir01b, Vog02, Bot07]. Unter normalen Bedingungen sind diese wichtige, hochreaktive Moleküle in den Signalwegen der Zelle. Die Erzeugung von zusätzlichen ROS-Molekülen durch Lasereinstrahlung kann dazu führen, dass die Enzyme und Antioxidantien nicht ausreichend ROS reduzieren können und die Zelle geschädigt wird oder Apoptose bzw. Nekrose eintritt.

Durch die Perforation der Membran kann neben ROS insbesondere extrazelluläres Calcium (Ca^{2+}) in die Zelle gelangen oder aus den zelleigenen Speichern freigesetzt werden [Koe99a, Smi01a, Day06, Cra06]. Ca^{2+} ist ein wichtiges Molekül für die zellulären Signalwege und ist beispielsweise bei der Zellteilung, Muskelkontraktion und synaptischer Signalübertragung ausschlaggebend. Eine Störung der Ca^{2+} -Homöostase mit überhöhter Ca^{2+} -Konzentration oder leichter aber lang anhaltender Anstieg kann tödlich sein [Ber98]. Deshalb muss auch dies für eine mögliche Schädigung der Zelle berücksichtigt werden.

Neben dem geringen Schädigungspotential der laserbasierten Transfektion beispielsweise im Vergleich zu der häufig verwendeten Elektroporation bietet diese Methode eine hohe Selektivität. In Mischkulturen könnten gezielt bestimmte Zellen transfiziert werden, die etwa durch ihre Morphologie oder eine geeignete Markierung von den übrigen Zellen unterscheidbar sind. Es ist demnach möglich, unterschiedliche Zelllinien ohne Zusatz von Reagenzien mit dem fs-Laser berührungsfrei und steril zu perforieren und somit eine Transfektion zu erreichen. Dies eröffnet die Anwendung mit besonders sensitiven Zellen mit kleiner Population wie Stamm- oder Primärzellen, die durch die klassischen Methoden nicht zufrieden stellend transfiziert werden können. Insbesondere bei humanen Applikationen bietet die Opto-Perforation große Vorteile, da besonders in diesem Feld der Forschung Viren oder chemische Zusätze vermieden werden sollten.

Ein Beispiel für den Gen-Transfer als Anwendung in der Biologie bzw. Medizin liegt in der Immuntherapie, bei der eine zelluläre Impfung (Vakzinierung) durchgeführt wird. Dafür werden immunstimulatorische Zellen mit bestimmten Eigenschaften in den Organismus gebracht. Beispielsweise wird mit Tumorantigen-beladenen dendritischen Zellen⁶ eine spezifische Immunreaktion gegen einen bestimmten Tumortyp induziert. Zur Steigerung der so genannten

⁶Zellen des Immunsystems. Durch Ausschüttung entsprechender Zytokine und Expression bestimmter Zelloberflächen-Rezeptoren beeinflussen sie T-Zellen und verstärken so die spezifische zelluläre Immunabwehr. Ihrem Namen entsprechend haben sie typische Zytoplasma-Ausläufer (lat. dendriticus = verzweigt).

Vakzinierungseffizienz, kann die Antigenität bzw. das entzündungsinduzierte Potential der dendritischen Zellen über entzündungsfördernde Faktoren gesteigert werden.

Ein solcher Faktor ist das High Mobility Group Box 1 (*HMGB1*) Protein. Aktivierte Makrophagen⁷ setzen das *HMGB1* Protein frei, das Zytokinwirkung⁸ besitzt und Entzündungsprozesse fördert [Goo73, Bus90, Bus99, Sca02, Mur03, Lot05, Wan05, Yam07]. Es steigert demnach die inflammatorische Immunantwort bei Gewebenekrose und kann auch von dendritischen Zellen exprimiert werden. Eine Herausforderung in der Immuntherapie ist, Stammzellen mit einem Plasmid zu transfizieren, das für das *HMGB1* Protein codiert ist, so dass die daraus differenzierten dendritischen Zellen dieses Protein exprimieren. Sie besäßen folglich eine körpereigene, gesteigerte immunstimulatorische Potenz, so dass die Anregung des autologen Immunsystems nach Stammzelltransplantation gesteigert ist (siehe Abbildung 1.6). Dadurch können sie die Immunabwehr spezifisch aktivieren und so beispielsweise vorliegende Krebszellen bekämpfen.

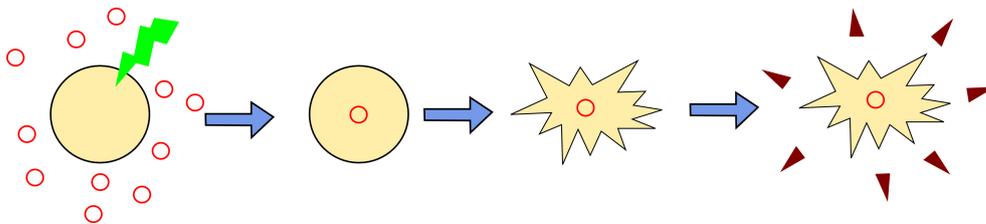


Abbildung 1.6: Schema für Transfektion, Differenzierung und Exprimierung von Stammzellen. Die Stammzelle (rund) wird zunächst in Anwesenheit von Plasmiden (rote Kreise) transfiziert (grüner Blitz). Die DNA wird in den Kern der Zelle transportiert. Die Stammzelle wird in eine dendritische Zelle differenziert (spitz) und exprimiert die vorgesehenen Proteine (rote Dreiecke).

Das Expressionsverhalten⁹ der in die differenzierten dendritischen Zellen eingebrachten rekombinanten Proteine muss charakterisiert werden, bevor sie für die Therapie eingesetzt werden können. Für eine optische Kontrolle der erfolgreichen Transfektion der Stammzelle mit dem *HMGB1*-Plasmid, kann das Plasmid mit der Codierung für GFP ergänzt werden [Pra92, Cha94], so dass das GFP an das *HMGB1*-Molekül gekoppelt exprimiert wird. Da das *HMGB1* Protein ausschließlich im Kern vorhanden ist, fluoresziert nur dieser Bereich der transfizierten Zelle [Har04, Mü04, Alt08, Bau08]. Wenn mit dieser Methode die erfolgreiche Transfektion gezeigt worden ist, werden die Zellen mit einem nicht-rekombinanten Plasmid transfiziert, so dass das *HMGB1*-Molekül ohne weitere Kopplung synthetisiert wird.

⁷Zellen des Immunsystems.

⁸Ein Zytokin ist ein zuckerhaltiges Protein, das regulierende Funktionen für das Wachstum und die Differenzierung von Körperzellen ausübt.

⁹Expression ist die Biosynthese von RNA und Proteinen (Proteinbiosynthese) aus den genetischen Informationen.

Im Folgenden wird in dieser Arbeit in Kapitel 2 zunächst auf die Erzeugung von ultrakurzen Pulsen sowie die Wechselwirkungen bei Propagation durch biologisches Gewebe eingegangen. Besonderes Augenmerk liegt dabei auf den Abtragsmechanismen im Parameterbereich von starker Fokussierung und kleinen Pulsenergien für die Zellchirurgie.

Kapitel 3 behandelt die Grundlagen der Zellbiologie für das Verständnis der molekularen und zellulären Abläufe während der Zellchirurgie. Es werden insbesondere die für diese Arbeit wesentlichen Zellorganellen und molekulare Signalwege in Bezug auf reaktiven Sauerstoff und Ca^{2+} in der Zelle bis hin zum programmierten Zelltod beschrieben.

Im 4. Kapitel wird der experimentelle Aufbau und die Durchführung der Versuche zu den molekularen, intrazellulären Reaktionen auf die Lasereinstrahlung des fs-Lasers eingegangen. Die Auswirkungen der Manipulation auf die Zellen werden in Abhängigkeit von der Pulsfolgefrequenz (Repetitionsrate) und der Pulsenergie beschrieben, besonders der Unterschied zwischen hohen und niedrigen Repetitionsraten im MHz und kHz Bereich in Bezug auf die Konzentrationen von ROS- und Ca^{2+} -Molekülen.

Das 5. Kapitel behandelt die Opto-Perforation als schonende Transfektionsmethode. Besonders die Quantifizierung über den Volumenaustausch während der Transfektion sowie die Effizienz der Perforation und Viabilität der Zellen werden dargestellt. Zusätzlich wird die erfolgreiche Transfektion von caninen ZMTH3 und MTH53a Zellen sowie von Primärneuronen der Maus gezeigt.

Abschließend werden im letzten Kapitel die in dieser Arbeit beschriebenen Ergebnisse der Experimente diskutiert. Des Weiteren wird ein Ausblick auf folgende Arbeiten gegeben, insbesondere im Hinblick auf eine Automatisierung und Effizienzsteigerung der Methode.

2 Ultrakurzpulslaser in der Zellchirurgie

In der fs-Laser basierten Zellchirurgie wird typischerweise mit einem Titan-Saphir-Lasersystem gearbeitet. Sehr geringe Pulsenergien im nJ-Bereich von einem Laser-Oszillator-System reichen aus, um mittels starker Fokussierung mit einem Objektiv mit hoher numerischer Apertur (NA) einzelne Zellen schonend und sehr präzise zu bearbeiten. Die Pulsfolgefrequenz (Repetitionsrate) eines solchen Oszillators ist dabei durch die Resonatorlänge definiert und liegt typischerweise zwischen 70 und 90 MHz. Die Repetitionsrate des Oszillators kann mit einem schnellen Schalter moduliert werden, der einzelne Pulse selektiert und beispielsweise durch einen akusto-optischen Modulator (AOM) realisiert werden kann. Damit kann auf die verschiedenen Ansätze der Zellchirurgie basierend auf kHz- oder MHz-Repetitionsraten zurückgegriffen werden.

Propagiert ein ultrakurzer Puls durch biologisches Gewebe hängt die Laser-Gewebe-Wechselwirkung stark von der Intensität und der Einstrahldauer sowie von der Puls-zu-Puls-Wechselwirkung ab. Zusätzlich wird der Laserpuls durch die intensitätsabhängige Änderung der nichtlinearen optischen Eigenschaften des Materials in seinem zeitlichen und räumlichen Profil modifiziert. Im Folgenden werden daher zunächst die Laser-Gewebe-Wechselwirkungen und die nichtlinearen Effekte bei der Propagation der ultrakurzen Pulse in transparenten Medien sowie der verwendete Titan-Saphir-Laser und der AOM beschrieben.

Der gleiche Laser, der für die Manipulation der Zellen verwendet wird, dient der präzisen Darstellung der Probe mittels Multiphotonenmikroskopie. Diese Methode wird abschließend in diesem Kapitel dargestellt und mit anderen, konventionellen fluoreszenzmikroskopischen Methoden verglichen.

2.1 Propagation ultrakurzer Pulse in transparenten Medien

Die Wechselwirkung von ultrakurzen Pulsen mit biologischem Material können nach linearer und nichtlinearer Absorption des Lichtes als Ursache unterteilt werden. Für die Zellchirurgie sind hierbei besonders die Photoablation als linearer und die Photodisruption als nichtlinearer

Ablationsmechanismus relevant. Zusätzlich zu der Wechselwirkung durch Absorption, beeinflussen Effekte während der Propagation der Pulse, die auf dem Brechungsindex basieren, den ultrakurzen Puls im Spektrum, der Dauer und der Intensitätsverteilung und werden daher ebenfalls im Bezug auf die Lasermanipulation betrachtet.

2.1.1 Nichtlineare Wechselwirkung von Laserstrahlung mit biologischem Gewebe

Die Laser-Gewebe-Wechselwirkung teilt sich abhängig von der Intensität und der Einstrahldauer in fünf verschiedene Prozesse auf. Bei niedrigen Intensitäten ($1 \frac{\text{W}}{\text{cm}^2}$) und Einstrahldauern von einigen Sekunden bis zu 10^4 s dominiert die so genannte Photochemie (siehe Abbildung 2.1). Diese wird im Bereich der Photodynamischen Therapie eingesetzt, bei der beispielsweise toxische Reaktionen von Farbstoffmolekülen zur Tumorbekämpfung genutzt werden. Bestrahlungsdauern von 1 ms bis einige Sekunden bei Lichtintensitäten von $1 \frac{\text{W}}{\text{cm}^2}$ bis $10^6 \frac{\text{W}}{\text{cm}^2}$ rufen den thermischen Wirkungsbereich hervor. Dies äußert sich durch Koagulation oder bei höheren Intensitäten durch Vaporisation des bestrahlten Gewebes, wobei die eingebrachte Energie zur Erwärmung des Gewebes führt. Diese Wechselwirkung wird vor allem in der Chirurgie verwendet, um ein blutloses Schneiden zu realisieren, da Blutgefäße durch die Koagulationszone des Lasers sofort wieder geschlossen werden [Pey74b, Pey74a, Boe77b, Boe77a].

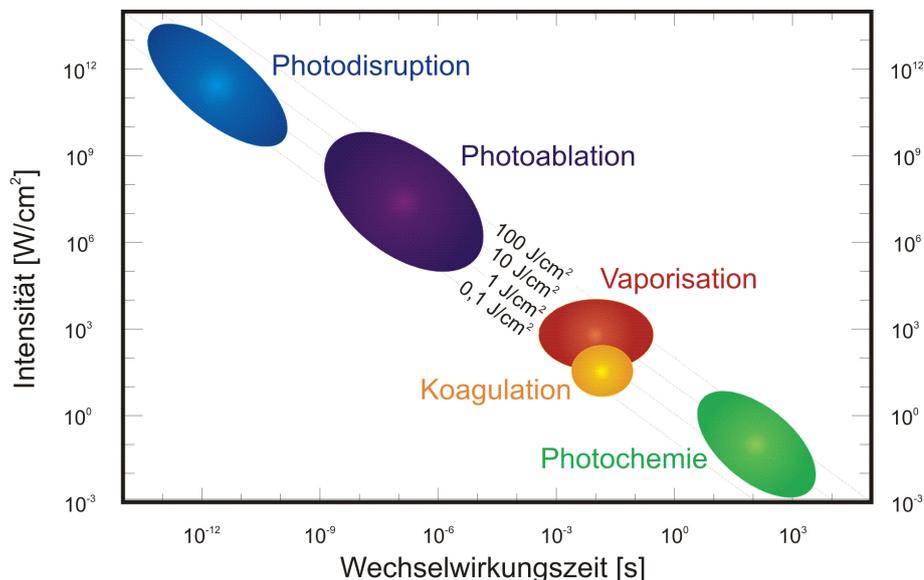


Abbildung 2.1: Laser-Gewebe-Wechselwirkungen in Abhängigkeit von der Intensität und der Wechselwirkungsdauer (nach [Bou86]).

Deutlich präzisere Bearbeitung des Gewebes ist mittels der Photoablation oder der Photodisruption möglich, die durch gepulste Laser erreicht werden. Da diese beiden Wechselwirkungen für die in dieser Arbeit dargestellten Experimente relevant sind, werden sie im Folgenden detaillierter beschrieben.

Photoablation

Die Photoablation tritt bei Intensitäten oberhalb von $10^7 \frac{\text{W}}{\text{cm}^2}$ und einer Pulsdauer im Nanosekundenbereich auf (siehe Abbildung 2.1). Während bei Verwendung von UV-Strahlung die Ablation auf das Aufbrechen der Molekülbindungen durch lineare Absorption zurückzuführen ist [Nik82], entsteht der Materialabtrag im nahinfraroten Bereich durch eine explosionsartige Verdampfung des Wassers im Gewebe [Bou86]. Dabei steigt die Präzision des Abtrags aufgrund der Absorption mit sinkender Eindringtiefe und mit kürzeren Pulsdauern, besonders wenn diese kürzer als die thermische Relaxationszeit (etwa 1 μs) sind.

Die im nahinfraroten Wellenlängenbereich für den Abtrag verantwortliche explosionsartige Verdampfung des Wassers hat mechanische Nebeneffekte zur Folge. Es treten Schall- und Schockwellen auf, die besonders an Grenzflächen zwischen zwei Medien durch die unterschiedliche akustische Impedanz zu erheblichen Schäden führen können. In wässrigen Medien entstehen dampfgefüllte Blasen, die sich durch die stetige Aufheizung bis zu einem maximalen Durchmesser ausdehnen und unter dem hydrostatischen Druck wieder kollabieren und anschließend einige Male oszillieren [Vog05]. Bei einem Kollaps der Kavitationsblase kann die Flüssigkeit auf der einer Grenzfläche zugewandten Seite nicht so schnell nachströmen, was zu einer Jetbildung führt, die eine große Schädigung verursacht. Die Kavitationsblasen können einen Durchmesser von bis zu einigen Millimetern erreichen, die damit deutlich über der Größenordnung einzelner Zellen liegen. Deshalb muss für die Zellchirurgie im Schwellbereich für die Entstehung von Kavitationsblasen gearbeitet werden, so dass diese möglichst klein bleiben, um unerwünschte Schäden zu minimieren.

Durch die Präzision der Photoablation im μm Bereich stellt sie eine schonende Materialbearbeitungsmethode dar, die von der eingebrachten Energie, der Wellenlänge und der Pulslänge abhängt. In der Zellchirurgie werden die auf Photoablation basierenden Applikationen typischerweise mit UV-Lasern oder Lasern im sichtbaren Bereich durchgeführt [Tao87, Pal96, Moh03, Ter04, Pat05], da so die Bildung einer großen Kavitationsblase umgangen wird.

Photodisruption

Im Gegensatz zu den bereits beschriebenen Wechselwirkungsmechanismen beruht die Photodisruption auf nichtlinearer Absorption, so dass der lineare Absorptionskoeffizient des Gewebes vernachlässigbar ist. In Wasser tritt die Disruption ab einer Intensitätsschwelle von $10^{11} \frac{W}{cm^2}$ auf [Bir77], und ist mit Laserpulslängen im ns- bis fs-Bereich erreichbar. Ein Plasma mit freien Elektronendichten von $10^{18} - 10^{23} \text{ cm}^{-3}$ wird im Fokus des Strahls gebildet das einen so genannten laserinduzierten optischen Durchbruch zur Folge hat [Noa98]. Die mechanischen Nebeneffekte wie die Bildung einer Schockwelle und einer Kavitationsblase führen hierbei zur Materialtrennung [Pul84, Sac91, Ken97, Noa98, Vog05].

Die im Fokusvolumen deponierte Energie der freien Elektronen wird innerhalb kürzester Zeit ($< 10 \text{ ps}$) durch nicht-strahlende Rekombination und Stöße an die benachbarten Moleküle und Atome abgegeben [Noa99, Vog05, Sar06]. Eine akustische Welle benötigt eine längere Zeit, um vom Fokuspunkt zu dessen Umgebung zu gelangen [Bre95]. Dadurch wird die thermische Relaxation verhindert, so dass thermoelastische Spannungen im Fokusvolumen eingeschlossen bleiben und zu einem starken Druckanstieg [Pal99, Vog03] mit einer darauf folgenden Stoßwelle nach außen führen. Aufgrund der Impulserhaltung hat dies nach innen gerichtete Zugkräfte zur Folge, so dass in wässrigen Medien eine Kavitationsblase gebildet wird, die das Material mechanisch aufreißt [Bre95, Vog05]. Bei Pulslängen länger als 10 ps findet der optische Durchbruch statt, bevor der Puls zu Ende ist. In diesem Fall wird im entstandenen Plasma zusätzliche Energie deponiert, und dieses weiter aufgeheizt.

Zwei Mechanismen führen zur Plasmabildung, die Multiphotonen-Ionisation und die Kaskaden-Ionisation. Als Näherung wird die Modellsubstanz Wasser hierfür als amorpher Halbleiter mit Valenz- und Leitungsband beschrieben [Wil76].

Die Multiphotonen-Ionisation tritt bei der gleichzeitigen Absorption von mehreren Photonen durch ein Atom oder Molekül auf. Dabei wird die zur Ionisation notwendige Energie durch die Summe der Photonenenergien erreicht (siehe Abbildung 2.2) [Göp31]. Die Ionisationsrate ist stark abhängig von der Intensität der Laserstrahlung, $P(I)_{MPI} = \sigma_k \cdot I^k$, wobei I die Intensität ist, σ_k der Multiphotonenabsorptionskoeffizient und k die Anzahl der zur Ionisation benötigten Photonen. Für Wasser liegt die Ionisationsenergie bei 6,5 eV [Wil76], d. h. in Wasser werden bei $\lambda = 800 \text{ nm}$ 5 Photonen benötigt. Eine andere Form der Ionisation ist die Tunnelionisation, wobei durch das starke elektromagnetische Feld des Laserlichtes die Coulombbarriere abgesenkt wird, so dass das Elektron durch das schmalere Potential tunneln kann. Bei hohen Laserfrequenzen, unter

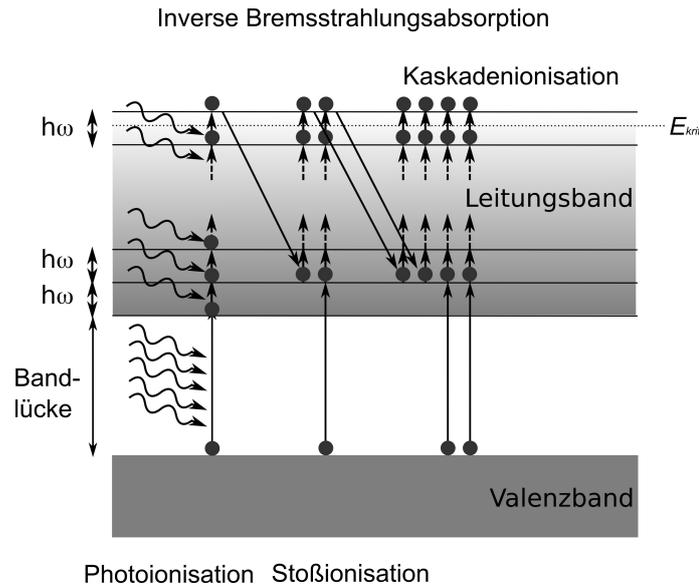


Abbildung 2.2: Plasmabildung durch Photoionisation, inverse Bremsstrahlungsabsorption und Stoßionisation. Wiederholte Sequenzen von inverser Bremsstrahlungsabsorption und Stoßionisation führen zu einer Kaskadenionisation und damit zur Bildung eines Plasmas (nach [Vog05]).

der Schwelle der Einzelphotonenabsorption, dominiert die Multiphotonen-Ionisation [Sch01].

Ist das so genannte Seed-Elektron in das Leitungsband angehoben, kann es durch lineare Absorption sukzessive die Energie weiterer Photonen absorbieren (inverse Bremsstrahlungsabsorption) [Vog96, Liu97, Ken97], wobei diese in kinetische Energie umgewandelt wird. Nach Erreichen einer kritischen Energie ist es diesen höherenergetischen freien Elektronen möglich über Stoßionisation weitere Elektronen ins Leitungsband zu heben und so eine Kaskadenionisation auszulösen (siehe Abbildung 2.2). Dieses Zusammenspiel aus Absorption von inverser Bremsstrahlung und Stoßionisation führt zu einem exponentiellen Anstieg der Dichte freier Elektronen. Sobald eine Dichte von 10^{21} cm^{-3} freien Elektronen erreicht ist, wird eine vollständige Ionisation angenommen [Vog05].

Die Gewichtung der Kaskadenionisation gegenüber der Multiphotonenionisation hängt stark von der Pulslänge ab. Bei ns-Pulsen ist während des Pulses relativ viel Zeit für wenige Seed-Elektronen durch Kaskadenionisation die Dichte von freien Elektronen für ein Plasma zu erzeugen. Im Gegensatz dazu reicht die Zeit bei fs-Pulsen hierfür nicht aus. Der Aufbau der Kaskade ist zeitlich stärker begrenzt, so dass die Multiphotonenabsorption in diesem Fall überwiegt [Noa99, Vog05].

Bei Verwendung von fs-Lasern sind die Pulse kürzer als die Thermalisierungszeit, so dass keine zusätzliche Erwärmung stattfindet. Bei längeren Pulsen ($> 10 \text{ ps}$) bildet sich über die Pulsdauer ein Gleichgewicht aus Erzeugung freier Elektronen, Rekombination und Thermalisierung aus,

wobei die resultierende Wärme mehrere 1000 Grad beträgt und zum Abstrahlen einer Stoßwelle von mehreren GPa führt (bei fs-Pulsen lediglich etwa 10 MPa) [Noa99, Vog99b]. Die daraus resultierende Kavitationsblase ist demnach für kürzere Pulse kleiner. Deshalb sind fs-Pulse in der Zellchirurgie zu bevorzugen. Durch Fokussierung mit einer hohen numerischen Apertur ($NA > 0,8$) nahe der Durchbruchschwelle werden Kavitationsblasen mit einer Größe von 200 – 300 nm Durchmesser erzeugt [Hei05a, Vog08]. Dieser Bereich ist demnach geeignet, einzelne Zellorganellen abzutragen oder zu manipulieren.

2.1.2 Abtragsmechanismen bei Repetitionsraten im kHz- und MHz-Regime

In der Zellchirurgie haben sich zwei Regimes etabliert, die sich im Wesentlichen in der Kombination von Pulsenergie und Repetitionsrate im kHz- und MHz-Regime unterscheiden. In der Gewebechirurgie, beispielsweise in der Augenchirurgie [Juh99, Vog99a, Lub00, Hei02], wird mit verstärkten fs-Laser Pulsen ($> 1 \mu\text{J}$) geschnitten, da die Schnittgenauigkeit von einigen μm ausreichend ist. Ebenso wird in der Zellchirurgie mit Einzelpulsmanipulation gearbeitet, bei der mit Pulsenergien knapp über der Schwelle des optischen Durchbruchs manipuliert wird. Dabei wird mit einem Plasma Material abgetragen, wobei darauf geachtet werden muß, dass der Durchmesser der resultierenden Kavitationsblase deutlich kleiner bleibt als $1 \mu\text{m}$, so dass die Zelle die Manipulation überlebt. Typischerweise werden Repetitionsraten von 1 kHz verwendet, so dass zwischen zwei Pulsen keine thermische Wechselwirkung auftritt. Mit Einzelpulsen werden ganze Organismen oder auch Organellen manipuliert. Beispiele sind die Nanoaxotomie [Yan04, Chu06] bzw. die Mitochondriendisruption [Wat04].

Kommerziell erhältliche Geräte für die fs-Laser basierte Zellchirurgie in Kombination mit Multiphotonenmikroskopie arbeiten typischerweise im MHz-Regime, da kein zusätzliches Verstärkersystem notwendig ist. In diesem Bereich wird mit einer hohen Anzahl an Laserpulsen manipuliert, mit Pulsenergien deutlich unter der Einzelpulsschwelle zum optischen Durchbruch, so dass sich keine Kavitationsblase ausbildet. Es wird nicht wie im Falle der Einzelpulse durch ein Plasma mit 10^{21} cm^{-3} freier Elektronendichte, sondern mittels eines Plasmas mit niedriger Elektronendichte (engl. *low density plasma*, siehe Abbildung 2.3) manipuliert. Die erzeugten freien Elektronen rufen chemische Effekte hervor, die aufsummiert zu einer Trennung des Materials führen. Mit jedem eingestrahnten Puls werden molekulare Bindungen zerstört, so dass es zu einer Störung des strukturellen Aufbaus der Moleküle kommt und dadurch das Material getrennt wird [Vog05]. Es handelt sich hierbei um einen kumulativen Prozeß, für den typischerweise Repetitionsraten von 80 MHz verwendet werden [Rip07]. Bei langen Einstrahldauern oder hohen Pulsenergien kann es

zur Ausbildung einer Gasblase kommen, die durch die in ihre Bestandteile aufgelösten Moleküle gebildet wird. Die Lebensdauer dieser Blasen ist in der Größenordnung von Milisekunden bis Sekunden, deutlich länger als die einer Kavitationsblase (im μs Bereich). In diesem Regime wird zum Beispiel die Membranperforation [Koe01a, Ste06, Bau08], die Zytoskelett-Manipulation [Hei05b, Max06, Kum06] aber auch zum Teil die Mitochondriendisruption [Shi05] durchgeführt (siehe Abbildung 2.3).

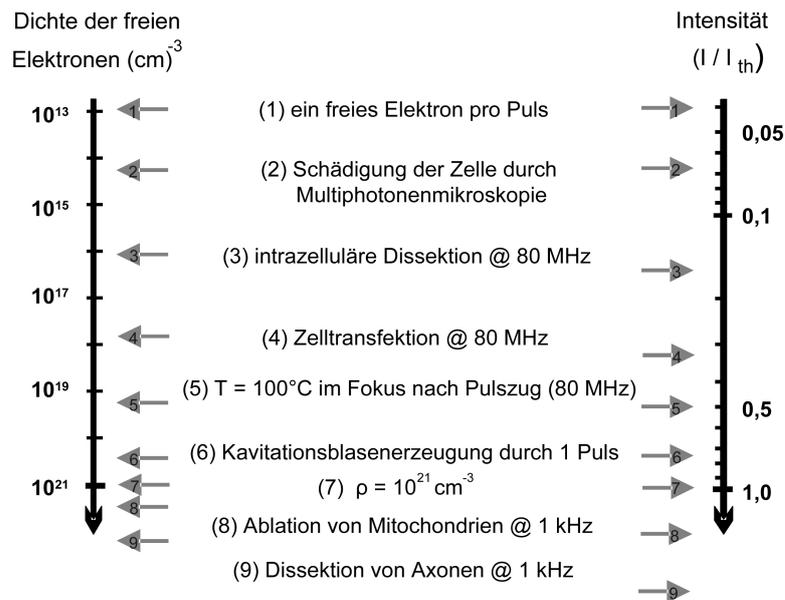


Abbildung 2.3: Überblick über plasmainduzierte Effekte durch fs-Laser Pulse. Beispiele aus der experimentellen Anwendung der Zellschädigung und des intrazellulären Abtrags in Bezug auf die erzeugte Freie-Elektronen-Dichte [Vog05].

Ein zwischen diesen beiden Regimes liegender Bereich ist die Manipulation mit Pulsenergien unter der Schwelle des optischen Durchbruchs mit Repetitionsraten im kHz-Bereich. Dies ist beispielsweise durch das zusätzliche Einsetzen eines AOM realisierbar, der einzelne Pulse selektiert (siehe Abschnitt 2.2.2). Die Mechanismen für eine Manipulation in diesem Regime sind noch nicht bekannt und werden in dieser Arbeit im direkten Vergleich zur Einstrahlung im MHz-Regime untersucht (siehe Kapitel 4).

2.1.3 Nichtlineare Effekte

Bei der Propagation und den Wechselwirkungen ultrakurzer Pulse dominiert neben dem Prozess der nichtlinearen Absorption auch die nichtlineare Änderung des Brechungsindex, hervor-

gerufen durch die hohe Spitzenintensität der Pulse. Im Folgenden wird zunächst auf den nichtlinearen Brechungsindex und die daraus resultierenden Effekte wie Selbstfokussierung, Selbstphasenmodulation und Gruppengeschwindigkeitsdispersion eingegangen. Anschließend wird ihre Auswirkungen auf die Mikroskopie diskutiert.

Selbstfokussierung

Die Selbstfokussierung kann als intensitätsabhängiger Brechungsindex verstanden werden. Sie wird durch den so genannten Kerr-Effekt hervorgerufen, der ein Effekt dritter Ordnung in der Entwicklung der Polarisation nach der Suszeptibilität χ für hohe Intensitäten ist. Der intensitätsabhängige Brechungsindex $n(I)$ in einem isotropen Medium mit dem linearen Brechungsindex $n_0 = \sqrt{1 + \chi^{(1)}}$ lautet [Mar75]:

$$(2.1) \quad n(I) = n_0 + n_2 I.$$

Dabei ist n_2 der nichtlineare Brechungsindex und I die Intensität der einfallenden Strahlung. Kann der Brechungsindex eines Mediums durch die Gleichung 2.1 genähert werden, wird es als Kerr-Medium bezeichnet. Der nichtlineare Brechungsindex hat in den meisten Flüssigkeiten und Festkörpern eine Größenordnung von $n_2 \approx 10^{-16} \frac{\text{cm}^2}{\text{W}}$. Nur Schwermetalloxidgläser bilden eine Ausnahme, hier kann der Brechungsindex diesen Wert bis zu zwei Größenordnungen übersteigen. [Rey94, Sie05]

Bei ausreichend hoher Spitzenintensität des Laserpulses führt das räumliche Strahlprofil zu einer räumlichen Brechungsindexvariation. Ein Gauß-Profil ergibt beispielsweise im Zentrum des Strahls einen höheren Brechungsindex als an den Rändern. Für die Teile des Pulses im Zentrum ist das Medium optisch dichter als in den Randbereichen. Dadurch folgt eine Fokussierung des Strahls analog zu einer Konvexlinse, wobei diesem Effekt die Divergenz und nichtlineare Absorption des Laserstrahls entgegen wirkt (siehe Abbildung 2.4). Bei einer bestimmten kritischen Leistungsschwelle P_{kr} halten sich diese beiden Effekte im Gleichgewicht [Mar75]:

$$(2.2) \quad P_{kr} = \frac{c\lambda^2}{32\pi^2 n_2}.$$

Bei Überschreiten von P_{kr} überwiegt der Einfluß der Selbstfokussierung dem der Diffraktion und der Strahl kollabiert [Mar75]. Numerischen Berechnungen zu Folge ergibt sich die Kollapsleistung

$P_{kollaps}$ zu:

$$(2.3) \quad P_{kollaps} \geq 3,77 \cdot P_{kr}.$$

Typischer Weise liegen diese Werte im Bereich von einigen Megawatt. Die kritische Leistung P_{kr} liegt für Wasser als Näherung für biologisches Gewebe bei etwa 3,4 MW, berechnet nach Gleichung 2.2 mit $n_2 = 1,8 \cdot 10^{-18} \frac{\text{cm}^2}{\text{W}}$ bei einer Wellenlänge von $\lambda = 800 \text{ nm}$. Dem zu Folge wird der Strahlkollaps bei einer Leistung von $P_{kollaps} = 12,8 \text{ MW}$ erreicht.

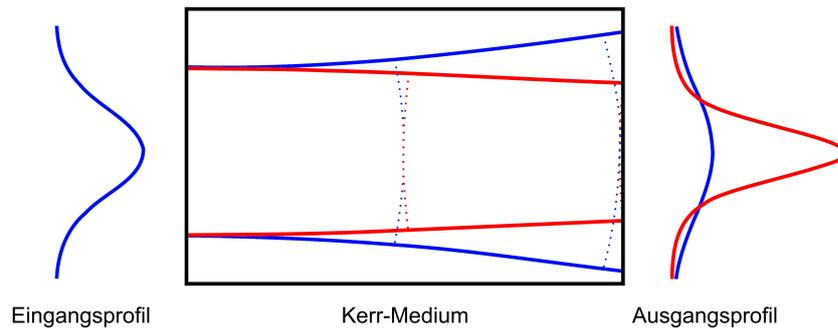


Abbildung 2.4: Der intensitätsabhängige Brechungsindex $n(I)$ erzeugt für einen intensiven Laserpuls eine Selbstfokussierung analog zu einer Konvexlinse (rot). Bei geringer Leistung ist die Ausbreitung im Kerr-Medium linear (blau).

Selbstphasenmodulation

Zusätzlich zu der räumlichen Beeinflussung des Strahlprofils, führt der nichtlineare Brechungsindex zu einer Änderung des zeitlichen Profils. Die so genannte Selbstphasenmodulation, die proportional zu Intensität des Pulses ist, äußert sich in der Phase, führt jedoch nicht zu einer zeitlichen Verbreiterung. Da die Intensität innerhalb des Pulsverlaufes zunächst bis zum Pulsmaximum ansteigt und anschließend wieder abfällt, ändert sich auch der Brechungsindex entsprechend mit den Pulsanteilen. Bei ansteigender Intensität werden die Phasenfronten der Pulse verzögert und so die Wellenlängen in den längerwelligen Bereiche (rot) verschoben. Genauso werden in der hinteren Pulsflanke bei abfallender Intensität höhere Frequenzen erzeugt, also die Wellenlängen in kurzwelligen Bereiche (blau) verschoben. Diese Verschiebung der Frequenzen wird „Chirp“ genannt. Die Größe der Modulation hängt dabei von der zeitlichen Steilheit des Pulsprofils in den Flanken ab und im Gegensatz zur Selbstfokussierung nicht von der Spitzenintensität. Die Verbreiterung des Pulses bezieht sich hier allerdings lediglich auf den Frequenzraum, die Pulslänge bleibt erhalten.

Am Beispiel der passiven Modenkopplung in einem Titan-Saphir-Laser, wird der Effekt der Selbstphasenmodulation zur Verkürzung der Pulse genutzt. Der Laserpuls erhält zusätzliche Frequenzkomponenten und gewinnt dadurch an Bandbreite. Somit kann der erzeugte Chirp durch geeignete Spiegel oder Gitter und aufgrund der resultierenden Gruppengeschwindigkeitsdispersion kompensiert werden (siehe Abschnitt 2.2.1).

Gruppengeschwindigkeitsdispersion

Zusätzlich zum linearen Brechungsindex führt der nichtlineare Brechungsindex neben der Verbreiterung im Frequenzraum durch die Gruppengeschwindigkeitsdispersion zu einer zeitlichen Verbreiterung der kurzen Pulse. Die Gruppengeschwindigkeitsdispersion wird häufig auch Dispersion 2. Ordnung genannt, als Maß dient $k'' = \frac{d^2k}{d\omega^2}$ mit der Einheit $\frac{\text{fs}^2}{\text{m}}$, wobei $k(\omega)$ die Wellenzahl ist. Für die Gruppengeschwindigkeitsdispersion eines optischen Elements hat sich der Wert D_2 durchgesetzt:

$$(2.4) \quad D_2 = z \frac{d^2k}{d\omega^2},$$

wobei z die Strecke ist, die der Puls im Medium zurück legt [Kas97].

In einem Medium mit positiver Gruppengeschwindigkeitsdispersion werden die langwelligeren, roten Pulsanteile den kurzwelligeren, blauen Anteilen vorauslaufen (positiver Chirp) und der Puls wird verlängert. Im Gegensatz zur Selbstphasenmodulation ergibt dies eine räumliche Verbreiterung des Pulses, die unter anderem zur Verstärkung ultrakurzer Laserpulse (Chirped Pulse Amplification) genutzt wird (siehe Abschnitt 2.2.1).

Die Pulsdauer τ_{out} eines gaußförmigen, chirpfreien Pulses verändert sich beim Durchgang durch ein Medium wie folgt [Kas97]:

$$(2.5) \quad \tau_{out} = \tau_{in} \sqrt{1 + 7,69 \left(\frac{k'' z}{\tau_{in}^2} \right)^2},$$

wobei τ_{in} die Eingangspulslänge und z die Propagationslänge im Medium sind. Im Allgemeinen sollte daher die Propagation ultrakurzer Pulse durch optisch dichte Medien minimiert werden, um die Pulslänge zu erhalten. Alternativ kann der Gruppengeschwindigkeitsdispersion mit einem so genannten "Pre-Chirp" entgegengewirkt werden. Dabei wird der Puls mit einem entgegengesetzten Chirp vorgeformt, damit nach Durchgang durch das dispersive Medium die gewünschte Pulslänge bis hin zum Fourierlimit vorliegt.

2.1.4 Auswirkungen der nichtlinearen Effekte in der Mikroskopie und Zellchirurgie

Die fs-Laser gestützte Fluoreszenzmikroskopie basiert darauf, den Laserstrahl mit einem Objektiv hoher numerischer Apertur in die Probe zu fokussieren um dort Fluoreszenz anzuregen (siehe Abschnitt 2.3.1). Typischer Weise haben Objektive eine Länge von 45 mm, in der der Puls durch lineare Absorption etwa 30% an Leistung verliert und durch Dispersion verlängert wird. Weniger Verluste bringen IR-optimierte Objektive mit sich, die speziell für die Multiphotonenmikroskopie korrigiert sind. Das Material der Objektivlinsen und das Linsendesign wird von den Herstellern nicht angegeben, so dass die genauen Auswirkungen des Objektivs auf die Laserpulsseigenschaften nicht berechnet werden können.

In dem Versuchsaufbau für die Transfektion, der im Rahmen dieser Arbeit verwendet wird (siehe Abschnitt 4.1), sind zusätzlich drei Strahlteilerwürfel (*Edmund Optics*) mit jeweils 10 mm Länge eingebaut, um die Leistung des Laserlichtes abzuschwächen und um zwei Strahlen deckungsgleich einzukoppeln. Die Strahlteilerwürfel bestehen aus SF11 mit $k'' = 1800 \frac{\text{fs}^2}{\text{cm}}$. Nach Durchlaufen dieses Glasweges ist ein Puls mit einer ursprünglichen Pulsdauer von 140 fs um etwa 36 fs verlängert. Die mittels Autokorrelator (Mini, *APE, Berlin*) gemessene Pulslänge vor der Eingangsapertur des Objektivs beträgt 210 fs, was auf einen ursprünglich kürzeren Puls hinweist oder die zusätzliche Verlängerung ist beispielsweise durch den Kristall des AOM (siehe Abschnitt 2.2.2) verursacht. Solche Kristalle haben üblicherweise einen hohen k'' -Wert. Das Material der Objektivoptik ist nicht bekannt. Es ist jedoch vernachlässigbar, da die Dispersion bei einer Pulslänge von etwa 200 fs klein ist (siehe Gleichung 2.5). Eine Kompensation der Dispersion durch einen Pre-Chirp des Pulses ist für die Zellchirurgie demnach nur notwendig, wenn kürzere Pulsdauern am Ort der Wechselwirkung gewünscht werden. Dabei muss abgewogen werden zwischen dem Aufwand der Kompensation der Pulsverlängerung und dem erzielten Vorteil einer kleineren Schwellenergie für den Materialabtrag. In dieser Arbeit wurde auf eine solche Kompensation verzichtet, da die erzielte Manipulationsgenauigkeit ohne Kompensation zu einer ausreichenden Überlebenswahrscheinlichkeit der Zellen führt.

Selbstfokussierung des Laserpulses ist, wie in Abschnitt 2.1.3 beschrieben, von der Intensität des Lichtes abhängig. Die Multiphotonenmikroskopie basiert darauf, durch ultrakurze Pulse und starke Fokussierung bereits bei geringen Pulsenergien eine ausreichende Wahrscheinlichkeit für die Multiphotonenanregung der Moleküle zu erlangen. Bei der Zellchirurgie liegt die Pulsenergie für eine Ablation typischerweise einen Faktor 10 oder mehr über der für die Multiphotonenmikroskopie. Im MHz-Regime wird auf der Basis von kumulativen Effekten weit unter der

Schwelle zum optischen Durchbruch gearbeitet, während bei Einzelpuls-Manipulation nah an der Schwelle abgetragen wird. Dennoch wird selbst in diesem Fall die Schwelle zum Strahlkollaps durch Selbstfokussierung weit unterschritten. Der Laserstrahl wird mit einem Objektiv mit hoher numerischer Apertur von $NA = 1,3$ fokussiert. Die Schwellintensität für den optischen Durchbruch in Wasser liegt bei etwa $I_{th} = 5 \cdot 10^{12} \frac{W}{cm^2}$ bzw. der Schwellenergie von $0,8 \frac{J}{cm^2}$ und mit einem Faktor 1000 deutlich unter der kritischen Leistung und der Kollapsschwelle von 12,8 MW (siehe Gleichung 2.3).

Die Geometrie und die Größe des Fokus wird hauptsächlich von der numerischen Apertur und der Wellenlänge des Lichtes bestimmt. Abbildung 2.5 zeigt die Konturengraphen von berechneten Durchbruchplasmen bei numerischen Aperturen von 0,5 bis 1,2, bei einer Wellenlänge von 780 nm und einer Pulslänge von 150 fs. Die Pulsenergie wurde jeweils 5% über der Schwelle zum optischen Durchbruch gewählt, wobei die damit assoziierte Dichte freier Elektronen von $10^{21} cm^{-3}$ in den weiß markierten Bereichen überschritten wurde. Bei geringer NA ist eine starke Asymmetrie entlang der Ausbreitungsrichtung erkennbar. Die höchste Plasmadichte wird bereits deutlich vor Erreichen des geometrischen Fokus bei $z = 0$ erzeugt. Ein Bereich mit geringerer Plasmadichte umgibt den der höchsten Plasmadichte, dessen Abmessungen mit steigender NA

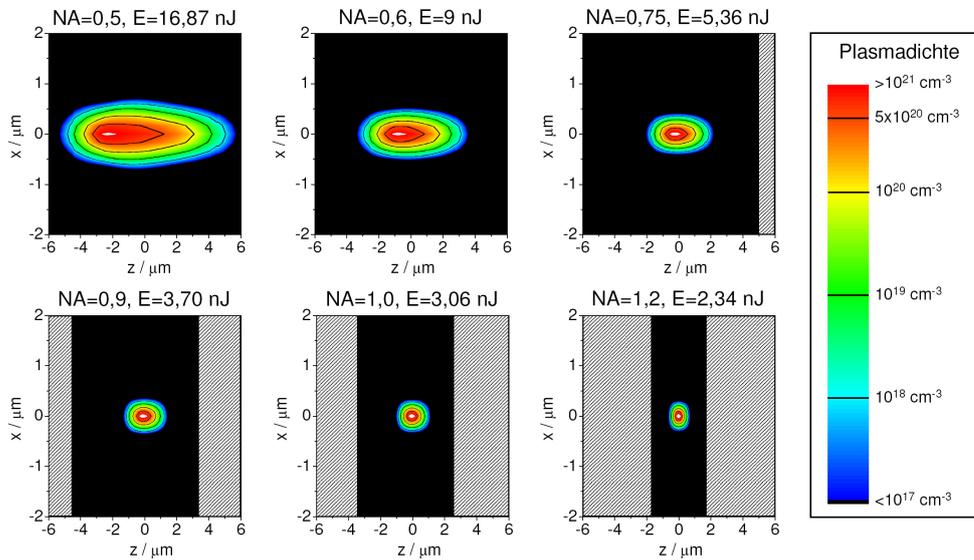


Abbildung 2.5: Konturengraphen von berechneten Durchbruchplasmen in zx-Ansicht bei unterschiedlicher numerischer Apertur ($0,5 \leq NA \leq 1,2$). Der geometrische Fokus befindet sich bei $z = 0$, wobei die erzeugenden Pulse jeweils von links eingestrahlt wurden. Die Pulsenergie ist 5% über der Schwelle zum optischen Durchbruch gewählt. Die weißen Bereiche zeigen die Gebiete, in denen die Durchbruchplasmadichte von $10^{21} cm^{-3}$ überschritten wurde. Die Konturlinien markieren die Dichten 10^{19} , 10^{20} und $5 \times 10^{20} cm^{-3}$. Die Größe der Berechnungsfelder skalieren mit der numerischen Apertur, Bereiche außerhalb des jeweiligen Feldes sind schraffiert dargestellt [Arn07].

abnehmen. Ebenso verlagert sich der Bereich der höchsten Plasmadichte bei einer größeren NA in Richtung des geometrischen Fokus [Arn07]. Die Überlebenswahrscheinlichkeit der bei der Zellchirurgie behandelten Zellen sowie die Präzision der Manipulation wird demnach mit stärkerer Fokussierung größer, da bei einer hohen NA sowohl ein kleineres Durchbruchplasma erzeugt wird als auch eine niedrigere Pulsenergie für den Abtrag notwendig ist.

Im Falle eines optischen Durchbruchs, beispielsweise bei Einzelpulsanwendungen in der Zellchirurgie, tritt zusätzlich eine Wechselwirkung der hinteren Pulsanteile mit dem bereits durch die ersten Pulsanteile erzeugten Plasma auf. Die vordere Pulsflanke durchläuft das Fokusbereich ungestört und erzeugt dabei erste freie Elektronen durch Multiphotonenionisation [Sud02, Arn07], wobei nicht absorbierte Photonenenergie weiter transmittiert wird. Abhängig von der numerischen Apertur und der Pulsdauer kann die Transmission bis zu 98% betragen [Arn07], wobei diese mit steigender numerischer Apertur ansteigt. In der hinteren Pulsflanke wird die Plasmadichte durch einsetzende Kaskadenionisation schnell vervielfacht. Während der vordere Pulsanteil fast unbeeinflusst durch das Fokusbereich propagiert, wird die hintere Pulsflanke von Plasmadefokussierung beeinflusst. Dieses führt zu einem stark asymmetrischen Plasma. Bei starker Fokussierung ($NA \geq 0,9$) nimmt der unerwünschte Einfluss der Plasmadefokussierung ab. Eine hohe numerische Apertur hat demnach nicht nur den Vorteil einer höheren räumlichen Selektivität der Manipulation, sondern auch geringere Nebeneffekte durch Asymmetrie des Plasmas (siehe Abbildung 2.6).

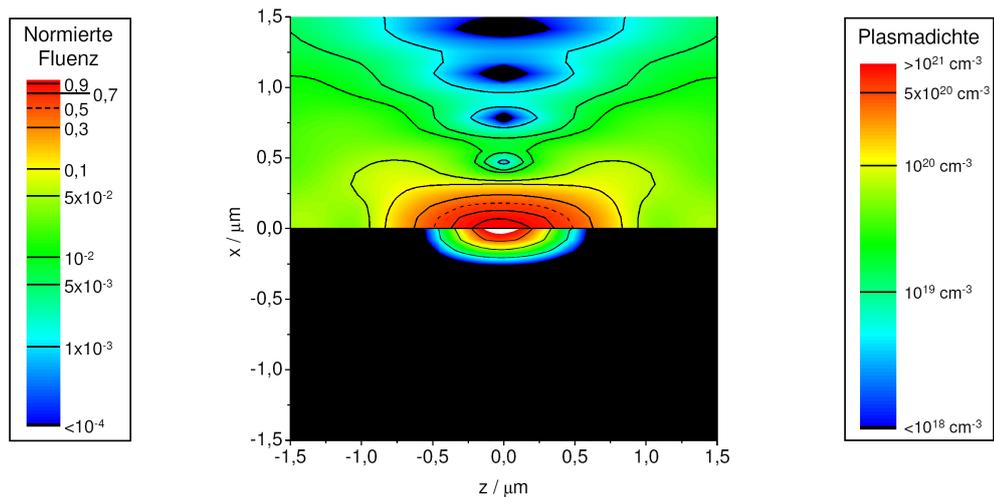


Abbildung 2.6: Konturenglyphen der Fluenz des erzeugenden Pulses (oben) im Vergleich zum erzeugten Plasma (unten) bei Fokussierung mit einer numerischen Apertur $NA = 1,2$ und einer Pulsenergie von $E = 2,34 \text{ nJ}$ an der Schwelle zum optischen Durchbruch [Arn07].

2.2 Lasersystem

In der Zellchirurgie ist die Verwendung eines Titan-Saphir-Lasers weit verbreitet. Der Vorzug dieses Lasersystems liegt in der großen Durchstimbarkeit des Lasers im nahinfraroten Wellenlängenbereich. Die lineare Absorption in biologischem Gewebe ist in diesem Bereich sehr gering, wodurch eine hohe Eindringtiefe in die Probe erreicht werden kann. Zusätzlich kann die Laserstrahlung für eine Fluoreszenzanregung über einen weiten Wellenlängenbereich an die jeweiligen Absorptionsspektren von Farbstoffen oder von Autofluoreszenz angepaßt werden. Die ultrakurzen Pulse erhöhen hierbei die Wahrscheinlichkeit der Multiphotonenanregung enorm, da die Photonendichte auf sehr kurzes Zeitintervall konzentriert wird (siehe auch Abschnitt 2.3.1). Die zusätzliche starke räumliche Fokussierung mittels eines Mikroskopobjektivs erzeugt zusammen mit den kurzen Pulsen die notwendige räumliche und zeitliche Dichte an Photonen zur effizienten Fluoreszenzanregung bzw. Plasmaerzeugung erreicht. Die damit erreichte Präzision der Wechselwirkung und die geringen Nebenwirkungen sind mit anderen Lasern wie beispielsweise Diodenlasern, bei denen die Manipulation auf linearer Absorption beruht, nicht erreichbar. Trotz der vergleichsweise hohen Anschaffungskosten für einen fs-Laser ist dieser durch die oben genannten Vorteile ein geeignetes Werkzeug für die Zellchirurgie und eine damit verbundene Fluoreszenzmikroskopie.

2.2.1 Titan-Saphir-Laser

Der Titan-Saphir-Laser wurde erstmals 1982 realisiert [Kne99]. Der große Durchstimmbereich zwischen 680 nm und 1080 nm wird erreicht, da aufgrund von d-Energiezuständen oberhalb des oberen Laserniveaus keine Selbstabsorption durch angeregte Energiezustände auftritt. Zusätzlich ist das breite Fluoreszenzband gut getrennt vom Absorptionsband, welches im blau-grünen Bereich liegt.

Ultrakurze Pulse werden im Titan-Saphir-Laser durch Kerr-Linsen-Modenkopplung erzeugt. Bei der Modenkopplung werden die statistisch, zeitlich schwankenden Phasendifferenzen der axialen Moden unterdrückt, so dass sich bei jedem Resonatorumlauf die Feldstärkeamplituden an einem Ort konstruktiv überlagern. Dadurch entstehen kurze Pulse, die sehr hohe Intensitäten erhalten. Mit steigender Anzahl N der miteinander gekoppelten Moden werden die Pulse kürzer und intensiver. Die Anzahl der in der Laserlinienbreite $\Delta\nu$ anschwingenden Moden im Resonator der Länge L beträgt $N = \Delta\nu \frac{2L}{c}$, wobei c die Lichtgeschwindigkeit ist.

Die Pulsdauer τ von modengekoppelten Lasern mit einer Linienbreite $\Delta\nu$ wird durch das Pulsbandbreitenprodukt $\tau\Delta\nu \geq K$ begrenzt, wobei K eine Konstante ist, die von der Form des Wellenpaketes abhängt [Eic03]. Für ein Gaußprofil gilt $K = \frac{2 \ln(2)}{2} = 0,441$ [Kne99]. Daraus ergibt sich eine Pulsdauer von

$$(2.6) \quad \tau = \frac{K}{N} \frac{2L}{c}.$$

Die in dieser Arbeit verwendeten Lasersysteme haben jeweils eine Pulsdauer von 140 fs (siehe Tab. 2.2.1). Die Pulsfolgefrequenz (Repetitionsrate) R der Pulse ist abhängig von der Länge des Resonators und beträgt

$$(2.7) \quad R = \frac{c}{2L}.$$

Bei einer Repetitionsrate von 80 MHz beträgt die Resonatorlänge demnach 1,87 m.

Tabelle 2.1: Spezifikationen der Titan-Saphir-Lasersysteme.

	Chameleon	Chameleon Ultra II
Pumplaser	Verdi	Verdi
Wellenlängenbereich	715 – 955 nm	680 – 1080 nm
Durchschnittliche Leistung	750 mW @ 715 nm 1,5 W @ 800 nm 350 mW @ 955 nm	600 mW @ 680 nm 3,3 W @ 800 nm 200 mW @ 1080 nm
M^2	< 1,1	< 1,1
Pulslänge	140 fs	< 140 fs
Repetitionsrate	90 MHz	80 MHz
Polarisation	horizontal	horizontal

Die Kerr-Linsen-Modenkopplung basiert auf dem Effekt der Selbstfokussierung im Laserkristall. Wie in Abschnitt 2.1.3 beschrieben werden die intensitätsabhängigen Anteile des Brechungsindex des Materials bei hohen Spitzenintensitäten der ultrakurzen Pulse relevant, und das Medium wirkt bei einem gaußförmigen Strahlprofil wie eine konvexe Linse. Die Modenkopplung wird erreicht, indem die Resonatormoden durch die Kerr-Linsen-Wirkung verstärkt werden, während die weniger intensiven Anteile des Strahls unterdrückt werden. Der Spot des Pumplasers innerhalb des Titan-Saphir-Kristalls dient dabei als Blende, die die weniger intensiven und deshalb geringer abgelenkten Anteile blockt, denn effiziente Verstärkung tritt nur dort auf, wo die Brennpunkte des Pumpstrahls und der Resonatormode zusammen fallen.

Der Einfluß der Gruppengeschwindigkeitsdispersion auf die Form der propagierenden Pulse verhindert wegen ihrer großen Frequenzbreite, dass diese kürzer als 1 ps werden können. Durch eine Prismenanordnung aus zwei Prismen, die im linearen Resonator zwei mal durchlaufen werden, wird die Dispersion kompensiert (siehe Abbildung 2.7) [For84, Kop96]. Alternativ zu den Prismen können auch spezielle dielektrische Spiegel, so genannte *chirped mirrors*, verwendet werden [Str85].

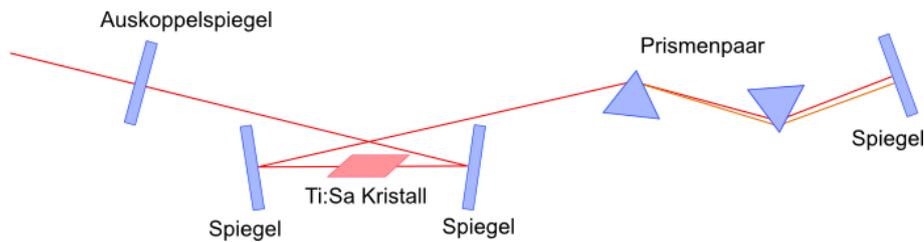


Abbildung 2.7: Resonator eines Titan-Saphir-Lasers. Das Prismenpaar dient zur Kompensation der Dispersion durch Weglängenunterschiede der jeweiligen Wellenlängenanteile.

Da die Repetitionsrate des Lasers fest mit der Resonatorlänge gekoppelt ist, wird in den Anwendungen der Zellchirurgie häufig auf MHz-Pulse zurück gegriffen. Dabei wird mit vielen Pulsen geringer Pulsenergie manipuliert [Koe99a, Tir01a, Koe01b, Shi05, Vog05, Hei07]. Es gibt jedoch auch die Möglichkeit mittels Verstärker ein System mit höheren Pulsenergien, dafür geringerer Repetitionsrate zu erzeugen. Bei derart intensiven Pulsen besteht die Gefahr der Zerstörung der Optiken durch die Wechselwirkung der Pulse mit dem Material. Dies wird bei der so genannten CPA (engl. *chirped pulse amplification*) umgangen, indem der Puls zunächst zeitlich gestreckt wird, um die Spitzenleistung zu senken. Dieser gestreckte Puls wird nun verstärkt und anschließend wieder komprimiert, um die ursprüngliche Pulsform zu erhalten. Die Streckung und Kompression wird hierbei mit optischen Gittern realisiert [Str85].

Daraus ergibt sich die Möglichkeit, die Anwendungen mit den Titan-Saphir-Laser auf das kHz-Regime zu erweitern. In diesem Fall werden Einzelpulse mit höherer Energie verwendet als im MHz-Regime. Des Weiteren kann bei ausreichender Pulsenergie des Oszillators die Repetitionsrate ohne vorheriges Verstärken reduziert werden, indem ein schneller Schalter eingebaut wird, beispielsweise ein AOM.

2.2.2 Akusto-optischer Modulator

Ein akusto-optischer Modulator (AOM) beinhaltet einen Kristall, an dem ein Piezoelement angebracht ist, um in diesem eine Ultraschallwelle zu erzeugen. Diese Schallwelle erzeugt eine periodische Dichteschwankung im Kristall, die eine Brechzahlvariation bei gleicher Frequenz und Wellenlänge verursacht. Dies wirkt wie ein optisches Gitter, an dem der Lichtstrahl gebeugt wird. Diese Beugung läßt sich auch als Bragg-Beugung interpretieren (siehe Abbildung 2.8).

Um nun den Laserstrahl von 80 MHz auf beispielsweise 40 kHz zu reduzieren, wird der AOM in den Strahlengang gebracht und mit einem Triggersignal jeder 2000. Puls gebeugt. Somit können mithilfe eines AOMs die unterschiedlichen Wechselwirkungsregimes untersucht werden, die in Abschnitt 2.1.2 beschrieben sind.

Der in dieser Arbeit verwendete AOM, ein PulsePicker (PulseSelect, APE, Berlin), ist speziell für die Anwendung eines fs-Lasers mit der Repetitionsrate 80 MHz ausgelegt. Der dazugehörige Controller kann die Laserfrequenz auf 4 MHz bis 16 kHz reduzieren.

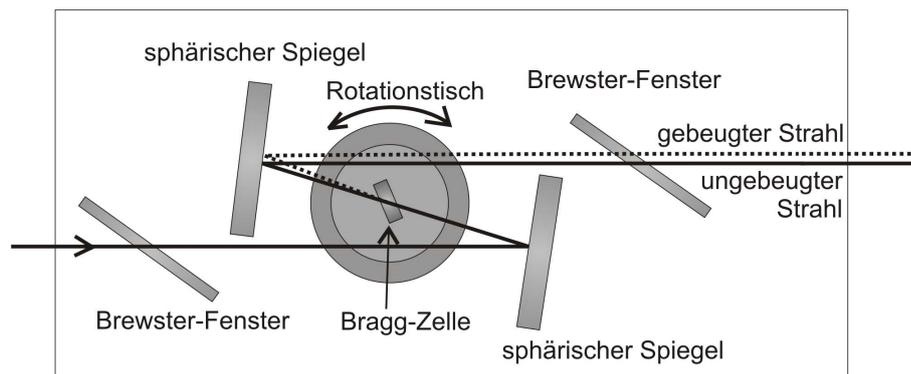


Abbildung 2.8: Schematischer Aufbau der PulsePicker Optik.

2.3 Multiphotonenmikroskopie

Die Multiphotonenabsorption ermöglicht wie in Abschnitt 2.1.4 bereits erwähnt nicht nur einen Abtrag durch Plasmabildung. Darüber hinaus ist durch die 2-Photonen-Absorption eine Fluoreszenzanregung möglich, die durch die Limitierung auf das fokale Volumen eine hohe räumliche Auflösung mit sich bringt. Im Folgenden wird die Multiphotonenmikroskopie als fluoreszenzbasiertes Bildgebungsverfahren beschrieben. Diese Methode wird anschließend mit der konventionellen Fluoreszenzmikroskopie mittels UV-Lampenanregung und der laserbasierten

konfokalen Mikroskopie (engl. *confocal laser scanning microscopy*, CLSM) verglichen und deren Vor- sowie Nachteile diskutiert.

2.3.1 Nichtlineare Fluoreszenzanregung

In der Multiphotonenmikroskopie wird ein Molekül mit Photonen angeregt, deren Energie etwa der Hälfte der notwendigen Anregungsenergie beträgt. Das Molekül muss demnach zur gleichen Zeit zwei Photonen absorbieren, da eines nicht ausreicht, um es in einen energetisch höheren Zustand zu bringen.

Die Wahrscheinlichkeit für die Zwei-Photonen-Absorption steigt mit dem räumlichen und zeitlichen Überlapp der einfallenden Photonen und ist sehr klein im Vergleich zur Ein-Photonen-Absorption bei der halben Wellenlänge. Die simultane Absorption von zwei Photonen muss innerhalb kürzester Zeit stattfinden (ca. 10^{-18} s). Um ein messbares Fluoreszenzsignal zu erhalten, sind deshalb hohe Energien und kurze Pulse erforderlich, da eine hohe Konzentration von Photonen zur gleichen Zeit am gleichen Ort benötigt wird (die Wahrscheinlichkeit ist proportional zu I^k , wenn k Photonen zur Anregung notwendig sind) [Tsa02, Dic06].

Die Zahl der Photonenpaare n_a , die pro Laserpuls von einem Chromophor absorbiert wird, beträgt

$$(2.8) \quad n_a \approx \frac{p_0^2 \delta}{\tau_p f_p^2} \left(\frac{\pi NA^2}{h c \lambda} \right)^2,$$

wobei c die Lichtgeschwindigkeit ist, h die Planck-Konstante, δ der Zwei-Photonen-Wirkungsquerschnitt, p_0 die durchschnittliche Leistung des anregenden Lasers, f_p die Repetitionsrate, λ die Wellenlänge und NA die numerische Apertur des verwendeten Objektivs [Den90].

Da ausschließlich im Fokus des Laserstrahls eine ausreichende Photonendichte erreicht wird, ist die Multiphotonenabsorption auf dieses Volumen beschränkt. Fluoreszenzmoleküle aus Bereichen außerhalb des Fokusvolumens werden nicht angeregt. Deshalb sind die laterale (δr) und axiale (δz) Auflösung vergleichbar mit denen der CLSM [Cox84, Bra86, Bra88, Bra89, Tsa02]:

$$(2.9) \quad \delta r = 1,2\pi \frac{NA}{n} z_{conf} = 0,6 \frac{\lambda_0}{n} \left(\frac{n}{NA} \right);$$

$$(2.10) \quad \delta z = 4\pi z_{conf} = 2 \frac{\lambda_0}{n} \left(\frac{n}{NA} \right)^2;$$

mit der konfokalen Länge

$$(2.11) \quad z_{conf} = \frac{1}{2\pi} \frac{\lambda_0}{n} \left(\frac{n}{NA} \right)^2.$$

Dabei ist $\frac{\lambda_0}{n}$ die Wellenlänge im Medium und NA die numerische Apertur. Für ein 100× Öl-Immersion-Objektiv mit einer numerischen Apertur von $NA = 1,3$ bei einer zentralen Wellenlänge von $\lambda_0 = 800$ nm beträgt die theoretisch berechnete konfokale Länge $z_{conf} = 0,1$ µm. Damit ergibt sich eine axiale und laterale Auflösung von $\delta z = 1,2$ µm und $\delta r = 0,37$ µm.

Nicht nur die Fluoreszenz, sondern auch die unerwünschten Nebeneffekte wie beispielsweise Photobleichen sind auf die fokale Ebene beschränkt. Zwar ist das Bleichen im fokalen Volumen durch die benötigten hohen Spitzenleistungen höher als bei konventioneller Mikroskopie basierend auf linearer Absorption, jedoch wird bei der Ein-Photonen-Anregung im gesamten Volumen der Lichtpenetration gebleicht.

2.3.2 Vergleich mit konventioneller und konfokaler Mikroskopie

Die Multiphotonenmikroskopie hat neben der nahezu konfokalen Auflösung (siehe Abschnitt 2.3.1) im Vergleich zur konventionellen UV-Lampen-basierten Mikroskopie und zur CLSM einige Vorteile aufgrund derer sie als Bildgebungsmethode für die in dieser Arbeit durchgeführten Experimente gewählt wurde.

Konfokale Mikroskopie ermöglicht die Detektion eines Signals, dessen Ursprung nur in der fokalen Ebene liegt. Diese Beschränkung erfolgt durch Einsetzen von zwei Lochblenden, eine vor dem Detektor und eine vor der Lichtquelle (sichtbare oder UV-Laser). Es erfolgt eine punktweise Beleuchtung des Objektfeldes. Dafür werden Laser aufgrund ihrer hohen Lichtintensitätsdichte im Strahl und der hervorragenden Fokussierbarkeit bevorzugt, da so im Beleuchtungspunkt genügend Licht zur Verfügung steht, um den fluoreszierenden Farbstoff anzuregen [Mat02].

Für die Multiphotonenmikroskopie wird im Allgemeinen ein fs-Laser im nahinfraroten Bereich verwendet. Dieser kann sowohl zur Bildgebung als auch zur schonenden Manipulation der Zellen genutzt werden (siehe Abschnitt 2.1.2), so dass kein weiteres Lasersystem notwendig ist. Dieser Wellenlängenbereich hat den Vorteil, dass der Streu- und der Absorptionskoeffizient in biologischem Gewebe sehr klein sind [Bou86], wodurch eine hohe Eindringtiefe in die Probe erreicht wird (siehe Abbildung 2.9). Für die lineare Anregung bei der konventionellen UV-Lampen-basierten Mikroskopie und der CLSM wird dagegen ultraviolettes bis sichtbares Licht verwendet. In diesem Bereich sind Streuung und Absorption deutlich stärker, so dass das Licht

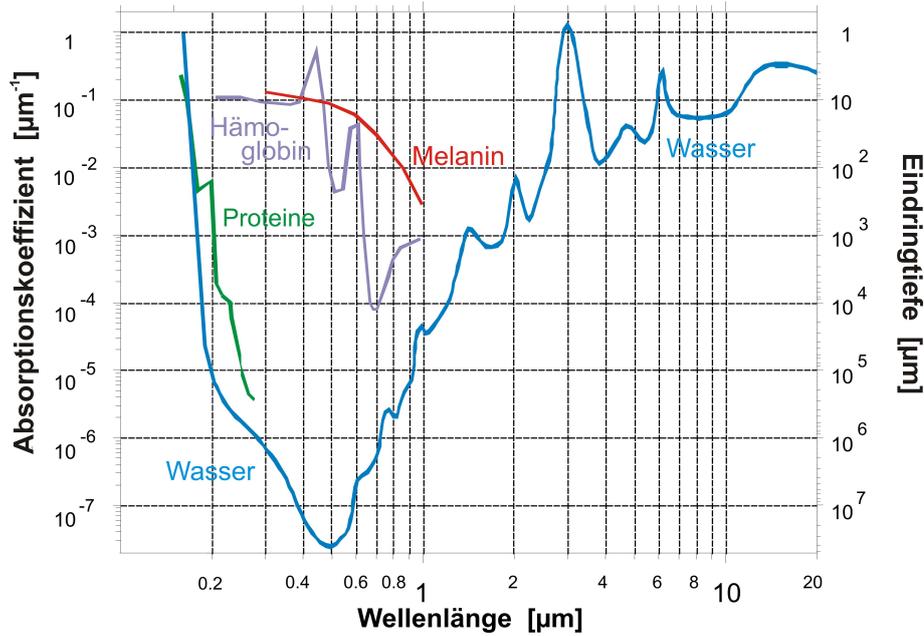


Abbildung 2.9: Absorptionskoeffizient und Eindringtiefe von Licht in biologisches Gewebe in Abhängigkeit zur Wellenlänge. Die höchste Eindringtiefe wird im nahinfraroten Bereich erzielt, im so genannten diagnostischen Fenster von 600 nm bis 1,1 μm [Bou86].

nur wenige 10 μm in die Probe propagieren kann [Cen98, Smi98]. Bei dicken Proben ist daher die Eindringtiefe für die Multiphotonenmikroskopie durch die Wellenlänge der Fluoreszenz begrenzt, während sie für die konventionelle Fluoreszenzmikroskopie durch das kürzerwellige anregende Licht limitiert ist.

Die Verwendung eines durchstimmbaren fs-Lasers für die Multiphotonenmikroskopie beinhaltet zusätzlich die Möglichkeit der Wellenlängen Anpassung an den jeweiligen Farbstoff. Im Gegensatz dazu werden für die CLSM mehrere Laser mit unterschiedlichen, festen Wellenlängen genutzt und für konventionelle Mikroskopie Anregungsfilter, die den jeweiligen spektralen Bereich der UV-Lampe transmittiert. Der Titan-Saphir-Laser bietet ein hohes Maß an Flexibilität für eine exakte Anregung der Moleküle ohne die Notwendigkeit von verschiedenen Anregungsfiltern oder mehreren Lasern.

Für Einzelzellschicht-Messungen wie sie in dieser Arbeit durchgeführt worden sind, ist eine hohe Eindringtiefe des Lichtes nicht von Bedeutung. Dennoch hat der Wellenlängenbereich im Nahinfraroten zwei entscheidende Vorteile für die Experimente. Der nahinfrarote Bereich ist aufgrund der geringen linearen Absorption weniger schädlich für die Zellen. Es kommt weder zu einer Temperaturerhöhung noch zu DNA-Schädigungen, wie sie im UV-Bereich vermehrt auftreten [Ber00, Tad03, Vog05, Gom07].

Zusätzlich entsteht durch die Zwei-Photonen-Anregung eine große spektrale Lücke zwischen Anregungswellenlänge und Fluoreszenzspektrum. Bei linearer Anregung hebt ein Photon das Chromophor in einen angeregten Zustand an, es kommt zu strahlungsfreien Relaxationen bevor das Molekül unter Aussendung eines Photons mit rotverschobener Wellenlänge (Stokesshift) wieder in den Grundzustand gelangt (siehe Abbildung 2.10). Dieser Stokesshift ist je nach Chromophor wenige nm bis einige 10 nm breit und ist nur mit entsprechend scharfkantigen Filtern selektierbar. Bei der nichtlinearen Anregung ist der spektrale Abstand zwischen anregendem und emittiertem Licht deutlich größer, typischer Weise im Bereich von mehreren 100 nm. Das Signal ist demnach besser vom Anregungsspektrum trennbar. Ebenso ist das Rauschen durch Stokes-verschobene Raman-Streuung geringer. Bei der Ein-Photonen-Anregung kann diese in das Emissionsband verschoben werden, während es bei der Zwei-Photonen-Anregung weiter vom Emissionsband weg verschoben wird. In Bezug auf Hyper-Raman und Hyper-Rayleigh Streuung besteht kein Unterschied zwischen Ein-Photonen- und Multiphotonenanregung. Sie können in beiden Fällen im Emissionsband liegen, diese Effekte sind allerdings klein und daher vernachlässigbar [Ter65, Lon70, Len07].

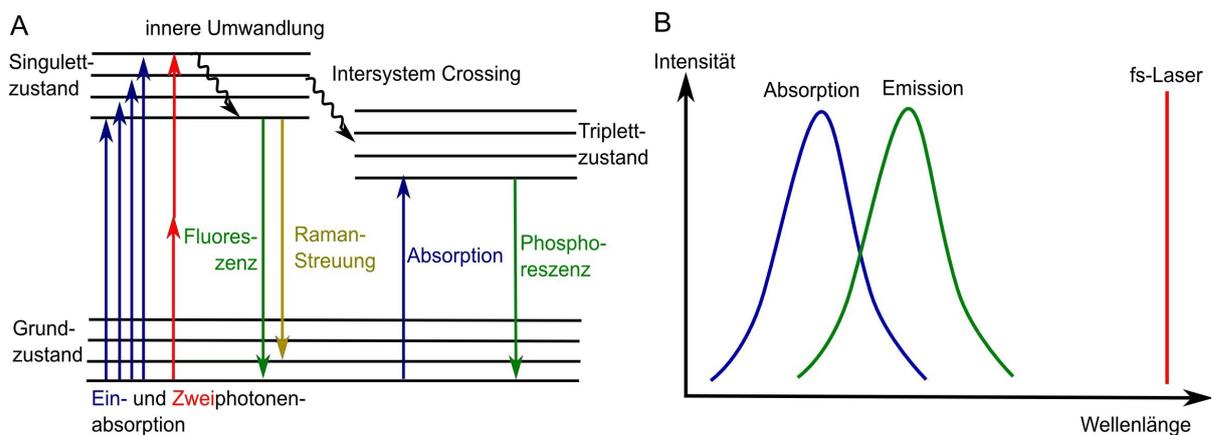


Abbildung 2.10: Schematische Darstellung (A) der Energieniveaueübergänge und (B) des Absorptions- und Emissionsspektrums eines Moleküls.

Die Begrenzung der Fluoreszenzanregung sowie des Photobleichens auf das fokale Volumen ist ein wichtiger Vorteil. Besonders für Messungen der Fluoreszenzintensität ist das deutlich limitierte Photobleichen entscheidend. Da lineare Absorption im gesamten Penetrationsvolumen des Lichtes stattfindet, tritt diese überall dort auf, so dass die Darstellung einer Konzentration mittels Fluoreszenzmikroskopie, die auf linearer Anregung basiert, nicht sinnvoll ist. Werden beispielsweise freie Radikale fluoreszenzmarkiert und deren Konzentration gemessen, würde

die Messung, zusätzlich zum Bleichen des Farbstoffes, durch die Erzeugung der Radikale durch das Anregungslicht die verfälscht. Wegen der geringen Pulsenergie, die für die Multiphotonenmikroskopie benötigt wird, ist die Erzeugung freier Radikale durch das Abrastern des Lasers um ein Vielfaches geringer als bei Verwendung von UV-Lampen [Koe00]. Deshalb ist die Multiphotonenmikroskopie hervorragend dazu geeignet, die relative Konzentration von ROS- oder Ca^{2+} -Molekülen darzustellen, wie in Kapitel 4 gezeigt wird.

3 Die eukaryotische Zelle

Es gibt zwei verschiedene Zellarten, die sich grundsätzlich darin unterscheiden, ob die Zelle eine durch Membrane abgegrenzte Organelle besitzt oder nicht, wie beispielsweise den Kern. Die Prokaryoten, Zellen ohne abgegrenzte Organellen, werden in zwei Gruppen aufgeteilt: die Bakterien und die Archaeen. Sie sind einzellige Organismen mit Genomen aus 1000 bis 4000 Genen. Eukaryoten haben viele Organellen, wie einen Kern, Mitochondrien und das endoplasmatische Retikulum (ER). Während der Zellteilung werden die Organellen wie das ER und die Mitochondrien auf die Folgezellen verteilt. Sie können nicht aus einer anderenorts enthaltenen Gensequenz heraus neu aufgebaut werden, sondern sie enthalten selbst die Informationen für ihren Aufbau [Bir83].

In dem durch eine Doppelmembran abgegrenzten Kern befindet sich die DNA. Typischerweise besitzen Eukaryoten 3 bis 30 mal so viele Gene wie Prokaryoten und zusätzlich etwa 1000 Mal mehr nicht codierende DNA. Diese ermöglicht komplexe Regelvorgänge der Genexpression, wie sie für einen vielzelligen Organismus notwendig sind [Alb02]. In dieser Arbeit werden ausschließlich Eukaryoten verwendet, deren Aufbau und Funktionsweise im Folgenden in ihren Grundzügen erläutert wird. Dabei liegt der Schwerpunkt besonders auf den Zellorganellen und Signalwegen für die in Kapitel 4 und 5 beschriebenden Experimente.

3.1 Aufbau der eukaryotischen Zelle

Jede Zelle wird grundsätzlich durch eine Membran von ihrer Umgebung abgegrenzt. Das Grundgerüst der Zellmembran ist eine Doppel-Lipid-Schicht, in die Proteine eingelagert sind, die die Funktion der Membran modulieren. Eine Verbindung zu anderen Zellen besteht über die extrazelluläre Matrix. Innerhalb der Zelle besteht ebenfalls eine Unterteilung in so genannte Zellorganellen (siehe Abbildung 3.1). Eine wichtige Organelle ist der Zellkern, der ebenfalls durch eine Doppelmembran vom Zytoplasma getrennt wird. In ihm befindet sich das genetische Material der Zelle. Die Energieversorgung einer eukaryotischen Zelle wird zum Großteil über

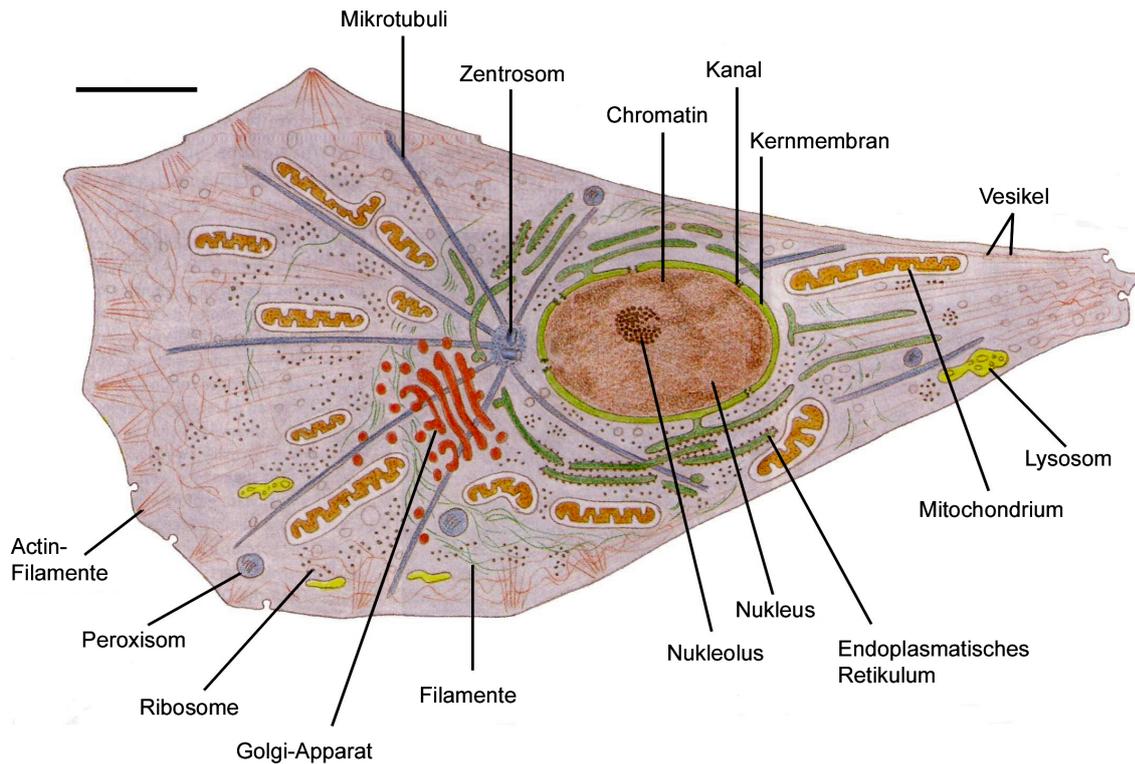


Abbildung 3.1: Schematische Zeichnung einer eukaryotischen Zelle. Skala: 5 μm [Alb02].

die Mitochondrien gewährleistet, die selbstvermehrend sind und ein eigenes Genom besitzen [Bir83]. Die Verdauung von Fremdstoffen in der Zelle wird von den Lysosomen und Peroxisomen übernommen. Diese Organellen enthalten Enzyme, die aufgenommene Moleküle und sogar Mikroorganismen abbauen [Alb02].

Die Form, die mechanische Stabilität und die Bewegung der Zelle sowie Transporte innerhalb der Zelle werden über das Zytoskelett und durch Motorproteine realisiert. Das Zytoskelett ist eine dynamische Struktur aus Proteinen, die nach Bedarf polymerisieren oder depolymerisieren und wird in drei Systeme unterteilt: die Aktinfilamente (Mikrofilamente), die Mikrotubuli und die Intermediärfilamente. Die Proteinbiosynthese wird durch die Ribosomen durchgeführt. Membranproteine sowie sekretorische Proteine werden direkt am ER synthetisiert. Die Ribosome, die diese Proteine produzieren, haften dort an, wodurch das sogenannte raue ER entsteht. Nach der Synthese wandern solche Proteine ins glatte ER und schließlich in den Golgi-Apparat. In diesen beiden Organellen werden die Proteine durch Faltung, Prozessierung, Glycosylierung und Phosphorylierung modifiziert und dadurch stufenweise funktionalisiert. Der Transport und die Sortierung der Proteine wird über Vesikel bewerkstelligt, die vom ER zum Golgi-Apparat und zurück oder zu Lysosomen sowie vom Golgi-Apparat zur Plasmamembran wandern [Alb02].

Im Folgenden werden die Zellmembran, der Zellkern und die Mitochondrien beschrieben. Diese Organellen werden in den in dieser Arbeit beschriebenen Versuchen mit dem fs-Laser manipuliert und die dadurch resultierenden Auswirkungen auf die Zelle untersucht. Die Barriere der Membran muss für die Transfektion von den DNA-Molekülen überwunden werden. Die Mitochondrien sowie der Zellkern sind wichtige Organellen für die Physiologie der Zelle und werden als Vergleichsmessung in dieser Arbeit manipuliert. Mitochondrien spielen eine wesentliche Rolle in der Produktion der Sauerstoffradikale und zusammen mit dem Kernperiplasma als Verlängerung der ER-Lumen regulieren sie den zytoplasmatischen Calciumhaushalt. Dieser ist ein wichtiger Mediator vieler zellulärer Funktionen wie Proliferation, Differenzierung oder Apoptose.

3.1.1 Die Zellmembran

Die Zellmembran besteht aus einer kontinuierlichen Doppel-Schicht von Lipidmolekülen, in die Membranproteine eingebettet sind (siehe Abbildung 3.2) [Eis84]. Sie wird als eine zweidimensionale Flüssigkeit beschrieben, in der sich Moleküle schnell bewegen können [Cha84]. Durch ihre Asymmetrie¹ ist ein Umklappen von Molekülen, die durch die Membran verlaufen (Flip-Flop), allerdings sehr selten [Dev93]. Die drei Hauptgruppen der Membran-Lipidmolekülen sind die Phospholipide, Cholesterin und Sphingolipide, wobei die Phospholipide die höchste Konzentration aufweisen [Bre85]. Je nach Zelltyp und nach Funktion der inneren und äußeren Seite der Membran ist die Zusammensetzung der Lipide unterschiedlich.

Die Doppel-Lipid-Schicht ist impermeabel für wasserlösliche, polare Moleküle und dient als Trennung zwischen intrazellulärem und extrazellulärem Raum. Sie dient ebenfalls als Gerüst, an das Polysaccharide und Proteine binden können. Darüber hinaus können Proteine mit den Lipiden assoziieren und sogar in die Doppel-Lipid-Schicht eingebettet werden (integrale Proteine). Durch Bindung von Polysacchariden an die Lipide (Bildung von Glycolipiden) und Einbettung sowie Assoziation mit Proteinen wird die Membran funktionalisiert. Die Membranproteine dienen als spezifische Rezeptoren, Enzyme und als Transportproteine [Bre85, Sim97, Har97]. Diese Moleküle treten transmembran² auf oder sind an der Oberfläche der Membran gebunden. Beispielsweise sind solche Moleküle Multipass-Proteine, die tonnenförmig in der Doppel-Lipid-Schicht angeordnet sind. Sie sind für den Transport von Ionen oder anderen kleinen wasserlöslichen Molekülen durch die Membran hindurch verantwortlich (siehe Abbildung 3.2).

¹Die Lipidmoleküle sind amphipatisch, beide Moleküleenden haben entgegengesetzte Eigenschaften, sie sind hydrophob bzw. hydrophil.

²Ein- oder mehrfache Durchgänge durch die Membran, so genannte Single oder Multipass-Proteine.

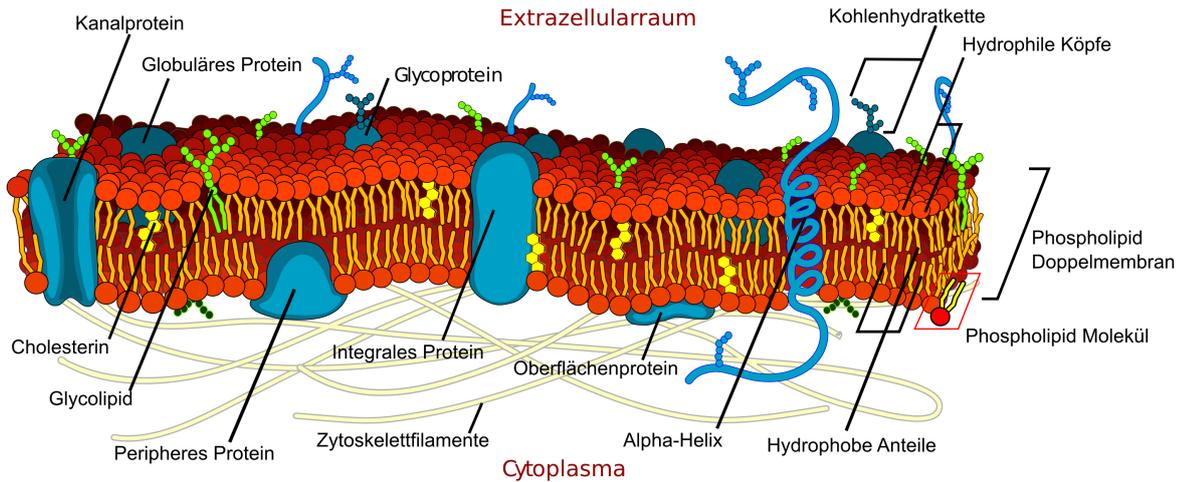


Abbildung 3.2: Schematische Zeichnung der Zellmembran [Tie].

Die Membranproteine sind an der äußeren Lipidschicht angeordnet und viele von ihnen sind durch kovalente Bindungen an Oligo- und Polysaccharid-Ketten³ gebunden [Bre85]. Daraus resultiert eine schützende Zuckerschicht um die Zelle herum, die sie gegenüber mechanischen oder chemischen Schäden schützt. Zusätzlich dienen diese äußeren Polysaccharidreste als Rezeptoren für Lektine (zuckerbindende Proteine) der extrazellulären Matrix [Sha95].

Um hydrophile Moleküle durch die Doppel-Lipid-Schicht der Membrane zu transportieren, beinhaltet jede Zellmembran verschiedene Transportproteine, die jeweils für den kontinuierlichen Transfer von spezifischen Molekülen oder Molekülgruppen zuständig sind [Bev99, San98]. Es gibt drei Klassen von Transportproteinen: Carrier-Proteine können Moleküle sowohl passiv als auch aktiv durch die Membran schleusen. Pumpen bekommen die für den Transport notwendige Energie über die ATP-Spaltung und Kanäle transportieren grundsätzlich passiv. Hierzu dient das elektrochemische Potential der jeweiligen Ionen als treibende Kraft.

Die Carrier-Proteine (Transporter) binden spezifisch Moleküle und durchlaufen eine Konformationsänderung, so dass die Bindungsstellen für das Molekül nacheinander auf der einen und der anderen Seite der Membran öffnen. Dieser Transport kann sowohl in Richtung als auch entgegengesetzt des elektrochemischen Gradienten ablaufen. Durch Kopplung eines in Richtung des elektrochemischen Gradienten ablaufenden (Symport) mit einem in Gegenrichtung ablaufenden Transport (Antiport) kann ein Carrier einen aktiven Transfer bewerkstelligen.

³Kohlenhydrate (Zucker), die aus mehreren gleichen oder verschiedenen Monosacchariden aufgebaut sind, und durch glykosidische Bindungen (Bindung zwischen Alkohol- und Zuckerteil) miteinander verbunden sind.

Die für die notwendigen Konformationsänderungen benötigte Energie für die Pumpen wird aus der Hydrolyse von ATP (Adenosintriphosphat), aus Licht oder aus dem in Richtung des Gradienten fließenden Molekülen wie beispielsweise Na^+ oder H^+ gewonnen [Mar85, Ste90].

Die Kanäle bilden ihrerseits wässrige Poren durch die Membran, durch die Ionen einer bestimmten Größe und Ladung entsprechend des elektrochemischen Gradienten fließen [Hig99]. Die Geschwindigkeit dieses Transportes ist etwa 1000-fach schneller als mittels der bekannten Carrier-Proteine. Die Kanäle öffnen sich kontrolliert als Antwort auf spezifische Reize bzw. Trigger, zum Beispiel eine Änderung des Membranpotentials (spannungskontrollierte Kanäle) oder die Bindung eines Neurotransmitters⁴ (transmitterkontrollierte Kanäle) [San98, Ste90].

3.1.2 Der Zellkern

Der Zellkern enthält das Genom und in ihm wird die DNA und RNA synthetisiert. Der Kern ist von einer inneren und einer äußeren Kernmembran umschlossen. Die dadurch entstandene Kernperiplasma setzt sich im Lumen des ERs fort. Die im Kern hergestellten RNA-Moleküle werden in das Zytosol transportiert, umgekehrt werden Kernproteine nach ihrer Synthese im Zytosol in den Kern hinein transportiert [Fah03, War96]. Einige dieser Kernproteine wandern hin und her zwischen dem Kern und dem Zytosol. Solche Pendelproteine steuern beispielsweise die Aktivität mancher Gen-regulierender Proteine, indem sie an ihre Rezeptormoleküle binden und sie damit aktivieren [Hut02, Fox02]. Diese binden ihrerseits an die DNA und kontrollieren die Transkription von spezifischen Genen.

Der Zellkern zerfällt während der Mitose und die Kernlamina depolymerisiert [Sti83], so dass die Barriere, die normalerweise das Zytosol vom Kerninnenraum trennt, nicht mehr vorhanden ist (siehe Abbildung 3.3). Zudem vermischen sich die Proteine, die nicht an Membranen oder Chromosomen gebunden sind [War96]. Erst im späteren Verlauf der Mitose (Anaphase) bildet sich die Kernhülle in einem Selbstorganisationsprozess wieder zurück [Foi93, Cox94, New90]. Dabei liegt sie anfänglich eng an den Chromosomen an, wodurch zunächst alle Proteine aus dem Kern ausgeschlossen werden, die nicht an die mitotischen Chromosomen gebunden waren. Nach dem Wiederaufbau der Kernhülle lagern sich Membranproteine der inneren Kernmembran, dephosphorylierte Lamine und Kernporenkomplexe an, die beginnen aktiv Proteine zu reimportieren.

⁴Neurotransmitter sind heterogene biochemische Stoffe, welche die Information von einer Nervenzelle zur anderen über die Kontaktstelle der Nervenzellen, der Synapse, weitergeben.

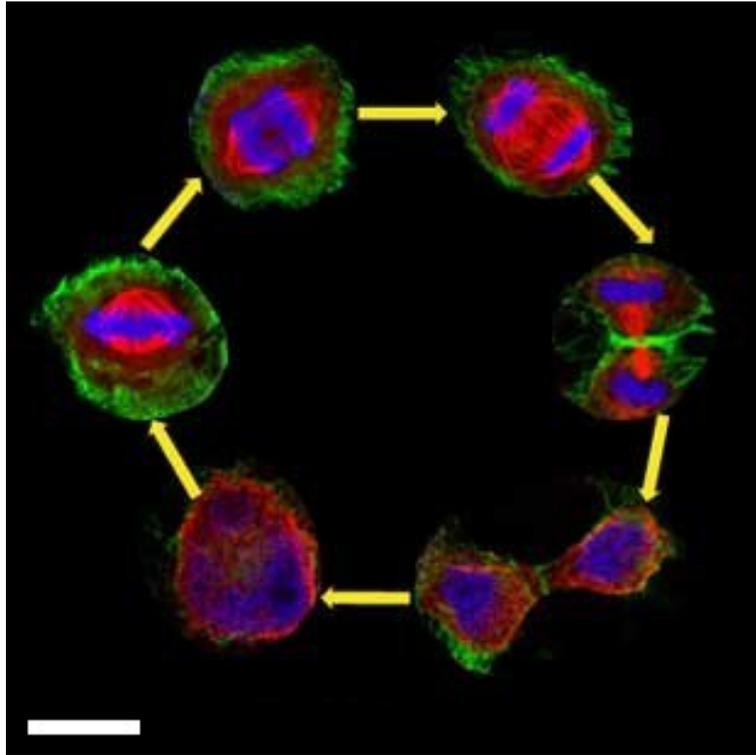


Abbildung 3.3: Fluoreszenzbild einer humanen Krebszelle bei der Zellteilung. Skala: 10 µm [Wae].

3.1.3 Die Mitochondrien

Die Mitochondrien nehmen einen Großteil des Volumens des Zytoplasmas von Eukaryoten ein. Es wird davon ausgegangen, dass in der Entwicklung der Zellen energieumwandelnde Prokaryoten von der Zelle durch Endozytose aufgenommen wurden und sich in Symbiose weiterentwickelt haben. Diese Theorie wird von verschiedenen Befunden unterstützt, u.a. durch die Tatsache, dass Mitochondrien ihre eigene DNA besitzen, die ihre Proteine codiert.

Ein Mitochondrium besteht aus einer äußeren Membran, dem Membranzwischenraum, der inneren Membran und der Matrix (siehe Abbildung 3.4) [Sch67, Par66, Sot67]. Die äußere Membran ist durchlässig für Proteine kleiner als 5000 kD, die so in das intermembrane Volumen gelangen. Die Energieumwandlung für den Metabolismus der Zelle läuft in diesen Organellen ab.

Die Hauptfunktionen der Mitochondrien finden an der inneren Membran und der Matrix statt. Die innere Membran ist dicht gefaltet in die so genannten Cristae, so dass diese bis zu einem Drittel der gesamten Membrane der Zelle ausmacht. Sie ist hoch spezialisiert, so dass ausschließlich die für Transportproteine und für die Verdauung von Pyruvat und Fettsäuren in Acetyl CoA im Zitronensäure-Zyklus benötigten Moleküle in die Matrix transportiert werden.

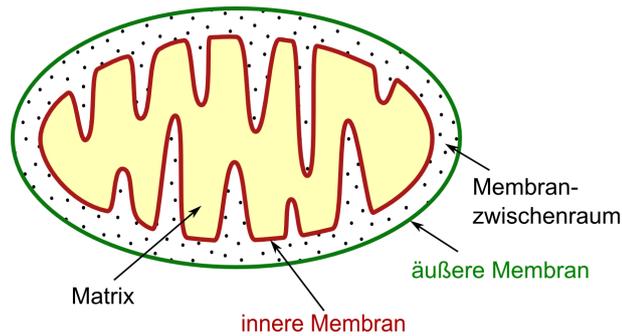


Abbildung 3.4: Schematische Darstellung eines Mitochondriums mit der äußeren und der inneren Membran, des Membranzwischenraums sowie der Matrix.

Die Hauptendprodukte dieser Reaktionen sind CO_2 , das als Abfallprodukt der Zelle entsorgt wird, und NADH, das für die Versorgung mit Elektronen für die Atmungskette (Elektronen-Transport-Kette) verantwortlich ist. Diese findet an der inneren Membran der Mitochondrien statt und ist wichtig für die oxidative Phosphorylierung, die das meiste ATP in den Zellen produziert [Sla53, Lar52, Lar53, Cha52, Cha55, Coh53, Boy54].

Glucose wird durch Glycolyse bis zum Pyruvat abgebaut. Dies wird, wie auch Fettsäuren, in Acetyl CoA (Acetyl Koenzym A) konvertiert und durch den Zitronensäure-Zyklus zu CO_2 und eine Zwei-Kohlenstoff-Acetyl-Gruppe oxidiert, die sich zu wieder zu Acetyl CoA formt (siehe Abbildung 3.5). Die Haupt-Endprodukte des Zitronensäure-Zyklus sind CO_2 und hochenergetische Elektronen in Form von NADH. Das CO_2 wird als Abfallprodukt aus dem Mitochondrium heraus transportiert, während das NADH das Elektron an die Elektronen-Transport-Kette weiter gibt, die an der inneren Membran lokalisiert ist (siehe Abbildung 3.5) [Kre37, Ken49, Sch49].

Die Elektronen-Transport-Kette produziert mit diesem Elektron in Verbindung mit Sauerstoff Wasser. Der Sauerstoff dient hierbei ausschließlich der Gewinnung der Elektronen aus dem NADH und damit zur Produktion von NAD^+ , so dass ohne Sauerstoff der Zyklus nicht weiter ablaufen kann⁵. Das Elektron wird durch eine Serie von Elektronen-Carrier transportiert, wobei sie transient an Protonen (H^+) binden, aber erst nach dem Durchgang durch die Elektronen-Transport-Kette an Sauerstoff binden, um die negativen Ladungen auszugleichen. Der durch diesen Ablauf entstandene Protonengradient zwischen Membranzwischenraum und Matrix ermöglicht die oxidative Phosphorylierung von ADP zu ATP [Coh53, Boy54, Swa56, Bra77].

Das in der inneren Membran befindliche Molekül ATP-Synthase ist ein durch Protonen getriebener Motor, der aus ADP und P_i das ATP synthetisiert. Das in der Matrix produzierte ATP wird

⁵ $\text{NADH} \rightarrow \text{NAD}^+ + \text{H}^+ + 2\text{e}^-$, so dass Elektronen für die Elektronen-Transport-Kette zur Verfügung stehen.

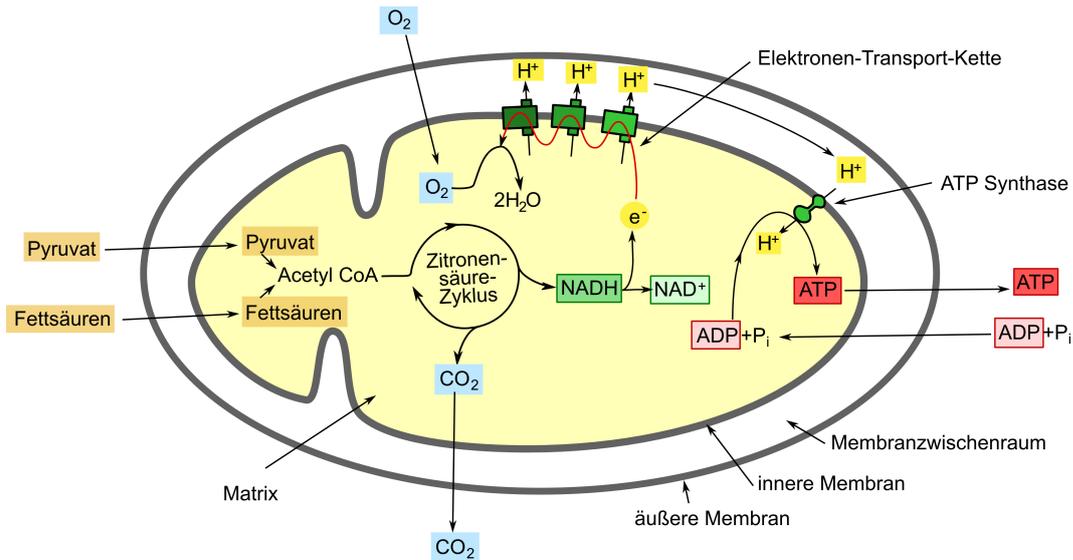


Abbildung 3.5: Schematische Darstellung der Energiegewinnung in Mitochondrien. Pyruvat und Fettsäuren werden in die Matrix des Mitochondriums transportiert (links) und werden in Acetyl CoA umgewandelt. Dieses wird im Zitronensäure-Zyklus verdaut und reduziert NAD^+ zu NADH (auch FAD zu FADH_2 , nicht dargestellt). In der oxidativen Phosphorylierung werden hochenergetische Elektronen vom NADH (und FADH_2) durch die Elektronentransport-Kette zu Sauerstoff transportiert. Diese Elektronentransport-Kette generiert einen Protonengradienten an der inneren Membran, der wiederum für die ATP-Herstellung durch ATP-Synthase benötigt wird (rechts).

über ADP/ATP -Antiporter in den Intermembranraum transportiert, diffundiert durch die äußere Membrane des Mitochondriums und steht der ganzen Zelle als Energiequelle zur Verfügung. Die Hydrolyse von ATP zu P_i und ADP ergibt je nach intrazellulären Bedingungen eine frei werdende Energie von $11 \frac{\text{kcal}}{\text{mol}}$ bis $13 \frac{\text{kcal}}{\text{mol}}$. Glycolyse alleine würde 2 ATP Moleküle pro metabolisiertes Glucose erzeugen. Dies ist der Fall, wenn kein Sauerstoff zur Verfügung steht. Dagegen produziert jedes aus NADH gewonnene Elektronenpaar die Energie für etwa 2,5 ATP Moleküle, wenn Sauerstoff vorhanden ist.

Tabelle 3.1: Produktfeld der Oxidation von Zucker und Fettsäuren in Mitochondrien.

Produkte aus der Oxidation eines Glukose Moleküls	
Zytosol	1 Glukose \rightarrow 2 Pyruvat + 2 NADH + 2 ATP
Mitochondrien	2 Pyruvat \rightarrow Acetyl CoA + 2 NADH 2 Acetyl \rightarrow 6 NADH + 2 FADH_2 + 2 GTP
Netto in Mitochondrien	2 Pyruvat \rightarrow 8 NADH + 2 FADH_2 + 2 GTP
Produkte aus der Oxidation eines Palmitoyl CoA	
Mitochondrien	1 Palmitoyl CoA \rightarrow 8 Acetyl CoA + 7 NADH + 7 FADH_2 8 Acetyl CoA \rightarrow 24 NADH + 8 FADH_2
Netto in Mitochondrien	1 Palmitoyl CoA \rightarrow 31 NADH + 15 FADH_2

3.2 Molekulare Signalwege der Zelle

Die molekularen Abläufe in Zellen sind äußerst komplex und oft von vielen Parametern abhängig. Dabei sind reaktive Sauerstoffspezies (engl. *reactive oxygen species*, ROS) besonders in den Energieumwandlungsprozessen, aber auch beim Alterungsprozess und in der Pathophysiologie beteiligt. Calcium ist ein Signalträger beispielsweise für die Zellteilung, Muskelkontraktion und synaptische Signalübertragung. Diese beiden Molekülgruppen werden im Folgenden für die Signalwege der Zellen behandelt.

3.2.1 Reaktive-Sauerstoffspezies-Signale

Die ROS sind reaktive Formen des Sauerstoffs, wie beispielsweise das Hyperoxid-Anion $\text{O}_2^{\bullet-}$ und das Hydroxyl-Radikal OH^\bullet , aber auch stabile molekulare Oxidantien wie Wasserstoffperoxid H_2O_2 und Ozon O_3 sowie angeregte Sauerstoffmoleküle wie Singulett-Sauerstoff $^1\text{O}_2$. In Zellen entstehen ROS unter anderem in den Mitochondrien als Nebenprodukt der Atmungskette an Komplex I und Komplex III (siehe auch Abschnitt 3.1.3) [Coh53, Boy54].

Komplex I, der NADH Dehydrogenase Komplex, nimmt ein Elektron von NADH auf und gibt es weiter an Ubichinone, welches seine Elektronen zum Cytochrom b-c₁ Komplex weiterleitet. Dieser Komplex funktioniert wie ein Dimer und gibt die Elektronen von Ubichinone an Cytochrom c weiter, das sie wiederum an den Cytochrom Oxydase Komplex gibt [Hog46]. Hier werden vier Elektronen an den Sauerstoff weitergegeben.

Die Cytochrom Oxydase Reaktion ist für etwa 90% der Sauerstoffaufnahme in den meisten Zellarten verantwortlich [Alb02]. Sauerstoff reagiert mit Wasserstoffionen zu Wasser, da jedes Atom die Edelgaskonfiguration anstrebt (für Sauerstoffatome mit acht Elektronen und für Wasserstoff mit zwei Elektronen). Da der Sauerstoff dort nur sechs und Wasserstoff ein Elektron besitzt, binden diese beiden Atome zu Wasser, so dass alle drei die Edelgaskonfiguration erreichen ($\text{O}_2 + 4\text{H}^+ \rightarrow 2\text{H}_2\text{O}$). Dieser Prozess ist in etwa 2% der Fälle fehlerhaft, wenn sich nur ein Wasserstoffatom mit einem Sauerstoffatom verbindet [Alb02]. Dies ist mit sieben Elektronen auf der äußeren Schale der Edelgaskonfiguration schon sehr nahe und strebt danach, sich mit einem weiteren Atom zu verbinden. Beispielsweise entsteht bei einer Reduktion um ein Elektron aus O_2 das Superoxid Anion $\text{O}_2^{\bullet-}$. Die Zellen haben jedoch Schutzmechanismen entwickelt, unter anderem Schutzenzyme (Superoxiddismutase, Katalase) und Antioxidantien (Glutathion, Ascorbinsäure, Vitamin C und β -Carotin), die die ROS durch Übertragung eines Elektrons

neutralisieren. So wird mit Hilfe von Superoxiddismutase aus



welches wiederum durch Katalase zu



umgewandelt wird. Diese beiden Enzyme sind äußerst effizient und führen ihre Reaktionen an oder nahe der diffusionslimitierten Rate durch (Katalase: $4 \times 10^7 \text{ s}^{-1}\text{M}^{-1}$, Superoxiddismutase: $7 \times 10^9 \text{ s}^{-1}\text{M}^{-1}$) [Str92, Fer99, Pap00].

Die Diffusion der freien Radikale ist aufgrund ihrer Reaktivität sehr begrenzt. Beispielsweise haben Radikale wie CCl_3^{\bullet} oder OH^{\bullet} eine Halbwertszeit von wenigen Milisekunden in biologischem Gewebe [Sla76, Bor84]. Deshalb können sie durch Diffusion durchschnittlich weniger als 100 nm vom Ort der Entstehung diffundieren [Sla76]. Weniger reaktive freie Radikale wie beispielsweise H_2O_2 haben eine höhere Halbwertszeit und können dadurch weitere Strecken diffundieren [Nik83, Bat02]. Da sie eine geringe Reaktivität besitzen, ist ihr Schädigungspotential für die Zelle ebenfalls geringer [Sla84].

Da biologisches Gewebe hauptsächlich aus Wasser besteht, ist dies für die Beschreibung von Zellen eine gute Näherung. Durch Photolyse ionisiert Wasser unter Abgabe eines Elektrons. Während einer Zeit kürzer als $3 \times 10^{-13} \text{ s}$ wird dieses Elektron hydratisiert. Das kationische Wasserradikal ist instabil und wird innerhalb von etwa 10^{-13} s in $H_2O^+ + H_2O \rightarrow H_3O^+ + OH^{\bullet}$ transformiert. Ebenso schnell kann das angeregte Wassermolekül dissoziieren in $H_2O^* \rightarrow H + OH^*$. Diese Primärreaktionen führen demnach während weniger Pikosekunden zur Bildung von H_3O^+ Ionen und OH^* Radikalen. Da neben Wasser auch Sauerstoff O_2 vorliegt kann es zu einer großen Zahl von Sekundärreaktionen kommen. Diese produzieren während 10^{-9} bis 10^{-6} s neue Produkte wie H , O_2^- , OH^- , H_2 , H_2O_2 und HO_2 . Nach etwa 10^{-3} s sind die durch Photolyse ausgelösten Reaktionen beendet [Nik83].

3.2.2 Calcium-Signale

Im Zytosol der Zellen ist die Calciumkonzentration sehr niedrig (etwa 10^{-7} M), während sie extrazellulär etwa 10.000-mal höher ist. In den einzelnen Zellkompartimenten ist sie jeweils durch die sie umgebende Membran reguliert. Calciumionen (Ca^{2+}) sind für sehr viele zelluläre Abläufe

ausschlaggebend. Sie sind unter anderem für die Zellteilung, die Muskelkontraktion, die zelluläre Motilität und die synaptische Signalübertragung bedeutend. Bei diesen Aktivitäten wird jeweils auf der Zelloberfläche ein extrazelluläres Signal empfangen, das dazu führt, dass die intrazelluläre Ca^{2+} -Konzentration dramatisch zunimmt. Ein länger andauernder und zu hoher Anstieg von Calcium kann über die Aktivierung von Ca^{2+} sensitiven proteinverdauenden Enzymen zu Nekrose führen [Ber98]. Um den Zelltod zu umgehen, wird entweder der Konzentrationsanstieg niedrig gehalten oder ein kurzes Signal mit hoher Amplitude weitergeleitet. Muss eine Information über einen längeren Zeitabschnitt aufrecht erhalten werden, kommt es zu so genannten Ca^{2+} -Oszillationen.

Während des Ablaufs von Ca^{2+} -Signalen gibt es einen kontinuierlichen Austausch der Ionen zwischen dem Endoplasmatischen Retikulum (ER) und den Mitochondrien. Dabei verbleibt jedoch der Hauptanteil im Lumen des ERs. Die hohe Ca^{2+} -Konzentration dient dort der Synthese und der Verarbeitung von Proteinen. Wird dieser Speicher zu Gunsten der Mitochondrien entleert, werden zwei Mechanismen in Gang gesetzt. Einerseits werden Stress-Signale im ER aktiviert, so dass Gene angeschaltet werden, die für den Zelltod zuständig sind. Andererseits führt die Übersättigung der Mitochondrien zur Auslösung der Aktivationskaskade der Apoptose (siehe Abschnitt 4.9) durch einen abnormalen Mitochondrien Metabolismus [Lam94]. Dabei wird vermutet, dass Ca^{2+} durch die Ablösung des Cytochrom c von der inneren Membran und der Permeabilisierung der äusseren Membran einen direkten Einfluss auf die Cytochrom c Freigabe hat [Ott02, Nie03, Don06].

Zusammenfassend aktiviert eine Störung der Calcium Homöostase viele destruktive Prozesse, die subzelluläre Strukturen angreifen, beispielsweise die Zellmembran, das Zytoskelett, die Mitochondrien oder den Zellkern [Ber98, Orr03, Don06].

3.2.3 Aktivationskaskade der Apoptose

In einem Organismus ist es unumgänglich, dass nicht nur die Rate der Zellteilung, sondern auch die des Zelltodes reguliert wird. Zellen, die nicht mehr gebraucht werden, leiten den programmierten Zelltod (Apoptose) ein, indem sie eine spezifische Aktivationskaskade auslösen [Raf92]. In ausgewachsenem Gewebe gleichen sich die Zellteilung und Apoptose aus, so dass es weder wächst noch schrumpft [Con99]. Bei krebsartigen Zellen dagegen ist die Aktivationskaskade der Apoptose an einer Stelle unterbrochen, so dass das Krebsgewebe wuchert und sich unaufhaltsam ausbreitet.

Stirbt eine Zelle durch akute Schädigung (Nekrose), schüttet sie ihren Inhalt über ihre Nachbarzellen aus und ruft möglicherweise eine Entzündungsreaktion hervor. Eine apoptotische Zelle dagegen stirbt, ohne ihre Nachbarn zu schädigen. Das Cytoskelett bricht zusammen, die Kernhülle zerfällt und die DNA wird zerlegt, so dass die Zelle schrumpft und sich verdichtet. Bevor Moleküle freigesetzt werden können, wird sie durch eine Nachbarzelle oder einen Makrophagen phagozytiert⁶ [Ker72]. Dies hat den zusätzlichen Vorteil, dass Bestandteile der toten Zelle von der Phagozytierenden wiederverwendet werden können.

Die Apoptose-Aktivationskaskade ist in allen tierischen Zellen ähnlich und beruht auf einer Familie von Proteasen, den Caspasen⁷ [Aln96, Tho98]. Werden die inaktiven Procaspasen aktiviert, löst dies die sich selbst verstärkende proteolytische Kaskade aus, denn jede Caspase aktiviert ihrerseits weitere Procaspasen. Bestimmte Caspasen spalten andere Schlüsselproteine der Zelle, beispielsweise die Kernlamine, und verursachen so den irreversiblen Abbau der Kernlamina⁸ [Los97, Ree99, Goy01]. Durch diese Prozesse zersetzt sich die Zelle selbst. Die Proteasekaskade ist zerstörend, selbstverstärkend und unumkehrbar. Ist sie einmal ausgelöst und hat einen bestimmten kritischen Punkt erreicht, ist dieser Prozess irreversibel.

Die Initialisierung der Kaskade wird entweder durch extrazelluläre Signale wie die Entfernung von Wachstumsfaktoren oder durch intrazelluläre Signale wie DNA-Anomalien eingeleitet, wobei intrazelluläre Adaptermoleküle Aggregation und Aktivierung der Procaspasen vermitteln (siehe Abbildung 3.6). Im Folgenden wird der intrinsische Apoptosesignalweg beschrieben, da dieser für die Interpretation der in dieser Arbeit durchgeführten Experimente wichtig ist.

Der intrinsische oder auch mitochondrienvermittelte Apoptosesignalweg wird beispielsweise durch einen irreparablen genetischen Schaden, extrem hohe Calcium-Konzentrationen im Cytosol oder massiven oxidativen Stress ausgelöst. Dieser Stress veranlaßt die Vertreter der Bcl-2-Proteinfamilie wie Bax oder Bad dazu, sich aus dem Cytosol zur äußeren Mitochondrienmembran zu bewegen und daran zu binden [Tsu98, Cor02]. Die Bindung von Bax an diese Membran erhöht ihre Permeabilität für bestimmte mitochondriale Proteine wie Cytochrom c [Shi98, Jür98, Nar98]. Die Freisetzung dieses Proteins ist möglicherweise das entscheidende Ereignis, das die Zelle in die Apoptose überführt. Das Cytochrom c bildet zusammen mit Procaspase-9 und anderen cytoplasmatischen Faktoren wie Apaf-1 den Multiproteinkomplex Apoptosom (Apoptosekörperchen). Die bei dieser Bindung aktivierte Caspase-9 ist eine Initiatorcaspase, die wiederum

⁶Durch Membraneinstülpung aufnehmen.

⁷Diese Proteasen haben ein Cystein im aktiven Zentrum und schneiden ihre Zielproteine an spezifischen Aspartylresten.

⁸Bestandteile der inneren Kernhülle.

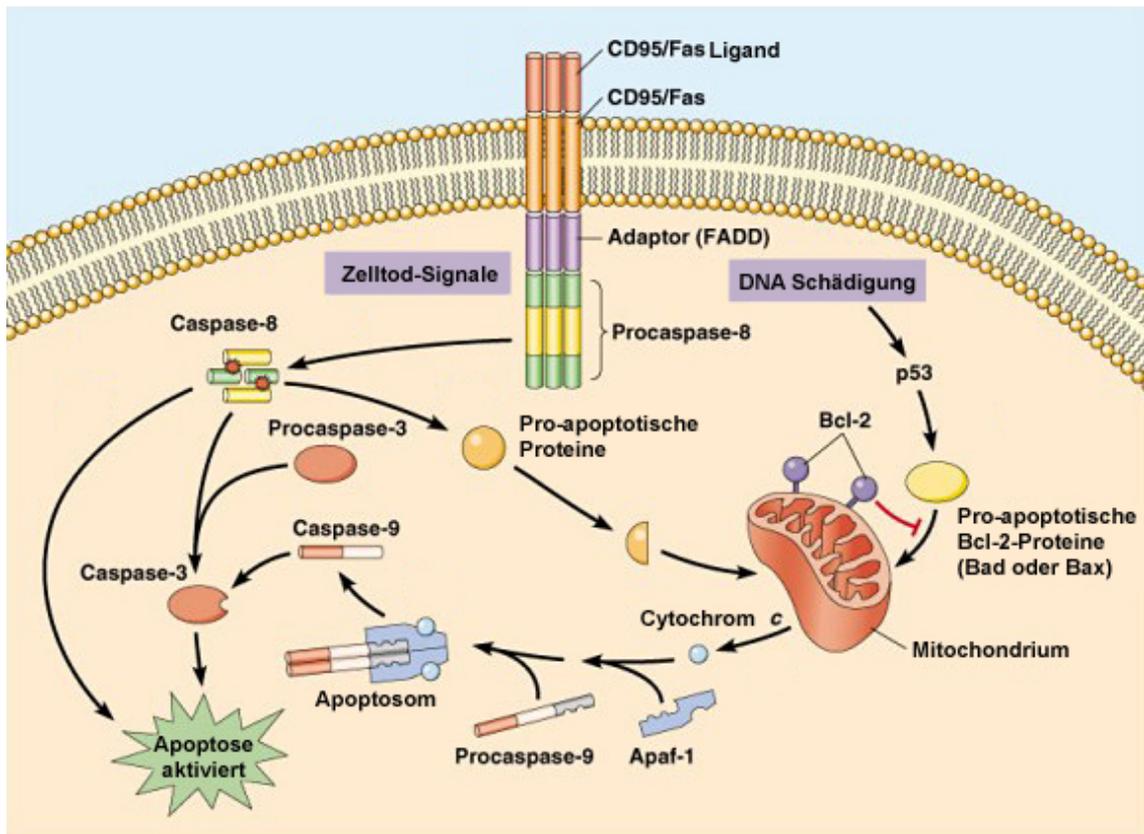


Abbildung 3.6: Schematische Darstellung des intrinsischen und extrinsischen Apoptosesignalweges [Hoh09]. Der intrinsische Signalweg wird beispielsweise durch DNA-Schädigung ausgelöst, der extrinsische durch Zelltodsignale, die von außen an bestimmte Rezeptoren der Zellmembran binden.

nachgeschaltete Effektorcaspasen aktiviert. An dieser Stelle der Kaskade treffen sich intrinsischer und extrinsischer Apoptosesignalweg⁹ (siehe Abbildung 3.6). Durch die Effektorcaspasen werden zelluläre Zielmoleküle gespalten und die apoptotische Reaktion wird ausgeführt.

3.3 Das Membranpotential

Die Konzentration von Ionen an der Innen- und Außenseite der Zellmembran ist in der Regel nicht ausgeglichen. Außerhalb der Zelle herrscht ein Überschuss an positiven Na^+ -Ionen und negativen Ionen, während in der Zelle mehr negative K^+ -Ionen vorliegen (siehe Abbildung 3.7) [Alb02]. Darüber hinaus ist im Ruhezustand die Membranpermeabilität für kleine Ionen wie Na^+ , K^+ und Cl^- unterschiedlich. Die Permeabilität von K^+ ist beispielsweise einen Faktor 100 höher als diejenige von Na^+ . Dieser Konzentrations- und Permeabilitätsunterschied führt

⁹Der extrinsische Apoptosesignalweg ist der Rezeptorvermittelte Zelltod, der durch Liganden induziert wird, die entsprechend an die in der Zellmembran befindlichen Rezeptoren binden.

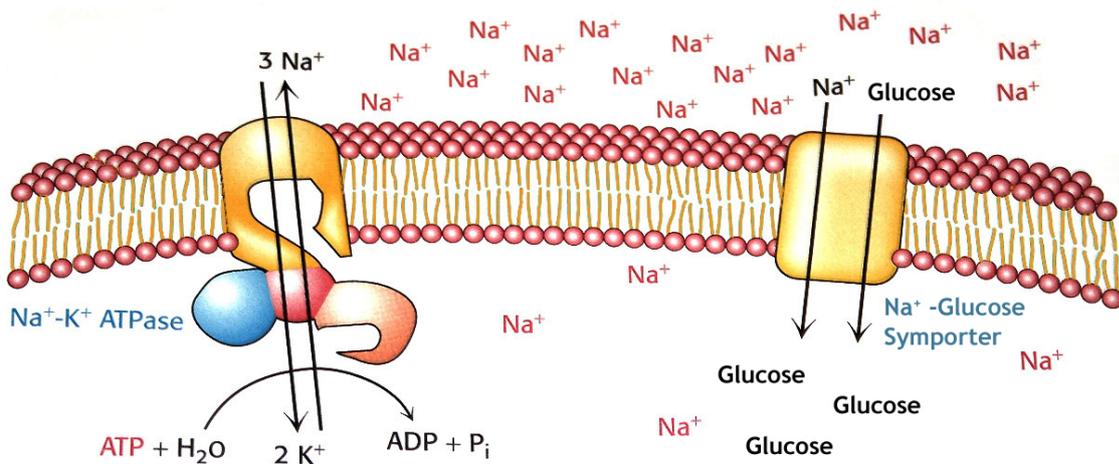


Abbildung 3.7: Na⁺/K⁺-ATPase wandelt die freie Energie des Phosphoryl-Transfers in freie Energie eines Na⁺-Gradienten um. Der Ionengradient kann dazu verwendet werden, Material in die Zelle zu pumpen, beispielsweise durch einen Sekundärtransporter wie der Na⁺-Glucose Symporter.

zur Entstehung eines Spannungsunterschieds zwischen dem extrazellulären und intrazellulären Raum. Dieses Membranpotential liegt in der Größenordnung von -10 bis -100 mV (wenn der extrazelluläre Raum auf 0 mV gesetzt wird) und hängt vom Zelltyp und dessen Funktion ab [Alb02]. Bei einer Stimulation kann es sich für eine Signalweiterleitung stark ändern [Hod52].

Innerhalb der Zelle stellen Kaliumionen (K⁺-Ionen) den Hauptanteil an positiv geladenen Ionen während Natriumionen (Na⁺-Ionen) nur in geringer Menge auftreten. Außerhalb der Zelle gibt es dagegen viele Na⁺-Ionen und wenige K⁺-Ionen. Die negative Ladung wird innerhalb der Zelle im Wesentlichen durch Proteine, Aminosäuren, Sulfate, Phosphate und Carbonsäure-Anionen getragen, während außerhalb der Zelle das Chloridion (Cl⁻-Ion) das Hauptanion ist [Alb02].

Das Membranpotential läßt sich durch folgende biophysikalische Betrachtung beschreiben (nach [Cot08]). Die Teilchenbewegung unter dem Einfluss von Konzentrationsgradienten, die chemische Diffusion, kann mit dem Fluss J_{chem} beschrieben werden

$$(3.3) \quad J_{chem} = -D \frac{dC}{dx},$$

wobei D der Diffusionskoeffizient und C die Konzentration der chemischen Stoffart darstellt.

Tragen die Teilchen eine elektrische Ladung, wie es in der Zelle oft der Fall ist, muss zusätzlich eine Treibgeschwindigkeit $v_{treib} = \mu E$ berücksichtigt werden, die von dem elektrischen Feld E abhängt, wobei μ die Mobilität ist. Stehen die Kräfte durch chemischen und elektrischen Fluss im Gleichgewicht, gilt

$$(3.4) \quad -D \frac{dC}{dx} = -\mu EC.$$

Wird die Ladung q in einem Zylindervolumen der Fläche A und der Länge dx angenommen, so wirken die Kräfte $F_{elekt} = EqCA dx$ und $F_{chem} = AdP$, wobei dP der Druckunterschied an beiden Enden des Zylinders ist. Im Gleichgewichtszustand folgt daraus

$$(3.5) \quad EqC = \frac{dP}{dx},$$

wobei der Druck P mit der idealen Gasgleichung durch $P = Ck_B T$ beschrieben werden kann. Dabei ist k_B die Boltzmann-Konstante und die Konzentration $C = \frac{N}{V}$ der Quotient aus Teilchenzahl und Volumen. Aus dem Gleichgewicht in Gleichung 3.4 folgt damit die Einstein-Gleichung

$$(3.6) \quad \mu = \frac{qD}{k_B T},$$

die die Mobilität zum Diffusionskoeffizienten in Beziehung setzt.

Das Ruhepotential U_m lässt sich damit wie folgt herleiten. Der elektrische Strom, der bei zwei verschiedenen geladenen Ionen auftritt, wobei die Bewegung wieder durch einen Konzentrationsgradienten und ein elektrisches Feld hervorgerufen wird, ist

$$(3.7) \quad J = -q(D_+ - D_-) \left(\frac{dC}{dx} \right) + qEC(\mu_+ + \mu_-)$$

$$(3.8) \quad J = qC(\mu_+ + \mu_-) \left(E - \frac{(D_+ - D_-)}{(\mu_+ + \mu_-)} \frac{d(\ln C)}{dx} \right),$$

wobei $\frac{1}{C} \left(\frac{dC}{dx} \right) = \frac{d(\ln C)}{dx}$ ist und die $+$ und $-$ Zeichen für die unterschiedlichen elektrischen Ladungen stehen. Der Strom ist hierbei eine allgemeine Form des Ohm'schen Gesetzes, er lässt sich vereinfacht als $i = \sigma(E + E_{chem})$ beschreiben, wobei $\sigma = qC(\mu_+ + \mu_-)$ die Leitfähigkeit ist.

Sind die Ionen durch eine Membran getrennt, ist die Potentialdifferenz auf der Innen- (i) und Außenseite (a)

$$(3.9) \quad \Delta U = U_i - U_a = - \int_a^i E_{chem} dx = \frac{(D_+ - D_-)}{(\mu_+ + \mu_-)} \ln \left(\frac{C_i}{C_a} \right).$$

Mit Gleichung 3.6 ergibt sich daraus die Nernst-Gleichung

$$(3.10) \quad \Delta U = -\frac{k_B T}{q} \ln\left(\frac{C_i}{C_a}\right) = -\frac{RT}{F} \ln\left(\frac{C_i}{C_a}\right),$$

wobei R die Gaskonstante und F die Faraday-Konstante sind. Es wurde dabei angenommen, dass die Permeabilität für negative Ionen weit über der für positive Ionen liegt ($\mu_- \gg \mu_+$). Für eine Größenabschätzung des Potentialunterschieds kann der konstante Vorfaktor bei 23°C etwa bei $\frac{k_B T}{q} = 0,026$ V angenommen werden, wenn es sich bei q um eine einzelne Elektronenladung handelt.

4 Messung der molekularen Reaktion der Zelle auf die Applikation von fs-Laserpulsen

Die Bestrahlung von biologischem Gewebe oder einzelnen Zellen mit fs-Laserpulsen führt zu Wechselwirkungen mit dem Material, die unter anderem die molekulare Struktur verändern können. Die Entstehung von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) wird aufgrund ihrer toxischen Wirkung auf die Zellen in diesem Kapitel in Abhängigkeit von der Repetitionsrate und dem Ort der Manipulation untersucht. Als beispielhafte Anwendungen der Zellchirurgie wurden der Zellkern, die Mitochondrien und die Zellmembran mit den gleichen Parametern (Repetitionsrate und Pulsenergie) bearbeitet und die Zellreaktion bezüglich der ROS-Konzentration beobachtet. Zusätzlich wurde der Einfluss der Lasermanipulation auf den Calciumhaushalt untersucht. Die Änderung der intrazellulären Calcium-Konzentration (Ca^{2+}) wurde bei der Membranperforation analog zu den ROS in Abhängigkeit von den Laserparametern und der Zeit untersucht. Zunächst wird jedoch der experimentelle Aufbau und die Versuchsdurchführung beschrieben.

4.1 Experimenteller Aufbau und Versuchsdurchführung

Das fs-Lasersystem zur Durchführung der hier beschriebenen Versuche war ein durchstimmbarer Titan-Saphir-Laser (Chameleon, *Coherent*, Santa Clara, CA, USA). Es wurden dabei zwei Modelle verwendet, die sich im Durchstimmbereich und der Repetitionsrate unterscheiden. Beide Modelle erzeugten ultrakurze Pulse mit einer Pulsdauer von 140 fs bei einer Repetitionsrate von 80 bzw. 90 MHz (siehe Tabelle 2.2.1), die durch einen akusto-optischen Modulator (PulsePicker, *APE*, Berlin) auf 4 MHz bzw. 4,5 MHz und 40 kHz bzw. 45 kHz verringert wurde (siehe Abbildung 4.1). Der durchstimbare Wellenlängenbereich erstreckte sich von 715 bis 955 nm bzw. von 690 bis 1040 nm. Die Pulsdauer in der Probenebene betrug durch Dispersion in den Optiken, insbesondere im Objektiv, etwa 210 fs (siehe Abschnitt 2.1.4). In allen Versuchsteilen wurde die Manipulation der Zellen bei einer Wellenlänge von 800 nm durchgeführt.

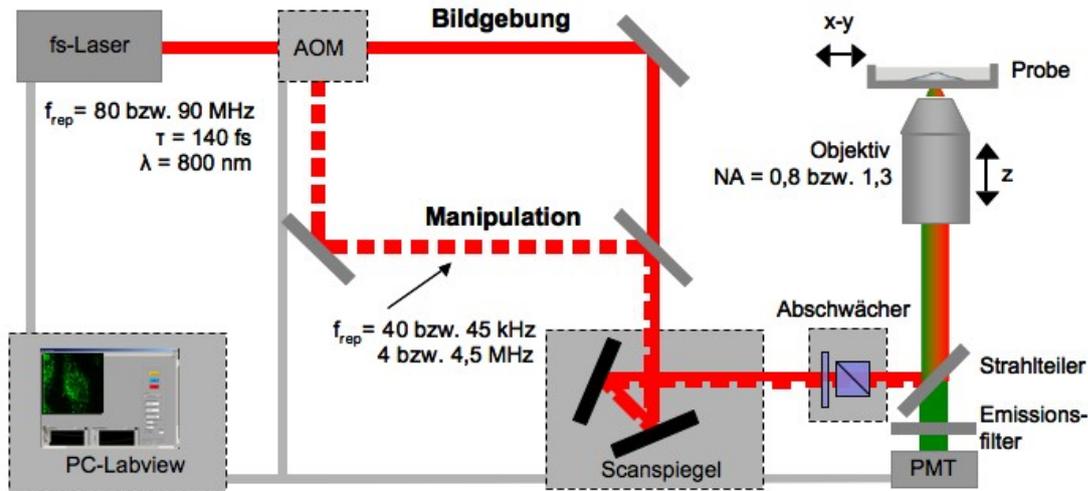


Abbildung 4.1: Schematische Darstellung des experimentellen Aufbaus.

Der Laserstrahl wurde durch einen Shutter (SC10, *Thorlabs Europe*, Dachau/München) und ein Abschwächersystem bestehend aus einem $\frac{\lambda}{2}$ -Plättchen und einem polarisierenden Strahlteilerwürfel sowie über Galvanometer-Scanspiegel zum Mikroskop (Axiovert 100, *Zeiss*, Jena) geführt. Ein Objektiv mit hoher numerischer Apertur (NA = 0,8 Wasserimmersion oder NA = 1,3 Ölimmersion, *Zeiss*, Jena) fokussierte den Strahl in die Probe (siehe Abbildung 4.1). Diese befand sich in einer Glasboden-Petrischale (*MatTek Corporation*, Ashland, MA, USA, 170 μm Dicke) und wurde über einen 2D-Verschiebetisch (H117, *Prior*, Jena) positioniert. Die axiale Lokalisierung wurde über einen Piezo-gesteuerten Hubtisch des Objektivs (nanoMipos400CAP, *Piezosystems Jena*) gesteuert. Die Trennung von anregendem und Emissionslicht wurde mittels dichroitischem Strahlteiler und Emissionsfilter (525 nm, 655 nm, *Semrock*, Tübingen) realisiert. Die Bilder für die ROS- oder Ca^{2+} -Konzentrationsmessungen wurde mittels Multiphotonenmikroskopie über einen Photomultiplier mit Vorverstärker (R6357 und C4900, *Hamamatsu Photonics Deutschland*, Herrsching am Ammersee) aufgenommen.

In allen in diesem Kapitel beschriebenen Experimenten wurde die Fluoreszenzintensität für die Konzentrationsbestimmung von ROS bzw. Ca^{2+} gemessen. Diese wurde normiert und als Rate der durchschnittlichen Fluoreszenzintensität von manipulierter Zelle zu Kontrollzelle ($I_{\text{rel}} = \frac{I_{\text{Manip}}}{I_{\text{Kontroll}}}$) bestimmt. Die Verweildauer des Lasers bei der Multiphotonenmikroskopie betrug pro Bildpunkt 11 μs bei einem Bildausschnitt von $67 \times 67 \mu\text{m}$ sowie 256×256 Bildpunkten. Die Multiphotonenmikroskopie und die Manipulation wurden mit dem Ölimmersionsobjektiv (NA = 1,3) durchgeführt. Der jeweilige Bereich wurde alle 30 s für etwa 15 bis 20 Minuten mit einer Laserleistung von 7 mW abgerastert. Vor der Manipulation wurden jeweils 5 Bilder

innerhalb von 2 Minuten aufgenommen, um das ursprüngliche Fluoreszenzniveau zu erhalten. Die Zeitspanne zwischen Manipulation und der anschließenden ersten Bildaufnahme betrug etwa 40 ms.

Die verwendeten Bovinen Aorta Endothelzellen (Rinderendothelzellen) wurden für die Manipulation in Glasboden-Petrischalen kultiviert. Um die Hintergrundfluoreszenz zu minimieren wurde die Behandlung in NaCl-BS (engl. *NaCl-Bath Solution*) durchgeführt. Diese enthielt 121 mM NaCl, 5,0 mM KCl, 0,8 mM MgCl₂, 1,8 mM CaCl₂, 6,0 mM NaHCO₃, 5,5 mM glucose, 25 mM HEPES, pH 7,4 und eine Osmolarität von 295 ± 5 . Für die Kontrollmessungen wurde der NaCl-BS 10 mM Ascorbinsäure als Antioxidant bzw. EGTA für eine Bindung des Ca²⁺ (Ca²⁺-freie extrazelluläre Lösung) zugefügt.

4.2 Nebeneffekte bei der Kernmanipulation

Die Erzeugung von ROS durch Abtrag von Kernmaterial wurde durch Anfärben der Zellen mit einem ROS-Indikator (CM-H₂DCFDA, *Invitrogen*, Karlsruhe) und Multiphotonenmikroskopie visualisiert (siehe Anhang A und B). Zur Kontrolle wurde zusätzlich 7,5 µM Propidium Jodid (PI) in die extrazelluläre Lösung zugefügt, um gegebenenfalls eine Permeabilisierung der Zellmembran zu zeigen.

Der fs-Laser wurde mittels des 1,3 NA Objektivs mit einer Pulsenergie von 1,0 bis 1,5 nJ in den Zellkern fokussiert und der relative Fluoreszenzanstieg beobachtet. Diese Energien liegen unter der Schwelle zum optischen Durchbruch, so dass die Manipulation auf einem low density Plasma beruht (siehe Abschnitt 2.1.2) [Vog05]. Der Kern wurde mit zwei verschiedenen Repetitionsraten behandelt, 4 MHz und 40 kHz. Bei beiden Repetitionsraten wurde die Pulszahl auf 160.000 festgelegt, was zu Einstrahldauern von 40 ms bzw. 4 s führte.

Diese Pulszahl entspricht der Schwelle für eine 50%-Wahrscheinlichkeit einer Ca²⁺ Freisetzung aus intrazellulären Speichern wie dem endoplasmatischen Retikulum (ER) durch Laserbestrahlung im kHz Regime [Iwa06], so dass eine Reaktion auf dem molekularen Level erwartet werden konnte. Bei höheren Repetitionsraten liegt diese Schwelle bereits bei 40.000 Pulsen. Zudem besteht in abhängigkeit der Repetitionsrate der eingestrahnten Laserpulse ein Einfluss auf die mögliche Temperaturerhöhung. Im Zentrum eines stark fokussierten fs-Laser-Pulses (1,3 NA, 800 nm Wellenlänge und 3 nJ Pulsenergie) steigt die Temperatur um etwa 0,3 K an und fällt anschließend wieder ab, bis der ursprüngliche Wert nach etwa 10 µs wieder erreicht ist [Vog05]. Dies entspricht dem zeitlichen Abstand von zwei Pulsen bei einer Repetitionsrate von 100 kHz.

Deshalb hat die Wärme-Akkumulation bei 40 kHz keinen Einfluss, während diese im MHz Regime berücksichtigt werden muss [Tyr61, Vog05].

4.2.1 Abhängigkeit der ROS-Erzeugung von der Repetitionsrate

Die ROS-Erzeugung durch fs-Laserpulse wurde in Abhängigkeit von der Pulsenergie (1,0 und 1,5 nJ) und der Repetitionsrate (40 kHz und 4 MHz) gemessen. Der jeweilige Pulszug wurde in eine zentrale Position innerhalb des Zellkerns appliziert, anschließend wurde die relative Fluoreszenzintensität (siehe Abschnitt 4.1) 13 Minuten lang mittels Multiphotonenmikroskopie beobachtet.

Nach Einstrahlen von 40 kHz Pulsen für 4 s mit einer Pulsenergie von 1,0 nJ wurde ein schneller Anstieg der ROS-Konzentration um 0,10 Einheiten während der Einstrahldauer beobachtet. Anschließend wurde langsam, innerhalb von 400 s, das ursprüngliche Level erreicht (siehe Abbildung 4.2 B). Bei der höheren Repetitionsrate von 4 MHz wurde ein Anstieg von etwa 0,08

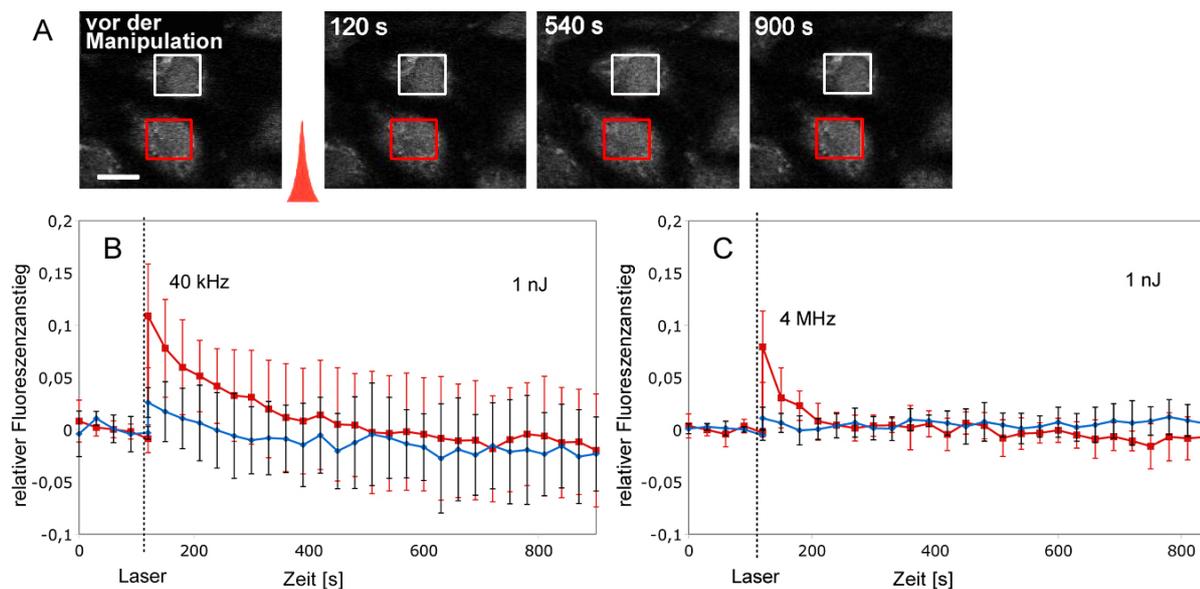


Abbildung 4.2: Multiphotonenmikroskopiebilder von Rinderendothelzellen, die mit H_2DCFDA gefärbt waren, vor und nach der Lasermanipulation bei 1,0 nJ Pulsenergie und 160.000 Pulsen. A) Die manipulierte Zelle ist mit einem weißen Rechteck markiert, die Kontrollzellen mit dem roten Rechteck. Der relative Fluoreszenzanstieg entspricht dem Quotienten der normierten, durchschnittlichen Fluoreszenzintensität der manipulierten und Kontrollzelle, wobei das Grundniveau auf Null gesetzt wurde. Die Manipulation der Zelle bei B) 40 kHz oder C) 4 MHz Repetitionsrate führte zu einem Anstieg der Fluoreszenz (rote Kurve), was einer Produktion von ROS entspricht. Diese konnte durch eine Zugabe von 10 mM Ascorbinsäure unterdrückt werden (blaue Kurve). Der Zeitpunkt der Lasermanipulation ist durch die schwarze, gepunktete Linie markiert. Skala: 10 μ M. (Jeweils $n = 5$, Fehlerbalken repräsentieren die Standardabweichung des Mittelwertes.)

Einheiten beobachtet. Der Abfall zum ursprünglichen Fluoreszenzlevel dauerte etwa 90 s an und war deutlich schneller als im Falle der kHz-Einstrahlung (siehe Abbildung 4.2 C).

Der Anstieg bei Manipulation in NaCl-BS mit 10 mM Ascorbinsäure war im kHz-Regime mit 0,03 Einheiten deutlich geringer. Im Vergleich dazu resultierte die Bestrahlung mit 4 MHz in einem Anstieg von 0,02 Einheiten. Der anschließende Abfall der ROS-Konzentration verhielt sich bei beiden Repetitionsraten wie im Falle des Einstrahlens ohne zusätzliche Antioxidantien in der extrazellulären Lösung (siehe Abbildung 4.2 B und C).

Das gleiche Experiment wurde bei einer höheren Pulsenergie von 1,5 nJ durchgeführt (siehe Abbildung 4.3). Die Einstrahlung von 160.000 Pulsen bei 40 kHz führte zu einem Anstieg von 0,18 Einheiten (etwa ein Faktor 2 im Vergleich zur Behandlung bei 1,0 nJ), gefolgt von einem Abfall der Intensität auf das ursprüngliche Niveau während der gesamten Beobachtungszeit (siehe Abbildung 4.3 B). Der ROS-Konzentrationsanstieg bei Einstrahlung von 4 MHz Pulsen führte im Vergleich dazu zu einem sehr starken Anstieg von 0,45 Einheiten, gefolgt von einem kontinuierlichen Abfall auf das ursprüngliche Niveau in etwa 400 s (siehe Abbildung 4.3 C).

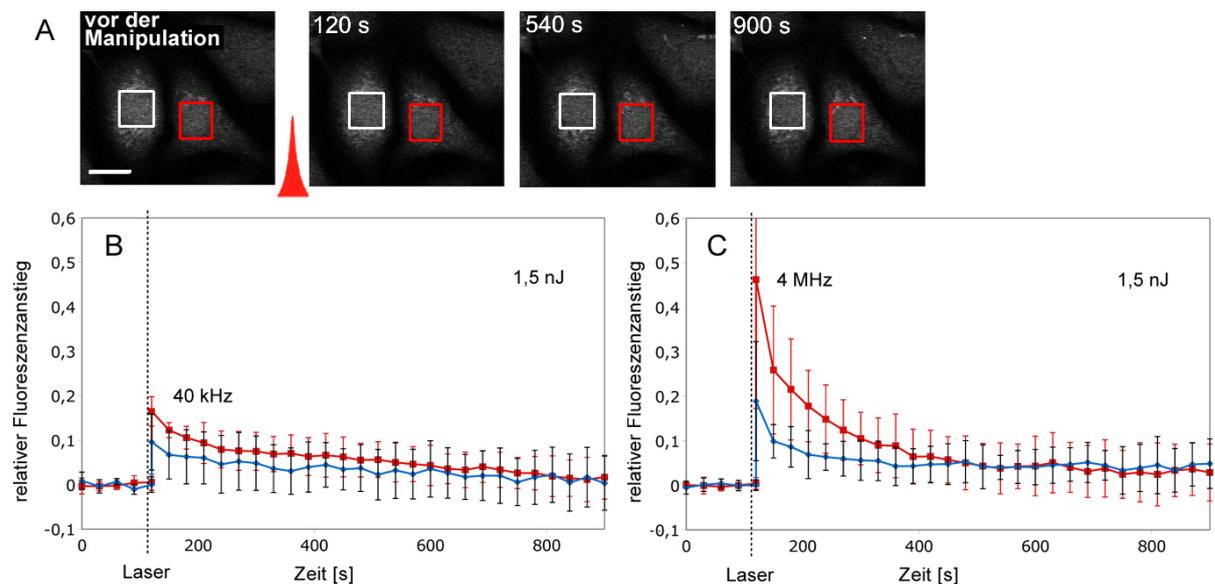


Abbildung 4.3: Multiphotonenmikroskopiebilder der Rinderendothelzellen, mit H_2DCFDA gefärbt, vor und nach der Manipulation bei 1,0 nJ Pulsenergie und 160.000 eingestrahltenPulsen. A) Die manipulierte Zelle ist mit dem weißen Rechteck markiert, die Kontrollzelle mit einem roten. Der relative Fluoreszenzanstieg ist der Quotient der normierten, durchschnittlichen Fluoreszenzintensität der normierten und der Kontrollzelle. Die Zellen wurden bei B) 40 kHz oder bei C) 4 MHz Repetitionsrate manipuliert, was zu einem Anstieg der Fluoreszenz führt (rote Kurve) und einer Produktion von ROS entspricht. Dieser Anstieg konnte mit 10 mM Ascorbinsäure abgeschwächt werden (blaue Kurve). Der Zeitpunkt der Lasermanipulation ist durch die schwarze, gepunktete Linie markiert. Skala: 10 μm . (Jeweils $n = 5$, Fehlerbalken repräsentieren die Standardabweichung des Mittelwertes.)

Bei diesen Parametern war die Zugabe von 10 mM Ascorbinsäure nicht ausreichend, um den Großteil der erzeugten ROS-Moleküle vollständig zu unterdrücken. Die ROS-Konzentration stieg im kHz-Regime um 0,1 Einheiten. Der anschließende Abfall verhielt sich ähnlich zur Behandlung in NaCl-BS ohne Ascorbinsäure. Im MHz-Regime wurde der Anstieg ebenso nicht vollständig reduziert, in diesem Fall auf etwa 0,2 Einheiten (siehe Abbildung 4.3 B und C).

Bei beiden Pulsenergien, 1,0 nJ und 1,5 nJ, änderte sich die Morphologie der Zellen und der Mitochondrien nicht. Es wurde keine Aufnahme von Propidium Jodid (PI) beobachtet.

4.2.2 Einfluss von vorhergehenden Pulszügen im kHz und MHz Regime

Der Einfluss von zwei aufeinanderfolgenden Pulszügen bei gleicher und bei unterschiedlicher Repetitionsrate wurde bei einer konstanten Pulsenergie von 1,5 nJ durchgeführt. Dabei betrug das Zeitintervall zwischen den beiden Manipulationen 630 s, der gesamte Beobachtungszeitraum nach der ersten Bestrahlung betrug 21 Minuten. Es wurden sowohl zwei Pulszüge mit gleicher (kHz-kHz, MHz-MHz) als auch mit unterschiedlicher Repetitionsrate (kHz-MHz, MHz-kHz) appliziert.

Zwei Pulszüge mit gleicher Repetitionsrate von 40 kHz mit einem Zeitintervall von 630 s führte jeweils zu einem Anstieg der ROS-Konzentration um 0,25 und 0,20 Einheiten in NaCl-BS (siehe Abbildung 4.4 B). Nach jedem Pulszug nahm die Fluoreszenzintensität während der folgenden 500 s um etwa 0,1 Einheit ab. Bei einer Repetitionsrate von 4 MHz stieg die Fluoreszenzintensität um 0,4 Einheiten nach dem ersten Pulszug an und wurde anschließend innerhalb von 300 s auf 0,05 Einheiten reduziert. Der zweite Pulszug verursachte einen etwas höheren Anstieg auf 0,45 Einheiten, gefolgt von einem Abfall auf 0,1 Einheiten bis zum Ende der Beobachtungszeit (siehe Abbildung 4.4 C).

Analog zu den Versuchen mit Applikation von einzelnen Pulszügen, war der Anstieg der ROS-Konzentration bei Manipulation sowohl im kHz-Regime als auch im MHz-Regime in NaCl-BS mit 10 mM Ascorbinsäure nach jedem eingestrahnten Pulszug reduziert (siehe Abbildung 4.4 B und C).

Die Einstrahlung von zwei Pulszügen mit unterschiedlicher Repetitionsrate führt zu einem anderen Verhalten hinsichtlich der ROS-Erzeugung. Die Applikation von einem Pulszug bei 40 kHz Repetitionsrate, gefolgt von einem MHz-Pulszug nach 630 s, führte jeweils zu einem Anstieg der ROS-Konzentration um 0,20 und 0,15 Einheiten (siehe Abbildung 4.5 B). Nach jedem Pulsintervall wurden die ROS während der 630 s fast bis zum ursprünglichen Level reduziert.

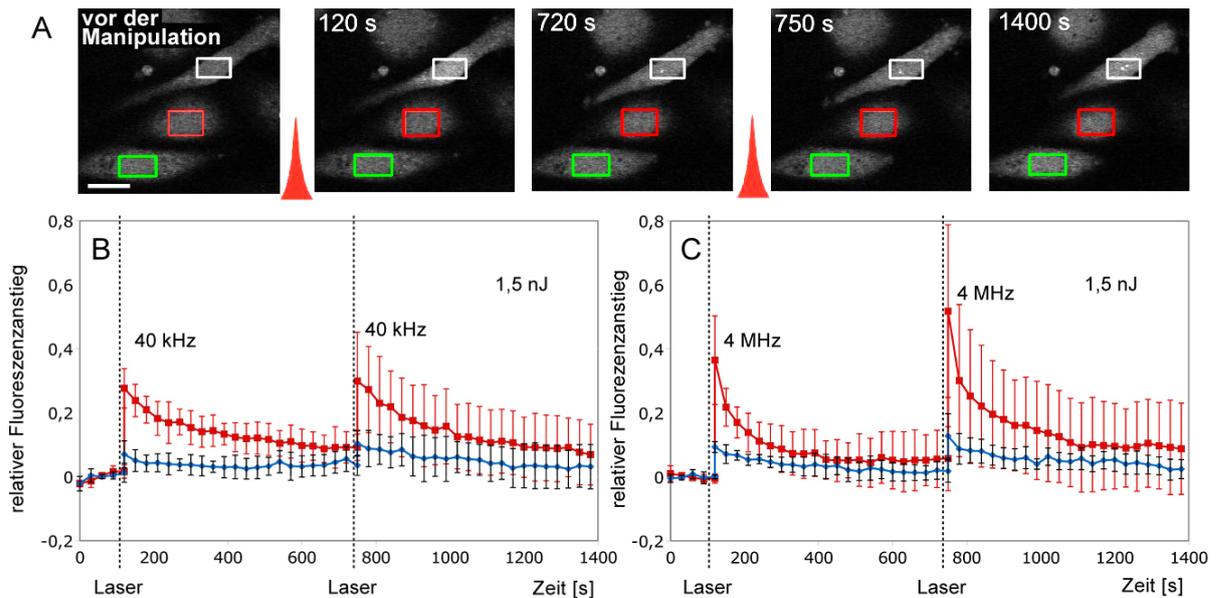


Abbildung 4.4: A) Multiphotonenmikroskopiebilder von Rinderendothelzellen vor und nach der zweifachen Manipulation mit jeweils 160.000 eingestrahlt Pulsen bei 1,5 nJ Pulsenergie und B) 40 kHz oder C) 4 MHz Repetitionsrate sowie 630 s zwischen den beiden Bestrahlungsintervallen. Die Zellen waren mit H_2DCFDA gefärbt und der gezeigte relative Fluoreszenzanstieg stellt den Quotienten der normierten, durchschnittlichen Fluoreszenzintensität der manipulierten (weißes Rechteck) und der Kontrollzelle (rotes oder grünes Rechteck) dar, wobei das Grundniveau auf Null gesetzt wurde. Die rote Kurve repräsentiert das Fluoreszenzverhalten ohne, die blaue Kurve das Verhalten mit Zugabe von Ascorbinsäure. Die Zeitpunkte der Lasermanipulationen sind jeweils durch die schwarze, gepunktete Linie markiert. Skala: 10 μM . (Jeweils $n = 5$, Fehlerbalken repräsentieren die Standardabweichung des Mittelwertes.)

Die umgekehrte Reihenfolge, Einstrahlung von einem MHz-Pulszug gefolgt von einem kHz-Pulszug, ergab ein deutlich anderes Verhalten bezüglich der ROS-Konzentration. Wie bei der Einzelintervallbestrahlung, stieg die Fluoreszenzintensität nach Manipulation mit dem 4 MHz Pulszug um 0,4 Einheiten (siehe Abbildung 4.5 B). Innerhalb der folgenden 630 s sank die Fluoreszenzintensität wieder auf 0,1 Einheiten. Der zweite Pulszug von 160.000 Pulsen bei einer Repetitionsrate von 40 kHz führte zu einem drastischen Anstieg um etwa 1,9 Einheiten. Dieser ist im Vergleich zu den Ergebnissen der konsekutiven Einstrahlung von zwei 4 MHz Pulszügen um einen Faktor 4 höher (siehe Abbildung 4.4 C). Nach der Einstrahlung des zweiten Intervalls wurden die ROS wieder zum ursprünglichen Level reduziert. Die großen Fehlerbalken der mittleren Standardabweichung zeigen, dass dieses Verhalten dabei nicht repräsentativ war und nur in etwa 20% der Fälle auftrat. Meist wurde das erhöhte Level lediglich leicht reduziert und die Konzentration blieb konstant auf diesem hohen Level (etwa 60%). Einige Zellen wurden nekrotisch (etwa 20%), was sich in einem drastischen Abfall deutlich unter das ursprüngliche Niveau äußerte.

Die Zugabe von Ascorbinsäure reduzierte die ROS-Akkumulation nach jedem Pulszug bei der Applikation von zwei aufeinander folgenden Pulszügen mit unterschiedlicher Repetitionsrate signifikant. Sogar der drastische Anstieg der ROS-Konzentration durch einen kHz-Pulszug nach vorheriger Bestrahlung mit MHz-Pulsen wurde vollständig unterdrückt. In diesem Fall stieg die Fluoreszenzintensität durch beide Bestrahlungen nur um etwa 0,10 Einheiten (siehe Abbildung 4.5 C).

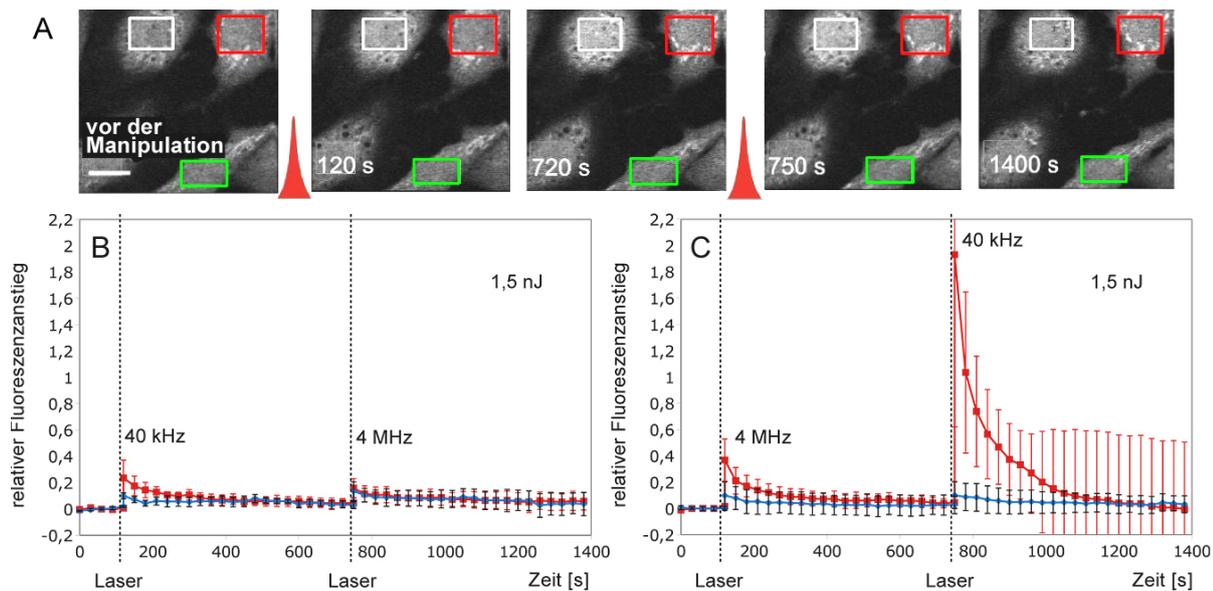


Abbildung 4.5: A) Multiphotonenmikroskopiebilder von H₂DCFDA gefärbten Rinderendothelzellen vor und nach der Bestrahlung mit zwei Pulszügen von jeweils 160.000 Pulsen bei 1,5 nJ Pulsenergie. B) Einstrahlung erfolgte bei 40 kHz für 4 s, nach 630 s bei 4 MHz Repetitionsrate für 40 ms oder C) umgekehrt. Die manipulierte Zelle ist mit einem weißen Rechteck markiert, die Kontrollzellen mit einem roten oder grünen. Der relative Fluoreszenzanstieg ist der Quotient der normierten, durchschnittlichen Fluoreszenzintensität der manipulierten und der Kontrollzelle. Die rote Kurve repräsentiert das Fluoreszenzverhalten ohne, die blaue Kurve das mit Zugabe von Ascorbinsäure in die extrazellulären Lösung. Der Zeitpunkt der Lasermanipulationen ist jeweils durch die schwarze, gepunktete Linie markiert. Skala: 10 μ m. (Jeweils n = 5, die Fehlerbalken repräsentieren die Standardabweichung.)

Eine Kontrolle der Viabilität der Zellen wurde mittels Mitochondrienfärbung (Mitotracker Red, Invitrogen, Karlsruhe) und Propidium Jodid (PI) in der extrazellulären Lösung durchgeführt (siehe Anhang B). Die Einstrahlung von zwei Pulsintervallen mit der gleichen Repetitionsrate sowie eines kHz-Pulszuges gefolgt von MHz-Pulsen führte zu keinen morphologischen Veränderungen der Zellen. Ebenso wurde kein PI in die Zellen aufgenommen. Lediglich im Falle des MHz-Pulszuges gefolgt von einem kHz Pulszug wurde eine deutliche Änderung der Morphologie der Mitochondrien in Abhängigkeit von der ROS-Konzentrationsänderung beobachtet. Blieb die Fluoreszenzintensität auf dem erhöhten Level, konnte keine Veränderung der Mitochondrien

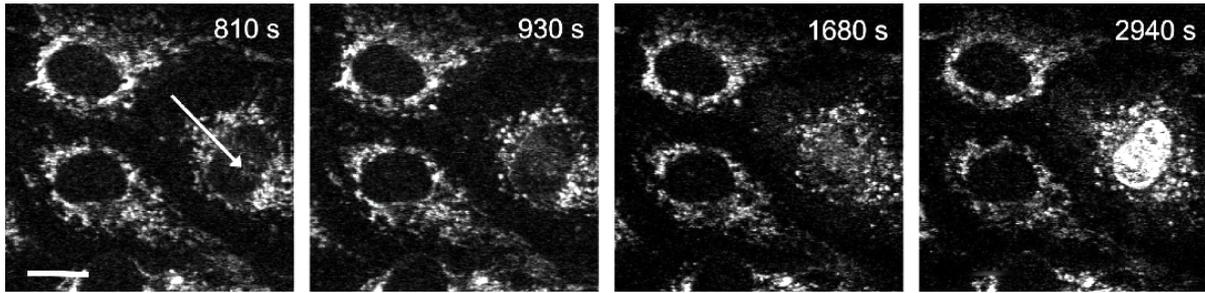


Abbildung 4.6: Multiphotonenmikroskopiebilder von Rinderendothelzellen, die mit MitoTracker Red und Propidium Jodid gefärbt waren. Zwei Pulszüge von 160.000 Pulsen bei 1,5 nJ Pulsenergie und Repetitionsraten von 4 MHz, gefolgt von 40 kHz mit einem Zeitintervall von 630 s zwischen den Manipulationen wurden etwa 40 ms vor der Aufnahme des ersten Bildes in den Zellkern fokussiert (Pfeil). Die Mitochondrien schwellen etwa 180 s nach der zweiten Manipulation, 930 s nach Beginn der Messung. Etwa zwölf Minuten später ($t = 1680$ s), wurde Propidium Jodid im Zellkern detektiert. Skala: 10 μm .

und keine Aufnahme von PI beobachtet werden. Bei starkem Abfall der Intensität deutlich unter das ursprüngliche Fluoreszenzlevel wurde ein Schwellen der Mitochondrien (180 s nach der kHz-Einstrahlung) sowie eine PI-Aufnahme in die Zellen (etwa 12 Minuten nach dem zweiten Pulsintervall) beobachtet (siehe Abbildung 4.6).

4.3 Nebeneffekte bei der Mitochondriendisruption

Die Mitochondriendisruption wurde analog zu der Kernmanipulation mit 1,0 und 1,5 nJ Pulsenergie, bei Repetitionsraten von 4 MHz und 40 kHz sowie Einstrahldauern von 40 ms und 4 s durchgeführt. Es wurde dabei nicht das gesamte, längliche Mitochondrium abgetragen, sondern auf einen Punkt in der Organelle fokussiert. Dabei wurden bei 1,0 nJ Pulsenergie 10 bzw. 20 Mitochondrien manipuliert, während bei der höheren Pulsenergie von 1,5 nJ auf 6 bzw. 10 Mitochondrien fokussiert wurde. Der Beobachtungszeitraum der Zellen nach der Manipulation betrug insgesamt 17 Minuten.

Die Rinderendothelzellen wurden mit zwei Farbstoffen gefärbt. MitoTracker Red diente der Visualisierung der Mitochondrien und als ROS-Indikator wurde H_2DCFDA verwendet (siehe Anhang A und B). Es wurden 5 Bilder innerhalb von 2 Minuten als Basismessung für das Fluoreszenzintensitätslevel vor der Manipulation aufgenommen und der Anstieg der relativen Fluoreszenzintensität gemessen, wie in Abschnitt 4.1 beschrieben. Der mittels Mikroskopobjektiv mit einer NA von 1,3 fokussierte fs-Laserstrahl wurde durch die Scanspiegel mit einem zeitlichen Abstand von 40 ms zu den jeweiligen Mitochondrien geführt.

4.3.1 Erzeugung von ROS durch fs-Laserpulse im kHz und MHz Regime

Das Verhalten bezüglich der ROS-Konzentration nach der Mitochondriendisruption wurde in Abhängigkeit von der Pulsenergie, der Repetitionsrate und der Anzahl der manipulierten Mitochondrien beobachtet. Bei einer Pulsenergie von 1,0 nJ wurden jeweils 10 oder 20 Mitochondrien in NaCl-BS manipuliert und anschließend die Änderung der relativen ROS-Konzentration (siehe Abschnitt 4.1) gemessen.

Bei einer Repetitionsrate von 40 kHz führte die Disruption von 10 bzw. 20 Mitochondrien zu einem Anstieg der Fluoreszenzintensität um etwa 1,0 bzw. 1,6 Einheiten (siehe Abbildung 4.7 A und B). Anschließend fiel sie langsam über den gesamten Beobachtungszeitraum auf 0,2 Einheiten ab und erreichte damit nicht vollständig das ursprüngliche Level. Der Abfall begann dabei in einigen Fällen mit einer Verzögerung von bis zu einer Minute nach Beenden der Manipulation. Die gleichen Messungen wurden bei einer Repetitionsrate von 4 MHz durchgeführt. Im Vergleich zu den kHz-Ergebnissen, war der Anstieg der Fluoreszenzintensität bei der höheren Repetitionsrate mit 0,5 bzw. 1,0 Einheiten geringer (siehe Abbildung 4.7 C und D). Der anschließende Abfall während des Beobachtungszeitraumes führte zu einer Intensität von 0,3 bzw. 0,2 Einheiten, vergleichbar mit der Mitochondriendisruption bei 40 kHz.

Die Zugabe von 10 mM Ascorbinsäure als Antioxidant reduzierte den Anstieg im kHz-Regime auf 0,6 bzw. 0,8 Einheiten für die Disruption von 10 bzw. 20 Mitochondrien, bevor die ROS-Konzentration innerhalb des Beobachtungszeitraumes auf das ursprüngliche Niveau reduziert wurde (siehe Abbildung 4.7 A und B). Bei der Manipulation mit MHz-Pulszügen führte dies ebenfalls zu einer Verminderung des Anstiegs auf 0,2 bzw. 0,5 Einheiten bei Disruption von 10 bzw. 20 Mitochondrien. Die ROS-Konzentration nahm nach Ende der Manipulation zunächst während 90 s weiter zu, um anschließend auf etwa 0,2 Einheiten abzufallen (siehe Abbildung 4.7 C und D).

Die gleichen Versuche wurden mit einer höheren Pulsenergie von 1,5 nJ durchgeführt. Es wurden jeweils 6 bzw. 10 Mitochondrien manipuliert. Dabei führte die Bestrahlung im kHz Regime im Vergleich zur Behandlung bei 1,0 nJ zu einem höheren Anstieg der ROS-Konzentration. Bei 4 MHz waren viele Zellen durch die Manipulation nekrotisch (20%, siehe auch Abschnitt 4.3.2).

Bei Bestrahlung der Zellen mit 40 kHz Repetitionsrate stieg die relative Fluoreszenzintensität auf 1,2 bzw. 1,8 Einheiten an, bevor die Fluoreszenz über den gesamten Beobachtungszeitraum von 15 Minuten auf etwa 0,3 bis 0,4 Einheiten verringert wurde (siehe Abbildung 4.8 A und B). Ebenso stieg die ROS-Konzentration durch die Lasereinstrahlung bei einer Repetitionsrate von

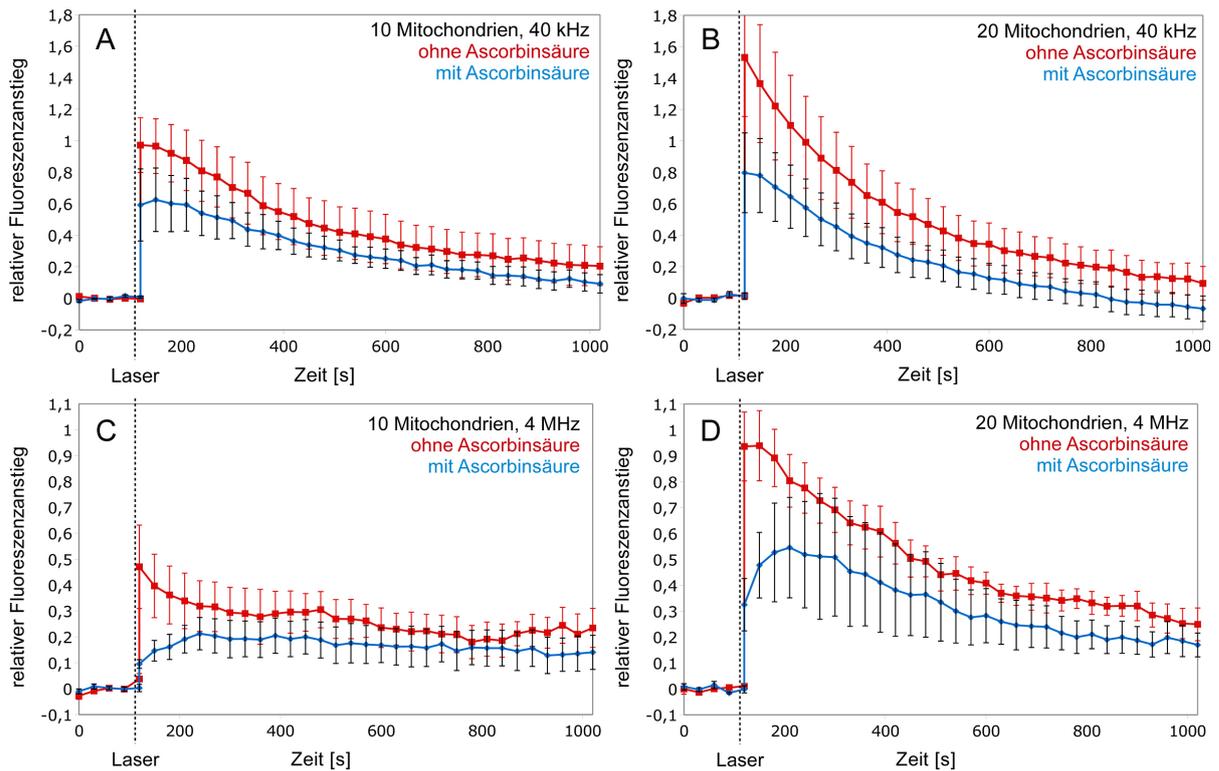


Abbildung 4.7: Relative ROS-Konzentrationsänderung. Die Mitochondriendisruption wurde bei einer Pulsenergie von 1,0 nJ durchgeführt. Die Rinderendothelzellen waren mit H_2DCFDA und Mitotracker Red gefärbt und der dargestellte relative Fluoreszenzanstieg ist der Quotient der normierten, durchschnittlichen Fluoreszenzintensität der manipulierten und der Kontrollzelle. Es wurden A) 10 und B) 20 Mitochondrien bei 40 kHz Repetitionsrate manipuliert sowie C) 10 und D) 20 Mitochondrien bei 4 MHz behandelt. Die rote Kurve repräsentiert jeweils den Verlauf der Konzentrationsänderung durch die Disruption in NaCl-BS und die blaue Kurve den bei Manipulation in NaCl-BS mit Zugabe von 10 mM Ascorbinsäure als Antioxidant. Die schwarzen, gepunkteten Linien markieren jeweils den Zeitpunkt der Lasereinstrahlung. Jeweils $n = 5$, die Fehlerbalken repräsentieren die Standardabweichung des Mittelwertes.

4 MHz auf etwa 0,4 Einheiten an, bevor sie wieder abgesenkt wurde (siehe Abbildung 4.8 C und D). Dieses Maximum ist niedriger als bei den jeweiligen Messungen bei 40 kHz Repetitionsrate, da einige der Zellen nekrotisch waren. Dies führte dazu, dass die Fluoreszenzintensität sehr schnell abnahm und sich deutlich unter dem ursprünglichen Niveau einstellte, während die Intensität in den übrigen Zellen auf einem erhöhten Wert konstant blieb. Dieser Sachverhalt wird durch die großen Werte der normierten Standardabweichung in den Fehlerbalken verdeutlicht.

Durch Manipulation in NaCl-BS mit 10 mM Ascorbinsäure reduzierte sich der Anstieg der ROS-Konzentration im kHz-Regime auf 0,6 bzw. 1,0 Einheiten. Der anschließende Abfall der Fluoreszenzintensität führte zu einer Reduzierung auf etwa 0,4 Einheiten (siehe Abbildung 4.8 A und B). Bei der Mitochondriendisruption im MHz-Regime wurde das gleiche Verhalten beobachtet,

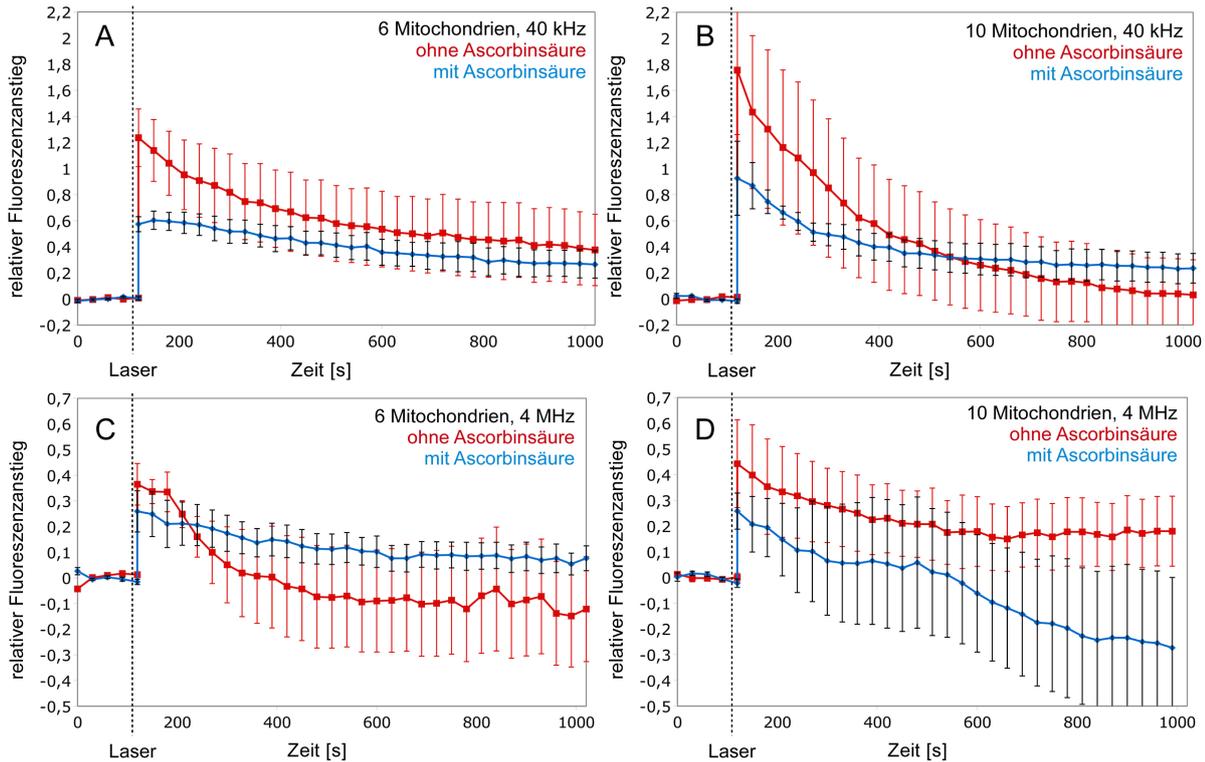


Abbildung 4.8: Relativer ROS-Konzentrationsverlauf in Rinderendothelzellen, die mit H_2DCFDA und Mitotracker Red gefärbt waren, durch fs-Laserpulse bei einer Pulsenergie von 1,5 nJ. Im kHz-Regime durchgeführte Disruption von A) 6 und B) 10 Mitochondrien sowie C) 6 und D) 10 im MHz-Regime manipulierte Mitochondrien. Der dargestellte relative Fluoreszenzanstieg stellt den Quotienten der normierten, durchschnittlichen Fluoreszenzintensität der manipulierten und der Kontrollzelle dar. Die rote Kurve repräsentiert jeweils den Verlauf der relativen ROS-Konzentration durch Behandlung in NaCl-BS, die blaue Kurve in NaCl-BS mit Zugabe von 10 mM Ascorbinsäure. Die schwarzen, gepunkteten Linien markieren jeweils den Zeitpunkt der Lasereinstrahlung. Jeweils $n = 5$, die Fehlerbalken repräsentieren die Standardabweichung des Mittelwertes.

wie in NaCl-BS ohne zusätzliche Ascorbinsäure. Die Fluoreszenzintensität stieg lediglich auf etwa 0,25 Einheiten an und sank anschließend auf 0,20 bei 6 manipulierten Mitochondrien bzw. unter das ursprüngliche Level ab (10 manipulierte Mitochondrien). Ebenfalls deuten die großen Fehlerbalken darauf hin, dass die Kurven durch sehr große Intensitätsunterschiede (sehr niedrig bei Nekrose, sonst konstant auf erhöhtem Niveau) beeinflusst wurden (siehe Abbildung 4.8 C und D).

Eine Fokussierung des fs-Laserstrahls auf das Zytoplasma, ohne die Mitochondrien zu beschädigen führte zu einem um den Faktor 5 geringeren Anstieg der ROS-Konzentration im Vergleich zur Behandlung mit Mitochondriendisruption (nicht dargestellt).

4.3.2 Apoptose durch Mitochondrienmanipulation

Das Auftreten von Nekrose und Apoptose während der Mitochondriendisruption wurde durch Färbung mit den Farbstoffen PI und dem FITC-konjugierten Annexin V überprüft (siehe Anhang A und B). Während das PI die DNA anfärbt, sobald die Zellmembran permeabel für die Farbstoffmoleküle wird, markiert das Annexin V die Zellmembran, wenn sie ihre Innenseite nach außen stülpt. Da dieser Prozess während der Apoptose stattfindet, bevor die Membran permeabilisiert, würde in diesem Fall zunächst die Membran fluoreszieren, bevor das PI in den Kern gelangt. Weitere Zeichen für Apoptose sind blasenartige Membranausstülpungen (engl. *Blebbing*) und die Ausschüttung von Cytochrom c in das Cytoplasma (siehe auch Abschnitt 3.2.3).

Bei der Disruption von 10 Mitochondrien wurde besonders bei einer Pulsenergie von 1,5 nJ und einer Repetitionsrate von 4 MHz in einigen Fällen Nekrose verursacht. Zusätzlich trat Apoptose ebenfalls bei einer Pulsenergie von 1,5 nJ und einer Repetitionsrate von 4 MHz auf, bei der Disruption von 6 bis 8 Mitochondrien. In diesen Fällen wurde ein instantanes Blebbing beobachtet, was auf Apoptose der Zelle hinweist (siehe Abbildung 4.9 B und D). Die Aufnahme von PI, das sich in der extrazellulären Lösung befand, wurde erst deutlich nach den beginnenden Blebbing sichtbar (etwa 12 Minuten später).

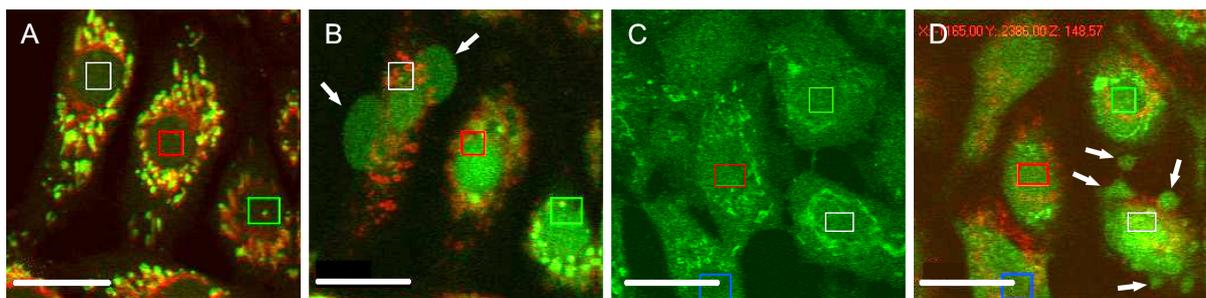


Abbildung 4.9: Multiphotonenmikroskopiebilder von Rinderendothelzellen. Die Zellen wurden mit MitoTracker Red, H₂DCFDA, FITC-konjugiertem Annexin V und Propidium Jodid gefärbt. Dabei sind die Zellen A), C) vor der Manipulation dargestellt, sowie die gleichen Zellen nach der Disruption von B) 6 und D) 8 Mitochondrien bei einer Pulsenergie von 1,5 nJ und 4 MHz Repetitionsrate. Die Membranausstülpungen der manipulierten Zelle, die auf Apoptose hinweisen, sind jeweils durch die weißen Pfeile markiert. Die manipulierte Zelle ist mit einem weißen Rechteck markiert. Rot stellt die Fluoreszenz von MitoTracker Red dar, grün die des ROS-Indikators. Die Fluoreszenz des FITC-konjugierten Annexin V ist spektral nicht von der des H₂DCFDA trennbar. Die Zellen waren während der ersten 12 Minuten PI-negativ. Skala: 20 µm.

4.4 Nebeneffekte bei der Membranperforation

Die Membranperforation wurde an Rinderendothelzellen durchgeführt, die mit dem Membranfarbstoff FM4-64 gefärbt waren (siehe Anhang A und B). Der fs-Laserstrahl wurde mit einem 1,3 NA Mikroskopobjektiv ein oder drei Mal auf die markierte Membran fokussiert, wobei bei mehrfacher Einstrahlung die Position leicht variiert wurde ($< 1 \mu\text{m}$ Abstand), um entsprechend der Prozedur der Transfektion vorzugehen [Ste06]. Die Membran wurde mit einer Pulsenergie von 1,0 oder 1,5 nJ und einer Repetitionsrate von 4 MHz für 40 ms oder 40 kHz für 4 s perforiert. Der gesamte Beobachtungszeitraum nach der Manipulation betrug 17 Minuten.

Die erfolgreiche Perforation wurde gefolgt von einem lokalen Blebbing der Membran am Ort des Laserfokus (siehe Abbildung 4.10 A). Diese Membranausstülpungen nahmen während des

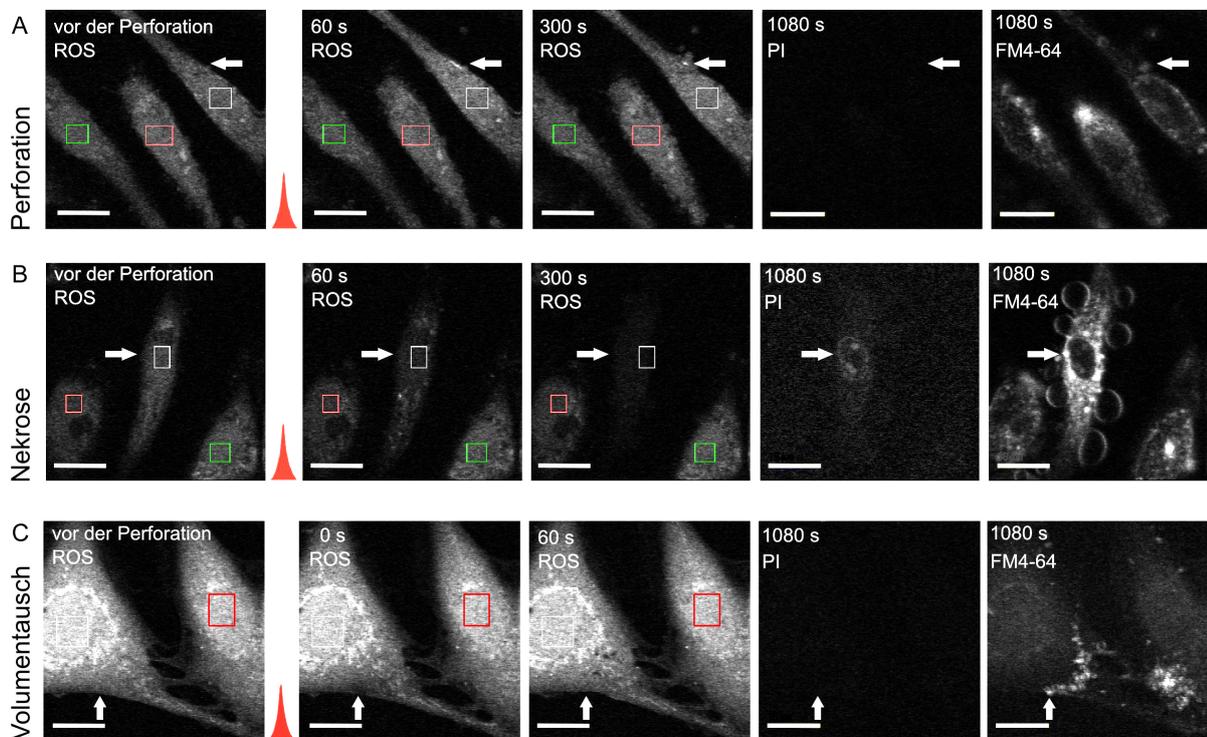


Abbildung 4.10: Multiphotonenmikroskopiebilder von Rinderendothelzellen. Die Zellen wurden mit ROS-Indikator, Propidium Jodid und dem Membranfarbstoff FM4-64 gefärbt. A) An der Stelle der Membranperforation bildet sich eine kleine Membranausstülpung. Die Zelle bleibt aufgrund der niedrigen PI-Konzentration PI-negativ. B) Im Falle von Nekrose nimmt die Fluoreszenz der Zelle sehr schnell ab und die Mitochondrien verändern ihre Morphologie (siehe auch Abbildung 4.6). Die Zelle wird nach einigen Minuten PI-positiv (aufgrund der geringen Konzentration unterscheidbar von der laserinduzierten Permeabilisierung, wobei die Zellen PI-negativ blieben) und die Membranfärbung zeigt deutlich fortgeschrittenes Blebbing der Membran. C) In einigen Fällen konnte beobachtet werden, dass in unmittelbarer Umgebung der Perforation intra- und extrazelluläre Lösung ausgetauscht wurde, verdeutlicht durch die geringere Fluoreszenz in diesem Bereich durch einströmende NaCl-Bs. Der Pfeil markiert jeweils die Position des Laserfokus während der Perforation. Skala: 16 μm .

gesamten Beobachtungszeitraumes nicht weiter zu. Zum Teil konnte sogar ein Einströmen von extrazellulärer Lösung beobachtet werden (siehe Abbildung 4.10 C). Im Falle von eintretender Nekrose durch die fs-Laserbestrahlung nahm die Fluoreszenzintensität des ROS- bzw. Ca^{2+} -Indikators innerhalb weniger Minuten auf ein Minimum deutlich unter dem initialen Fluoreszenzniveau ab und blieb konstant. Gleichzeitig trat eine Morphologieänderung der Mitochondrien beobachtet. Etwa 12 Minuten nach der Manipulation wurden die nekrotischen Zellen PI-positiv (siehe Abbildung 4.10 B).

4.4.1 ROS-Erzeugung durch fs-Laser Pulse im kHz und MHz Regime

Der Einfluss der Permeabilisierung der Zellmembran bezüglich der ROS-Konzentration wurde bei 1,0 und 1,5 nJ mit kHz-Pulszügen sowie mit MHz-Pulszügen realisiert. Es wurde dabei jeweils ein oder drei Mal auf die Membran fokussiert. Die relative ROS-Konzentration wurde analog zu den Kern- und Mitochondrienmanipulationversuchen bestimmt (siehe Abschnitt 4.1).

Die Membranperforation bei einer Pulsenergie von 1,0 nJ und einer Repetitionsrate von 40 kHz resultierte in einem sehr kleinen Anstieg der ROS-Konzentration. Die Fluoreszenzintensität stieg unmittelbar nach der Einstrahlung lediglich um 0,03 Einheiten, wobei sie anschließend über den Beobachtungszeitraum konstant auf diesem Level blieb (siehe Abbildung 4.11 A). Bei dreifacher Bestrahlung hingegen wurde ein Anstieg auf 0,1 Einheiten beobachtet. Bei 4 MHz Repetitionsrate und einfacher Manipulation wurde analog zum Verhalten bei 40 kHz kein signifikanter Anstieg beobachtet (siehe Abbildung 4.11 C). Eine dreifache Bestrahlung resultierte hingegen in einem Anstieg von 0,3 Einheiten, was deutlich höher ist, als bei der vergleichbaren Behandlung im kHz Regime (siehe Abbildung 4.11 D).

Die Zugabe von Ascorbinsäure bei einfacher Bestrahlung führte sowohl im kHz-Regime als auch im MHz-Regime zu keinem signifikanten Unterschied (siehe Abbildung 4.11 A und C). Es gab keinen Anstieg durch die Manipulation. Ebenso verhielt es sich bei dreifacher Perforation, die Bildung von ROS durch die Lasereinstrahlung wurde in beiden Repetitionsratenregimes vollständig unterdrückt (siehe Abbildung 4.11 B und D).

Die gleichen Experimente wurden mit einer Pulsenergie von 1,5 nJ durchgeführt. Bei einer Repetitionsrate von 40 kHz und einfacher Perforation stieg die relative Fluoreszenzintensität um etwa 0,2 Einheiten und fiel anschließend innerhalb von 120 s wieder auf 0,1 Einheiten ab (siehe Abbildung 4.12 A). Bei dreifacher Einstrahlung war der Anstieg deutlich höher und erreichte durchschnittlich etwa 0,4 Einheiten, gefolgt von einem Abfall ebenfalls auf 0,1 Einheiten während

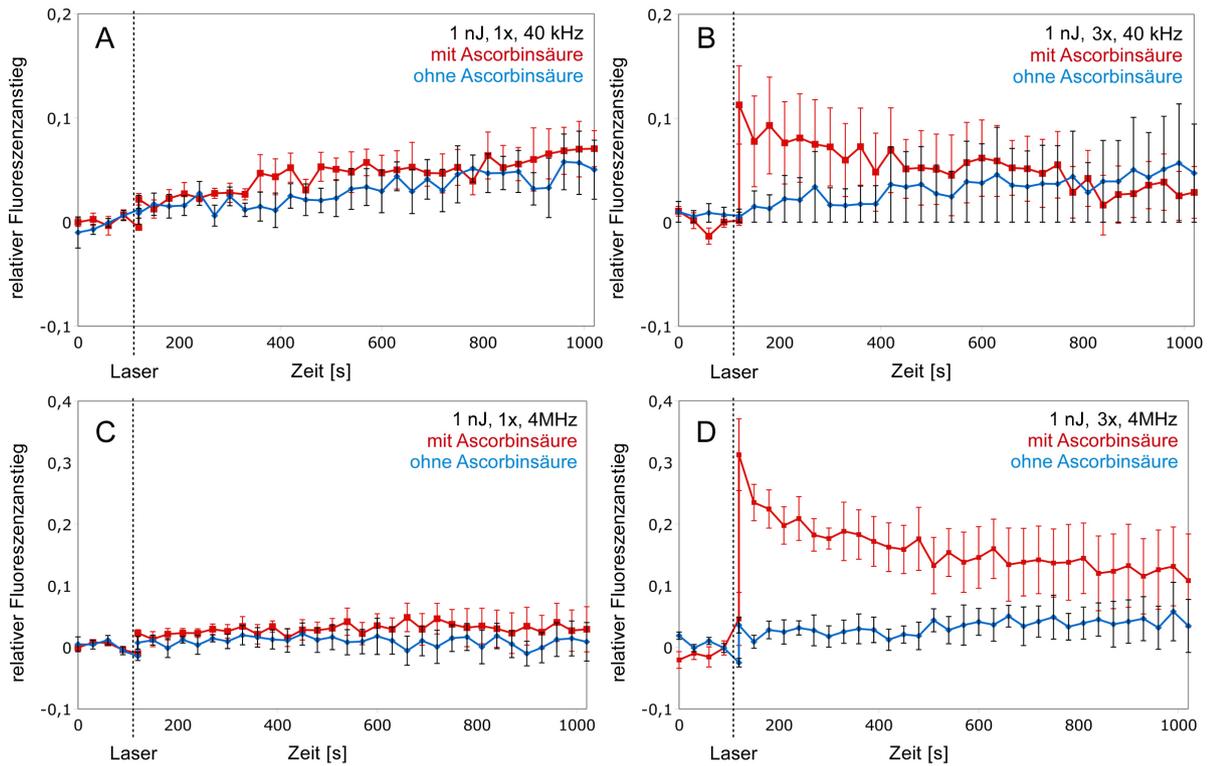


Abbildung 4.11: Die relative ROS-Konzentration während der Membranperforation mittels fs-Laserpuls. A) Bei einfacher und B) dreifacher Bestrahlung bei 40 kHz sowie C) einfacher und D) dreifacher Perforation bei 4 MHz Repetitionsrate. Die Pulsenergie betrug 1,0 nJ. Die rote Kurve zeigt den Verlauf der ROS-Konzentration bei Manipulation in NaCl-BS, die blaue in NaCl-BS mit 10 mM Ascorbinsäure. Der Zeitpunkt der Lasereinstrahlung ist durch die schwarze gepunktete Linie markiert. Die Fehlerbalken repräsentieren die Standardabweichung des Mittelwertes, jeweils $n = 5$.

des gesamten Beobachtungszeitraumes (siehe Abbildung 4.12 B). Die Perforation im MHz Regime führte zu einem anderen Verhalten. Das einfache Einstrahlen auf die Membran führte zu einem durchschnittlichen Anstieg um 0,05 Einheiten. Anschließend blieb die Fluoreszenzintensität auf dem erhöhten Niveau und stieg langsam weiter auf 0,1 Einheiten an (siehe Abbildung 4.12 C). Die dreimalige Perforation der Membran mit 4 MHz Pulsen führte zu einem durchschnittlichen Anstieg von 0,2 Einheiten, gefolgt von einem Abfall der Fluoreszenzintensität deutlich unterhalb des ursprünglichen Levels ($-0,4$ Einheiten) (siehe Abbildung 4.12 B). Dieses Verhalten ist einerseits durch Nekrose, wobei die Fluoreszenz auf ein Minimum unter dem ursprünglichen Niveau absinkt, andererseits durch Anstieg mit anhaltender erhöhter ROS-Konzentration begründet, wie bereits bei der Kernmanipulation in Abschnitt 4.2.2 beschrieben.

Eine Zugabe von Ascorbinsäure in die extrazelluläre NaCl-BS unterdrückte den anfänglichen Anstieg der ROS-Konzentration direkt nach der Manipulation. Bei der einfachen Perforation blieb die relative Fluoreszenzintensität während der gesamten Messung auf dem gleichen Niveau,

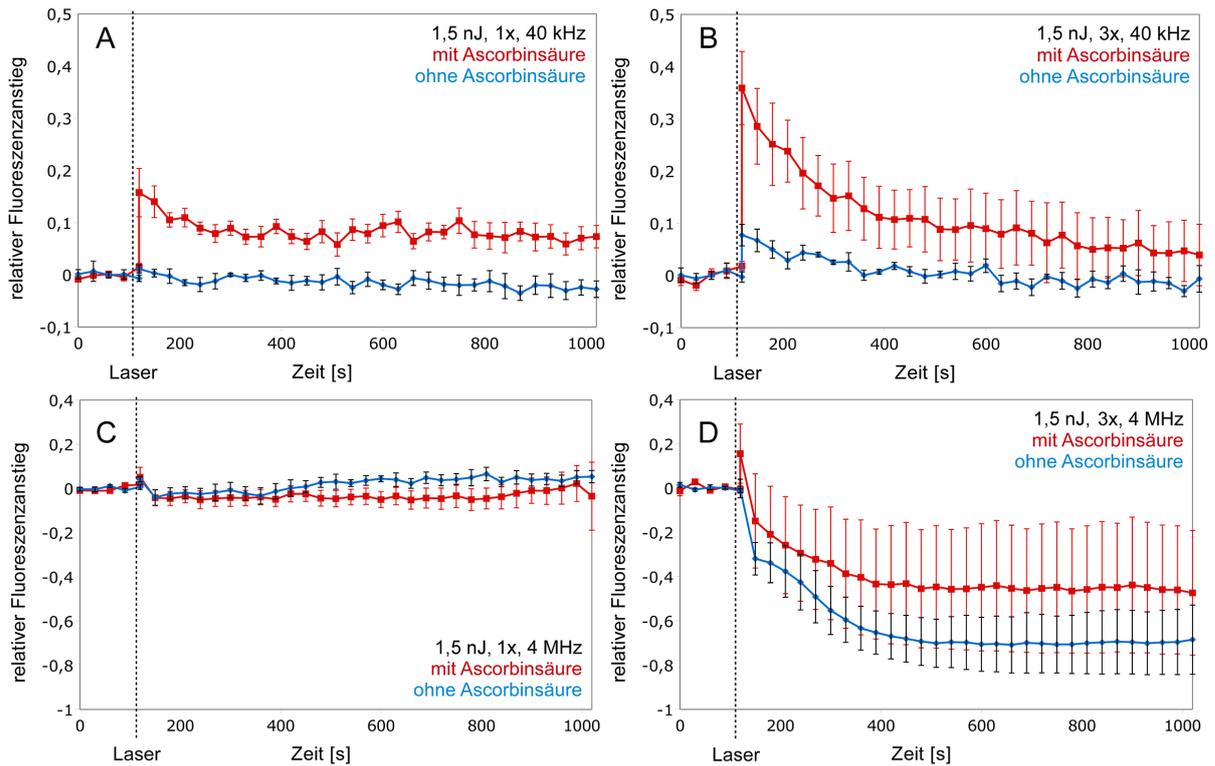


Abbildung 4.12: Relative ROS-Konzentration bei Opto-Peration mittels fs-Laserpulsen mit 1,5 nJ Pulsenergie. Der Einfluß von A) einfacher und B) dreifacher Manipulation bei 40 kHz, sowie von C) einfacher und D) dreifacher Perforation bei 4 MHz Repetitionsrate. Die rote Kurve repräsentiert den Verlauf bei Bestrahlung in NaCl-BS, die blaue in NaCl-BS mit 10 mM Ascorbinsäure. Die schwarze gepunktete Linie markiert jeweils den Zeitpunkt der Lasermanipulation. Die Fehlerbalken repräsentieren die Standardabweichung des Mittelwertes, jeweils $n = 5$.

während die Fluoreszenz bei dreifacher Bestrahlung tiefer sank als bei Manipulation ohne Ascorbinsäure in der NaCl-BS ($-0,7$ Einheiten).

4.4.2 Calcium-Influx durch fs-Laser Pulse im kHz und MHz Regime

Der Einfluss der Lasermanipulation auf die Ca^{2+} -Konzentration wurde in Abhängigkeit von der Pulenergie (1,0 und 1,5 nJ) und der Repetitionsrate (40 kHz und 4 MHz) beobachtet. Dabei wurde die Membran analog zu den Messungen bezüglich der ROS-Konzentration bei der Membranperforation einfach oder dreifach permeabilisiert. Wie bei den ROS-Konzentrationsmessungen wurde zunächst das ursprüngliche Niveau bestimmt. Nach der Perforation wurden die Zellen in den ersten 2 Minuten alle 5 s aufgenommen, um die direkte Ca^{2+} -Reaktion zu beobachten, anschließend wurde für 18 Minuten alle 30 s ein Bild aufgenommen. Die Manipulation wurde entweder in NaCl-BS oder in calciumfreier NaCl-BS mit EGTA durchgeführt. Der Verlauf

der Ca^{2+} -Konzentration nach der Behandlung unterschied sich dabei nicht wesentlich bei den unterschiedlichen Pulsenergien. Deshalb wird im Folgenden nur die Behandlung mit 1,0 nJ und dreifacher Permeabilisierung in beiden Repetitionsratenregimes beschrieben. Die Färbung für die Detektion von Ca^{2+} wurde mit 8 μM Fluo-4 (*Invitrogen*, Karlsruhe) und 4 μM FM4-64 (*Invitrogen*, Karlsruhe) realisiert (siehe Anhang A und B).

Die Wirkung der Laserpulse auf die Ca^{2+} -Homöostase wurde untersucht. Durchschnittlich wiesen etwa 50% aller Zellen keine Reaktion aufgrund der Lasermanipulation bezüglich der Ca^{2+} -Konzentration auf. 62% bzw. 32% der Zellen, die im kHz-Regime in der NaCl-BS mit Ca^{2+} bzw. in der calciumfreien NaCl-BS mit EGTA manipuliert worden sind zeigten keine Reaktion (siehe Abbildung 4.13 F und 4.14 A). Im MHz-Regime waren es 56% bzw. 45% Zellen in NaCl-BS mit EGTA (siehe Abbildung 4.14 B). Bei den restlichen Zellen lies sich das Muster der durch die Laserpulse induzierten Ca^{2+} -Signale in 5 Gruppen unterteilen:

Gruppe 1 zeichnete sich durch einen schnellen Anstieg auf etwa 0,3 Einheiten aus. Die Ca^{2+} -Konzentration blieb für durchschnittlich 4 Minuten konstant auf diesem erhöhten Level, bevor sie wieder auf das ursprüngliche Niveau abfiel (siehe Abbildung 4.13 A). Nach Erreichen dieses Levels wurden häufig Ca^{2+} -Oszillationen beobachtet. Dieses Verhalten zeigten die meisten Zellen insgesamt (20% bei kHz- und 45% bei MHz-Einstrahlung, siehe Abbildung 4.14). Bei 16% der mit 40 kHz Pulsen perforierten Zellen wurde das Verhalten von Gruppe 2 beobachtet (siehe Abbildung 4.14 A). Dieses ist charakterisiert durch einen schnellen Anstieg auf etwa 0,6 Einheiten nach der Perforation. Die Ca^{2+} -Konzentration blieb für etwa 70 s konstant auf diesem Wert, bis ein erneuter schneller Anstieg auf ein höheres Level ausgelöst wurde. Dieser zweite Anstieg wurde direkt gefolgt von einem Abfall auf das erste Niveau von 0,6 Einheiten, bevor insgesamt 4 Minuten nach der Manipulation das ursprüngliche Level erreicht wurde (siehe Abbildung 4.13 B).

In Gruppe 3 wurde ein sehr starker, schneller Anstieg um etwa 1,8 Einheiten gemessen, dabei wurde die Membran an einer Position nahe des Zellkerns perforiert. Der Anstieg war gefolgt von einem schnellen Abfall innerhalb von 100 s auf das ursprüngliche Level (siehe Abbildung 4.13 C). Im Folgenden wurden wie in Gruppe 1 und 2 Ca^{2+} -Oszillationen beobachtet. Dieser Verlauf wurde in etwa 32% der behandelten Zellen im kHz-Regime und bei 10% bei 4 MHz Repetitionsrate beobachtet (25 Zellen insgesamt im kHz- und 29 im MHz-Regime bei Manipulation in NaCl-BS, siehe Abbildung 4.14). Der durch die Perforation verursachte Anstieg der Ca^{2+} -Konzentration kann sowohl durch Einströmen von extrazellulärem Ca^{2+} als auch durch intrazelluläre Ca^{2+} -Freisetzung verursacht worden sein. Als Kontrolle wurden die Zellen ebenfalls in calciumfreier NaCl-BS mit EGTA perforiert. Dabei kann kein Ca^{2+} aus der extrazellulären

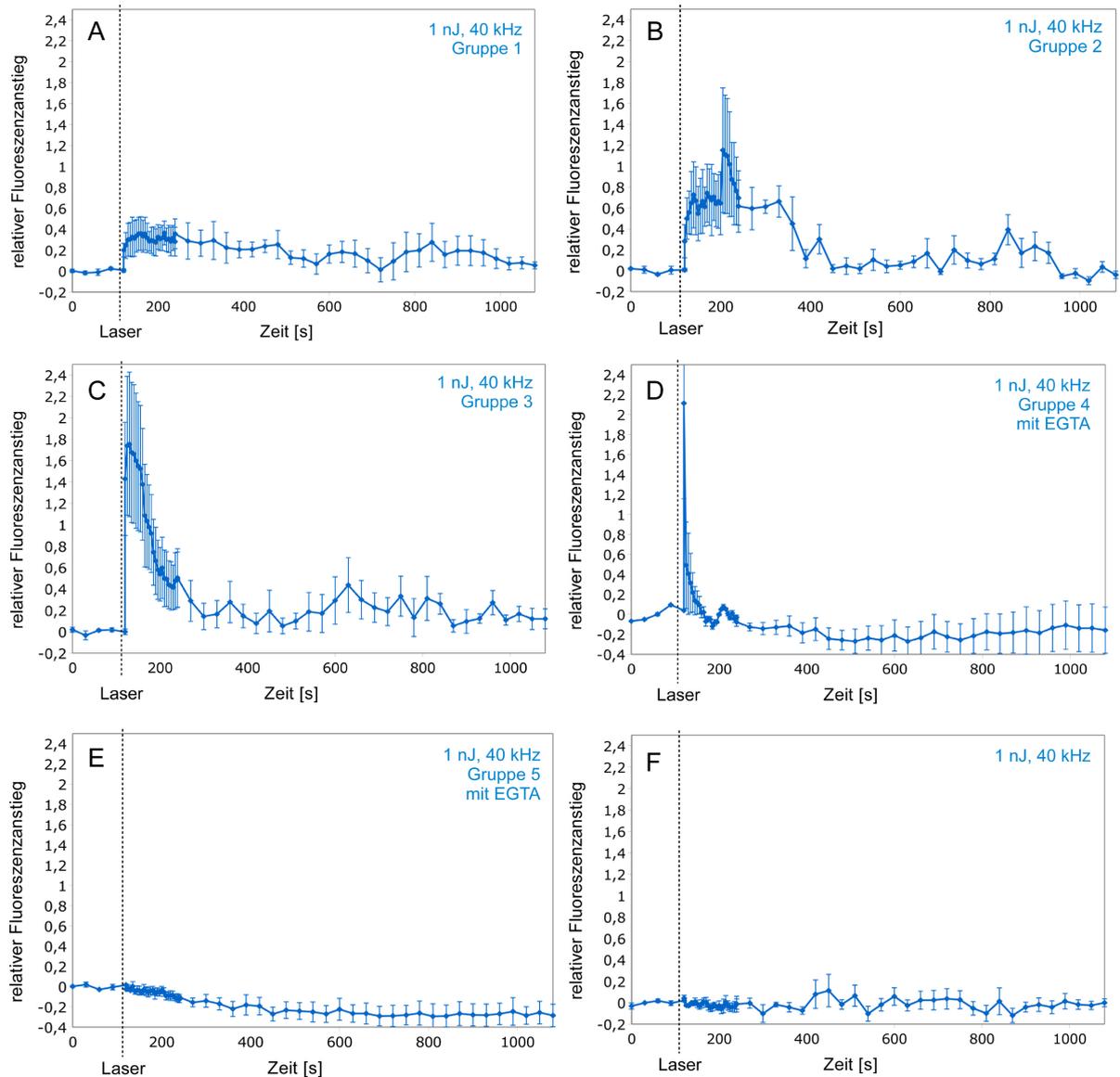


Abbildung 4.13: Relativer Anstieg der Ca^{2+} -Konzentration bei Membranperforation. Repräsentative Darstellung der unterschiedlichen Gruppen bei einer Pulsenergie von 1,0 nJ, 40 kHz Repetitionsrate und 3-facher Perforation. Dabei zeigt A) das Verhalten der mit Fluo-4 gefärbten Rinderendothelzellen in Gruppe 1, wobei das Einströmen von extrazellulärem Ca^{2+} durch die Perforation zum Signal beiträgt. B) Ca^{2+} -induzierte Ca^{2+} -Freisetzung nach der Bestrahlung durch vorangegangenen Influx aus dem NaCl-BS (Gruppe 2). C) Gruppe 3 zeigt den Einfluss von intra- und extrazellulärem Ca^{2+} auf die Konzentrationsänderung. D) Intrazelluläre Ca^{2+} -Freisetzung durch die Bestrahlung in Ca^{2+} -freien NaCl-BS mit EGTA (Gruppe 4). E) Das Verhalten in Gruppe 5 zeigt die Unterdrückung von Ca^{2+} -Influx in Ca^{2+} -freien NaCl-BS mit EGTA mit leichtem Efflux. F) Es wurde kein Effekt durch die Behandlung erzeugt. Der Zeitpunkt der Lasereinstrahlung ist jeweils durch die schwarze gepunktete Linie markiert. Die Fehlerbalken repräsentieren die Standardabweichung vom Mittelwert, jeweils $n = 3$ bis 5.

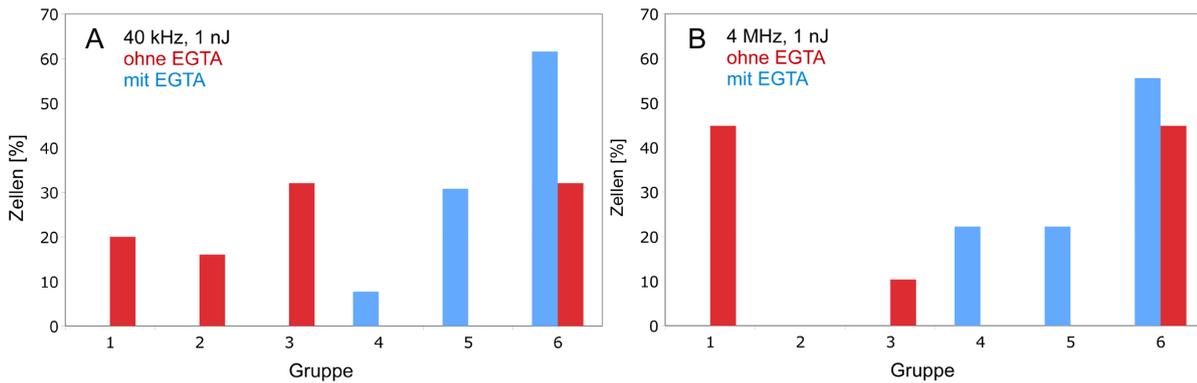


Abbildung 4.14: Die Gewichtung der verschiedenen Gruppen von Ca^{2+} -Konzentrationsverhalten bei der Membranperforation (siehe auch Abbildung 4.13) A) bei 40 kHz und B) 4 MHz Repetitionsrate. Die Membran wurde drei Mal bei einer Pulsenergie von 1,0 nJ permeabilisiert. Die roten Balken stellen den jeweiligen Anteil der Zellen dar, die in NaCl-BS manipuliert wurden, während die blauen Balken denjenigen Anteil der Zellen zeigt, der in Ca^{2+} -freier NaCl-BS mit EGTA behandelt wurde. $n = 25$ bzw. 13 bei 40 kHz mit bzw. ohne Ca^{2+} in der NaCl-BS, $n = 29$ bzw. 9 bei 4 MHz mit bzw. ohne Ca^{2+} in der NaCl-BS.

Lösung in die Zelle diffundieren, somit tragen ausschließlich intrazelluläre Ca^{2+} -Freisetzungen zum Konzentrationsanstieg bei.

In 92% bzw. 77% der mit kHz bzw. MHz Pulsen behandelten Zellen konnte die Bestrahlung in Ca^{2+} -freiem Medium keine Änderung der Ca^{2+} -Konzentration induzieren, wobei in 30% bzw. 22% der Fälle sogar ein Abfall auf $-0,2$ Einheiten stattfand, was durch Gruppe 5 repräsentiert wird (13 Zellen insgesamt im kHz- und 9 Zellen im MHz-Regime bei Behandlung in Ca^{2+} -freier NaCl-BS mit EGTA, siehe Abbildung 4.13 E und F sowie Abbildung 4.14). Diese Resultate zeigen, dass die durch die Laserpulse induzierte Änderung der Ca^{2+} -Konzentration zum großen Teil vom Einfluss des Ca^{2+} aus der extrazellulären Lösung abhängig ist. Das ist nicht überraschend, da die Lasereinstrahlung dazu verwendet wurde, die Zellmembran zu perforieren. In nur 8% bzw. 23% der Zellen wurde hier ein schneller, starker Anstieg nach der Behandlung mit kHz- bzw. MHz-Pulsen beobachtet, der auf der Freisetzung von intrazellulärem Ca^{2+} beruht (Gruppe 4, siehe Abbildung 4.13 D und 4.14).

Die Unterschiede der beobachteten Ca^{2+} -Signale lassen sich deshalb wie folgt erklären. Die Perforation der Membran erlaubt ein Einströmen des Ca^{2+} in die Zelle. Abhängig von der Größe und der Öffnungszeit der generierten Pore kann die Ca^{2+} -Konzentration schneller oder langsamer eine bestimmte Schwelle erreichen, so dass eine Ca^{2+} -induzierte Ca^{2+} -Freisetzung (CICR, engl. *Calcium induced Calcium release*) aus intrazellulären Speichern aktiviert wird [Moz96, Moz98, Res07]. Demnach wurde diese bei den der Gruppe 1 zugeordneten Zellen nicht

erreicht. Bei den Zellen der Gruppe 2 wurde die Schwelle knapp erreicht, während sie in Gruppe 3 sehr schnell überschritten wurde. Die Gruppe 3 umfasst zusätzlich Zellen der Gruppe 2, bei denen die Laserpulse eine direkte Ca^{2+} -Freisetzung ohne Ca^{2+} -Einstrom induzierten, dieser Anteil der Zellen ist jedoch sehr gering. Das Verhalten aus Gruppe 3 trat im MHz-Regime nicht auf (siehe Abbildung 4.14 B). In allen Gruppen mit Laserbehandlung in Ca^{2+} -haltiger NaCl-BS zeigten die Zellen als Folge der kurzzeitig erhöhten Konzentration im Anschluss Ca^{2+} -Oszillationen.

4.5 Fazit der ROS- und Ca^{2+} -Studie und Auswirkungen auf die Zellchirurgie

Die experimentellen Untersuchungen zur Erzeugung von ROS und der laserinduzierten Ca^{2+} -Freisetzung bzw. -Influx ergaben eine Abhängigkeit von der Pulsenergie und der Repetitionsrate. Zusätzlich wurde ein deutlicher Unterschied in Bezug auf die Position des Abtrags durch den fs-Laser beobachtet.

Die Mitochondrien tragen grundsätzlich stark zu der ROS-Bildung innerhalb einer Zelle bei. Die Zerstörung dieser Organellen führte zu einem stärkeren Anstieg der ROS-Konzentration als vergleichsweise die Fokussierung in das Zytoplasma neben die Mitochondrien. Es ist demnach von Bedeutung, an welchem Ort in der Zelle Material mit dem Laser abgetragen wird. Erwartungsgemäß ist die Erzeugung von ROS bei 1,5 nJ höher als bei 1,0 nJ Pulsenergie, ebenso ist sie bei kleinerer Repetitionsrate (40 kHz) geringer. Die Beeinflussung einer Vorschädigung durch MHz-Einstrahlung zeigte, dass die Erzeugung der ROS im kHz-Regime im Gegensatz zum MHz-Regime, durch die verursachte Veränderung des Materials verstärkt wird. Diese Verstärkung könnte aus den größeren Zeitabständen zwischen zwei Pulsen im kHz-Regime zu resultieren. In diesem Fall bleibt ausreichend Zeit für langsamer ablaufende oder Sekundärreaktionen [Nik83], während diese im MHz-Regime durch den folgenden Puls durch erneute Ionisation und Dissoziation gestört wird. Der Verstärkungseffekt bei der Manipulation mit einem kHz-Pulszug nach der Vorschädigung im MHz-Regime wurde durch die Zugabe von Antioxidantien vollständig unterdrückt.

Insgesamt führte die Zugabe von Ascorbinsäure zu einer deutlichen Verringerung der ROS-Erzeugung. Dies ist demnach eine einfache Möglichkeit, die Störung der Zellen auf molekularer Ebene zu reduzieren und damit die Viabilität der Zellen nach der Lasermanipulation zu erhöhen. Die Ca^{2+} -Studie bezüglich der Membranperforation zeigte ebenso eine Abhängigkeit von der Repetitionsrate des Lasers. Die Pulsenergie spielte in diesem Fall keine gesonderte Rolle, da

die Perforation der Membran, die lediglich wenige Nanometer dick ist, stark ortsabhängig ist und damit die Fokusposition einen größeren Einfluß hat. Eine Unterscheidung zwischen intrazellulärer Ca^{2+} -Freisetzung und Ca^{2+} -Influx aus der extrazellulären Lösung wurde durch die Kontrollexperimente in Ca^{2+} -freier NaCl-BS ermöglicht. Die Studie zeigte, dass die Perforation mit kHz-Pulsen durchschnittlich zu mehr Ca^{2+} -Influx führte, so dass sogar CICR induziert wurde. Dies war bei der Behandlung mit MHz-Pulsen nicht der Fall. Bezüglich der intrazellulären Ca^{2+} -Freisetzung führten beide Repetitionsraten zu vergleichbaren Ergebnissen. In allen Fällen wurden Ca^{2+} -Oszillationen beobachtet, die eine deutliche Störung der Ca^{2+} -Homöostase zeigen. Die Behandlung der Zellen in Ca^{2+} -freiem Medium konnte das Auslösen der Ca^{2+} -Oszillationen verhindern und stellt damit vergleichbar zur Zugabe von Antioxidantien eine wichtige Möglichkeit dar, die Viabilität der Zellen nach der Lasermanipulation zu erhöhen.

5 Fs-Laser basierter Gen-Transfer

Der Gen-Transfer mittels fs-Laserpulsen findet durch Diffusion der DNA in die Zelle statt, nachdem die impermeable Membran lokal und transient perforiert wurde [Tir02, Koh05, Ste06, Pen07, Zei07, Bro08, Bau08, Uch08]. Die Charakterisierung der Perforation in Bezug auf den Volumenaustausch, die Effizienz und die Überlebenswahrscheinlichkeit der Zellen mithilfe von Fluoreszenzfarbstoffen (Propidium Jodid (PI) und Lucifer Yellow (LY)) wird in diesem Kapitel beschrieben. PI hat für die Perforationsversuche den Vorteil, dass es ausschließlich im an DNA gebundenen Zustand fluoreszent ist und die Probe deshalb nicht gewaschen werden muss, um die Fluoreszenz darzustellen.

Da Farbstoffmoleküle wie PI und LY im Vergleich zu DNA klein sind, wird anschließend der Transfer von großen Molekülen wie DNA sowohl an caninen Zelllinien (MTH53a und ZMTH3) als auch an Primärneuronen (Spinalganglion-Neuronen) gezeigt. Zusätzlich wird die Funktionalität der DNA nach der Laserbestrahlung nachgewiesen, indem die Zellen mit einem GFP-Leervektor und GFP-Vektoren [Pra92, Cha94], die für ein GFP-*HMGA2* bzw. GFP-*HMGB1* Fusionsprotein kodiert waren, transfiziert wurden.

5.1 Mechanismus der Membranperforation

Die Perforation der Zellmembran mittels fokussierter fs-Laserstrahlung verursacht einen Austausch von Molekülen aus den intra- und extrazellulären Medien (siehe Abbildung 5.1). Nicht ausschließlich die im extrazellulären Medium befindliche DNA diffundiert in die Zelle, auch andere Moleküle und Ionen werden ausgetauscht. Für eine Quantifizierung dieses Volumenaustauschs wird im Folgenden die Patch-Clamp Technik beschrieben. Über die Bestimmung der Änderung des Membranpotentials wird anschließend der Volumenaustausch mittels der Nernst und Goldman Gleichungen berechnet und experimentell verifiziert.

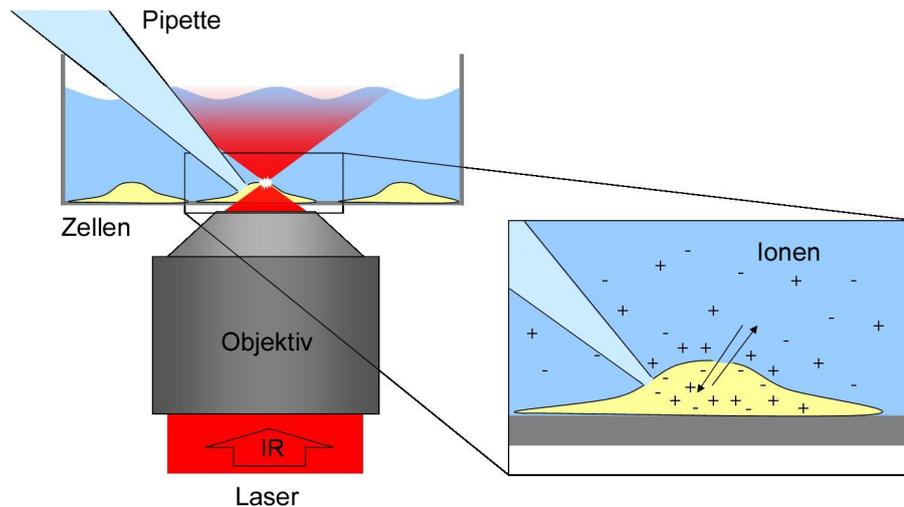


Abbildung 5.1: Schematische Darstellung des Zusammenhangs zwischen Membranpotentialänderung und laserinduzierter Membranperforation. Neben der im extrazellulären Raum befindlichen DNA gelangen Ionen in die Zelle hinein bzw. können aus der Zelle hinaus diffundieren (Pfeile).

5.1.1 Experimenteller Aufbau und Patch-Clamp Technik

Das Membranpotential der Zellen wurde mittels Patch-Clamp Technik gemessen (siehe auch Abschnitt 3.3). Zusätzlich zu dem in Abschnitt 4.1 beschriebenen optischen Aufbau wurden für die elektrophysiologischen Versuche die entsprechenden Elemente ergänzt (siehe Abbildung 5.2). Die Messungen wurden im Voltage-Clamp¹ und Current-Clamp Modus² mit Hilfe eines Verstärkers (Axopatch-1D, *Axon Instruments*, Sunnyvale, CA, USA) und eines Computer Interfaces (Computer Interfaces, *Instrutech Corporation*, Minnesota, USA) aufgenommen. Es wurde in der Whole-Cell Konfiguration³ gemessen. Dadurch entstand eine direkte Verbindung der Elektrode zum Zellinneren, so dass das Potential über die ganze Zelle gegenüber dem geerdeten extrazellulären Medium gemessen wurde [Neh76]. Die verwendete Pipettenlösung beinhaltete 100 mM K⁺-Gluconat, 40 mM KCl, 10 mM Hepes (4-(2-Hydroxyethyl)-1-Piperazineethanesulfonic Säure), 5 mM Na₂ATP, 1 mM Glucose, 1 mM MgCl₂, 5 mM EGTA (engl. *ethylene glycol tetraacetic acid*, Ethylen Glycol Tetraacetat), 0,25 mM cAMP (3'-5'-cyclic Adenosin Monophosphat), 0,5 mM cGMP (Cyclic Guanosin Monophosphat), bei pH 7,4 und einer Osmolarität von 295 ± 5. Die Patch-Elektrode mit der Pipettenlösung hatte einen Widerstand von 10 MΩ.

¹Im Voltage-Clamp Modus wird die Spannung festgelegt und der Stromfluss durch die Membran gemessen.

²Im Current-Clamp Modus wird der Strom festgelegt und die Änderung der Spannung über die Membran (Membranpotential) gemessen.

³In der Whole-Cell Konfiguration wird die Membran innerhalb der Pipette durch einen Unterdruck aufgerissen, so dass eine direkte Verbindung zwischen Pipettenmedium und Zellinnerem besteht.

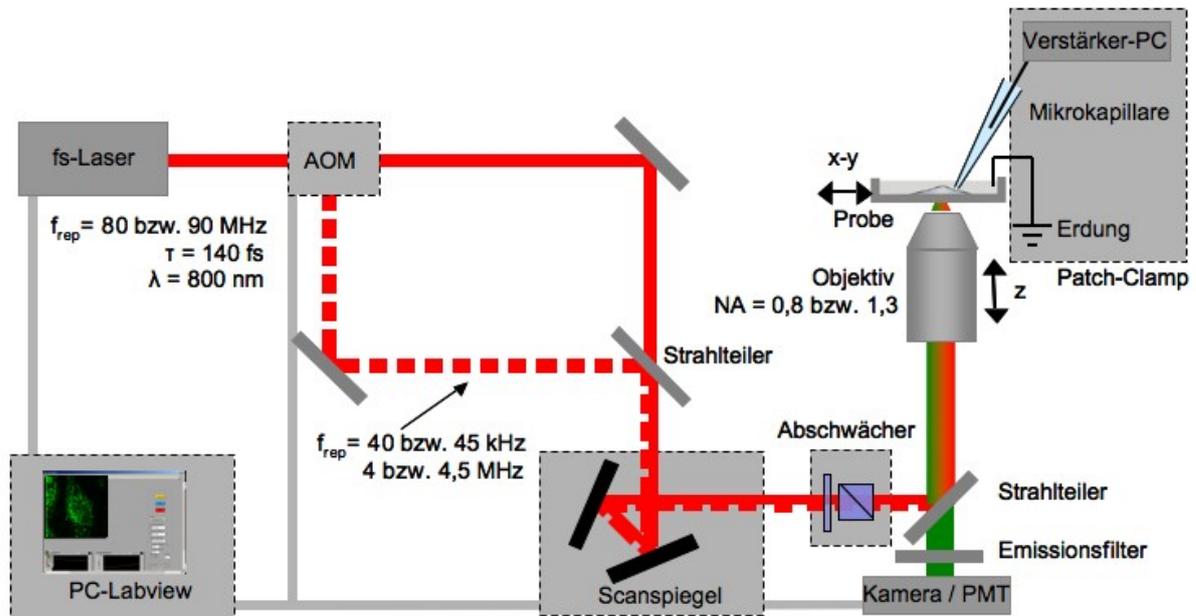


Abbildung 5.2: Schematische Darstellung des Versuchsaufbaus. Zusätzlich zu dem in Abbildung 4.1 dargestellten Aufbau wurden die Patch-Clamp-Elemente integriert (eine piezogesteuerte Mikrokapillare mit Elektrode und ein Verstärker-PC-System). Die Bildgebung wurde entweder über Multiphotonenmikroskopie mittels Photomultiplier (PMT) oder über Hellfeldmikroskopie mit einer CCD-Kamera (Kamera) realisiert.

Wesentliche Eigenschaft der Verbindung zwischen Membran und Pipette ist der hohe Widerstand, der sogenannte Gigaseal, der für eine Messung sehr stabil sein muss [Neh76, Ham81, Num96]. Deshalb wurden die Zellen nicht zentral sondern seitlich anvisiert, so dass der Laserfokus mit ausreichendem Abstand zur Pipette positioniert werden konnte. Dadurch wurde verhindert, dass die Membran durch die Blasenbildung im Fokus von der Pipette weggedrückt wurde und unter Umständen den Gigaseal zerstört. Dies würde dazu führen, dass das gemessene Potential auf 0 mV ansteigt, was ebenso bei Nekrose der Zellen einträte und somit Fehlinterpretationen zur Folge hätte.

Die erfolgreiche Perforation der Membran wurde durch eine Aufnahme von im extrazellulären Medium gelösten PI-Molekülen gezeigt, so dass der zeitliche Verlauf des Potentials direkt in Zusammenhang mit der Lasereinstrahlung gebracht werden konnte. Da PI ausschließlich in Bindung an die DNA fluoresziert, muss der Farbstoff vor der Fluoreszenzdetektion nicht herausgewaschen werden, so dass die Whole-Cell Konfiguration währenddessen gehalten werden kann. Die Perforation wurde für alle Versuche in Verbindung mit der elektrophysiologischen Messung mit 1 nJ Pulsenergie und 40 ms Einstrahldauer (0,8 NA Objektiv) durchgeführt.

Die Versuche mit der Patch-Clamp Technik wurden mit den für diese Methode etablierten GFSHR-17 Granulosazellen durchgeführt. Dagegen wurden die Transfektion mit caninen MTH53a und ZMTH3 Zellen, für die die Vektorplasmide hergestellt wurden bzw. mit DRG-Neuronen (Spinalganglion-Neuronen) durchgeführt, die beispielhaft für die Behandlung von primären Zellen gewählt wurden.

5.1.2 Untersuchungen zur Membranpermeabilisierung

Das Ruhemembranpotential der GFSHR-17 Granulosazellen lag bei -45 mV. Die fs-Laser-Perforation zeigte zwei verschiedene Regimes in Bezug auf die Depolarisation, abhängig von der Position des Laserfokusses relativ zur Zellmembran. Unterscheidungsmerkmal im Hellfeldmikroskopie-Bild ist eine kleine Gasblase (durchschnittlich < 1 μm). Diese Gasblase entsteht durch chemische und kumulative thermische Effekte, die bei Pulsenergien unter der Schwelle zum optischen Durchbruch bei MHz-Repetitionsraten entstehen (siehe Abschnitt 2.1.2) [Vog05].

In beiden Regimes steigt das Membranpotential zunächst um 2 bis 5 mV. Die beobachtete Depolarisationszeit Δt ist in beiden Fällen einige Millisekunden länger als die Einstrahldauer t_{Laser} des Lasers

$$(5.1) \quad \Delta t > t_{\text{Laser}}.$$

In dem Regime, in dem keine Gasblase sichtbar war, folgte der Depolarisation eine langsame Repolarisation (siehe Abbildung 5.3 A). Im Falle einer sichtbaren Gasblase kam es zu einer weiteren schnellen, starken Depolarisation von 10 bis 20 mV (siehe Abbildung 5.3 B). Anschließend repolarisierte das Potential langsam im Vergleich zur Depolarisation oder blieb konstant auf dem erhöhten Level.

Im Regime ohne sichtbare Gasblase, bei dem lediglich der erste Schritt der Depolarisation auftrat, konnte keine Fluoreszenz von PI detektiert werden. Hingegen war im zweiten Regime eine Fluoreszenz von PI sichtbar (siehe Abbildung 5.4). Eine Gasblase im Hellfeldmikroskopie-Bild war demnach ein Indikator für eine erfolgreiche Perforation der Zellmembran und der dadurch induzierten Aufnahme von ausreichend Farbstoffmolekülen, um die Fluoreszenz zu detektieren. Der experimentelle Nachweis des Zusammenhangs zwischen Gasblasenerzeugung und Membranpotentialänderung wird im folgenden Abschnitt beschrieben.

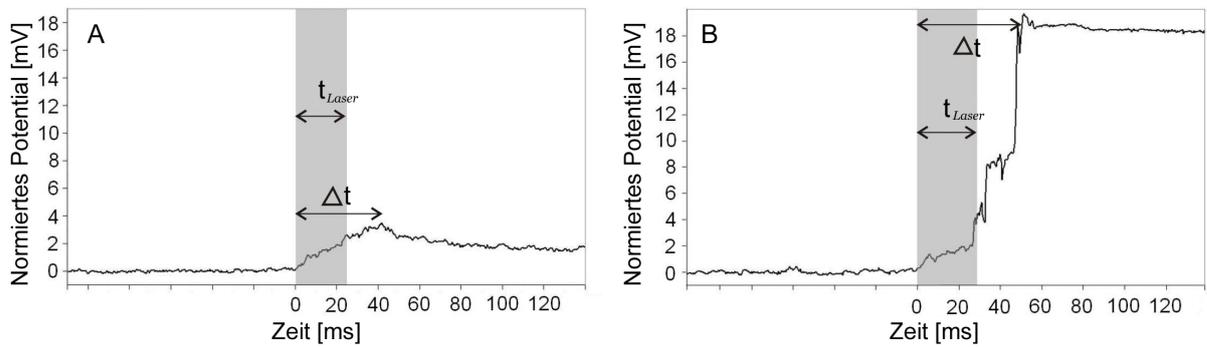


Abbildung 5.3: Das Membranpotential von GHFSR-17 Granulosazellen während der Membranperforation. Die Pulsenergie betrug 0,9 nJ. Der graue Balken repräsentiert die Lasereinstrahlungsdauer t_{Laser} für die Perforation, Δt repräsentiert die maximale Depolarisationszeit. A) Keine Gasblasenbildung während der Manipulation ($n = 7$), B) eine kleine Gasblase wurde bei der Behandlung erzeugt ($n = 4$).

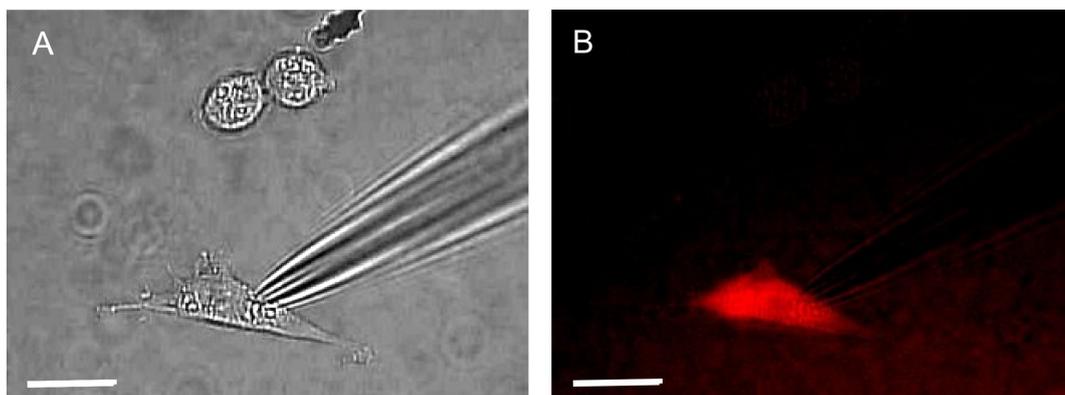


Abbildung 5.4: Granulosazelle nach der Perforation während der Potentialmessung. A) Hellfeldmikroskopiebild der Zellen mit der Patch-Pipette, B) Fluoreszenzmikroskopiebild der gleichen Zelle. Diese hat PI aus der extrazellulären Lösung aufgenommen und fluoresziert. Skala: 10 μm .

5.1.3 Untersuchung der Blasenerzeugung und der Membranpotentialänderung

Die Korrelation von Membranpotentialänderung, Stromfluss durch die Membran und Blasenerzeugung wurde in Kooperation mit der Arbeitsgruppe Vogel⁴ experimentell mittels Streulichtdetektion verifiziert. Der in den Abschnitten 4.1 und 5.1.1 beschriebene Versuchsaufbau wurde durch den in der Arbeitsgruppe Vogels entwickelten Aufbau ergänzt, der die Komponenten zur Streulichtdetektion und für die Kurzzeitphotographie enthält.

Versuchsaufbau

Es wurde ein cw SLM-Laser (*CrystaLaser*, Reno, NV, USA, engl. *continuous wave single longitude mode laser*) über einen mechanischen Shutter (LS6, *Uniblitz*, Rochester, USA) und einen Abschwächer zu einem Strahlteiler (HT > 750 nm, HR 660 nm) geleitet, der diesen Laserstrahl mit dem des fs-Lasers kollimiert (siehe Abbildung 5.5). Die Detektion des Streulichtes wurde in Vorwärtsrichtung mittels einer Photodiode (HCA-S-200M-SI, *femto*, Berlin) gemessen. Das Licht des cw-Lasers wurde mit einem Strahlteiler (HR 635 nm), einem Tiefpass-Filter (700 nm) und einem Bandpass-Filter (660 nm) selektiert. Das Blasensignal der Photodiode wurde über einen Hochgeschwindigkeits-Digitalisierer (DP240, *Agilent Technologies*, Santa Clara, CA, USA) aufgenommen, die Lokalisierung der Zellmembran wurde über eine NI PCI-6251 Datenerfassungskarte (*National Instruments*, USA) detektiert. Der Aufbau ist von Vogel et al. detailliert beschrieben [Vog08]. Gleichzeitig wurde die Änderung des Membranpotentials oder der Stromfluss mit der Patch-Clamp-Technik gemessen, wie in Abschnitt 4.1 beschrieben ist.

Zusätzlich zu der Streulichtdetektion wurden mittels Kurzzeitphotographie Bilder der erzeugten Gasblasen aufgenommen. Dazu wurde die Hellfeldbeleuchtung durch eine Blitzlampe (*High-Speed Photo Systeme*, Wedel) ersetzt. Das Bild wurde von einer Kamera (EOS5D, *Canon*, Krefeld) detektiert, wobei die Verschlusszeit 2 s betrug und die Sensitivität auf ISO 1600 gesetzt wurde.

Für die Lokalisierung der Zellmembran wurde die Zelle über einen Piezotisch (PI P-280, E-463 HVPZT-Verstärker, *Physik Instrumente*, Karlsruhe/Palmbach) schrittweise durch den Laserfokus bewegt. Eine Streulichtänderung jeweils am Rand der Zelle wurde als Position der Zellmembran interpretiert. Für die Blasendetektion wurde die Zellmembran anschließend wieder um 200 µm von der Fokusposition entfernt, so dass bei einer erneuten Annäherung in 280 nm Schritten, jeweils mit fs-Laser-Bestrahlung, die Streulichtmessung durchgeführt werden konnte. Das Patch-Clamp Signal wurde sowohl Voltage-Clamp- als auch im Current-Clamp-Modus aufgenommen.

⁴Arbeitsgruppe A. Vogel des Instituts für Biomedizinische Optik, Lübeck, Deutschland.

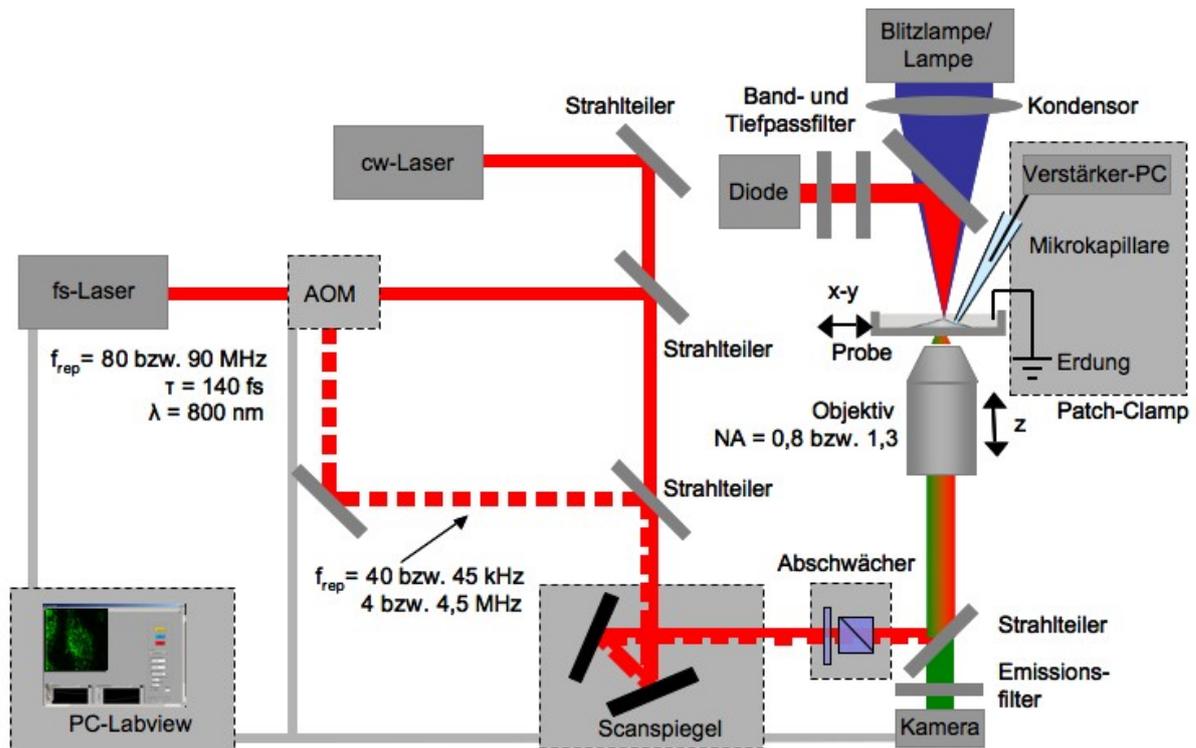


Abbildung 5.5: Schematische Darstellung des Versuchsaufbaus für die Streulichtmessung zur Blasendetektion in Kombination mit der Patch-Clamp-Technik. Zusätzlich zu dem in Abschnitt 4.1 beschriebenen Aufbau ist ein cw-Laser und eine Photodiode, die Patch-Clamp-Aparatur sowie die Blitzlampenbeleuchtung (alternativ zur Hellfeldbeleuchtung) eingekoppelt.

Experimentelle Ergebnisse

Die Blaserzeugung wurde bei verschiedenen Repetitionsraten von 80 MHz, 4 MHz und 40 kHz durchgeführt. Im MHz-Regime wurde jeweils für 30 und 40 ms, im kHz-Regime für 4 s eingestrahlt. Bei allen verwendeten Repetitionsraten trat ein Plasmaleuchten auf, bevor eine Position erreicht wurde, in der eine Blase gebildet wurde (siehe Abbildung 5.6). Bei 40 kHz wurde in keinem Fall eine Gasblase detektiert. Das Membranpotential wurde bei einem Plasmaleuchten um wenige Millivolt depolarisiert, der Strom änderte sich während der Bestrahlungszeit kontinuierlich auf bis zu -1 nA und ging anschließend in einigen Fällen wieder auf 0 nA zurück (siehe Abbildung 5.8 C). Dieses Verhalten wurde bei allen drei Repetitionsraten beobachtet, sobald ein Plasmaleuchten detektiert wurde.

Nachdem ein Plasmaleuchten detektiert wurde, resultierte die Bestrahlung mit 80 MHz bei weiterer Annäherung an die Membran immer in der Bildung einer Gasblase (siehe Abbildung 5.6). Dabei depolarisierte das Membranpotential um mehrere Millivolt und repolarisierte in den meisten Fällen wieder langsam (mehrere Minuten). Der Strom fiel durchschnittlich auf etwa -2

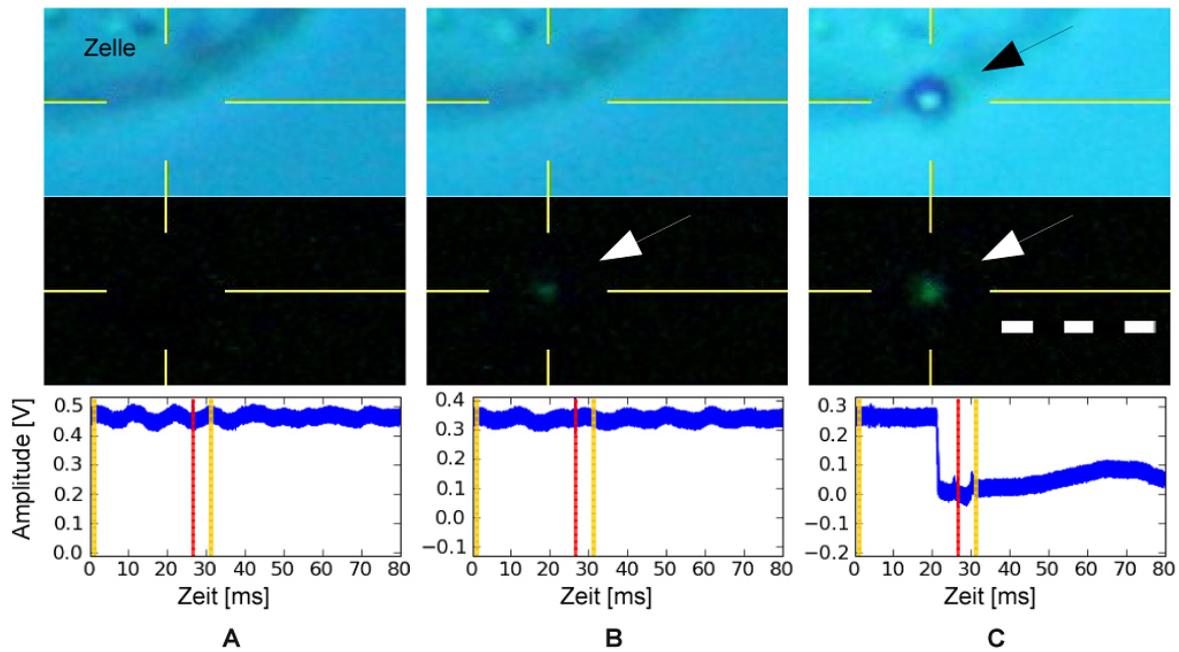


Abbildung 5.6: Typische Serie von Bildern und Signalen der Kurzzeitphotographie und dem Photodiodensignal für eine Zelle bei abnehmendem Abstand zwischen Laserfokus und Zellmembran. fs-Laserpulse mit einer Pulsenergie von 0,7 nJ und 80 MHz Repetitionsrate wurden mit dem Wasserimmersionsobjektiv mit einer NA von 0,8 fokussiert. Die Fokusposition ist durch das gelbe Fadenkreuz markiert. Der Zeitpunkt der Öffnung bzw. Schließung des Shutters ist durch die gelben Linien angezeigt, der der Blitzlampenbeleuchtung durch die rote Linie. A) Der Fokus ist neben der Zellmembran. Weder eine Gasblase noch eine Lumineszenz und Probenstrahl-Signal wurden beobachtet. B) Der Fokus näher an der Membran. Lumineszenz (weißer Pfeil) wurde detektiert. C) Eine Gasblase (schwarzer Pfeil), Lumineszenz und ein Blasensignal durch den Probenstrahl wurden detektiert. Skala: 5 μm , $n = 1$.

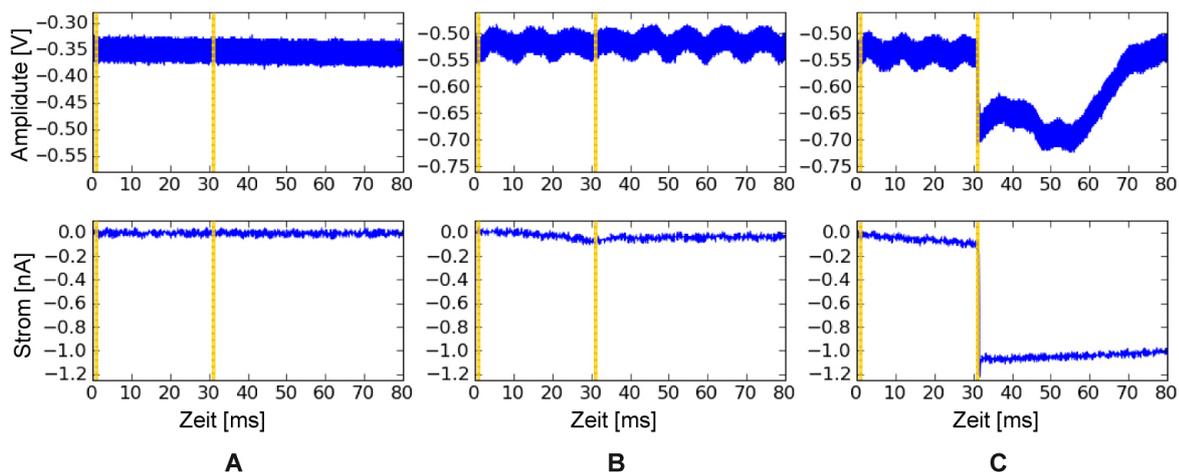


Abbildung 5.7: Repräsentatives Blasensignal (Photodiode, oben) und dazugehöriger Stromfluss (Patch-Clamp Technik, unten) entsprechend der drei Beispiele in Abbildung 5.6. A) Kein Blasensignal, B) Plasmalumineszenz aber keine Blasenerzeugung und C) Blasensignal mit Stromfluss. Der Zeitpunkt der Öffnung bzw. Schließung des Shutters ist durch die gelben Linien markiert. $n = 1$.

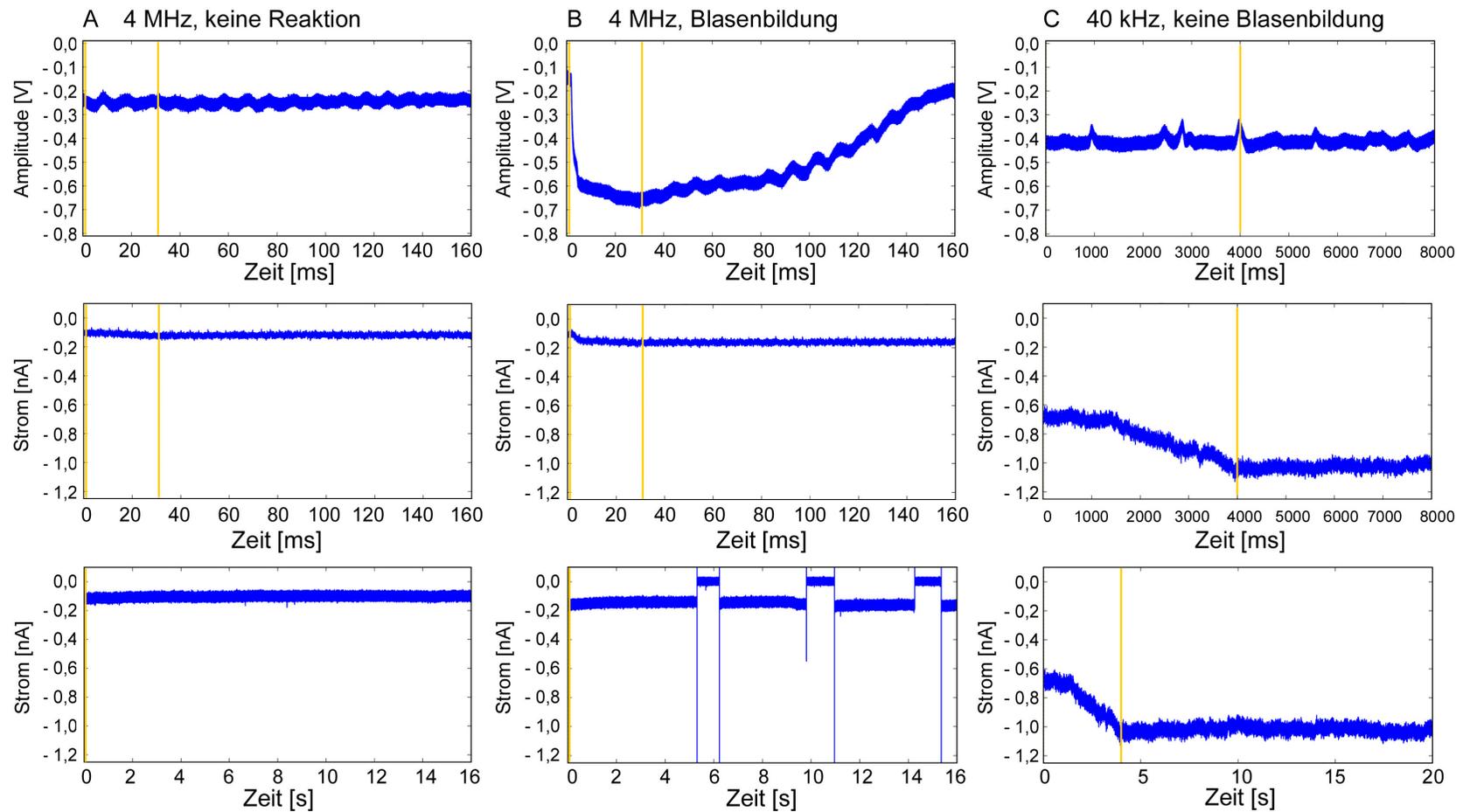


Abbildung 5.8: Repräsentative Darstellung von Blasen-signal und Voltage-Clamp-Signal bei 4-MHz und 40-kHz Repetitionsrate. Die Graphen zeigen jeweils das Streulichtsignal (Photodiodenspannung) zur Blasen-detektion (oben), die Stromänderung des Voltage-Clamp-Signals als kurzen Ausschnitt (Mitte) und das gleiche Strom-Signal als Übersicht über eine Zeitspanne von 16 bzw. 20 s (unten). A) keine Reaktion durch die Laserbestrahlung. B) Blasen-signal bei 4-MHz mit Anstieg des Stromflusses durch die Membran. C) Kein Blasen-signal bei 40 kHz-Manipulation mit Stromfluss durch die Bestrahlung. Der Zeitpunkt der Öffnung bzw. Schließung des Shutters ist durch die gelben Linien markiert. $n = 1$

bis $-1,2$ nA und ging innerhalb von einigen Sekunden ebenfalls wieder auf 0 nA zurück. Bei 4 MHz wurde das gleiche Verhalten in einigen Fällen beobachtet (siehe Abbildung 5.8 A bzw. B). Wenn keine Gasblase detektiert wurde, verlief die Membranpotentialänderung und der Strom wie im Falle von 40 kHz (siehe Abbildung 5.7 B und 5.8 C).

Da ein deutlicher Stromfluss und eine große Membranpotentialänderung ausschließlich bei Auftreten einer Gasblase zu beobachten war ist ein großer Volumenaustausch besonders bei einer Repetitionsrate von 80 MHz zu erwarten. Der Verlauf der Membranpotentialänderung korreliert sehr gut mit der low density Plasma-Bildung und der Blasenbildung. Der Zeitpunkt der Blasenbildung ist statistisch verteilt im Zeitabschnitt während der Shutter geöffnet ist. Der Verlauf der Membranpotentialänderung beginnt im Falle einer detektierten Blasenbildung mit einem langsamen, kleinen Anstieg und steigt sprunghaft, sobald eine Gasblase gebildet wird (siehe Abbildung 5.3).

5.1.4 Berechnung des Volumenaustauschs nach Nernst und Goldman

Der Volumenaustausch während der Membranperforation läßt sich über die Nernst und Goldman Gleichungen berechnen. Wie in Abschnitt 3.3 dargestellt, beschreibt die Nernst'sche Gleichung, dass ein gelöstes Molekül oder Ion dazu bestrebt ist, sich aus einem Bereich höherer Konzentration in einen Bereich geringerer Konzentration zu bewegen, um eine Gleichverteilung der Molekülzahl zu erreichen. Mit der Goldman-Gleichung wird der Ionenstrom als Funktion der Ionenkonzentration und der Permeabilität a bzw. b der Membran für die jeweiligen Ionen genähert und damit das Ruhemembranpotential U_m als Gleichgewichts-Potentialdifferenz über die Membran von den Ionenströmen aller permeabler Ionen berechnet [Gol43]. Die Hauptkomponenten, die dazu beitragen, sind die Ionen K^+ und Na^+ . Damit kann das Ruhemembranpotential aus Gleichung 3.10 wie folgt beschrieben werden:

$$(5.2) \quad U_{m_0} = \frac{RT}{F} \ln\left(\frac{aC_{Na}^a + bC_K^a}{aC_{Na}^i + bC_K^i}\right) \Leftrightarrow e^{\frac{FU_{m_0}}{RT}} = \frac{aC_{Na}^a + bC_K^a}{aC_{Na}^i + bC_K^i}.$$

Für den hier präsentierten Fall ändert sich das Membranpotential durch die Membranperforation und dem damit verbundenen Strom von Ionen. Das neue Potential U_{m_1} beträgt

$$(5.3) \quad U_{m_1} = \frac{RT}{F} \ln\left(\frac{aC_{Na}^a + bC_K^a}{aC_{Na}^i + bC_K^i}\right).$$

Mit der Annahme, dass sich das Volumen V der Zelle dabei nicht geändert hat, ergibt sich daraus eine Konzentration beispielhaft für Na^+ mit einer Änderung des ausgetauschten Volumens α von

$$(5.4) \quad C_{\text{Na}}^i = \frac{C_{\text{Na}}^i(V - \alpha) + \alpha C_{\text{Na}}^a}{V}.$$

Die Änderung des Membranpotentials ist damit

$$(5.5) \quad \Delta U_m = U_{m_1} - U_{m_0} = \frac{RT}{F} \ln\left(\frac{aC_{\text{Na}}^a + bC_{\text{K}}^a}{aC_{\text{Na}}^i + bC_{\text{K}}^i}\right).$$

Mit Gleichung 5.4 folgt

$$(5.6) \quad \Delta U_m = -\frac{RT}{F} \ln\left[1 - \frac{\alpha}{V}(1 - e^{\frac{F}{RT}U_{m_0}})\right].$$

Für eine konstante Konzentration im Medium und bei konstantem Zellvolumen läßt sich demnach das relative ausgetauschte Volumen wie folgt berechnen:

$$(5.7) \quad \frac{\alpha}{V} = \frac{1 - e^{-\frac{F}{RT}\Delta U_m}}{1 - e^{\frac{F}{RT}U_{m_0}}}.$$

Mit diesen Randbedingungen ist es möglich, die Transfektion mittels fs-Laser basierter Membranperforation zu quantifizieren. Ist das relative ausgetauschte Volumen berechnet, läßt sich durch die Kenntnis der DNA Konzentration im extrazellulären Medium die Menge der eingebrachten DNA berechnen.

5.1.5 Experimenteller Nachweis des Volumenaustauschs

Ist die Änderung des Membranpotentials während der Lasereinstrahlung bekannt, kann nach Gleichung (5.7) das ausgetauschte Volumen berechnet werden. Mit einer durchschnittlichen Depolarisation des Membranpotentials um 10 mV beträgt das relative ausgetauschte Volumen $\frac{\alpha}{V}$ etwa 0,4. Beispielsweise bei GFSHR-17 Granulosazellen mit einem Ruhemembranpotential von etwa -45 mV, einem Durchmesser von 10 μm und damit einem Gesamtvolumen von etwa 500 fl beträgt das ausgetauschte Volumen 200 fl.

Versuchsdurchführung

Der experimentelle Nachweis dieses Volumenaustauschs wurde mit Hilfe des Fluoreszenzfarbstoffs LY durchgeführt. Dieser ist unabhängig von anderen Prozessen wie der Bindung an bestimmte

Moleküle, so dass er hervorragend für Konzentrationsmessungen geeignet ist (siehe Anhang A). Im Vergleich dazu ist PI ausschließlich in Verbindung mit DNA fluoreszent, wodurch die Zeit bis zur maximalen Fluoreszenzausbeute beeinflusst wird. Somit wurde LY mit einer bestimmten Konzentration im extrazellulären Medium gelöst und anschließend GFSHR-17 Zellen mittels fs-Laserpulsen perforiert. Die Fluoreszenzintensität wurde mit einer EM-CCD-Kamera (iXon, Andor Technology, Belfast, Irland) aufgenommen.

Für die Kalibrierung der Fluoreszenzintensität bezüglich der entsprechenden Konzentrationen wurde der Farbstoff LY durch die Patch-Clamp Pipette in Whole-Cell Konfiguration in die Zellen eingebracht. Ein Gleichgewicht zwischen Pipetten-Medium und Zelle war nach 15 Minuten erreicht. Die zu diesem Zeitpunkt detektierte Fluoreszenzintensität wurde der Konzentration des Farbstoffs im Pipettenmedium zugeordnet.

Die Konzentration im Pipettenmedium wurde zwischen 2 μM und 2 mM gewählt. Bei kleinen Konzentrationen (2 und 10 μM) konnte die Fluoreszenz nicht vom Hintergrund unterschieden werden. Bei höheren Konzentrationen (200 bis 2000 μM) konnte ein linearer Anstieg der Fluoreszenzintensität beobachtet werden (siehe Abbildung 5.9).

Die Membran wurde mittels fs-Laserpuls in einer extrazellulären mit LY-Konzentrationen ($[\text{LY}]_o$) von 1 mM, 600, 200 und 100 μM perforiert. Dabei wurden als Standardparameter eine Einstrahldauer von 40 ms und eine Pulsenergie von 0,9 nJ gewählt (30 bis 50 Zellen pro Konzentration). Da ein relativer Volumenaustausch von 0,4 berechnet wurde, wurde eine Verdünnung des LY um einen Faktor 2,5 erwartet.

Ergebnisse der Konzentrationsmessung

Bei einer LY-Konzentration von 1 mM im extrazellulären Medium, ergibt eine Berechnung nach Gleichung (5.7) eine resultierende intrazelluläre Konzentration von 400 mM nach der Perforation. Entsprechend der Referenzgeraden der Konzentration (siehe Abbildung 5.9), wurde eine Fluoreszenzintensität von 186 w.E. nach der Perforation erwartet. Es wurde eine Intensität von 155 w.E. gemessen, was einer intrazellulären Konzentration ($[\text{LY}]_i$) von 332 μM und einem Faktor des relativen ausgetauschten Mediums von 0,33 entspricht. Bei 600, 200 und 100 μM wurde ein korrespondierender Faktor $\frac{\alpha}{V}$ von jeweils 0,44, 0,35 und 0,37 gemessen (siehe Tabelle 5.1). Der Vergleich des theoretisch berechneten und des gemessenen relativen Volumenaustauschs hat gezeigt, dass eine quantitative Einschätzung der Menge eines Moleküls (beispielsweise DNA) möglich ist, das von der Zelle aufgrund der fs-Laser-Perforation aufgenommen wurde.

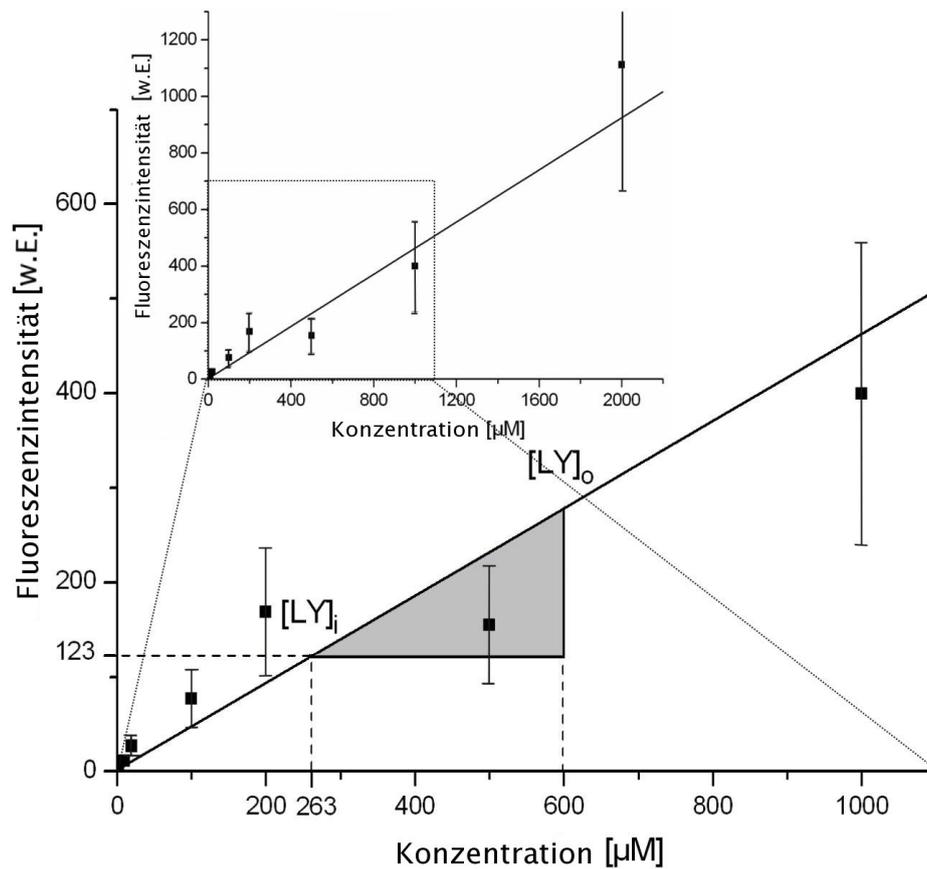


Abbildung 5.9: Die Fluoreszenzintensität von LY in Zellen mit verschiedenen Konzentrationen, eingebracht durch die Patch-Clamp Pipette. Die Datenpunkte repräsentieren die durchschnittliche Standardabweichung für mindestens 5 Zellen je Konzentration. Die lineare Ausgleichsgrade ($f(x) = 0,4x + 1,77$) wurde verwendet, um die jeweilige Konzentration von LY einordnen zu können, die aus dem extrazellulären Medium in die durch den fs-Laser perforierten Zellen diffundiert war. Der Bereich der Konzentrationen, die während der Perforation erreicht wurde, ist vergrößert dargestellt. Beispielsweise entspricht der extrazellulären Konzentration ($[LY]_o$) von 600 µM eine intrazelluläre Konzentration von 263 µM mit einer Fluoreszenzintensität von 123 w.E..

Tabelle 5.1: Fluoreszenzintensität von LY, gemessen nach der fs-Laser-Perforation in einem extrazellulären Medium mit unterschiedlichen LY-Konzentrationen ($[LY]_o$). Die Werte der entsprechenden erwarteten intrazellulären LY-Konzentration ($[LY]_i$) entstammen der Kalibrationsgerade aus Abbildung 5.9. Der gemessene relative Volumenaustausch ist gegeben als $[LY]_i/[LY]_o$. Die erwartete intrazelluläre LY-Konzentration wurde unter der Annahme $\frac{\alpha}{V} = 0,4$ berechnet. Die Fehlerangaben entsprechen der Standardabweichung.

Extrazelluläre Konzentration ($[LY]_o$) in $[\mu\text{M}]$	erwartete intrazelluläre Konzentration $[\mu\text{M}]$ (mit $\frac{\alpha}{V} = 0,4$)	gemessene intrazelluläre Konzentration ($[LY]_i$) $[\mu\text{M}]$	gemessene Fluoreszenzintensität [a.u.]	relatives ausgetauschtes Volumen $\frac{\alpha}{V}$ ($[LY]_i/[LY]_o$)
1000	400	304 ± 91	142 ± 30	$0,33 \pm 0,10$
600	240	263 ± 79	123 ± 37	$0,44 \pm 0,13$
200	80	70 ± 21	34 ± 12	$0,35 \pm 0,10$
100	40	37 ± 11	19 ± 6	$0,37 \pm 0,11$

5.2 Viabilität der Zellen und Effizienz der Membranperforation

Die Energie, die während der Membranperforation in die Zelle eingebracht wird, sollte so gering wie möglich sein, damit eine Kollateralschädigung minimiert wird. Gleichzeitig sollte die Effizienz für die Aufnahme von Moleküle aus dem extrazellulären Medium möglichst groß sein. Dies ist jedoch mit hoher Pulsenergie und langen Einstrahldauern wahrscheinlicher. Ein Kompromiss zwischen diesen beiden Kriterien muss gefunden werden. In folgenden Abschnitt wird daher die experimentelle Bestimmung der optimalen Laserparameter für die Permeabilisierung der Membran und eine Langzeitstudie bezüglich Apoptose bzw. Nekrose beschrieben.

5.2.1 Viabilitäts- und Effizienznachweis durch Propidium Jodid

Die optimalen Laserparameter bezüglich der Effizienz und der Überlebenswahrscheinlichkeit der Zellen bei der Perforation wurden mithilfe der Aufnahme von Farbstoffmolekülen bestimmt, die sich in der extrazellulären Lösung befanden.

Versuchsdurchführung

Im extrazellulären Medium wurde vor der Perforation für die Viabilitätskontrolle $1,5 \mu\text{M}$ PI gelöst. Der Laser wurde auf die Membran fokussiert, um eine transiente Pore zu erzeugen und PI-Moleküle in das Zellinnere diffundieren zu lassen. PI hat die Eigenschaft bei Bindung an DNA fluoreszent zu werden (siehe Anhang A). Der Vorteil beispielsweise gegenüber LY ist in

diesem Fall, dass das PI für die direkte Fluoreszenzdetektion nicht herausgewaschen werden muss, bevor der Fluoreszenznachweis getätigt wird (siehe Abschnitt 5.1.1).

Die Parameter für die Perforation von GFSHR-17 Granulosazellen waren eine Zentralwellenlänge von 800 nm, eine Repetitionsrate von 90 MHz und eine Pulsenergie zwischen 0,7 und 1,1 nJ. Die Einstrahldauer wurde zwischen 30 und 60 ms variiert (0,8 NA Objektiv). Es wurden etwa 40 bis 60 Zellen je Parameterkombination behandelt. Nach der Perforation wurden die Zellen mit PBS (Phosphate Buffer Saline) gewaschen und für 90 Minuten bei 37° und 5% CO₂-Atmosphäre inkubiert. Anschließend wurde die Probe erneut mit 1,5 µM PI gefärbt und die manipulierten Zellen wiederum fluoreszenzmikroskopisch dargestellt.

Ergebnisse der Effizienz- und Viabilitätsmessung

Die Viabilität der Zellen wurde mittels der PI-Färbung bestimmt: Diejenigen Zellen, deren Membran nach der Inkubationszeit von 90 Minuten nicht wieder vollständig intakt war, nahmen durch die erneute Färbung zusätzliche PI-Moleküle auf und leuchteten deutlich heller als die gesunden Zellen, was auf einen pathologischen Zustand hinwies. Die Zellen, deren Membran wieder vollständig impermeabel für den Farbstoff war, wiesen etwa die gleiche, schwache Fluoreszenz des Farbstoffs auf (siehe Abbildung 5.10). Die Effizienz entspricht dem Anteil der Zellen, die PI aufgenommen hatten (unabhängig von der Fluoreszenzintensität).

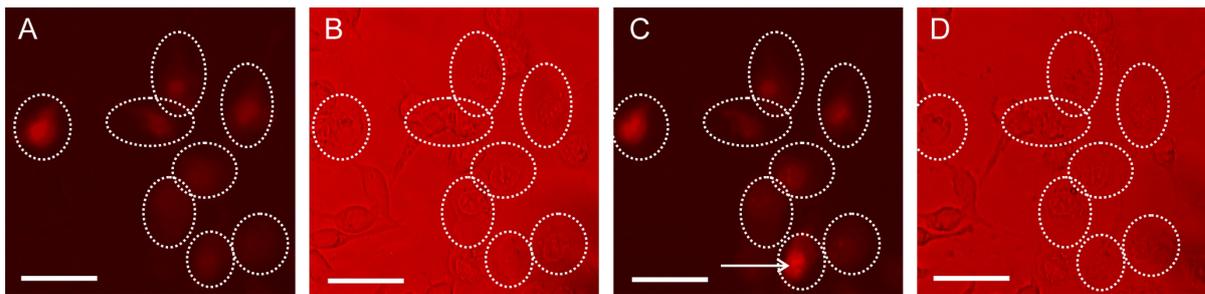


Abbildung 5.10: Mittels fs-Laser perforierte GFSHR-17 Granulosazellen in PI-haltigem extrazellulären Medium, Laserparameter waren 0,9 nJ und 40 ms. A) Fluoreszenzbild der GFSHR-17 Granulosazellen, aufgewachsen auf Deckglasboden direkt nach der Perforation. Die manipulierten Zellen sind mit durch die gestrichelten Ovale gekennzeichnet. 1,5 µM PI war im Medium gelöst. Alle bestrahlten Zellen sind fluoreszent. B) Hellfeldmikroskopie-Bild der gleichen Zellen. C) Fluoreszenzbild derselben Zellen nach 90 Minuten Inkubation in PBS. Die Zellen wurden erneut mit PI gefärbt, um die Viabilität zu prüfen. Die mit dem Pfeil markierte Zelle zeigt repräsentativ eine Zelle, deren Membran beschädigt ist und deshalb weiterhin permeabel für das Fluorophor ist. D) Hellfeldmikroskopie-Bild der Zellen nach der Inkubationszeit. Skala: 30 µm.

Im Bereich kurzer Einstrahldauern von 30 ms betrug die Viabilität der Zellen bis zu 90% bei einer Pulsenergie bis zu 0,9 nJ (siehe Abbildung 5.11). Längere Einstrahlung wie 60 ms bei hoher Pulsenergie von 1,1 nJ führten zu einer Abnahme der Viabilität auf 40%. Im Gegensatz dazu lag die Effizienz der Farbstoffaufnahme bei etwa 40% oder niedriger für 30 ms Einstrahldauer und Pulsenergien bis zu 1,0 nJ. Die Effizienz dagegen nahm mit steigender Pulsenergie und Einstrahldauer auf 70% bei 1,1 nJ und 60 ms zu.

Die Effizienz stieg demnach mit wachsender Pulsenergie und Einstrahldauer, während die Viabilität absank, die 90 Minuten nach der Manipulation beobachtet wurde. Ein guter Kompromiss zwischen Effizienz der Farbstoffaufnahme und Viabilität der perforierten Zellen wurde bei 40 ms Einstrahldauer und 0,9 nJ Pulsenergie gefunden. Bei diesen Parametern betrug die Viabilität etwa 90% und die Effizienz 70%.

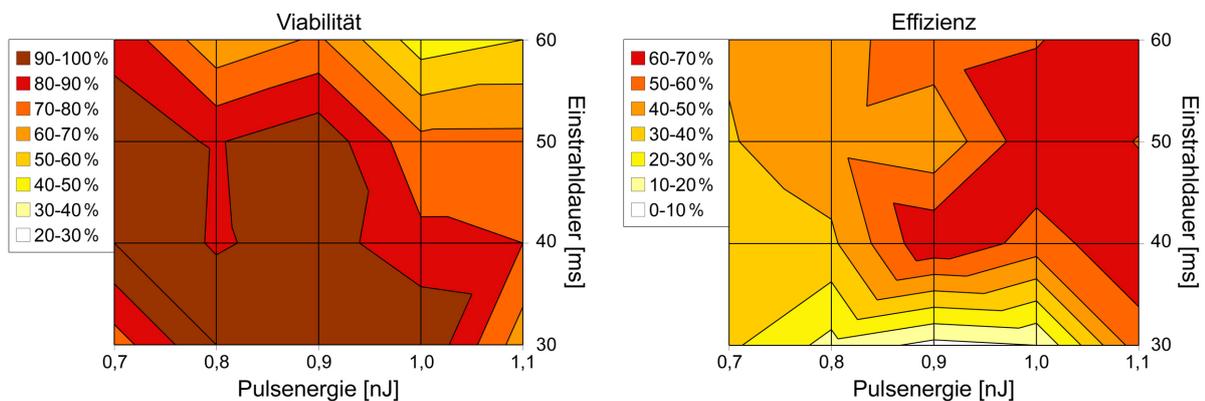


Abbildung 5.11: A) Die Viabilität der Zellen und B) die Effizienz der Aufnahme von PI-Molekülen in die Zellen in Abhängigkeit von der Pulsenergie und Einstrahldauer.

5.2.2 Langzeitnachweis von Apoptose durch Annexin V

Eine Studie über einen Zeitraum von 60 Stunden wurde durchgeführt, um die Entwicklung der Viabilität der Zellen auf längere Zeit zu beurteilen. Für eine gesicherte Aussage über die Induzierung von Apoptose durch die Lasereinstrahlung muß der Zustand der Zellen über eine Zeit von mindestens 2 Zellzyklen geprüft werden (in diesem Fall mindestens 48 Stunden).

Versuchsdurchführung

Nach der Perforation wurden 1,5 μM PI und 0,2% Annexin V FITC Konjugat im extrazellulären Medium gelöst. Beide Farbstoffe können nicht durch die Membran diffundieren. Bei Induzierung

von Apoptose stülpt sich die Innenseite der Membran nach außen, Annexin V bindet an Rezeptoren, die sich auf der Membraninnenseite befinden, und wird fluoreszent (siehe Anhang A). PI gelangt hingegen ausschließlich bei einer beschädigten Membran in die Zelle, bindet an die DNA und wird ebenfalls fluoreszent. Dies geschieht bei Eintreten von Nekrose oder zu einem späteren Zeitpunkt der Apoptose. Dadurch kann durch die Kombination von PI und Annexin V sowohl Apoptose als auch Nekrose nachgewiesen werden. Zusätzlich wurden die Zellen mit $5 \frac{\mu\text{g}}{\text{ml}}$ Hoechst 33342 gefärbt. Dieser Farbstoff färbt den Zellkern und fluoresziert im blauen Wellenlängenbereich. Dadurch kann die Fluoreszenz sehr gut von der Fluoreszenz des PI getrennt werden. Diese Färbung dient der Verfolgung der Zellen, solange keiner der übrigen Farbstoffe detektiert werden kann.

Für die Langzeitbeobachtung wurden die Zellen in einem Inkubationssystem (*Okolab*, Quarto, Italien) bei 37°C und 5% CO_2 auf dem Mikroskop mit 1 nJ Pulsenergie und einer Einstrahldauer von 40 ms perforiert. Es wurden in diesem Fall MTH53a Zellen in M199 Medium behandelt, da diese für die im weiteren Verlauf beschriebenen Versuche der Transfektion verwendet wurden. Die Perforation wurde im Hellfeld durchgeführt. Anschließend wurden dem Medium die Farbstoffe Annexin V und PI zugeführt. Im weiteren Verlauf der Messung wurden die Zellen mittels Multiphotonenmikroskopie dargestellt (Laserleistung beim Abrastern betrug 8 mW). Die ersten 20 Minuten wurde alle 30 s ein Bild mit Grünfilter aufgenommen, um gegebenenfalls die Membranfärbung durch Annexin V zu detektieren. Anschließend wurde mittels Rotfilter die Fluoreszenz von PI überprüft. Während der folgenden Beobachtungszeit wurde alle 30 Minuten ein Stapel von 30 μm Höhe und einem axialen Abstand von 1,5 μm aufgenommen und alle 24 Stunden die rote Fluoreszenz überprüft.

In dem Beobachtungsbereich von $160 \times 160 \mu\text{m}$ befanden sich zwischen 6 und 21 Zellen. 20 von diesen wurden mit 0,7 nJ Pulsenergie, 80 MHz Repetitionsrate, 40 ms Einstrahldauer und dem 1,3 NA Ölimmersionsobjektiv perforiert. Um eine starke Wanderung der Zellen während der Beobachtung zu vermeiden, wurde die Zellen bei einer Konfluenz⁵ von etwa 60% manipuliert.

Ergebnisse der Langzeitstudie

Die Zellen, die Apoptose einleiteten, wurden Annexin V positiv, so dass die Zellmembran grün fluoresziert, bevor der Zellkern PI aufgenommen hat (rote Fluoreszenz). Eine Zelle wurde innerhalb der ersten 30 Minuten apoptotisch, 20% gingen etwa 5,5 Stunden nach der Perforation

⁵Konfluenz bezeichnet die Zelldichte auf dem Gefäßboden. 100% Konfluenz beschreibt einen vollständig geschlossenen Zellrasen.

in Apoptose (Annexin V positiv, siehe Abbildung 5.12). Direkt nach der Manipulation (innerhalb von 30 Minuten) wurde keine der Zellen nekrotisch (alle Zellen waren PI negativ), nach etwa 19 Stunden wurde auf rote Fluoreszenz geprüft und 4 Zellen waren PI-positiv. Die Zellen wurden insgesamt über einen Zeitraum von 60 Stunden beobachtet.

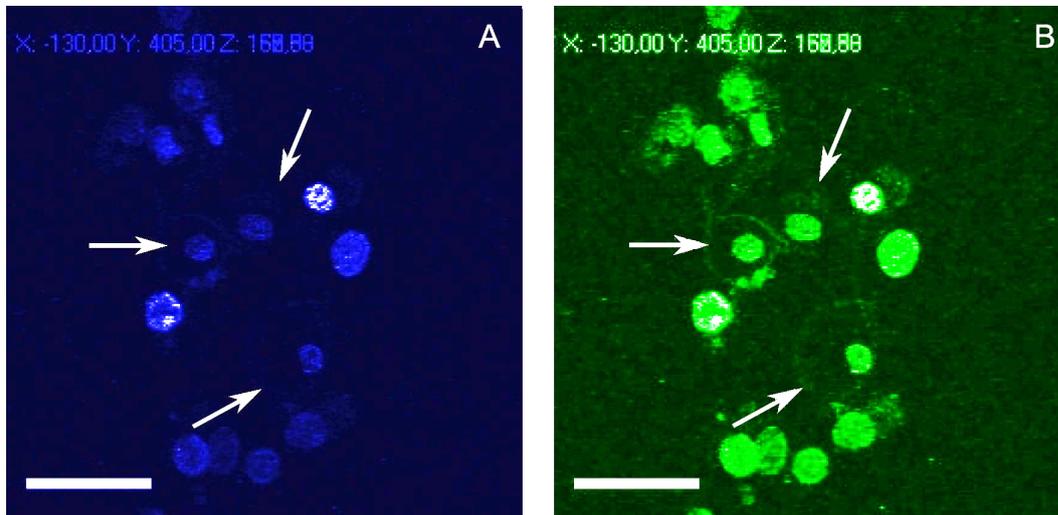


Abbildung 5.12: Multiphotonenmikroskopiebilder von MTH53a Zellen, die mit A) Hoechst 33342, B) FITC-konjugiertem Annexin V und PI gefärbt wurden, jeweils 5,5 Stunden nach der Manipulation. Die mit den Pfeilen markierten Zellen sind Annexin V positiv. Die Membran wurde mit einer Pulsenergie von 0,7 nJ und einer Einstrahldauer von 40 ms perforiert, die Fluoreszenz bei einer Anregungswellenlänge von 750 nm und einem Filter bei 475 nm bzw. bei 800 nm und einem Emissionsfilter bei 525 nm aufgenommen. Skala: 40 μ m.

5.3 Gen-Transfer von DNA

Der Gen-Transfer beinhaltet zusätzlich zur Aufnahme der Moleküle ins Zytosol den Transport der DNA von dort in den Zellkern, damit sie repliziert werden kann. Für eine erfolgreiche Transfektion ist demnach neben der erfolgreichen Aufnahme der DNA ins Zytosol noch der Transport in den Kern und eine erfolgreiche Replikation von großer Bedeutung. Diese Faktoren beeinflussen die Effizienz des Verfahrens und können nur ablaufen, wenn die DNA unbeschädigt ist. Im Folgenden werden daher die erfolgreiche fs-Laser basierte Transfektion mit einem nicht-rekombinanten und rekombinanten Vektorplasmiden und die dabei erhaltene Funktionalität dieser Plasmide gezeigt. Neben den etablierten caninen Zelllinien MTH53a und ZMTH3 wurden DRG (engl. *dorsal root ganglion*, Spinalganglien) Primärneuronen transfiziert.

5.3.1 Transfektion und Funktionalitätsnachweis der rekombinanten und nicht-rekombinanten GFP-Plasmide

Die Transfektion wurde mit einem nicht-rekombinanten pEGFP-C1 Vektorplasmid (*BD Bioscience Clontech*, Franklin Lakes, NJ, USA) und einem rekombinanten pEGFP-C1-*HMGA2* und -*HMGB1* Vektorplasmid durchgeführt (siehe Anhang A und B). Der Leervektor pEGFP-C1 färbt unspezifisch die gesamte Zelle, während die beiden rekombinanten Vektoren durch die Fusion des GFP-Proteins an das Kernprotein zu einer kernspezifischen Färbung führen.

Für die Transfektion der caninen MTH53a und ZMTH3 Zellen wurden diese in poly-L-lysine beschichteten Glasboden Schalen (*MatTek Corp.*, Ashland, MA, USA) kultiviert. Die Lasermanipulation wurde im M199 Kulturmedium (*Gibco*, Karlsruhe) mit $50 \frac{\mu\text{g}}{\text{ml}}$ des nicht-rekombinanten pEGFP-C1 Vektors oder des rekombinanten pEGFP-C1-*HMGA2* oder -*HMGB1* Vektors durchgeführt. Wie in Abschnitt 1.3 beschrieben, wurde der fs-Laser mit einem Wasserimmersionsobjektiv mit einer NA von 0,8 auf die Membran fokussiert, um sie zu perforieren. Die entsprechende Fokusposition wurde im Hellfeldmikroskopiebild bestimmt. Da die exakte Positionierung des Fokus in der lediglich 5 nm dicken Membran auf diese Weise nicht möglich war, wurde jede Zelle bis zu 3 Mal bestrahlt und der Fokus jeweils axial um etwa 1 μm verschoben. Die Einstrahldauer des Lasers wurde auf jeweils 40 ms festgelegt, die Pulsenergie betrug 1 nJ. Da der Bildausschnitt bei dem Ölimmersionsobjektiv mit 1,3 NA sehr klein ist, wurde auf das 0,8 NA Wasserimmersionsobjektiv zurückgegriffen. Bei diesen Parametern wurde eine Viabilität von 90% und eine Effizienz von 70% erwartet (siehe Abschnitt 5.2.1). Nach der Behandlung wurden die Zellen mit NaCl-Medium gewaschen und für 24 bis 48 Stunden im Kulturmedium bei 37° und 5% CO₂ kultiviert. Anschließend wurde die erfolgreiche Transfektion über konventionelle Fluoreszenzmikroskopie nachgewiesen.

Es wurde kein Unterschied in der Effizienz der Transfektion zwischen den ZMTH3 und den MTH53a Zellen festgestellt, jedoch wachsen die MTH53a Zellen sehr dicht nebeneinander, während die ZMTH3 Zellen auch vereinzelt auftreten. Dies ist ein Vorteil für die Transfektion, da dadurch die Abgrenzungen der ZMTH3 Zellen besser erkannt werden können. Dennoch wurden beide Zelllinien erfolgreich mit den rekombinanten und dem nicht-rekombinanten Vektoren transfiziert (siehe Abbildung 5.13). Die höchste Ausbeute an fluoreszierenden Zellen wurde 48 Stunden nach der Behandlung erzielt. Dabei muss berücksichtigt werden, dass die Zellen sich geteilt haben können.

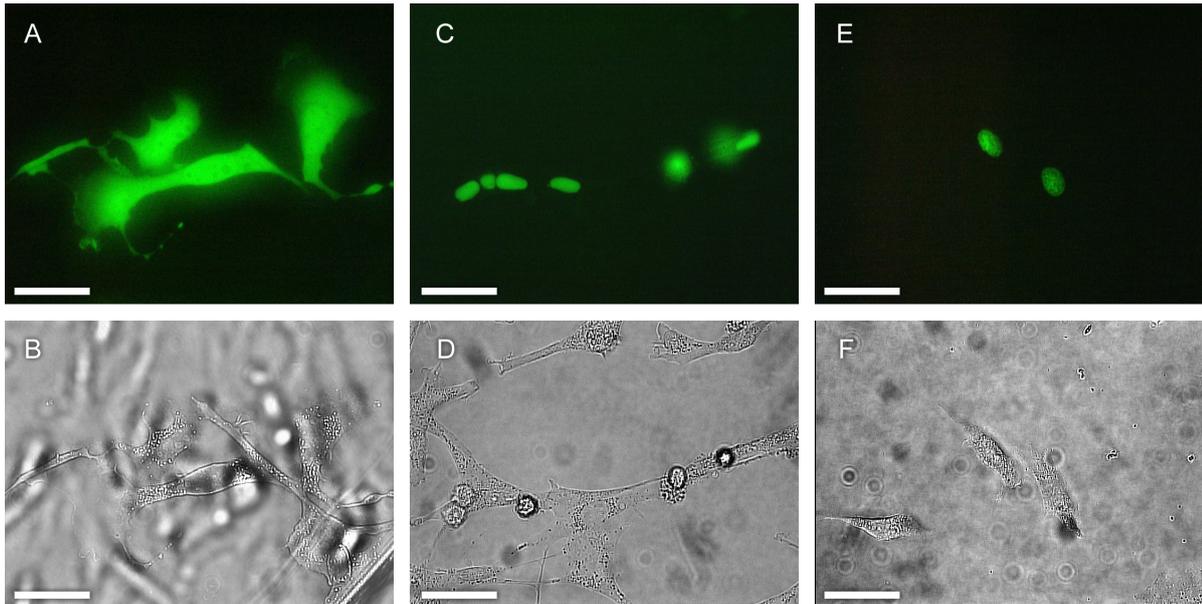


Abbildung 5.13: Transfizierte ZMTH3 und MTH53a Zellen. A) Fluoreszenz- und B) Hellfeldmikroskopiebilder der mit dem nicht-rekombinanten pEGFP-C1 Vektorplasmid transfizierten ZMTH3 Zellen. C) Fluoreszenz- und D) Hellfeldmikroskopiebilder der ZMTH3 Zellen, die mit dem rekombinanten pEGFP-HMGA2 Vektorplasmid und E) und F) das Fluoreszenz- und Hellfeldbild der mit dem rekombinanten pEGFP-HMGB1 Vektorplasmid transfizierten MTH53a Zellen. Die Bilder wurden jeweils 48 Stunden nach der Manipulation aufgenommen. Die Membran wurde mit einer Pulsenergie von 1 nJ und einer Einstrahldauer von 40 ms perforiert. Skala: 20 μm .

Eine Studie über einen Zeitraum von 60 Stunden wurde durchgeführt, um den Verlauf der Transfektion zu beobachten. Dabei wurden die Zellen mit dem nicht-rekombinanten pEGFP-C1 Vektorplasmid im extrazellulären Medium perforiert. Die Zellen wurden ebenfalls mit 0,7 nJ Pulsenergie, 40 ms Einstrahldauer und dem 1,3-NA-Ölimmersionsobjektiv behandelt, mit 50 $\frac{\mu\text{g}}{\text{ml}}$ Vektorplasmid in NaCl-BS als extrazelluläre Lösung. Parallel wurde wie in Abschnitt 5.2.2 mit Hoechst 33342, PI und Annexin V die Viabilität der Zellen kontrolliert. Über einen Zeitraum von 60 Stunden wurde mit einem Abstand von 30 Minuten ein Stapel von etwa 30 μm Höhe mit einem axialen Abstand der Bilder von 1,5 μm aufgenommen. Da das Spektrum von Hoechst 33342 ebenfalls leicht ins Grüne reicht, kann eine gleichzeitige Detektion des GFP und des gefärbten Kerns erfolgen. Deshalb wurde die Fluoreszenz bei 800 nm gemessen, was nicht den jeweiligen Anregungsmaxima entspricht.

Die Beobachtung der perforierten Zellen über insgesamt 60 Stunden zeigte, dass die erfolgreich transfizierten Zellen in einem Zeitraum von etwa 5,5 bis 7,5 Stunden anfangen, das GFP zu exprimieren (siehe Abbildung 5.14). Dabei wurde wie in Abschnitt 5.2.2 vorgegangen. Nach der Perforation wurden der extrazellulären Lösung Annexin V FITC Konjugat und PI zugefügt, um

gegebenenfalls Apoptose und Nekrose nachzuweisen. Zusätzlich wurde als Kontrollmessung ein Bereich in einer Entfernung von mehr als 160 μm von den manipulierten Zellen abgerastert. Dabei wurden keine Zellen gefunden, die bei der selben Behandlung, jedoch ohne Laserbestrahlung, durch spontane Transfektion das GFP exprimierten.

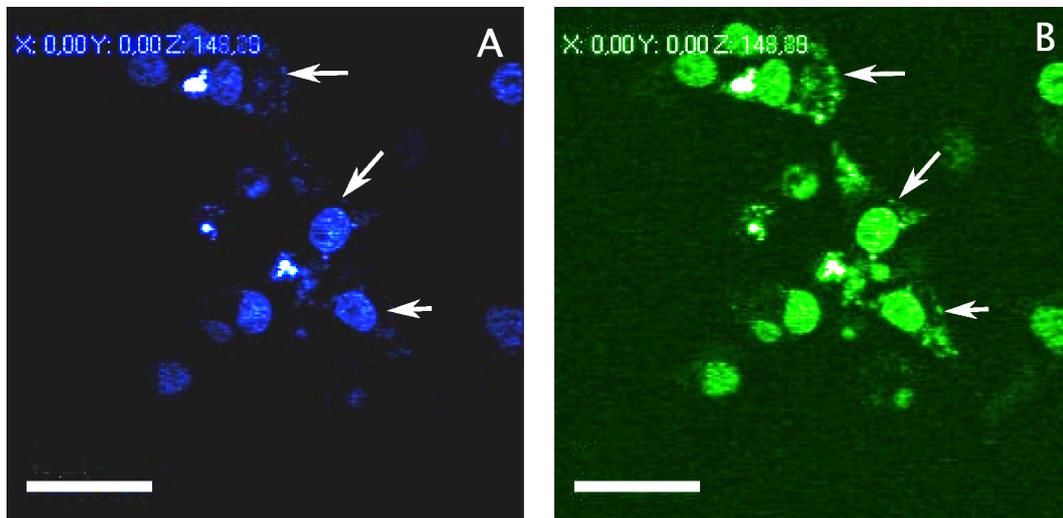


Abbildung 5.14: Multiphotonenmikroskopiebilder von transfizierten MTH53a Zellen. A) blaue Fluoreszenz des Hoechst 33342 und B) grüne Fluoreszenz der mit dem nicht-rekombinanten pEGFP-C1 Vektorplasmid transfizierten Zellen, 7,5 Stunden nach der Manipulation (zusätzlich ist der Hoechst-Farbstoff zu sehen, so dass die Kerne besonders hell fluoreszieren). Die Membran wurde mit einer Pulsenergie von 0,7 nJ und einer Einstrahldauer von 40 ms perforiert, die Fluoreszenz bei einer Anregungswellenlänge von 750 nm und einem Filter bei 475 nm bzw. bei 800 nm und einem Emissionsfilter bei 525 nm aufgenommen. Die Pfeile markieren die erfolgreich transfizierte Zellen. Skala: 40 μm .

5.3.2 Transfektion von Primärzellen

Die fs-Laser basierte Transfektion zeichnet sich durch ein sehr geringes Schädigungspotential aus. Deshalb wird angenommen, dass sie sich besonders gut für die Transfektion von Stamm- oder Primärzellen eignet. Diese sind sehr sensibel und reagieren daher empfindlicher auf Schädigung als etablierte Zelllinien. In dieser Arbeit wurden DRG Primärneuronen transfiziert (siehe Anhang B). Diese liegen in einer Mischkultur mit Gliazellen⁶ vor. Die Neuronen wurden in F12 Medium mit NGF (engl. *neuron growth factor*) inkubiert. Die DRG Neuronen wurden im Kulturmedium mit 50 $\frac{\mu\text{g}}{\text{ml}}$ pEGFP-C1 Plasmid perforiert. Die Bestrahlung wurde mit unterschiedlichen Laserparametern durchgeführt. Die Einstrahldauer betrug zwischen 20 und 40 ms und die Pulsenergie lag zwischen 1,0 und 1,1 nJ.

⁶Gliazellen bilden im Nervengewebe ein von Blutkapillaren und Lymphgefäßen durchzogenes, bindegewebeähnliches Stützgewebe.

Die beste Rate von transfizierten Neuronen wurde bei 1 nJ Pulsenergie und 30 ms Einstrahldauer erreicht. Durch die hohe Selektivität der Opto-Perforation wurden ausschließlich die Neuronen transfiziert (siehe Abbildung 5.15). Keine der Gliazellen wies Fluoreszenz des GFP auf. Durchschnittlich befanden sich etwa 50 Neuronen in einer Glas-Boden-Petrischale, die alle manipuliert wurden (insgesamt 15 Schalen, davon 4 bei diesen Parametern). Während die Gliazellen sich während der Inkubationszeit nach der Perforation geteilt haben, sind die Neuronen mitotisch ruhend. Von den behandelten Zellen waren etwa 50% nekrotisch, die Effizienz der Transfektion bei 1 nJ Pulsenergie und 30 ms Einstrahldauer lag bei etwa 12% der perforierten Zellen.

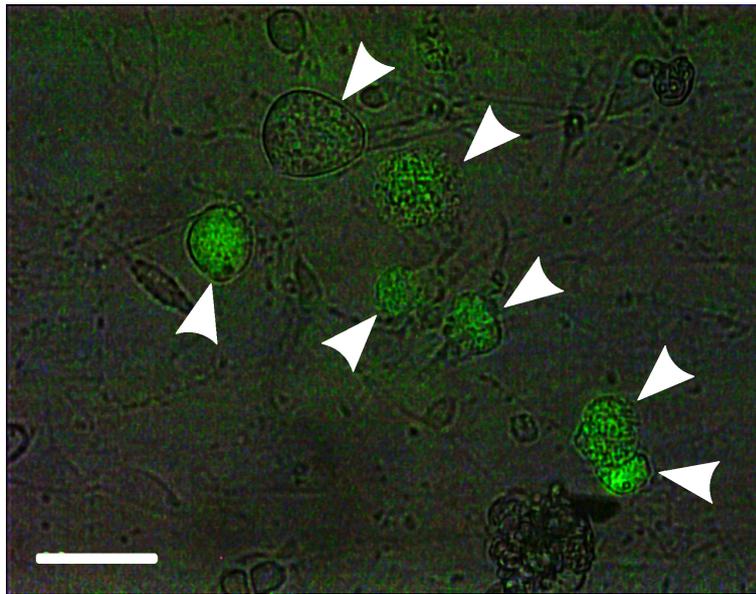


Abbildung 5.15: Überlagerung des Hellfeld- und Fluoreszenzmikroskopiebildes von primären Neuronen und Gliazellen. Die Neuronen wurden mit 1 nJ Pulsenergie und 30 ms Einstrahldauer in Gegenwart von $50 \frac{\mu\text{g}}{\text{ml}}$ pEGFP-C1 Vektorplasmid perforiert, gewaschen und für 48 Stunden im Kulturmedium inkubiert. Die Pfeile markieren die DRG Neuronen, die übrigen Zellen sind Gliazellen. Die erfolgreich transfizierten Neuronen fluoreszieren grün (GFP). Skala: 30 µm.

5.4 Fazit der Opto-Perforation als Transfektionsmethode

Die Transfektion von Zellen mittels ultrakurzer Laserpulse konnte erfolgreich an verschiedenen Zelllinien mit nicht-rekombinantem und rekombinantem Vektorplasmid gezeigt werden. Zusätzlich zu der Transfektion von etablierten Zelllinien wurde erstmals gezeigt, dass sogar Primärzellen (DRG-Neuronen) mit dieser Methode transfiziert werden können, bei denen die Standardmethoden nicht zufriedenstellend funktionieren.

Als visuelles Signal einer erfolgreichen Perforation der Membran wurde in der Literatur die Erzeugung einer Gasblase vermutet [Ste06, Bau08]. Diese Hypothese konnte mit Hilfe der Patch-Clamp-Technik in Verbindung mit Kurzzeitphotographie und einer Streulichtdetektion von Gasblasen verifiziert werden. Zusätzlich wurde eine Quantifizierung der Transfektion durch die Messung der Membranpotentialänderung vorgenommen und mit den Nernst- und Goldman-Gleichungen berechnet. Dies wurde experimentell durch eine Konzentrationsmessung mittels Aufnahme von LY als Fluoreszenzfarbstoff verifiziert. Eine solche Quantifizierung der Transfektion ist mit keiner der etablierten Methoden möglich.

Das Einbringen von rekombinanten Vektorplasmiden brachte hervor, dass die Laserbestrahlung die exogene DNA nicht schädigt und sie vollständig funktionsfähig in den Zellkern gelangt. Die Funktionalität wurde dadurch gezeigt, dass die DNA so codiert war, dass das GFP an ein Kernprotein gekoppelt wird, so dass nicht wie bei der Transfektion von nicht-rekombinanten Plasmiden das GFP in der ganzen Zelle unspezifisch verteilt ist, sondern ausschließlich im Kern vorliegt.

Mit diesen Ergebnissen kann die Opto-Poration mittels fs-Laserpulsen als sehr gut geeignete Methode für die Transfektion von Zellen, insbesondere von sensiblen Zellen wie Primärzellen, beurteilt werden. Die Detektion einer Gasblase ermöglicht zusätzlich eine simultane Kontrolle der Perforation mittels Hellfeldmikroskopie.

6 Diskussion und Ausblick

Mit der vorliegenden Arbeit ist es gelungen, das viel versprechende Potential der Transfektion von lebenden Zellen mittels fs-Laserpulsen mit einer hohen Effizienz zu demonstrieren und erstmals die Umsetzung an Primärzellen zu realisieren. Im Hinblick auf diese Anwendung an den sensiblen Primär- aber auch Stammzellen konnten die Nebenwirkungen auf dem molekularen Niveau der Zelle bezüglich der Entstehung reaktiver Sauerstoff Spezies (ROS) und dem Einströmen von Calcium (Ca^{2+}) aus der extrazellulären Lösung festgestellt werden. Diese konnten über die Zugabe von Antioxidantien bzw. der Behandlung der Zellen in Ca^{2+} -freier Umgebung minimiert werden, so dass die Überlebenswahrscheinlichkeit der Zellen nach der Laserbestrahlung erhöht wurde. Darüber hinaus wurden die optimalen Laserparameter für die Transfektion eruiert und über elektrophysiologische Experimente ein besseres Verständnis der Mechanismen der Permeabilisierung mittels fs-Laserpulsen erreicht.

Für die Transfektion ist insbesondere wichtig, dass die endogene DNA, ebenso wie die exogene DNA, die in die Zelle gelangen soll, nicht beschädigt wird. Diese besitzt eine hohe Absorption im UV-Wellenlängenbereich, so dass eine Karzinogenität durch die Verwendung längerer Wellenlängen im Nahinfraroten, wie sie fs-Laser typischerweise emittieren, vermindert werden kann [Gre87a, Gre87b, Ras89]. Zusätzlich zur Manipulation kann dieser Laser bei geringerer Pulsenergie zur Bildgebung mittels Multiphotonenmikroskopie genutzt werden. Dabei bietet sich der Vorteil, dass deutlich weniger ROS erzeugt wird, als bei konventioneller Fluoreszenzmikroskopie bei Anregung mittels UV-Lampe [Tir01b]. Die Kombination dieser beiden Methoden ermöglichte die präzise Untersuchung der Nebenwirkungen der Laserstrahlung bezüglich der Entstehung von ROS und der Änderung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration, die in dieser Dissertation vorgestellt wurde.

Die optimalen Laserparameter für die Transfektion wurden mittels Permeabilisierung von Granulosazellen in PI-haltiger extrazellulärer Lösung eruiert. Eine erfolgreiche Perforation wurde direkt durch die Fluoreszenz des aufgenommenen Farbstoffs bestimmt, während die Viabilität nach 90 Minuten durch Nachfärbung mit PI und einem Fluoreszenzintensitätsvergleich nachgewiesen

wurde (siehe Abschnitt 5.2.1). Die optimalen Parameter von 0,9 nJ und 40 ms Einstrahldauer und 90 MHz Repetitionsrate, mit einer Effizienz von etwa 70% und einer Viabilität von etwa 90%, stimmen sehr gut mit den in der Literatur (für andere Zelllinien) angegebenen Werten überein [Tir02, Koh05, Ste06, Bro08]. Die Langzeitstudie über 60 Stunden nach der Permeabilisierung in Anwesenheit von pEGFP-C1-Vektorplasmid, wobei der extrazellulären Lösung nach der Perforation PI und Annexin V zugefügt wurde, zeigte den zeitlichen Ablauf von Nekrose, Apoptose und Exprimierung des GFP nach der laserinduzierten Permeabilisierung. Für diese Versuche wurde statt dem 0,8 NA Wasserimmersionsobjektiv das 1,3 NA Ölimmersionsobjektiv verwendet, da das Immersionswasser zu schnell verdunstete. Deshalb wurde die Transfektion mit 0,7 nJ und 40 ms durchgeführt. Dabei ist die Fluenz mit $0,5 \frac{\text{J}}{\text{cm}^2}$ zwar höher, als mit dem Wasserimmersionsobjektiv ($0,25 \frac{\text{J}}{\text{cm}^2}$), jedoch ist die Fokussierung in die Membran durch den kleineren Fokusbereich mittels Hellfeldmikroskopie schlechter zu realisieren. Dieser Kompromiss war bezüglich des Auftretens von Gasblasen bei der Permeabilisierung vergleichbar mit den Parametern für das Wasserimmersionsobjektiv. Die laserinduzierte Nekrose trat innerhalb der ersten Minuten nach Behandlung ein, während Apoptose auch noch später, bis einige Stunden nach der Perforation auftrat. Die erste Synthetisierung des GFP wurde bereits nach etwa 5,5 Stunden beobachtet. Die Ausbeute war allerdings insgesamt jeweils 48 Stunden nach der Laserbehandlung am größten, wobei einige Zellen sich in dieser Zeit geteilt haben, so dass dies mit in eine Effizienzbetrachtung aufgenommen werden muss.

Die Funktionalität der exogenen, mittels fs-Laserpulsen eingebrachten DNA wurde durch die Verwendung von rekombinanten Vektorplasmiden nachgewiesen (siehe Abschnitt 5.3.1). Es wurden canine ZMTH3 und MTH53a Zellen transfiziert, für die die DNA hergestellt wurde. Die Plasmide waren so codiert, dass das GFP an ein kernspezifisches Protein gekoppelt synthetisiert wurde, so dass die erfolgreich transfizierten Zellen ausschließlich im Kern fluoreszierten. Im Vergleich dazu wurde das GFP in den mit dem nicht-rekombinanten pEGFP-Vektorplasmid transfizierten Zellen unspezifisch im ganzen Zellvolumen detektiert. Diese ortsspezifische Fluoreszenz bei rekombinantem und nicht-rekombinantem Vektorplasmid wurde in jedem Fall korrekt beobachtet, so dass von einer fehlerfreien Synthetisierung ausgegangen werden kann.

Die Mechanismen der Transfektion wurden durch die elektrophysiologischen Messungen betrachtet. Die Kenntnis des Membranpotentials und des Stroms durch die Membran gibt Aufschluß darüber, wie lange die Membranintegrität gestört ist bzw. wie lange ein Austausch zwischen extra- und intrazellulärem Raum besteht. Die Messungen ergaben bei 90 MHz eine Depolarisationszeit von durchschnittlich 60 ms bei einer Einstrahldauer von 30 ms. Der Stromfluss im

40 kHz-Regime stieg dagegen während der gesamten Bestrahlungszeit von 4 s an. Die Störung der Membranintegrität ist demnach im MHz-Regime um einen Faktor 100 kürzer, so dass der Stress für die Zelle in diesem Fall kleiner ist. Darüber hinaus ermöglichte die Membranpotentialänderung während der Permeabilisierung eine Quantifizierung des Gentransfers mittels der Nernst- und Goldman-Gleichungen. Die Depolarisation gibt Aufschluss darüber, wie viele Ionen aus intra- und extrazellulärem Raum ausgetauscht wurden, unter der Annahme dass es zu keiner Volumenänderung der Zelle kommt (siehe Abschnitt 5.1.4). Ist die Konzentration der DNA in der extrazellulären Lösung bekannt, kann die eingebrachte Menge berechnet werden. Die Messungen ergaben bei einer Depolarisation um durchschnittlich 10 mV ein relatives ausgetauschtes Volumen von 0,4. Dieses Ergebnis wurde verifiziert durch eine Vergleichsmessung der Farbstoffkonzentration, nach definiertem Einbringen einer Konzentration von Lucifer Yellow (LY) mittels Mikrokapillare und durch Perforation mittels fs-Laserpulsen in LY-haltiger extrazellulärer Lösung. Dieser Farbstoff fluoresziert unabhängig von einer Bindung, ist impermeabel für die Zellmembran und somit besser geeignet als beispielsweise PI. Die Quantifizierung des Gentransfers kann zukünftig dazu genutzt werden, um zu bestimmen, wie viel DNA wirklich notwendig ist, um eine Zelle zu transfizieren. Eine Studie, bei der zwei unterscheidbare Vektorplasmide in eine Zelle eingebracht werden, wobei beide in unterschiedlicher Konzentration vorliegen, könnte Aufschluss darüber bringen, wie viel DNA tatsächlich notwendig ist, damit eine Zelle die darauf codierten Proteine exprimiert. Zusätzlich ermöglicht diese Kenntnis eine Zeit- und Kostenersparnis in Bezug auf die Herstellung der Plasmide, da keine überschüssige DNA produziert werden muss.

Die zelluläre Reaktion auf die Lasereinstrahlung auf dem molekularen Niveau wurde mittels Multiphotonenmikroskopie beobachtet. Repräsentativ wurden dafür neben der Membran auch der Zellkern und die Mitochondrien manipuliert. Der Zellkern ist im Vergleich zum Laserfokus sehr groß und näherungsweise homogen, so dass eine multiple Bestrahlung auch mit einem großen Zeitintervall zwischen den Manipulationen (630 s) möglich war. Die Laserparameter wurden, wie in Abschnitt 4.2 erläutert, aufgrund der Arbeiten von Iwanaga et al. so gewählt, dass sie sich an der Schwelle bzw. über der Schwelle zur Erzeugung von einer molekularen Reaktion befinden [Iwa06]. Beispielhaft für eine etablierte Zelllinie wurden für die Experimente bezüglich der ROS- und Ca^{2+} -Studien Bovine Aorta Endothelzellen (Rinderendothelzellen) verwendet.

Die Einstrahlung von einem fs-Laserpulszug zeigte im einen vergleichbaren Anstieg der ROS-Konzentration kHz- und im MHz-Regime bei einer Pulsenergie von 1,0 nJ und der gleichen Pulsanzahl. Der Verlauf der Fluoreszenzintensität wies darauf hin, dass die ROS direkt durch die Laserstrahlung produziert wurden. Da die Zelle zu etwa 70% aus Wasser besteht, sind diese

Radikale als Ergebnis der Ionisation insbesondere H_2O^+ , H_3O^+ und OH^- . Während einige der erzeugten ROS, wie Singulett Sauerstoff und Hydroxyl Radikale, aufgrund ihrer Reaktivität auf das fokale Volumen beschränkt sind, ist Hydrogenperoxid stabil genug, die Zellmembran zu durchqueren [Nik83, Bat02]. Deshalb verteilt sich die Fluoreszenz durch Diffusion der ROS-Moleküle bis zu ihrer Oxidation schnell innerhalb der gesamten Zelle. Diese wurden durch die zelleigenen Radikalfänger bei MHz-Pulszügen schneller gebunden als bei kHz-Bestrahlung. Dies läßt sich damit erklären, dass die Applikation der benötigten 160.000 Pulse im MHz-Regime um einen Faktor 100 kürzer ist und damit ein geringerer Stress induziert wird. Während der Anstieg der ROS-Konzentration bei 1,0 nJ Pulsenergie in beiden Repetitionsratenregimes etwa gleich war, erhöhte sich dieser bei 1,5 nJ und 40 kHz um einen Faktor 2 und bei 4 MHz um einen Faktor 5 (siehe Abschnitt 4.2). Dieser Unterschied kann durch die limitierten Diffusionskoeffizienten der Radikalfänger resultieren. Wenn viele ROS-Moleküle im fokalen Volumen erzeugt werden, kann dies zu einer Überlastung der Radikalfängerkapazität führen. In diesem Fall wäre ihre Effizienz durch die Diffusion in das fokale Volumen bestimmt. Beispielsweise beträgt der Diffusionskoeffizient von Catalase $43 \cdot 10^{-8} \frac{\text{cm}^2}{\text{s}}$, der deutlich geringer als der der ROS-Moleküle ist [Str92, Pap00]. Deshalb wurde bei der 100-fach kürzeren Zeit zwischen zwei Laserpulsen im MHz-Regime eine stärkere Akkumulation von ROS-Molekülen beobachtet.

Der Zusatz Ascorbinsäure als Antioxidant unterdrückte den laserinduzierten ROS-Konzentrationsanstieg durch Kernmanipulation mit 1,0 nJ Pulsenergie fast vollständig (siehe Abschnitt 4.2), wobei es insbesondere das langlebige H_2O_2 bindet [Deu98]. Dahingegen reichte die Reduktionskapazität der Ascorbinsäuremoleküle (10 μM) nicht aus, die produzierten ROS bei 1,5 nJ vollständig zu binden, jedoch konnte der Anstieg der ROS-Konzentration deutlich vermindert werden. Dies zeigt, dass die Zugabe von Antioxidantien den Einfluss der ROS-Erzeugung auf die Zelle während der Zellchirurgie reduziert. Eine geringere Störung des molekularen Gleichgewichtes führt wiederum zu einer höheren Überlebensrate der Zellen, wodurch die Effizienz der Manipulation insgesamt gesteigert wird.

Die sukzessive Bestrahlung des Zellkerns mit zwei Pulszügen (40 kHz, 4 s Einstrahldauer oder 4 MHz für 40 ms bestrahlt) bei 1,5 nJ Pulsenergie ergab ein interessantes Verhalten der ROS-Konzentration (siehe Abschnitt 4.2.2). Zwei aufeinander folgende Einstrahlintervalle der gleichen Repetitionsrate resultierten wie erwartet in zwei Anstiegen, die denen der Einzelmanipulation entsprachen. Ebenso verhielt sich die Konzentration nach einem kHz- gefolgt von einem MHz-Pulszug. Dahingegen verursachte die umgekehrte Reihenfolge, erst MHz- und anschließend kHz-Bestrahlung, einen drastischen ROS-Konzentrationsanstieg, der einen Faktor 4 stärker als mit

zwei MHz-Pulszügen war. Die Zugabe von Ascorbinsäure unterdrückte diesen Effekt vollständig und die Konzentrationserhöhung verhielt sich wie bei den Einzelbestrahlungen (siehe Abbildung 4.5). Dies zeigt, dass die Radikalfänger oder ROS-reduzierende Mechanismen beschädigt wurden, in ihrer Aktivität eingeschränkt wurden oder dass durch die MHz-Bestrahlung bestimmte Moleküle bevorzugt entstanden, die bei kHz-Einstrahlung verstärkt Reaktionen auslösen und damit den ROS-Anstieg katalysieren. Die photochemischen Reaktionen, die zur ROS-Bildung führen, können in schnelle und langsame Reaktionen unterteilt werden, mit Zeitkonstanten von 10^{-9} bis 10^{-6} bzw. 10^{-3} s [Nik83]. Die Ergebnisse deuten darauf hin, dass die langsamen photochemischen Prozesse im Millisekundenbereich normalerweise von den Radikalfängern unterdrückt werden, jedoch nach der Vorschädigung durch einen MHz-Pulszug, bei niedrigen Repetitionsraten eine wesentliche Rolle spielen. Dahingegen ist die Zeit zwischen zwei aufeinander folgenden 4 MHz-Pulsen mit $0,25 \mu\text{s}$ so kurz, dass diese langsamen Prozesse durch permanente Ionisation und Dissoziation der Moleküle im fokalen Volumen nicht ungestört stattfinden können und somit eine untergeordnete Rolle spielen. Deshalb blieb der ROS-Konzentrationsanstieg durch zwei aufeinander folgende MHz-Pulszügen gleich, während die ROS-Akkumulation durch einem kHz-Pulszug nach vorangegangener Bestrahlung in MHz-Regime deutlich stärker war. Um diese Ergebnisse zu belegen und im Detail zu verstehen, ist es notwendig, eine weiterführende Studie diesbezüglich durchzuführen. Dabei sollten bestimmte endogene Radikalfänger geblockt werden (beispielsweise Catalase), um zu zeigen, dass in Bezug auf die Repetitionsrate eine Änderung der ROS-Akkumulation stattfindet bzw. welche Radikale für das Verhalten ausschlaggebend sind. Darüber hinaus könnten bestimmte Radikale geblockt werden, beispielsweise durch die Zugabe anderer Antioxidantien wie Catalase, Glutathion sowie Vitamin A und E verifiziert werden. Eine weitere Fragestellung lautet, wie lange die Zeitspanne und wie groß der räumliche Abstand zwischen der konsekutiven Einstrahlung zweier Pulszüge werden kann, um diesen Effekt noch hervorzurufen.

Neben der ROS-Konzentrationsänderung durch die Applikation aufeinander folgender Pulszüge in den Kern wurde die Morphologie der Mitochondrien der Zellen beobachtet, um Aufschluß über die Viabilität der Zellen zu bekommen. Etwa zwei bis drei Minuten nach der Bestrahlung mit einem kHz-Pulszug, nachdem die Zelle zuvor mit MHz-Pulsen behandelt wurde, trat eine Veränderung der Mitochondrien auf. Diese war gefolgt von einer schnellen Minderung der Fluoreszenzintensität und der Aufnahme von PI im Zellkern, was auf eine schwerwiegende Schädigung der Zelle hindeutet (siehe Abbildung 4.6). Eine Langzeitstudie über die Entwicklung der ROS-Konzentration in den mittels fs-Laserpulsen behandelten Zellen wäre bezüglich der

Überlebenswahrscheinlichkeit nach einfacher und konsekutiver Manipulation interessant, da mit den bisher durchgeführten Experimenten lediglich die direkte Auswirkung auf die Zellen beobachtet wurde. Für die Langzeitentwicklung ist jedoch der ROS-Indikator H_2DCFDA nicht geeignet, da er sehr schnell aus den Zellen heraus diffundiert und eine aussagekräftige Messung über eine Stunde hinaus nicht möglich ist. Eine Nachfärbung würde dieses Problem umgehen, allerdings ist die Farbstoffaufnahme der Zellen sehr unterschiedlich, so dass aufeinander folgende Meßpunkte bezüglich der Fluoreszenzintensität nicht ohne weiteres vergleichbar wären.

Zusätzlich zur Kernmanipulation wurde Mitochondriendisruption durchgeführt und die dabei erzeugte ROS-Konzentrationserhöhung gemessen. Die Mitochondrien sind grundsätzlich für einen Großteil der ROS-Erzeugung während der Energieumwandlung in der Zelle verantwortlich (siehe Abschnitt 3.1.3). Sie sind sehr dynamisch und ändern ihre Form fortwährend, wobei sie sich sowohl teilen, als auch fusionieren können [Kar05]. Außerdem sind sie mit durchschnittlich 1 μm Durchmesser (in den Rinderendothelzellen) im Vergleich zum Zellkern sehr klein. Deshalb muss in Bezug auf die Mitochondriendisruption berücksichtigt werden, dass zum Teil unbeabsichtigt neben die Organelle fokussiert wurde. Die Mitochondrien sind in der Literatur ein beliebtes Beispiel, um die Präzision der fs-Laser-Zellchirurgie zu demonstrieren. Dabei wurde bereits Vermutungen über den Einfluß von molekularen Veränderungen in der Umgebung der manipulierten Mitochondrien getroffen [Wat04, Shi05, She05]. Vergleichbar mit der Kernmanipulation konnte eine Zunahme der ROS-Konzentration mit steigender Pulsenergie und wachsender Anzahl behandelter Mitochondrien festgestellt werden. Ebenfalls führte die Disruption im kHz-Regime zu einer geringeren ROS-Produktion als im MHz-Regime. Die Fokussierung in das Zytosol neben die Mitochondrien führte zu einem um 80% geringeren ROS-Konzentrationsanstieg. Dies lag nicht ausschließlich an der Tatsache, dass die Mitochondrien ohnehin ROS produzieren, welches durch Schädigung freigesetzt wird, sondern auch daran, dass diese angefärbt waren und deshalb eine höhere Absorption vorweisen als das ungefärbte Zytosol. Die ROS-Erzeugung ist demnach sowohl von den Laserparametern, als auch vom Ort der Fokussierung und der Absorption (Färbung) der jeweiligen Organelle abhängig.

Die Mitochondriendisruption wurde zusätzlich hinsichtlich der Möglichkeit der Apoptoseauslösung untersucht. Deshalb wurde jeweils darauf geachtet, das Mitochondrium nicht vollständig abzutragen, sondern lediglich auf einen Punkt der Organelle zu fokussieren. Damit wurde verhindert, dass das gesamte Material des Mitochondriums zerstört wurde und somit Moleküle wie Cytochrom c weiterhin funktional blieben, die grundlegend zum Ablauf der Apoptose beitragen (siehe Abschnitt 3.2.3). Im Gegensatz zur Nekrose, wobei die Fluoreszenz des ROS-Indikators

sehr schnell auf ein Minimum unter dem initialen Niveau absank und einige Minuten später eine PI-Akkumulation im Kern beobachtet wurde, traten bei der Apoptose Membranausstülpungen (engl. *Blebbing*) auf (siehe Abbildungen 4.9 und 4.10). Dieses Blebbing trat direkt nach der Lasereinstrahlung auf und verursachte eine langsamere Abnahme der durchschnittlichen Fluoreszenzintensität im Vergleich zur Nekrose. Die Mitochondrien änderten zudem ihre Morphologie. Als weiterer Indikator für Apoptose wurden die Proben mit Annexin V FITC-Konjugat gefärbt. Da jedoch sowohl das an Annexin gebundene FITC als auch der ROS-Indikator grün fluoreszieren, konnte nicht eindeutig festgestellt werden, ob die Zellen Annexin-positiv waren (siehe Abbildung 4.9). Dennoch ist das Blebbing ein deutlicher Hinweis auf Apoptose. Zum Einleiten der Apoptose eigneten sich besonders die folgenden Parameter: 1,5 nJ Pulsenergie, 4 MHz Repetitionsrate bei 6 bis 8 manipulierte Mitochondrien. Der Mechanismus, der hinter der Apoptoseauslösung steht, ist wahrscheinlich die Freisetzung des in den Mitochondrien befindlichen Cytochrom c, das bei Beschädigung der Membran der Organelle in das Zytoplasma gelangt und damit die Apoptosekaskade auslöst (siehe Abschnitt 3.2.3). Eine weiterführende Studie bezüglich der Cytochrom c Freigabe durch Mitochondriendisruption wäre interessant. Es besteht die Möglichkeit Cytochrom c Freisetzung durch bestimmte Antikörperfärbung zu überprüfen. Eine derartig spezifische Auslösung der Apoptose könnte neue Erkenntnisse über den Ablauf der intrinsischen Apoptose bringen, wie beispielsweise eine Quantifizierung. Bisherige Methoden sind darauf beschränkt, in allen Mitochondrien der Zelle die Cytochrom c Freisetzung auszulösen und können deshalb diese Quantifizierung nicht leisten.

Da während der fs-Laser-basierten Transfektion typischerweise mehrfach (mit kleiner Änderung der axialen Position, $< 1 \mu\text{m}$) mit dem fs-Laser in die nur wenige Nanometer dicke Doppel-Lipid-Schicht fokussiert wird [Ste06], wurde sowohl für die ROS- als auch für die Ca^{2+} -Studie jeweils ein und drei Mal mit 1,0 oder 1,5 nJ Pulsenergie in beiden Repetitionsratenregimes manipuliert. Die erfolgreiche Fokussierung auf die Zellmembran wurde meist durch ein lokales Blebbing am Ort des Fokus begleitet, das sich jedoch über den Beobachtungszeitraum nicht auf die gesamte Membran ausweitete, sondern konstant blieb. Die eintretende Apoptose oder Nekrose würde sich in Blebbing über die gesamte Membran hinweg äußern. Deshalb wird davon ausgegangen, dass es sich um eine transiente Veränderung der Membranintegrität handelt, die der Zelle nicht langfristig schadet. Darüber hinaus wurden die Versuche mit 1,5 μM PI in der extrazellulären Lösung durchgeführt. Diese Konzentration reichte nicht aus, die Aufnahme von PI in die Zelle durch die laserbasierte Perforation mittels Multiphotonenmikroskopie zu detektieren. Im Falle von einer schwerwiegenden Schädigung der Zelle ist die Aufnahme des PIs jedoch ausreichend,

um die Fluoreszenz des Farbstoffs im Kern zu detektieren, so dass eine Unterscheidung zwischen transienter Permeabilisierung und starker, lang anhaltender Schädigung möglich war (siehe Abbildung 4.10).

Wie im Falle der Kernmanipulation und der Mitochondriendisruption nimmt auch während der Membranperforation die Erzeugung von ROS mit steigender Pulsenergie und steigender Repetitionsrate zu. In einigen Fällen wurde sogar ein Volumenaustausch zwischen extrazellulärem und intrazellulärem Raum durch eine verminderte Fluoreszenzintensität in der Umgebung des Laserfokus detektiert (siehe Abbildung 4.10). Durch die Zugabe von Ascorbinsäure als Antioxidant konnte die Produktion von ROS durch die Lasermanipulation bei 1,0 und 1,5 nJ Pulsenergie und einmaliger Bestrahlung in beiden Repetitionsratenregimes vollständig unterdrückt werden. Dies ermöglicht eine Reduzierung der molekularen Störung durch die Lasereinstrahlung und kann dadurch die Effizienz der Transfektion erhöhen. Die durch 1,5 nJ Pulsenergie und dreifacher Bestrahlung resultierende ROS-Erzeugung wurde zwar im kHz-Regime ebenfalls fast vollständig unterdrückt, jedoch kam es im MHz-Regime häufig zu einer sehr schnellen Fluoreszenzabnahme gefolgt von einem PI-positiven Signal und folglich zu einer starken Schädigung der Zelle. Für die Membranperforation führt die Applikation von 1,0 nJ Pulsen zu einer erfolgreichen Perforation ohne langfristige Zellschädigungen, wobei 1,5 nJ Pulsenergie sogar mit zusätzlichen Antioxidantien bereits zu Nekrose führt (siehe Abbildung 4.12).

Neben der ROS-Erzeugung wurde der Einfluss auf die Ca^{2+} -Homöostase während der Membranperforation untersucht. Die Erhöhung der Ca^{2+} -Konzentration durch Fokussierung von fs-Laserpulsen innerhalb einer Zelle wurde in der Literatur bereits beschrieben [Koe99b, Smi01b, Day06, Cra06]. Die Membranperforation stellt jedoch eine gesonderte Rolle dar, da hierbei zusätzlich zu einer intrazellulären Freisetzung ein Einströmen von extrazellulärem Ca^{2+} stattfinden kann. Dabei wurde vornehmlich eine Abhängigkeit von der Repetitionsrate festgestellt, die Pulsenergie hingegen war bedingt durch die hohe Ungenauigkeit der Positionierung des Laserfokus relativ zur Zellmembran nicht ausschlaggebend. Sowohl bei 1,0 nJ als auch bei 1,5 nJ Pulsenergie zeigten sich die gleichen Verhaltensstrukturen. Etwa die Hälfte aller perforierten Zellen zeigte keine Reaktion bezüglich Ca^{2+} auf die Manipulation. Die der übrigen Zellen konnten durch Kontrollmessungen in Ca^{2+} -freier extrazellulärer Lösung zwischen Signalen unterschieden werden, die durch Einfließen von extrazellulärem Ca^{2+} bedingt waren oder durch Freisetzung von Ca^{2+} aus intrazellulären Speichern. Das Einfließen von extrazellulärem Ca^{2+} war durch einen schnellen Anstieg der Konzentration charakterisiert, die zunächst einige Minuten auf dem erhöhten Niveau konstant blieb und anschließend auf das ursprüngliche Niveau abfiel (Gruppe 1, siehe Abbildung

4.13 A). Der Betrag dieses Anstiegs variierte stark und je nachdem, ob eine bestimmte Schwelle zur Ca^{2+} -induzierten Ca^{2+} -Freisetzung [Moz96, Moz98, Res07] erreicht wurde, folgte durch die erhöhte Konzentration ein weiterer Ca^{2+} -Anstieg, der innerhalb kurzer Zeit (70 s) wieder abfiel (Gruppe 2, siehe Abbildung 4.13 B). Die maßgeblichen Ca^{2+} -Speicher der Zelle, die eine intrazelluläre Ca^{2+} -Freisetzung ermöglichen, sind das endoplasmatische Retikulum (ER) und zu einem geringeren Anteil die Mitochondrien. Diese Speicher können somit durch Schädigung der Membran durch die Laserpulse aber auch durch weitere Signale zur Ca^{2+} -Freisetzung geleert werden [Ber98]. Ein solches durch intrazelluläre Ca^{2+} -Freisetzung bedingtes Signal äußerte sich in einem schnellen, starken Anstieg der Ca^{2+} -Konzentration, gefolgt von einer Reduktion auf das ursprüngliche Niveau innerhalb von durchschnittlich 90 s (Gruppe 3, siehe Abbildung 4.13 C). Dieser Gruppe müssen zusätzlich die Fälle mit gleichzeitigem intra- und extrazellulärem Ca^{2+} -Anstieg zugeordnet werden. In allen drei Gruppen traten Ca^{2+} -Oszillationen während des gesamten Beobachtungszeitraums nach der Manipulation auf. Im MHz-Regime trat das Verhalten von Gruppe 2 nicht und das von Gruppe 3 selten auf (siehe Abbildung 4.14). Dies weist darauf hin, dass die Perforation im kHz-Regime bezüglich des Ca^{2+} -Gleichgewichts ein höheres Schädigungspotential besitzt. Dies liegt an der längeren Einstrahldauer, die notwendig ist, um die gleiche Anzahl von Pulsen zu applizieren wie bei 4 MHz Repetitionsrate. Die Lasereinstrahlung verursacht eine zeitlich längere Störung der Integrität der Membranmoleküle, so dass Ca^{2+} -Ionen in höherer Konzentration in die Zelle gelangen als bei der kurzen MHz-induzierten Störung. Die in den Gruppen 1 bis 3 auftretenden Ca^{2+} -Oszillationen konnten jedoch durch Perforation in Ca^{2+} -freier extrazellulärer Lösung verhindert werden. Sogar nach dem Konzentrationsanstieg durch Freisetzung aus intrazellulären Speichern mit anschließender Reduzierung, wurden keine Oszillationen beobachtet (siehe Abbildung 4.13 E und F). Eine Studie mit längerer Beobachtungszeit der Zellen ist erforderlich, um die Auswirkungen der Ca^{2+} -Oszillationen bzw. der verminderten Schädigung in Ca^{2+} -freiem Medium zu eruieren. Für einen kurzen Behandlungszeitraum zur Transfektion könnte somit eine Aufbewahrung der Zellen in Ca^{2+} -freiem Medium die Viabilität und damit die Effizienz deutlich steigern (analog zur Perforation in Medien mit zusätzlichen Antioxidantien).

Die bereits erwähnte Ungenauigkeit der Fokuspositionierung relativ zur Membran aufgrund ihrer Dicke (wenige Nanometer) macht eine Kontrolle der erfolgreichen Perforation während der Behandlung notwendig. Eine Möglichkeit ist dabei die Membranfärbung, wie sie für die ROS- und Ca^{2+} -Studie durchgeführt wurde. Jedoch war diese Methode sehr langsam, da bei der benötigten Genauigkeit nur ein kleiner Bildausschnitt beobachtet werden konnte. Aus diesem Grund wurden

die Transfektionsversuche mit einem 0,8 NA Wasserimmersionsobjektiv im Hellfeldmikroskopie-Modus durchgeführt, wobei ein größerer Bildausschnitt beobachtet werden konnte und eine schnellere laterale Bewegung im Vergleich zum Multiphotonenmikroskopie-Modus (Objektiv mit 1,3 NA) möglich war. Allerdings musste eine geringere Fokussierung in Kauf genommen werden, die zu einer gröberen Manipulation führt. Im Vergleich zu dem Objektiv mit 1,3 NA wurde deshalb eine etwas höhere Pulsenergie benötigt (0,7 bzw. 0,9 nJ), um eine vergleichbare Perforation zu erreichen (vergleichbare Blasenbildung). Für eine erfolgreiche Perforation wurde die Entstehung von einer Gasblase als Kontrollsignal [Ste06] mittels Streulichtdetektion und der Patch-Clamp-Technik untersucht. Die elektrophysiologischen Experimente wurden mit den für die Patch-Clamp-Technik etablierten GFSHR-17 Granulosazellen durchgeführt, ebenso wie die dazugehörigen Effizienz und Viabilitätsstudien. Die tatsächliche Transfektion mit pEGFP-Vektorplasmiden wurde mit caninen ZMTH3 und MTH53a Zellen durchgeführt, da die Plasmide speziell für diese Zelllinien hergestellt wurden.

Die Ergebnisse der kombinierten Experimente mit Streulichtdetektion und Patch-Clamp-Technik konnten in zwei Regimes unterteilt werden. Ein Regime ist charakterisiert durch einen kleinen Stromfluß durch die Membran begleitet von einem Plasmaleuchten, das andere durch einen stärkeren Stromfluß, Plasmaleuchten und der Erzeugung einer Gasblase. Während der Annäherung der Fokusposition an die Membran wurde zunächst ein Plasmaleuchten detektiert, das einher ging mit einer leichten Depolarisation des Membranpotentials von wenigen Millivolt und einem kleinen Stromfluss von bis zu -1 nA. Dabei wurde keine Blasenentwicklung und keine Aufnahme des im extrazellulären Raum befindlichen PI detektiert. Dennoch weist der Stromfluss auf eine Permeabilisierung der Membran hin, die zusätzlich durch den starken Ca^{2+} -Konzentrationsanstieg im kHz-Regime bestätigt wurde (siehe Abschnitt 4.4.2). Nach weiterer Annäherung wurde eine Gasblase erzeugt, die über das Streulichtsignal des Probenlasers detektiert wurde. Gleichzeitig wurde eine starke Depolarisation des Membranpotentials von durchschnittlich 10 mV und ein Stromfluss von $-0,2$ bis $-1,2$ nA beobachtet. In diesen Fällen wurde eine PI-Akkumulation in der Zelle detektiert. Ein solcher Verlauf trat nicht bei 40 kHz, selten bei 4 MHz und häufig bei 80 MHz auf, während das zuerst beschriebene Regime mit Plasmaleuchten, leichtem Stromfluss aber ohne Blasenenerzeugung bei allen Repetitionsraten auftrat. Die Korrelation zwischen Blasenenerzeugung, Membranpotentialänderung und Aufnahme von PI führt zu dem Ergebnis, dass eine durch den Laser verursachte Gasblase ein Indiz für die erfolgreiche Perforation der Zellmembran ist und hervorragend (schnell und ohne zusätzlichen Messaufwand) als Simultankontrolle im Hellfeldmikroskopie-Modus verwendet werden kann.

Die Transfektion von Stamm- oder Primärzellen ist eine Herausforderung, da diese sehr sensibel auf Schädigungen reagieren. Wie die in dieser Arbeit dargestellten Ergebnisse bezüglich der Nebenwirkungen auf dem molekularen Niveau zeigten, war das Schädigungspotential der laserbasierten Transfektion sehr gering und beispielsweise durch die Zugabe von geeigneten Adjuvantien weiter herabgesetzt werden. König et al. haben bereits humane Speicheldrüsen-Stammzellen erfolgreich transfiziert [Uch08], wobei es sich jedoch um eine etablierte Stammzelllinie handelt, die nicht die typische Sensitivität aufweist. Mit der Transfektion von primären DRG-Neuronen konnte in dieser Arbeit erstmals die erfolgreiche Anwendung dieser Methode an Primärzellen und damit die Sensitivität des Verfahrens gezeigt werden (siehe Abschnitt 5.3.2). Die Neuronen lagen in Mischkultur mit Gliazellen vor, die nicht transfiziert wurden. Aufgrund der Verwendung der auf die caninen Zellen abgestimmten DNA war die Effizienz der Transfektion sehr gering (12%). Eine bessere Effizienz ist zu erwarten, wenn die Zellen mit einem für Neuronen optimierten Vektorplasmid behandelt werden. Im Vergleich dazu brachten herkömmliche Verfahren eine unzureichende Effizienz und zusätzlich wurden mittels Elektroporation fast ausschließlich die Gliazellen transfiziert und nicht wie gewünscht die Neuronen. Eine weitergehende Studie bezüglich der Effizienz und Viabilität der Zellen in einem Ca^{2+} -freien Medium mit zusätzlichen Antioxidantien ist wünschenswert, um die Ergebnisse der molekularen Beeinflussung der fs-Laserstrahlung auf die Zellen in der Anwendung zu überprüfen.

Der maßgebliche Vorteil der hohen Sensitivität und Selektivität des fs-Laserverfahrens bringt die Einschränkung auf einen kleinen Durchsatz mit sich. Da die Grundlagen für eine Anwendung bezüglich der Parameter und der Reduzierung der Nebeneffekte mit dieser Arbeit gelegt sind, ist der nächste Entwicklungsschritt zu einer Automatisierung notwendig. Da jede Zelle einzeln anvisiert werden muss, würde die Transfektion einer großen Zellpopulation, ohne eine solche Automatisierung sehr lange dauern. Zwei mögliche Ansätze könnten für einen hohen Durchsatz weiterentwickelt werden. Die Nanopartikel-basierte und die Mikrofluidik-basierte Transfektion. Bei der Perforation in mikrofluidischen Kanälen können (nicht-adhärenente) Suspensionszellen im Durchfluss über einen Führungslaser (optische Pinzette) in die optimale Position relativ zum fs-Laserfokus gebracht werden und im Vorbeifließen bestrahlt werden. Dabei müssen Führungs- und fs-Laser so zueinander justiert sein, dass die Zellmembran in einem Punkt durch den fs-Laser perforiert wird. Die Durchflussgeschwindigkeit bestimmt dann die Einstrahldauer für die Permeabilisierung. Zusätzlich kann hier eine über den Führungslaser Sortierung erfolgen, so dass der Prozentsatz der transfizierten Zellen in der sortierten Probe zusätzlich erhöht wird. So könnten mehrere hundert Zellen pro Sekunde automatisch transfiziert werden. In Vorarbeiten zu

diesen Versuchen wurde bereits gezeigt, dass Suspensionszellen erfolgreich transfiziert werden können [Bra08]. Die Nanopartikel-basierte Perforation beruht auf plasmonischen Effekten an den Partikeln, die in der Nähe der Membran platziert wurden [Yao05, Yao08]. Die Positionierung der Nanopartikel auf der Membran der Zellen kann über eine Biokonjugation spezifiziert werden. Mit einer großflächigen Bestrahlung kann so ein hoher Durchsatz an gleichzeitig permeabilisierten Zellen erreicht werden und wie mit dem mikrofluidischen Aufbau ein großer Durchsatz erreicht werden.

Zusammenfassend konnte die Anwendung der laserbasierten Transfektion an Zelllinien sowie an primären Zellen sehr erfolgreich etabliert und das Verständnis des Ablaufs der Transfektion vertieft werden. Durch die Optimierung Laserparameter konnte eine Effizienz von 70% und eine Überlebenswahrscheinlichkeit von 90% erreicht werden (0,9 nJ, 40 ms, 90 kHz). Mit diesen Parametern wurden nicht nur etablierte Zelllinien, sondern auch sensible Primärzellen in Mischkultur selektiv transfiziert und die Funktionalität der DNA nachgewiesen. Darüber hinaus wurden neue Einblicke in die chemischen Nebenwirkungen der Zellchirurgie mittels fs-Laserpulsen erzielt. Die manipulierten Zellen waren auf dem molekularen Niveau durch die fs-Laserbestrahlung beeinflusst. Es konnte gezeigt werden, dass die Verwendung von kHz-Pulsen eine geringere Störung des Zellgleichgewichtes bezüglich der Produktion von ROS zur Folge hat, während die Ca^{2+} -Homöostase bei der Membranpermeabilisierung durch MHz-Pulszüge weniger beeinflusst wurde. Als wichtiges Ergebnis konnte gezeigt werden, dass die Nebenwirkungen auf dem molekularen Niveau durch die Zugabe von Adjuvantien und die Transfektion in geeigneten Medien vollständig unterdrückt werden konnten. Diese beiden Erkenntnisse stellen eine sehr gute und wichtige Möglichkeit dar, die Zellchirurgie mittels fs-Laserpulsen schonender und damit effizienter durchzuführen. Die zeitlichen Abläufe der Transfektion konnten auf einer Zeitskala von wenigen Millisekunden bis mehrere Tage eingeordnet werden sowie Einblicke in die Mechanismen der Transfektion gewonnen werden. Darüber hinaus wurde sogar eine Quantifizierung der eingebrachten DNA erreicht. Diese Kenntnisse sowie der Nachweis der entstehenden Gasblase als Kontrollsignal schafft die Möglichkeit, eine Effiziente und einfache Umsetzung der Methode mit dem Potential auf einen hohen Durchsatz zu entwickeln. Damit wurde die fs-Laser-basierte Transfektion mittels fs-Laserpulsen mit reduzierten Nebenwirkungen und hoher Effizienz etabliert, charakterisiert und optimiert.

Literaturverzeichnis

- [Alb02] ALBERTS B, JOHNSON A, LEWIS J, RAFF M, ROBERTS K, WALTER P, *Molecular Biology of the Cell*, Garland Science, 2002.
- [Aln96] ALNEMRI ES, LIVINGSTON DJ, NICHOLSON DW, SALVESEN G, THORNBERRY NA, WONG WW, YUAN J, Human ICE/CED-3 protease nomenclature, *Cell*, **87** (2): 171, 1996.
- [Alt08] ALTMANN S, LANGE S, POMMERENCKE J, ESCOBAR HM, BULLERDIECK J, NOLTE I, FREUND M, JUNGHANSS C, High Mobility Group Box 1-Protein expression in canine hematopoietic cells and influence on canine peripheral blood mononuclear cell proliferative activity, *Vet Immunol Immunop*, **126**(3-4): 367–72, 2008.
- [Arn07] ARNOLD CL, HEISTERKAMP A, ERTMER W, LUBATSCHOWSKI H, Computational model for nonlinear plasma formation in high NA micromachining of transparent materials and biological cells, *Opt Express*, **15** (16): 10.303–10.317, 2007.
- [Bat02] BATANDIER C, FONTAINE E, KÉRIEL C, LEVERVE XM, Determination of mitochondrial reactive oxygen species: methodological aspects, *J Cell Mol Med*, **6** (2): 175–187, 2002.
- [Bau08] BAUMGART J, BINTIG W, NGEZAHAYO A, WILLENBROCK S, ESCOBAR HM, ERTMER W, LUBATSCHOWSKI H, HEISTERKAMP A, Quantified femtosecond laser based opto-perforation of living GFSHR-17 and MTH53 a cells, *Opt Express*, **16** (5): 3021–3031, 2008.
- [Ber98] BERRIDGE MJ, BOOTMAN MD, LIPP P, Calcium – a life and death signals, *Nature*, **395** (6703): 645–648, 1998.
- [Ber00] BERNS MW, WANG Z, DUNN A, WALLACE V, VENUGOPALAN V, Gene inactivation by multiphoton-targeted photochemistry, *Proc Natl Acad Sci USA*, **97** (17): 9504–9507, 2000.
- [Bev99] BEVERS EM, COMFURIUS P, DEKKERS DW, ZWAAL RF, Lipid translocation across the plasma membrane of mammalian cells, *Biochim Biophys Acta*, **1439** (3): 317–330, 1999.
- [Bir77] BIRNGRUBER R, HILLENKAMP F, STEFANI FH, GABEL VP, Q-switched ruby laser damage of the rabbit eye lens, *Adv Ophthalmol*, **34**: 158–163, 1977.
- [Bir83] BIRKY CW, Relaxed cellular controls and organelle heredity, *Science*, **222** (4623): 468–475, 1983.
- [Boe77a] BOERGEN KP, Blood vessel coagulation with the argon laser, *Fortschr Med*, **95** (38): 2297–2302, 1977.
- [Boe77b] BOERGEN KP, BIRNGRUBER R, GABEL VP, HILLENKAMP F, Intravital microscopic studies on the selective coagulation of small vessels by means of the argon laser, *Ber Zusammenkunft Dtsch Ophthalmol Ges*, **74**: 428–434, 1977.
- [Bor84] BORG D, SCHAICH K, Cyto-Toxicity From Coupled Redox Cycling of Autoxidizing Xenobiotics and Metals - A Selective Critical-Review and Commentary on Work-In-Progress, *Israel J Chem*, **24**: 38–53, 1984.

- [Bot07] BOTCHWAY SW, CRISOSTOMO AG, PARKER AW, BISBY RH, Near infrared multiphoton-induced generation and detection of hydroxyl radicals in a biochemical system, *Arch Biochem Biophys*, **464** (2): 314–321, 2007.
- [Bou86] BOULNOIS JL, Photophysical processes in recent medical laser developments: a review, *Lasers Med Sci*, **1** (1): 47–66, 1986.
- [Boy54] BOYER PD, FALCONE AB, HARRISON WH, Reversal and mechanism of oxidative phosphorylation, *Nature*, **174** (4426): 401–402, 1954.
- [Bra77] BRAND MD, LEHNINGER AL, H⁺/ATP ratio during ATP hydrolysis by mitochondria: modification of the chemiosmotic theory, *Proc Natl Acad Sci U S A*, **74** (5): 1955–1959, 1977.
- [Bra86] BRAKENHOFF GJ, VAN DER VOORT HT, VAN SPRONSEN EA, NANNINGA N, Three-dimensional imaging by confocal scanning fluorescence microscopy, *Ann N Y Acad Sci*, **483**: 405–415, 1986.
- [Bra88] BRAKENHOFF GJ, VAN DER VOORT HT, VAN SPRONSEN EA, NANNINGA N, 3-dimensional imaging of biological structures by high resolution confocal scanning laser microscopy, *Scanning Microsc*, **2** (1): 33–40, 1988.
- [Bra89] BRAKENHOFF GJ, VAN DER VOORT HT, VAN SPRONSEN EA, NANNINGA N, Three-dimensional imaging in fluorescence by confocal scanning microscopy, *J Microsc*, **153** (Pt 2): 151–159, 1989.
- [Bra08] BRAUN B, *Femtosekundenlaser basierende Transfektion mit Hilfe einer optischen Pinzette*, Diplomarbeit, Fakultät für Informations-, Medien- und Elektrotechnik, Fachhochschule Köln, 2008.
- [Bre85] BRETSCHER MS, The molecules of the cell membrane, *Sci Am*, **253** (4): 100–108, 1985.
- [Bre95] BRENNEN C, *Cavitation and Bubble dynamics*, Oxford University Press, New York, 1995.
- [Bro08] BROWN C, STEVENSON D, TSAMPOULA X, MCDUGALL C, LAGATSKY A, SIBBETT W, GUNN-MOORE F, DHOLAKIA K, Enhanced operation of femtosecond lasers and applications in cell transfection, *J Biophoton*, **1**: 183–199, 2008.
- [Bur68] BURNETT JP, HARRINGTON JA, Infectivity associated with Simian adenovirus type SA7 DNA, *Nature*, **220** (5173): 1245, 1968.
- [Bus90] BUSTIN M, LEHN DA, LANDSMAN D, Structural features of the HMG chromosomal proteins and their genes, *Biochim Biophys Acta*, **1049** (3): 231–243, 1990.
- [Bus99] BUSTIN M, Regulation of DNA-dependent activities by the functional motifs of the high-mobility-group chromosomal proteins, *Mol Cell Biol*, **19** (8): 5237–5246, 1999.
- [Cal06] CALLEGARI AJ, KELLY TJ, UV irradiation induces a postreplication DNA damage checkpoint, *Proc Natl Acad Sci USA*, **103** (43): 15.877–15.882, 2006.
- [Cap80] CAPPECHI M, High efficiency transformation by direct microinjection of DNA into cultured mammalian cells, *Cell*, **22**: 479–488, 1980.
- [Cen98] CENTONZE VE, WHITE JG, Multiphoton excitation provides optical sections from deeper within scattering specimens than confocal imaging., *Biophys J*, **75** (4): 2015–2024, 1998.
- [Cha52] CHANCE B, Spectra and reaction kinetics of respiratory pigments of homogenized and intact cells, *Nature*, **169** (4293): 215–221, 1952.
- [Cha55] CHANCE B, WILLIAMS GR, Respiratory enzymes in oxidative phosphorylation. IV. The respiratory chain, *J Biol Chem*, **217** (1): 429–438, 1955.
- [Cha84] CHAPMAN D, BENGA G, *Biological Membranes*, London: Academic Press, 1984, Kapitel Biomembrane fluidity - studies of model and natural membranes, Seiten 1–56.

- [Cha94] CHALFIE M, TU Y, EUSKIRCHEN G, WARD WW, PRASHER DC, Green fluorescent protein as a marker for gene expression, *Science*, **263** (5148): 802–805, 1994.
- [Che83] CHERNOMORDIK L, SUKHAREV S, ABIDOR L, CHIZMMADZHEV Y, Breakdown of lipid bilayer membranes in an electric field, *Biochimica et Biophysica Acta*, **736**: 203–213, 1983.
- [Che93] CHENG L, ZIEGELHOFFER PR, YANG NS, In vivo promoter activity and transgene expression in mammalian somatic tissues evaluated by using particle bombardment, *Proc Natl Acad Sci USA*, **90** (10): 4455–4459, 1993.
- [Chi04] CHIU SJ, UENO NT, LEE RJ, Tumor-targeted gene delivery via anti-HER2 antibody (trastuzumab, Herceptin) conjugated polyethylenimine, *J Control Release*, **97** (2): 357–369, 2004.
- [Chu06] CHUNG SH, CLARK DA, GABEL CV, MAZUR E, SAMUEL ADT, The role of the AFD neuron in *C. elegans* thermotaxis analyzed using femtosecond laser ablation, *BMC Neurosci*, **7**: 30, 2006.
- [Coh53] COHN M, A study of oxidative phosphorylation with O18-labeled inorganic phosphate, *J Biol Chem*, **201** (2): 735–750, 1953.
- [Con99] CONLON I, RAFF M, Size control in animal development, *Cell*, **96** (2): 235–244, 1999.
- [Cor02] CORY S, ADAMS JM, The Bcl2 family: regulators of the cellular life-or-death switch, *Nat Rev Cancer*, **2** (9): 647–656, 2002.
- [Cot08] COTTERILL R, *Biophysik*, Wiley-VCH, 2008.
- [Cox84] COX IJ, Scanning optical fluorescence microscopy, *J Microsc*, **133** (Pt 2): 149–154, 1984.
- [Cox94] COX LS, HUTCHISON CJ, Nuclear envelope assembly and disassembly, *Subcell Biochem*, **22**: 263–325, 1994.
- [Cra06] CRANFIELD C, BOMZON Z, DAY D, GU M, CARTMELL S, mechanical Strains Induced in Osteoblasts by Use of Point Femtosecond Laser Targeting, *Int J Biomed Imaging*, Article ID 21304: 1-6, 2006.
- [Day06] DAY D, CRANFIELD C, GUENTER M, High-speed fluorescence imaging and intensity profiling of femtosecond-induced calcium transients, *Int J Biomed Imaging*, Article ID 93438, 2006.
- [Den90] DENK W, STRICKLER JH, WEBB WW, Two-photon laser scanning fluorescence microscopy, *Science*, **248** (4951): 73–76, 1990.
- [Deu98] DEUTSCH JC, Ascorbic acid oxidation by hydrogen peroxide, *Anal Biochem*, **255** (1): 1–7, 1998.
- [Dev93] DEVAUX P, Lipid transmembrane asymmetry and flip-flop in biological membranes and in lipid bilayers, *Curr Opin Struct Biol*, **3**: 489–494, 1993.
- [Dic06] DICKINSON M, *Multiphoton and Multispectral Laser-scanning Microscopy*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2006, Kapitel 3, Seiten 83–104.
- [DKF08] DKFZ, Mircoinjektion, Technischer Bericht, <http://www.dkfz.de/de/transgen-service/Methoden/DNAMikroinjektion.html>, 07.11.2008.
- [Don06] DONG Z, SAIKUMAR P, WEINBERG JM, VENKATACHALAM MA, Calcium in cell injury and death, *Annu Rev Pathol*, **1**: 405–434, 2006.
- [Eic03] EICHLER J, EICHLER H, *Laser: Bauformen, Strahlführung, Anwendungen*, Springer, 2003.
- [Eis84] EISENBERG D, Three-dimensional structure of membrane and surface proteins, *Annu Rev Biochem*, **53**: 595–623, 1984.
- [Fah03] FAHRENKROG B, AEBI U, The nuclear pore complex: nucleocytoplasmic transport and beyond,

- Nat Rev Mol Cell Biol*, **4** (10): 757–766, 2003.
- [Fel72] FELDESH I, MOL'NAR I, GAAL V, The mechanism of transfection. Kinetics and nature of B. subtilis transfection by phage SP-50 desoxyribonucleic acid, *Mol Biol*, **5** (4): 419–430, 1972.
- [Fel87] FELGNER PL, GADEK TR, HOLM M, ROMAN R, CHAN HW, WENZ M, NORTHROP JP, RINGOLD GM, DANIELSEN M, Lipofection: a highly efficient, lipid-mediated DNA-transfection procedure, *Proc Natl Acad Sci USA*, **84** (21): 7413–7417, 1987.
- [Fel95] FELGNER PL, TSAI YJ, SUKHU L, WHEELER CJ, MANTHORPE M, MARSHALL J, CHENG SH, Improved cationic lipid formulations for in vivo gene therapy, *Ann N Y Acad Sci*, **772**: 126–139, 1995.
- [Fer99] FERSHT A, *Structure and Mechanism in Protein Science: A Guide to Enzyme Catalysis and Protein Folding*, W.H. Freeman and Company, 1999.
- [Foi93] FOISNER R, GERACE L, Integral membrane proteins of the nuclear envelope interact with lamins and chromosomes, and binding is modulated by mitotic phosphorylation, *Cell*, **73** (7): 1267–1279, 1993.
- [For84] FORK RL, MARTINEZ OE, GORDON JP, Negative dispersion using pairs of prisms, *Opt Lett*, **9** (5): 150–152, 1984.
- [Fox02] FOX AH, LAMOND AI, Nuclear processes controlled by molecular machines, *Genome Biol*, **3** (6): REPORTS 4016, 2002.
- [Fra80] FRALEY R, SUBRAMANI S, BERG P, PAPAHAADJOPOULOS D, Introduction of liposome-encapsulated SV40 DNA into cells, *J Biol Chem*, **255** (21): 10.431–10.435, 1980.
- [Gol43] GOLDMAN D, Potential, impedance, and rectification in membranes, *J Gen Physiol*, **27**: 37–60, 1943.
- [Gom07] GOMEZ-GODINEZ V, WAKIDA NM, DVORNIKOV AS, YOKOMORI K, BERNS MW, Recruitment of DNA damage recognition and repair pathway proteins following near-IR femtosecond laser irradiation of cells, *J Biomed Opt*, **12** (2): 020.505, 2007.
- [Goo73] GOODWIN GH, SANDERS C, JOHNS EW, A new group of chromatin-associated proteins with a high content of acidic and basic amino acids, *Eur J Biochem*, **38** (1): 14–19, 1973.
- [Goy01] GOYAL L, Cell death inhibition: keeping caspases in check, *Cell*, **104** (6): 805–808, 2001.
- [Gra73] GRAHAM FL, VAN DER EB AJ, A new technique for the assay of infectivity of human adenovirus 5 DNA, *Virology*, **52** (2): 456–467, 1973.
- [Gra77] GRAHAM FL, SMILEY J, RUSSELL WC, NAIRN R, Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5., *J Gen Virol*, **36** (1): 59–74, 1977.
- [Gra79a] GRAESSMANN A, GRAESSMANN M, MÜLLER C, Simian virus 40 and polyoma virus gene expression explored by the microinjection technique, *Curr Top Microbiol Immunol*, **87**: 1–21, 1979.
- [Gra79b] GRAESSMANN A, GRAESSMANN M, TOPP WC, BOTCHAN M, Retransformation of a simian virus 40 revertant cell line, which is resistant to viral and DNA infections, by microinjection of viral DNA, *J Virol*, **32** (3): 989–994, 1979.
- [Gre87a] GREEN H, BOLL J, PARRISH J, KOICHEVAR I, OSEROFF A, Cytotoxicity and mutagenicity of low intensity, 248- and 193-nm excimer laser radiation in mammalian cells, *Cancer Res*, **47**: 410–413, 1987.
- [Gre87b] GREEN H, MARGOLIS R, BOLL J, KOICHEVAR I, PARRISH J, OSEROFF A, Unscheduled DNA

- synthesis in human skin after *in vitro* ultraviolet-excimer laser ablation, *J Invest Dermatol*, **89**: 201–204, 1987.
- [Göp31] GÖPPERT-MAYER M, *Über Elementarakte mit zwei Quantensprüngen*, Dissertation, Universität Göttingen, 1931.
- [Ham81] HAMILL OP, MARTY A, NEHER E, SAKMANN B, SIGWORTH FJ, Improved patch-clamp techniques for high-resolution current recording from cells and cell-free membrane patches, *Pflugers Arch*, **391** (2): 85–100, 1981.
- [Har97] HARDER T, SIMONS K, Caveolae, DIGs, and the dynamics of sphingolipid-cholesterol microdomains, *Curr Opin Cell Biol*, **9** (4): 534–542, 1997.
- [Har04] HARRIS HE, ANDERSSON U, Mini-review: The nuclear protein HMGB1 as a proinflammatory mediator, *Eur J Immunol*, **34** (6): 1503–1512, 2004.
- [Hav70] HAVENDER WR, TRAUTNER TA, Genetic and transfection studies with B. subtilis phage SP50. II. Temperature sensitive mutants and the establishment of a linkage map, *Mol Gen Genet*, **108** (1): 61–69, 1970.
- [Hay96] HAYNES JR, McCABE DE, SWAIN WF, WIDERA G, FULLER JT, Particle-mediated nucleic acid immunization, *J Biotechnol*, **44** (1-3): 37–42, 1996.
- [Hei02] HEISTERKAMP A, RIPKEN T, MAMON T, DOMMER W, WELLING H, ERTMER W, LUBATSCHOWSKI H, Nonlinear side effects of fs pulses inside corneal tissue during photodisruption, *Appl Phys B*, **74** (4-5): 419–425, 2002.
- [Hei05a] HEISTERKAMP A, MAXWELL I, UNDERWOOD J, NICKERSON J, INGBER D, MAZUR E, Nanosurgery in live cells using ultrashort pulses, in: *Optical Interaction with Tissue and Cells XVI*, 2005.
- [Hei05b] HEISTERKAMP A, MAXWELL IZ, MAZUR E, UNDERWOOD JM, NICKERSON JA, KUMAR S, INGBER DE, Pulse energy dependence of subcellular dissection by femtosecond laser pulses, *Opt Express*, **13** (10): 3690–3696, 2005.
- [Hei07] HEISTERKAMP A, BAUMGART J, MAXWELL IZ, NGEZAHAYO A, MAZUR E, LUBATSCHOWSKI H, Fs-laser scissors for photobleaching, ablation in fixed samples and living cells, and studies of cell mechanics, *Methods Cell Biol*, **82**: 293–307, 2007.
- [Hig99] HIGGINS C, Membrane permeability transporters and channels: from disease to structure and back, *Curr Opin Cell Biol*, **11**: 495, 1999.
- [Hod52] HODGKIN AL, HUXLEY AF, Currents carried by sodium and potassium ions through the membrane of the giant axon of Loligo, *J Physiol*, **116** (4): 449–472, 1952.
- [Hog46] HOGBOOM G, CLAUDE A, HOTCHKISS R, The Distribution of Cytochrome Oxidase and Succinoxidase in the cytoplasm of the Mammalian Liver Cell, *J Biol Chem*, **165**: 615–629, 1946.
- [Hoh09] HOHENEGGER M, Calcium und Muskel, *Medizinische Universität Wien, Institut für Pharmakologie*, 2009.
- [Hut02] HUTCHISON CJ, Lamins: building blocks or regulators of gene expression?, *Nat Rev Mol Cell Biol*, **3** (11): 848–858, 2002.
- [Iwa06] IWANAGA S, SMITH N, FUJITA K, KAWATA S, Slow Ca²⁺ wave stimulation using low repetition rate femtosecond pulsed irradiation, *Opt Express*, **14**: 717–725, 2006.
- [Juh99] JUHASZ T, LOESEL F, HORVATH C, KURTZ R, BILLE J, MOUROU G, Corneal refractive Surgery with Femtosecond Lasers, *IEEE J Quantum Electron*, **5** (4): 902–910, 1999.

- [Jür98] JÜRGENSMEIER JM, XIE Z, DEVERAUX Q, ELLERBY L, BREDESEN D, REED JC, Bax directly induces release of cytochrome c from isolated mitochondria, *Proc Natl Acad Sci USA*, **95** (9): 4997–5002, 1998.
- [Kar05] KARP G, *Molekulare Zellbiologie*, Springer Berlin Heidelberg New York, 2005.
- [Kas97] KASPER A, *Erzeugung und Charakterisierung ultrakurzer Lichtpulse aus Titan:Saphir-Oszillatoren*, Dissertation, Max-Planck-Institut für Quantenoptik, Garching, 1997.
- [Ken49] KENNEDY EP, LEHNINGER AL, Oxidation of fatty acids and tricarboxylic acid cycle intermediates by isolated rat liver mitochondria, *J Biol Chem*, **179** (2): 957–972, 1949.
- [Ken97] KENNEDY PK, HAMMER DX, ROCKWELL B, Laser-induced breakdown in aqueous media, *Prog Quant Electr*, **21** (3): 155–248, 1997.
- [Ker72] KERR JF, WYLLIE AH, CURRIE AR, Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics, *Br J Cancer*, **26** (4): 239–257, 1972.
- [Kin79] KINOSHITA K, TSONG TY, Voltage-induced conductance in human erythrocyte membranes, *Biochim Biophys Acta*, **554** (2): 479–497, 1979.
- [Kle87] KLEIN T, WOLF E, WU R, SANFORD J, High-velocity microprojectiles for delivering nucleic acids into living cells, *Nature*, **327**: 70–73, 1987.
- [Kne99] KNEUBUEHL F, SIGRIST M, *Laser*, B.G. Teubener Stuttgart, 1999.
- [Koe99a] KOENIG K, BECKER TW, FISCHER P, RIEMANN I, HALBHUBER KJ, Pulse-length dependence of cellular response to intense near-infrared laser pulses in multiphoton microscopes, *Opt Lett*, **24** (2): 113–115, 1999.
- [Koe99b] KOESTER HJ, BAUR D, UHL R, HELL SW, Ca²⁺ fluorescence imaging with pico- and femtosecond two-photon excitation: signal and photodamage, *Biophys J*, **77** (4): 2226–2236, 1999.
- [Koe00] KOENIG K, Multiphoton microscopy in life sciences, *Journal of Microscopy*, **200**: 83–104, 2000.
- [Koe01a] KOENIG K, Human DNA is dissected with multiphoton scalpel, *Opto & Laser Europe*, **86**: 13, 2001.
- [Koe01b] KOENIG K, RIEMANN I, FRITZSCHE W, Nanodissection of human chromosomes with near-infrared femtosecond laser pulses, *Opt Lett*, **26** (11): 819–821, 2001.
- [Koh05] KOHLI V, ACKER JP, ELEZZABI AY, Reversible permeabilization using high-intensity femtosecond laser pulses: applications to biopreservation, *Biotechnol Bioeng*, **92** (7): 889–899, 2005.
- [Kop96] KOPF D, SPÜHLER J, WEINGARTEN K, KELLER U, Mode-locked laser cavities with a single prism for dispersion compensation, *Appl Opt*, **35**: 912–915, 1996.
- [Kre37] KREBS HA, JOHNSON WA, Metabolism of ketonic acids in animal tissues, *Biochem J*, **31** (4): 645–660, 1937.
- [Kum06] KUMAR S, MAXWELL IZ, HEISTERKAMP A, POLTE TR, LELE TP, SALANGA M, MAZUR E, INGBER DE, Viscoelastic retraction of single living stress fibers and its impact on cell shape, cytoskeletal organization, and extracellular matrix mechanics, *Biophys J*, **90** (10): 3762–3773, 2006.
- [Lam94] LAM M, DUBYAK G, CHEN L, NUÑEZ G, MIESFELD RL, DISTELHORST CW, Evidence that BCL-2 represses apoptosis by regulating endoplasmic reticulum-associated Ca²⁺ fluxes, *Proc Natl Acad Sci USA*, **91** (14): 6569–6573, 1994.

- [Lar52] LARDY HA, WELLMAN H, Oxidative phosphorylations; role of inorganic phosphate and acceptor systems in control of metabolic rates, *J Biol Chem*, **195** (1): 215–224, 1952.
- [Lar53] LARDY HA, WELLMAN H, The catalytic effect of 2,4-dinitrophenol on adenosinetriphosphate hydrolysis by cell particles and soluble enzymes, *J Biol Chem*, **201** (1): 357–370, 1953.
- [Las96] LASIC D, TEMPLETON N, Liposomes in gene therapy, *Adv Drug Deliver Rev*, **20**: 221–266, 1996.
- [Len07] LENG W, KELLEY AM, Hyper-Rayleigh and hyper-Raman scatterings with intermediate and two-photon resonances, *J Chem Phys*, **127** (16): 164.509, 2007.
- [Liu97] LIU X, DU D, MOUROU G, Laser ablation and micromachining with ultrashort laser pulses, *IEEE J Quantum Electron*, **33** (10): 1706–1716, 1997.
- [Lon70] LONG D, STANTON L, Studies of Nonlinear Phenomena. I. Theory of the Hyper Raman Effect, *Proceedings of the Royal Society of London, Series A, Mathematical and Physical Sciences*, **318**: 441–457, 1970.
- [Los97] LOS M, HERR I, FRIESEN C, FULDA S, SCHULZE-OSTHOFF K, DEBATIN KM, Cross-resistance of CD95- and drug-induced apoptosis as a consequence of deficient activation of caspases (ICE/Ced-3 proteases), *Blood*, **90** (8): 3118–3129, 1997.
- [Lot05] LOTZE MT, TRACEY KJ, High-mobility group box 1 protein (HMGB1): nuclear weapon in the immune arsenal, *Nat Rev Immunol*, **5** (4): 331–342, 2005.
- [Loy82] LOYTER A, SCANGOS GA, RUDDLE FH, Mechanisms of DNA uptake by mammalian cells: fate of exogenously added DNA monitored by the use of fluorescent dyes, *Proc Natl Acad Sci USA*, **79** (2): 422–426, 1982.
- [Lub00] LUBATSCHOWSKI H, MAATZ G, HEISTERKAMP A, HETZEL U, DROMMER W, WELLING H, ERTMER W, Application of ultrashort laser pulses for intrastromal refractive surgery, *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol*, **238** (1): 33–39, 2000.
- [Mar75] MARBURGER J, Self-focussing: Theory, *Prog Quant Electr*, **4**: 35–110, 1975.
- [Mar85] MARTONOSI A, *The Enzymes of Biological Membranes, Vol 3: Membrane Transport, 2nd edition*, New York: Plenum Press, 1985.
- [Mat02] MATSUMOTO B, *Methods in Cell Biology, Cell Biological Applications of Confocal Microscopy*, Academic Press, Volume 70, 2002.
- [Max06] MAXWELL IZ, *Application of femtosecond lasers for subcellular nanosurgery*, Dissertation, Harvard University, 2006.
- [McC68] MCCUTCHAN JH, PAGANO JS, Enhancement of the infectivity of simian virus 40 deoxyribonucleic acid with diethylaminoethyl-dextran, *J Natl Cancer Inst*, **41** (2): 351–357, 1968.
- [Men05] MENENDEZ P, BUENO C, WANG L, BHATIA M, Human embryonic stem cells: potential tool for achieving immunotolerance?, *Stem Cell Rev*, **1** (2): 151–158, 2005.
- [Moh03] MOHANTY SK, SHARMA M, GUPTA PK, Laser-assisted microinjection into targeted animal cells, *Biotechnol Lett*, **25** (11): 895–899, 2003.
- [Moz96] MOZHAYEVA MG, $[Ca^{2+}]_i$ elevation evoked by Ca^{2+} readdition to the medium after agonist-induced Ca^{2+} release can involve both IP_3 -, and ryanodine-sensitive Ca^{2+} release, *Pflugers Arch*, **433** (1-2): 180–187, 1996.
- [Moz98] MOZHAYEVA M, KISELYOV K, Involvement of Ca^{2+} -induced Ca^{2+} release in the biphasic Ca^{2+} response evoked by readdition of Ca^{2+} to the medium after UTP-induced store depletion in

- A431 cells, *Pflugers Arch - Eur J Physiol*, **435**: 859–864, 1998.
- [Mue78] MUELLER C, GRAESSMANN A, GRAESSMANN M, Mapping of early SV40-specific functions by microinjection of different early viral DNA fragments, *Cell*, **15** (2): 579–585, 1978.
- [Mur03] MURUA ESCOBAR H, MEYER B, RICHTER A, BECKER K, FLOHR AM, BULLERDIEK J, NOLTE I, Molecular characterization of the canine HMGB1, *Cytogenet Genome Res*, **101** (1): 33–38, 2003.
- [Mül04] MÜLLER S, RONFANI L, BIANCHI ME, Regulated expression and subcellular localization of HMGB1, a chromatin protein with a cytokine function, *J Intern Med*, **255** (3): 332–343, 2004.
- [Nar98] NARITA M, SHIMIZU S, ITO T, CHITTENDEN T, LUTZ RJ, MATSUDA H, TSUJIMOTO Y, Bax interacts with the permeability transition pore to induce permeability transition and cytochrome c release in isolated mitochondria, *Proc Natl Acad Sci USA*, **95** (25): 14.681–14.686, 1998.
- [Neh76] NEHER E, SAKMANN B, Noise analysis of drug induced voltage clamp currents in denervated frog muscle fibres, *J Physiol*, **258** (3): 705–729, 1976.
- [Neu89] NEUMANN E, SHOWERS A, JORDAN C (Hg.), *Electroporation and Electrofusion in Cell Biology*, Plenum, 1989.
- [New90] NEWPORT JW, WILSON KL, DUNPHY WG, A lamin-independent pathway for nuclear envelope assembly, *J Cell Biol*, **111** (6 Pt 1): 2247–2259, 1990.
- [Nic72] NICOLSON MO, MCALLISTER RM, Infectivity of human adenovirus-1 DNA, *Virology*, **48** (1): 14–21, 1972.
- [Nie03] NIEMINEN AL, Apoptosis and necrosis in health and disease: role of mitochondria, *Int Rev Cytol*, **224**: 29–55, 2003.
- [Nik82] NIKOGOSYAN DN, ANGELOV DA, ORAEVSKY AA, Determination of parameters of excited states of DNA and RNA bases by laser UV photolysis, *Photochem Photobiol*, **35** (5): 627–635, 1982.
- [Nik83] NIKOGOSYAN D, ORAEVSKY A, RUPASOV V, Two-Photon Ionization and Dissociation of Liquid Water by Powerful Laser UV Radiation, *Chem Phys*, **77**: 131–143, 1983.
- [Noa98] NOACK J, HAMMER DX, NOOJIN GD, ROCKWELL BA, VOGEL A, Influence of pulse duration on mechanical effects after laser-induced breakdown in water, *J Appl Phys*, **83** (12): 7488–7495, 1998.
- [Noa99] NOACK J, VOGEL A, Laser-induced plasma formation in water at nanosecond to femtosecond time scales: calculation of thresholds, absorption coefficients, and energy density, *IEEE J Quantum Electron*, **35** (8): 1156–1167, 1999.
- [Num96] NUMBERGER M, DRAGUHN A, *Patch-Clamp-Technik*, Spektrum Akademischer Verlag, 1996.
- [Ogu05] OGUURA R, MATSUO N, WAKO N, TANAKA T, ONO S, HIRATSUKA K, Multi-color luciferases as reporter for monitoring regulated gene expression in higher plants, *Plant Biotechnol J*, **22**: 151–155, 2005.
- [Orr03] ORRENIUS S, ZHIVOTOVSKY B, NICOTERA P, Regulation of cell death: the calcium-apoptosis link, *Nat Rev Mol Cell Biol*, **4** (7): 552–565, 2003.
- [Ott02] OTT M, ROBERTSON JD, GOGVADZE V, ZHIVOTOVSKY B, ORRENIUS S, Cytochrome c release from mitochondria proceeds by a two-step process, *Proc Natl Acad Sci USA*, **99** (3): 1259–1263, 2002.
- [Pal96] PALUMBO G, CARUSO M, CRESCENZI E, TECCE MF, ROBERTI G, COLASANTI A, Targeted

- gene transfer in eucaryotic cells by dye-assisted laser optoporation, *J Photochem Photobiol B*, **36** (1): 41–46, 1996.
- [Pal99] PALTAUF G, SCHMIDT-KLOIBER H, Photoacoustic cavitation in spherical and cylindrical absorbers, *Appl phys A mater sci process*, **68** (5): 525–531, 1999.
- [Pap00] PAPADOPOULUS S, JUERGENS K, GROS G, Protein Diffusion in Living Skeletal Muscle Fibers: Dependence on Protein Size, Fiber Type, and Contraction, *Biophys J*, **79**: 2084–2094, 2000.
- [Par66] PARSONS DF, WILLIAMS GR, CHANCE B, Characteristics of isolated and purified preparations of the outer and inner membranes of mitochondria, *Ann N Y Acad Sci*, **137** (2): 643–666, 1966.
- [Pat05] PATERSON L, AGATE B, COMRIE M, FERGUSON R, LAKE T, MORRIS J, CARRUTHERS A, BROWN C, SIBBETT W, BRYANT P, GUNN-MOORE F, RICHES A, DHOLAKIA K, Photoporation and cell transfection using a violet diode laser, *Opt Express*, **13**: 595–600, 2005.
- [Pen07] PENG C, PALAZZO RE, WILKE I, Laser intensity dependence of femtosecond near-infrared optoinjection, *Phys Rev E Stat Nonlin Soft Matter Phys*, **75** (4 Pt 1): 041.903, 2007.
- [Pey74a] PEYMAN GA, KOZIOL JE, SANDERS DR, VLCEK JK, Studies on intravitreal blood vessels. 3. Effectiveness of intraocular diathermy on blood vessel closure; a comparison with argon laser, *Invest Ophthalmol*, **13** (5): 369–376, 1974.
- [Pey74b] PEYMAN GA, KOZIOL JE, SANDERS DR, VLCEK JK, Studies on intravitreal blood vessels. II. Effectiveness of xenon arc and argon laser photocoagulation in blood vessel closure, *Invest Ophthalmol*, **13** (6): 441–454, 1974.
- [Pra92] PRASHER DC, ECKENRODE VK, WARD WW, PRENDERGAST FG, CORMIER MJ, Primary structure of the *Aequorea victoria* green-fluorescent protein, *Gene*, **111** (2): 229–233, 1992.
- [Pul84] PULIAFITO CA, STEINERT R, Short-Pulsed Nd:YAG Laser Microsurgery of the Eye: Biophysical Considerations, *IEEE J Quantum Electron*, **20**: 1442–1448, 1984.
- [Qiu96] QIU P, ZIEGELHOFFER P, SUN J, YANG NS, Gene gun delivery of mRNA in situ results in efficient transgene expression and genetic immunization, *Gene Ther*, **3** (3): 262–268, 1996.
- [Raf92] RAFF MC, Social controls on cell survival and cell death, *Nature*, **356** (6368): 397–400, 1992.
- [Ras89] RASMUSSEN R, HAMMER-WILSON M, BERNS M, Mutation and sister chromatid exchange induction in Chinese hamster ovary (CHO) cells by pulsed excimer laser radiation at 193 nm and 308 nm and continuous UV radiation at 254 nm, *Photochem Photobiol*, **49**: 413–418, 1989.
- [Ree99] REED JC, Dysregulation of apoptosis in cancer, *J Clin Oncol*, **17** (9): 2941–2953, 1999.
- [Res07] RESNIK ER, KECK M, SUKOVICH DJ, HERRON JM, CORNFELD DN, Chronic intrauterine pulmonary hypertension increases capacitance calcium entry in fetal pulmonary artery smooth muscle cells, *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, **292** (4): L953–L959, 2007.
- [Rey94] REYNOSO VS, BARBOSA L, ALVES O, ARANHA N, CESAR C, Preparation and characterization of heavy-metal oxide glasses: $Bi_2O_3 - PbO - B_2O_3 - GeO_2$ systems, *J Mater Chem*, **4**: 529–532, 1994.
- [Rip07] RIPKEN T, *Anwendung von MHz-fs-Lasern in der Ophthalmologie und Erarbeitung eines Therapiekonzeptes für die laserassistierte Behnadlung der Altersweitsichtigkeit*, Dissertation, Gottfried Wilhelm Leibniz Universität Hannover, 2007.
- [Sac91] SACCHI CA, Laser-induced electric breakdown in water, *J Opt Soc Am B*, **8** (2): 337, 1991.
- [San98] SANSOM MS, Models and simulations of ion channels and related membrane proteins, *Curr Opin Struct Biol*, **8** (2): 237–244, 1998.

- [Sar06] SARPE-TUDORAN C, ASSION A, WOLLENHAUPT M, WINTER M, BAUMERT T, Plasma dynamics of water breakdown at a water surface induced by femtosecond laser pulses, *Appl Phys Lett*, **88** (26): 261109, 2006.
- [Sau91] SAULIS G, VENSLAUSKAS M, NAKTINIS J, Kinetics of pore resealing in cell membranes after electroporation, *J Electroanal Chem, Bioelectrochem and Bioenergetics*, **26**: 1–13, 1991.
- [Sca02] SCAFFIDI P, MISTELI T, BIANCHI ME, Release of chromatin protein HMGB1 by necrotic cells triggers inflammation, *Nature*, **418** (6894): 191–195, 2002.
- [Sch49] SCHNEIDER WC, POTTER VR, Intracellular distribution of enzymes; the distribution of oxalacetic oxidase activity in rat liver and rat kidney fractions, *J Biol Chem*, **177** (2): 893–903, 1949.
- [Sch67] SCHNAITMAN C, ERWIN VG, GREENAWALT JW, The submitochondrial localization of monoamine oxidase. An enzymatic marker for the outer membrane of rat liver mitochondria, *J Cell Biol*, **32** (3): 719–735, 1967.
- [Sch01] SCHAFFER C, BRODEUR A, MAZUR E, Laser-induced breakdown and damage in bulk transparent materials induced by tightly focused femtosecond laser pulses, *Meas Sci Technol*, **12**: 1784–1794, 2001.
- [Sha95] SHARON N, LIS H, Lectins–proteins with a sweet tooth: functions in cell recognition, *Essays Biochem*, **30**: 59–75, 1995.
- [She82] SHEN YM, HIRSCHHORN RR, MERCER WE, SURMACZ E, TSUTSUI Y, SOPRANO KJ, BASERGA R, Gene transfer: DNA microinjection compared with DNA transfection with a very high efficiency, *Mol Cell Biol*, **2** (9): 1145–1154, 1982.
- [She05] SHEN N, DATTA D, SCHAFFER CB, LEDUC P, INGBER DE, MAZUR E, Ablation of cytoskeletal filaments and mitochondria in live cells using a femtosecond laser nanoscissor, *Mech Chem Biosyst*, **2** (1): 17–25, 2005.
- [Shi88] SHIGEKAWA K, DOWER WJ, Electroporation of eukaryotes and prokaryotes: a general approach to the introduction of macromolecules into cells, *Biotechniques*, **6** (8): 742–751, 1988.
- [Shi98] SHIMIZU S, EGUCHI Y, KAMIKE W, FUNAHASHI Y, MIGNON A, LACRONIQUE V, MATSUDA H, TSUJIMOTO Y, Bcl-2 prevents apoptotic mitochondrial dysfunction by regulating proton flux, *Proc Natl Acad Sci USA*, **95** (4): 1455–1459, 1998.
- [Shi05] SHIMADA T, WATANABE W, NATSUNAGA S, HIGASHI T, ISHII H, FUKUI K, ISOBE K, ITOH K, Intracellular disruption of mitochondria in a living HeLa cell with a 76-MHz femtosecond laser oscillator, *Opt Express*, **13**: 9869–9880, 2005.
- [Sie05] SIEGEL J, FERNÁNDEZ-NAVARRO J, GRACÍA-NAVARRO A, DIEZ-BLANCO V, SANZ O, SOLIS J, VEGA F, ARMENGOL J, Waveguide structures in heavy metal oxide glass written with femtosecond laser pulses above the critical self-focusing threshold, *Appl Phys Lett*, **86**: 121.109, 2005.
- [Sim97] SIMONS K, IKONEN E, Functional rafts in cell membranes., *Nature*, **387** (6633): 569–572, 1997.
- [Sla53] SLATER EC, Mechanism of phosphorylation in the respiratory chain, *Nature*, **172** (4387): 975–978, 1953.
- [Sla76] SLATER T, Minerva Medica, Torino, 1976, Seiten 99–108.
- [Sla84] SLATER TF, Free-radical mechanisms in tissue injury, *Biochem J*, **222** (1): 1–15, 1984.
- [Smi98] SMITHPETER CL, DUNN AK, WELCH AJ, RICHARDS-KORTUM R, Penetration depth limits of

- in vivo confocal reflectance imaging, *Appl Opt*, **37** (13): 2749–2754, 1998.
- [Smi01a] SMITH EDJ, MOORE SC, WADA N, CHUJO W, SAMPSON DD, Spectral Domain Interferometry for OCDR Using Non-Gaussian Broad-Band Sources, *IEEE PHOTONICS TECHNOLOGY LETTERS*, **13** (1): 64–66, 2001.
- [Smi01b] SMITH NI, FUJITA K, KANEKO T, KATOH K, NAKAMURA O, KAWATA S, TAKAMATSU T, Generation of calcium waves in living cells by pulsed-laser-induced photodisruption, *Applied Physics Letters*, **79** (8): 1208–1210, 2001.
- [Sot67] SOTTOCASA GL, KUYLENSTIERNA B, ERNSTER L, BERGSTRAND A, An electron-transport system associated with the outer membrane of liver mitochondria. A biochemical and morphological study, *J Cell Biol*, **32** (2): 415–438, 1967.
- [Ste90] STEIN W, *Channels, Carriers and Pumps: An Introduction to Membrane Transport*, San Diego: Academic Press, 1990.
- [Ste06] STEVENSON D, AGATE B, TSAMPOULA X, FISCHER P, BROWN CTA, SIBBETT W, RICHES A, GUNN-MOORE F, DHOLAKIA K, Femtosecond optical transfection of cells: viability and efficiency, *Opt Express*, **14** (16): 7125–7133, 2006.
- [Sti83] STICK R, SCHWARZ H, Disappearance and reformation of the nuclear lamina structure during specific stages of meiosis in oocytes, *Cell*, **33** (3): 949–958, 1983.
- [Sti03] STILWELL JL, MCCARTY DM, NEGISHI A, SUPERFINE R, SAMULSKI RJ, Development and characterization of novel empty adenovirus capsids and their impact on cellular gene expression, *J Virol*, **77** (23): 12.881–12.885, 2003.
- [Str69] STREIPS UN, WELKER NE, Infection of *Bacillus stearothermophilus* with bacteriophage deoxyribonucleic acid, *J Bacteriol*, **99** (1): 344–346, 1969.
- [Str85] STRICKLAND D, MOUROU G, Compression of amplified chirped optical pulses, *Opt Commun*, **56**: 219–221, 1985.
- [Str92] STROE-BLEZEN S, EVERAERTS F, JANSSEN L, TACKEN R, Diffusion coefficients of oxygen, hydrogen peroxide and glucose in a hydrogel, *Anal Chem Acta*, **273**: 553–560, 1992.
- [Sud02] SUDRIE L, COUAIRON A, FRANCO M, LAMOUREUX B, PRADE B, TZORTZAKIS S, MYSYROWICZ A, Femtosecond Laser-Induced Damage and Filamentary Propagation in Fused Silica, *Phys Rev Lett*, **89** (18): 186.601, 2002.
- [Swa56] SWANSON MA, Studies on the non-oxidative exchange between inorganic phosphate and ATP, as catalyzed by intact mitochondria, *Biochim Biophys Acta*, **20** (1): 85–91, 1956.
- [Tad03] TADOKORO T, KOBAYASHI N, ZMUDZKA BZ, ITO S, WAKAMATSU K, YAMAGUCHI Y, KOROSSY KS, MILLER SA, BEER JZ, HEARING VJ, UV-induced DNA damage and melanin content in human skin differing in racial/ethnic origin, *FASEB J*, **17** (9): 1177–1179, 2003.
- [Tao87] TAO W, WILKINSON J, STANBRIDGE EJ, BERNS MW, Direct gene transfer into human cultured cells facilitated by laser micropuncture of the cell membrane, *Proc Natl Acad Sci USA*, **84** (12): 4180–4184, 1987.
- [Tem02] TEMPLETON NS, Cationic liposome-mediated gene delivery in vivo, *Biosci Rep*, **22** (2): 283–295, 2002.
- [Ter65] TERHUNE RW, MAKER PD, SAVAGE CM, Measurements of Nonlinear Light Scattering, *Phys Rev Lett*, **14** (17): 681–684, 1965.
- [Ter04] TERAOKAWA M, OGURA M, SATO S, WAKISAKA H, ASHIDA H, UENOYAMA M, MASAKI Y,

- OBARA M, Gene transfer into mammalian cells by use of a nanosecond pulsed laser-induced stress waves, *Opt Lett*, **29** (11): 1227–1229, 2004.
- [Tho98] THORNBERRY NA, LAZEBNIK Y, Caspases: enemies within, *Science*, **281** (5381): 1312–1316, 1998.
- [Tie] <http://www.tier-guide.com/index.php?id=1033&wikiid=Zellmembran>.
- [Tir01a] TIRLAPUR UK, KÖNIG K, Femtosecond near-infrared laser pulse induced strand breaks in mammalian cells, *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)*, **47 Online Pub**: OL131–OL134, 2001.
- [Tir01b] TIRLAPUR UK, KÖNIG K, PEUCKERT C, KRIEG R, HALBHUBER KJ, Femtosecond near-infrared laser pulses elicit generation of reactive oxygen species in mammalian cells leading to apoptosis-like death, *Exp Cell Res*, **263** (1): 88–97, 2001.
- [Tir02] TIRLAPUR UK, KÖNIG K, Targeted transfection by femtosecond laser, *Nature*, **418** (6895): 290–291, 2002.
- [Tsa02] TSAI P, NISHIMURA N, YODER E, DOLNICK E, WHITE G, KLEINFELD D, *Principles, Design and Construction of a Two-Photon Laser-Scanning Microscope for In Vitro and In Vivo Brain Imaging*, CRC Press LLC, 2002, Kapitel In Vivo Optical Imaging of Brain Function.
- [Tsu84] TSUKAKOSHI M, KURATA S, NOMIYA Y, IKAWA Y, KASUYA T, A novel method of DNA transfection by laser microbeam cell surgery, *Appl Phys B: Lasers and Optics*, **35**: 135–140, 1984.
- [Tsu98] TSUJIMOTO Y, Role of Bcl-2 family proteins in apoptosis: apoptosomes or mitochondria?, *Genes Cells*, **3** (11): 697–707, 1998.
- [Tyr61] TYRRELL J, *Diffusion and Heat Flow in Liquids*, Butterworths, London, 1961.
- [Uch08] UCHUGONOVA A, KÖNIG K, BUECKLE R, ISEMANN A, TEMPEA G, Targeted transfection of stem cells with sub-20 femtosecond laser pulses., *Opt Express*, **16** (13): 9357–9364, 2008.
- [Vah65] VAHERI A, PAGANO JS, Infectious poliovirus RNA: a sensitive method of assay., *Virology*, **27** (3): 434–436, 1965.
- [Vel05] VELIGURA A, KOEHLER M, FRITZSCHE W, LYTVYN P, GORCHINSKY A, BUZANEVA E, UV induced ds(ss)-DNA damage: optical and electrical recognition, *BMC Plant Biology*, **5**, 2005.
- [Vog96] VOGEL A, NAHEN K, THEISEN D, NOACK J, Plasma formation in water by picosecond and nanosecond Nd:YAG laser pulses - part I: Optical breakdown at threshold and superthreshold irradiance, *IEEE J Quantum Electron*, **2** (4): 847–860, 1996.
- [Vog99a] VOGEL A, NAHEN K, THEISEN D, BIRNGRUBER R, THOMAS RJ, ROCKWELL BA, Influence of Optical Aberrations on Laser-Induced Plasma Formation in Water and their Consequences for Intraocular Photodisruption, *Appl Opt*, **38** (16): 3636–3643, 1999.
- [Vog99b] VOGEL A, NOACK J, NAHEN K, THEISEN D, BUSCH S, PARLITZ U, HAMMER D, NOOJIN G, ROCKWELL B, BIRNGRUBER R, Energy balance of optical breakdown in water at nanosecond to femtosecond time scales, *Appl Phys B*, **68** (2): 271–280, 1999.
- [Vog02] VOGEL A, NOACK J, HUETTMANN G, PALTAUF G, Femtosecond-laser-produced low-density plasmas in transparent biological media: a tool for the creation of chemical, thermal, and thermomechanical effects below the optical breakdown threshold, in: EDWARDS GS, NEEV J, OSTENDORF A, SUTHERLAND JC (Hg.), *Commercial and Biomedical Applications of Ultrafast and Free-Electron Lasers*, SPIE, 2002, Band 4633, Seiten 23–37.
- [Vog03] VOGEL A, VENUGOPALAN V, Mechanisms of pulsed laser ablation of biological tissues., *Chem*

- Rev*, **103** (2): 577–644, 2003.
- [Vog05] VOGEL A, NOACK J, HÜTTMAN G, PALTAUF G, Mechanisms of femtosecond laser nanosurgery of cells and tissues, *Applied Physics B: Lasers and Optics*, **81** (8): 1015–1047, 2005.
- [Vog08] VOGEL A, LINZ N, FREIDANK S, PALTAUF G, Femtosecond-Laser-Induced Nanocavitation in Water: Implications for Optical Breakdown Threshold and Cell Surgery, *Physical Review Letters*, **100** (3): 038102, 2008.
- [Wae] WAESCH R, Zellzyklusregulation, die Bedeutung der Anaphase-Promoting-Komplex (APC)-abhängigen Proteolyse von Regulatoren des Zellteilungszyklus in normalen und malignen humanen Zellen, medizinische Universitätsklinik Freiburg, Innere Medizin I.
- [Wag90] WAGNER E, ZENKE M, COTTEN M, BEUG H, BIRNSTIEL ML, Transferrin-polycation conjugates as carriers for DNA uptake into cells., *Proc Natl Acad Sci U S A*, **87** (9): 3410–3414, 1990.
- [Wal00] WALTHER W, STEIN U, Viral vectors for gene transfer: a review of their use in the treatment of human diseases., *Drugs*, **60** (2): 249–271, 2000.
- [Wan05] WANG M, The Measurement of Ocular Accommodation in Pseudophakia, *Cataract & Refractive Surgery Today*, Seiten 30–32, 2005.
- [War68] WARDEN D, THORNE HV, The infectivity of polyoma virus DNA for mouse embryo cells in the presence of diethylaminoethyl-dextran., *J Gen Virol*, **3** (3): 371–377, 1968.
- [War96] WARREN G, WICKNER W, Organelle inheritance., *Cell*, **84** (3): 395–400, 1996.
- [Wat04] WATANABE W, ARAKAWA N, MATSUNAGA S, HIGASHI T, FUKUI K, ISOBE K, ITOH K, Femtosecond laser disruption of subcellular organelles in a living cell, *Opt Express*, **12** (18): 4203–4213, 2004.
- [Wea96] WEAVER J, CHIZMADZHEV Y, Theory of electroporation: a review, *Bioelectrochem Bioenerget*, **41**: 135–160, 1996.
- [Wil76] WILLIAMS F, VARMA S, HILLENUS S, Liquid water as a lone-pair amorphous semiconductor, *J Chem Phys*, **64**: 1549ff, 1976.
- [Wil79] WILSON T, PAPAHAJDOPOULOS D, TABER R, The introduction of poliovirus RNA into cells via lipid vesicles (liposomes)., *Cell*, **17** (1): 77–84, 1979.
- [Wil97] WILSON SP, SMITH LA, Addition of glycerol during DNA exposure enhances calcium phosphate transfection., *Anal Biochem*, **246** (1): 148–150, 1997.
- [Wol99] WOLD W, DORONIN K, TOTH K, KUPPUSWAMY M, LICHTENSTEIN D, TOLLEFSON A, Immune responses to adenoviruses: viral evasion mechanisms and their implications for the clinic, *Curr Opin Immunol*, **11**: 380–386, 1999.
- [Won82] WONG TK, NEUMANN E, Electric field mediated gene transfer., *Biochem Biophys Res Commun*, **107** (2): 584–587, 1982.
- [Yam07] YAMADA S, MARUYAMA I, HMGB1, a novel inflammatory cytokine., *Clin Chim Acta*, **375** (1-2): 36–42, 2007.
- [Yan90] YANG NS, BURKHOLDER J, ROBERTS B, MARTINELL B, MCCABE D, In vivo and in vitro gene transfer to mammalian somatic cells by particle bombardment., *Proc Natl Acad Sci USA*, **87** (24): 9568–9572, 1990.
- [Yan04] YANIK MF, CINAR H, CINAR HN, CHISHOLM AD, JIN Y, BEN-YAKAR A, Neurosurgery: functional regeneration after laser axotomy., *Nature*, **432** (7019): 822, 2004.
- [Yao05] YAO C, RAHMANZADEH R, ENDL E, ZHANG Z, GERDES J, HÜTTMANN G, Elevation of plasma

- membrane permeability by laser irradiation of selectively bound nanoparticles., *J Biomed Opt*, **10** (6): 064.012, 2005.
- [Yao08] YAO CP, ZHANG ZX, RAHMANZADEH R, HUETTMANN G, Laser-based gene transfection and gene therapy., *IEEE Trans Nanobioscience*, **7** (2): 111–119, 2008.
- [Ye90] YE GN, DANIELL H, SANFORD JC, Optimization of delivery of foreign DNA into higher-plant chloroplasts., *Plant Mol Biol*, **15** (6): 809–819, 1990.
- [Zat92] ZATLOUKAL K, WAGNER E, COTTEN M, PHILLIPS S, PLANK C, STEINLEIN P, CURIEL DT, BIRNSTIEL ML, Transferrinfection: a highly efficient way to express gene constructs in eukaryotic cells., *Ann N Y Acad Sci*, **660**: 136–153, 1992.
- [Zei07] ZEIRA E, MANEVITCH A, MANEVITCH Z, KEDAR E, GROPP M, DAUDI N, BARSUK R, HARATI M, YOTVAT H, TROILO PJ, GRIFFITHS TG, PACCHIONE SJ, RODEN DF, NIU Z, NUSSBAUM O, ZAMIR G, PAPO O, HEMO I, LEWIS A, GALUN E, Femtosecond laser: a new intradermal DNA delivery method for efficient, long-term gene expression and genetic immunization., *FASEB J*, **21** (13): 3522–3533, 2007.
- [Zen90] ZENKE M, STEINLEIN P, WAGNER E, COTTEN M, BEUG H, BIRNSTIEL ML, Receptor-mediated endocytosis of transferrin-polycation conjugates: an efficient way to introduce DNA into hematopoietic cells, *Proc Natl Acad Sci USA*, **87** (10): 3655–3659, 1990.

A Eigenschaften und Merkmale der Farbstoffe und Herstellung der Plasmide

Die Farbstoffe

Die im Folgenden vorgestellten Farbstoffe sind für die Färbung von lebenden Zellen geeignet.

ROS-Indikator CM-H₂DCFDA

Der ROS-Indikator CM-H₂DCFDA hat ein Molekulargewicht von $577,80 \frac{\text{g}}{\text{mol}}$. Das Maximum des Anregungsspektrums liegt bei 493 nm, das des Emissionsspektrums bei 525 nm. Der Anstieg einer ROS-Konzentration kann durch eine Fluoreszenzintensitätserhöhung detektiert werden. Die ROS, an die der Farbstoff bindet, sind nicht bekannt.

Ca²⁺-Indikator Fluo-4 AM

Der Calcium-Indikator Fluo-4 AM hat ein Molekulargewicht von $1096,95 \frac{\text{g}}{\text{mol}}$. Das Anregungsmaximum für die Fluoreszenz liegt bei 494 nm, das Emissionsmaximum bei 516 nm. Die Moleküle sind fluoreszent, sobald sie an Calcium binden. Eine Calciumkonzentrationsänderung wird über eine Fluoreszenzintensitätsänderung bestimmt.

Mitotracker Red FM

Das Molekulargewicht von Mitotracker Red FM ist $724,00 \frac{\text{g}}{\text{mol}}$, das Anregungsmaximum liegt bei 352 nm und das Emissionsmaximum bei 644 nm. Dieser Farbstoff färbt spezifisch die Mitochondrien einer Zelle.

Hoechst 33342

Das Molekulargewicht von Hoechst 33342 beträgt $615,99 \frac{\text{g}}{\text{mol}}$, das Anregungsmaximum bei 352 nm das Emissionsmaximum 461 nm. Hoechst 33342 färbt den Zellkern an, indem er sich an die Adenin-Thymin-Sequenzen bindet.

Lucifer Yellow

Lucifer Yellow hat das Anregungsmaximum bei einer Wellenlänge von 427 nm und das Emissionsmaximum bei 543 nm. Dieser Farbstoff färbt unabhängig von einer Bindung an spezifische Moleküle, jedoch ist die Zellmembran impermeabel für die Moleküle.

Propidium Jodid

Das Maximum des Anregungsspektrums liegt bei 304 nm, das für die Emission bei 519 nm. Die Zellmembran ist für Propidium Jodid (PI) Moleküle impermeabel. PI ist fluoreszent, sobald es an DNA oder RNA bindet. Dieser Farbstoff wird üblicherweise zum Nachweis von Nekrose genutzt, wobei er den Zellkern färbt.

Annexin V FITC-Konjugat

Das Anregungsmaximum von FITC liegt bei 494 nm, das Emissionsmaximum bei 519 nm. Das Annexin bindet spezifisch an Serin, welches sich an der Membrannenseite der Zellen befindet. Da die Membran für diese Farbstoffmoleküle impermeabel ist, können diese nur im Falle einer Membranstülpung oder einer Permeabilisierung der Zellmembran an das Serin binden. Annexin wird üblicherweise in Kombination mit Propidium Jodid als Apoptose bzw. Nekrose Nachweis genutzt. Im Falle von Apoptose wird die Zelle zunächst Annexin-positiv (fluoreszierende Membran) und zu einem späteren Zeitpunkt PI-positiv, während Nekrose charakterisiert ist von sofortiger Aufnahme von PI.

Rekombinante und nicht-rekombinante GFP-Plasmide

Die proteinkodierende Sequenz des caninen HMGB1 Gens (acc. nos. AY135519, AF281043, U51677) wurde über PCR¹ an MTH53a cDNA mit den HMGB1 genspezifischen Primerpaaren²

¹PCR, Polymerase Chain Reaction, Polymerase-Kettenreaktion, ist eine Methode zur Vervielfältigung von DNA in vitro. Dazu wird das Enzym DNA-Polymerase verwendet.

²Primer sind Oligonukleotide, die als Startpunkt für DNA-replizierende Enzyme dienen.

(5' AGCTCCATAGAGACAGCACC-3'/5'-TCTTCCTCCTCCTCCTCATCC-3' und 5' AGG CCTCTTGGGTGCATT-3'/5'-AGTATCATCCAGGACTCAGAT-3') amplifiziert .

Das PCR-Produkt wurde in einem 1,5% Agarosegel aufgetrennt und über ein QIAquick Gel Extraction Kit (*QIAGEN*) aus dem Gel wieder aufgereinigt. Anschließend wurde es in das pGEM-T Easy Vector System (*Promega*) kloniert und zur Verifizierung sequenziert. Dann wurde eine Adapterprimer-PCR (Primerpaar: 5'-CGGAATTCACCATGGGCAAAGGAGA-3'/5'-GCGGTACCTTATTCATC ATCATC- 3') durchgeführt um die Restriktionsstellen³ *EcoRI* und *KPN1* anzuhängen. Dies ermöglicht später ein gerichtetes Klonen der HMGB1-proteinkodierenden Sequenz in den pEGFP-C1 Vektor unter Verwendung des verifizierten HMGB1-pGEM-T Easy Klons als Matrize. Nach der gerichteten Klonierung wurde der rekombinante pEGFP-C1-HMGB1 Vektor über Standardmethoden amplifiziert und für die Verifizierung sequenziert.

Das Anregungsmaximum von GFP liegt bei 488 nm, das Emissionsmaximum bei 508 nm.

³Restriktionsenzyme schneiden die DNA innerhalb einer Sequenz an bestimmten Restriktionsstellen.

B Präparation der Zellen

Kultivierung und Färbung der Rinder Aorta Endothelzellen

Die Rinder Endothelzellen wurden in RPMI 1640 (Roswell Park Memorial Institute) Zellmedium inkubiert, das mit 10% fetalem Kälberserum (FCS) und den Antibiotika Penicillin, Streptomycin und Patricin angereichert ist, bei 5% CO₂ inkubiert. Während der Experimente befanden sich die Zellen in NaCl-Medium.

Für die Färbung der Mitochondrien wurden die Zellen zunächst 40 Minuten mit 700 nM MitoTracker[®] Red (*Invitrogen*) in NaCl-Medium inkubiert. Das NaCl-Medium enthält in mM: 121 NaCl, 5 KCl, 0,8 MgCl₂, 1,8 CaCl₂, 6 NaHCO₃, 5,5 Glucose, 25 HEPES, pH 7,4 und eine Osmolarität von 295 ± 5. Nach der Färbung wurden die Zellen ein Mal mit NaCl-Medium gewaschen.

Für die Färbung mit dem ROS-Indikator wurden die Zellen 20 Minuten in 10 µM CM-H₂DCFDA (*Invitrogen*, Karlsruhe) in NaCl-Medium inkubiert. Anschließend wurden die Zellen ein Mal mit NaCl-Medium gewaschen.

Die Membranfärbung wurde mit FM4-64 (*Invitrogen*, Karlsruhe) durchgeführt. Dafür wurden die Zellen für 10 Minuten in 20 µM FM4-64 in NaCl-Medium inkubiert. Nach dieser Inkubationszeit wurden die Zellen ein Mal mit NaCl-Medium gewaschen.

Die Ca²⁺-Färbung wurde mit Fluo-4 (*Invitrogen*, Karlsruhe) realisiert. Die Zellen wurden 60 Minuten lang in 8 µM Fluo-4 in NaCl-Medium inkubiert und anschließend ein Mal mit NaCl-Medium gewaschen.

Kultivierung und Färbung der Granulosazellen

Die GFSHR-17 Granulosazellen der Ratte wurden auf Deckgläschen in DMEM 8900 (Dulbecco's Modified Eagle Medium) mit 5% FCS und den Antibiotika Penicillin, Streptomycin und Partricin

inkubiert. Für die Lasermanipulation wurde das Deckgläschen mit den Zellen in eine Perfusions-Kammer gebracht mit 0,5 ml Phosphat Puffer Saline (PBS) und 1,5 μM Propidium Jodid.

Kultivierung und Präparation der MTH53a und ZMTH3 Zellen für die Transfektion

Die MTH53a und ZMTH3 Zellen wurden in Poly-L-lysine beschichteten Deckglas-Boden-Petrischalen (*MatTek Corp.*, Ashland, MA, USA) in M199 Medium (*Gibco*, Karlsruhe) mit 20% FCS und Penicillin und Streptomycin kultiviert. Die Transfektion wurde durchgeführt in 50 $\frac{\mu\text{g}}{\text{ml}}$ non-rekombinantem pEGFP-C1 Vektorplasmid (*BD Bioscience Clontech*, Franklin Lakes, NJ, USA) für eine Färbung der gesamten Zelle oder in 50 $\frac{\mu\text{g}}{\text{ml}}$ rekombinanten pEGFP-C1-*HMGA2* oder -*HMGB1* Plasmid für Kernspezifische Färbung. Nach der Transfektion wurden die Zellen ein Mal mit NaCl-Medium gewaschen und für 48 Stunden im Kulturmedium inkubiert.

Präparation der primären Neuronen

Die Präparation der DRG-Neuronen wurde nach dem Protokoll von Martin Kolzenburg aus London durchgeführt. Die verwendeten Mäuse waren Balbc Mäuse, die 12 Wochen alt waren.

Die Deckgläschen, auf denen die Zellen kultiviert wurden, sind mindestens 2 Stunden vor dem Ausplattieren mit Laminin und Poly-L-Lysin beschichtet worden. Für etwa 30 Minuten wurden 0,5 ml Papain Lösung und 4,5 ml papain-Aktivierungs-Lösung bei 37°C gemischt. Die DRG-Neuronen von balb/c Mäuse wurden in HBSS für 1 Minute bei 381 g zentrifugiert und der Überstand verworfen. Die Papain-Aktivato-Lösung wurde steril filtriert und hinzugefügt. Anschließend wurden die Zellen für 20 Minuten bei 37°C inkubiert, dabei gelegentlich geschüttelt. Während der Inkubation wurden 4 ml HBSS und 1 ml des Collagenase/Dispase Aliquots bei 37°C gemischt. Die Ganglien wurden für 1 Minute ebenfalls bei 381 g zentrifugiert, der Überstand verworfen und für 20 Minuten bei 37°C mit der Collagenase/Dispase-Mischung inkubiert und gelegentlich geschüttelt. Anschließend wurde erneut bei den gleichen Parametern zentrifugiert und der Überstand abgenommen.

Das Pellet wurde in 1 ml HBSS aufgenommen und resuspendiert, bis die Lösung milchig wurde. 1 ml Percoll und 4 ml komplettes L-15 Medium wurde mit der Zellsuspension überschichtet und ohne Bremse bei 381 g für 8 Minuten zentrifugiert. Dissoziierte Neuronen bildeten ein Pellet am Boden, der Überstand wurde vorsichtig abgesaugt.

Der verbliebene Percoll wurde durch Resuspension in 2 ml L15-Medium und Zentrifugation für 2 Minuten bei 1029 g entfernt. Die Waschlösung wurde abgesaugt und die Zellen in 250 µl F-12-Medium aufgenommen. Es wurden 10 µl der Zellsuspension in jede Glasboden-Petrischale gegeben, die mit Laminin beschichtet waren. Um ein Absetzen der Zellen zu ermöglichen, wurden sie für 2 Stunden im Brutschrank inkubiert, bevor 2 ml F-12-Medium mit NGF zugefügt wurden.

C Liste der Veröffentlichungen

- J. Baumgart, W. Bintig, A. Ngezahayo, S. Willenbrock, H. Murua Escobar, W. Ertmer, H. Lubatschowski, A. Heisterkamp, Quantified femtosecond laser based opto-perforation of living GFSHR-17 and MTH53a cells, *Opt. Express*, 16(5): 3021–3031 (2008)
- J. Baumgart, K. Küttemeyer, W. Bintig, A. Ngezahayo, W. Ertmer, H. Lubatschowski, A. Heisterkamp, Repetition rate dependency of reactive oxygen species formation during femtosecond laser based cell surgery (submitted)
- J. Baumgart, W. Bintig, A. Ngezahayo, S. Willenbrock, H. Murua Escobar, W. Ertmer, H. Lubatschowski, A. Heisterkamp, Quantified femtosecond laser based opto-perforation of living cells (submitted)
- K. Kuetemeyer, J. Baumgart, H. Lubatschowski, A. Heisterkamp, Repetition rate dependency of low density plasma effects during femtosecond laser based intrastromal surgery (submitted)
- M. Schomaker, J. Baumgart, H. Murua Escobar, J. Bullerdiek, I. Nolte, A. Ngezahayo, H. Lubatschowski, A. Heisterkamp, Nanoparticle mediated cell membrane perforation by femtosecond laser pulses (submitted)
- J. Baumgart, K. Küttemeyer, W. Bintig, A. Ngezahayo, W. Ertmer, H. Lubatschowski, A. Heisterkamp, Reactive oxygen species formation due to fs laser based intracellular cell surgery, *Proc. EOS Annual Meeting*, Paris (2008)
- M. Schomaker, J. Baumgart, H. Murua Escobar, J. Bullerdiek, I. Nolte, A. Ngezahayo, H. Lubatschowski, A. Heisterkamp, Plasmonic cell perforation with gold nanoparticles and femtosecond laser pulses, *Proc. EOS Annual Meeting*, Paris (2008)
- J. Baumgart, W. Bintig, A. Ngezahayo, S. Willenbrock, H. Murua Escobar, W. Ertmer, H. Lubatschowski, A. Heisterkamp, Quantified femtosecond laser based opto-perforation of living cells, *Proc. LPM 2008*, Quebec City (2008)

- J. Baumgart, K. Küttemeyer, W. Bintig, A. Ngezahayo, W. Ertmer, H. Lubatschowski, A. Heisterkamp, Investigation of reactive oxygen species formation in living cells during femtosecond laser based cell surgery, *Proc. SPIE Optical Interactions with Tissue and Cells XIX*, 6854, 68540O (2008)
- J. Baumgart, W. Bintig, A. Ngezahayo, W. Ertmer, H. Lubatschowski, A. Heisterkamp, Live cell opto-injection by femtosecond laser pulses, *Proc. SPIE, Optical Interactions with Tissue and Cells XVIII*, 6435, 643512 (2007)
- A. Heisterkamp, J. Baumgart, I.Z. Maxwell, A. Ngezahayo, E. Mazur, H. Lubatschowski, Fs-laser scissors for photobleaching, ablation in fixed samples and living cells, and studies of cell mechanics, *Methods Cell Biol.*, 82: 293–307 (2007)
- J. Baumgart, A. Heisterkamp, A. Ngezahayo, W. Ertmer, H. Lubatschowski, Multiphoton microscopy for cell surgery, *Proc. SPIE, Commercial and Biomedical Applications of Ultrafast Lasers I*, 6108, 271–278 (2006)
- J. Baumgart, A. Heisterkamp, A. Ngezahayo, W. Ertmer, H. Lubatschowski, Combined multiphoton imaging and cell surgery by femtosecond laser pulses, *Proc. DGaO*, ISSN: 1614–8436 (2006)
- J. Baumgart, A. Heisterkamp, A. Ngezahayo, W. Ertmer, H. Lubatschowski, Combined multiphoton microscopy and cell surgery by femtosecond laser pulses, *Proc. EOS Topical Meeting on Biophotonics and Biomedical Optics*, 34–35, ISBN-10: 3–00–019530–3 (2006)
- J. Baumgart, A. Heisterkamp, A. Ngezahayo, W. Ertmer, H. Lubatschowski, Combined multiphoton imaging and cell surgery by femtosecond laser pulses, *Europ. J. Cell Biol.*, 85S1:56, 99, ISSN 0171–9335 (2006)

Ein Teil der in dieser Arbeit vorgestellten Ergebnisse wurde aus Prioritätsgründen bereits veröffentlicht und ist in der Liste der Publikationen enthalten.

D Lebenslauf

Persönliche Daten

Name: Judith Baumgart
Geburtsdatum: 04. April, 1980
Geburtsort: Hannover, Deutschland
Staatsangehörigkeit: deutsch
Eltern: Gernot Baumgart, Oberstudienrat
Anna Eleonore Baumgart, geb. Werner, Fachpraxislehrerin
Familienstand: ledig

Ausbildung

Schulbildung: 07/1999 Abitur am Johannes-Kepler-Gymnasium, Garbsen
Hochschulstudium: 1999 - 2005 Studium der Physik, Universität Hannover
05/2004 - 06/2005 Diplomarbeit
08/2005 - 04/2009 Promotionsstudium Physik, Laser Zentrum Hannover e.V.
Auslandsaufenthalt: 09/2002 - 09/2003 Studium der Physik, Universität Claude Bernard Lyon I, Lyon, Frankreich

Beruflicher Werdegang

04/2002 - 07/2002 Hilfwissenschaftlicher Mitarbeiter an der Universität Hannover
seit 08/2005 Wissenschaftlicher Mitarbeiter am Laser Zentrum Hannover e.V.

Danksagung

In den folgenden Zeilen möchte ich mich bei all denen bedanken, die mich während meiner Promotion auf unterschiedlichste Weise unterstützt haben und die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben. Ohne sie hätte mir meine Promotionszeit nicht mit so viel Freude bereitet.

Herrn Prof. Dr. Alexander Heisterkamp danke ich für die Betreuung meiner Promotion und der damit verbundenen interessanten und vielversprechenden Aufgabenstellungen. Die offene Arbeitsatmosphäre und das freundschaftliche Miteinander in seiner Arbeitsgruppe trugen dazu bei, dass ich mich der täglichen Arbeit motiviert und mit viel Spaß widmen konnte.

Herrn Prof. Dr. Anaclet Ngezahayo gilt mein Dank für seine Unterstützung während meiner Promotion. Sein Optimismus und seine besonders positive Art motivierten mich immer wieder aufs Neue. Jede der “Bio-Nachhilfestunden für Dummies”, die die Durchführung meiner Arbeit mit Zellen erst ermöglichten, gab er mir das Gefühl, der Biologie ein Stück näher gekommen zu sein.

Für die Übernahme des Prüfungsvorsitzes bei der Disputation danke ich Herrn Prof. Dr. Herbert Pfnür.

Entscheidende Beiträge zu dieser Arbeit habe ich Willem Bintig, Kai Kütemeyer, Sabine Przemeczek, Benita Braun und Manuel Beckschebe am LZH sowie Dirk Jachowski und Sebastian Eckert aus dem Institut für Biomedizinische Optik in Lübeck zu verdanken. Ohne ihre hervorragende Arbeit wäre diese Arbeit zum jetzigen Zeitpunkt im Zweifelsfall noch nicht abgeschlossen. Besonderer Dank gilt Willem Bintig, der seine Fähigkeit als Bio-Lehrer mit einer Engelsgeduld bewiesen hat und mir stets mit Medien, Farbstoffen und Zellen ausgeholfen hat. Ebenso möchte ich Kai Kütemeyer hervorheben, der mit tatkräftiger Unterstützung im Labor und in zahlreichen Diskussionen wesentlich zum Reifen dieser Arbeit beigetragen hat.

Bei meinen Kollegen der Abteilung Biomedizinische Optik am LZH, die mich auf die eine oder andere Art unterstützt haben, möchte ich mich bedanken. Hervorheben möchte ich Dr. Silvia Schumacher, die mich seit Beginn meines Studiums begleitet hat und bei der ich immer ein offenes Ohr gefunden habe und deren Schulter ich oft in Anspruch genommen habe. Nicht zu vergessen seien meine Bürokollegen Markus Schomaker, Diego Fernando Ramirez und Dr. Alexander Krüger, die mich tatkräftig unterstützt und mir einen abwechslungsreichen Büroalltag beschert haben. Außerdem geht mein Dank für die gute Zusammenarbeit und die besonders vielen gemeinsam verbrachten Stunden abseits der Arbeit an die weiteren Kollegen und ehemaligen Kollegen der Abteilung. DANKE: Prof. Dr. Holger Lubatschowski, Dr. Cord Arnold, Peggy Menne, Dr. Tammo Ripken, Dr. Fabian Will, Henning Wisweh, Dr. Holger Ernst, Dr. Uwe

Oberheide, Ole Massow, Thomas Block, Kristitan Werelius und allen anderen Wegbegleitern.

Mein Dank gilt auch der gesamten Transregio-A2-Forschergruppe. Hervorheben möchte ich dabei Dr. Hugo Murua Escobar und Saskia Willenbrock, die mich stets mit "ihrer" DNA versorgt haben. Ich möchte mich auch für ihre Geduld bedanken, die sie bei den zahlreichen Bio-Fragestunden bewiesen haben. Ebenso gilt mein Dank Dr. Sandra Lange, die den Weg von Rostock nach Hannover inklusive Stammzellen nie gescheut hat.

Für die Organisation möglicher und unmöglicher Dinge möchte ich den Sekretariaten im Institut für Quantenoptik und am LZH mit Gunhild Faber, Silvia Gerber und Gabi Herold danken. Ebenso möchte ich den Kollegen aus der Verwaltung und der Werkstatt sowie dem Sicherheitsingenieur Thomas Püster danken.

Meinem Flötenquartett danke ich für die vielen schönen Proben und gemütlichen Stunden, bei denen ich gelegentlich die Anspannung der Promotion abbauen konnte. Danke Diana Fischer, Renate Heidbüchel und Karin Sell.

Großer Dank gebührt meinen Mitbewohnern und Freunden Frank von Malottki, Matthias Böse und Jarek Leszczynski, die mich besonders in stressigen Zeiten voll unterstützt haben und jederzeit für eine willkommene Ablenkung sorgen konnten.

Meiner Familie, die mich auf meinem bisherigen Lebensweg immer unterstützt und ermutigt hat, gilt ein ganz besonderer Dank.

Für die Ermunterung und Unterhaltung in zahlreichen Nacht- und Wochenendschichten, fürs Verständnis, für die vielen Bilder und ganz besonders fürs Da-sein: Danke Andrei!