

**Femtosekundenlaser-Manipulation
von Zellen und Gewebe
in der regenerativen Medizin**

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

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

von
Dipl.-Phys. Kai Küttemeyer
geboren am 07.04.1984 in Hannover

2011

Referent: Prof. Dr. Alexander Heisterkamp

Korreferent: Prof. Dr. Anaclet Ngezahayo

Tag der Promotion: 12.12.2011

Zusammenfassung

Die Entwicklung neuer Therapieansätze in der regenerativen Medizin ist von essentieller Bedeutung für die Reparatur geschädigten Gewebes. Das vielversprechende Tissue Engineering basiert auf der Herstellung artifiziellen Gewebes mit anschließender Kollagen-Quervernetzung zur Erhöhung der mechanischen Steifigkeit. In diesem Zusammenhang ist die Verwendung embryonaler Stammzellen nach einem somatischen Zellkerntransfer von hohem Interesse, der die mechanische E nukleation einer Oozyte beinhaltet. Im Gegensatz zu den konventionellen, invasiven Methoden führt die Fokussierung von Femtosekunden (fs)-Laserpulsen in biologische Medien zu einer minimal-invasiven Manipulation subzellulärer Strukturen auf der Basis nichtlinearer Absorption. Im sogenannten Low-Density-Plasma-Regime wird durch die nichtlineare Wechselwirkung eine chemische Dissektion des biologischen Materials mit einer Präzision im Nanometerbereich erzielt. Jedoch sind die zugrunde liegenden Wechselwirkungs-Mechanismen experimentell noch weitgehend ungeklärt.

Ziel dieser Arbeit war die experimentelle Charakterisierung der fundamentalen chemischen und thermischen Effekte im Low-Density-Plasma-Regime auf subzellulärer Ebene. Darüber hinaus wurde das Anwendungspotential der fs-Lasermanipulation zur Kollagen-Quervernetzung artifiziellen Gewebes und zur Laser-E nukleation evaluiert.

Die Laserbestrahlung von Hoechst-gefärbten Zellkernen führte zur Entstehung freier Elektronen und Radikale, welche innerhalb weniger Nanosekunden mit umliegenden Molekülen reagierten. Dabei ergab sich eine Abgrenzung der Mechanismen von Photobleichung und Dissektion. Während die Hoechst-Photobleichung aus sequentiellen Einphotonenabsorptionen vom ersten angeregten Zustand resultierte, basierte die Dissektion überwiegend auf der Multiphotonenionisation der Fluorophore aus dem Grundzustand.

Oberhalb einer von der Bestrahlungszeit abhängigen Schwellenfluenz wurde durch die Akkumulation thermischer Energie im fokalen Volumen eine langlebige Gasblase erzeugt. Dieser Indikator einer Membranperforation war für die effiziente Zellfusion nach einer Laserbestrahlung der Kontaktstelle nicht-adhärenter Zellen notwendig.

Die Dissektion der Metaphasenplatte porziner Oozyten hatte keine unmittelbaren Schädigungen des Zytoplasmas und der umliegenden Organellen zur Folge. Jedoch war das Entwicklungspotential Laser-enukleierter Oozyten gegenüber der mechanischen E nukleation deutlich verringert. Ursächlich hierfür war die Detektion von DNA-Schäden mit vermutlich folgender Einleitung der Apoptose durch das Zellzyklus-Kontrollsystem.

Das großflächige Abrastern Riboflavin-behandelter, artifizieller Gewebe ergab eine vom Kollagengehalt abhängige signifikante Versteifung. Dies wurde auf eine Zweiphotonenanregung des Photosensitizers Riboflavin zurückgeführt. Im Gegensatz zur UV-A-induzierten Kollagen-Quervernetzung blieben dabei die Zellvitalität und -funktionalität unbeeinflusst.

Zusammenfassend wurden in dieser experimentellen Arbeit erstmals alle physikalischen Grundlagen für eine selektive fs-Lasermanipulation subzellulärer Strukturen in dreidimensionalen, biologischen Medien geschaffen. Darauf aufbauend wurde das große Potential dieser Methode für therapeutische Anwendungen in der regenerativen Medizin aufgezeigt.

Schlagnvorte: Femtosekundenlaser, Multiphotonenmikroskopie, Nanochirurgie, Low-Density-Plasma, freie Radikale, somatischer Zellkerntransfer, Kollagen-Quervernetzung

Abstract

The development of new therapeutic approaches in the field of regenerative medicine is of key importance for repairing damaged tissue. Promising tissue engineering is based on the generation of artificial tissue followed by collagen cross-linking to increase the mechanical stiffness. In this context, the use of embryonic stem cells after somatic cell nuclear transfer is of particular interest which involves mechanical oocyte enucleation. In contrast to conventional, invasive methods, focusing femtosecond (fs) laser pulses into biological media leads to minimally-invasive manipulation of subcellular structures based on nonlinear absorption. In the so-called low-density plasma regime, the nonlinear interaction causes chemical dissection of biological material with nanometer precision. However, the fundamental interaction mechanisms in this regime are experimentally still widely unknown.

The aim of this study was to experimentally characterize the fundamental chemical and thermal effects in the low-density plasma regime at the subcellular level. Furthermore, the application potential of fs-laser manipulation for collagen cross-linking in artificial tissue and for laser-enucleation was evaluated.

Laser irradiation of Hoechst-stained cell nuclei caused the formation of free electrons and radicals which reacted with surrounding molecules within a few nanoseconds. At the same time, there was a distinction of the mechanisms between photobleaching and dissection. While Hoechst-photobleaching resulted from sequential single-photon absorptions out of the first excited state, dissection was predominantly based on multiphoton ionization of the fluorophores out of the ground state.

Above an irradiation time-dependent fluence threshold, a long-lasting gas bubble was produced in the focal volume by accumulation of thermal energy. This indicator of membrane perforation was necessary for efficient cell fusion after laser irradiation of the junction of non-adherent cells.

Dissection of the metaphase plate of porcine oocytes caused no immediate damage to the cytoplasm and surrounding organelles. However, the developmental potential of laser-enucleated oocytes was reduced compared to mechanical enucleation. The reason for this was the detection of DNA damage with probable subsequent initiation of apoptosis by the cell cycle control system.

Large-area scanning of riboflavin-treated, artificial tissue resulted in significant stiffening depending on the collagen concentration. This was attributed to two-photon excitation of the photosensitizer riboflavin. In contrast to UV-A-induced collagen cross-linking, cell viability and functionality were unaffected.

To conclude, in this work, the physical principles for selective fs-laser manipulation of subcellular structures in three-dimensional, biological media were developed for the first time. Based on these results, the great potential of this method for therapeutic applications in regenerative medicine was demonstrated.

Keywords: femtosecond laser, multiphoton microscopy, nanosurgery, low-density plasma, free radicals, somatic cell nuclear transfer, collagen cross-linking

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
1.1. Regenerative Medizin	1
1.2. Femtosekundenlaser-Manipulation	5
1.3. Zielsetzung und Inhalt dieser Arbeit	7
2. Grundlagen der Zytologie und Struktur des biologischen Gewebes	9
2.1. Tierische Zellen	9
2.1.1. Zellmembran und -fusion	10
2.1.2. Struktur der DNA im Zellkern	12
2.1.3. Phasen und Regulation des Zellzyklus	14
2.2. Zellschädigungen	16
2.2.1. DNA-Schäden	16
2.2.2. Doppelstrangbrüche	17
2.3. Biologisches Gewebe	19
2.3.1. Kollagengewebe	20
3. Wechselwirkung ultrakurzer Laserpulse mit biologischen Medien	23
3.1. Multiphotonenmikroskopie (MPM)	23
3.1.1. Multiphotonenanregung	24
3.1.2. Photobleichung	25
3.1.3. Zweiphotonenmikroskopie (2PM)	27
3.1.4. Experimentelle Umsetzung	28
3.1.5. Vorteile der 2PM gegenüber der konfokalen Mikroskopie	29
3.1.6. Zusammenfassung	31
3.2. Femtosekundenlaser-Nanochirurgie	31
3.2.1. Photoionisation	32
3.2.2. Kaskadenionisation	33
3.2.3. Zeitliche Dynamik der Plasmaerzeugung	34
3.2.4. Parameterregimes für die Nanochirurgie	36
3.2.5. Zusammenfassung	38
3.3. Low-Density-Plasma-Regime	39
3.3.1. Chemische Effekte	39
3.3.2. Thermische Effekte	40

4. Experimentelle Methoden zur MPM-gesteuerten Nanochirurgie	43
4.1. Experimenteller Aufbau	43
4.1.1. Femtosekunden-Lasersystem	43
4.1.2. Strahlmodulation	44
4.1.3. Scaneinheit und Mikroskop	46
4.2. Charakterisierung des experimentellen Aufbaus	48
4.2.1. Pulsdauer des Lasers	48
4.2.2. Zeit-Bandbreiten-Produkt	51
4.2.3. Optische Auflösung des Multiphotonenmikroskops	51
4.2.4. Bildfeldgröße und -homogenität	53
4.2.5. Zusammenfassung	55
5. Charakterisierung der Effekte im Low-Density-Plasma-Regime	57
5.1. Photobleichung höherer Ordnung	57
5.1.1. Anregungs- und Photobleichungsordnungen	58
5.1.2. Beeinflussung der intrazellulären Umgebung	59
5.1.3. Entstehung reaktiver Sauerstoffspezies	60
5.2. Intrazelluläre Dissektion	62
5.2.1. Abgrenzung von Photobleichung und Dissektion	62
5.2.2. Induktion von Doppelstrangbrüchen	63
5.2.3. Einfluss der Fluorophore und Laserparameter	65
5.3. Laser-induzierte Zellfusion	67
5.3.1. Einfluss der Laserparameter	69
5.3.2. Übertragbarkeit auf porzine 2-Zell-Embryonen	71
5.4. Zusammenfassung	74
6. Laserbildgebung und -manipulation in der regenerativen Medizin	77
6.1. MPM-gesteuerte Laser-Enukleation	77
6.1.1. Visualisierung und Dissektion der Metaphasenplatte	78
6.1.2. Parthenogenetische Entwicklung Laser-enukleierter Oozyten	81
6.1.3. Verwendung Laser-enukleierter Oozyten für den Kerntransfer	83
6.2. Zweiphotonen-induzierte Kollagen-Quervernetzung	85
6.2.1. Kollagen-Quervernetzung in artifiziellem Bindegewebe	87
6.2.2. Übertragbarkeit auf artifizielles Herzmuskelgewebe	87
6.2.3. Optimierung des experimentellen Protokolls	89
6.3. Zusammenfassung	91
7. Diskussion und Ausblick	93
7.1. Chemische Effekte im Low-Density-Plasma-Regime	93
7.2. Thermische Effekte im Low-Density-Plasma-Regime	97
7.3. MPM-gesteuerte Laser-Enukleation	99

7.4. Zweiphotonen-induzierte Kollagen-Quervernetzung	102
7.5. Fazit	104
Literaturverzeichnis	105
Anhang	127
A. Präparation der Zellen und Gewebe	127
A.1. Bovine Aorten-Endothelzellen und murine RAT1-Fibroblasten	127
A.2. Humane HL-60-Zellen	128
A.3. Porzine Oozyten und Embryonen	128
A.4. Murines, artifizielles Gewebe	129
B. Reproduktion von Säugetieren	131
B.1. Oozytenentwicklung	131
B.2. Frühe Embryonalentwicklung	131
B.3. Parthenogenetische Entwicklung	132
C. Gruppengeschwindigkeitsdispersion	133
D. Spannungs-Dehnungs-Diagramm	135
E. Liste der Publikationen	137
F. Lebenslauf	139

Abkürzungsverzeichnis

Bezeichnung	Beschreibung
2PM	Zweiphotonenmikroskopie
AOM	Akusto-optischer Modulator
DNA	Desoxyribonukleinsäure (<i>deoxyribonucleic acid</i>)
DSB	Doppelstrangbruch
FWHM	Volle Halbwertsbreite (<i>full width at half maximum</i>)
GVD	Gruppengeschwindigkeitsdispersion (<i>group velocity dispersion</i>)
MII	Metaphase II
MPM	Multiphotonenmikroskopie
mRNA	Boten-Ribonukleinsäure (<i>messenger ribonucleic acid</i>)
NA	Numerische Apertur
NIR	Nahes Infrarot
RF	Riboflavin
ROS	Reaktive Sauerstoffspezies (<i>reactive oxygen species</i>)
SCNT	Somatischer Zellkerntransfer (<i>somatic cell nuclear transfer</i>)
SHG	Erzeugung der zweiten Harmonischen (<i>second harmonic generation</i>)

1. Einleitung

Kardiovaskuläre Erkrankungen sind die häufigste Todesursache weltweit. Im Jahr 2004 starben geschätzte 17,1 Millionen Menschen an deren Folgen, was etwa 29 % der globalen Todesfälle entspricht. Davon ließen sich 7,2 Millionen auf eine koronare Herzkrankheit und 5,7 Millionen auf einen Schlaganfall mit nahezu gleicher Wahrscheinlichkeit für Frauen und Männer zurückführen [Wor11]. Die koronare Herzkrankheit entsteht durch eine Ablagerung von Blutfetten, Thromben und Bindegewebe in den Herz-versorgenden Blutgefäßen. Mit zunehmender Ablagerung verringert sich der Gefäßdurchmesser, so dass die Blut- und damit auch die Sauerstoffversorgung der Herzmuskulatur abnimmt. Bei vollständiger Verstopfung eines oder mehrerer Blutgefäße besteht die Gefahr eines Herzinfarkts [Cla03].

Wird der Blutfluss in den Gefäßen nach einem Herzinfarkt nicht unmittelbar wieder hergestellt, tritt der Zelltod von mehr als einer Milliarde Zellen in der betroffenen Region des Herzmuskels („Myokard“) auf [Bha10]. Da sich die kontrahierenden Herzmuskelzellen im adulten Herzen nicht teilen können und nur wenige adulte Stammzellen vorhanden sind, kann das geschädigte Gewebe vom Körper nicht repariert werden [Sui11]. Dies hat die Entstehung von Narbengewebe zur Folge, das nicht die kontraktile, mechanische sowie elektrische Eigenschaften des gesunden Herzmuskels besitzt und damit die Pumpfunktion des Herzens reduziert. Im Endstadium dieser sogenannten Herzinsuffizienz sterben durch die geringe Verfügbarkeit von Spenderorganen viele Patienten, während diese sich auf Wartelisten befinden [Jaw07]. Folglich ist die Erforschung alternativer Methoden zur Wiederherstellung der Pumpfunktion des Herzens von großer Bedeutung.

1.1. Regenerative Medizin

Die regenerative Medizin umfasst Therapieansätze für Patienten mit schweren Verletzungen oder chronischen Krankheiten, welche nicht von körpereigenen Mechanismen geheilt werden können, wie beispielsweise die koronare Herzkrankheit, Diabetes oder Osteoporose. In diesem Bereich hat sich in den letzten Jahren das sogenannte „Tissue Engineering“ entwickelt. Dieser interdisziplinäre Forschungszweig beinhaltet die Herstellung artifiziellen Gewebes und dessen Transplantation in den Patienten mit dem Ziel der vollständigen Regeneration von Struktur sowie Funktion des geschädigten Gewebes [Ata08].

Die Strategie des Tissue Engineering besteht in der Kombination eines dreidimensionalen Zellträgers aus Biopolymeren (z.B. Kollagen) mit spezialisierten Zellen und Wachstumsfaktoren [Jaw08]. Während der Polymer-Zellträger die Anlagerung und Proliferation der Zellen ermöglicht sowie dem artifiziellen Gewebe seine Struktur und mechanische Stabilität verleiht,

bestimmt die Zusammensetzung der Zellen die biologische Funktionalität des Gewebes. Nach der Transplantation initiiert das artifizielle Konstrukt die Geweberegeneration. Dazu sind eine Verbindung des Polymer-Zellträgers mit dem nativen Gewebe und eine Revascularisation für die Sauerstoffversorgung des Transplantats notwendig. Zusätzlich muss das Polymer mit einer Rate degradieren, die der Geweberegeneration entspricht [Bha10]. Zur Entwicklung funktionalen Gewebes ist eine Überstimmung der mechanischen sowie morphologischen Eigenschaften von artifiziellem und nativem Gewebe notwendig [Jaw08].

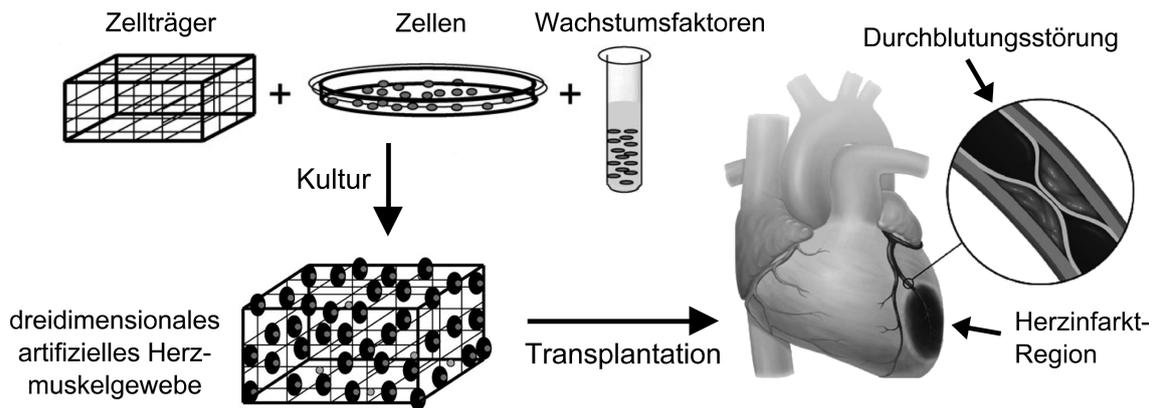


Abbildung 1.1.: Beim myokardialen Tissue Engineering wird artifizielles Herzmuskelgewebe aus einem Zellträger, spezialisierten Zellen und Wachstumsfaktoren hergestellt. Dies wird auf die Region des Herzinfarkts transplantiert, um eine Regeneration der Pumpfunktion des Herzens zu erreichen [Jaw08].

Myokardiales Tissue Engineering bietet die Möglichkeit zur Substitution des nicht-kontraktiven Narbengewebes nach einem Herzinfarkt (siehe Abbildung 1.1). Dazu wird das artifizielle Gewebe auf oder in die Infarktregion transplantiert. Zur erfolgreichen Wiederherstellung der Pumpfunktion des Herzens ist eine synchrone Kontraktion und damit ein elektrischer Kontakt mit dem nativen Gewebe notwendig. Außerdem muss die mechanische Steifigkeit des Polymer-Zellträgers hoch genug sein, um den bei einer kontinuierlichen Muskelkontraktion auftretenden Kräften zu widerstehen [Jaw08]. Verschiedene Arbeitsgruppen konnten im Säugetiermodell zeigen, dass die Transplantation von artifiziellem, myokardialem Gewebe zu einer Verbesserung der Pumpfunktion des Herzens nach einem induzierten Herzinfarkt führt [Zim00, Zim07, Kre11].

Die chemische Quervernetzung hat sich in den letzten Jahrzehnten als effiziente Methode zur Stabilisierung Kollagen-basierter Biomaterialien entwickelt, unter anderem für Herzklappen, Blutgefäße und die menschliche Kornea [McI75, Dar76, Wol03a]. Die Erhöhung der Gewebesteifigkeit wird im Allgemeinen entweder durch Aldehydreaktionen oder die UV-A-Bestrahlung lichtempfindlicher Moleküle („Photosensitizer“) erreicht. Dabei ist Riboflavin der am häufigsten verwendete Photosensitizer [Fra08]. Der positive Effekt auf

die mechanische Stabilität wird jedoch in beiden Verfahren vom apoptotischen Zelltod im behandelten Gebiet begleitet [Jay96, Wol04], welcher in der Kornea durch eine anschließende Repopulation mit lebenden Zellen aus umliegenden Bereichen kompensiert wird [Hel98]. Ferner bieten beide Verfahren keine Möglichkeit zur selektiven Quervernetzung beliebiger Strukturen in dreidimensionalen artifiziellen Gewebekonstrukten. Dies ist für den klinischen Erfolg des myokardialen Tissue Engineering unabdingbar, da natives myokardiales Gewebe eine intrinsische Anisotropie in seiner Struktur und Funktion besitzt [Zim11].

Zur Vermeidung immunologischer Abstoßungsreaktionen nach einer Transplantation von artifiziellem Gewebe ist die Verwendung körpereigener Zellen vorteilhaft [Ata08]. Embryonale Stammzellen stellen eine ideale Quelle für das Tissue Engineering dar, da diese unbegrenzt teilbar sind und in jeden Zelltyp eines Organismus differenziert werden können („Pluripotenz“). Allerdings enthält der adulte Körper keine embryonalen Stammzellen zur Isolation, so dass diese durch ein aufwendiges Verfahren, den sogenannten somatischen Zellkerntransfer (SCNT, *engl.: somatic cell nuclear transfer*), aus körpereigenen (somatischen) Zellen gewonnen werden müssen. Auf Grund der Verwendung menschlicher Embryonen ist der SCNT jedoch mit ethischen Problemen verbunden [Kar10]. Alternativ bietet die in den letzten Jahren etablierte direkte Reprogrammierung somatischer Zellen in einen pluripotenten Zustand („iPS-Zellen“) in naher Zukunft eventuell die Möglichkeit zur schnellen und ethisch unbedenklichen Gewinnung embryonaler Stammzellen [Tak07, Sid11].

Seit der Geburt von „Dolly“ im Jahr 1996 als erster Klon eines adulten Schafes durch SCNT [Wil97] wurde diese Technik auf eine Vielzahl von Säugetierspezies erfolgreich übertragen; unter anderem Rind, Ziege, Schwein und Pferd [Cib98, Bag99, Pol00, Gal03a]. Dabei ermöglicht die Verwendung genetisch modifizierter, somatischer Zellen die Generierung transgener Nachkommen für Applikationen in der Landwirtschaft und Biomedizin. Transgene Schweine werden beispielsweise durch ihre im Vergleich zum Menschen ähnliche Anatomie und Physiologie als geeignete Spender für eine Organtransplantation angesehen, wenn die für eine Abstoßungsreaktion verantwortlichen Gene ausgeschaltet sind [Kue04]. Diese sogenannte Xenotransplantation könnte in naher Zukunft zur Behebung des stetig zunehmenden Organmangels beitragen [Uni09].

Der SCNT umfasst mehrere Schritte (siehe Abbildung 1.2) [Edw03, Cam07a]. Zuerst wird die maternale Desoxyribonukleinsäure (DNA, *engl.: deoxyribonucleic acid*) einer Eizelle („Oozyte“), bestehend aus der Metaphasenplatte und dem Polkörper, mit einer Mikropipette abgesaugt; dieser Vorgang wird Eukleation genannt. In einem zweiten Schritt wird eine somatische Zelle unterhalb der Zona Pellucida so eng wie möglich an die Zellmembran injiziert. Danach werden beide Zellen durch elektrische Stimulation fusioniert, was eine epigenetische Reprogrammierung des somatischen Zellkerns in einen totipotenten Zustand zur Folge hat. Abschließend initiiert eine erneute elektrische Stimulation die embryonale Entwicklung. Für therapeutische Anwendungen wie das Tissue Engineering werden embryonale Stammzellen im Blastozystenstadium aus der inneren Zellmasse entnommen [Kar10].

Die invasive mechanische Eukleation erfordert ausgeprägte feinmotorische Fähigkeiten und viel Erfahrung [Ful04]. Um die Plasmamembran der Oozyte mit einer Mikropipette ohne

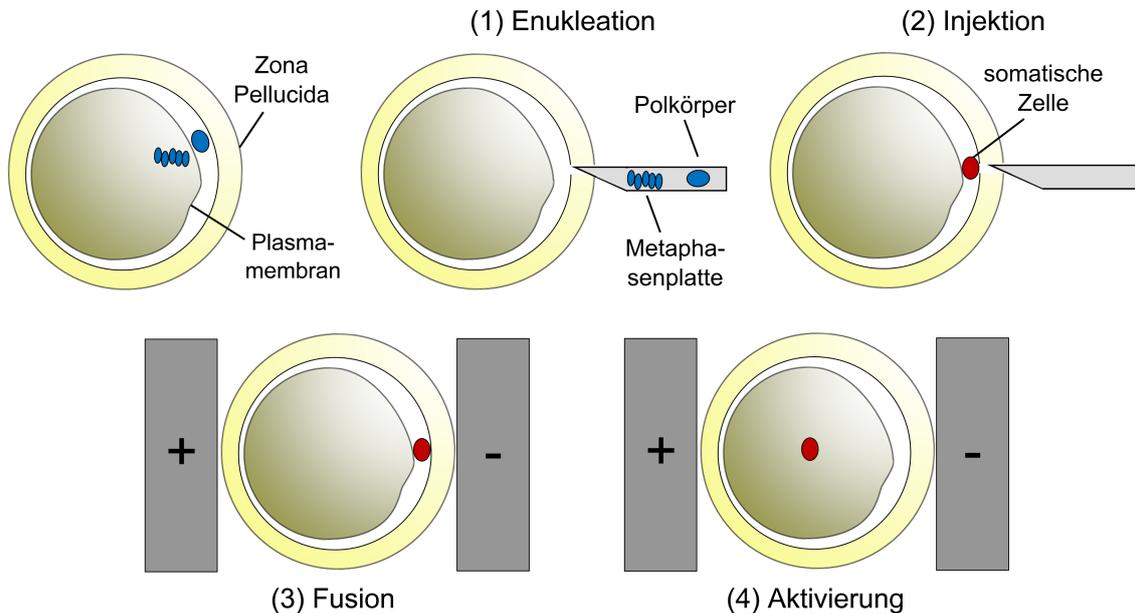


Abbildung 1.2.: Schematischer Ablauf des SCNT. Nach der Entfernung der DNA (Metaphasenplatte und Polkörper) einer Oozyte wird eine somatische Zelle injiziert und mit der Oozyte elektrisch fusioniert. Eine erneute elektrische Stimulation initiiert die embryonale Entwicklung.

irreparable Schädigungen zu durchdringen, muss die Oozyte vorher mit Cytochalasin B behandelt werden, was starke Änderungen am Zytoskelett verursacht [MF80, Ima02, Gal03b]. Die Markierung der DNA wird im Allgemeinen mit dem DNA-spezifischen Fluorophor Hoechst 33342 durchgeführt. Zur Lokalisierung der Metaphasenplatte vor deren mechanischer Entfernung wird die Oozyte für einen kurzen Zeitraum UV-A-Strahlung ausgesetzt, die mit hoher Wahrscheinlichkeit eine Schädigung der mitochondrialen DNA im Zytoplasma verursacht [Dom00]. Aus diesem Grund können langfristig schädigende Effekte nicht ausgeschlossen werden [Tsu88]. Während der Aspiration der Metaphasenplatte werden geringe Mengen des Zytoplasmas in unmittelbarer Umgebung entfernt, die wichtige Proteine für die Zellteilung enthalten. Dies hat eine signifikant negative Auswirkung auf die spätere embryonale Entwicklung [Sim03]. Zur Vermeidung der genannten Probleme sind neue Methoden für die Bildgebung und Eukleation von Oozyten notwendig.

Zusammenfassend bieten das Tissue Engineering und der SCNT in naher Zukunft die Möglichkeit, bei schweren Erkrankungen oder Verletzungen eine vollständige Regeneration von Struktur sowie Funktion des geschädigten Gewebes zu erreichen. Jedoch sind konventionelle Methoden in beiden Forschungsbereichen sehr invasiv. Zusätzlich haben diese einen geringen Durchsatz und sind durch viele manuelle Schritte personalintensiv. Daher ist die Entwicklung und Evaluation minimal-invasiver, automatisierter Verfahren für die regenerative Medizin von essentieller Bedeutung.

1.2. Femtosekundenlaser-Manipulation

Femtosekundenlaser (fs-Laser) sind ein exzellentes, minimal-invasives Werkzeug für die Bildung [Den90] und Manipulation biologischen Materials; letztere beinhaltet beispielsweise die Anregung von Photosensitizern sowie die Nanochirurgie [Koe99b, Tir02, Fre05]. Bei Verwendung nah-infraroter Wellenlängen im sogenannten *diagnostischen Fenster* beruht die Wechselwirkung auf nichtlinearen Prozessen, die auf das fokale Volumen beschränkt sind. Dies ermöglicht im Vergleich zu linearen Prozessen mit UV-Strahlung eine signifikant höhere Eindringtiefe bis zu einigen Millimetern [Koe00] und eine Reduktion der photochemischen Schädigungen [Squ99].

Wenn fs-Pulse mit einer hohen numerischen Apertur ($NA \geq 0,8$) in biologisches Material fokussiert werden, sind die Photonendichten oberhalb einer Intensitätsschwelle von etwa $10^{11} \frac{\text{W}}{\text{cm}^2}$ hoch genug, um nichtlineare Ionisationsprozesse im fokalen Volumen zu induzieren. Dabei ist der Energietransfer in die umliegenden Bereiche vernachlässigbar. Folglich treten außerhalb des fokalen Volumens keine thermischen oder mechanischen Schädigungen auf [Vog05]. Auf dieser Grundlage sind viele therapeutische Anwendungen auf subzellulärer Ebene entstanden, wie beispielsweise die Chromophor-assistierte Laserinaktivierung von Proteinen [Tan05], die Laser-induzierte Freisetzung chemischer Substanzen [Den90] und die Femtosekundenlaser-Nanochirurgie (fs-Nanochirurgie). Letztere umfasst unter anderem die intrazelluläre Dissektion [Koe99b] und die Laser-induzierte Zellfusion [Gon08].

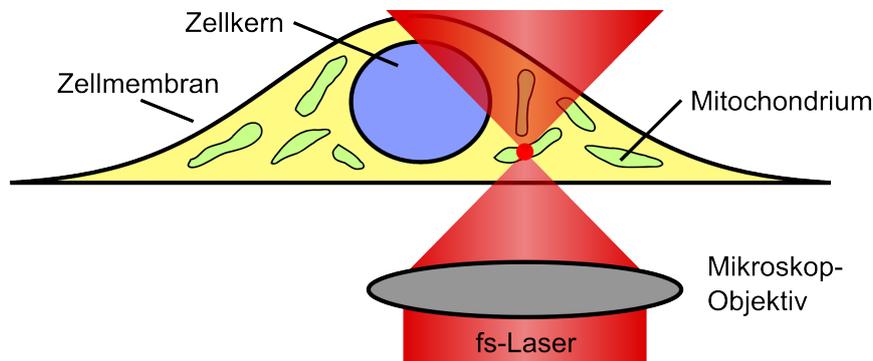


Abbildung 1.3.: Für die Nanochirurgie wird ein fs-Laser mit einem Mikroskop-Objektiv hoher numerischer Apertur auf eine subzelluläre Struktur fokussiert, wie beispielsweise ein Mitochondrium. Im Low-Density-Plasma-Regime führt die Akkumulation von chemischen Effekten über mehrere Pulse zur Dissektion des biologischen Materials im fokalen Volumen.

Seit der ersten Demonstration von König et al. im Jahr 1999 [Koe99b] hat sich die fs-Nanochirurgie als effiziente Methode zur Dissektion subzellulärer Strukturen etabliert (siehe Abbildung 1.3), sowohl *in vitro* [Koe01, Tir02, Wat04, Max05] als auch *in vivo* [Yan04, Sup05, Sac07, AM10]. Das Schneiden einzelner Aktinfasern ohne Beeinflussung benachbarter Strukturen erlaubt eine lokale Perturbation des Zytoskeletts [Hei05, Sac05].

Dies ist für das Verständnis der Organisation und Funktion des Zytoskeletts von großer Bedeutung und bietet vertiefte Kenntnisse über die Fortbewegung der Zelle, die Differenzierung sowie den programmierten Zelltod [Kum06]. Das selektive Ausschalten einzelner Mitochondrien wird zur Untersuchung ihres Einflusses auf die Energieproduktion, den Zelltod und das zelluläre Gleichgewicht verwendet [Wat04, Shi05]. *In vivo* ermöglicht das Schneiden der faserartigen Fortsätze einzelner Nervenzellen neue Erkenntnisse über ihre funktionale Regeneration im Organismus [Yan04]. Des Weiteren lassen sich damit verschiedene Modelle neurodegenerativer Erkrankungen erzeugen [Sac07, AM10]. Die selektive Ablation von Gewebe in Embryonen bietet einen Einblick in die komplexen Prozesse während der embryonalen Entwicklung [Sup05]. In all diesen Anwendungen ist der Kontrast zwischen subzellulären Strukturen im Allgemeinen sehr schwach, so dass die Zielstruktur mit Fluorophoren oder fluoreszenten Proteinen markiert werden muss. Aus diesem Grund wird die fs-Nanochirurgie häufig mit der konfokalen Mikroskopie oder Multiphotonenmikroskopie (MPM) kombiniert [Wat04, Shi05, Sac05, Kum06].

Für die MPM-gesteuerte Nanochirurgie wird überwiegend ein Titan:Saphir-Laser mit einer Repetitionsrate um 80 MHz und Pulsenergien im sogenannten „Low-Density-Plasma“-Regime verwendet [Sac05, Vog05, Sac07, AM10]. In diesem Regime induzieren freie Elektronen Bindungsbrüche und damit eine Zersetzung von Biomolekülen [Bou00, San05]. Darüber hinaus werden reaktive Sauerstoffspezies (ROS, *engl.: reactive oxygen species*) produziert, die sehr effizient die chemische Struktur von Biomolekülen modifizieren [Nik83, Hut85]. Die Akkumulation dieser Effekte über mehrere Pulse resultiert in einer chemischen Dissektion des biologischen Materials. Jedoch ist bis heute ungeklärt, auf welcher Zeitskala die photochemischen Prozesse in der zellulären Umgebung stattfinden. Für die Erzeugung von ROS in Wasser lassen sich diese in „schnelle“ und „langsame“ Reaktionen mit Zeitkonstanten im Nano- bzw. Millisekundenbereich aufteilen [Nik83]. Infolgedessen beeinflusst die Repetitionsrate des Lasers eventuell die Effizienz der intrazellulären Dissektion.

Obwohl Vogel et al. umfangreiche theoretische Arbeiten zum Verständnis der fundamentalen Mechanismen im Low-Density-Plasma-Regime durchgeführt haben, wurde in diesen Berechnungen Wasser als Modellsubstanz für biologische Medien verwendet [Vog05]. Der Einfluss von Fluorophoren und Biomolekülen wurde vernachlässigt. Jedoch haben verschiedene Experimente gezeigt, dass eine Behandlung biologischer Proben mit Fluorophoren die Effizienz der chemischen Dissektion signifikant erhöht [Koe01, Din07, Wil07]. Bei der Auswahl des Fluorophors sind ein möglichst hoher Multiphotonen-Absorptionsquerschnitt und eine geringe Wahrscheinlichkeit für die photoinduzierte Modifikation seiner chemischen Struktur mit anschließendem irreversiblen Verlust der Fluoreszenzfähigkeit („Photobleichung“) von entscheidender Bedeutung [Son95, Xu96]. Experimentelle Untersuchungen haben gezeigt, dass sich die Schwelle für die Photobleichung eines Fluorophors ungefähr 20 % unterhalb der Schwelle für die intrazelluläre Dissektion befindet [Hei05]. Dieser geringe Unterschied legt die Vermutung nahe, dass ähnliche Mechanismen bei der Photobleichung und der Dissektion von biologischem Material involviert sind.

Die fs-Laser-induzierte Zellfusion ist eine berührungslose Fusionsmethode und wird

durch eine fokussierte Bestrahlung der Kontaktstelle zweier aggregierender Zellen erreicht [Gon08]. Dabei sind die zugrunde liegenden Mechanismen bis heute ungeklärt. Gong et al. folgerten aus ihren Versuchsergebnissen, dass eine Perforation der Zellmembran nicht notwendig sei [Gon08], da die verwendeten Pulsenergien deutlich unterhalb der Schwelle für eine Laser-induzierte Membranperforation („Optoporation“) lagen [Tir02, Ste06, Bau08]. Dahingegen haben experimentelle Untersuchungen mit elektrischer Stimulation gezeigt, dass sowohl bei der Membranperforation als auch bei der Zellfusion eine Membranpore gebildet wird, wobei diese im Falle der Zellfusion deutlich größer ist [Zim82]. Die erfolgreiche Optoporation wird im Allgemeinen durch die Entstehung einer langlebigen Gasblase im fokalen Volumen mit einer Lebensdauer im Millisekunden- bis Sekundenbereich begleitet, was mit einem gewöhnlichen Lichtmikroskop beobachtet werden kann [Ste06, Bau08, Uch08b]. Folglich ist die Gasblasenentstehung ein geeignetes Kriterium, um die Notwendigkeit einer Membranperforation für die Zellfusion näher zu untersuchen.

Zusammenfassend ermöglichen fs-Laser eine nichtlineare Anregung von Photosensitizern sowie eine präzise, MPM-gesteuerte Nanochirurgie subzellulärer Strukturen in dreidimensionalen biologischen Proben mit einer Eindringtiefe von einigen Millimetern. Die fs-Nanochirurgie basiert auf einer chemischen Dissektion von Biomolekülen im fokalen Volumen, wobei keine chemischen, mechanischen und thermischen Schädigungen der umliegenden Bereiche auftreten. Folglich bieten fs-Laser ein enormes Potential für die minimal-invasive Quervernetzung von Proteinen der extrazellulären Matrix im Bereich des Tissue Engineering und die Dissektion der Oozyten-DNA („Laser-Enukleation“) bzw. die induzierte Zellfusion im Bereich des SCNT.

1.3. Zielsetzung und Inhalt dieser Arbeit

Ziel der vorliegenden Arbeit war die Realisierung und Evaluation der fs-Laser-Manipulation von Zellen sowie Gewebe für therapeutische Applikationen im Bereich der regenerativen Medizin. Dabei lag der Fokus auf dem SCNT und dem Tissue Engineering. Zudem wurden die Effekte des für die fs-Nanochirurgie verwendeten Low-Density-Plasma-Regimes auf subzellulärer Ebene charakterisiert.

Im folgenden Kapitel 2 wird zunächst in den Aufbau tierischer Zellen und die arbeitsrelevanten zellulären Prozesse eingeführt. Im Anschluss werden die Eigenschaften biologischen Gewebes und die Kollagen-Quervernetzung dargestellt.

Kapitel 3 vermittelt den aktuellen Stand der Forschung im Bereich der Propagation ultrakurzer Laserpulse in biologischen Medien. Insbesondere werden die grundlegenden Mechanismen der MPM und fs-Nanochirurgie erläutert.

In Kapitel 4 wird der experimentelle Aufbau zur MPM-gesteuerten Nanochirurgie ausführlich beschrieben. Zur Charakterisierung des Systems werden dessen wichtigste Parameter bestimmt und mit theoretischen Berechnungen sowie Simulationen verglichen.

Die experimentellen Ergebnisse zur Charakterisierung der Effekte im Low-Density-Plasma-

Regime werden in Kapitel 5 dargestellt. In diesem Zusammenhang werden die Mechanismen der Photobleichung sowie der intrazellulären Dissektion aufgeklärt und voneinander abgegrenzt. Ferner wird die Notwendigkeit einer Membranperforation für die Laser-induzierte Fusion anhand unterschiedlicher Zelltypen evaluiert.

Kapitel 6 beinhaltet experimentelle Studien zur MPM-gesteuerten Laser-Enukleation und zur Zweiphotonen-induzierten Kollagen-Quervernetzung. Das Potential dieser neuen Applikationen in der regenerativen Medizin wird im Säugetiermodell untersucht.

Abschließend erfolgen in Kapitel 7 eine Diskussion der in dieser Arbeit erzielten Ergebnisse sowie ein Ausblick auf zukünftige Arbeiten, vor allem hinsichtlich der Automatisierung und Effizienzsteigerung der entwickelten Applikationen.

2. Grundlagen der Zytologie und Struktur des biologischen Gewebes

Im Laufe der Evolution haben sich zwei grundlegend verschiedene Lebensformen entwickelt, die sich in der Struktur ihrer Zellen stark unterscheiden. Prokaryoten bestehen aus einfach gebauten Zellen ohne abgegrenzten Zellkern und umfassen Bakterien sowie Archaeen. Eukaryoten hingegen besitzen einen komplexen zellulären Aufbau mit einer hohen Diversität an intrazellulären Kompartimenten. Zu den Eukaryoten gehören Protisten, Fungi, Pflanzen und Tiere [Kar10]. Die im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Zellen und Gewebe stammen von Säugetieren, so dass im Folgenden die tierische Zelle ausführlich beschrieben wird. Zuerst wird deren grundlegender Aufbau mit den wichtigsten Bestandteilen und Mechanismen erläutert. Danach werden die durch exogene und endogene Quellen verursachten Zellschädigungen dargestellt. Abschließend wird die Struktur des biologischen Gewebes beschrieben und Methoden zur Erhöhung der Gewebesteifigkeit aufgezeigt.

2.1. Tierische Zellen

Tierische Zellen haben einen Durchmesser von 10 bis 30 μm und sind von ihrer Umgebung durch eine Zellmembran abgegrenzt, die eine selektiv permeable Barriere darstellt (siehe Abschnitt 2.1.1) [Kar10]. Der Aufbau tierischer Zellen ist sehr komplex (siehe Abbildung 2.1). Die genetische Information befindet sich im Zellkern, der vom Zytosol durch die Kernhülle getrennt ist (siehe Abschnitt 2.1.2). Das Zytoskelett besteht aus Filamenten, die das gesamte Zytoplasma durchkreuzen, und bildet zusammen mit vielen weiteren Proteinen ein strukturgebendes, aber dennoch flexibles und variables Zellgerüst. Dies verleiht der Zelle ihre Form sowie mechanische Stabilität und kontrolliert sowohl die Zellbewegung als auch den intrazellulären Transport von Organellen [Alb08].

Innerhalb des Zytoplasmas befindet sich neben dem Zellkern eine Vielzahl Membransumgeschlossener Organellen. Die Proteinbiosynthese findet an den Ribosomen statt, die sowohl im Zytoplasma als auch an der Membran des rauen endoplasmatischen Retikulums lokalisiert sind. Im endoplasmatischen Retikulum wird zusätzlich ein Großteil der Lipide hergestellt, die zusammen mit den Proteinen im Golgi-Apparat modifiziert und zu ihrem Bestimmungsort transportiert werden [Kar10]. Die Mitochondrien wandeln die Energie von Nährstoffmolekülen, unter anderem Zucker, durch Oxidation in Adenosintriphosphat um, das einen universellen Energieträger in tierischen Zellen darstellt. Außerdem besitzen Mitochondrien ihre eigene genetische Information und stimmen in ihrer Größe sowie Struktur

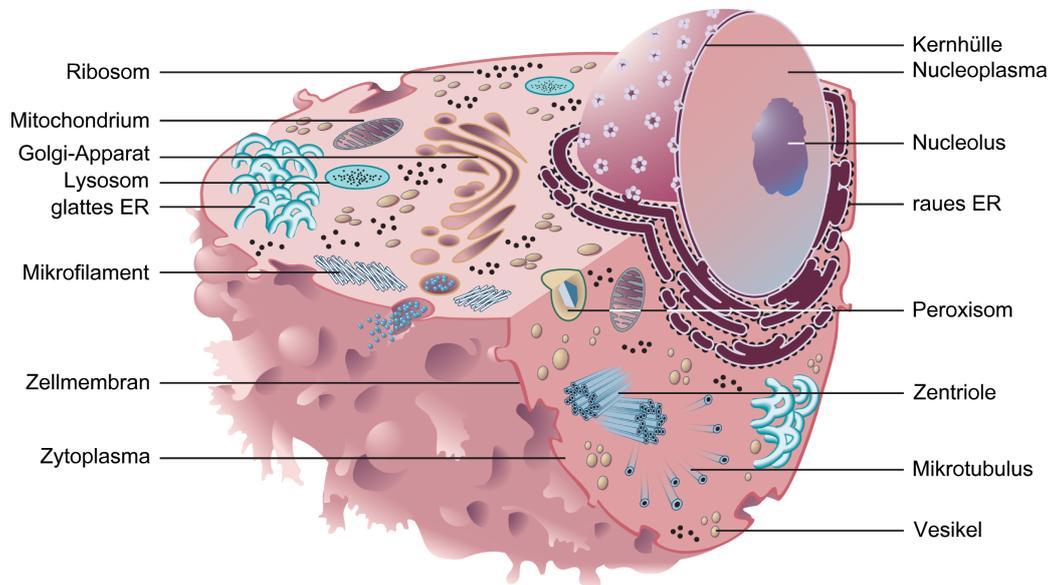


Abbildung 2.1.: Tierische Zellen sind durch eine Zellmembran vom extrazellulären Raum getrennt und beinhalten neben dem Zellkern mit der genetischen Information eine Vielzahl von Zellkompartimenten [Kar10].

mit Bakterien überein. Daher wird heutzutage die Hypothese vertreten, dass Mitochondrien aus der Symbiose eines Bakteriums mit dem Vorläufer einer tierischen Zelle hervorgegangen sind („Endosymbiontentheorie“) [Alb08].

2.1.1. Zellmembran und -fusion

Die Zellmembran stellt eine undurchlässige Barriere für einen Großteil der wasserlöslichen Moleküle dar und ist eine dynamische, fluide Struktur aus Lipiden sowie eingebetteten Proteinen mit einer geringen Dicke von etwa 5 nm [Sin72, Kar10]. Die Lipide und Proteine werden überwiegend durch nicht-kovalente Bindungen zusammengehalten und sind in der Membranebene frei beweglich [Kor71]. Die drei am häufigsten vorkommenden Lipidarten sind Cholesterin, Sphingolipide und Phospholipide, wobei letztere die höchste Konzentration aufweisen [Kar10]. Phospholipide besitzen zwei hydrophobe Schwänze und einen hydrophilen Kopf mit negativer Ladung. Folglich sind die Lipidmoleküle in wässrigen Medien in einer durchgehenden Doppelschicht angeordnet, deren hydrophobe Komponenten jeweils nach innen zeigen (siehe Abbildung 2.2). Die beiden Monoschichten der Zellmembran haben jedoch eine unterschiedliche Lipidzusammensetzung. Glykolipide befinden sich ausschließlich an der äußeren Seite und dienen dort als Rezeptoren für extrazelluläre Liganden [Kar10]. Negativ geladene Phosphatidylserine sind an der inneren Seite lokalisiert, so dass ein deutlicher Ladungsunterschied zwischen den Monoschichten entsteht [Alb08].

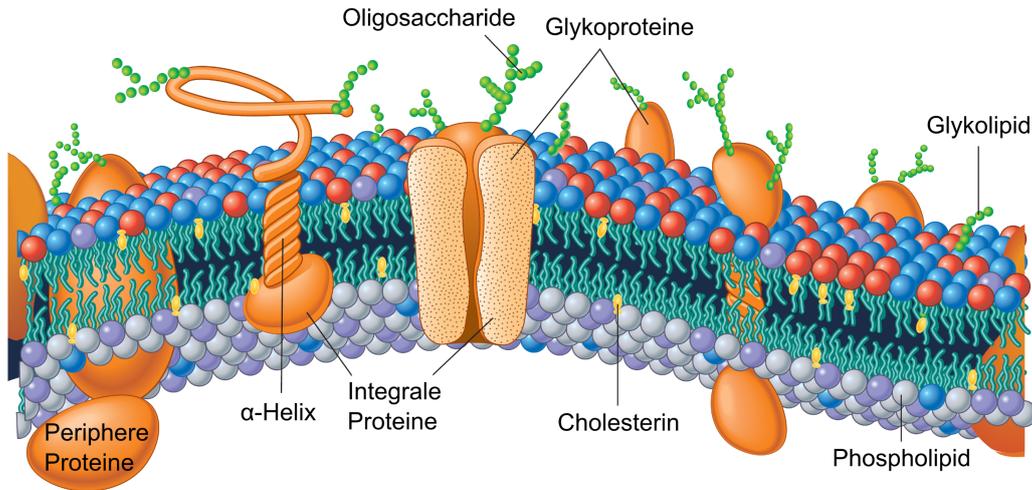


Abbildung 2.2.: Nach dem Flüssig-Mosaik-Modell der Zellmembran [Sin72] ist die Lipid-Doppelschicht eine dynamische, fluide Struktur gerichteter Lipide und Proteine [Kar10].

Die hohe Flexibilität der Lipid-Doppelschicht ermöglicht eine Deformation der Zellmembran während der Fortbewegung und Teilung der Zelle (siehe Abschnitt 2.1.3). Für den Großteil der Membranfunktionen sind angelagerte Proteine verantwortlich, deren Zusammensetzung vom Zelltyp abhängt. Integrale Proteine durchdringen die gesamte Membran und dienen als Rezeptoren für die Bindung spezifischer Moleküle an der Membranoberfläche sowie als Kanäle oder Transporter für Ionen und gelöste Substanzen [Kar10]. In tierischen Zellen sind viele integrale Proteine glykolisiert. Diese befinden sich ausschließlich an der äußeren Membranseite, da die Zuckerreste (Oligosaccharide) im Lumen des endoplasmatischen Retikulums hinzugefügt werden. Durch die Bindung von komplexen Proteinen oder Glykoproteinen an Oligosaccharide werden viele temporäre Zell-Zell-Adhäsionsvorgänge vermittelt, unter anderem bei der Interaktion von Spermium und Oozyte [Alb08]. Periphere Proteine sind durch schwache elektrostatische Bindungen mit der Zellmembran verknüpft und verleihen ihr mechanische Stabilität. Zusätzlich regulieren diese die Übertragung transmembraner Signale und bilden molekulare Anker für integrale Proteine [Kar10].

Die Zellfusion ist ein fundamentaler biologischer Prozess in der Entwicklung und Physiologie multizellulärer Organismen. Beispielsweise fusionieren bei der Fertilisation die Plasmamembranen von Spermium und Oozyte, nachdem das Spermium die Zona Pellucida der Oozyte durchdrungen hat. Seit der Realisierung der induzierten Zellfusion durch die Zugabe von Sendai-Viren *in vitro* hat sich diese Methode als nützliches Werkzeug für die Analyse der Genexpression, die Kartographierung des Genoms, die Produktion von Antikörpern und die Krebsimmuntherapie entwickelt [Che05]. Neben der Addition von Viren wurden in den letzten Jahrzehnten auch chemische Substanzen [Ahk72], die elektrische Stimulation [Zim82] und die Laserbestrahlung [Sch84] erfolgreich zur Zellfusion eingesetzt.

Jedoch sind die dafür verantwortlichen Mechanismen auf molekularer Ebene bis heute nicht vollständig aufgeklärt. Die am weitesten verbreitete Hypothese besagt, dass alle genannten Methoden Aktivierungsenergie für eine Annäherung der beiden negativ geladenen, äußeren Membranschichten bereitstellen (siehe Abbildung 2.3). Wenn diese Anziehungskraft größer als die abstoßende Kraft zwischen den hydrophilen Schichten ist, bildet sich ein sogenannter „Stiel“ und die äußeren Membranschichten fusionieren. Zur Verringerung der daraus resultierenden hohen Zugspannung wird der Zwischenraum im Stiel reduziert, so dass die inneren Membranschichten in engen Kontakt kommen und fusionieren. An dieser Stelle entsteht eine Fusionspore, die einen Kanal für den Austausch von Zytoplasma bietet. Dieser Kanal wird kontinuierlich verbreitert bis die Zellfusion abgeschlossen ist [Ogl05, Gon08].

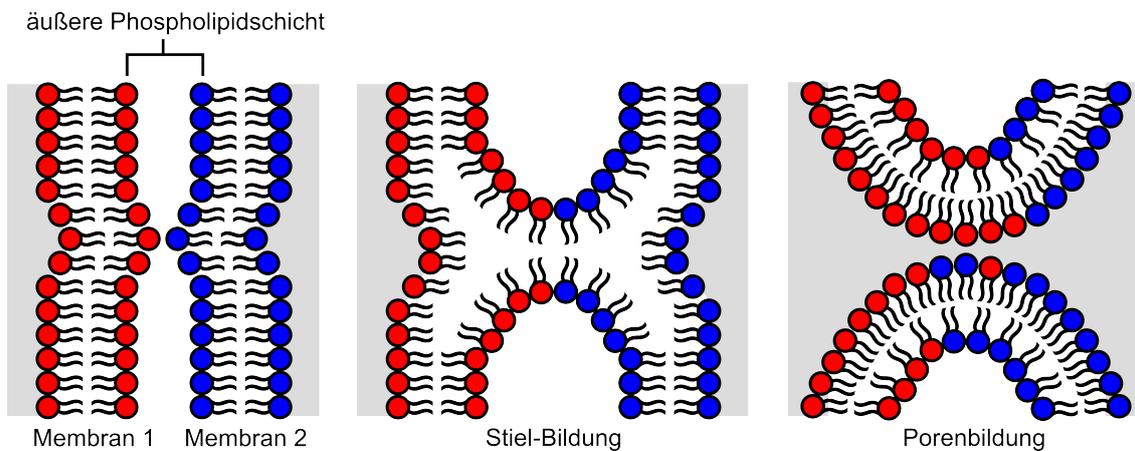


Abbildung 2.3.: Die induzierte Zellfusion erfordert die Bereitstellung von Aktivierungsenergie für die Annäherung und Fusion der äußeren Membranschichten. Nach der daraus folgenden Stiel-Bildung fusionieren auch die inneren Membranschichten, so dass eine Fusionspore für den Austausch von Zytoplasma entsteht (nach [Ogl05]).

2.1.2. Struktur der DNA im Zellkern

Der Zellkern nimmt ungefähr 10 % des gesamten Zellvolumens ein und ist vom Zytoplasma durch die Kernhülle getrennt [Olm83]. Diese besteht aus zwei Zellmembranen, die parallel angeordnet und ungefähr 10 bis 50 nm voneinander getrennt sind. Die Membranen stellen eine Barriere dar und verhindern eine Diffusion von Ionen sowie Makromolekülen. Der aktive und passive Austausch zwischen Zyto- und Nukleoplasma findet durch die Kernporenkomplexe statt, welche die Kernhülle durchdringen und von denen eine durchschnittliche Säugetierzelle mehrere Tausend enthält [Kar10].

Die genetische Information einer tierischen Zelle ist in der DNA kodiert, deren struktureller Aufbau von Watson und Crick anhand von Röntgenbeugungsdiagrammen entschlüsselt wurde [Wat53]. Die DNA ist ein doppelsträngiges Kettenmolekül aus Nukleotiden, welche jeweils

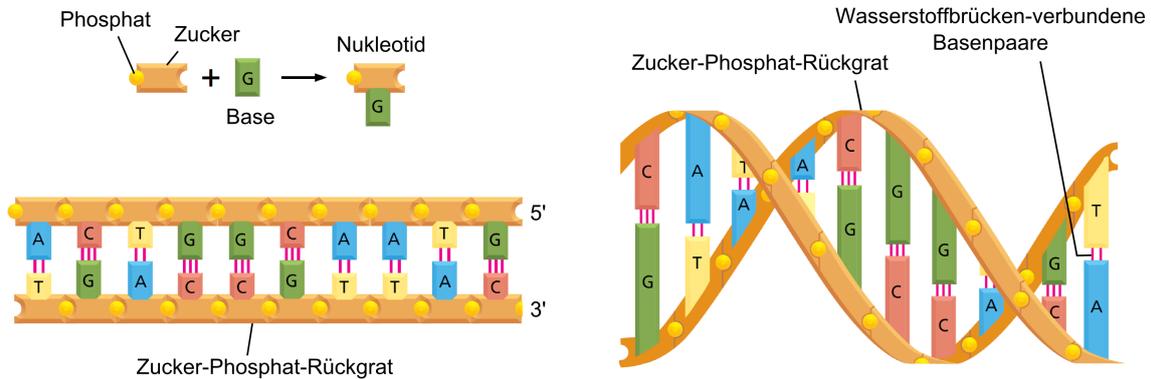


Abbildung 2.4.: Die doppelsträngige DNA besteht aus Nucleotiden, welche aus einem Zucker, einer Phosphat-Gruppe und einer von vier organischen Basen zusammengesetzt sind, und ist in Form einer Doppelhelix angeordnet [Alb08].

aus einem Zucker (Desoxyribose), einer Phosphat-Gruppe und einer von vier organischen Basen (Adenin, Thymin, Cytosin und Guanin) zusammengesetzt sind (siehe Abbildung 2.4). Dabei sind sowohl Adenin und Thymin als auch Cytosin und Guanin komplementär. Die Nucleotide sind asymmetrisch aufgebaut und besitzen jeweils ein 3'-Ende (Zucker) sowie ein 5'-Ende (Phosphat), welche ihnen eine chemische Polarität verleihen. Durch starke kovalente Bindungen zwischen den Nucleotiden eines Strangs entsteht ein stabiles Zucker-Phosphat-Rückgrat. Im Vergleich dazu sind die Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den gegenüberliegenden Strängen relativ schwach. Unter Energieaufwand ermöglicht dies eine Trennung beider Stränge ohne eine Zerstörung des Zucker-Phosphat-Rückgrats, was für die Zellteilung, DNA-Transkription und DNA-Reparaturmechanismen notwendig ist (siehe Abschnitt 2.2.2). Durch die Verdrehung beider Stränge ist die DNA in Form einer Doppelhelix mit einem Durchmesser von etwa 2 nm angeordnet [Kar10].

Das menschliche Genom enthält ungefähr 30000 bis 35000 Gene, besteht aber zu mehr als 98 % aus nicht-kodierenden Sequenzen [Lan01]. Zur Proteinbiosynthese wird die entsprechende Nucleotidsequenz der DNA in komplementäre Boten-Ribonucleinsäure (mRNA, engl.: *messenger ribonucleic acid*) umgeschrieben („transkribiert“). Diese ist im Gegensatz zur DNA einzelsträngig und enthält den Zucker Ribose anstatt Desoxyribose sowie die Nucleinbase Uracil anstatt Thymin. An den Ribosomen wird die mRNA schließlich in die Aminosäuresequenz des Proteins übersetzt („translatiert“) [Alb08].

Alle tierischen Lebewesen besitzen komplexe Mechanismen zur Kompaktierung der DNA auf das Kernvolumen von etwa 10 bis 100 Femtolitern [Olm83]. Im Zellkern ist die DNA auf einen Satz unterschiedlicher Chromosomen aufgeteilt. Durch die Anlagerung von Histonen nimmt ein DNA-Molekül eine deutlich kompaktere Struktur an (siehe Abbildung 2.5). Diese als Nucleosom bezeichnete erste Verpackungsstufe besteht aus acht Histonproteinen; je zwei Moleküle der Histone H2A, H2B, H3, H4; und einem doppelsträngigen DNA-Abschnitt mit

145 Nukleotiden. Das Histon-Oktamer bildet einen Proteinkern, um den das DNA-Molekül ungefähr 1,7-mal gewunden ist [Bed98].

Die Nukleosomen sind durch „Linker-DNA“ mit einer Länge von wenigen bis etwa 80 Nukleotiden verbunden [Alb08]. Die Aneinanderreihung von Nukleosomen und Linker-DNA in Form einer Perlschnur wird durch die Anlagerung eines H1-Histons sowie nicht-Histon-Proteinen weiter verdichtet. Die daraus entstehende 30 nm-Struktur wird als Chromatinfaser bezeichnet. Die Verpackung der Chromatinfasern in sehr eng gewickelte Schleifen mit einer Größe von einigen hundert Nanometern [Mar79] führt schließlich zu einer Kompaktierung der DNA in einem kondensierten Metaphasechromosom um den Faktor 10000 [Kar10].

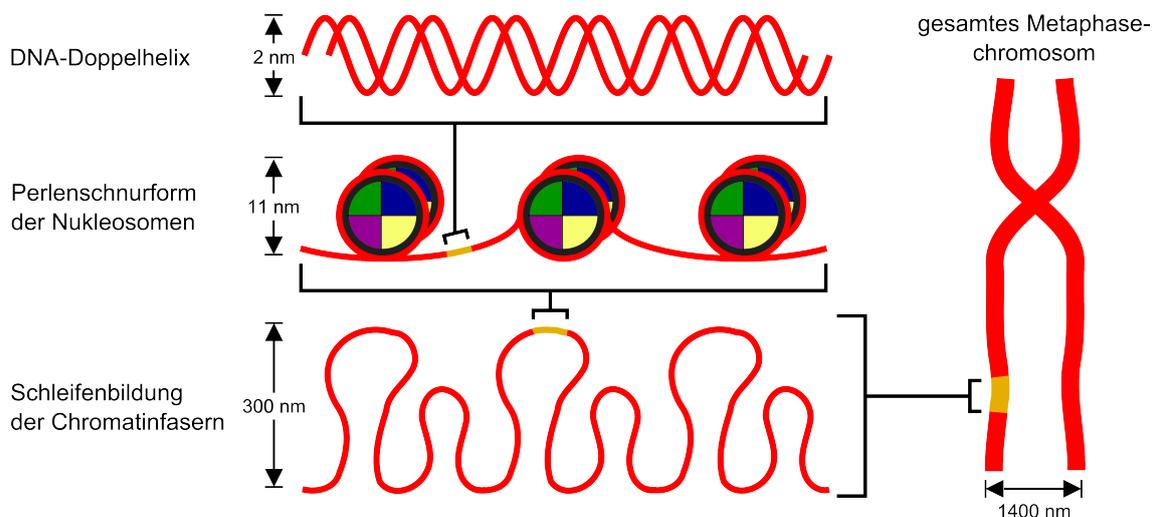


Abbildung 2.5.: Durch die Anlagerung von Histonen und nicht-Histon-Proteinen wird die DNA in einem kondensierten Metaphasechromosom in mehreren Verpackungsstufen um den Faktor 10000 komprimiert (nach [Alb08]).

2.1.3. Phasen und Regulation des Zellzyklus

Der Zellzyklus ist eine feste Abfolge makromolekularer Prozesse, die zur Zellteilung und Produktion von zwei Tochterzellen mit identischer genetischer Information führen. In tierischen Zellen ist der Zellzyklus in vier Phasen aufgeteilt und dauert abhängig von der Spezies zwischen 90 Minuten und etwa 24 Stunden [Lod07] (siehe Abbildung 2.6a). In der G1-Phase werden die Zellorganellen verdoppelt und mRNA sowie Proteine für die folgende S-Phase hergestellt; dies resultiert in einer Zunahme des Zellvolumens. Die S-Phase umfasst die Replikation der DNA und die Herstellung von Histonen, so dass jedes Chromosom zwei identische Chromatide besitzt („Schwesterchromatide“). In der G2-Phase nimmt das Zellvolumen durch die Proteinherstellung für die folgende M-Phase weiter zu. Sowohl die G1-, S- als auch G2-Phase werden als Interphase zusammengefasst, deren zeitlicher Anteil

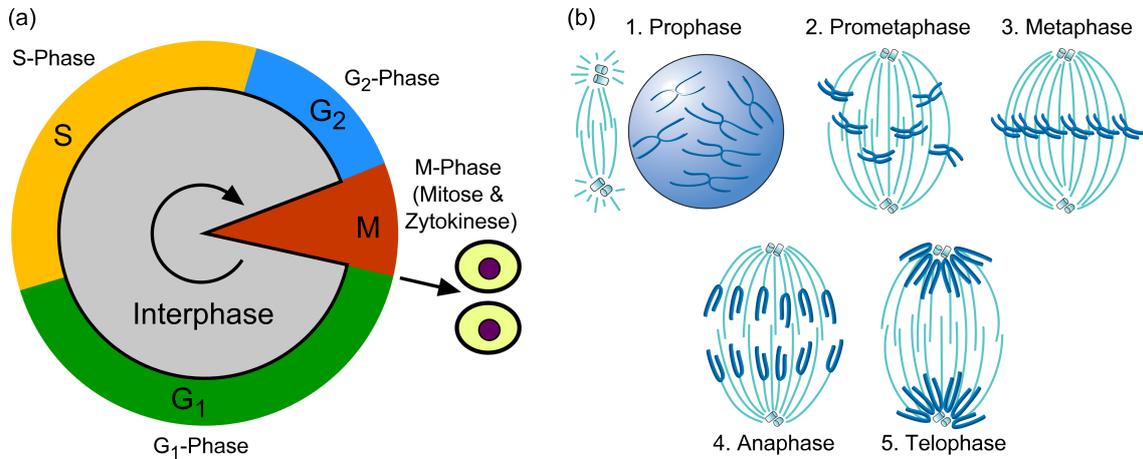


Abbildung 2.6.: (a) Der Zellzyklus einer tierischen Zelle beinhaltet die G₁-, S- und G₂-Phase, welche als Interphase zusammengefasst werden, sowie die M-Phase mit der Mitose und Zytokinese. (b) Die Mitose wird in fünf Phasen aufgeteilt und resultiert in der Separation der duplizierten Chromosomen in zwei Zellkerne (nach [Kar10]).

an der Gesamtdauer des Zellzyklus für Säugetierzellen ungefähr 95 % beträgt [Alb08].

Die M-Phase des Zellzyklus beinhaltet die Verteilung der duplizierten Chromosomen auf zwei Zellkerne („Mitose“) und die Zellteilung in zwei Tochterzellen („Zytokinese“). In menschlichen Zellen dauern die Mitose und Zytokinese zusammen etwa 30 Minuten [Lod07]. In der Prophase der Mitose kondensieren die Chromosomen und werden unter starker Vergrößerung sichtbar (siehe Abbildung 2.6b). Des Weiteren wird die mitotische Spindel zur Trennung der Chromosomen aufgebaut und die Kernhülle zerfällt. In der Prometaphase lagern sich Mikrotubuli an die Chromosomen an und ziehen diese mit Motorproteinen zur Äquatorialebene der Spindel. Die Ausrichtung der Chromosomen in einer Ebene, der sogenannten Metaphasenplatte, wird in der Metaphase abgeschlossen. In der Anaphase werden die Chromatide eines Chromosoms in zwei Gruppen getrennt und zu den entgegengesetzten Polen der Spindel gezogen. Durch die Dekondensation der Chromosomen und der Bildung von Kernhüllen um beide Gruppen entstehen in der Telophase zwei neue Zellkerne. Die Aufteilung des Zytoplasmas und seiner Bestandteile auf die beiden Tochterzellen mit identischer genetischer Information beendet die M-Phase [Kar10].

Katastrophale genetische Defekte können auftreten, wenn die Zelle in die nächste Phase des Zellzyklus übergeht bevor die vorherige Phase vollständig abgeschlossen ist [Har89]. Zur Minimierung dieser Defekte existieren an unterschiedlichen Punkten während des Zellzyklus Kontrollmechanismen, die Schädigungen am Genom (siehe Abschnitt 2.2.1), eine fehlerhafte DNA-Replikation, eine unvollständige Anlagerung der Chromosomen an die mitotische Spindel und eine unvollständige Separation der duplizierten Chromosomen detektieren [Lod07]. Bei Aktivierung eines Kontrollpunkts wird der Zellzyklus temporär unterbrochen

und diese Zeit zur Fehlerbehebung genutzt. Dies ist besonders bei komplexen tierischen Lebewesen von entscheidender Bedeutung, da eine Zellteilung mit genetischen Defekten zur Entstehung einer Krebszelle führen kann [Kar10]. Wenn die Fehler nicht vollständig behoben werden können, leitet das Kontrollsystem mit Effektorproteinen entweder den programmierten Zelltod („Apoptose“) oder den Übergang in einen permanenten Zellzyklusarrest („Seneszenz“) ein [Zho00, Pie02, Nii06].

Die Apoptose ist ein streng regulierter, zellulärer Mechanismus zur kontrollierten Entfernung geschädigter Zellen und wird von charakteristischen Änderungen in der Morphologie begleitet. Die Zelle schrumpft und verdichtet sich, das Zytoskelett bricht zusammen, die Kernhülle zerfällt und die DNA wird in Stücke zerlegt [Alb08]. Durch Veränderungen an der Oberfläche der Plasmamembran wird die apoptotische Zelle von Makrophagen erkannt und vollständig abgebaut. Im Gegensatz zur Apoptose beinhaltet die sogenannte Nekrose als Reaktion auf eine akute Zellschädigung ein Anschwellen des Zytoplasmas und der mitochondrialen Matrix bis die Plasmamembran reißt. Durch die Verteilung der Zellbestandteile in den extrazellulären Raum ist die Entstehung schädlicher Entzündungsreaktionen in der unmittelbaren Umgebung möglich [Kro98].

2.2. Zellschädigungen

Für das Überleben der Zelle ist die Aufrechterhaltung des zellulären Gleichgewichts („Homöostase“) notwendig [Yu94]. Dies umfasst unter anderem die Integrität des Genoms, den pH-Wert, die Temperatur und die Ionenkonzentrationen. Unter physiologischen Bedingungen werden diese Faktoren durch interne und externe Quellen modifiziert [Som00, Val07]. Da Mutationen und Veränderungen im Erbgut die größte Bedrohung für die Vitalität der Zellen darstellen [War88], werden im Folgenden DNA-Schäden sowie ihre Reparaturmechanismen näher beschrieben. Dabei wird wegen seines hohen Schädigungspotentials insbesondere auf den Doppelstrangbruch eingegangen.

2.2.1. DNA-Schäden

DNA-Schäden können durch endogene und exogene Quellen verursacht werden [Som00, Val07]. Der im Rahmen dieser Arbeit verwendete Femtosekundenlaser (siehe Abschnitt 4.1.1) im nahen Infrarot (NIR) induziert DNA-Schäden entweder durch direkten Energietransfer oder die Erzeugung freier Radikale [Hut85, War88, Bou00, Vog05].

Die Multiphotonenabsorption (siehe Abschnitt 3.1.1) von DNA-Molekülen führt zur Entstehung von Photoprodukten und Zyklobutan-Pyrimidin-Dimeren [Sin02]. Letztere bezeichnen die Entstehung kovalenter Bindungen zwischen benachbarten Thymin- und Cytosin-Basen. Bei Anregung des Zuckers eines Nukleotids über dessen Ionisationspotential wird ein Zuckerradikal produziert, das durch eine Reaktion mit Sauerstoff Strangbrüche induziert, welche über ein erhebliches mutagenes Potential verfügen [Lea96, Mar06, Kon09]. Durch die Addition von Photosensitizern wird die Ausbeute dieser Produkte signifikant

erhöht [Din07, Wil07]. Ursächlich hierfür ist der große Absorptions-Wirkungsquerschnitt der Photosensitizer, die mit hoher Effizienz die absorbierte Energie zum benachbarten DNA-Molekül transferieren [Aru98].

Ionisationsprozesse in biologischen Materialien haben die Erzeugung freier Sauerstoff-Radikale zur Folge (siehe Abschnitt 3.3.1). Diese sind freie Moleküle mit einem oder mehreren ungepaarten Elektronen und bilden eine Untergruppe der ROS. Zu den freien Radikalen gehören unter anderem das Hydroxyl-Radikal (OH^\bullet) und das Superoxid. Übersteigt die Konzentration der erzeugten ROS die intrazellulären Mechanismen zu deren Neutralisierung, wird dieser Zustand als oxidativer Stress bezeichnet [Hal92].

Das Superoxid hat eine geringe Reaktionsrate mit der DNA und ist somit nur für einen sehr kleinen Teil der induzierten DNA-Schäden verantwortlich. Indes reagiert das Hydroxyl-Radikal mit diffusionsbegrenzten Raten sehr effizient mit der DNA und ihren Komponenten, wobei die Reaktionsraten mit freien Nukleotiden deutlich höher als mit der Doppelhelix sind. Dies ist auf die sehr stabilen kovalenten Bindungen zwischen den Nukleotiden in der Doppelhelix und die damit verbundene deutlich geringere Anzahl möglicher Reaktionsstellen zurückzuführen [Hut85].

Durch die Reaktion eines Hydroxyl-Radikals mit dem Zucker eines Nukleotids kann ein Wasserstoffatom extrahiert werden. Die entstehenden Zuckerradikale reagieren irreversibel mit gelöstem Sauerstoff [Son81], was entweder in einem Strangbruch oder in der Ablösung einer unbeschädigten Nukleinbase resultiert. Zudem reagieren Hydroxyl-Radikale sehr effizient mit den Nukleinbasen, sowohl mit den Purinen (Adenin und Guanin) als auch mit den Pyrimidinen (Cytosin und Thymin). Dabei wird entweder ein Wasserstoffatom extrahiert oder ein Hydroxyl-Radikal angelagert [Hut85]. Die chemisch modifizierten Nukleinbasen sind freie Radikale und bilden nach einer weiteren Reaktion mit Sauerstoff stabile Endprodukte [Ora85]. Wenn in unmittelbarer Umgebung des DNA-Radikals durch die Reaktion eines Proteins mit OH^\bullet ein Proteinradikal vorliegt, können zudem DNA-Protein-Quervernetzungen entstehen [Aru98].

Zelluläre Antioxidantien wie Glutathion oder Ascorbinsäure können die durch freie Radikale-induzierten Modifikationen der DNA-Moleküle effizient verringern, indem diese mit den Zucker- oder Nukleinbasen-Radikalen vor deren Wechselwirkung mit gelöstem Sauerstoff reagieren. Dadurch werden die DNA-Radikale neutralisiert und die Entstehung von DNA-Schäden verhindert [Yu94, Lea96].

2.2.2. Doppelstrangbrüche

Zur Erhaltung der Integrität des Genoms ist eine Reparatur der Strangbrüche von essentieller Bedeutung. Diese werden in Einzelstrang- und Doppelstrangbrüche (DSB) unterteilt. Einzelstrangbrüche werden durch die Reaktion von Zuckerradikalen mit gelöstem Sauerstoff induziert (siehe Abschnitt 2.2.1) und haben eine lokale Denaturierung in der unmittelbaren Umgebung zur Folge. Dadurch wird der protektive Effekt der Doppelhelix gegenüber freien Radikalen verringert [Lea96]. Bei einem geringen Nukleotidabstand zwischen Brü-

chen in gegenüberliegenden Strängen entsteht ein DSB, der das Chromosom trennt und bei ausbleibender Reparatur zum Zelltod führt [Fri03]. Zur Reparatur von DSB existieren zwei verschiedene Mechanismen: das Nicht-homologe „Endjoining“ und die Homologe Rekombination [Kob08].

Beim Nicht-homologen Endjoining binden Proteinkomplexe an die Enden des DSB und führen diese wieder zusammen (siehe Abbildung 2.7). Im Anschluss werden die gebrochenen Strangenden durch Nukleasen abgebaut und von DNA-Ligasen verknüpft [Kar10]. Dadurch entsteht ein Verlust von Nukleotiden an der Verbindungsstelle, der eine Veränderung des Genoms zur Folge hat. Jedoch codiert nur ein sehr geringer Teil des Genoms für Proteine, so dass die Wahrscheinlichkeit für eine Genmutation gering ist [Alb08]. Trotzdem wird vermutet, dass dieser fehlerbehaftete Reparaturmechanismus für einen Großteil der karzinogenen Effekte exogener Quellen verantwortlich ist [Lod07].

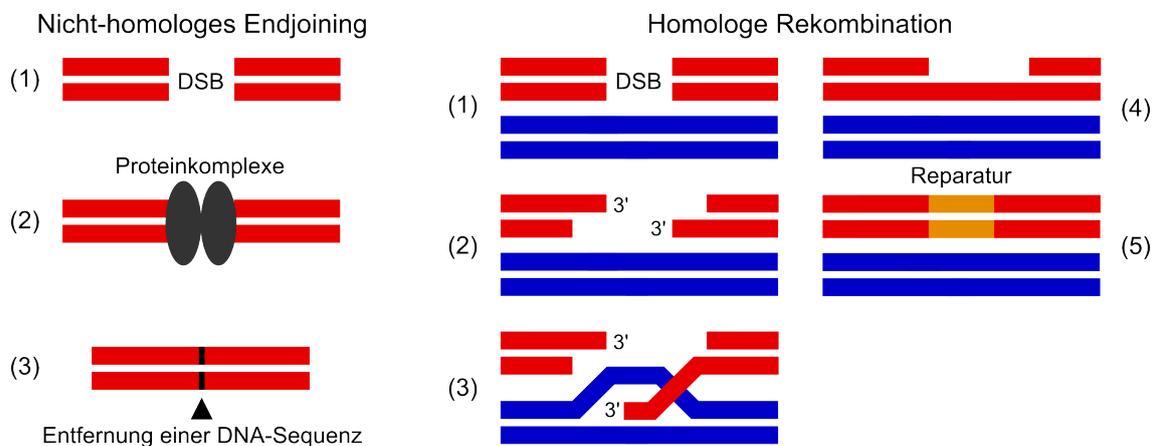


Abbildung 2.7.: DSB werden entweder durch Nicht-homologes Endjoining oder Homologe Rekombination repariert. Beim Nicht-homologen Endjoining führt die Verknüpfung der gebrochenen Strangenden ohne vorherige Korrektur zur Veränderung des Genoms. Für die Homologe Rekombination wird die identische Sequenz des Schwesterchromatids (blau) zur vollständigen Reparatur der geschädigten DNA verwendet (nach [Alb08]).

Die Homologe Rekombination benötigt die Anwesenheit von zwei genetisch identischen Chromatiden, so dass dieser Prozess im Gegensatz zum Nicht-homologen Endjoining nur während und kurz nach der DNA-Replikation stattfinden kann (siehe Abschnitt 2.1.3). Durch die DSB-Induktion in einem Chromatid werden eine Vielzahl von Exonukleasen aktiviert, die an der Bruchstelle einsträngige 3'-Enden produzieren. Das Rad51-Kernprotein sucht die zum geschädigten Bereich identische (homologe) DNA-Sequenz im Schwesterchromatid und trennt dessen Stränge. Nach der Verbindung des geschädigten, einsträngigen 3'-Endes mit dem komplementären Strang des Schwesterchromatids werden die fehlenden Basen durch DNA-Polymerasen ersetzt. Anschließend wird das reparierte 3'-Ende wieder mit dem ursprünglichen Einzelstrang verbunden. Eventuell verbleibende Lücken in der Sequenz

werden durch DNA-Polymerasen und -Ligasen aufgefüllt [Lod07].

Die Reparaturmechanismen werden durch eine Abfolge verschiedener Prozesse reguliert. Zuerst erkennt ein Sensorprotein, wahrscheinlich die Serin-Proteinkinase ATM, den induzierten DSB. Danach phosphoryliert ATM diverse Mediatorproteine, unter anderem das Histon H2AX zu γ -H2AX und den Tumorsuppressor p53. Die phosphorylierten Mediatorproteine aktivieren den Kontrollpunkt des Zellzyklus (siehe Abschnitt 2.1.3) und die Reparaturmechanismen [Kob08]. Ferner bilden diese nukleäre Foki, die einen Durchmesser im Nanometerbereich haben und mit der Position der DSB sowie der Reparaturproteine übereinstimmen [Wal03, Bra05, GG07].

2.3. Biologisches Gewebe

Biologisches Gewebe wird bei Wirbeltieren in vier Hauptkategorien eingeteilt: Epithelgewebe, Muskelgewebe, Nervengewebe und Bindegewebe [Cam07b]. Epithelgewebe besteht aus ein- oder mehrlagigen Zellschichten, bedeckt die Organ- sowie Körperoberflächen und kleidet die Körperhöhlen aus. Durch die hohe Packdichte der Zellen dient Epithelgewebe als Barriere gegen mechanische Verletzungen, Pathogene und Flüssigkeitsverlust. Muskelgewebe ist für nahezu alle Arten der Körperbewegung verantwortlich und verbraucht dadurch den Großteil der im Körper produzierten Energie. Alle Muskelzellen enthalten einen hohen Anteil an Aktin- und Myosinfilamenten, die zusammen eine Kontraktion des Muskels ermöglichen. Die Funktionen des Nervengewebes sind die Reizdetektion und die Signaltransmission von einem Körperteil zum anderen, welche durch die Weiterleitung von Aktionspotentialen entlang der Fortsätze der Nervenzellen („Axone“) erreicht wird [Cam07b].

Bindegewebe verbindet und unterstützt die restlichen Gewebe sowie Organe innerhalb des Körpers und beinhaltet eine im Vergleich zu den anderen Gewebetypen geringere Zelldichte in einer extrazellulären Matrix. Letztere besteht aus einem Fasernetzwerk, eingebettet in eine stark hydratisierte, Gel-ähnliche Stützstruktur aus Makromolekülen, die von den Zellen des Bindegewebes („Fibroblasten“) synthetisiert werden. Die Hauptklassen der Makromoleküle sind Proteoglykane und faserförmige Proteine wie das Kollagen, Elastin und Laminin, wobei deren relative Mengen sowie ihre Organisation zur Gesamtmatrix vom Gewebetyp abhängen. Während Kollagenfasern die extrazelluläre Matrix verstärken und strukturieren, verleiht Elastin ihr die notwendige Elastizität. Die Gel-ähnliche Stützstruktur hält der Druckkraft auf die Matrix stand, ermöglicht aber gleichzeitig einen schnellen Austausch von Nährstoffen, Metaboliten sowie Hormonen zwischen dem Blut und den Gewebezellen, die durch Integrine an der extrazellulären Matrix verankert sind [Alb08, Kar10].

Das im Rahmen dieser Arbeit verwendete artifizielle Herzmuskelgewebe ist ein kollagenhaltiges Bindegewebe aus Fibroblasten mit einer Kardiomyozyten-Population (siehe Anhang A.4). Daher werden im Folgenden die Eigenschaften von Kollagenewebe beschrieben. Anschließend wird die induzierte Kollagen-Quervernetzung als effiziente Methode zur Erhöhung der Gewebesteifigkeit dargestellt.

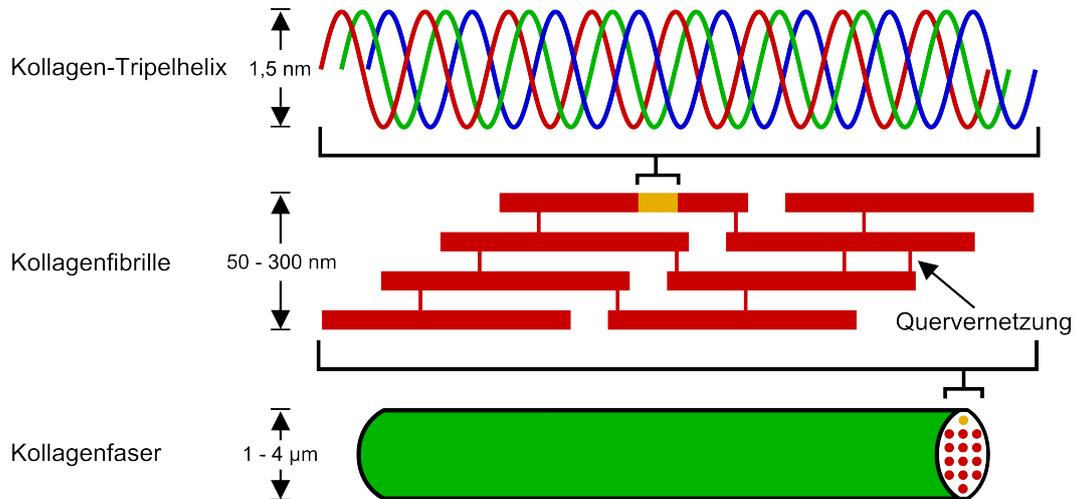


Abbildung 2.8.: Kollagen-Moleküle bilden eine Tripelhelix aus Polypeptidketten und aggregieren zu Fibrillen mit intermolekularen Quervernetzungen. Durch die Ansammlung von Fibrillen entstehen Kollagenfasern mit einem Durchmesser zwischen 1 und 4 µm (nach [Fra08]).

2.3.1. Kollagengewebe

Kollagengewebe enthält auf der Basis des Trockengewichts ungefähr 75 bis 90 % Kollagen [Li06], das hauptsächlich von Fibroblasten, aber auch von glatten Muskel- und Epithelzellen synthetisiert wird. Insgesamt wurden bis heute 27 unterschiedliche Typen des menschlichen Kollagens identifiziert. Obwohl jeder Kollagentyp auf einen bestimmten Ort innerhalb des Körpers beschränkt ist, befinden sich in der gleichen extrazellulären Matrix im Allgemeinen zwei oder mehrere Typen [Kar10].

Kollagen Typ I ist der am häufigsten vorkommende Kollagentyp und bildet den wichtigsten Bestandteil der Knochen sowie der Haut, Bänder und Sehnen [Li06]. Ein Kollagen Typ I-Molekül („Tropokollagen“) besteht aus drei schraubenförmigen Polypeptidketten, die ineinander verflochten sind und somit eine Tripelhelix um die zentrale Molekülachse bilden (siehe Abbildung 2.8). Während zwei Polypeptidketten identisch sind und aus 1056 Aminosäuren bestehen, beinhaltet die dritte Kette nur 1029 Aminosäuren [Mil84]. Tropokollagen hat ein Molekulargewicht von 283 kDa bei einem Durchmesser von 1,5 nm und einer Länge von 280 nm [Li06].

Kollagenmoleküle aggregieren zu Fibrillen mit einem vom Gewebetyp und -alter abhängigen Durchmesser zwischen 50 und 300 nm. Dabei haben zwei benachbarte Moleküle einen Abstand von ungefähr 0,15 nm und sind um etwa 65 nm gegeneinander verschoben [Kat73, Li06]. Die Fibrillen werden durch intermolekulare Quervernetzungen („Crosslinks“) zwischen den Lysin- und Hydroxylysin-Residuen des Kollagens verstärkt. Die Anzahl der Quervernetzungen nimmt mit dem Alter stetig zu und ist vermutlich für die abnehmende

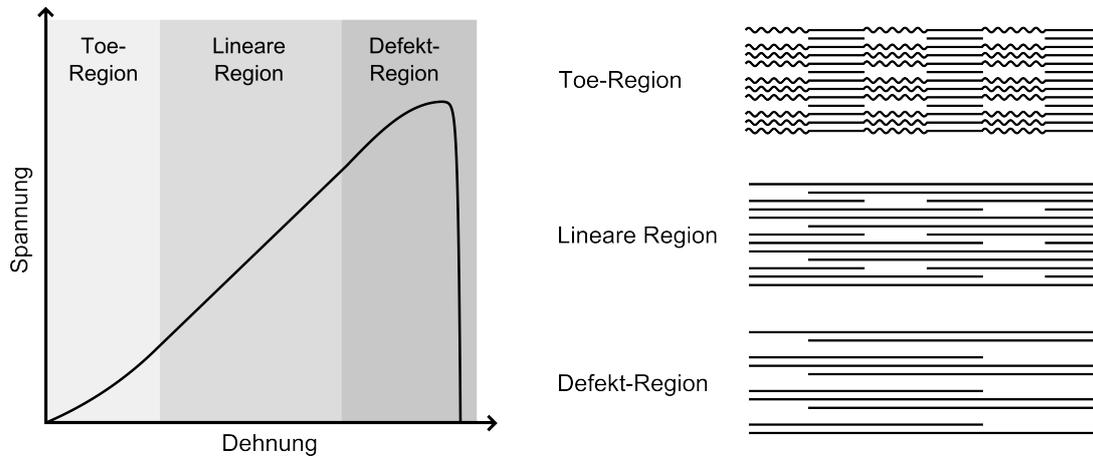


Abbildung 2.9.: Das Spannungs-Dehnungs-Diagramm von Kollagengewebe ist in drei Regionen unterteilt. Die Kollagenfasern werden in der Toe-Region geglättet und in der linearen Region nach dem Hookeschen Gesetz gedehnt. In der Defekt-Region tritt ein mechanisches Versagen des Kollagengewebes auf (nach [Fra08]).

Elastizität der Haut verantwortlich [Kar10]. Im Allgemeinen aggregieren Kollagenfibrillen zu noch größeren Bündeln mit einem Durchmesser im Bereich von 1 bis 4 μm [Li06], die unter einem Lichtmikroskop als Kollagenfasern sichtbar sind.

Unter den vielen Komponenten der extrazellulären Matrix bestimmt überwiegend die dreidimensionale Organisation der Kollagenmoleküle die mechanischen Eigenschaften der Matrix. Beispielsweise sind die Kollagenfasern in Sehnen parallel zur Richtung der Zugkräfte angeordnet, um den während der Muskelkontraktion wirkenden hohen Kräften zu widerstehen. Dahingegen verleiht die willkürliche Faserausrichtung der Haut ihre notwendige Elastizität unter mechanischer Spannung. In der Kornea sind die Fasern benachbarter Ebenen senkrecht zueinander ausgerichtet. Diese Struktur besitzt eine hohe mechanische Stabilität und gewährleistet eine hohe Transparenz der Kornea [Kar10].

Das Spannungs-Dehnungs-Diagramm (siehe Anhang D) von Kollagengewebe mit parallel angeordneten Fasern weist ein für bioviskoelastische Festkörper typisches nichtlineares Verhalten auf (siehe Abbildung 2.9) [Fun93]. In der sogenannten „Toe“-Region wird die makroskopische Kräuselung der Kollagenmoleküle aufgehoben, so dass die Fibrillenbündel in Zugrichtung geglättet und ausgerichtet werden. Dadurch ist das Elastizitätsmodul relativ gering, steigt aber mit zunehmender Ausrichtung kontinuierlich an. Die Länge dieser Region hängt sowohl vom Gewebetyp, von der Vorspannung als auch vom experimentellen Protokoll zur Gewebehalterung ab [Fra08]. In der linearen Region werden die geglätteten Fasern entlang der Zugrichtung gedehnt und die mechanische Spannung ist nach dem Hookeschen Gesetz proportional zur Dehnung. Das entsprechende Elastizitätsmodul wird „Youngsches Modul“ genannt und beträgt für Kollagenfasern etwa 1 GPa [Li06, Par07]. In der Defekt-

Region flacht das Elastizitätsmodul bis zum mechanischen Versagen des Gewebes an der Zugfestigkeitsgrenze wieder ab. Ursächlich hierfür ist vermutlich eine zunehmende Zerstörung der chemischen Verbindungen innerhalb des Kollagennetzwerkes [Fra08].

Die mechanischen Eigenschaften des Kollagengewebes hängen entscheidend von der Erzeugung intermolekularer Quervernetzungen zwischen den Kollagenmolekülen ab, die ein Gleiten der Fasern unter mechanischer Zugspannung verhindern. In den meisten industriellen und medizinischen Anwendungen ist die Anzahl der natürlichen Quervernetzungen jedoch zu gering. Daher wurden in den letzten Jahren viele Methoden entwickelt, um die Gewebesteifigkeit durch die Induktion von Quervernetzungen weiter zu erhöhen und die mechanischen Eigenschaften zu modifizieren sowie zu kontrollieren. Im Spannungs-Dehnungs-Diagramm führen die induzierten Quervernetzungen zu einer Verkürzung der Toe-Region sowie einer Erhöhung des Youngschen Moduls und der Zugfestigkeitsgrenze [Fra08].

Für die chemisch-induzierte Kollagen-Quervernetzung werden überwiegend Aldehydreaktionen oder die UV-A-Bestrahlung von Photosensitizern verwendet [Fra08]. Aldehydmoleküle bilden stabile kovalente Bindungen mit den Lysin- oder Hydroxylysin-Residuen des Kollagens. Durch weitere chemische Reaktionen dieser Produkte mit Kollagenmolekülen entstehen stabile Quervernetzungen [Dam95]. Die UV-A-Bestrahlung des Photosensitizers Riboflavin führt zur Besetzung des Triplett-Zustands (siehe Abschnitt 3.1.1) mit einem folgenden Energietransfer zum gelösten Sauerstoff. Der dadurch entstehende Singulett-Sauerstoff reagiert mit Kollagenmolekülen zu einem hochreaktiven Zwischenprodukt, das zusammen mit endogenen Karbonylen die Bildung intermolekularer Quervernetzungen katalysiert [DR02, McC10].

3. Wechselwirkung ultrakurzer Laserpulse mit biologischen Medien

Die wesentlichen Wechselwirkungs-Mechanismen bei der Propagation von Laserstrahlung in biologischen Medien sind Streuung und Absorption, deren Verhältnis durch die optischen Eigenschaften des Mediums bei der eingestrahlten Wellenlänge bestimmt wird. Zur Beschreibung der Abschwächung von Laserstrahlung wird im Allgemeinen die mittlere freie Transportweglänge (L_{TMFP} , *engl.: transport mean free path*) [Nie04, Ntz10]

$$L_{\text{TMFP}} = \frac{1}{\alpha + \alpha'_s} \quad (3.1)$$

mit dem Gesamt-Absorptionskoeffizienten α aller endogenen Absorber und dem reduzierten Streukoeffizienten α'_s verwendet, der multiple Streuvorgänge berücksichtigt. Bei der MPM entspricht die maximal erreichbare Eindringtiefe einfallender Photonen ungefähr der Hälfte von L_{TMFP} [Ntz10].

Die Absorption in biologischem Gewebe lässt sich in guter Näherung durch die vier Hauptabsorber beschreiben: Wasser, Proteine, Hämoglobin und Melanin [Bou86, Nie04]. Im NIR-Bereich zwischen 0,6 und 1,1 μm ist die Summe der vier Absorptions- sowie des Streukoeffizienten minimal. Durch die daraus resultierende, gewebeabhängige Eindringtiefe bis zu einigen Millimetern wird dieser Bereich auch als *diagnostisches Fenster* bezeichnet [Koe00].

Ziel dieser Arbeit war die Anwendung ultrakurzer Laserpulse zur Bildgebung sowie Manipulation von Zellen und Gewebe im Bereich der regenerativen Medizin. Die dabei verwendeten Techniken waren die MPM für die Visualisierung biologischer Strukturen und zellulärer Prozesse sowie die fs-Nanochirurgie für die Dissektion von biologischem Material. Folglich werden in diesem Kapitel die physikalisch-chemischen Grundlagen der MPM und fs-Nanochirurgie ausführlich beschrieben.

3.1. Multiphotonenmikroskopie (MPM)

Die MPM basiert auf der Multiphotonenanregung von Fluorophoren in biologischen Medien und einer nachfolgenden Detektion der von den Fluorophoren emittierten Photonen. In diesem Abschnitt werden daher zunächst die Grundlagen der Multiphotonenanregung dargestellt und die Laser-induzierte, irreversible Zerstörung von Fluorophoren beschrieben. Anschließend wird die experimentelle Umsetzung der MPM erläutert und ein Vergleich zur konfokalen Mikroskopie gezogen.

3.1.1. Multiphotonenanregung

Die Multiphotonenanregung von Molekülen ist ein nichtlinearer optischer Prozess [Boy08]. Durch die quasi-simultane Absorption mehrerer (N) Photonen innerhalb von etwa 10^{-16} s wird ein Molekül vom Grundzustand S_0 in einen höheren Zustand S_1 angeregt [Zip03b]. Quantenmechanisch betrachtet regen die ersten ($N-1$) Photonen das Molekül in virtuelle Zwischenzustände an; erst die Absorption des letzten Photons überführt das Molekül schließlich in den nächsthöheren elektronischen Zustand (siehe Abbildung 3.1). Dabei müssen alle am Prozess beteiligten Photonen nicht die gleiche Energie besitzen [Den06].

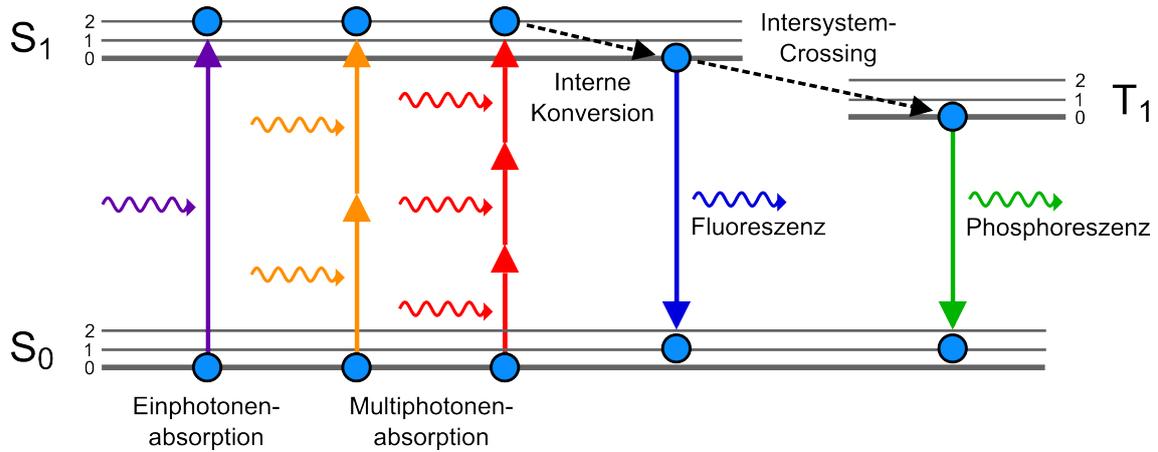


Abbildung 3.1.: Die Anregung eines Moleküls vom Grundzustand S_0 in den nächsthöheren elektronischen Zustand S_1 kann durch eine Ein- oder Multiphotonenabsorption erfolgen. Nach einer strahlungslosen Relaxation (interne Konversion) kehrt das Molekül durch die Emission eines Fluoreszenzphotons wieder in den Grundzustand zurück. Alternativ ist ein Übergang in den Triplett-Zustand T_1 („Intersystem-Crossing“) mit anschließender Emission eines Phosphoreszenzphotons möglich.

Während eines Laserpulses ist die Wahrscheinlichkeit p_N für die N -Photonen-Absorption eines Fluorophors im Zentrum des fokalen Volumens gegeben durch [Koe99c, Den06]:

$$p_N = \sigma_N \frac{g^{(N)}}{\tau^{N-1} f^N} \left(\frac{\bar{I} \lambda}{hc} \right)^N = \sigma_N \frac{g^{(N)}}{\tau^{N-1} f^N} \left(\frac{\bar{P} \pi (\text{NA})^2}{hc \lambda} \right)^N. \quad (3.2)$$

Dabei entspricht σ_N dem N -Photonen-Absorptionsquerschnitt des Fluorophors, \bar{I} bzw. \bar{P} der zeitlich gemittelten Intensität bzw. Leistung, τ und f der Pulsdauer bzw. Repetitionsrate, λ und c der Wellenlänge bzw. Lichtgeschwindigkeit, NA der numerischen Apertur der fokussierenden Optik und $g^{(N)}$ einem dimensionslosen von der Pulsform abhängigen Faktor. Mit Pulsdauern im Femtosekundenbereich kann jeder Fluorophor pro Puls nur einmal angeregt werden, da dessen Fluoreszenzlebensdauer im Allgemeinen im Nanosekundenbereich liegt [Den06]. Folglich ist Gleichung (3.2) nur gültig, solange die Absorptionswahrscheinlichkeit

p_N deutlich kleiner als Eins ist und keine Sättigungseffekte auftreten. Auf Grund der Abhängigkeit von der N -ten Ordnung der Intensität ist die Multiphotonenabsorption auf den Bereich hoher Intensitäten ($\approx 10^6$ bis $10^9 \frac{\text{W}}{\text{cm}^2}$) im fokalen Volumen beschränkt [Koe00]. Im Vergleich zur konfokalen Mikroskopie ergeben sich dadurch mehrere entscheidende Vorteile (siehe Abschnitt 3.1.5).

3.1.2. Photobleichung

Die Photobleichung ist ein dynamischer Prozess, in dem ein Fluorophor eine photoinduzierte, chemische Modifikation erfährt und seine Fluoreszenzfähigkeit irreversibel verliert. Die Wahrscheinlichkeit dieses Prozesses hängt sowohl von der Bestrahlungsintensität als auch von der molekularen Struktur des Fluorophors sowie seiner chemischen Umgebung ab [Son95, Paw06]. Der Abfall der Fluoreszenzintensität über die Zeit für N_0 bestrahlte Fluorophore wird durch eine multi-exponentielle Funktion beschrieben [Hir76]

$$N(t) = N_0 \sum_{i=1}^n A_i \exp(-k_i t), \quad (3.3)$$

die von den Vorfaktoren A_i und den Photobleichungsraten k_i der einzelnen zur Bleichung führenden n Prozesse abhängt (siehe Abbildung 3.2).

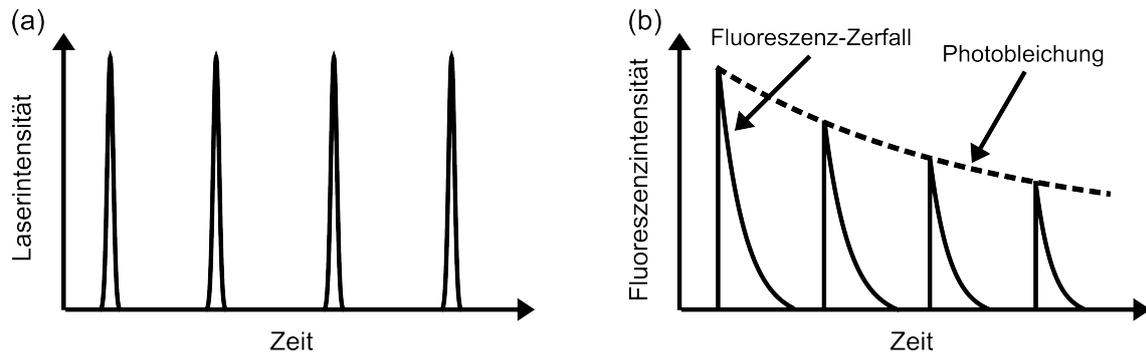


Abbildung 3.2.: Bei (a) gepulster Anregung wird der (b) Abfall der Fluoreszenzintensität über die Zeit (Photobleichung) durch eine multi-exponentielle Funktion (gestrichelte Linie) beschrieben (nach [Son95]).

In der konfokalen Mikroskopie ist die Photobleichungsrate proportional zur eingestrahlichten Intensität und wird entscheidend von der Sauerstoffkonzentration im Medium sowie dem Anteil der Fluorophore im Triplett-Zustand beeinflusst [Son95, Son96, Pat00, Dit01]. Folglich ist die Reaktion eines Fluorophors im Triplett-Zustand mit molekularem Sauerstoff der dominante Pfad zur Photobleichung. Dies resultiert in der Bildung von nicht-fluoreszenten Fluorophorradiikalen sowie Singulett-Sauerstoff [Son95], der durch nachfolgende chemische Reaktionen zur Entstehung freier Radikale [Paw06] und damit zur Schädigung von Biomolekülen beiträgt (siehe Abschnitt 2.2.1).

In Bezug auf die Zweiphotonenmikroskopie (2PM) wurde experimentell gezeigt, dass die Anzahl der emittierten Photonen bis zur Photobleichung eines Fluorophors im fokalen Volumen signifikant geringer als in der konfokalen Mikroskopie ist [San97, Son99, Dit01]. Zusätzlich hängt sowohl die Photobleichungs- als auch Phototoxizitätsrate im Allgemeinen stärker als quadratisch von der Laserintensität ab („Photobleichung höherer Ordnung“) [Koe99c, Pat00, Hop01, Che02, Egg05]. Da keine signifikante Triplett-Besetzung der Fluorophore bei der Photobleichung höherer Ordnung auftritt, sind im Vergleich zur konfokalen Mikroskopie andere Prozesse von entscheidender Bedeutung [Dit01].

Im Photobleichungsmodell von Eggeling et al. für die MPM werden auf Grund des vernachlässigbaren Einflusses der Triplett-Zustände nur die Singulett-Zustände berücksichtigt [Egg05]. Die Multiphotonenabsorption aus dem Grundzustand S_0 in den ersten angeregten elektronischen Singulett-Zustand S_1 erfolgt mit der Rate k_{01} (siehe Abbildung 3.3). Aus diesem Zustand kann der Fluorophor entweder strahlungslos (k_{rel}) bzw. durch Emission eines Fluoreszenzphotons (k_{fl}) in den Grundzustand zurückkehren oder durch sequentielle Einphotonenabsorptionen in noch höhere Singulett-Zustände S_N mit den Raten k_{1N} und k_{NN} angeregt werden. Zusätzlich besteht die Möglichkeit, dass ein Elektron-Kation-Paar entsteht („Photolyse“), welches entweder zu einem angeregten Fluorophor rekombiniert oder in ein freies (hydratisiertes) Elektron sowie ein kationisches Fluorophorradikal zerfällt [Egg05]. In polaren Lösungsmitteln wie beispielsweise Wasser ist letzteres sehr instabil [Reu96, Egg98] und führt mit der Rate k_{bS1} zur Photobleichung. Analog erfolgt aus dem hoch-angeregten Zustand S_N die Bildung eines Elektron-Kation-Paares, was mit der Rate k_{bSN} in einer Photobleichung des Fluorophors resultiert [Egg05]. Die erzeugten freien Elektronen und kationischen Fluorophorradikale sind potentielle Reaktionspartner für die chemische Umgebung. Freie Elektronen können zur Entstehung freier Radikale [Nik83] und damit zur Schädigung von Biomolekülen führen (siehe Abschnitt 2.2.1).

Bei sehr hohen Intensitäten folgt der Multiphotonenanregung vom Grundzustand S_0 in den nächsthöheren, elektronischen Zustand S_1 unmittelbar die Einphotonenanregung in S_N . Dieser Sättigungseffekt tritt auch bei der Einphotonenanregung von S_N in noch höher angeregte Zustände auf, jedoch nicht beim Übergang von S_0 in S_1 [Dia05, Egg05]. Ursächlich hierfür ist der größere Wirkungsquerschnitt und die damit verbundene höhere Wahrscheinlichkeit für die Ein- im Vergleich zur Multiphotonenabsorption (siehe Gleichung (3.2)) [Xu96].

Die gesamte Photobleichungsrate k bei der MPM berechnet sich zu [Egg05]

$$k = k_{bS1} + k_{bSN} = \sum_{i=0}^m B_i \bar{P}^{N_{PB,i}} = \sum_{i=0}^m B_i \bar{P}^{O+U_i} \quad (3.4)$$

mit den Vorfaktoren B_i sowie den Photobleichungsordnungen $N_{PB,i}$ als jeweilige Summe der Photonenordnung O für die Anregung von S_0 in S_1 und der Anzahl ungesättigter Übergänge U_i . Findet keine sequentielle Einphotonenabsorption statt oder sind alle Übergänge von S_1 in höher angeregte Zustände gesättigt, folgt $m = 0$ und die Photobleichungsrate hängt analog zur Fluoreszenzintensität von der O -ten Ordnung der mittleren Laserleistung \bar{P} ab.

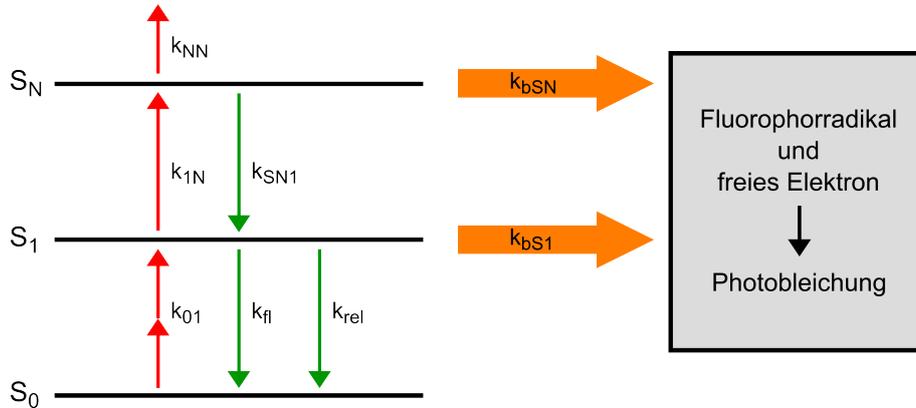


Abbildung 3.3.: Im Photobleichungsmodell nach Eggeling et al. erfolgt eine Bleichung aus den angeregten Singulett-Zuständen durch die Bildung eines Elektron-Kation-Paares, das in ein freies Elektron und ein kationisches Fluorophorradikal zerfällt [Egg05]. Dabei werden die einzelnen Übergangsraten mit k bezeichnet; beispielsweise entspricht k_{01} der Rate der Multiphotonenanregung.

3.1.3. Zweiphotonenmikroskopie (2PM)

Seit der ersten Demonstration von Denk et al. im Jahr 1990 hat sich die 2PM als Standard für die MPM biologischer Proben etabliert [Den90, Koe00]. Zur Erzeugung genügend hoher Intensitäten für die 2PM ist die Verwendung von Mikroskop-Objektiven mit hoher numerischer Apertur ($NA \geq 0,8$) notwendig. Obwohl die NA einen sehr starken Einfluss auf die Zweiphotonen-Absorptionswahrscheinlichkeit p_2 im Zentrum des Fokus hat (siehe Gleichung (3.2)), hängt die gesamte im fokalen Volumen absorbierte Leistung bei homogener Verteilung der Fluorophore nicht davon ab. Ursächlich hierfür ist die gegenseitige Kompensation der Änderungen von p_2 und der Größe des fokalen Volumens [Den06].

Das räumliche Strahlprofil im Fokus eines Mikroskop-Objektivs entspricht der sogenannten Beleuchtungs-Punktspreizfunktion PSF_B . Diese berechnet sich für ein aberrationsfreies Objektiv zu [Hel05]

$$PSF_B(v, u) = \left| 2 \int_0^1 d\rho P(\rho) J_0(v\rho) \exp\left[\frac{i}{2}u\rho^2\right] \rho \right|^2, \quad (3.5)$$

wobei J_0 die Besselfunktion nullter Ordnung und u sowie v dimensionslose, axiale bzw. radiale Koordinaten darstellen. Die Pupillenfunktion $P(\rho)$ nimmt für eine homogene Beleuchtung den Wert Eins an, während diese für einen gaußförmigen Laserstrahl durch $\exp(-\rho^2/T^2)$ berechnet wird. In diesem Zusammenhang gibt der Objektivfüllfaktor T das Verhältnis zwischen dem $1/e^2$ -Strahldurchmesser und dem Durchmesser der Objektiv-Eingangsapertur an [Hel05]. Die Herleitung von Gleichung (3.5) ist durch die zugrunde liegende skalare Beugungstheorie streng genommen nur für eine $NA < 0,8$ gültig. Im Falle hoher numerischer Aperturen ($NA \geq 0,8$) ist zur Berechnung der Punktspreizfunktion die vektorielle

Debye-Theorie notwendig [Gu00]. Jedoch kann die skalare Beugungstheorie auch in diesem Bereich als gute Näherung verwendet werden [Paw06].

Bei der 2PM entspricht die Punktspreizfunktion $\text{PSF}_{2\text{PM}}$ für eine großflächige Detektion mit einem Photomultiplier (siehe Abschnitt 3.1.4) dem Quadrat der Beleuchtungs-Punktspreizfunktion PSF_{B} [Hel05]. Die Auflösungen in lateraler (ω_{xy}) und axialer (ω_{z}) Richtung werden typischerweise als volle Halbwertsbreiten (FWHM, *engl.: full width at half maximum*) der jeweiligen Ausdehnung von $\text{PSF}_{2\text{PM}}$ definiert; für hohe numerische Aperturen ($\text{NA} \geq 0,8$) gilt [Zip03b]

$$\omega_{\text{xy},2\text{PM}} = \frac{0,38\lambda}{\text{NA}^{0,91}} \quad ; \quad \omega_{\text{z},2\text{PM}} = 0,63\lambda \frac{1}{n - \sqrt{n^2 - \text{NA}^2}}, \quad (3.6)$$

wobei n der Brechungsindex des Mediums ist. Bei einer schwächeren Fokussierung hängt ω_{xy} linear von der NA ab [Zip03b].

Das Anregungsvolumen der 2PM ergibt sich bei Approximation von $\text{PSF}_{2\text{PM}}$ durch ein dreidimensionales gaußförmiges Volumen in guter Näherung zu [Zip03b]:

$$V_{2\text{PM}} = \pi^{3/2} \omega_{\text{xy},2\text{PM}}^2 \omega_{\text{z},2\text{PM}}. \quad (3.7)$$

Konventionelle numerische Aperturen sowie Wellenlängen für die 2PM liegen im Bereich von $\text{NA} = 0,8$ bis $1,3$ bzw. $\lambda = 750$ bis 850 nm [Koe00]. Damit ergibt sich ein Anregungsvolumen von ungefähr $0,5$ Femtolitern.

3.1.4. Experimentelle Umsetzung

Ein Zweiphotonenmikroskop besteht aus einer Strahlquelle, einem scannenden Mikroskop und einem hochempfindlichen Detektor. Als Strahlquelle wird am häufigsten ein Titan:Saphir-Oszillator mit einer Repetitionsrate um 80 MHz verwendet, die den Fluoreszenzlebensdauern entspricht und damit einen Kompromiss zwischen hoher Anregungseffizienz und dem Eintreten von Sättigung bietet [Hel05]. Die Wellenlänge kann in einem großen Bereich zwischen 680 und 1080 nm kontinuierlich durchgestimmt werden, was die Anregung einer Vielzahl von Fluorophoren ermöglicht [Xu96].

Da die Zweiphotonen-Absorptionswahrscheinlichkeit proportional zu \overline{P}^2/τ ist (siehe Gleichung (3.2)), sind zur Minimierung der mittleren Leistung \overline{P} und damit der Wärmeerzeugung möglichst geringe Pulsdauern vorteilhaft [Den06]. Jedoch verursacht die Gesamtdispersion der Optiken im Strahlengang (siehe Gleichung (4.1)) eine zeitliche Verbreiterung der Laserpulse, die von der ursprünglichen Pulsdauer abhängt. Bei einer Pulsdauer von 100 fs am Laserausgang werden in der Objektivenebene im Allgemeinen die kürzestmöglichen Pulsdauern zwischen 200 und 300 fs erreicht [Koe00]. Obwohl Prismen- oder Gitteraufbauten eine Dispersionskompensation ermöglichen [Gui97, Mue98], wird bei der 2PM häufig darauf verzichtet und eine Pulsdauer um 100 fs am Laserausgang verwendet [Koe00]. Dies ist auf die vernachlässigbare Temperaturerhöhung in der Probe in diesem Regime [Sch98] und die häufig mehr als quadratische Abhängigkeit der Photobleichungs- bzw. Phototoxizitätsrate

von der Laserintensität zurückzuführen [Pat00] (siehe Abschnitt 3.1.2). Folglich wird das Prozessfenster für eine Zweiphotonenanregung von Fluorophoren ohne photochemische Schädigungen mit sinkender Pulsdauer im Femtosekundenbereich stetig kleiner [Koe00].

Der Anregungsstrahlengang beinhaltet mindestens ein Abschwächersystem zur Einstellung der Laserleistung, zwei Galvanometer-Scanspiegel zur lateralen Positionierung des Strahls, ein Linsensystem zur Anpassung des Strahldurchmessers und ein Mikroskop-Objektiv zur Fokussierung des Laserstrahls. Bei der Anpassung des Strahldurchmessers muss darauf geachtet werden, dass die Eingangsapertur des Mikroskop-Objektivs „überfüllt“ ist, um die beugungsbedingte Auflösungsgrenze zu erreichen [Tsa02].

Die von der Probe emittierte Fluoreszenz im sichtbaren Wellenlängenbereich wird wiederum vom Mikroskop-Objektiv aufgesammelt und zum Detektor geleitet. Wegen ihrer geringen Preise, großen Detektionsflächen und hohen Sensitivität haben sich Photomultiplier als Standard etabliert [So00]. Zur Detektion der Fluoreszenz existieren prinzipiell zwei Möglichkeiten: (1) die Fluoreszenz wird von den Scanspiegeln zurückreflektiert und hinter einer Lochblende detektiert („descanned detection“) oder (2) die gesamte vom Objektiv aufgesammelte Fluoreszenz wird direkt zum Detektor geführt („whole-area detection“) [Hel05]. Durch die Integration einer Lochblende gelangen nur die ungestreuten (ballistischen) Fluoreszenzphotonen auf den Detektor, so dass mit diesem Detektionsschema die maximale Eindringtiefe in stark streuenden Proben um mehr als eine Größenordnung geringer ist [LG08]. Daher wird für die 2PM nahezu ausschließlich das „whole-area“-Detektionsschema verwendet [Hel05].

3.1.5. Vorteile der 2PM gegenüber der konfokalen Mikroskopie

Bei der konfokalen Mikroskopie werden die Fluorophore im Gegensatz zur 2PM durch lineare Absorption angeregt. Dadurch ist die gesamte Fluoreszenzintensität jeder axialen Ebene in der Probe konstant, so lange die Abschwächung des zur Anregung verwendeten Laserstrahls mit zunehmender Probentiefe vernachlässigbar ist (siehe Abbildung 3.4) [So00]. Folglich wird bei der konfokalen Mikroskopie typischerweise das „descanned“-Detektionsschema mit einer Lochblende verwendet, um die außerhalb des fokalen Volumens generierten Fluoreszenzphotonen nicht zu detektieren [Paw06, Ntz10]. Diese Lochblende wird bei der 2PM nicht benötigt, da die Zweiphotonenanregung auf das fokale Volumen beschränkt ist (siehe Abbildung 3.4). Deren hohe Lokalisierung bleibt auch in der Tiefe stark streuender Proben erhalten, da die Dichte der gestreuten Photonen zu gering ist, um ein signifikantes Fluoreszenzsignal zu erzeugen. Aus diesem Grund ermöglicht nur die 2PM eine Detektion von Fluoreszenzphotonen, die im fokalen Volumen generiert und vor der Aufsammlung durch das Objektiv mehrfach gestreut worden sind [Hel05].

Wegen der Beschränkung der Zweiphotonenabsorption auf das fokale Volumen wird die Photobleichung außerhalb des Fokus und damit die Gesamttoxizität für die Probe minimiert. Dies resultiert in einer signifikanten Erhöhung der Zellvitalität bei der Beobachtung zellulärer Prozesse über einen längeren Zeitraum [Squ99]. Jedoch wurde in Abschnitt 3.1.2 gezeigt,

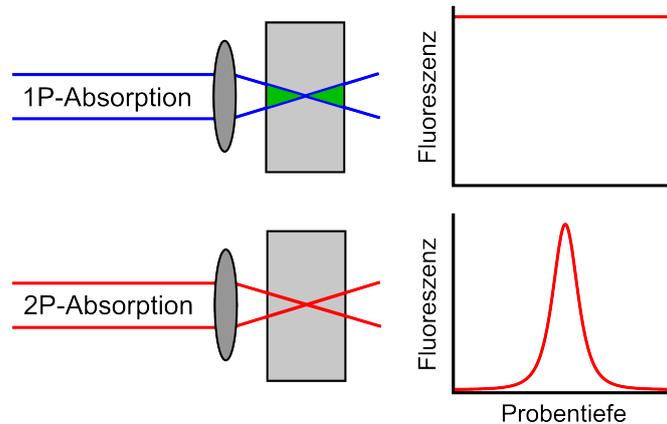


Abbildung 3.4.: Während die Fluoreszenzintensität jeder axialen Ebene bei der Einphotonenabsorption über die gesamte Probentiefe konstant bleibt, ist die Zweiphotonenabsorption auf das fokale Volumen beschränkt. Folglich ist bei der 2PM keine Lochblende zur Unterdrückung der außerhalb des Fokus erzeugten Fluoreszenz notwendig (nach [Lak06]).

dass die Photobleichung in der fokalen Ebene bei nichtlinearer Anregung deutlich stärker ist. Daher sind bei der 2PM zur langfristigen Beobachtung einer Ebene die Minimierung der Anregungsleistung und die Maximierung der Sammeleffizienz von Fluoreszenzphotonen von noch größerer Bedeutung als bei der konfokalen Mikroskopie [Zip03b].

Die quantenmechanischen Übergangsregeln für die Zweiphotonenabsorption unterscheiden sich von denen für die Einphotonenabsorption. Für isolierte Atome ist nur einer der beiden Prozesse möglich. Jedoch werden diese strikten Auswahlregeln durch die komplexe Molekülstruktur der Fluorophore gelockert [McC71]. Daher tritt bei Fluorophoren neben der linearen Absorption bei der Wellenlänge λ im Allgemeinen auch eine Zweiphotonenabsorption bei $\lambda/2$ auf, so dass die Zweiphotonen-Absorptionsspektren deutlich breiter sind. Zudem wird in vielen Fällen eine Blauverschiebung dieser Spektren beobachtet [Bes02]. Ursächlich hierfür ist der starke Überlapp der Wellenfunktionen vom Grundzustand S_0 und virtuellen Zwischenzustand bzw. virtuellen Zwischenzustand und angeregten Zustand S_1 , während die direkte Einphotonenanregung von S_0 nach S_1 sehr unwahrscheinlich ist [Mor81, Lou83].

Das Zweiphotonen-Absorptionsspektrum liegt beim überwiegenden Teil der Fluorophore im Bereich des *diagnostischen Fensters* zwischen 600 und 1100 nm, wo die Streuung und Absorption deutlich geringer als im sichtbaren Bereich sind [Koe00]. Infolgedessen ist die Eindringtiefe bei der 2PM im Vergleich zur konfokalen Mikroskopie typischerweise um einen Faktor Zwei bis Drei höher, so dass die 2PM insbesondere für die Bildgebung in tiefen Gewebeschichten von Vorteil ist [Ntz10].

Im Gegensatz zur konfokalen Mikroskopie wird bei der 2PM ungefähr die doppelte Anregungswellenlänge verwendet. Dies resultiert in einer Verschlechterung der beugungsbedingten Auflösungsgrenze (siehe Gleichung (3.6)), bei Annahme einer ideal punktförmigen

Lochblende im konfokalen Mikroskop um einen Faktor Zwei [Den06]. Jedoch ist in der Praxis ein endlicher Blendendurchmesser nötig, um ausreichend Fluoreszenzphotonen aus dem fokalen Volumen zu detektieren. Dadurch verschlechtert sich die Auflösung eines „realistischen“ konfokalen Mikroskops. Theoretische und experimentelle Untersuchungen haben gezeigt, dass dies eine vergleichbare Auflösung beider Mikroskopietechniken zur Folge hat [Gau99, Cox04].

3.1.6. Zusammenfassung

Bei Intensitäten zwischen 10^6 und $10^9 \frac{\text{W}}{\text{cm}^2}$ werden Fluorophore durch Multiphotonenabsorption angeregt. Dieser Prozess ist auf das fokale Volumen beschränkt, so dass photochemische Schädigungen in angrenzenden Bereichen minimiert werden. Zudem führt die Verwendung des NIR-Bereichs im Vergleich zur linearen Anregung mit sichtbaren Wellenlängen zur signifikanten Erhöhung der Eindringtiefe in biologischen Medien, ohne eine Verschlechterung des Auflösungsvermögens zu verursachen. Folglich hat sich die MPM zum Standardverfahren für die minimal-invasive Bildgebung tiefer Gewebeschichten entwickelt.

3.2. Femtosekundenlaser-Nanochirurgie

Bei Laserintensitäten oberhalb von 10^{10} bis 10^{13} W/cm^2 und Wellenlängen im NIR-Bereich tritt in (transparenten) biologischen Medien nichtlineare Absorption auf. Diese resultiert in einer Änderung des intrinsischen Absorptionskoeffizienten α und ist damit von dem Prozess der Multiphotonenabsorption abzugrenzen, der keinen Einfluss auf α hat [QS07]. Die hohen elektrischen Feldstärken führen zur Ionisation und Entstehung eines Elektronenplasmas im fokalen Volumen, was abhängig von der Plasmaenergie eine mechanische Disruption oder chemische Dissektion von biologischem Material induziert; im Falle hoher numerischer Aperturen ($\text{NA} \geq 0,8$) mit einer Präzision im Nanometerbereich [Vog05].

Da biologische Medien im Allgemeinen zu 70 bis 90 % aus Wasser bestehen [Yam90], hat sich dessen Verwendung als Modellsubstanz für die fs-Nanochirurgie etabliert [Ken95, Vog05]. Zur Beschreibung der Erzeugung freier Elektronen wird Wasser als ein amorpher Halbleiter betrachtet [Wil76, Sac91]. Dabei entspricht die Anregungsenergie Δ der notwendigen Energie für den Übergang vom Grundzustand (Valenzband) in das Leitungsband [Ken95]. Die in das Leitungsband angeregten Elektronen werden als „quasi-frei“ bezeichnet. Analog zu bisherigen Veröffentlichungen werden im Folgenden die Bezeichnungen „freies“ und „quasi-freies“ Elektron bzw. „Anregung in das Leitungsband“ und „Ionisation“ synonym verwendet. Zudem wird aus Komplexitätsgründen die Dissoziation von Wassermolekülen aus dem angeregten Zustand vernachlässigt [Vog05, QS07].

Für ultrakurze Laserpulse muss die Anregungsenergie Δ durch das effektive Ionisationspotential $\tilde{\Delta}$ ersetzt werden [Kel65, Ken95]

$$\tilde{\Delta} = \Delta + \frac{e^2 F^2}{4m'\omega^2}, \quad (3.8)$$

welches die Oszillationsenergie des Elektrons mit der Ladung e und der reduzierten Exzitonmasse m' im elektrischen Feld des Lasers mit der Amplitude F und der Kreisfrequenz ω berücksichtigt. Bei den in dieser Arbeit verwendeten Laserintensitäten um 10^{16} W/cm² und Wellenlängen um 800 nm ergibt sich ein effektives Ionisationspotential von etwa $\tilde{\Delta} = 6,6$ eV für Wasser [Vog05].

In diesem Abschnitt werden zunächst ausführlich die fundamentalen Mechanismen zur Erzeugung eines Elektronenplasmas in Wasser mit ultrakurzen Laserpulsen beschrieben. Anschließend werden die bei der fs-Nanochirurgie verwendeten Parameterregimes dargestellt und voneinander abgegrenzt.

3.2.1. Photoionisation

Bei der Bestrahlung von Wasser mit einem ultrakurzen Laserpuls im NIR-Bereich liefert die Photoionisation die ersten freien („Seed“-) Elektronen. Diese wird in zwei voneinander unabhängige Prozesse unterteilt: Multiphotonenionisation und Tunnelionisation [Kel65].

Die Multiphotonenionisation bezeichnet die quasi-simultane Absorption mehrerer Photonen (siehe Abschnitt 3.1.1), deren Gesamtenergie das effektive Ionisationspotential $\tilde{\Delta}$ überschreitet. Dies resultiert in der Erzeugung eines freien Elektrons. Die Rate der Multiphotonenionisation η_{MPI} ist proportional zur k -ten Ordnung der Laserintensität I ($\eta_{\text{MPI}} \sim I^k$), wobei k die minimal notwendige Photonenanzahl für diesen Prozess darstellt. Im verwendeten Wellenlängenbereich von 680 bis 1080 nm ergibt sich bei etwa 750 nm ein Übergang von der vierten ($k = 4$) zur fünften ($k = 5$) Ordnung.

Die Tunnelionisation ist ein quantenmechanischer Effekt und beschreibt das Tunneln gebundener Elektronen durch die Coulomb-Potentialbarriere in einen ungebundenen (freien) Zustand. Die dafür notwendige Absenkung des Potentials für das Elektron im Valenzband wird durch das elektrische Feld des Lasers verursacht (siehe Abbildung 3.5). Im Vergleich zur Multiphotonenionisation ist die Abhängigkeit der Tunnelrate von der eingestrahlichten Intensität deutlich schwächer [Sch01].

Die relativen Anteile von Multiphotonen- und Tunnelionisation hängen sowohl von der Laserintensität als auch -frequenz ab. Zur Unterscheidung der jeweiligen Regimes führte Keldysh den nach ihm benannten Keldysh-Parameter γ ein [Kel65]

$$\gamma = \frac{\omega}{\omega_t} = \frac{\omega}{eF} \sqrt{m' \Delta} = \frac{\omega}{e} \sqrt{\frac{m' \Delta c \epsilon_0 n}{2I}}, \quad (3.9)$$

wobei ϵ_0 die Dielektrizitätskonstante, I die Laserintensität und $1/\omega_t$ die Tunnelzeit für die Durchquerung der atomaren Potentialbarriere darstellen. Folglich beschreibt γ das Verhältnis zwischen der Tunnelzeit und der Oszillationszeit der elektromagnetischen Welle. Mit steigender Laserintensität nimmt das Inverse der Tunnelzeit und damit die Tunnelwahrscheinlichkeit zu. Bei geringen Laserfrequenzen und/oder hohen Laserintensitäten ($\gamma \ll 1$) dominiert daher die Tunnelionisation (siehe Abbildung 3.5). Im Gegensatz dazu gilt $\gamma \gg 1$ für hohe Laserfrequenzen und/oder geringe Laserintensitäten. In diesem Bereich werden

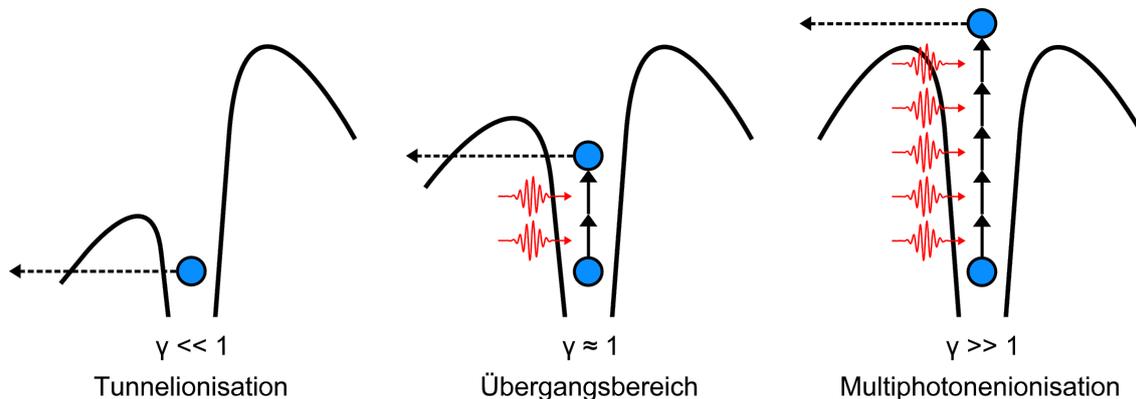


Abbildung 3.5.: Die relativen Anteile von Tunnel- und Multiphotonenionisation werden durch den Keldysh-Parameter γ bestimmt. Für $\gamma \ll 1$ und $\gamma \gg 1$ dominiert die Tunnel- bzw. die Multiphotonenionisation. Bei $\gamma \approx 1$ entstehen Seed-Elektronen durch eine Mischung aus Multiphotonenabsorption und Tunnelionisation (nach [Sch01]).

Seed-Elektronen ausschließlich durch Multiphotonenionisation erzeugt [Vog05, QS07]. Beim Übergang zwischen beiden Bereichen führt eine Mischung aus Multiphotonenabsorption und Tunnelionisation zum Übergang gebundener Elektronen in einen freien Zustand [Sch01].

Die in dieser Arbeit verwendeten Laserintensitäten um 10^{16} W/cm² und Wellenlängen um 800 nm ergeben einen Keldysh-Parameter von etwa 4,3; der dominierende Prozess der Photoionisation ist daher die Multiphotonenionisation.

3.2.2. Kaskadenionisation

Ein durch Multiphotonen- oder Tunnelionisation erzeugtes freies Elektron im Leitungsband (siehe Abschnitt 3.2.1) kann in einem nicht-resonanten Prozess, der sogenannten inversen Bremsstrahlung, einzelne Photonen absorbieren. Wegen der Impuls- und Energieerhaltung ist dieser lineare Prozess nur im Zuge einer Kollision mit einem Ion/Molekül möglich. Die Photonenenergie wird dabei in kinetische Energie des Elektrons umgewandelt. Nach der sequentiellen Absorption mehrerer Photonen ist die kinetische Energie ausreichend, um bei einer Kollision mit einem Molekül ein weiteres freies Elektron zu erzeugen (siehe Abbildung 3.6). Dieser Prozess wird als Stoßionisation bezeichnet [Vog05].

Die notwendige kinetische Energie E_{Krit} für eine Stoßionisation ist auf Grund der Impuls- und Energieerhaltung größer als das effektive Ionisationspotential $\tilde{\Delta}$ [Rid99]:

$$E_{\text{Krit}} = \left(\frac{1 + 2\mu}{1 + \mu} \right) \tilde{\Delta}. \quad (3.10)$$

Der Parameter μ bezeichnet das Verhältnis zwischen den Massen des quasi-freien Elektrons im Leitungsband und des „Lochs“ im Valenzband. Bei Annahme von $\mu = 1$ für Wasser entspricht $E_{\text{Krit}} = 1,5 \cdot \tilde{\Delta}$ [Vog05]. Nach der Stoßionisation wird die restliche Energie von $0,5 \cdot \tilde{\Delta}$

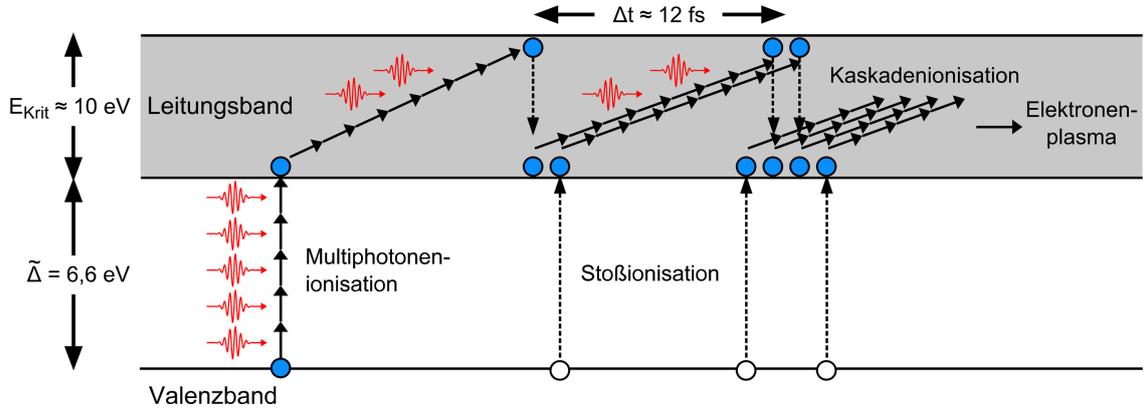


Abbildung 3.6.: Die durch Multiphotonenionisation in das Leitungsband angeregten Seed-Elektronen gewinnen durch inverse Bremsstrahlung genügend kinetische Energie, um weitere freie Elektronen durch Stoßionisation zu erzeugen. Die mehrfache Wiederholung dieser Sequenz resultiert in einem lawinenartigen Anstieg der Dichte freier Elektronen und damit in der Entstehung eines Elektronenplasmas (nach [Vog05]).

auf die Kollisionspartner verteilt [Rid99]. Die beiden entstandenen freien Elektronen gewinnen wiederum durch inverse Bremsstrahlung genügend kinetische Energie für je eine weitere Stoßionisation. Die mehrfache Wiederholung dieser Prozesse resultiert in einem lawinenartigen Anstieg der Anzahl freier Elektronen („Kaskadenionisation“) und schließlich in der Erzeugung eines Elektronenplasmas (siehe Abbildung 3.6) [Vog05]. Die Rate der Kaskadenionisation η_{KI} ist proportional zur Rate der inversen Bremsstrahlung und damit proportional zur Laserintensität ($\eta_{KI} \sim I$) [QS07].

Aus dem effektiven Ionisationspotential von etwa $\tilde{\Delta} = 6,6$ eV für Wasser ergibt sich $E_{Krit} \approx 10$ eV. Folglich ist für eine Stoßionisation bei einer Wellenlänge um 800 nm die sequentielle Absorption von sieben Photonen notwendig. Bei Annahme von 1,7 fs als Zeitspanne zwischen zwei Absorptionsprozessen [Sun05, Vog05] beträgt die minimale Zeit für eine Verdopplung der Anzahl freier Elektronen daher ungefähr 12 fs.

3.2.3. Zeitliche Dynamik der Plasmaerzeugung

Die zeitliche Entwicklung der Dichte freier Elektronen $\rho(t)$ im Leitungsband während eines ultrakurzen Laserpulses wird durch folgende Ratengleichung beschrieben [Noa98, Vog05]:

$$\frac{d\rho(t)}{dt} = \eta_{PI} + \eta_{KI} \cdot \rho(t) - \eta_D \cdot \rho(t) - \eta_R \cdot \rho(t)^2. \quad (3.11)$$

Der erste Term entspricht der Erzeugungsrate freier Elektronen durch Photoionisation, während der zweite Term den Beitrag der Kaskadenionisation darstellt. Die beiden letzten Terme kennzeichnen die Verluste durch Elektronendiffusion aus dem fokalen Volumen bzw. durch Rekombination der freien Ladungsträger. Während die Kaskadenionisation und der

Diffusionsverlust proportional zur Anzahl bereits erzeugter freier Elektronen sind, hängt die Rekombinationsrate quadratisch von $\rho(t)$ ab, da dieser Prozess zwei geladene Teilchen (Elektron und Loch) beinhaltet. Bei der Verwendung von Laserpulsen im Femtosekundenbereich sind die Diffusions- und Rekombinationsverluste wegen der im Pikosekundenbereich zugrunde liegenden Zeitskala vernachlässigbar [Vog05].

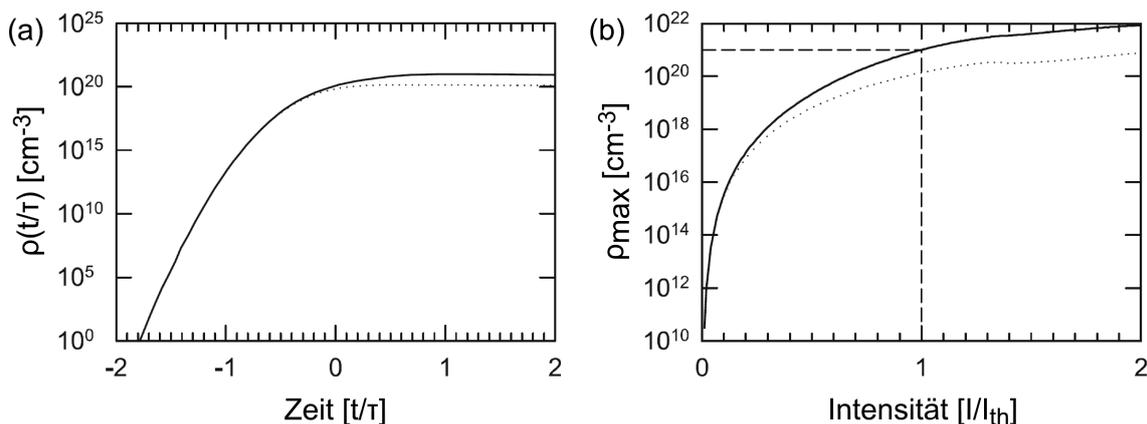


Abbildung 3.7.: Numerische Berechnungen (a) der zeitlichen Entwicklung von $\rho(t)$ an der Schwelle des optischen Durchbruchs I_{th} und (b) der maximalen Dichte freier Elektronen ρ_{max} in Abhängigkeit der Laserintensität I für einen Laserpuls mit $\tau = 100$ fs und $\lambda = 800$ nm. Der Anteil der Multiphotonenionisation ist jeweils als gepunktete Linie dargestellt. (b) Bei Intensitäten unterhalb von 20 % der Durchbruchschwelle werden freie Elektronen ausschließlich durch Multiphotonenionisation erzeugt [Vog05].

Im Verlauf eines Femtosekundenpulses steigt die Dichte freier Elektronen $\rho(t)$ kontinuierlich an (siehe Abbildung 3.7a) [Vog05]. Anschließend wird die Energie des Elektronenplasmas innerhalb weniger zehn Pikosekunden durch strahlungslose Rekombination und Stoßprozesse an die schweren Ionen, Atome und Moleküle in der unmittelbaren Umgebung abgegeben [Sch02a, Gar05]. Diese Zeitspanne ist deutlich geringer als die akustische Laufzeit vom Zentrum bis zum Rand des Fokus. Folglich ist während der Thermalisierung keine akustische Relaxation möglich, so dass der thermoelastische Stress auf das fokale Volumen beschränkt ist. Daraus resultiert die Emission einer Stoßwelle, die bei Überschreitung der maximalen Zugfestigkeit von Wasser die Bildung einer Kavitationsblase hervorruft [Noa98, Vog03]. Die dafür notwendige kritische Dichte des Elektronenplasmas von $0,2 \cdot 10^{21} \text{ cm}^{-3}$ wird im Allgemeinen als experimentelle Schwelle des „optischen Durchbruchs“ bezeichnet [Vog05]. In diesem Bereich entspricht der Kavitationsblasen-Durchmesser der räumlichen Ausdehnung der Dichte freier Elektronen mit einer geringen Lebensdauer von etwa 10 ns [Vog08].

Während für Nanosekundenpulse an der Schwelle des optischen Durchbruchs 10^9 mal mehr freie Elektronen durch Kaskaden- als durch Multiphotonenionisation erzeugt werden, sinkt dieses Verhältnis mit abnehmender Pulsdauer kontinuierlich auf einen Faktor 12 bei 100 fs

[Vog05]. Ursächlich hierfür ist die im Vergleich zur Kaskadenionisation stärkere Abhängigkeit der Photoionisation von der Laserintensität (siehe Abschnitt 3.2.1), so dass letztere mit abnehmender Pulsdauer an Einfluss gewinnt. Infolgedessen tritt im Femtosekundenbereich kein Mangel an Seed-Elektronen auf und die maximale Dichte freier Elektronen ρ_{\max} kann in Abhängigkeit der Laserintensität sehr fein reguliert werden (siehe Abbildung 3.7b). Bei Intensitäten unterhalb von etwa 20 % der Durchbruchschwelle ist der Anteil der Kaskadenionisation an der Plasmaerzeugung vernachlässigbar [Vog05].

Die radialsymmetrische, räumliche Verteilung der maximalen Dichte freier Elektronen $\rho_{\max}(r, z)$ ist für sehr hohe numerische Aperturen ($NA \geq 1$) ebenfalls axialsymmetrisch [Arn07] und lässt sich aus der räumlichen Intensitätsverteilung des Laserpulses berechnen. Bei Annahme einer gaußschen Intensitätsverteilung $I(r, z)$ und einer Abhängigkeit von der k -ten Ordnung der Laserintensität ergibt sich $\rho_{\max}(r, z)$ zu [Vog05]

$$\rho_{\max}(r, z) = \rho_{\max}[I(0, 0)] \cdot \exp \left[-2k \left(\frac{r^2}{a^2} + \frac{z^2}{b^2} \right) \right], \quad (3.12)$$

wobei k die minimal notwendige Photonenzahl für eine Multiphotonenionisation und r sowie z die auf die Halbachsen a und b normierten Koordinaten in radialer bzw. axialer Richtung sind. Auf Grund der nichtlinearen Abhängigkeit von der Laserintensität ist das Volumen von $\rho_{\max}(r, z)$ deutlich kleiner als das fokale Volumen. Beispielsweise ist bei einer Wellenlänge von 800 nm die quasi-simultane Absorption von fünf ($k = 5$) Photonen notwendig. Daher ist die räumliche Ausdehnung von $\rho_{\max}(r, z)$ sowohl in radialer als auch in axialer Richtung um den Faktor $\sqrt{5}$ kleiner (siehe Abbildung 3.8). Dies resultiert in einer Verringerung des ionisierten Volumens um den Faktor $(\sqrt{5})^3 \approx 11,2$.

In allen bisher veröffentlichten Modellen zur Berechnung der zeitlichen Entwicklung der Dichte freier Elektronen wurde Wasser als Modellsubstanz für biologische Medien verwendet und der Einfluss von Bio- oder Farbstoffmolekülen vernachlässigt [Ken95, Vog05, Arn07]. Jedoch wird in biologischen Medien die Bandstruktur von Wasser durch die Anwesenheit von Bio- oder Farbstoffmolekülen modifiziert, so dass neue Energieniveaus entstehen können, die einen signifikanten Einfluss auf die lineare und/oder nichtlineare Absorption haben [Vog05]. Mehrere Experimente haben gezeigt, dass diese Modifikation zu einer signifikanten Verringerung der notwendigen Laserenergie für eine Schädigung einzelner Zellen führt [Koe01, Din07, Wil07]. Deswegen wurde dieser Aspekt im Rahmen der vorliegenden Arbeit mittels entsprechender Experimente genauer untersucht (siehe Kapitel 5).

3.2.4. Parameterregimes für die Nanochirurgie

Für die fs-Nanochirurgie wird im Allgemeinen ein Titan:Saphir-Laser verwendet [Vog05]. Ursächlich hierfür sind dessen exzellente mechanische Stabilität, die Möglichkeit zur simultanen MPM [Sac05] sowie die geringe lineare Absorption in biologischen Medien im Titan:Saphir-Wellenlängenbereich zwischen 680 und 1080 nm [Bou86, Eic10]. Da die maximale Laserleistung bei ungefähr 800 nm erreicht wird (siehe Abbildung 4.2), hat sich diese Wellenlänge in

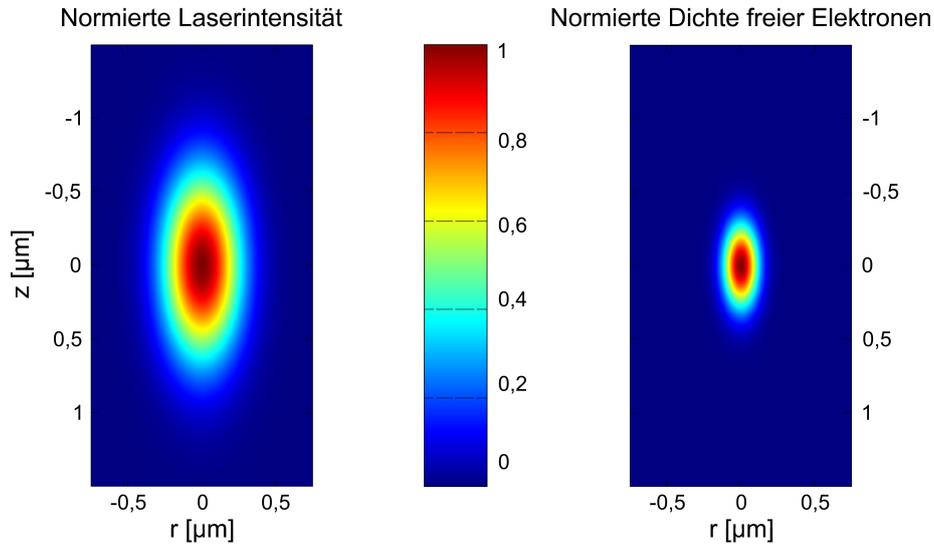


Abbildung 3.8.: Normierte Laserintensität und Dichte freier Elektronen bei einer Wellenlänge von 800 nm und einer NA von 1,3. Die Berechnungen wurden nach Gleichung (3.12) durchgeführt. Das Volumen der maximalen Dichte freier Elektronen ist um den Faktor $(\sqrt{5})^3 \approx 11,2$ kleiner als das fokale Volumen.

den letzten Jahren als Standard etabliert [Vog05]. Um eine Manipulation tierischer Zellen mit einem Durchmesser von 10 bis 30 μm auf subzellulärer Ebene zu erreichen, ist eine räumliche Präzision im Nanometerbereich notwendig [Kar10]. Dies wird durch eine Fokussierung des Laserstrahls mit Mikroskop-Objektiven hoher numerischer Apertur ($NA \geq 0,8$) erreicht. In diesem Bereich liegt die Schwelle des optischen Durchbruchs weit unterhalb der Schwelle für eine nichtlineare Pulspropagation. Folglich sind Effekte wie Selbstfokussierung und Filamentierung bei der fs-Nanochirurgie vernachlässigbar [Sch01, Gab08].

Zwei verschiedene Parameterregimes haben sich für die fs-Nanochirurgie etabliert. Einerseits werden lange Pulszüge aus Laseroszillatoren mit einer Repetitionsrate um 80 MHz und Pulsenergien weit unterhalb der Durchbruchschwelle (≈ 1 nJ) sowohl für die Transfektion [Tir02, Zei03, Ste06, Koh07, Bau08, Uch08b] als auch für die intrazelluläre Dissektion [Koe99b, Oeh00, Sac05, Sup05, Shi05, Uch08a, Nii08, AM10] verwendet (siehe Abbildung 3.9). In diesem sogenannten „Low-Density-Plasma“-Regime werden zwischen 40000 [Koe99b] und mehreren Millionen Pulsen [Tir02, Zei03] auf eine feste Position appliziert. Die Dissektion von biologischem Material erfolgt dabei durch die Akkumulation von chemischen und thermischen Effekten (siehe Abschnitt 3.3).

Neben dem Low-Density-Plasma-Regime werden Verstärkersysteme mit einer Repetitionsrate von 1 kHz und Pulsenergien oberhalb der Durchbruchschwelle (≈ 2 bis 40 nJ) für die Disruption subzellulärer Kompartimente benutzt, wie beispielsweise einzelne Axone in Nervenzellen [Wat04, Yan04, Hei05, Kum06, Bou07]. Die dafür notwendige Anzahl von

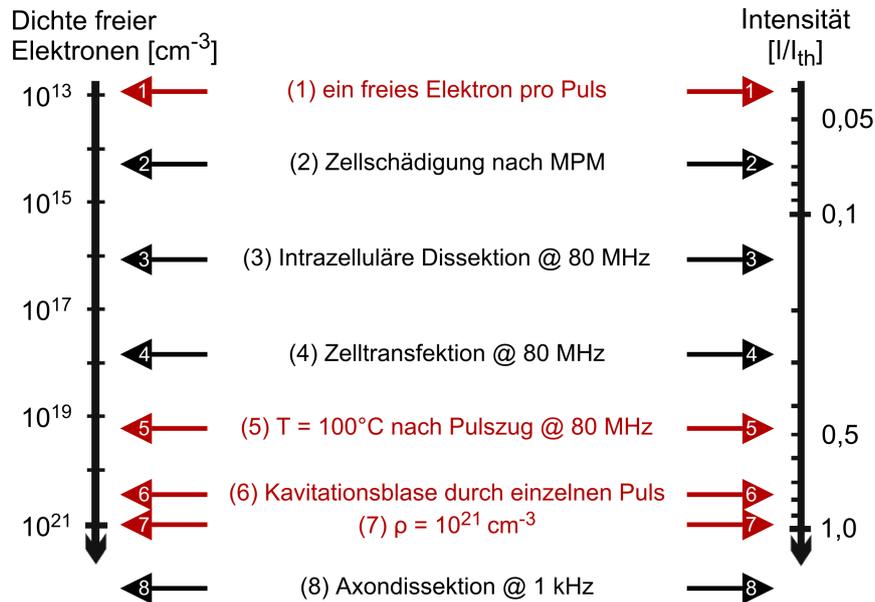


Abbildung 3.9.: Überblick der physikalischen Phänomene (rot) und Anwendungen (schwarz) der fs-Nanochirurgie. Diese sind jeweils mit der dazugehörigen Dichte freier Elektronen und der auf die Schwelle des optischen Durchbruchs normierten Intensität dargestellt (nach [Vog05]).

Laserpulsen variiert zwischen Eins [Bou07] und mehreren Hundert [Hei05]. In diesem Regime ist der thermoelastische Stress im fokalen Volumen hoch genug, um Kavitationsblasen mit Durchmessern in Nanometerbereich zu erzeugen, die zu einer mechanischen Zerstörung des biologischen Materials führen. Durch die sehr hohe Dichte freier Elektronen wird die mechanische Disruption wie im Low-Density-Plasma-Regime zusätzlich von chemischen Effekten begleitet. Thermische Effekte sind wegen der geringen Repetitionsrate von 1 kHz vernachlässigbar [Vog05].

3.2.5. Zusammenfassung

Oberhalb einer Intensitätsschwelle von 10^{10} bis 10^{13} W/cm² führen die hohen Photondichten ultrakurzer Laserpulse im fokalen Volumen transparenter, wässriger Medien zur Ionisation und damit zur Erzeugung von Seed-Elektronen. In Abhängigkeit des Keldysh-Parameters geschieht dies entweder durch Multiphotonen- oder Tunnelionisation. Die Seed-Elektronen werden durch inverse Bremsstrahlung beschleunigt, bis die kinetische Energie zur Stoßionisation weiterer Moleküle ausreicht. Die mehrfache Wiederholung dieser Sequenz liefert einen lawinenartigen Anstieg der Anzahl freier Elektronen, der die Entstehung eines Elektronenplasmas mit einer von der Laserintensität abhängigen Dichte zur Folge hat. Oberhalb einer kritischen Dichte freier Elektronen von $0,2 \cdot 10^{21}$ cm⁻³ wird eine Kavitationsblase erzeugt, die in biologischen Proben eine mechanische Materialdisruption verursacht. Jedoch

tritt auch bei deutlich geringeren Dichten im Low-Density-Plasma-Regime eine chemische Dissektion des Materials auf. Aus diesem Grund werden im Bereich der fs-Nanochirurgie beide Parameterregimes verwendet.

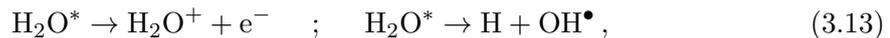
3.3. Low-Density-Plasma-Regime

Unterhalb der Schwelle des optischen Durchbruchs werden freie Elektronen in einem großen Intensitätsbereich erzeugt (siehe Abbildung 3.7b). Dieses sogenannte Low-Density-Plasma-Regime ermöglicht eine Steuerung der Mechanismen für die Laser-induzierte Dissektion von biologischem Material [Vog05]. Bei sehr geringen Intensitäten dominieren direkte Multiphotonen- und freie Elektronen-induzierte chemische Effekte. Am oberen Ende des Regimes treten zusätzlich thermische Effekte auf, die zur Entstehung einer langlebigen Gasblase führen.

3.3.1. Chemische Effekte

Die bei der fs-Nanochirurgie auftretenden chemischen Effekte werden in zwei Gruppen aufgeteilt [Vog05]. Zum einen werden durch Strukturänderungen der Wassermoleküle ROS erzeugt, die sehr effizient mit Biomolekülen reagieren. Zum anderen wird die molekulare Struktur der Biomoleküle durch Anlagerung eines freien Elektrons modifiziert. Die Akkumulation dieser Effekte über mehrere Laserpulse resultiert in einer vollständigen Zerstörung des biologischen Materials im fokalen Volumen.

Während eines fs-Laserpulses werden gebundene Elektronen im Valenzband von Wasser durch die simultane Absorption mehrerer Photonen in das Leitungsband angeregt (siehe Abschnitt 3.2.1). Dies resultiert entweder in einer Ionisation oder Dissoziation der Wassermoleküle [Nik83]



wobei im letztgenannten Prozess das Wasserstoffatom H und das Hydroxyl-Radikal OH^\bullet entstehen. Die erzeugten freien Elektronen werden innerhalb von 300 fs hydratisiert [Wie80]. Das kationische Wasserradikal H_2O^+ ist instabil und wird durch die Reaktion mit einem Wassermolekül innerhalb von 100 fs in ein Oxonium-Ion H_3O^+ und ein OH^\bullet -Radikal umgewandelt [Nik83]. Folglich sind bis zum Ende des fs-Laserpulses hydratisierte Elektronen, H_3O^+ -Ionen, OH^\bullet -Radikale und Wasserstoffatome entstanden. Diese reagieren innerhalb von Nano- bis Mikrosekunden sehr effizient mit Biomolekülen (siehe Abschnitt 2.2.1) sowie dem im Wasser gelösten Sauerstoff [Nik83, Hut85, Ora85]. Bei hohen Radikal-Konzentrationen führt dies zu signifikanten Zellschädigungen bis hin zum apoptotischen Zelltod [Koe97, Koe99a, Tir01].

Nach der Anregung in das Leitungsband von Wasser gewinnen freie Elektronen durch inverse Bremsstrahlung an kinetischer Energie (siehe Abschnitt 3.2.2). Die beschleunigten freien Elektronen können in antibindende Orbitale von Biomolekülen eingefangen

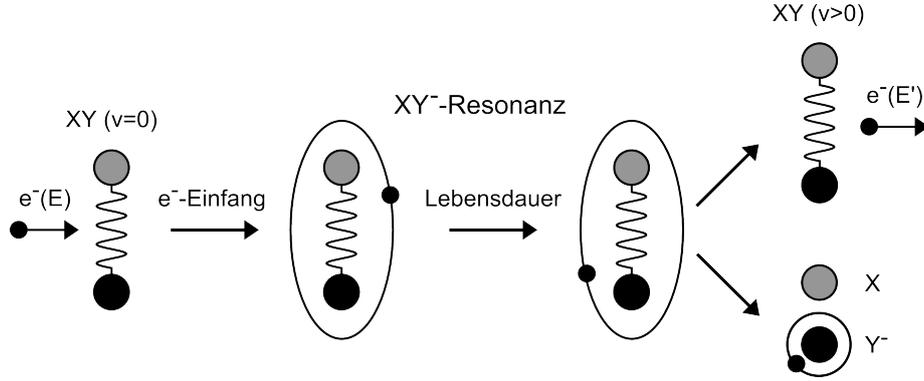


Abbildung 3.10.: Die Elektronenanlagerung an Biomoleküle im vibronischen Grundzustand ($XY (v = 0)$) erfolgt bei einer molekulspezifischen Resonanzenergie. Das resultierende transiente anionische Molekül (XY^-) kann entweder durch Abgabe eines Elektrons in ein vibronisch angeregtes Molekül ($XY (v > 0)$) übergehen oder in zwei Fragmente dissoziieren ($X + Y^-$) (nach [Vog05]).

werden, wenn für die kinetische Energie der Elektronen ein ausreichender Überlapp der Wellenfunktionen von Grund- und anionischem Zustand existiert. Dieser Prozess wird als Elektronenanlagerung bezeichnet (siehe Abbildung 3.10). Nach einer Zeitspanne von 10^{-15} bis 10^{-11} s zerfällt das transiente anionische Molekül durch Freisetzung eines Elektrons in ein vibronisch angeregtes Molekül oder dissoziiert durch Aufbrechen von Molekülbindungen in zwei Fragmente [Vog05]. Verschiedene Experimente haben gezeigt, dass die Resonanzenergie der Elektronenanlagerung an Biomoleküle wie beispielsweise DNA etwa 3 bis 20 eV beträgt [Bou00, Hue03, San05]. Diese Werte liegen im Bereich der notwendigen Energie für eine Stoßionisation von Wassermolekülen (siehe Abschnitt 3.2.2). Infolgedessen ist die Elektronenanlagerung bei der fs-Nanochirurgie von großer Bedeutung.

3.3.2. Thermische Effekte

Die Deponierung der Laserenergie in biologisches Material erfolgt nach der Plasmaerzeugung (siehe Abschnitt 3.2.3). Um zwischen zwei aufeinander folgenden Laserpulsen ein thermodynamisches Gleichgewicht zu erreichen, muss das Inverse der Repetitionsrate größer als die charakteristische thermische Diffusionszeit t_D sein [Vog03]. Bei Verwendung hoher numerischer Aperturen ($NA \geq 0,8$) hat das fokale Volumen eine nahezu sphärische Form [Vog05], so dass t_D durch [Car59]

$$t_D = \frac{d^2}{8\kappa} \quad (3.14)$$

gegeben ist, wobei d den Durchmesser der Dichteverteilung freier Elektronen $\rho_{\max}(r, z)$ und κ die Temperaturleitfähigkeit des Mediums darstellen. Mit einer $NA = 1,3$ und einer Wellenlänge von 800 nm ergibt sich für Wasser eine thermische Diffusionszeit von $t_D = 100$ ns.

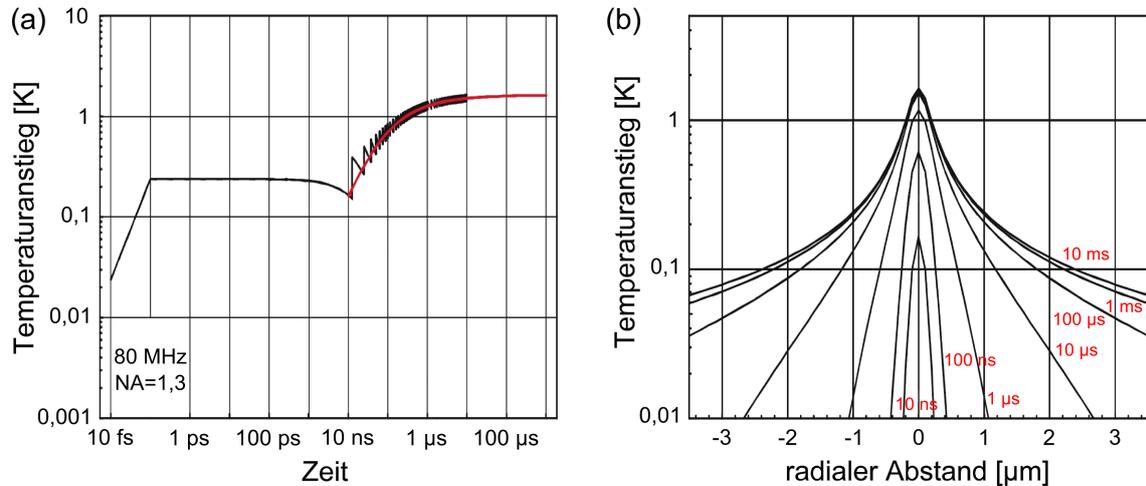


Abbildung 3.11.: Zeitliche Entwicklung des (a) Temperaturanstiegs im Zentrum des fokalen Volumens und (b) der radialen Verteilung des Temperaturanstiegs bei fs-Laserbestrahlung von Wasser mit einem Pulszug ($\tau = 100$ fs, $\lambda = 800$ nm, $f = 80$ MHz, $E = 1$ J cm $^{-3}$). (a) Die mittlere Temperatur (rote Linie) erreicht nach ungefähr 1 ms den Sättigungswert. (b) Die räumliche Ausdehnung der Temperaturverteilung bleibt mit der Zeit in etwa konstant [Vog05].

Folglich akkumuliert thermische Energie im fokalen Volumen bei Repetitionsraten oberhalb von 10 MHz.

Die räumliche Temperaturverteilung am Ende eines fs-Laserpulses entspricht der räumlichen Verteilung der Dichte freier Elektronen (siehe Abbildung 3.8). Während eines Pulszugs mit einer Repetitionsrate von 80 MHz nimmt die Temperatur im fokalen Volumen stetig zu, bis nach ungefähr 1 ms eine Sättigung erreicht wird (siehe Abbildung 3.11a) [Vog05]. Die Sättigungstemperatur t_{Sat} wird dabei entscheidend von der NA beeinflusst. Für eine $NA = 0,6$ ist t_{Sat} um den Faktor 45 höher als die Temperatur nach einem Puls. Dieses Verhältnis sinkt bei einer $NA = 1,3$ auf den Faktor 6,8. In diesem Fall bleibt die räumliche Ausdehnung der Temperaturverteilung mit der Zeit in etwa konstant (siehe Abbildung 3.11b). Ursächlich hierfür ist das geringe fokale Volumen im Sub-Femtoliterbereich, welches eine schnelle Diffusion von thermischer Energie ermöglicht [Vog05].

Während der fs-Nanochirurgie mit einer 80 MHz-Repetitionsrate und einer $NA = 1,3$ bei Raumtemperatur ($T = 20^\circ\text{C}$) wird die Siedetemperatur von Wasser ($T = 100^\circ\text{C}$) erreicht, wenn einzelne Pulse einen jeweiligen Temperaturanstieg von $11,8^\circ\text{C}$ verursachen. Dafür ist eine maximale Dichte freier Elektronen von $\rho_{\text{max}} = 2,1 \cdot 10^{19}$ cm $^{-3}$ notwendig; dies entspricht ungefähr der Hälfte der Schwellenintensität des optischen Durchbruchs [Vog05]. Bei Überschreitung der Siedetemperatur von Wasser entsteht im fokalen Volumen eine Gasblase, deren Wachstum vom Wärmetransport aus der Flüssigkeit an die Blasengrenzfläche limitiert wird. Im Gegensatz dazu ist die Dynamik von Kavitationsblasen nur von der Trägheit der Flüssigkeit begrenzt [Flo65, Ple77, Nig81]. Dies führt zu deutlich unterschiedlichen

Wachstums- bzw. Kollapszeiten. Während Gasblasen eine Lebensdauer im Millisekunden- bis Sekundenbereich haben [Sup05, Ste06, Bau09], liegt diese für Kavitationsblasen im Nanosekundenbereich [Vog08].

Für die Entstehung langlebiger Gasblasen in biologischen Medien sind neben der Akkumulation von thermischer Energie auch freie Elektronen-induzierte, chemische Prozesse verantwortlich (siehe Abschnitt 3.3.1). Ursächlich hierfür ist die hohe Dichte freier Elektronen in diesem Intensitätsbereich. Beide Effekte resultieren in einer Dissoziation von Biomolekülen in flüchtige, nicht-kondensierbare Fragmente [Vog05]. Die langlebigen Gasblasen dienen bei der Lasertransfektion als Indikator für eine erfolgreiche Permeabilisierung der Zellmembran [Ste06, Bau08, Uch08a]. Jedoch treten für Gasblasen-Durchmesser oberhalb von 2 μm gehäuft Änderungen der Zellmorphologie auf, die eine signifikante Abnahme der Zellvitalität zur Folge haben [Ste06].

4. Experimentelle Methoden zur MPM-gesteuerten Nanochirurgie

Ultrakurze Laserpulse mit Pulslängen im Femtosekundenbereich ermöglichen sowohl eine hochauflösende Bildgebung als auch eine Nanochirurgie biologischer Proben auf der Basis nichtlinearer optischer Prozesse (siehe Kapitel 3). Durch die Wahl eines geeigneten Parametersatzes wird eine chemische Materialdissektion in lebenden Zellen mit einer Präzision im Nanometerbereich erreicht [Vog05]. Die MPM kann dabei zur Detektion der exakten Position der Zielstruktur und zur Beobachtung der Zellvitalität nach einer Dissektion eingesetzt werden.

In diesem Kapitel wird zunächst der im Rahmen dieser Arbeit realisierte, experimentelle Aufbau zur MPM-gesteuerten Nanochirurgie beschrieben. Anschließend wird die Leistung des Systems analysiert und anhand von Simulationen mit vorherigen Aufbauten verglichen. Die daraus gewonnenen Erkenntnisse waren für die Erzeugung präziser intrazellulärer Schnitte in den Kapiteln 5 und 6 von großer Bedeutung.

4.1. Experimenteller Aufbau

Der experimentelle Aufbau zur MPM-gesteuerten Nanochirurgie war in drei Bereiche unterteilt: Strahlmodulation, Scaneinheit und Mikroskop (siehe Abbildung 4.1). Neben den Eigenschaften des verwendeten Femtosekunden-Lasersystems werden diese im folgenden Abschnitt jeweils ausführlich beschrieben.

4.1.1. Femtosekunden-Lasersystem

Die Parameter des fs-Lasersystems haben einen großen Einfluss auf die Effizienz der Multiphotonenabsorption bei der MPM (siehe Abschnitt 3.1.1) und die Erzeugung freier Elektronen bei der Nanochirurgie (siehe Abschnitt 3.2).

Das in dieser Arbeit verwendete Lasersystem war der *Chameleon Ultra II* (Coherent, Santa Clara, USA), dessen Spezifikationen von allen kommerziell erhältlichen Geräten den größten Überlapp mit dem Low-Density-Plasma-Regime bieten (vgl. Tabelle 4.1 und Abschnitt 3.2.4). Der *Chameleon Ultra II* besteht aus einem optischen Resonator mit Titan:Saphir-Kristall als Verstärkungsmedium und einem die Pumpleistung liefernden *Verdi*-Laser (Coherent). Im *Verdi* befindet sich ein Nd:YVO₄-Kristall, der durch Laserdioden gepumpt wird und Laserstrahlung bei einer Wellenlänge von 1064 nm emittiert. Durch einen in den *Verdi*

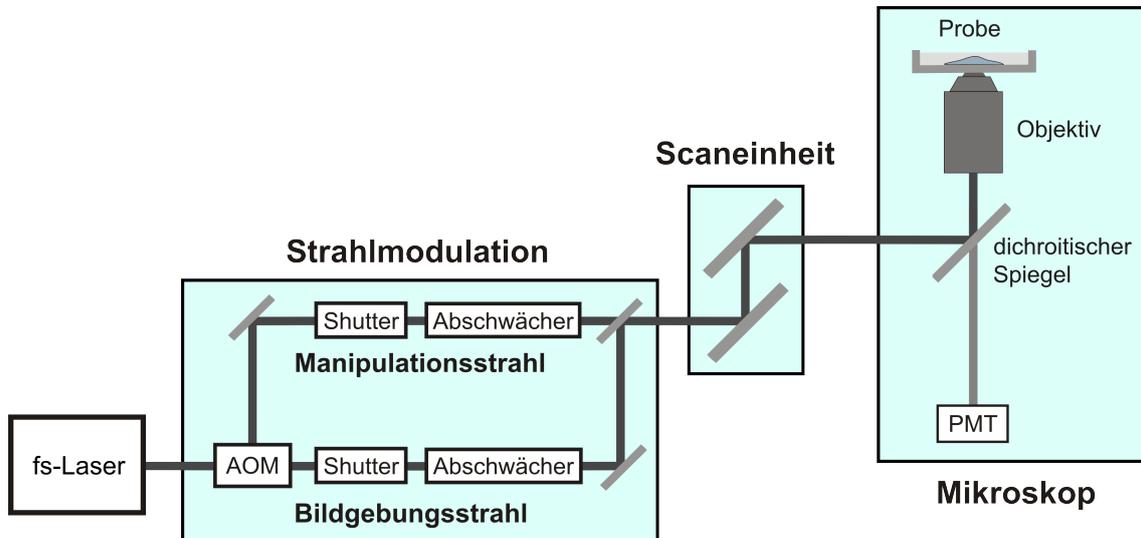


Abbildung 4.1.: Schematische Darstellung des experimentellen Aufbaus zur MPM-gesteuerten Nanochirurgie, der in drei Bereiche unterteilt war: Strahlmodulation, Scaneinheit und Mikroskop. AOM: Akusto-optischer Modulator, PMT: Photomultiplier.

integrierten LBO-Kristall wird diese frequenzverdoppelt und in den optischen Resonator geleitet. Die Verwendung der Kerr-Linsen-Modenkopplung im Resonator ermöglicht die Erzeugung ultrakurzer Laserpulse im Femtosekundenbereich [Spe91]. Spezifiziert ist der *Chameleon Ultra II* mit einer Pulsdauer von 155 fs bei einer Wellenlänge von 790 nm und einer Repetitionsrate von 80 MHz (siehe Tabelle 4.1).

Der große Vorteil von Titan:Saphir-Lasern besteht in ihrem großen Durchstimmbereich, welcher durch die starke Kopplung der elektronischen Energiezustände an die Gitterschwingungen im Titan:Saphir-Kristall entsteht [Sal08]. Zudem ermöglicht die starke Trennung von Emissions- und Absorptionsband eine nahezu verlustfreie Propagation des Laserstrahls im Resonator. In Kombination mit der extrem guten Wärmeleitfähigkeit des Kristalls werden daher vergleichsweise hohe Laserleistungen bei gleichzeitig exzellenter mechanischer Stabilität erreicht [Eic10]. Die Wellenlänge des *Chameleon Ultra II* lässt sich zwischen 680 und 1080 nm in 1 nm-Schritten variieren. Dabei hängt die mittlere Leistung von der Wellenlänge ab und beträgt maximal etwa 3,5 W bei 790 nm (siehe Abbildung 4.2).

4.1.2. Strahlmodulation

Die relativen Anteile chemischer und thermischer Effekte im Low-Density-Plasma-Regime werden entscheidend von der Repetitionsrate des Lasers beeinflusst (siehe Abschnitt 3.3) [Eat05, Kue09]. Um den Einfluss dieses Parameters bei der intrazellulären Dissektion zu evaluieren (siehe Kapitel 5), wurde ein akusto-optischer Modulator (AOM) in den

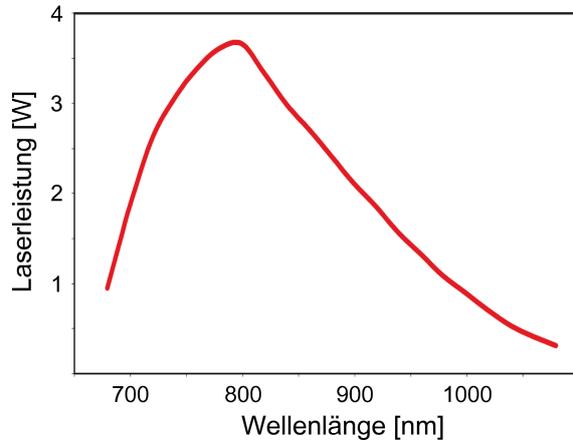


Abbildung 4.2.: Der *Chameleon Ultra II* ist von 680 bis 1080 nm durchstimmbar und hat bei 790 nm die höchste mittlere Leistung.

Parameter

mittlere Leistung ¹	> 3,5W
Wellenlängenbereich	680 - 1080 nm
Pulsdauer ¹	155 fs
Repetitionsrate	80 MHz
Strahldurchmesser	$1,2 \pm 0,2$ mm
Strahlelliptizität	0,9 - 1,1
Beugungsmaßzahl	$M^2 < 1,1$

¹ Werte gelten für $\lambda = 790$ nm.

Tabelle 4.1.: Spezifikationen des *Chameleon Ultra II*. Die Pulsdauer beträgt bei $\lambda = 790$ nm ungefähr 155 fs.

Strahlengang integriert. Dieser besteht aus einem optischen Kristall, in dem einfallende Laserstrahlen an einer Schallwelle gebeugt werden [Sal08].

In dieser Arbeit wurde der *Pulse Select* (*APE GmbH*, Berlin, Deutschland) verwendet, der sowohl am Eingang als auch am Ausgang ein Brewster-Fenster zur Minimierung von Reflektionsverlusten beinhaltet. Im *Pulse Select* wurde der Laserstrahl durch gekrümmte Spiegel in einen AOM fokussiert und danach wieder kollimiert. Die Beugungseffizienz wurde bei einer Wellenlänge von 800 nm experimentell zu etwa 60 % bestimmt. Aus dem Beugungswinkel von $1,1 \pm 0,1^\circ$ ergab sich eine Schallwellenlänge von ungefähr $40 \mu\text{m}$ [Sal08].

Die Kombination aus *Pulse Select*-Treiberelektronik und externer Triggerung über eine *Lab View*-basierte Software ermöglichte die Selektion von Einzelpulsen aus einem Pulszug mit einstellbarem Teilungsverhältnis zwischen 1:20 und 1:80000. Somit konnte die 80 MHz-Repetitionsrate des *Chameleon Ultra II* auf bis zu 1 kHz verringert werden. Unabhängig vom Teilungsverhältnis und von der Wellenlänge ergab eine Strahlprofilmessung mit der *WinCam D-UCD23* (*DataRay*, Bella Vista, USA), dass die Elliptizität des gebeugten Laserstrahls im Vergleich zum ungebeugten Laserstrahl um etwa 10 % größer war. Ursächlich hierfür waren die Frequenzabhängigkeit des Braggwinkels und der daraus resultierende Unterschied im Ablenkwinkel zwischen den spektralen Anteilen des Laserpulses [Ngo01].

Beide Laserstrahlen wurden jeweils getrennt voneinander durch einen mechanischen Shutter (*SH10*, *Thorlabs*, Newton, USA) und ein Abschwächersystem geführt, bestehend aus einer $\lambda/2$ -Platte (*AHWP05M-980*, *Thorlabs*) sowie einem polarisierenden Strahlteilerwürfel (*NT49-870*, *Edmund Optics*, Barrington, USA). Mit dem Shutter wurde die Bestrahlungszeit der Probe eingestellt, welche gerätespezifisch auf mindestens 10 ms begrenzt war. In einem nachfolgenden polarisierenden Strahlteilerwürfel wurden die Laserstrahlen wieder überlagert und zur Scaneinheit geleitet.

4.1.3. Scaneinheit und Mikroskop

Nach der Überlagerung des gebeugten und ungebeugten Laserstrahls aus dem *Pulse Select* wurde der Strahldurchmesser durch ein Teleskopsystem ($f_1 = 25$ mm und $f_2 = 50$ mm, Abstand $d_1 = f_1 + f_2$) aus Achromaten (*Thorlabs*) um einen Faktor Zwei vergrößert, um die nachfolgenden Scanspiegel mit einer nutzbaren Fläche von jeweils 9 mm² optimal auszuleuchten (siehe Abbildung 4.3).

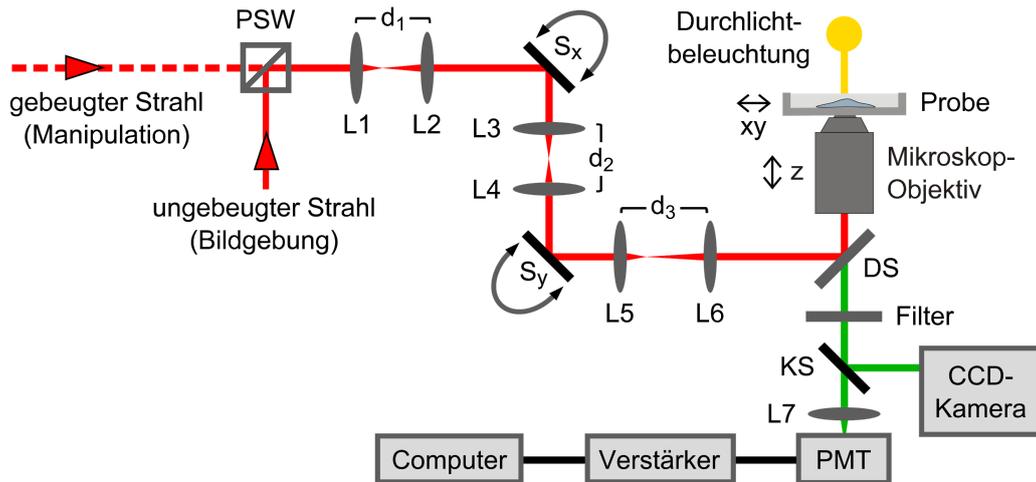


Abbildung 4.3.: Strahlengang in der Scaneinheit und im Mikroskop zur Anregung sowie Detektion von Fluoreszenz. PSW: polarisierender Strahlteilerwürfel, L1–L7: achromatische Linsen mit $f_1 = f_7 = 25$ mm, f_2 bis $f_5 = 50$ mm und $f_6 = 150$ mm, S_x und S_y : Galvanometer-Scanspiegel, DS: dichroitischer Spiegel, KS: Kippspiegel.

Zum Abrastern der Probe in der x-y-Ebene wurden zwei Galvanometer-Scanspiegel (*6210H, Cambridge Technology, Lexington, USA*) verwendet, die einen mechanischen Ablenkewinkel von $\pm 20^\circ$ bieten und von einem Hochgeschwindigkeits-Analogausgangsmodul (*PCI-6711, National Instruments, Austin, USA*) angesteuert wurden. Beim Scanvorgang ist eine minimale Bewegung des Laserstrahls, demzufolge eine homogene Laserintensität, in der Ebene der Eingangsapertur des Objektivs von entscheidender Bedeutung [Tsa02]. Daher bildete ein Teleskopsystem mit einer 1-fach Vergrößerung ($f_3 = f_4 = 50$ mm, Abstand $d_2 = 2f_3$) aus Achromaten (*Thorlabs*) den Drehpunkt des ersten Scanspiegels auf den zweiten Scanspiegel ab. Der Abstand beider Scanspiegel zu diesem „Relaysystem“ entsprach dabei jeweils der Brennweite f_3 . Analog wurde der Drehpunkt des zweiten Scanspiegels auf die Eingangsapertur des Objektivs abgebildet.

Um die volle numerische Apertur des Objektivs zu nutzen, muss der $1/e^2$ -Strahldurchmesser mindestens dem Durchmesser der Objektiv-Eingangsapertur entsprechen [Tsa02]; dieser lag bei den in dieser Arbeit häufig verwendeten Objektiven zwischen 6 und 10 mm (siehe Tabelle 4.2). Gleichzeitig waren möglichst geringe Verluste an der Eingangsapertur notwendig,

um eine ausreichend hohe Laserfluenz im fokalen Volumen zu erreichen. Infolgedessen wurde ein Teleskopsystem aus Achromaten (*Thorlabs*) mit einer 3-fach Vergrößerung ($f_5 = 50$ mm und $f_6 = 150$ mm, Abstand $d_3 = f_5 + f_6$) als Kompromiss gewählt, das sich wiederum im Abstand der jeweiligen Brennweiten zum zweiten Scanspiegel bzw. Objektiv befand. Dadurch ergab sich ein mit der *WinCam D-UCD23 (DataRay)* gemessener $1/e^2$ -Strahldurchmesser von 6,5 mm in der Objektivebene.

Tabelle 4.2.: Spezifikationen und Anwendungen der im Rahmen dieser Arbeit häufig verwendeten Mikroskop-Objektive (*Carl Zeiss AG, Jena, Deutschland*).

	EC Plan-Neofluar	C-Achroplan	Plan-Neofluar
Vergrößerung	20x	40x	100x
Numerische Apertur	0,5	0,8	1,3
Arbeitsabstand	2 mm	1,7 mm	0,2 mm
Eingangsapertur	8 mm	10 mm	6 mm
Immersion	-	Wasser	Öl
Brechungsindex	1	1,33	1,52
laterale Auflösung ¹	545 nm	335 nm	215 nm
axiale Auflösung ¹	3385 nm	1695 nm	620 nm
primäre Anwendung	Zellfusion	Nanochirurgie	Nanochirurgie

¹ Werte wurden nach Gleichung (3.6) für $\lambda = 720$ nm berechnet.

Zur Bildgebung und Dissektion biologischer Proben wurden die überlagerten Laserstrahlen in ein invertiertes Mikroskop (*Axiocvert 100, Carl Zeiss AG*) eingekoppelt. Ein dichroitischer Spiegel (*HC 670 SP, Semrock, Rochester, USA*) im Reflektorschieber des Mikroskops mit einer Reflektivität von mehr als 90 % im NIR-Bereich sowie einer Transmission von mehr als 95 % im sichtbaren Spektrum diente der Trennung von Laserstrahlung und Fluoreszenz. Nach der Reflektion am dichroitischen Spiegel wurde der Laserstrahl mit einem Objektiv in die Probe fokussiert, dessen Auswahl für jede Anwendung nach den Anforderungen an die numerische Apertur und Vergrößerung erfolgte (siehe Tabelle 4.2).

Die präzise Positionierung der Probe erfolgte in der x-y-Ebene durch einen motorisierten Verschiebetisch (*H117, Prior Scientific, Rockland, USA*) mit einer Genauigkeit von 1 μ m und in der z-Ebene durch ein piezoelektrisches Positioniersystem (*nanoMIPOS 300, Piezosystem Jena GmbH, Jena, Deutschland*) mit einer Genauigkeit von 100 nm. Für die Experimente mit biologischen Proben wurde optional eine Mikroskop-Inkubationskammer (*Okolab, Ottaviano, Italien*) auf dem Verschiebetisch befestigt, um optimale Kulturbedingungen außerhalb des Inkubators zu gewährleisten. Zur Bestimmung der Laserleistung in der Objektivebene wurde ein Halbleiterdetektor (*LM 2-VIS, Coherent*) in Kombination mit einem Leistungsmessgerät

(*Fieldmaster, Coherent*) verwendet. Die Leistung auf der Probe entsprach dem gemessenen Wert multipliziert mit der Transmission des Objektivs.

Die durch Multiphotonenabsorption induzierte Fluoreszenz im sichtbaren Wellenlängenbereich wurde vom Objektiv wieder aufgesammelt und am dichroitischen Spiegel transmittiert. Zur Unterdrückung der Laserstrahlung durchlief diese einen Sperrfilter (*HC 680/SP, Semrock*) mit einer Transmission von weniger als 10^{-8} im NIR-Bereich. Zusätzliche Bandpassfilter (*Brightline HC, Semrock*) im Filterrad des Mikroskops ermöglichten die Selektion einzelner Bereiche aus dem sichtbaren Spektrum zur Trennung von Fluoreszenzsignalen. Abschließend wurde die Fluoreszenz von einer kurzbrennweitigen Linse ($f_7 = 25$ mm) auf einen Photomultiplier (*R6357, Hamamatsu Photonics, Hamamatsu, Japan*) fokussiert, so dass diese beim Abrastern der Probe immer auf die Detektorfläche traf [Tsa02].

Der Photomultiplier lieferte einen zur Fluoreszenzintensität proportionalen Stromfluss. Dieser wurde im nachgeschalteten Verstärker (*C7319, Hamamatsu Photonics*) mit dem Faktor 10^6 V/A in eine Spannung umgewandelt und vom Analog-Digital-Wandler eines Multifunktions-Datenerfassungsmoduls (*PCI-6110, National Instruments*) digitalisiert. Eine innerhalb der Abteilung *Biomedizinische Optik* entwickelte *LabView*-basierte Software konvertierte dieses Signal in ein 8 bit-Graustufenbild. Die Software diente ferner der Ansteuerung der Probenpositionierung, des Lasers und der Shutter sowie der Einstellung der Parameter für Bildgebung und Dissektion biologischer Proben. Durch ein mäanderförmiges Abrastern der Probe konnte bei einer Bildgröße von 300×300 Pixel eine maximale Bildwiederholrate von 4 fps erreicht werden; dies entsprach einer Verweildauer von ungefähr $3 \mu\text{s}$ pro Pixel.

Zur konventionellen Lichtmikroskopie wurde eine Durchlichtbeleuchtung (*HAL 100, Carl Zeiss AG*) verwendet. Durch einen Kippspiegel im Mikroskopkorpus konnte das vom Objektiv transmittierte Licht zu einer CCD-Kamera (*CCD1300CB, VDS Vosskühler GmbH, Osnabrück, Deutschland*) abgelenkt werden. Die Kamerabilder wurden mit einer Bildwiederholrate von 10 fps aufgenommen.

4.2. Charakterisierung des experimentellen Aufbaus

In diesem Abschnitt wird der experimentelle Aufbau hinsichtlich seiner wichtigsten Parameter charakterisiert; zum einen die Pulsdauer und das Zeit-Bandbreiten-Produkt des Lasers und zum anderen die optische Auflösung und die Bildfeldgröße bzw. -homogenität des Multiphotonenmikroskops. Dabei wird durch Berechnungen sowie Simulationen ein Vergleich zwischen Theorie und Experiment gezogen.

4.2.1. Pulsdauer des Lasers

Ultrakurze Laserpulse im Femtosekundenbereich werden bei der Propagation in dispersiven Medien zeitlich verbreitert (siehe Anhang C). Die Auswirkung der Gruppengeschwindigkeitsdispersion (GVD, *engl.: group velocity dispersion*) auf die Pulsdauer τ_{in} eines gaußförmigen,

chirpfreien Laserpulses kann mit [Zip03b]

$$\tau_{\text{out}} = \tau_{\text{in}} \sqrt{1 + \left(\frac{4 \cdot \ln(2) D}{\tau_{\text{in}}^2} \right)^2} \quad (4.1)$$

abgeschätzt werden, wobei D die Gesamtdispersion aller Medien mit der Einheit $(\text{fs})^2$ und τ_{out} die resultierende Pulsdauer kennzeichnen. In Abbildung 4.4 ist die Gesamtdispersion des Aufbaus ohne Mikroskop-Objektive dargestellt, da deren Hersteller keine entsprechenden Werte veröffentlicht. Erkennbar ist analog zum Verlauf des Brechungsindex in Abbildung C.1a ein streng monotoner Abfall der Gesamtdispersion mit zunehmender Wellenlänge. Bei einer Wellenlänge von 800 nm ergab sich eine Gesamtdispersion von $D = 11700 \text{ fs}^2$, die mit anderen Multiphotonenmikroskopen (3000 bis 20000 fs^2) vergleichbar ist [Zip03b].

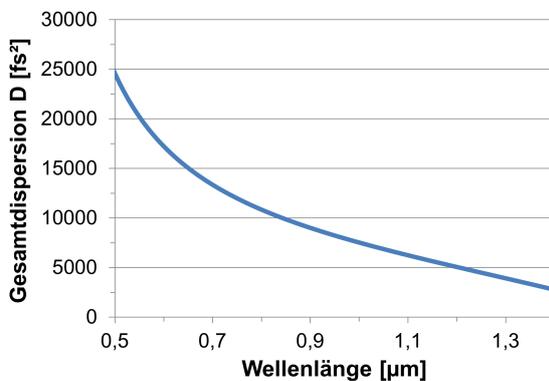


Abbildung 4.4.: Die Gesamtdispersion des experimentellen Aufbaus ohne Objektiv lag im Titan:Saphir-Wellenlängenbereich zwischen 7500 und 15000 fs^2 .

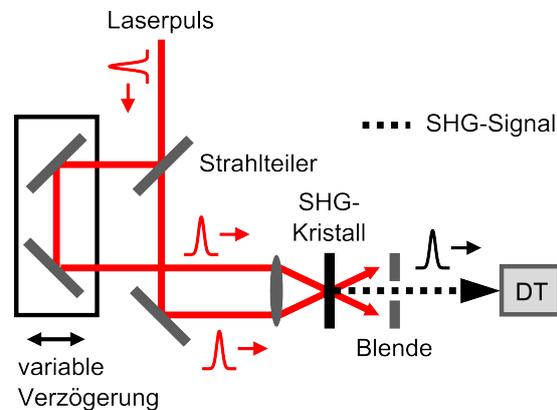


Abbildung 4.5.: Schematischer Aufbau für die Messung der Pulsdauer, welche auf der SHG in einem nichtlinearen Kristall basiert. DT: Detektor.

Zur Bestimmung der Dispersion der Mikroskop-Objektive und der Pulsdauer in der Probenebene wurden Autokorrelatoren (*Mini / Carpe, APE GmbH*) verwendet, da Pulse im Femtosekundenbereich zu kurz für eine direkte Messung mit elektronischen Detektoren sind [Sar09]. Das Prinzip der Autokorrelation basiert auf der Erzeugung der zweiten Harmonischen (SHG, *engl.: second harmonic generation*) in einem nichtlinearen Kristall durch zeitliche und räumliche Überlagerung zweier nicht-kollinearer Teilstrahlen (siehe Abbildung 4.5). Dabei durchläuft ein Teilstrahl eine variable Verzögerungsstrecke und die Effizienz der SHG wird in Abhängigkeit der Verzögerungszeit detektiert. Die daraus ermittelte Autokorrelationsfunktion zweiter Ordnung wird mit einem Korrekturfaktor G multipliziert, der von der Intensitätsverteilung des zu vermessenden Laserpulses abhängt. Für die gaußförmige Intensitätsverteilung des *Chameleon Ultra II* gilt $G = 0,71$ [Sar09]. Die Pulsdauer ergibt sich schließlich aus der FWHM des Gauß-Fits der modifizierten Autokorrelationsfunktion.

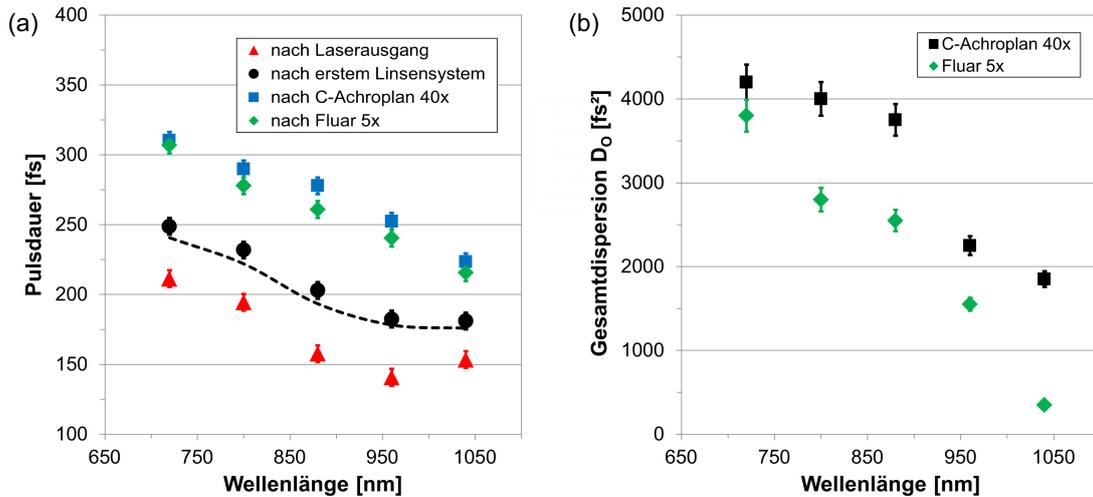


Abbildung 4.6.: (a) Die gemessene Pulsdauer nahm vom Laserausgang bis hinter das Mikroskop-Objektiv durch akkumulierende Dispersion stetig zu und stimmte gut mit berechneten Werten überein (gestrichelte Linie). (b) Die Gesamtdispersion der beiden verwendeten Mikroskop-Objektive sank kontinuierlich mit zunehmender Wellenlänge. In beiden Graphen geben die Fehlerbalken die jeweilige Messgenauigkeit an.

Die Pulsdauer wurde an drei markanten Punkten innerhalb des experimentellen Aufbaus bestimmt: (1) nach dem Laserausgang, (2) nach dem ersten Linsensystem und (3) hinter dem Mikroskop-Objektiv. Während für die beiden erstgenannten Punkte der Autokorrelator *Mini* verwendet wurde, konnte die Pulsdauerermessung hinter dem Objektiv durch den großen Divergenzwinkel des Laserstrahls nur mit dem *Carpe* durchgeführt werden. Da die Ausgangsleistung des Lasers deutlich oberhalb der Zerstörschwelle der Autokorrelatoren lag, musste diese am Messpunkt (1) durch ein zusätzliches Abschwächersystem, bestehend aus $\lambda/2$ -Platte und polarisierendem Strahlteilerwürfel, verringert werden.

Nach dem Laserausgang wurde eine Wellenlängen-abhängige Pulsdauer zwischen 140 und 210 fs mit einem Minimum bei 960 nm gemessen (siehe Abbildung 4.6a). Zwischen den Messpunkten nahm die Pulsdauer erwartungsgemäß zu. Dieser Zuwachs war stark Wellenlängen-abhängig und variierte am Punkt (3) für das *C-Achroplan*-Objektiv zwischen 45 % (720 und 1040 nm) und 80 % (960 nm). Für das *Fluar 5x*-Objektiv (*Carl Zeiss AG*) ergaben sich leicht geringere Werte von 40 bis 70 %.

Mit Gleichung (4.1) und der GVD aller optischen Komponenten (siehe Abbildung C.1b) konnte aus der experimentellen Pulsdauer an den Messpunkten (1) und (3) die theoretische Pulsdauer am Laserausgang sowie nach dem ersten Linsensystem und die Gesamtdispersion der Mikroskop-Objektive berechnet werden. Deutlich erkennbar ist die sehr gute Übereinstimmung zwischen den theoretischen und experimentellen Pulsdauern nach dem ersten Linsensystem (siehe Abbildung 4.6a). Im Vergleich zu Messpunkt (1) mit einem zusätzlichen

Abschwächersystem war die theoretische Pulsdauer am Laserausgang um weniger als 5 fs kleiner und stimmte im Wellenlängenbereich von 860 bis 1040 nm mit den Spezifikationen des Herstellers überein (siehe Tabelle 4.1). Die Gesamtdispersion der Mikroskop-Objektive D_O nahm entsprechend der GVD der anderen optischen Komponenten mit steigender Wellenlänge kontinuierlich ab (vgl. Abbildungen 4.6b und C.1b). Bei einer Wellenlänge von 800 nm betrug diese für das *C-Achroplan*-Objektiv etwa $D_O = 4000 \text{ fs}^2$ und für das *Fluar*-Objektiv ungefähr $D_O = 3000 \text{ fs}^2$. Analog zu anderen Multiphotonenmikroskopen hatte damit das Mikroskop-Objektiv den größten Anteil an der Gesamtdispersion [Koe00].

4.2.2. Zeit-Bandbreiten-Produkt

Die Verbindung von Zeit- und Frequenzraum mittels Fouriertransformation hat zur Folge, dass die FWHM des Laserspektrums und der Pulsdauer durch das Zeit-Bandbreiten-Produkt aneinander gekoppelt sind. Bei einer gaußförmigen Intensitätsverteilung im Zeitraum ergibt sich nach einer Fouriertransformation wiederum ein gaußförmiges Spektrum im Frequenzraum. In diesem Fall gilt für das Zeit-Bandbreiten-Produkt [Die96]

$$\Delta f \Delta \tau = \frac{c}{\lambda^2} \Delta \lambda \Delta \tau \geq 0,44 \quad (4.2)$$

mit der FWHM der spektralen Bandbreite Δf und der FWHM der Pulsdauer $\Delta \tau$. Dieses Produkt entspricht nur für einen sogenannten Bandbreiten-begrenzten Laserpuls dem minimalen Wert. Da sich die Pulsdauer bei der Propagation in einem dispersiven Medium ohne Beeinflussung des Spektrums vergrößert, nimmt das Zeit-Bandbreiten-Produkt mit steigender Gesamtdispersion kontinuierlich zu (siehe Gleichung 4.1).

Die spektrale Bandbreite des Lasers wurde nur an einer festen Position innerhalb des experimentellen Aufbaus mit einem Spektrometer bestimmt (*QE6500*, *Ocean Optics*, Dunedin, USA). Gerechtfertigt war dies durch den vernachlässigbaren Einfluss der Selbstphasenmodulation auf das Spektrum innerhalb der Spezifikationen des *Chameleon Ultra II* [Nib95, Nib96, Sch01]. Infolgedessen blieb die spektrale Bandbreite bis zur Objektivenebene unverändert, so dass die Messung vor dem ersten Linsensystem zur Berechnung des Zeit-Bandbreiten-Produkts an allen drei Messpunkten aus Abschnitt 4.2.1 verwendet wurde.

Bei Wellenlängen von 720 und 800 nm ergaben sich spektrale Bandbreiten von $\Delta \lambda = 4,3$ bzw. 5,8 nm (siehe Abbildung 4.7a). Damit berechnete sich das Zeit-Bandbreiten-Produkt am Laserausgang Wellenlängen-unabhängig zu 0,5. Folglich waren die Laserpulse des *Chameleon Ultra II* nach dem Verlassen des Resonators nahezu Bandbreiten-begrenzt. Zwischen den Messpunkten nahm das Zeit-Bandbreiten-Produkt durch die akkumulierende Gesamtdispersion kontinuierlich zu und betrug nach dem *C-Achroplan*-Objektiv ungefähr 0,8 (siehe Abbildung 4.7b).

4.2.3. Optische Auflösung des Multiphotonenmikroskops

In Abschnitt 3.1.3 wurde die beugungsbedingte Auflösungsgrenze für die 2PM dargestellt. Deren Herleitung basiert auf einer gleichmäßigen Ausleuchtung der Eingangsapertur des

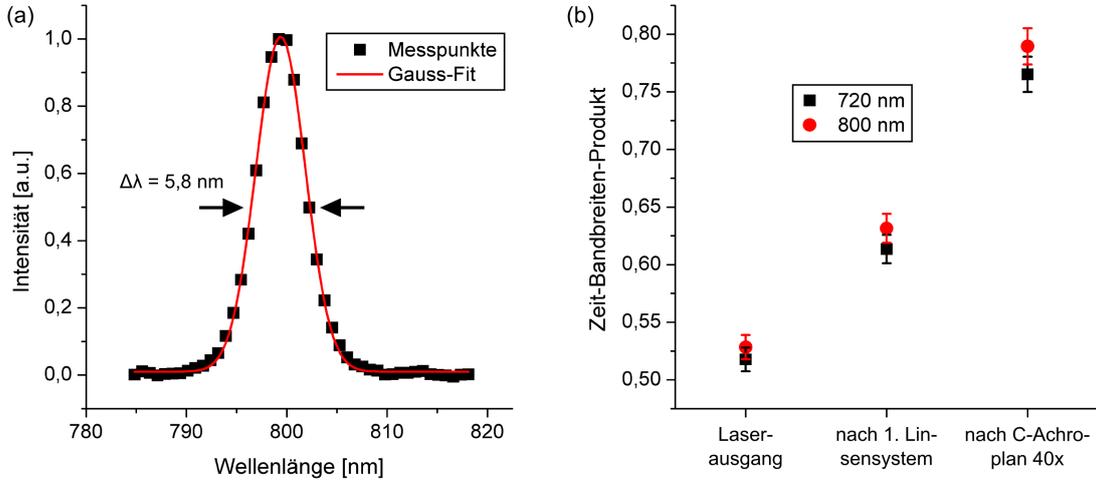


Abbildung 4.7.: (a) Die spektrale Bandbreite der Laserpulse betrug bei einer Zentralwellenlänge von 800 nm etwa $\Delta\lambda = 5,8$ nm. (b) Das Zeit-Bandbreiten-Produkt nahm Wellenlängenunabhängig vom Laserausgang bis zur Probenebene von 0,5 auf 0,8 zu.

Objektives mit einer ebenen Welle, die in einem idealen Punkt in der Bildebene konvergiert. Da die Komponenten eines experimentellen 2PM-Aufbaus dieser Idealisierung nicht entsprechen, wird die beugungsbegrenzte Auflösung nie vollständig erreicht. Jedes optische Element induziert Aberrationen, welche die Strahltaile vergrößern und damit die Auflösung verschlechtern [Paw06].

Zur Bestimmung der Auflösung eines 2PM-Aufbaus haben sich lumineszente Objekte mit Durchmessern unterhalb der Beugungsgrenze als Standard etabliert. Die Intensitätsverteilung der detektierten Punktspreizfunktion wird mit einem Gauß-Fit genähert und dessen FWHM als laterale und axiale Auflösung definiert (siehe auch Gleichung (3.6)) [Paw06]. Dabei ist zu beachten, dass die Größe der lumineszenten Objekte mit einem Durchmesser D durch Faltung mit der Intensitätsverteilung die detektierte Punktspreizfunktion (P_D) beeinflusst. Die tatsächliche Punktspreizfunktion (P_T) und damit die Auflösung ergibt sich aus der Beziehung $P_T = \sqrt{P_D^2 - D^2}$ [Row99]. Im Rahmen dieser Arbeit wurden chemisch hergestellte Gold-Nanopartikel mit $D = 79,4 \pm 6,4$ nm verwendet (*PGO-80, Kisker GmbH, Steinfurt, Deutschland*), die mit einer Konzentration von 10^{10} Partikel pro Milliliter Wasser in eine Glasboden-Petrischale (*μ Dish 35 mm, ibidi GmbH, Martinsried, Deutschland*) transferiert wurden. Da die Aufnahmezeit eines dreidimensionalen 2PM-Bilderstapels im Sekundenbereich lag, wurde die Probe eine Stunde lang getrocknet, um die Mobilität der Nanopartikel zu minimieren.

Die Punktspreizfunktion wurde bei einer Wellenlänge von 720 nm mit dem *Plan-Neofluar*-Objektiv ($NA = 1,3$) detektiert. Für die Erzeugung dreidimensionaler Bilderstapel erfolgte eine Überabtastung des Volumens, um die vollständige Bildinformation zu bewahren

(Nyquist-Shannon-Abtasttheorem) [Sha49]. Der Pixelabstand war in allen drei Dimensionen deutlich kleiner als die Hälfte der beugungsbedingten Auflösungsgrenze und wurde mit einer Mikrometerskala kalibriert. Dazu wurde die laterale Position des Laserstrahls in Abhängigkeit des mechanischen Ablenkungswinkels der Scanspiegel bestimmt.

Erwartungsgemäß wurde kein Unterschied zwischen der Auflösung in x- und y-Richtung beobachtet. Nach einer Mittelung über fünf Nanopartikel ergab sich eine laterale Auflösung von $\Delta x = 270 \pm 8$ nm und eine axiale Auflösung von $\Delta z = 700 \pm 38$ nm (siehe Abbildung 4.8). Diese Werte lagen nach Gleichung (3.6) ungefähr 25 bzw. 15 % über der beugungsbedingten Auflösungsgrenze. Die geringe Überfüllung der Eingangsapertur des *Plan-Neofluar*-Objektivs um 10 % konnte die Verschlechterung der Auflösung nur zu einem geringen Teil erklären [Tsa02, Hel05]. Vermutlich war diese größtenteils auf die von den Optiken im Strahlengang induzierten Aberrationen zurückzuführen.

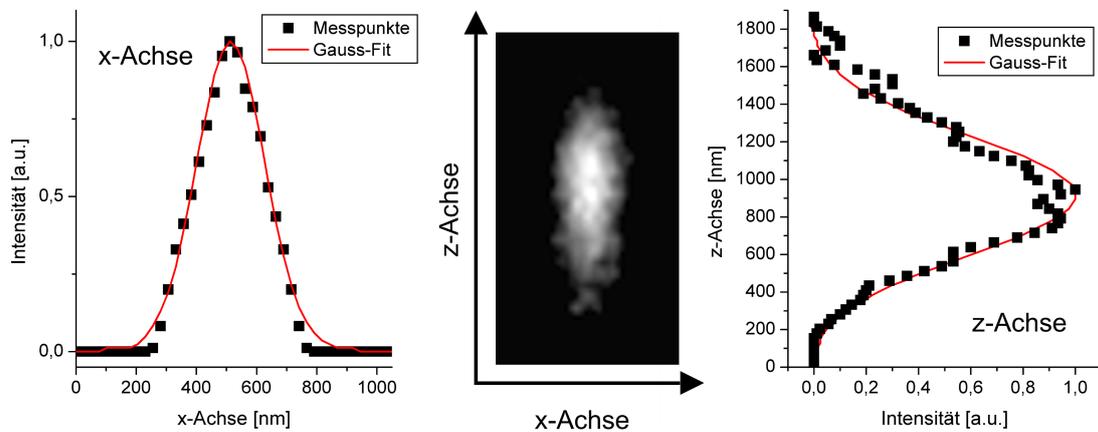


Abbildung 4.8.: x-z-Querschnitt der Punktspreizfunktion eines 80 nm Gold-Nanopartikels bei einer Wellenlänge von 720 nm und einer $NA = 1,3$. Die gemessene laterale und axiale Auflösung betrug 270 bzw. 700 nm.

4.2.4. Bildfeldgröße und -homogenität

Für das dreidimensionale Abrastern fluoreszenter Objekte im Millimeterbereich wird in der MPM konventionell eine Mosaikaufnahme durchgeführt, da die Bildfeldgröße nur im Bereich weniger Hundert Mikrometern liegt [Cho06]. Diesbezüglich wird bei einer homogenen Probe im Idealfall eine homogene Fluoreszenzintensität über den gesamten Bildbereich detektiert. Auf Grund der Zellmigration erfordert die Mosaikaufnahme lebender Proben eine möglichst geringe Aufnahmezeit. Diese skaliert quadratisch mit dem Inversen der Bildfeldgröße, so dass eine Maximierung der Bildfeldgröße unabdingbar ist.

Die Bildfeldgröße sowie -homogenität wurden mit dem Farbstoff Fluorescein (*Sigma Aldrich*, St. Louis, USA) und dem *Plan-Neofluar*-Objektiv ($NA = 1,3$) bestimmt. Dazu

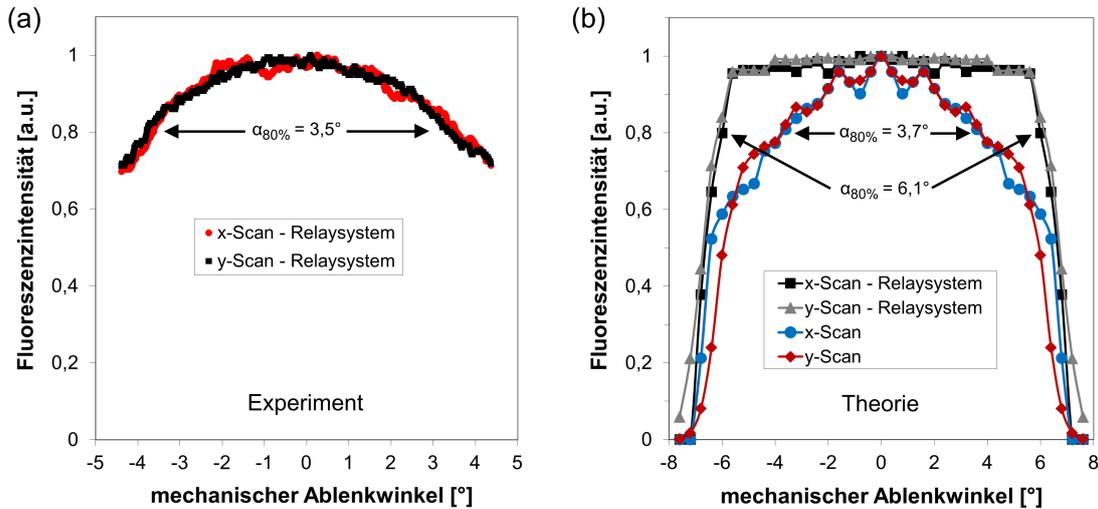


Abbildung 4.9.: (a) Experimentell bestimmte und (b) theoretisch berechnete Abhängigkeit der Fluoreszenzintensität vom mechanischen Ablenkwinkel der Scanspiegel. (a) Die Fluoreszenzintensität einer homogenen Fluorescein-Lösung nahm mit steigendem Ablenkwinkel unabhängig von der Ablenkrichtung kontinuierlich ab. Der Winkel für einen Abfall auf 80 % der maximalen Fluoreszenzintensität betrug $\alpha_{80\%} = 3,5^\circ$. (b) ZEMAX-Berechnungen ergaben bei Integration eines Relaysystems zwischen den Scanspiegeln eine Steigerung von $\alpha_{80\%}$ um 65 % (6,1 vs. 3,7°).

wurde Fluorescein in 1 % Low-Melting-Agarose (*Biozym Scientific GmbH*, Wien, Österreich) in deionisiertem Wasser gesättigt gelöst, erhitzt und homogen vermischt. Anschließend wurde die Lösung in eine Glasboden-Petrischale (*μ Dish 35 mm, ibidi GmbH*) transferiert und eine Stunde lang getrocknet.

Die notwendige Laserleistung für eine Detektion der Fluorescein-Fluoreszenz lag bei Wellenlängen um 780 nm zwischen 1 und 10 mW, so dass die Empfindlichkeit mit anderen Multiphotonenmikroskopen vergleichbar war [Koe00]. Wie erwartet hatte die Laserwellenlänge keinen signifikanten Einfluss auf die Bildfeldgröße und -homogenität. Die Fluoreszenzintensität war im Zentrum des Bildes am höchsten und nahm mit steigendem Ablenkwinkel kontinuierlich ab, wobei dieser Abfall unabhängig von der Ablenkrichtung war (siehe Abbildung 4.9a). Der mechanische Ablenkwinkel für einen Abfall auf 80 % der maximalen Fluoreszenzintensität betrug $\alpha_{80\%} = 3,5^\circ$ und entsprach einer Bildfeldgröße von 135 μm . Im Vergleich zu vorherigen Aufbauten stellte dies eine Steigerung um etwa 80 % dar [Bau05]. Dies war auf die Integration eines Relaysystems zwischen den Scanspiegeln zurückzuführen (siehe Abbildung 4.3) [Tsa02].

Zum Vergleich von Theorie und Experiment wurde der Einfluss des Relaysystems auf die Bildfeldgröße mit der Software ZEMAX (*Radiant ZEMAX LLC*, Bellevue, USA) berechnet. Dazu wurde der Strahlengang aus Abbildung 4.3 anhand von Herstellerdaten zu den einzelnen optischen Komponenten simuliert. Durch die fehlenden Daten zu den

Mikroskop-Objektiven wurde analog zum *Plan-Neofluar*-Objektiv eine fokussierende Optik mit einem Eingangsapertur-Durchmesser von 6 mm verwendet. Die Integration eines Relaysystems führte zu einer deutlich höheren Homogenität der Fluoreszenzintensität (siehe Abbildung 4.9b). Die mechanischen Ablenkwinkel für einen Abfall auf 80 % der maximalen Fluoreszenzintensität betragen $\alpha_{80\%} = 6,1$ und $3,7^\circ$ für einen Aufbau mit bzw. ohne Relaysystem. Dies entsprach einem Zuwachs von 65 % und stimmte damit gut mit den experimentellen Werten überein.

Die *ZEMAX*-Berechnungen zeigten, dass der maximale Ablenkwinkel bei integriertem Relaysystem nur durch den Ein-Zoll-Durchmesser der Linsen in den Teleskopsystemen auf etwa 8° begrenzt wurde. Jedoch war $\alpha_{80\%}$ im Experiment um 75 % kleiner als in den Berechnungen (vgl. Abbildungen 4.9a und b). Dies war auf zusätzliche Begrenzungen des Lichtkegels im Detektionsstrahlengang zurückzuführen. Die einzelnen Positionen des Filtrerrads im *Axiocvert 100* sind für einen Optikedurchmesser von einem Zoll konstruiert. Dadurch wird mit steigendem Ablenkwinkel ein zunehmender Anteil der Fluoreszenz abgeschnitten und gelangt nicht mehr auf den Photomultiplier. Eine Umgehung dieser Einschränkung ist in Zukunft nur durch die Verwendung eines anderen Mikroskop-Korpus für den MPM-Aufbau möglich.

4.2.5. Zusammenfassung

Die ultrakurzen Laserpulse des *Chameleon Ultra II* wurden infolge der GVD im experimentellen Aufbau von 155 fs am Laserausgang auf etwa 270 fs hinter dem Mikroskop-Objektiv verbreitert, was einer Gesamtdispersion von ungefähr 15000 fs^2 entsprach. Dabei blieb das Spektrum auf Grund der geringen Pulsenergien im nJ-Bereich unverändert. Die im Strahlengang induzierten Aberrationen führten zu einer etwa 20 %-igen Verschlechterung der Auflösung im Vergleich zur Beugungsgrenze. Durch die Integration eines Relaysystems zwischen den Scanspiegeln konnte das Bildfeld gegenüber vorherigen Arbeiten um etwa 80 % vergrößert werden. Dies wurde anhand von *ZEMAX*-Berechnungen theoretisch bestätigt.

5. Charakterisierung der Effekte im Low-Density-Plasma-Regime

Die Bestrahlung von Fluorophor-markierten, biologischen Strukturen im Low-Density-Plasma-Regime führt jeweils ab einer bestimmten Schwellenenergie zur Photobleichung der Fluorophore bzw. chemischen Materialdissektion im fokalen Volumen (siehe Kapitel 3). In diesem Kapitel werden die grundlegenden Effekte im Low-Density-Plasma-Regime auf subzellulärer Ebene charakterisiert, um einen Überblick der Wechselwirkung ultrakurzer Laserpulse mit biologischen Medien zu erlangen. Dazu wurde der in Kapitel 4 beschriebene experimentelle Aufbau verwendet.

Zuerst werden die Mechanismen der Photobleichung höherer Ordnung und deren Auswirkungen auf die unmittelbare chemische Umgebung evaluiert. Danach wird die intrazelluläre Dissektion von der Photobleichung abgegrenzt und die Dissektions-Schwellenenergie in Abhängigkeit der Laserparameter sowie der Anwesenheit exogener Fluorophore untersucht. Abschließend wird die Laser-induzierte Fusion verschiedener Zelltypen demonstriert und ein Vergleich zur Optoporation gezogen.

5.1. Photobleichung höherer Ordnung

Die Photobleichung von Fluorophoren führt zur irreversiblen Modifikation ihrer chemischen Struktur (siehe Abschnitt 3.1.2). In dieser Arbeit wurde die Photobleichung höherer Ordnung je eines endogenen (eGFP) und eines exogenen Fluorophors (Hoechst 33342) untersucht. Die Bleichung wurde analog zur Fluoreszenzdetektion durch ein kontinuierliches, mäanderförmiges Abrastern der Probe induziert. Zur Fokussierung wurde entweder eine NA von 0,8 oder 1,3 benutzt (siehe Tabelle 4.2). Dabei wurde die Wellenlänge zwischen 720 und 950 nm variiert sowie eine Repetitionsrate von 4 oder 80 MHz eingestellt. Außerhalb dieser Parameterbereiche war die mittlere Laserleistung zu gering für eine signifikante Photobleichung der verwendeten Fluorophore innerhalb eines sinnvollen Zeitraums von zehn Minuten.

Für die Experimente wurden entweder Hoechst-gefärbte, bovine Aorten-Endothelzellen oder eGFP-exprimierende, murine RAT1-Fibroblasten verwendet (siehe Anhang A.1). Während Hoechst fest an die DNA bindet, ist das durch Proteinbiosynthese hergestellte eGFP [Pat97, Tsi98] frei im intrazellulären Raum beweglich. Folglich wird nur bei der Photobleichung von eGFP die Abnahme der Fluoreszenzintensität durch Diffusion von Molekülen aus der unmittelbaren intrazellulären Umgebung kompensiert.

Im Folgenden werden zunächst die Anregungs- und Photobleichungsordnungen der Fluorophore bestimmt. Hiernach wird der Einfluss der Photobleichung auf die intrazelluläre Umgebung sowie die Erzeugung von ROS evaluiert. Die statistische Signifikanz der Ergebnisse wurde mit *SigmaStat 3.5* (*Systat Software*, Chicago, USA) getestet. Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen wurden ab einem Signifikanzniveau von $P < 0,05$ als statistisch signifikant angenommen.

5.1.1. Anregungs- und Photobleichungsordnungen

Die Anregungsordnung N_{MP} ist äquivalent zur Photonenzahl für die Anregung der Fluorophore vom Grundzustand S_0 in den nächsthöheren elektronischen Zustand S_1 . Zur Bestimmung von N_{MP} wurde die mittlere Laserleistung \bar{P} in einem Bereich ohne signifikante Photobleichung variiert und dabei die Fluoreszenzintensität I detektiert. Anschließend wurden die Messwerte mit einer Potenzfunktion $I \propto \bar{P}^{N_{\text{MP}}}$ genähert.

Die Laserbestrahlung Hoechst-gefärbter Endothelzellen ergab einen nahezu quadratischen Anstieg der Fluoreszenzintensität mit der Laserleistung ($N_{\text{MP}} \approx 2$) bei Wellenlängen zwischen 720 und 800 nm. Oberhalb dieses Bereichs stieg die Anregungsordnung mit der Wellenlänge kontinuierlich und signifikant auf $N_{\text{MP}} = 2,5$ bei 950 nm an ($P < 0,001$, ANOVA und Tukey-Test). Folglich dominierte die Zwei-Photonen-Absorption zwischen 720 und 800 nm, während die Drei-Photonen-Absorption oberhalb von 800 nm zunehmend an Einfluss gewann. Für eGFP-exprimierende RAT1-Fibroblasten wurde über den gesamten Wellenlängenbereich ein Wert von $N_{\text{MP}} \approx 2$ gemessen, was auf eine dominierende Zwei-Photonen-Absorption hinweist. Unterhalb von 800 nm wurde zusätzlich eine schwache Ein-Photonen-Absorption beobachtet, die jedoch keinen signifikanten Einfluss hatte ($P \geq 0,12$, ANOVA und Tukey-Test).

Die zeitliche Abnahme der Fluoreszenzintensität $I(t)$ durch Photobleichung konnte in allen Messungen in sehr guter Näherung (Bestimmtheitsmaß $R^2 \geq 0,98$) durch eine einzelne Exponentialfunktion beschrieben werden

$$I(t) = I_0 \exp\left(-\frac{\ln(2)}{t_{1/2}} t\right) = I_0 \exp(-kt), \quad (5.1)$$

wobei I_0 die ursprüngliche Fluoreszenzintensität und $t_{1/2}$ die Halbwertszeit darstellt. Die Photobleichungsrate k hängt nach Gleichung (3.4) zusätzlich von der Photobleichungsordnung N_{PB} der mittleren Laserleistung \bar{P} ab. Folglich konnte N_{PB} aus der Messung der Halbwertszeit bei verschiedenen Laserleistungen durch Näherung der Werte mit einer Potenzfunktion $t_{1/2} \propto \bar{P}^{-N_{\text{MP}}}$ bestimmt werden. Dabei wurde durchgehend ein gleichgroßes Bildfeld von $9500 \mu\text{m}^2$ verwendet, um eine konstante Scangeschwindigkeit zu erhalten. Die Bildwiederholrate der Fluoreszenzdetektion betrug ungefähr 2,5 fps, so dass $t_{1/2}$ mit einer Genauigkeit von etwa 200 ms gemessen wurde.

Für Hoechst ergab sich bei Wellenlängen zwischen 720 und 920 nm eine Photobleichungsordnung von $N_{\text{PB}} \approx 2$ ohne signifikante Unterschiede zwischen den einzelnen Messwerten

($P \geq 0,06$, ANOVA und Tukey-Test; siehe Abbildung 5.1a). Indes stieg N_{PB} bei 930 nm sprunghaft auf den Wert Drei an ($P < 0,001$, ANOVA und Tukey-Test). Die Photobleichung von eGFP resultierte in $N_{PB} \approx 3$ für Wellenlängen zwischen 720 und 820 nm ($P = 0,07$, ANOVA; siehe Abbildung 5.1b). Wiederum stieg die Photobleichungsordnung sprunghaft um Eins an, in diesem Fall bei einer Wellenlänge von 840 nm ($P < 0,001$, ANOVA und Tukey-Test). Von 860 bis 920 nm variierte N_{PB} leicht um den Wert Vier. Bei Vernachlässigung einer Messung (920 nm, 4 MHz und $NA = 1,3$) wurden in diesem Bereich keine signifikanten Unterschiede beobachtet ($P = 0,37$, ANOVA). Unabhängig vom Fluorophor hatten weder die Repetitionsrate noch die NA einen Einfluss auf die Anregungs- sowie Photobleichungsordnung; dies galt für alle Wellenlängen zwischen 720 und 950 nm.

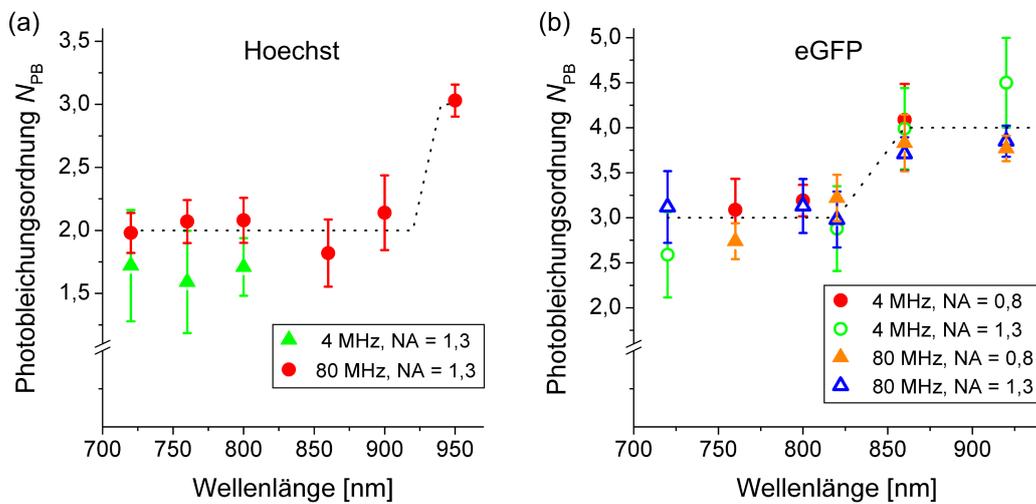


Abbildung 5.1.: Die Photobleichungsordnung N_{PB} stieg bei einer Fluorophor-abhängigen Wellenlänge von (a) 930 nm für Hoechst bzw. (b) 840 nm für eGFP sprunghaft um Eins an (gepunktete Linien) und war unabhängig von der Repetitionsrate sowie der NA. Die Messwerte stellen den Mittelwert \pm Standardabweichung aus mindestens fünf Wiederholungen dar.

Zur Evaluation des Einflusses weiterer Laserparameter wurde die Photobleichung in Abhängigkeit der Größe des abgerasterten Bildfelds und der applizierten Energiedichte untersucht. Letztere wurde als Produkt der Pulsenergie und der Anzahl der Laserpulse pro Volumen definiert. Bei konstanter NA, Repetitionsrate und Wellenlänge war die Halbwertszeit $t_{1/2}$ proportional zur Größe des Bildfelds und damit der Anzahl applizierter Laserpulse. Ferner führte die Verwendung höherer Pulsenergien unabhängig von der Repetitionsrate zu einem schnelleren Abfall der Fluoreszenzintensität mit der applizierten Energiedichte.

5.1.2. Beeinflussung der intrazellulären Umgebung

In diesem Abschnitt wird der Einfluss der Photobleichung höherer Ordnung auf die intrazelluläre, chemische Umgebung dargestellt. Dazu wurden Hoechst 33342-gefärbte, eGFP-

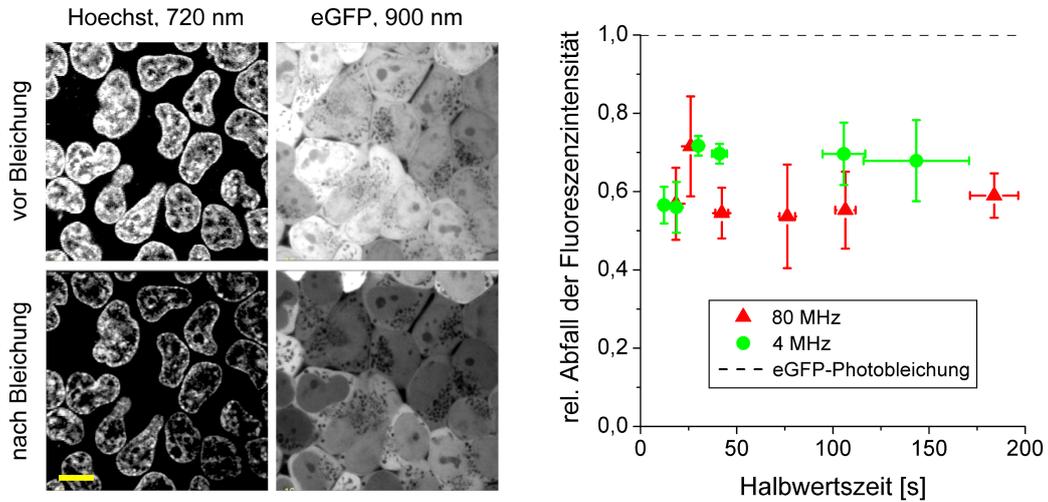


Abbildung 5.2.: Einfluss der eGFP-Photobleichung auf umliegende Hoechst-Moleküle. Simultan zur eGFP-Photobleichung nahm die Hoechst-Fluoreszenzintensität unabhängig von der Halbwertszeit sowie Repetitionsrate um etwa 55 bis 80 % ab, bezogen auf den Abfall der eGFP-Fluoreszenzintensität. Die Messwerte stellen den Mittelwert \pm Standardfehler aus mindestens acht Wiederholungen dar. Skala: 10 μ m.

exprimierende RAT1-Fibroblasten verwendet (siehe Anhang A.1). Zur Unterscheidung der Fluoreszenzsignale von eGFP und Hoechst wurden verschiedene Anregungswellenlängen gewählt, bei denen die Fluorophore jeweils einen großen Multiphotonen-Absorptionsquerschnitt besitzen: 900 nm für eGFP [Hei01] und 720 nm für Hoechst [Bes02]. Hinsichtlich der Photobleichung hatte eine Hoechst-Färbung der RAT1-Fibroblasten unabhängig von der Laserleistung keinen Einfluss auf die Halbwertszeit von eGFP bei 900 nm ($P \geq 0,08$, t-Test). Folglich wurden Hoechst-Moleküle bei dieser Wellenlänge nicht durch eine direkte Photon-Fluorophor-Wechselwirkung geblichen. Dies ermöglichte eine selektive Photobleichung der eGFP-Moleküle und damit die Bestimmung ihrer Auswirkungen auf die Hoechst-Moleküle in der unmittelbaren Umgebung. Dabei wurden verschiedene Laserleistungen mit Halbwertszeiten von bis zu 200 s verwendet.

Die eGFP-Photobleichung von Hoechst 33342-gefärbten RAT1-Fibroblasten bei einer Wellenlänge von 900 nm resultierte in einem Abfall der Hoechst-Fluoreszenzintensität um 55 bis zu 80 %, bezogen auf den entsprechenden Abfall der eGFP-Fluoreszenzintensität (siehe Abbildung 5.2). Dieses Verhalten war unabhängig von der Halbwertszeit und Repetitionsrate ($P = 0,65$, ANOVA).

5.1.3. Entstehung reaktiver Sauerstoffspezies

Zur Analyse der Entstehung von ROS im intrazellulären Raum während der Photobleichung wurden Hoechst 33342-gefärbte Endothelzellen zusätzlich mit CM-H2DCFDA inkubiert,

einem Fluoreszenz-Indikator für oxidativen Stress (siehe Anhang A.1). Die simultane Photobleichung von Hoechst und Zweiphotonenanregung von CM-H2DCFDA wurde bei einer Wellenlänge von 860 nm durchgeführt, da beide Fluoreszenzsignale in diesem Fall mit Emissionsfiltern (Hoechst: *Brightline HC 475/42*, CM-H2DCFDA: *Brightline HC 525/50*; *Semrock*) getrennt werden konnten. Der zeitliche Verlauf der CM-H2DCFDA-Fluoreszenzintensität wurde bei verschiedenen Laserleistungen detektiert und mit dem simultanen, exponentiellen Abfall der Hoechst-Fluoreszenzintensität korreliert. Dieser Abfall wurde anschließend anhand der jeweiligen, gemessenen Halbwertszeit modelliert.

Während der Photobleichung von Hoechst stieg die Anzahl von ROS-Molekülen im intrazellulären Raum kontinuierlich mit der Zeit an (siehe Abbildung 5.3). Dabei stimmten die Zeiträume bis zur Sättigung dieses Anstiegs und bis zur vollständigen, chemischen Zerstörung der Hoechst-Moleküle überein. Des Weiteren entsprach der Zeitpunkt für das Erreichen des halben Sättigungswerts innerhalb der Fehlerbalken der Halbwertszeit der Photobleichung, so dass eine direkte Korrelation beider Prozesse bestand. Dieses Verhalten war unabhängig von der Halbwertszeit ($P \geq 0,05$, ANOVA).

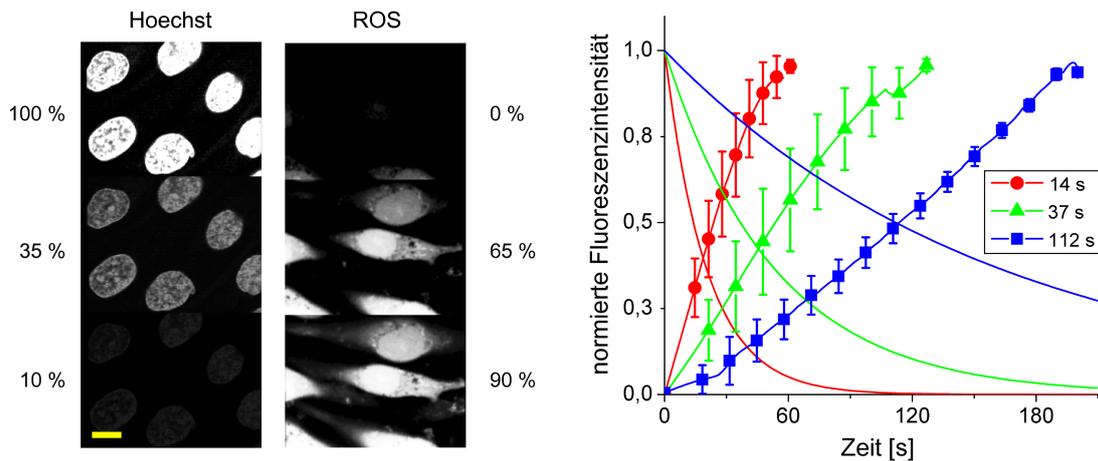


Abbildung 5.3.: Entstehung von ROS während der Photobleichung von Hoechst für verschiedene Halbwertszeiten. Der Abfall der Hoechst-Fluoreszenzintensität korrelierte unabhängig von der Halbwertszeit direkt mit der ROS-Erzeugung. Die Messwerte stellen den Mittelwert \pm Standardabweichung aus fünf Wiederholungen dar. Skala: 5 μ m.

Die erneute Inkubation von gebleichten, Hoechst-gefärbten Endothelzellen mit Hoechst ergab keine Veränderung des Fluoreszenzsignals. Indes resultierte die Färbung mit einem anderen DNA-Fluorophor (SYBR Green I, siehe Anhang A.1) in einer Wiederherstellung der ursprünglichen Fluoreszenzintensität im bestrahlten Bereich. Ein Live/Dead-Assay (siehe Anhang A.1) zeigte keinen direkten, negativen Einfluss der Photobleichung auf die Zellvitalität, da eine intensive Calcein- aber keine Propidium Iodid-Fluoreszenz sichtbar war. Analog wurde in gebleichten, eGFP-exprimierenden RAT1-Zellen die ursprüngliche

Fluoreszenzintensität durch Proteinbiosynthese neuer eGFP-Moleküle innerhalb von zwölf Stunden vollständig wiederhergestellt. Dabei waren die Teilungsraten gebleichter Zellen mit denen unbehandelter Zellen vergleichbar.

5.2. Intrazelluläre Dissektion

Die folgenden Experimente untersuchen die grundlegenden Mechanismen der Laser-induzierten chemischen Dissektion subzellulärer Strukturen im Low-Density-Plasma-Regime. Auf Grund deren Anwendung in der Laser-Enukleation von Oozyten in Abschnitt 6.1 wurden Hoechst-gefärbte Zellkerne boviner Aorten-Endothelzellen als Modellsubstanz verwendet (siehe Anhang A.1). Zur Manipulation des Zellkerns wurde der Laserstrahl mit einer $NA = 1,3$ in zufällig ausgewählten Bereichen entweder auf eine feste Position fokussiert oder entlang einer Linie abgerastert. Die durch Zweiphotonenabsorption angeregte Hoechst-Fluoreszenz wurde jeweils vor und nach der Manipulation detektiert, um durch einen Vergleich auf das Ausmaß der Laser-induzierten, sichtbaren Schädigungen zu schließen.

Zunächst wird die intrazelluläre Dissektion im Low-Density-Plasma-Regime von der Photobleichung abgegrenzt. Danach wird die Induktion von DSB unterhalb der Dissektionsschwelle untersucht. Abschließend wird der Einfluss von Laserparametern und Fluorophoren auf die intrazelluläre Dissektionsschwelle bestimmt. Die statistische Signifikanz der Ergebnisse wurde mit *SigmaStat 3.5 (Systat Software)* getestet. Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen wurden bei $P < 0,05$ als statistisch signifikant angenommen.

5.2.1. Abgrenzung von Photobleichung und Dissektion

Die Variation der Pulsenergie für einen Linienschnitt in Hoechst-gefärbten Zellkernen zeigte bei konstanter Wellenlänge, Repetitionsrate sowie Pulsdichte insgesamt drei verschiedene Bereiche (siehe Abbildung 5.4a). Oberhalb der ersten Schwelle wurde eine deutliche Abnahme der Fluoreszenzintensität innerhalb weniger Minuten beobachtet. Indes trat diese oberhalb der zweiten Schwelle, die etwa 50 % höher lag, unmittelbar nach Bestrahlung auf. Nur zwischen beiden resultierte eine erneute Färbung mit SYBR Green I (siehe Anhang A.1) in einer Wiederherstellung der ursprünglichen Fluoreszenzintensität im geschädigten Bereich. Folglich entsprachen diese der Photobleichungs- und Dissektionsschwelle [Hei05]. Die Manipulation von mehr als 20 Zellen pro Pulsenergie zeigte, dass die Dissektionsschwelle von Zelle zu Zelle ungefähr um 30 % variierte (siehe Abbildung 5.4b). Aus diesem Grund wurde die Dissektionsschwelle in allen folgenden Experimenten als Dissektions-Wahrscheinlichkeit von 100 % in mindestens zehn Zellkernen definiert.

Für verschiedene Repetitionsraten zwischen 20 kHz und 80 MHz sowie einer Wellenlänge von 720 nm wurde die FWHM der Linienschnitte oberhalb der Dissektionsschwelle analysiert. Dazu wurde diese mit der Software *ImageJ* an drei Stellen entlang des Linienschnitts bestimmt und daraus der Mittelwert gebildet. Wie erwartet nahm die mittlere FWHM unabhängig von der Repetitionsrate kontinuierlich mit der Pulsenergie zu. Innerhalb der

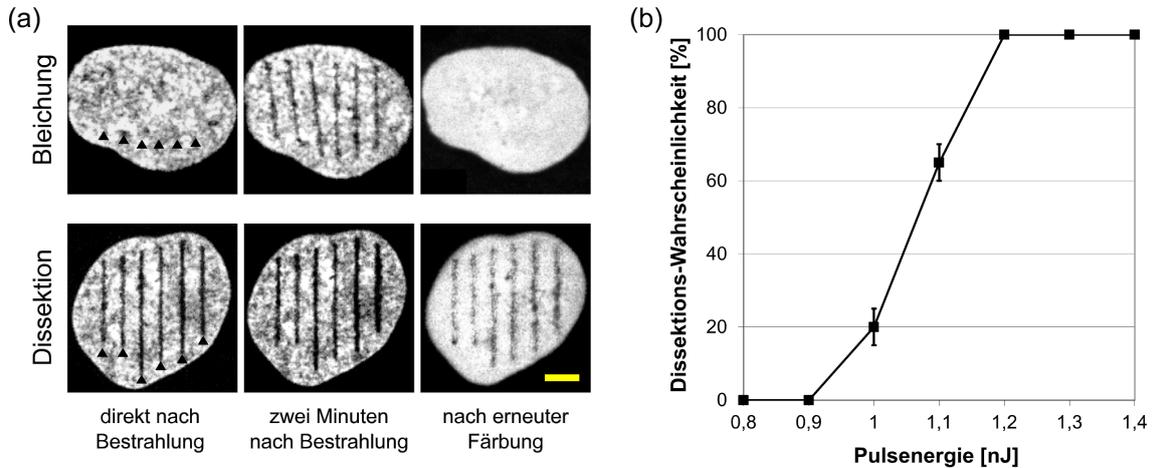


Abbildung 5.4.: Abgrenzung von Photobleichung und Dissektion in Hoechst-gefärbten Zellkernen. (a) Bei Pulsenergien im Bereich der Photobleichung wurde ein deutlicher Abfall der Fluoreszenzintensität innerhalb weniger Minuten beobachtet. Oberhalb der Dissektionsschwelle trat dieser direkt nach Bestrahlung auf. Skala: 4 μm . (b) Die Dissektionsschwelle variierte bei konstanter Repetitionsrate, Wellenlänge und Pulsdichte (40 kHz, 720 nm und 200 Pulse/ μm) von Zelle zu Zelle um etwa 30 %. Die Messwerte stellen den Mittelwert \pm Standardabweichung von mindestens 20 bestrahlten Zellen dar.

Fehlerbalken war dieser Anstieg für Repetitionsraten unterhalb von 4 MHz identisch ($P \geq 0,13$, ANOVA, siehe Abbildung 5.5a). Für die Dissektion mit einer Pulsdichte von 2000 Pulsen/ μm wurde eine FWHM von 0,35 μm bei 1 nJ (zweifache Schwellenenergie) sowie von 0,7 μm bei 5 nJ gemessen, was einer Zunahme um den Faktor Zwei entspricht. Im Vergleich zu Repetitionsraten unterhalb von 4 MHz war der Anstieg der FWHM mit 80 MHz signifikant steiler ($P < 0,001$, ANOVA und Tukey-Test), bei 100 Pulsen/ μm um etwa 20 % zwischen der zweifachen und fünffachen Schwellenenergie (siehe Abbildung 5.5b).

5.2.2. Induktion von Doppelstrangbrüchen

DSB besitzen ein hohes mutagenes Potential (siehe Abschnitt 2.2.2). Infolgedessen wird im Folgenden die DSB-Induktion bei der Manipulation Hoechst-gefärbter Zellkerne genauer untersucht. Dazu wurden Linienschnitte im Zellkern bei variabler Repetitionsrate, Pulsenergie und Pulsdichte durchgeführt. Pro Parametersatz wurden zwischen 50 und 200 Zellen automatisiert mit einem Liniengitter bestrahlt. Nach der Manipulation erfolgte eine 15-minütige Inkubationszeit im Brutschrank, bevor die Zellen fixiert und mit einem primären sowie sekundären Antikörper zur Detektion des phosphorylierten H2AX-Histons (γ -H2AX) inkubiert wurden (siehe Anhang A.1). Da sich γ -H2AX in den letzten Jahren als Standardmarker für DSB etabliert hat [Lim93, Kon09], diente die Antikörper-Fluoreszenz der Evaluation der Parameter-abhängigen DSB-Induktion.

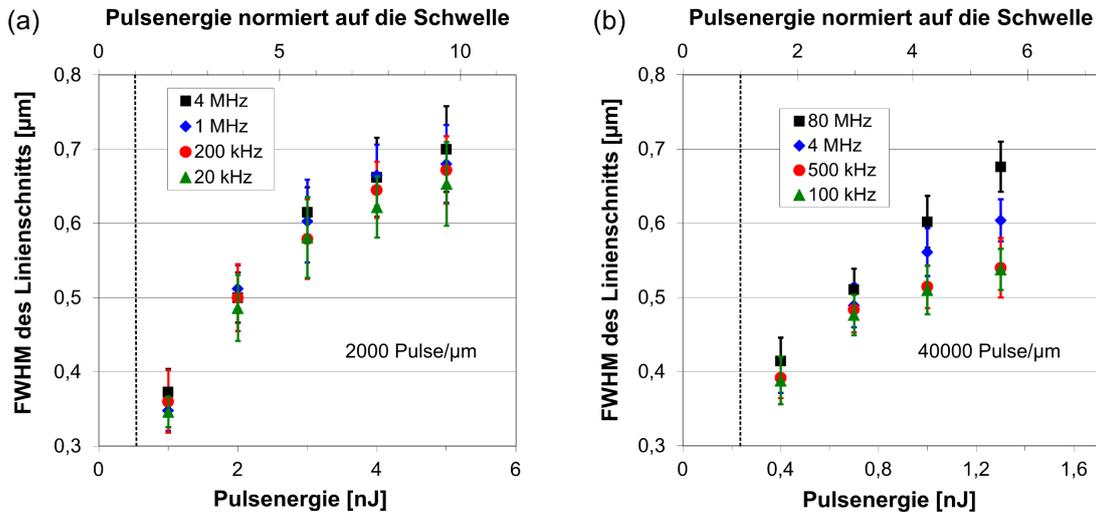


Abbildung 5.5.: FWHM der Linienschnitte in Hoechst-gefärbten Zellkernen oberhalb der Dissektions-Schwellenenergie (gestrichelte Linien) in Abhängigkeit der Pulsenergie und Repetitionsrate bei konstanter Wellenlänge von 720 nm. (a) 2000 Pulse/ μm und (b) 40000 Pulse/ μm wurden appliziert. Der Anstieg der FWHM mit der Pulsenergie war bei 80 MHz signifikant steiler als im kHz-Bereich. Jeder Messwert stellt den Mittelwert \pm Standardabweichung von mindestens zehn bestrahlten Zellen dar.

In Abhängigkeit der Pulsenergie wurden bei ansonsten festen Laserparametern drei verschiedene Bereiche beobachtet. Oberhalb der ersten Schwelle war ein γ -H2AX-Signal entlang des Linienschnitts sichtbar („Liniensignal“), jedoch blieb die Hoechst-Fluoreszenzintensität unverändert (siehe Abbildung 5.6a). Das γ -H2AX-Signal breitete sich oberhalb der zweiten Schwelle, die etwa um den Faktor Drei höher lag, über den gesamten Zellkern aus („kernweites Signal“). Erst bei ungefähr 50 % höheren Pulsenergien trat eine deutliche Abnahme der Hoechst-Fluoreszenzintensität entlang des Linienschnitts auf. Durch die Variation der Schwellenenergien von Zelle zu Zelle wurden diese im Folgenden als minimal notwendige Energien zur Entstehung der entsprechenden Signale im bestrahlten Gebiet definiert.

Bei konstanter Repetitionsrate waren die Schwellen-Pulsenergien für die DSB-Induktion (Linien- und kernweites Signal) und die Dissektion von Hoechst-Molekülen antiproportional zur vierten Potenz der Bestrahlungszeit pro Mikrometer (siehe Abbildung 5.6b). Des Weiteren hatte die Zeit zwischen zwei aufeinander folgenden Laserpulsen bei konstanter applizierter Pulsdichte keinen Einfluss auf das γ -H2AX-Signal.

Um die Aktivierung von Reparaturmechanismen nach der DSB-Induktion zu untersuchen, wurde die Inkubationszeit bis zur Zellfixierung über einen großen Bereich von sieben Minuten bis zu 16 Stunden variiert. Im Bereich des Liniensignals fiel auf, dass innerhalb eines Zeitraums von 100 Minuten keine nennenswerten Veränderungen auftraten. Ab diesem Zeitpunkt wurde jedoch vermehrt entweder ein Nachlassen des Liniensignals oder die Entstehung eines

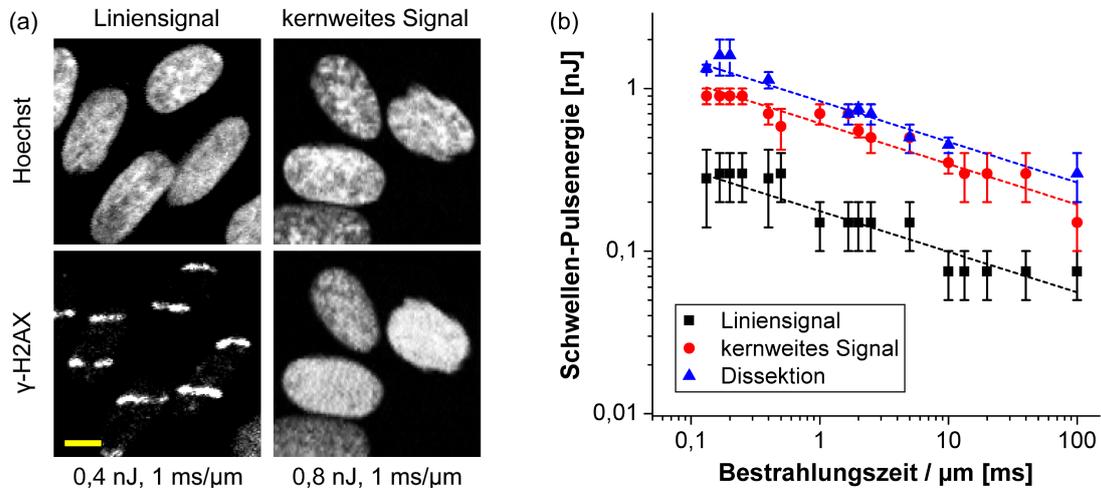


Abbildung 5.6.: Parameter-abhängige DSB-Induktion in Hoechst-gefärbten Zellkernen. (a) Mit steigender Pulsenergie breitete sich das γ -H2AX-Liniensignal über den gesamten Zellkern aus. Skala: 5 μ m. (b) Die Schwellen-Pulsenergien für die DSB-Induktion und die Hoechst-Dissektion waren bei konstanter Repetitionsrate sowie Wellenlänge (400 kHz, 720 nm) antiproportional zur vierten Potenz der Bestrahlungszeit pro Mikrometer (gestrichelte Linien). Jeder Messwert stellt den Mittelwert \pm Standardabweichung von mindestens 50 bestrahlten Zellen dar.

kernweiten Signals beobachtet. Im Gegensatz dazu zeigte sich im Parameterbereich des kernweiten Signals keine Abhängigkeit von der Inkubationszeit.

5.2.3. Einfluss der Fluorophore und Laserparameter

Zur Bestimmung des Einflusses der Zeit zwischen zwei aufeinander folgenden Laserpulsen auf die Dissektionsschwelle wurde die Repetitionsrate bei konstanter Wellenlänge von 720 nm zwischen 1 kHz und 80 MHz variiert. In diesen Zusammenhang wurde die applizierte Pulsdichte und damit die Energiedichte bei der Erzeugung von Linienschnitten durch simultane Anpassung der Scangeschwindigkeit konstant gehalten. Für jede feste Pulsdichte war die Dissektions-Schwellenenergie unabhängig von der Repetitionsrate ($P \geq 0,05$, ANOVA, siehe Abbildung 5.7a), stieg jedoch von 0,25 nJ bei 40000 Pulsen/ μ m auf 1,3 nJ bei 100 Pulsen/ μ m an. Die Inkubation von Hoechst-gefärbten Zellkernen mit Antioxidantien (Ascorbinsäure, siehe Anhang A.1) führte zu keiner Änderung der Dissektions-Schwellenenergie, unabhängig von den Laserparametern.

Die Variation der Scangeschwindigkeit bei konstanter Repetitionsrate von 40 kHz zeigte, dass die Schwellen-Pulsenergie analog zu den Ergebnissen in Abschnitt 5.2.2 antiproportional zur vierten Potenz der Bestrahlungszeit pro Mikrometer war (siehe durchgezogene Linie in Abbildung 5.7b). Aus diesem Grund wurde der Einfluss der auf einer festen Position applizierten Pulsanzahl auf die Schwellenenergie untersucht. Bei konstanter Repetitionsrate im

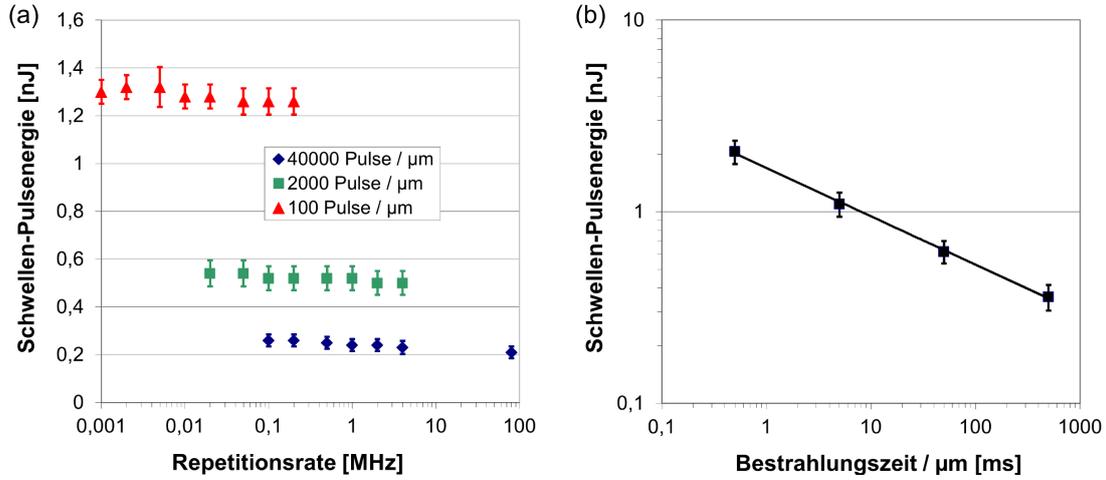


Abbildung 5.7.: Einfluss der Laserparameter auf die Dissektions-Schwellenenergie in Hoechst-gefärbten Zellkernen. (a) Die Schwellenenergie für Linienschnitte war bei fester applizierter Pulsdichte unabhängig von der Repetitionsrate. (b) Bei konstanter Repetitionsrate und Wellenlänge (40 kHz, 720 nm) war die Schwellen-Pulsenergie antiproportional zur vierten Potenz der Bestrahlungszeit pro Mikrometer (durchgezogene Linie). Jeder Messwert stellt den Mittelwert \pm Standardabweichung aus mindestens fünf Wiederholungen dar.

kHz-Regime wurden verschiedene Wellenlängen verwendet, von denen drei in Abbildung 5.8a exemplarisch dargestellt sind. Für jeden Pulszug stieg die Schwellenenergie mit der Wellenlänge an. Im Vergleich zu 720 nm waren bei 840 und 950 nm zweifach bzw. dreifach höhere Pulsenergien notwendig. Die nichtlineare Regression der experimentellen Schwellenwerte mit einer Potenzfunktion zeigte, dass die Anzahl der Laserpulse antiproportional zur vierten Potenz ($k = 4$) der Pulsenergie bei 720 und 840 nm bzw. zur fünften Potenz ($k = 5$) der Pulsenergie bei 950 nm war. Zur Bestimmung des Einflusses der Repetitionsrate auf diesen Zusammenhang wurden die gleichen Experimente mit 80 MHz durchgeführt. Der Exponent der Potenzfunktion war bei 720 nm ($k = 3,5$) und 800 nm ($k = 3,8$) signifikant geringer ($P < 0,05$, t-Test), während keine Abweichung oberhalb von 800 nm beobachtet wurde (siehe Abbildung 5.8b).

Der Einfluss von Hoechst-Fluorophoren auf die Plasmaerzeugung und damit den Dissektionsprozess wurde evaluiert, indem die Dissektions-Schwellenenergien mit und ohne Hoechst-Färbung bei konstanter Wellenlänge von 720 nm verglichen wurden. Zur Identifizierung des Zellkerns in ungefärbten Zellen wurden diese mit dem Membranfarbstoff FM4-64 markiert (siehe Anhang A.1). Der Zeitraum von der Manipulation bis zur Analyse der Dissektion betrug ungefähr 15 Minuten, da die Analyse eine Hoechst-Färbung der nur mit FM4-64 markierten Zellen erforderte. Jedoch verschwanden die Linienschnitte in lebenden Zellen auf Grund der Bewegung des Chromatins oft während dieser Zeit, so dass stattdessen fixierte Zellen verwendet wurden (siehe Anhang A.1). Hinsichtlich der

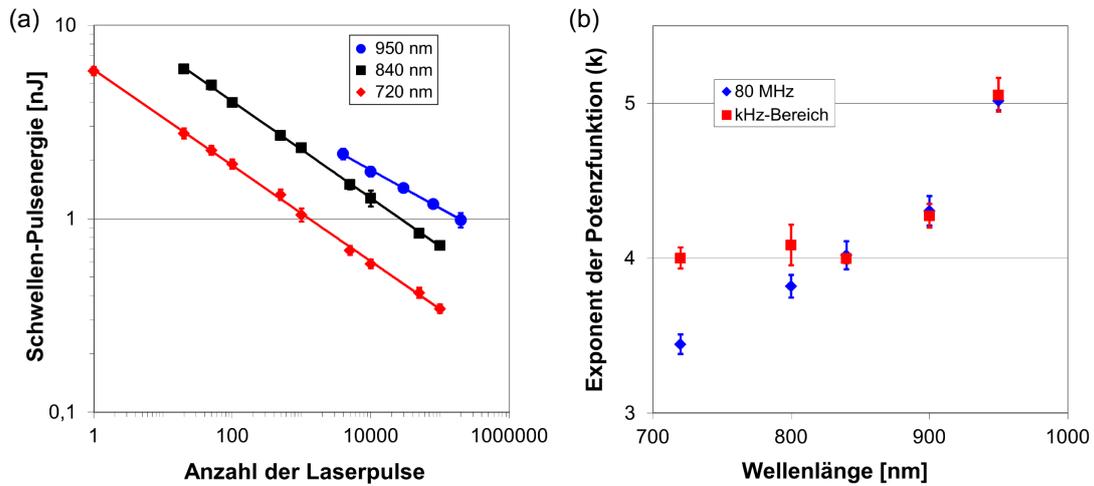


Abbildung 5.8.: Dissektions-Schwellenenergie in Abhängigkeit der Anzahl applizierter Laserpulse in Hoechst-gefärbten Zellkernen. (a) Die Schwellenenergie war antiproportional zur vierten Ordnung der Pulsanzahl bei 720 und 840 nm bzw. zur fünften Ordnung der Pulsanzahl bei 950 nm (siehe durchgezogene Linien). (b) Der Exponent der Potenzfunktion k war bei 80 MHz unterhalb von 840 nm signifikant geringer als im kHz-Bereich. Jeder Messwert stellt den Mittelwert \pm Standardabweichung aus mindestens drei Wiederholungen dar.

Dissektions-Schwellenenergie in Zellkernen wurde kein Unterschied zwischen fixierten und lebenden Zellen beobachtet. Bei einer Repetitionsrate von 1 MHz und 20000 Pulsen/ μm mit 1,5 nJ Pulsenergie war ein unmittelbarer, deutlicher Abfall der Fluoreszenzintensität in Hoechst-gefärbten Zellkernen sichtbar, während keine Dissektion in ungefärbten Zellen auftrat (siehe Abbildung 5.9a). Die Schwellenenergie war mit Hoechst-Färbung ungefähr um den Faktor Vier geringer (siehe Abbildung 5.9b). Indes ergab sich in beiden Fällen ein identischer Anstieg der Dissektions-Wahrscheinlichkeit mit der Pulsenergie. Analog zu Abbildung 5.7a hatte die Repetitionsrate auch in ungefärbten Zellkernen keinen Einfluss auf die Dissektionsschwelle.

5.3. Laser-induzierte Zellfusion

Die experimentelle Studie zur Laser-induzierten Zellfusion wurde mit nicht-adhären HL-60-Zellen und parthenogenetischen 2-Zell-Embryonen vom Schwein durchgeführt, wobei letztere ein etwa 50-fach größeres Volumen haben (siehe Anhang A und B). Zur Induktion der Zellfusion wurde der Laserstrahl mit einer NA von 0,5 oder 0,8 auf die Kontaktstelle zweier aggregierender Zellen fokussiert (siehe Tabelle 4.2). Dies resultierte in einem beugungsbegrenzten Fokusbereich mit einem Durchmesser von 1,8 bzw. 1,1 μm [Paw06]. Eine höhere NA von 1,3 wurde nicht verwendet, da die präzise Positionierung des Laserstrahls auf der Zellmembran bei geringeren numerischen Aperturen wegen der deutlich größeren Rayleigh-Länge

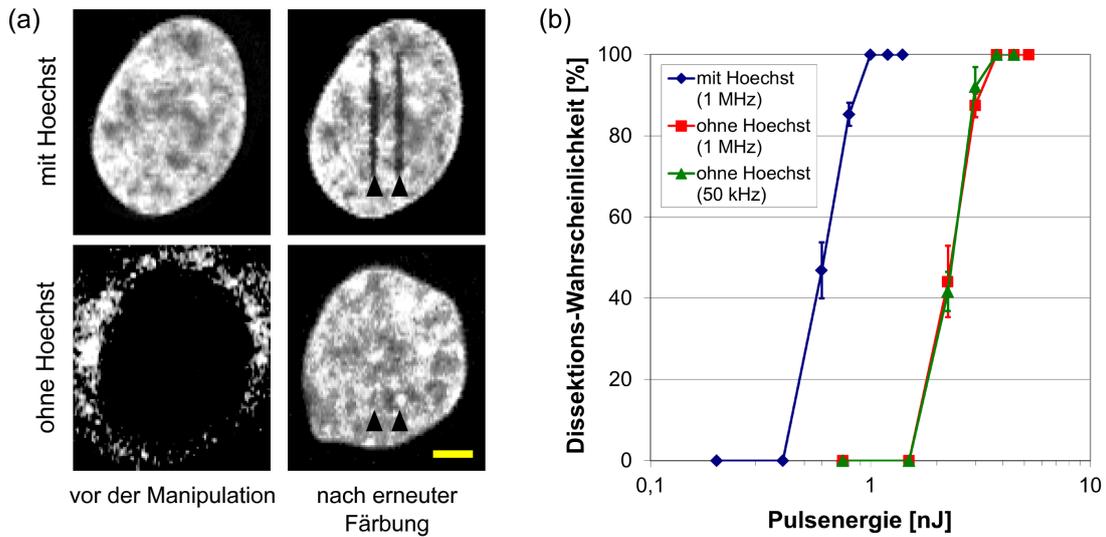


Abbildung 5.9.: Einfluss der Hoechst-Färbung auf die Dissektions-Schwellenenergie für Linienschnitte in fixierten Zellen (720 nm, 20000 Pulse/ μm). (a) Bei einer Pulsenergie von 1,5 nJ war nur in Hoechst-gefärbten Zellkernen eine Dissektion sichtbar (markiert mit schwarzen Dreiecken). Skala: 3 μm . (b) Abhängigkeit der Dissektions-Wahrscheinlichkeit von der Pulsenergie. Die Schwellenenergie war für gefärbte Zellkerne um den Faktor Vier geringer. Jeder Messwert stellt den Mittelwert \pm Standardabweichung aus mindestens drei Wiederholungen dar.

weniger kritisch ist [Sal08]. Die Experimente wurden mit einer Repetitionsrate von 80 MHz und einer Wellenlänge von 720 nm durchgeführt, da diese Kombination bei konstanter applizierter Pulsenergie die höchste Dissektionseffizienz subzellulärer Strukturen aufwies (siehe Abbildungen 5.5b und 5.8). Außerdem ermöglichte die hohe Repetitionsrate analog zur Optoporation die zusätzliche Nutzung thermischer Effekte im fokalen Volumen [Vog05, Ste06, Bau08, Uch08b].

Für die Laserbestrahlung von HL-60-Zellen wurden ausschließlich aggregierende Paare in engem Kontakt verwendet, da der zur Fusion erforderliche Zytoplasma-Austausch (siehe Abschnitt 2.1.1) bei Distanzen von mehr als 50 Å erschwert wird [Woj83]. Diese Selektion war bei porzinen 2-Zell-Embryonen durch deren inhärenten engen Kontakt nicht notwendig. Die Kontaktstelle zweier aggregierender HL-60-Zellen wurde mit Hilfe des motorisierten Verschiebetisches und des Fokustriebs am Mikroskop im Laserfokus positioniert. Im Fall der 2-Zell-Embryonen wurde eine Mikropipette mit einem inneren Durchmesser von 50 μm am Mikroskop befestigt. Diese war über einen Schlauch mit einer 1 ml-Spritze (*BD Medical*, Franklin Lakes, USA) verbunden, um durch leichten Unterdruck einzelne Embryonen in Position zu halten. Mit der Spritze wurde ein alternierender Unter- und Überdruck erzeugt, bis die Zell-Zell-Kontaktstelle in der äquatorialen Ebene des Embryos positioniert war. Die Laserbestrahlung der Kontaktstelle wurde bis zu dreimal in leicht unterschiedlichen axialen

Ebenen durchgeführt, wenn diese keine zur Fusion notwendige Entstehung einer langlebigen Gasblase im fokalen Volumen zur Folge hatte (siehe Abbildung 5.10b).

Die Fusionseffizienzen wurden 10 und 120 min nach Laserbestrahlung für HL-60-Zellen bzw. porzine 2-Zell-Embryonen ausgewertet. Nach weiterer Inkubation für eine Stunde wurde die Zellvitalität durch ein Live/Dead-Assay bestimmt (siehe Anhang A.2 und A.3). Eine Hoechst-Färbung diente der Identifizierung der Zellkerne im fusionierten Komplex. Das Entwicklungspotential der Embryonen wurde nach sechstägiger *in vitro*-Kultivierung bis zum Blastozystenstadium anhand morphologischer Kriterien evaluiert, unter anderem der Zellform und der Bildung des Blastocoels. Zur Untersuchung einer möglichen Zellkernfusion wurde der Ploidiegrad der Zellen im Blastozystenstadium bestimmt (siehe Anhang A.3).

Im folgenden Abschnitt wird der Einfluss von Laserparametern auf die Fusionseffizienz von HL-60-Zellen beschrieben. Dabei wird die Entstehung langlebiger Gasblasen unter dem Lichtmikroskop beobachtet, um eine Verbindung zwischen Zellfusion und Optoporation herzustellen. Mit den gewonnenen Erkenntnissen wird anschließend die erfolgreiche Fusion porziner 2-Zell-Embryonen mit einem deutlich größeren Volumen von etwa 200 pl demonstriert. Die statistische Signifikanz der Ergebnisse wurde mit *SigmaStat 3.5 (Systat Software)* getestet. Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen wurden bei $P < 0,05$ als statistisch signifikant angenommen.

5.3.1. Einfluss der Laserparameter

Die erste Versuchsreihe diente der Identifizierung geeigneter Laserparameter für eine Laser-induzierte Fusion von HL-60-Zellen. Dazu wurde die Zell-Zell-Kontaktstelle mit verschiedenen Zeiten und Pulsenergien bei einer festen NA von 0,5 oder 0,8 bestrahlt. In diesem Zusammenhang wurde die Laserfluenz als Quotient aus Pulsenergie und fokalem Volumen definiert. Bei geringen Fluenzen ohne direkt sichtbare zelluläre Reaktion wurden keine Anzeichen einer Zellfusion oder eines Zelltods beobachtet. Oberhalb einer von der Bestrahlungszeit abhängigen Fluenz entstand eine Gasblase mit einer Lebensdauer von bis zu etwa einer Sekunde im fokalen Volumen (siehe Abbildung 5.10b). Die mit einer 50 %-Wahrscheinlichkeit zur Gasblasen-Erzeugung führenden Schwellenfluenz F_t nahm kontinuierlich mit der Bestrahlungszeit t ab. Die experimentellen Daten wurden optimal mit einer Potenzfunktion genähert, welche asymptotisch auf einen Sättigungswert F_∞ abfällt. Bei einer NA von 0,5 betrug dieser $F_\infty = 45 \text{ mJ/cm}^2$ und der Exponent der Potenzfunktion $k = 2$ (siehe Abbildung 5.10g). Nur nach der Erzeugung einer langlebigen Gasblase wurde innerhalb weniger Minuten entweder eine erfolgreiche Zellfusion oder eine signifikante Änderung der Morphologie bis zum Zelltod beobachtet.

Im Falle einer erfolgreichen Zellfusion war innerhalb von 30 Sekunden die Fusion der angrenzenden Zellmembranen sichtbar (siehe Abbildung 5.10c). Während dieses Zeitraums trat im bestrahlten Bereich einiger Zellpaare ein runder, dunkler Fleck mit der gleichen Größe wie der fokussierte Laserstrahl auf, der innerhalb weniger Minuten verblasste (siehe Abbildungen 5.10d-f). Nach ungefähr fünf bis zehn Minuten war der Fusionsprozess abge-

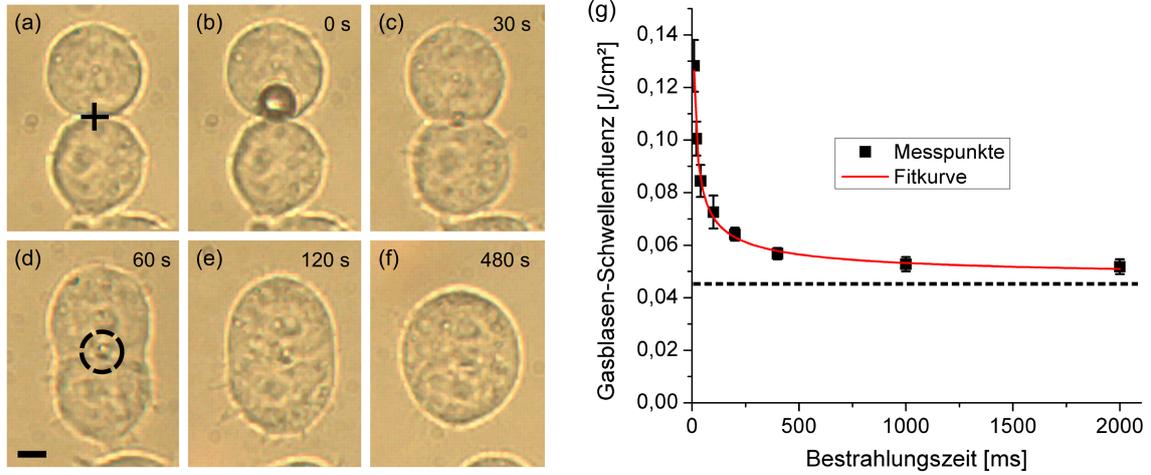


Abbildung 5.10.: (a-f) Zeitlicher Verlauf der Laser-induzierten Fusion von HL-60-Zellen mit einer $NA = 0,8$. Die Bestrahlung der Zell-Zell-Kontaktstelle (schwarzes Kreuz) führte zur Entstehung einer langlebigen Gasblase. Anschließend war in diesem Bereich ein runder, dunkler Fleck sichtbar (gestrichelter Kreis in (d)). Die Zellfusion durchlief mehrere Zwischenstadien und war nach etwa fünf bis zehn Minuten abgeschlossen. Skala: $5 \mu\text{m}$. (g) Die Gasblasen-Schwellenfluenz F_t nahm bei einer $NA = 0,5$ mit zunehmender Bestrahlungszeit t asymptotisch auf einen Sättigungswert $F_\infty = 45 \text{ mJ}/\text{cm}^2$ ab (gestrichelte Linie). Jeder Messwert stellt den Mittelwert \pm Standardabweichung aus fünf Wiederholungen dar.

schlossen. Unabhängig von den Laserparametern war die Vitalität der fusionierten Zellen höher als 95 %; dabei wurden insgesamt 26 Komplexe analysiert.

Die Korrelation zwischen der Größe und Lebensdauer der Gasblase sowie der Wahrscheinlichkeit einer Zellfusion wurde anhand der Laserbestrahlung von 150 Zellpaaren oberhalb der Schwelle zur Gasblasen-Erzeugung untersucht. Da die Blasengröße kontinuierlich mit der Zeit abnahm, wurde der maximale Blasendurchmesser als entsprechender Wert im ersten CCD-Kamerabild nach deren Erzeugung definiert. Der maximale Blasendurchmesser variierte über einen großen Bereich zwischen $1,2$ und $10 \mu\text{m}$. Jedoch nahm die Auftrittswahrscheinlichkeit mit steigendem Durchmesser ab (siehe schwarze Balken in Abbildung 5.11a). Hohe Fusionsraten wurden nur bei Durchmessern zwischen 4 und $8 \mu\text{m}$ mit einem Verhältnis von 2:1 bis 14:1 zwischen fusionierten und nicht-fusionierten Zellen erreicht. Wie erwartet nahm die Lebensdauer der Gasblase t_L kontinuierlich mit dem maximalen Blasendurchmesser D zu (siehe Abbildung 5.11b). Die experimentellen Daten wurden optimal durch eine Potenzfunktion $t_L \propto D^p$ mit einem Exponenten $p = 1,7$ genähert.

Die Fusionseffizienz von HL-60-Zellen wurde für Bestrahlungszeiten von 10 und 60 ms bei unterschiedlichen Laserfluenzen analysiert. Der erste Wert entsprach der kürzestmöglichen Öffnungszeit des mechanischen Shutters (siehe Abschnitt 4.1.2), während der zweite Wert häufig zur Optoporation verwendet wird [Bau08]. Da die maximale Fusionseffizienz unabhän-

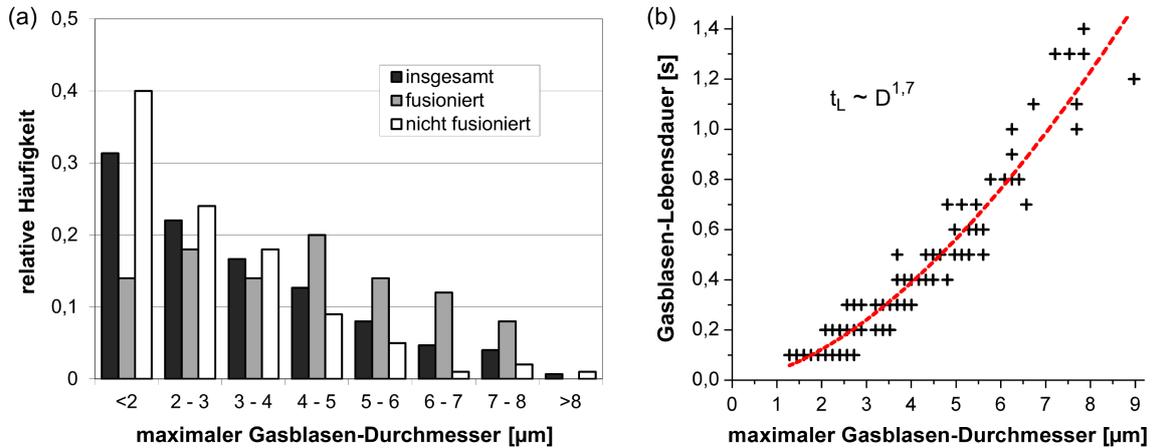


Abbildung 5.11.: Korrelation zwischen Größe und Lebensdauer der Gasblase sowie der Wahrscheinlichkeit einer Zellfusion für $n=150$ bestrahlte HL-60-Zellpaare (180 mJ/cm^2 , 10 ms , $NA = 0,8$). (a) Relative Häufigkeiten des maximalen Blasendurchmessers für alle Zellpaare (schwarze Balken), die entweder fusionierten (graue Balken) oder nicht fusionierten (weiße Balken). Hohe Fusionswahrscheinlichkeiten wurden nur bei Durchmessern zwischen 4 und 8 μm beobachtet. (b) Die experimentellen Daten der Gasblasen-Lebensdauer t_L in Abhängigkeit des maximalen Blasendurchmessers D wurden am besten durch eine Potenzfunktion mit einem Exponenten $p = 1,7$ genähert.

gig von der NA des Mikroskop-Objektivs war, wurde in diesem Experiment eine NA von $0,5$ mit einem deutlich größeren Bildfeld verwendet. Die Schwellenfluenz für eine Zellfusion betrug 75 mJ/cm^2 bei 10 ms sowie 55 mJ/cm^2 bei 60 ms und stimmte jeweils mit der minimal notwendigen Fluenz für eine Gasblasen-Erzeugung überein (siehe Abbildung 5.12). Die Fusionseffizienz stieg kontinuierlich mit der Laserfluenz bis zum Maximum von 21% bei 10 ms und 15% bei 60 ms an, welches etwa 45 bzw. 70% oberhalb der Schwelle lag. Eine weitere Erhöhung der Laserfluenz resultierte in einem stetigen Abfall der Fusionseffizienz auf etwa 5% bei der zwei- bis dreifachen Schwellenfluenz. Insgesamt zeigte diese Versuchsreihe, dass die geringere Bestrahlungszeit von 10 ms höhere Fusionseffizienzen zur Folge hatte (vgl. Abbildungen 5.12a und b).

5.3.2. Übertragbarkeit auf porcine 2-Zell-Embryonen

Basierend auf den Ergebnissen in Abschnitt 5.3.1 wurde die Laser-induzierte Fusion parthenogenetischer 2-Zell-Embryonen vom Schwein untersucht, die einen deutlich größeren Durchmesser von ungefähr 150 μm haben. In diesen Experimenten wurde eine $NA = 0,5$ mit einem Sichtfeld von etwa 550 μm verwendet. Auf Grund des hohen Lipidanteils im Zytoplasma ist die optische Transmission porciner Embryonen im Vergleich zu HL-60-Zellen sehr gering, insbesondere im NIR-Bereich [Zeg07]. Folglich lag die Schwellenfluenz für eine Fusion

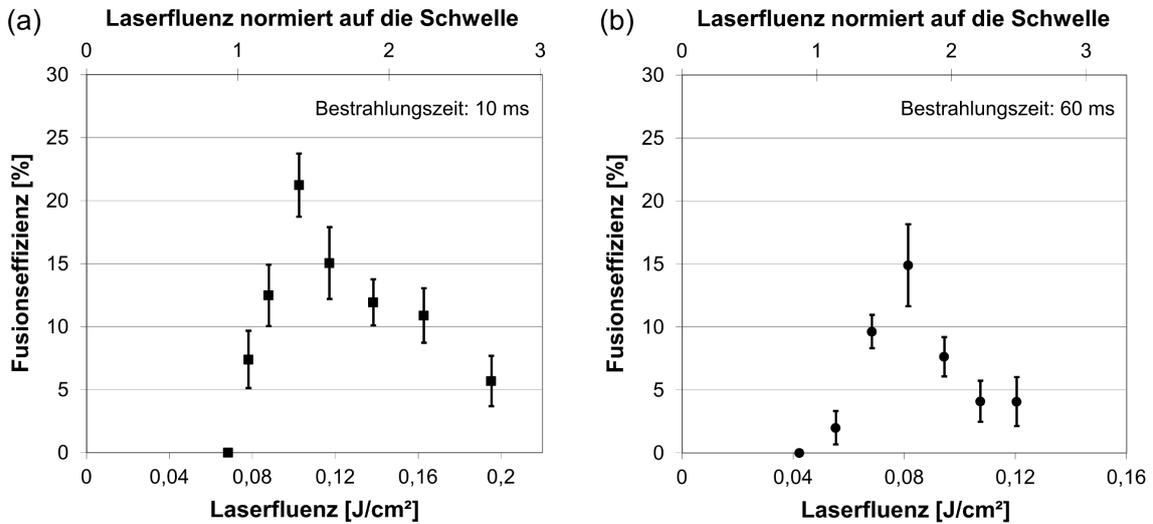


Abbildung 5.12.: Fusionseffizienzen nach Bestrahlung von $n > 2000$ HL-60-Zellpaaren mit einer $NA = 0,5$ für (a) 10 ms und (b) 60 ms. Die Fusionsschwelle entsprach jeweils der Schwelle zur Gasblasen-Erzeugung. Die maximale Fusionseffizienz betrug (a) 21 % für 10 ms sowie (b) 15 % für 60 ms und wurde etwa 45 bzw. 70 % oberhalb der Schwelle erreicht. Jeder Messwert stellt den Mittelwert \pm Standardfehler aus mindestens fünf Wiederholungen dar.

von 2-Zell-Embryonen etwa drei- bis viermal höher ($180\text{-}280 \text{ mJ/cm}^2$). Analog zu HL-60-Zellen war die Erzeugung einer langlebigen Gasblase im bestrahlten Bereich notwendig, um eine Zellfusion zu induzieren. Dabei hatte die Gasblase einen deutlich größeren Durchmesser von bis zu $15 \mu\text{m}$ mit einer Lebensdauer von einigen Sekunden. Die Zwischenstadien bei der Fusion von 2-Zell-Embryonen waren mit denen von HL-60-Zellen vergleichbar, benötigten aber einen etwa 20-fach längeren Zeitraum (vgl. Abbildungen 5.13c-f und 5.10d-f). Erst eine halbe Stunde nach der Laserbestrahlung war ein Austausch von Zytoplasma zwischen beiden Zellen deutlich sichtbar (siehe gestrichelte Ellipse in Abbildung 5.13b).

Zum Erreichen möglichst hoher Fusionseffizienzen wurde eine Laserfluenz etwa 30 % oberhalb der Schwelle gewählt, bei der reproduzierbar eine langlebige Gasblase entstand. Die Fusionseffizienz wurde für zwei Bestrahlungszeiten von 20 und 100 ms bei Fluenzen von 360 bzw. 230 mJ/cm^2 bestimmt. Obwohl Abschnitt 5.3.1 deutlich gezeigt hat, dass noch kürzere Zeiten vorteilhaft wären, wurde dies durch die maximale Ausgangsleistung des Lasers verhindert. Der Anteil fusionierter 2-Zell-Embryonen war für 20 ms (54 %) und 100 ms (44 %) vergleichbar (siehe Abbildung 5.14). Gleichzeitig war die Zellvitalität bei der geringeren Bestrahlungszeit signifikant höher (95 % bei 20 ms vs. 73 % bei 100 ms, $P < 0,05$, t-Test). Eine Hoechst-Färbung der fusionierten Embryonen ergab, dass die Zellkerne entweder im Zytoplasma getrennt blieben oder in der Mitte des Embryos innerhalb weniger Stunden fusionierten (siehe Abbildungen 5.15a und b).

Nach Bestimmung der Fusionseffizienz wurden die 2-Zell-Embryonen weiter kultiviert, um

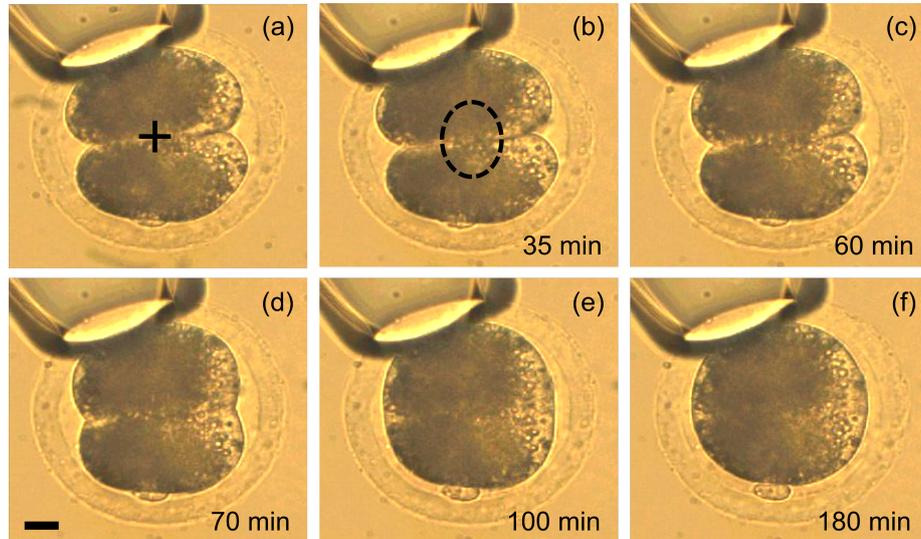


Abbildung 5.13.: Zeitlicher Verlauf der Laser-induzierten Fusion parthenogenetischer 2-Zell-Embryonen vom Schwein mit einer $NA = 0,5$. (a) Die Bestrahlung der Zell-Zell-Kontaktstelle (schwarzes Kreuz) initiierte die Zellfusion. (b) Der Austausch von Zytoplasma zwischen beiden Zellen war ungefähr eine halbe Stunde nach Bestrahlung sichtbar (markiert durch gestrichelte Ellipse). (c-f) Die Zellfusion benötigte im Vergleich zu HL-60-Zellen einen etwa 20-fach längeren Zeitraum. Skala: 20 μm .

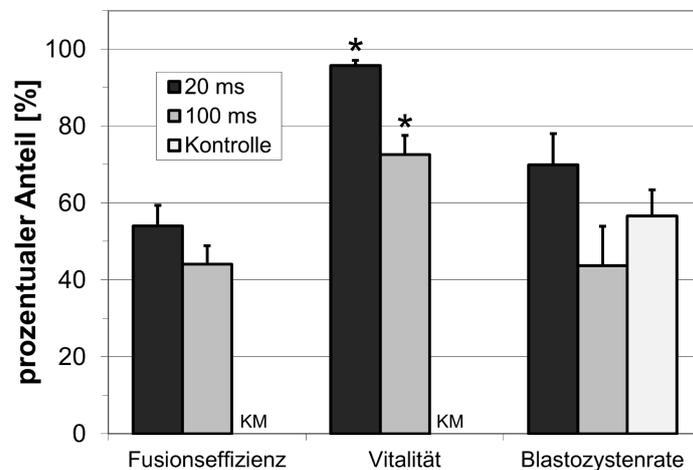


Abbildung 5.14.: Evaluation der Fusionseffizienz, Vitalität und Blastozystenrate nach der Laserbestrahlung von $n > 450$ parthenogenetischen 2-Zell-Embryonen vom Schwein mit einer $NA = 0,5$ (20 ms, 360 mJ/cm^2 bzw. 100 ms, 230 mJ/cm^2). Die Blastozystenraten fusionierter und unbehandelter (Kontroll-) Embryonen zeigten keinen statistisch signifikanten Unterschied. KM: keine Messung. Jeder Messwert stellt den Mittelwert \pm Standardfehler aus mindestens vier Wiederholungen dar. * Werte sind statistisch signifikant unterschiedlich ($P < 0,05$).

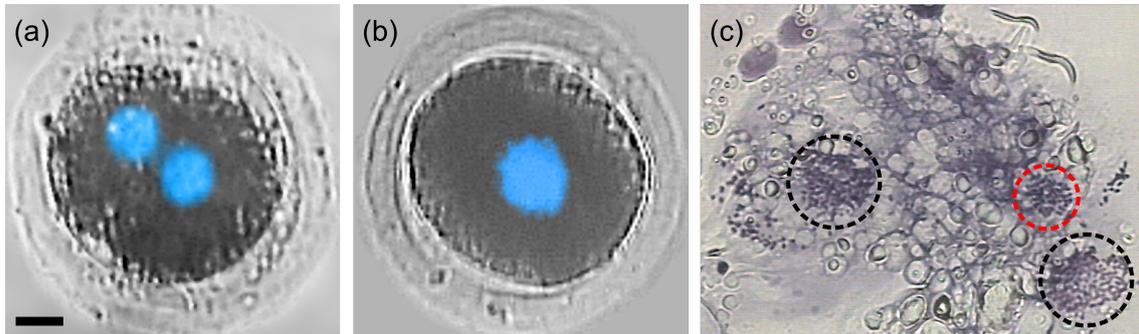


Abbildung 5.15.: (a,b) Eine Hoechst-Färbung der fusionierten 2-Zell-Embryonen (blau) zeigte, dass beide Zellkerne entweder getrennt im Zytoplasma blieben oder fusionierten. Skala: 20 μm . (c) In einigen fusionierten Embryonen waren neben diploiden Zellkernen (roter Kreis) auch polyploide Zellkerne (schwarze Kreise) sichtbar.

die Entwicklungsraten bis zum Blastozystenstadium zu ermitteln. Analog zur Fusionseffizienz war die Blastozystenrate bei 20 ms (70 %) deutlich höher als bei 100 ms (43 %). Dabei wurde kein statistisch signifikanter Unterschied zwischen fusionierten und unbehandelten (Kontroll-) Embryonen festgestellt ($P > 0,13$, t-Test, siehe Abbildung 5.14). Eine Analyse des Ploidiegrads in diesem Entwicklungsstadium zeigte, dass in einigen fusionierten Embryonen polyploide Zellkerne im Zytoplasma vorhanden waren (siehe Abbildung 5.15c).

5.4. Zusammenfassung

In diesem Kapitel wurden die Mechanismen der Photobleichung höherer Ordnung, der intrazellulären Dissektion und der Laser-induzierten Zellfusion näher untersucht, die alle überwiegend im Low-Density-Plasma-Regime durchgeführt werden [Vog05].

Die Photobleichung höherer Ordnung wurde sowohl für endogene (eGFP) als auch für exogene Fluorophore (Hoechst) evaluiert. Bei einer Fluorophor-spezifischen Wellenlänge, 840 nm für eGFP und 930 nm für Hoechst, stieg die Photobleichungsordnung sprunghaft um Eins an. Die selektive Photobleichung von eGFP in Hoechst-gefärbten Zellkernen resultierte in einem Laserparameter-unabhängigen Abfall der Hoechst-Fluoreszenzintensität um etwa 70 %, bezogen auf den Abfall der eGFP-Fluoreszenzintensität. Des Weiteren korrelierte die Hoechst-Photobleichung unabhängig von der Halbwertszeit mit der Erzeugung von ROS im intrazellulären Raum.

Bei der Manipulation Hoechst-gefärbter Zellkerne wurde das Photobleichungs- vom Dissektionsregime abgegrenzt, deren Schwellenenergien etwa 50 % auseinander lagen. Jedoch wurden bereits bei im Vergleich zur Dissektionsschwelle fünffach geringeren Pulsenergien DSB in den Zellkernen induziert, die zur Aktivierung von Reparaturmechanismen führten. Die Dissektions-Schwellenenergie wurde entscheidend von der Anwesenheit von Hoechst-

Molekülen und der Anzahl applizierter Laserpulse pro Volumen beeinflusst, jedoch nicht von der Repetitionsrate. Eine Zellkern-Färbung mit Hoechst verringerte die Schwellenenergie um den Faktor Vier. Die experimentellen Daten der Schwellenenergie in Abhängigkeit der Anzahl applizierter Laserpulse wurden optimal mit einer Potenzfunktion genähert. Bei einer Wellenlänge von etwa 900 nm nahm der Exponent der Potenzfunktion unabhängig von der Repetitionsrate um Eins zu. Unterhalb von 840 nm war dieser bei einer hohen Repetitionsrate von 80 MHz deutlich geringer als im kHz-Regime.

Die Laser-induzierte Zellfusion von nicht-adhärenenten HL-60-Zellen und parthenogenetischen 2-Zell-Embryonen vom Schwein wurde jeweils durch eine Bestrahlung der Zell-Zell-Kontaktstelle erreicht. Für beide Zelltypen korrelierte die Fusionschwelle mit der Schwelle zur Erzeugung einer langlebigen Gasblase im bestrahlten Bereich. Diese hatte für HL-60-Zellen einen Durchmesser zwischen 1,2 und 10 μm mit einer dazugehörigen Lebensdauer von bis zu einer Sekunde. Hohe Fusionsraten wurden nur bei Blasendurchmessern zwischen 4 und 8 μm erreicht. Die maximale Fusionseffizienz wurde etwa 50 % oberhalb der Schwellenfluenz gemessen und war bei einer Bestrahlungszeit von 10 ms deutlich höher als bei 60 ms. Analoge Beobachtungen wurden für 2-Zell-Embryonen gemacht. Nach der Laser-induzierten Fusion entwickelten sich diese mit einer maximalen Rate von 70 % bis zum Blastozystenstadium ohne signifikanten Unterschied zur Kontrollgruppe. In diesem Stadium waren in einigen fusionierten Embryonen polypleide Zellkerne sichtbar.

6. Laserbildgebung und -manipulation in der regenerativen Medizin

Ultrakurze Laserpulse sind ein minimal-invasives Werkzeug für die Bildgebung und Manipulation biologischer Strukturen [Koe00, Vog05]. Basierend auf den Erkenntnissen in Kapitel 5 werden in diesem Kapitel potentielle Applikationen in der regenerativen Medizin mit Pulsenergien im Low-Density-Plasma-Regime evaluiert.

Zunächst wird die MPM-gesteuerte Nanochirurgie zur automatisierten Bildgebung und Dissektion der Metaphasenplatte porziner Oozyten verwendet, was eine Alternative zur konventionellen mechanischen E nukleation beim SCNT darstellt. Anschließend wird die Eignung der Zweiphotonenanregung von Photosensitizern zur chemischen Kollagen-Quervernetzung in artifiziellem Gewebe im Bereich des Tissue Engineering untersucht. Im Gegensatz zu etablierten Methoden ermöglicht dieser nichtlineare Prozess die selektive Quervernetzung beliebiger Strukturen.

6.1. MPM-gesteuerte Laser-E nukleation

Das Potential der MPM-gesteuerten Laser-E nukleation für den SCNT wurde mit porzinen Metaphase-II-Oozyten (MII-Oozyten) ermittelt (siehe Anhang B.1 und [Höl03]). Diese wurden in Fünfergruppen mit Hoechst 33342 gefärbt (siehe Anhang A.3) und einzeln nacheinander mit dem in Kapitel 4 beschriebenen experimentellen Aufbau sowie einer NA von 0,8 manipuliert. Zur Positionierung der Oozyten wurde eine Mikropipette mit einem inneren Durchmesser von 50 μm am Mikroskop befestigt und über einen Schlauch mit einer 1 ml-Spritze (*BD Medical*) verbunden. Damit wurde ein alternierender Unter- und Überdruck angelegt, bis der Polkörper und die Metaphasenplatte mit der MPM identifiziert werden konnten. In den folgenden Experimenten wurde durchgehend eine Wellenlänge von 720 nm verwendet, da diese zur maximalen Dissektionseffizienz subzellulärer Strukturen führte (siehe Abbildung 5.8) und dem Zweiphotonen-Absorptionsmaximum von Hoechst im genutzten Parameterbereich entspricht [Bes02].

Die Laser-E nukleation porziner Oozyten umfasste drei Schritte. Zuerst wurde mittels MPM ein dreidimensionaler Bilderstapel generiert, dessen räumliche Grenzen die Metaphasenplatte umschlossen. Durch unmittelbare Bildverarbeitung mit einer innerhalb der Abteilung *Biomedizinische Optik* entwickelten *LabView*-basierten Software wurden Position und Umrisse der Metaphasenplatte in jeder axialen Ebene automatisch erfasst. Dies basierte auf dem Kontrast zwischen der intensiven Hoechst-Fluoreszenz und dem Hintergrundsignal

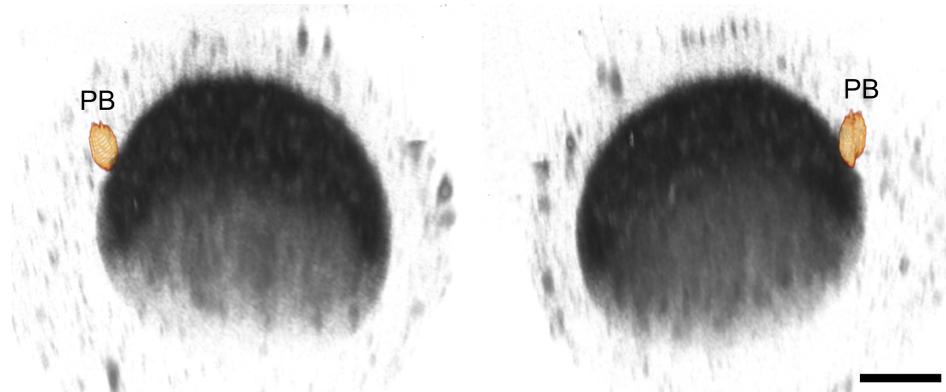


Abbildung 6.1.: Dreidimensionale Rekonstruktion einer porzinen MII-Oozyte aus einem MPM-Bilderstapel, die aus zwei entgegengesetzten Blickwinkeln gezeigt ist. Während die Autofluoreszenz des Zytoplasmas (in Grau) und die Hoechst-Fluoreszenz des Polkörpers (PB, in Orange) sichtbar sind, befindet sich die Metaphasenplatte im Inneren des Zytoplasmas. Skala: 30 μm .

(siehe Abbildung 6.2b). Danach wurde der Manipulationsstrahl nur über die von der Software markierten Bereiche mit einer Pulsenergie im Low-Density-Plasma-Regime abgerastert. Der laterale Abstand zwischen zwei Linien in einer Ebene und der axiale Abstand zwischen zwei Ebenen wurden zu 0,5 bzw. 1,5 μm bestimmt. Diese unterschieden sich jeweils um weniger als 15 % von der Strahlentaille bzw. der Rayleigh-Länge des fokussierten Laserstrahls bei einer NA von 0,8 [Sal08], so dass die Metaphasenplatte mit einer homogenen Energiedichte bestrahlt wurde. Abschließend wurde der gleiche dreidimensionale Bilderstapel wie zuvor generiert, um den Erfolg der Dissektion zu beurteilen. Insgesamt dauerte die Prozedur ungefähr 30 s. Die bestrahlten Oozyten wurden erneut mit Hoechst und zusätzlich mit SYBR Green I gefärbt, um die Photobleichung von der Dissektion abzugrenzen. Zur Beurteilung der mitochondrialen Verteilung und Morphologie vor sowie nach der Laser-Enukleation wurden die Oozyten mit MitoTracker Orange gefärbt (siehe Anhang A.3).

Im folgenden Abschnitt wird zuerst die Effizienz der Laser-Enukleation in Abhängigkeit der Laserparameter untersucht. Anschließend werden das parthenogenetische Entwicklungspotential der Laser-enukleierten Oozyten und deren Eignung für den SCNT im Vergleich zur mechanischen Enukleation bewertet. Die statistische Signifikanz der Ergebnisse wurde mit *SigmaStat 3.5 (Systat Software)* getestet. Unterschiede zwischen Versuchsgruppen wurden bei $P < 0,05$ als statistisch signifikant angenommen.

6.1.1. Visualisierung und Dissektion der Metaphasenplatte

Zur Demonstration der Eignung der MPM für die Bildgebung porziner MII-Oozyten ist in Abbildung 6.1 die dreidimensionale Rekonstruktion eines Bilderstapels dargestellt.

Erkennbar sind die Autofluoreszenz des äußeren Zytoplasmas und die Hoechst-Fluoreszenz des Polkörpers, während sich die Metaphasenplatte im Inneren der Oozyte befindet und daher nicht sichtbar ist. Ein deutlicher Abfall der detektierten Fluoreszenzintensität trat in den tiefsten Schichten der Oozyte auf, die einen Durchmesser von ungefähr 150 μm hat. Deswegen wurde die Metaphasenplatte vor der Laser-Enukleation in der äquatorialen Ebene der Oozyte positioniert.

Die erste Versuchsreihe diente der Identifizierung optimaler Laserparameter für eine effiziente Dissektion der Metaphasenplatte bei minimaler Schädigung des umgebenden Zytoplasmas. Dazu wurden die Repetitionsrate, Pulsenergie und Scangeschwindigkeit des Manipulationsstrahls über den verfügbaren Parameterbereich variiert. Bei konstanter applizierter Energiedichte war die Dissektions-Wahrscheinlichkeit analog zu den Experimenten in Hoechst-gefärbten Zellkernen (siehe Abschnitt 5.2.3) unabhängig von der Repetitionsrate. Um zugleich eine Minimierung der Prozessdauer und der thermischen Effekte zu erreichen (siehe Abschnitt 3.3.2), wurden alle weiteren Experimente mit einer Repetitionsrate von 1 MHz bei einer Pulsdichte von 10000 Pulsen/ μm durchgeführt.

Direkt nach Bestrahlung der Metaphasenplatte mit einer Pulsenergie von 2,5 nJ verschwand deren Hoechst-Fluoreszenz in etwa 75 % der Oozyten vollständig (siehe Abbildung 6.2c). Im Gegensatz dazu blieb der benachbarte Polkörper in seiner Form und Hoechst-Fluoreszenzintensität unverändert. Wie auch in Abschnitt 5.2.1 wurde die Fluoreszenz der Metaphasenplatte in diesem Regime durch erneute Färbung mit Hoechst und SYBR Green I nicht wiederhergestellt. Folglich führten diese Parameter mit einer Wahrscheinlichkeit von 75 % zur vollständigen Dissektion der Metaphasenplatte. Gleichzeitig blieb die Morphologie der Oozyten und ihrer Mitochondrien über mindestens drei Stunden unverändert. Durch die variierende optische Transmission des Zytoplasmas wurde bei den übrigen 25 % der Oozyten entweder eine verbleibende Hoechst-Fluoreszenz von Chromosomenfragmenten oder die Entstehung einer langlebigen Gasblase beobachtet; letzteres ist bei der intrazellulären Dissektion unerwünscht [Vog05]. Eine Variation der Pulsenergie zeigte, dass die Wahrscheinlichkeit für verbleibende Chromosomenfragmente und die Bildung einer langlebigen Gasblase mit ab- bzw. zunehmender Pulsenergie kontinuierlich anstieg (siehe Abbildung 6.3). Dementsprechend wurde in den folgenden Versuchsreihen ausschließlich eine Pulsenergie von 2,5 nJ verwendet.

In Abschnitt 5.2.2 wurde gezeigt, dass die Dissektion in Hoechst-gefärbten Zellkernen zur Erzeugung eines kernweiten γ -H2AX-Signals und damit zur Aktivierung von Reparaturmechanismen führt. Infolgedessen wurde die Übertragbarkeit dieser Ergebnisse auf die Laser-Enukleation überprüft. Dazu wurden die manipulierten MII-Oozyten nach 15 Minuten fixiert und mit einem primären sowie sekundären Antikörper zur Detektion des phosphorylierten H2AX-Histons (γ -H2AX) inkubiert (siehe Anhang A.3). Im Vergleich zur Kontrollgruppe, in der alle Arbeitsschritte bis auf die Dissektion der Metaphasenplatte durchgeführt wurden, resultierte die Laser-Enukleation in einem deutlichen Anstieg des γ -H2AX-Signals (siehe Abbildung 6.4). Dies war in allen Oozyten nahezu homogen über das gesamte Zytoplasma verteilt.

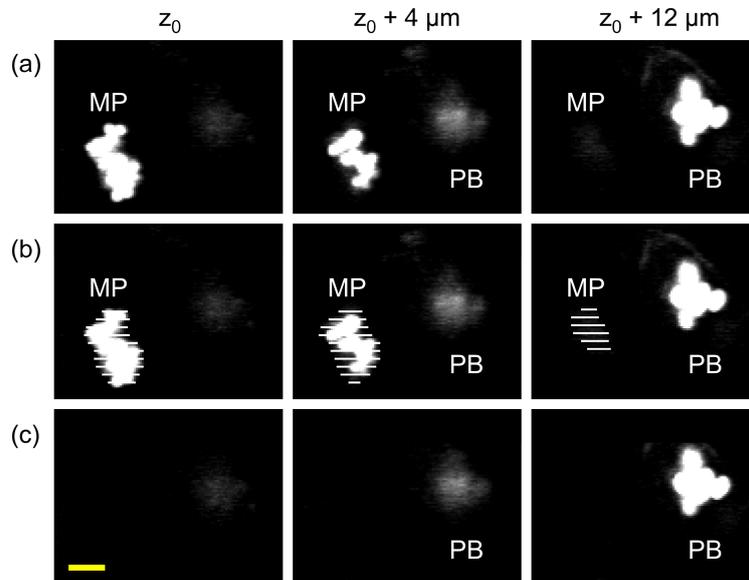


Abbildung 6.2.: MPM-Bilder aus verschiedenen axialen Ebenen z_0 , $z_0 + 4 \mu\text{m}$ und $z_0 + 12 \mu\text{m}$ (a) vor sowie (c) direkt nach der Dissektion der Metaphasenplatte (MP) einer Hoechst-gefärbten, porzinen MII-Oozyte (10000 Pulse/ μm , 1 MHz, 2,5 nJ). (b) Bei dieser Prozedur wurden die Position und Umrisse der MP automatisch erfasst. PB: Polkörper. Skala: 5 μm .

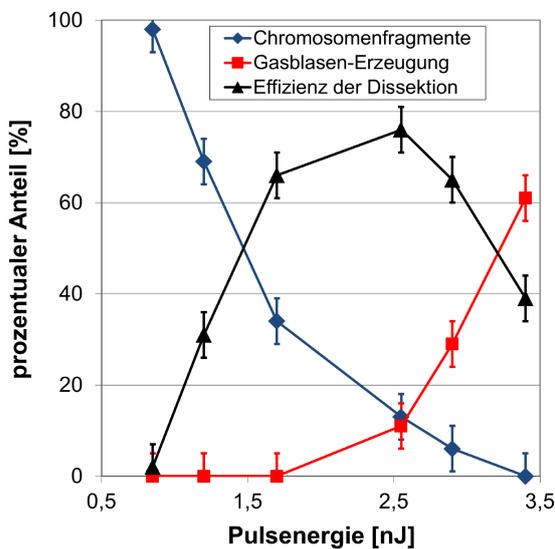


Abbildung 6.3.: Die Effizienz der Metaphasenplatten-Dissektion war bei einer Pulsenergie von 2,5 nJ maximal (10000 Pulse/ μm , 1 MHz).

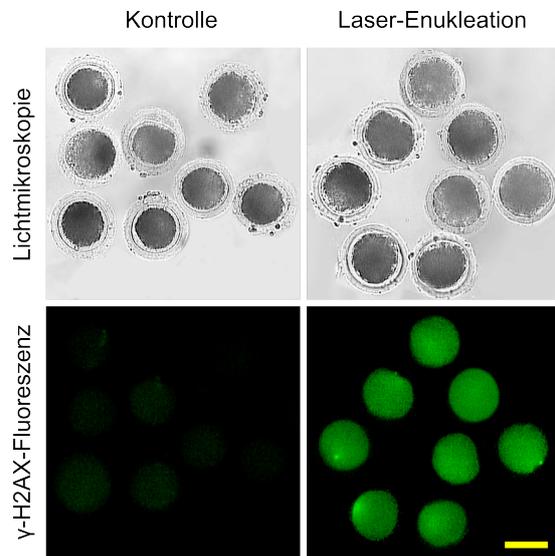


Abbildung 6.4.: Die Laser-Enukleation porziner MII-Oozyten induzierte ein starkes γ -H2AX-Signal im gesamten Zytoplasma. Skala: 100 μm .

6.1.2. Parthenogenetische Entwicklung Laser-enukleierter Oozyten

Zur Verifizierung der erfolgreichen Laser-Enukleation wurden die manipulierten MII-Oozyten parthenogenetisch aktiviert und anschließend *in vitro* kultiviert (siehe Anhang B.3 und [Höl03]). Eine vollständige Dissektion der Metaphasenplatte sollte die DNA inaktivieren und keine parthenogenetische Entwicklung initiieren, ohne die umliegenden Zellorganellen oder das Zytoplasma unmittelbar zu schädigen. Aus diesem Grund wurden zwei Kontrollgruppen verwendet, in denen das Oozyten-Zytoplasma direkt neben bzw. diametral entgegengesetzt der Metaphasenplatte mit den gleichen Laserparametern manipuliert wurde. Diese werden im Folgenden als „Zytoplasma 0°“ bzw. „Zytoplasma 180°“ bezeichnet. Zusätzlich wurden in einer weiteren Kontrollgruppe alle Arbeitsschritte bis auf die Dissektion der Metaphasenplatte durchgeführt („MPM-Kontrolle“). Zur Evaluation potentieller, negativer Einflüsse der MPM und der anderen Arbeitsschritte verblieb eine Kontrollgruppe während des gesamten Experiments im Inkubator („Inkubator-Kontrolle“). Um einen direkten Vergleich zu konventionellen Methoden zu erhalten, wurde in einer weiteren Gruppe die mechanische Enukleation durchgeführt, deren Ablauf in [Höl03] beschrieben ist.

Das Entwicklungspotential parthenogenetisch aktivierter MII-Oozyten wurde entweder 19 Stunden (Vorkernstadium) oder sieben Tage (Blastozystenstadium) nach der Aktivierung untersucht. Zur Bewertung der erfolgreichen Entstehung eines Vorkerns wurden die Embryonen nach 19 Stunden fixiert, mit Lacmoid gefärbt und unter einem Phasenkontrastmikroskop untersucht (siehe Anhang A.3). Die Rate der Vorkernbildung wurde als Quotient aus der Anzahl der Embryonen mit mindestens einem Vorkern und der Gesamtanzahl aktivierter Oozyten definiert. Morphologische Kriterien wie beispielsweise die Zellform und die Bildung des Blastocoels wurden verwendet, um die erfolgreiche Embryonalentwicklung bis zum Blastozystenstadium nach sieben Tagen zu evaluieren. Die Embryonenqualität wurde anhand der Anzahl der Zellkerne in Hoechst-gefärbten Blastozysten bewertet. Embryonen mit mehr als einem Zellkern wurden als „geteilt“ klassifiziert. Die Blastozysten- und Teilungsraten wurden als Quotient aus der Anzahl von Blastozysten bzw. geteilten Embryonen und der Gesamtanzahl aktivierter Oozyten definiert.

In allen experimentellen Gruppen wiesen mehr als 95 % der Oozyten 19 Stunden nach parthenogenetischer Aktivierung eine normale Morphologie auf (siehe Tabelle 6.1). Analog zu Abschnitt 6.1.1 waren in etwa 10 % der Laser-enukleierten Oozyten verbleibende Chromosomenfragmente im Zytoplasma sichtbar (siehe Abbildung 6.5e). Die Effizienz der Laser-Enukleation betrug 96 %, da eine Vorkernbildung nur in 4 % der Embryonen beobachtet wurde; dies war mit der mechanischen Enukleation vergleichbar ($P = 0,5$, Exakter Fisher-Test). Im Gegensatz dazu waren die Raten der Vorkernbildung in der MPM- und Inkubator-Kontrolle jeweils größer als 95 % und damit signifikant höher ($P < 0,001$, Chi-Quadrat-Test).

Nach siebentägiger *in vitro*-Kultivierung trat in 35 % der Laser-enukleierten Oozyten eine Fragmentierung des Zytoplasmas auf, ohne dass einzelne Zellkerne oder DNA-Fragmente sichtbar waren (siehe Abbildung 6.5f). Die gleichen Beobachtungen wurden nach der

Tabelle 6.1.: Parthenogenetische Entwicklung Laser-enukleierter MII-Oozyten bis zur Vorkernbildung im Vergleich zu Kontrollgruppen. Die Dissektion der Metaphasenplatte inaktivierte in 96 % der Oozyten die DNA ohne deren Morphologie zu beeinflussen, was mit der mechanischen Enukleation vergleichbar war.

	Normale Morphologie	Vorkernbildung
Laser-Enukleation	48/50 (96 %)	2/50 (4 %) ^a
Mechanische Enukleation	42/42 (100 %)	0/42 (0 %) ^a
Inkubator-Kontrolle	64/64 (100 %)	61/64 (95 %) ^b
MPM-Kontrolle	51/51 (100 %)	50/51 (98 %) ^b

^{ab} Werte sind statistisch signifikant unterschiedlich ($P < 0,05$).

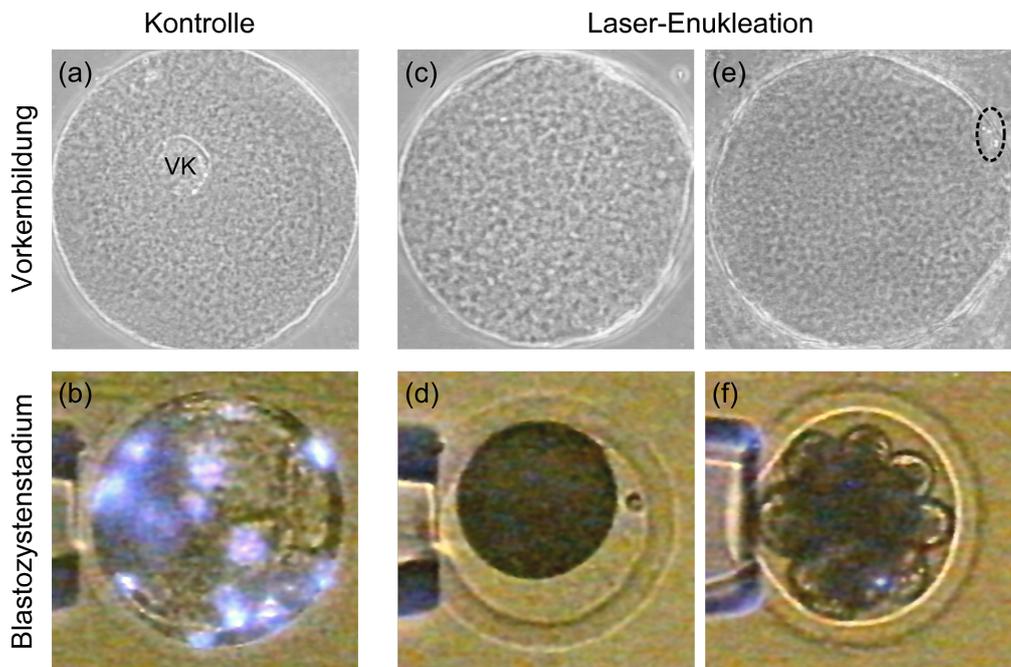


Abbildung 6.5.: Morphologie von (a,b) Kontroll- und (c-f) Laser-enukleierten MII-Oozyten nach parthenogenetischer Aktivierung. Kontrollloozyten (a) bildeten einen Vorkern (VK) und (b) entwickelten sich zu Blastozysten, während sich Laser-enukleierte Oozyten (c,d) durch den fehlenden Vorkern nicht teilten. In einigen manipulierten Oozyten waren (e) Chromosomenfragmente im Zytoplasma (gestrichelte Ellipse) bzw. (f) eine Fragmentierung des Zytoplasmas sichtbar. Die Oozyten in (b), (d) und (f) waren mit Hoechst (blau) gefärbt.

mechanischen Enukleation gemacht. Kein Laser- oder mechanisch enukleiertes Embryo setzte die parthenogenetische Entwicklung fort und durchlief die erste mitotische Zellteilung, so dass in diesen Gruppen keine Blastozysten entstanden (siehe Tabelle 6.2). Im Vergleich dazu waren die Teilungs- und Blastozystenraten nach der Manipulation des Zytoplasmas („Zytoplasma 0°“ und „Zytoplasma 180°“) signifikant höher ($P < 0,001$, Chi-Quadrat-Test) und mit denen der MPM- sowie der Inkubator-Kontrolle vergleichbar. Ferner war die Anzahl der Zellkerne in diesen vier Gruppen signifikant höher als nach der Laser- und mechanischen Enukleation ($P < 0,005$, ANOVA, Tukey-Test).

Tabelle 6.2.: Parthenogenetische Entwicklung Laser-enukleierter MII-Oozyten bis zum Blastozystenstadium im Vergleich zu Kontrollgruppen. Nach der Laser-Enukleation wurde keine Zellteilung beobachtet. Die Laserbestrahlung des Zytoplasmas hatte keinen signifikanten Einfluss auf das Entwicklungspotential der Oozyten. Die Angaben für die Anzahl der Zellkerne stellen den Mittelwert \pm Standardfehler dar.

	Teilungsrate	Blastozystenrate	Zellkern-Anzahl
Laser-Enukleation	0/60 (0 %) ^a	0/60 (0 %) ^a	0,3 \pm 0,1 ^a
Mechanische Enukleation	0/80 (0 %) ^a	0/80 (0 %) ^a	0 \pm 0 ^a
Inkubator-Kontrolle	102/119 (86 %) ^b	36/119 (30 %) ^b	13,9 \pm 2,4 ^b
MPM-Kontrolle	55/66 (83 %) ^b	17/66 (26 %) ^b	12,1 \pm 1,0 ^b
Zytoplasma 0°	62/85 (73 %) ^b	17/85 (20 %) ^b	9,8 \pm 2,4 ^b
Zytoplasma 180°	50/59 (85 %) ^b	17/59 (29 %) ^b	13,4 \pm 1,1 ^b

^{ab} Werte sind statistisch signifikant unterschiedlich ($P < 0,05$).

6.1.3. Verwendung Laser-enukleierter Oozyten für den Kerntransfer

Zur Evaluation des Entwicklungspotentials Laser-enukleierter MII-Oozyten wurde ein Kerntransfer durchgeführt, dessen Prozedur in [Höl03] beschrieben ist. Hierzu dienten GFP-exprimierende Fibroblasten als somatische Spenderzellen (siehe [Die08]). Diese ermöglichten im Blastozystenstadium eine Unterscheidung zwischen der parthenogenetischen und embryonalen Entwicklung. Ursächlich hierfür ist die nur im letzteren Fall auftretende GFP-Expression und damit detektierbare GFP-Fluoreszenz im gesamten Zytoplasma nach erfolgreicher epigenetischer Reprogrammierung [Par01].

Für die Laser-Enukleation wurden die gleichen Parameter wie in Abschnitt 6.1.2 verwendet. Nach dem Kerntransfer folgte eine siebentägige *in vitro*-Kultivierung bis zum Blastozystenstadium. In diesem Stadium wurden neben den Teilungs- und Blastozystenraten auch die Anzahl sowie Morphologie der Zellkerne durch Hoechst-Färbung untersucht (siehe Anhang A.3). Um eine fundierte Aussage über die Eignung der Laser-Enukleation für den SCNT zu treffen, wurde in einer Kontrollgruppe zum Vergleich die mechanische

Enukleation durchgeführt.

Nach konventionellem SCNT mit mechanischer Enukleation ergab sich eine Teilungsrate von 83 % (86/104) sowie eine Blastozystenrate von 13 % (13/104). Dabei wurden in allen Blastozysten eine intensive GFP-Fluoreszenz und morphologisch intakte Zellkerne beobachtet. Im Gegensatz dazu teilten sich nach der Laser-Enukleation nur 5 % (4/79) der Kern-transferierten Embryonen ohne das Blastozystenstadium zu erreichen ($P < 0,001$, Chi-Quadrat-Test). Zudem war der transferierte Fibroblast nach siebentägiger Kultivierung in 67 % der Fälle (53/79) ohne Anzeichen einer mitotischen Zellteilung im Zytoplasma des Embryos erkennbar.

Als Alternative zum vollständigen Abrastern in drei Dimensionen (siehe Abbildung 6.2b) wurde der Laserstrahl nur auf einen Punkt in der Metaphasenplatte fokussiert („partielle Enukleation“). Die verwendeten Laserparameter lagen wiederum oberhalb der Dissektionschwelle. Eine Analyse der parthenogenetischen Entwicklung nach partieller Enukleation (500 ms, 1,7 nJ, 1 MHz) ergab eine Teilungsrate von 24 % (16/67), jedoch maximal bis zum 4-Zell-Stadium. Dies entspricht dem Zeitpunkt, in dem beim Schwein die RNA-Synthese des embryonalen Genoms einsetzt (siehe Anhang B.2) [Jar91, Par01]. Folglich war die partiell geschädigte Metaphasenplatte inaktiviert und damit nicht an der embryonalen Entwicklung beteiligt. Nach dem Kerntransfer in partiell enukleierte Oozyten (20 ms, 7 nJ, 50 kHz) betrug die Teilungsrate 53 % (26/49) und die Blastozystenrate 2 % (1/49). Dabei wurden in 10 % der Fälle (5/49) Chromosomenfragmente im Zytoplasma beobachtet. Obwohl die Blastozyste eine intensive GFP-Fluoreszenz im gesamten Zytoplasma aufwies, waren deutliche Veränderungen in der Morphologie der Zellkerne im Vergleich zur mechanischen Enukleation sichtbar (siehe Abbildung 6.6).

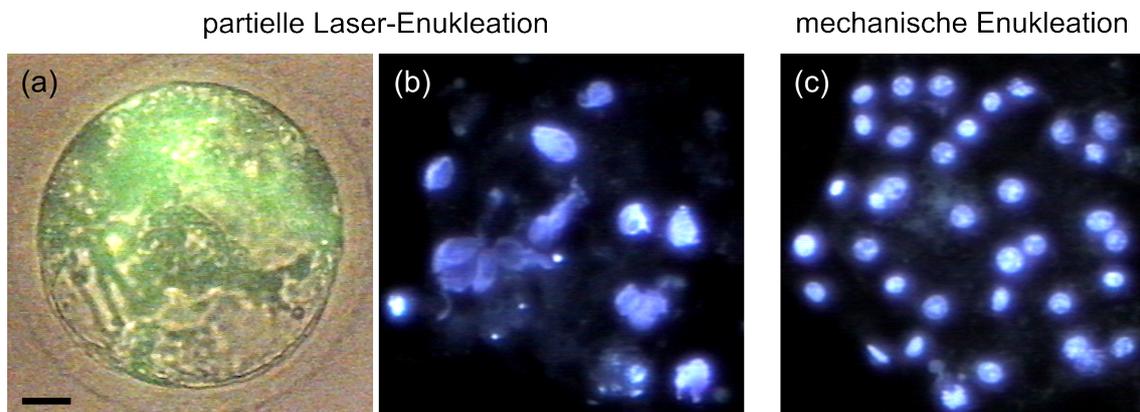


Abbildung 6.6.: (a) GFP- und (b) Hoechst-Fluoreszenz einer Blastozyste nach partieller Laser-Enukleation und Kerntransfer. Die intensive GFP-Fluoreszenz im Zytoplasma deutete auf eine erfolgreiche Reprogrammierung des injizierten Fibroblasten hin. Jedoch hatten die Zellkerne im Vergleich zur (c) mechanischen Enukleation eine deutlich veränderte Morphologie. Skala: 20 μm .

6.2. Zweiphotonen-induzierte Kollagen-Quervernetzung

Die Zweiphotonen-induzierte Kollagen-Quervernetzung wurde in artifiziellem Gewebe durchgeführt. Zur Gewebeherstellung wurden murine Kardiomyozyten und embryonale Fibroblasten als Basis für Herzmuskelgewebe bzw. kollagenreiches Bindegewebe verwendet. Nach sechstägiger *in vitro*-Kultivierung wurde ein Teil der Gewebekonstrukte 16 Stunden mit TMRM und 0,27 mM des Photosensitizers Riboflavin (*R9504*, *Sigma Aldrich*) im Kulturmedium inkubiert (siehe Anhang A.4). TMRM ist ein etablierter Marker für die zelluläre metabolische Aktivität [Hat10, Ken11] und diente damit der Bestimmung der Zellvitalität. Die Riboflavin (RF)-Konzentration war eine Größenordnung geringer als bei der UV-A-induzierten Kollagen-Quervernetzung in der Kornea [Wol03a]. Ursächlich hierfür ist die geringere Löslichkeit der in dieser Arbeit verwendeten nicht-phosphorylierten Form.

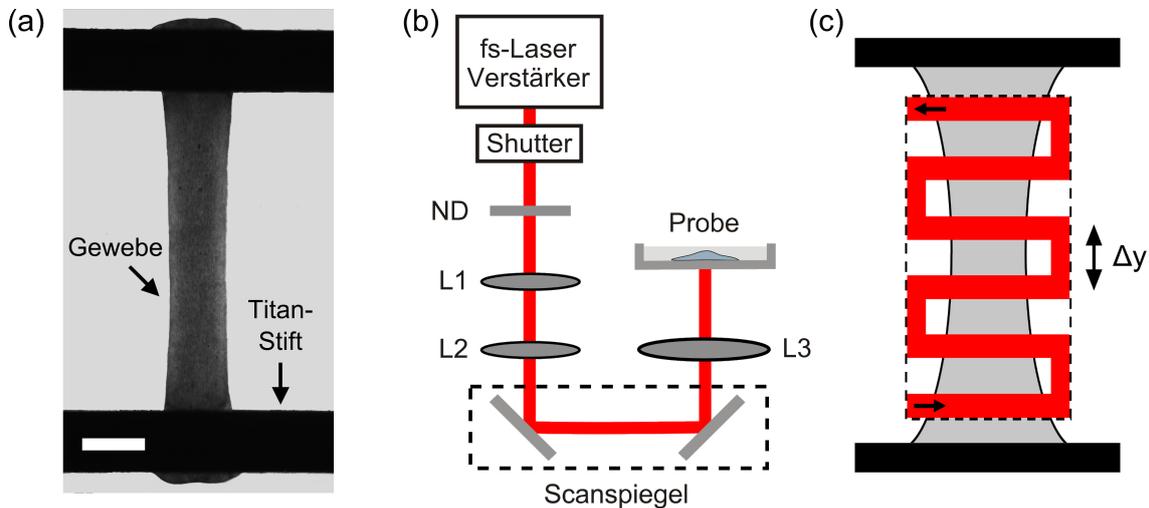


Abbildung 6.7.: (a) Phasenkontrastaufnahme eines zwischen zwei Titanstiften aufgehängten artifiziellem Bindegewebes vor der Laserbestrahlung. Skala: 1 mm. (b) Schematische Darstellung des experimentellen Aufbaus für die Zweiphotonen-induzierte Kollagen-Quervernetzung. L1/L2: Linsen mit $f_1 = 250$ und $f_2 = -50$ mm, L3: Linse mit $f = 140$ mm oder $f = 400$ mm, ND: Neutraleichtfilter. (c) Die Gewebekonstrukte wurden mit konstanter Scangeschwindigkeit und konstantem Linienabstand Δy mäanderförmig abgerastert.

Die großflächige Laserbestrahlung der Gewebekonstrukte innerhalb eines experimentell sinnvollen Zeitraums unter zehn Minuten erforderte eine deutlich geringere NA als im experimentellen Aufbau in Kapitel 4. Um dabei gleichzeitig Laserfluenzen im Bereich von $0,1 \text{ J/cm}^2$ für die Manipulation im Low-Density-Plasma-Regime zu erreichen [Vog05], wurde statt eines Titan:Saphir-Oszillators ein Verstärkersystem verwendet. Der gesamte experimentelle Aufbau ist in Abbildung 6.7b dargestellt. Die Strahlquelle war ein regenerativ verstärkter Titan:Saphir-Laser mit Pulsdauern im Femtosekundenbereich, entweder der

Spitfire Pro (120 fs, 800 nm, 5 kHz, *Spectra Physics*, Irvine, USA) oder der *Bright* (120 fs, 780 nm, 5 kHz, *Thales*, Elancourt, Frankreich). In diesem Wellenlängenbereich hat RF einen Zweiphotonen-Wirkungsquerschnitt von 0,5 GM bei 780 nm und 0,45 GM bei 800 nm [Zip03a]. Der Durchmesser des Laserstrahls wurde durch ein Galileisystem ($f_1 = 250$ mm und $f_2 = -50$ mm, Abstand $d = f_1 + f_2$) mit dem Vergrößerungsfaktor 0,2 auf die nutzbare Fläche der nachfolgenden Optiken angepasst. Ein kontinuierlich variabler Neutraldichtefilter diente der Abschwächung des Laserstrahls. Zum Abrastern der Gewebe in der x-y-Ebene wurden zwei Galvanometer-Scanspiegel (*Litrack*, *Müller Elektronik*, Spaichingen, Deutschland) verwendet. Die Fokussierung in das Gewebe erfolgte entweder mit einer 140 oder 400 mm-Linse. Dies resultierte in einer Strahltaile von $\omega_0 = 65$ bzw. 190 μm und einer Rayleigh-Länge von $z_0 = 17$ bzw. 145 mm, wobei letztere deutlich größer als die durchschnittliche Gewebedicke von 0,8 mm war.

Für die Zweiphotonen-induzierte Kollagen-Quervernetzung wurden die Gewebekonstrukte mit einer durchschnittlichen Querschnittsfläche von 0,7 mm² nach der RF-Inkubation mittels des Laserstrahls mäanderförmig abgerastert (siehe Abbildungen 6.7a und c). Dabei wurde eine konstante Scangeschwindigkeit und ein konstanter Linienabstand Δy verwendet, der für beide Fokussierlinsen der jeweiligen Strahltaile entsprach. Insgesamt wurde eine zweidimensionale Fläche von 2 x 4 mm² bestrahlt; dies dauerte in Abhängigkeit der Laserparameter ungefähr 30 Sekunden bis 5 Minuten. Wenn nicht anders angegeben, wurden die Experimente bei Raumtemperatur unter normaler Atmosphäre durchgeführt. Direkt nach der Laserbestrahlung wurde jedes Gewebekonstrukt in RF-freiem Kulturmedium gewaschen und für weitere 24 Stunden inkubiert (siehe Anhang A.4).

Zur Evaluation der mechanischen Steifigkeit artifizieller Binde- und Herzmuskelgewebe wurde deren passive Kraft in Abhängigkeit der Dehnung in einem Bioreaktorsystem gemessen, das in [Ken11] beschrieben ist. Dabei wurden die Gewebekonstrukte einzeln nacheinander mit einer konstanten Geschwindigkeit von $33,25 \pm 1,75$ $\mu\text{m/s}$ entlang der longitudinalen Achse gezogen, bis die Dehnung einen Wert von 20 % erreichte (siehe Anhang D). Das Youngsche Modul in der linearen Region der Spannungs-Dehnungs-Kurve (siehe Abschnitt 2.3.1) wurde durch lineare Regression ermittelt. Um die Kontraktionsfähigkeit der Kardiomyozyten zu bestimmen, wurde jedes Herzmuskelgewebe im Bioreaktorsystem vor der Kraftmessung insgesamt fünfmal ohne Vorspannung elektrisch stimuliert.

Nach der Kraftmessung wurden die artifiziellen Gewebe fixiert und mit DAPI gefärbt (siehe Anhang A.4). Dies diente der Analyse der volumetrischen Zelldichte in bestrahlten sowie nicht-bestrahlten Bereichen. Die Fluoreszenzaufnahmen der Gewebekonstrukte wurden entweder mit einem *AxioObserver Z1*-Mikroskop (*Carl Zeiss AG*) oder der SLOT-Technik erstellt, die in [Lor11] beschrieben ist.

Im Folgenden wird zunächst die Zweiphotonen-induzierte Kollagen-Quervernetzung in artifiziellem Bindegewebe evaluiert. Anhand dieser Erkenntnisse wird die Erhöhung der mechanischen Steifigkeit artifizieller Herzmuskelgewebe demonstriert. Abschließend wird durch die Optimierung der Methode eine Verbesserung der Effizienz der Kollagen-Quervernetzung erreicht. Die statistische Signifikanz der Ergebnisse wurde mit *SigmaStat 3.5*

(*Systat Software*) getestet. Unterschiede zwischen Versuchsgruppen wurden bei $P < 0,05$ als statistisch signifikant angenommen.

6.2.1. Kollagen-Quervernetzung in artifiziellem Bindegewebe

Die erste Versuchsreihe wurde mit dem *Spitfire Pro*-Lasersystem durchgeführt. Durch die Strahltaile von $65 \mu\text{m}$ und die Scangeschwindigkeit von $300 \mu\text{m/s}$ ergab sich eine gesamte Bestrahlungsdauer von ungefähr fünf Minuten. Zur Identifizierung geeigneter Parameter wurden in Vorversuchen verschiedene Laserfluenzen verwendet. Hieraus wurden empirisch Fluenzen von 150 und 300 mJ/cm^2 für die Zweiphotonen-induzierte Kollagen-Quervernetzung ausgewählt. Dabei wurden die Gewebekonstrukte in fünf Gruppen aufgeteilt: (1) unbehandelte Kontrolle, (2) RF-Inkubation, (3) 150 mJ/cm^2 mit RF-Inkubation und (4) 300 mJ/cm^2 mit sowie (5) ohne RF-Inkubation.

Alle artifiziiellen Bindegewebe wiesen 24 Stunden nach Laserbestrahlung vergleichbare Spannungs-Dehnungs-Kurven auf. Diese zeigten anfangs ein nichtlineares Verhalten (Toe-Region), das ab einer Dehnung von etwa 15 % linear wurde (siehe Abbildung 6.8). Die alleinige RF-Inkubation beeinflusste die mechanische Steifigkeit der Bindegewebe nicht. Dagegen resultierte die Laserbestrahlung RF-inkubierter Gewebekonstrukte mit einer Fluenz von 150 mJ/cm^2 in einer 35 % höheren Steifigkeit bei einer Dehnung von 20 % im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle. Ein ähnlicher Anstieg wurde für das Youngsche Modul in der linearen Region der Spannungs-Dehnungs-Kurve beobachtet ($46,6 \pm 0,3$ vs. $34,8 \pm 2,3 \text{ kPa}$). Bei Verdopplung der Laserfluenz auf 300 mJ/cm^2 verschwand der positive Effekt auf die Gewebesteifigkeit, unabhängig von der RF-Inkubation.

Bei einer Laserfluenz von 150 mJ/cm^2 waren die TMRM- sowie DAPI-Fluoreszenzintensitäten zwischen bestrahlten und nicht-bestrahlten Bereichen vergleichbar, so dass die zelluläre metabolische Aktivität bzw. die Zelldichte unverändert blieben. Im Gegensatz dazu wurde die metabolische Aktivität bei der doppelten Laserfluenz unabhängig von der RF-Inkubation deutlich verringert (siehe Abbildung 6.9a), ohne gleichzeitige Beeinflussung der Zelldichte.

6.2.2. Übertragbarkeit auf artifizielles Herzmuskelgewebe

Die folgenden Experimente untersuchen die Übertragbarkeit der in Abschnitt 6.2.1 gewonnenen Erkenntnisse auf bioartifizielles Herzmuskelgewebe. In diesem Zusammenhang wurden die Gewebekonstrukte in vier Gruppen aufgeteilt: (1) unbehandelte Kontrolle, (2) 150 mJ/cm^2 mit sowie (3) ohne RF-Inkubation und (4) 300 mJ/cm^2 mit RF-Inkubation.

Analog zum Bindegewebe zeigten die Spannungs-Dehnungs-Kurven einen nichtlinearen Verlauf, der ab einer Dehnung von 15 % linear wurde. Jedoch waren die mechanische Steifigkeit und das Youngsche Modul von Herzmuskelgewebe um den Faktor Drei geringer. Die Laserbestrahlung unbehandelter Kontrollgewebe mit einer Fluenz von 150 mJ/cm^2 hatte keinen Einfluss auf die Spannungs-Dehnungs-Kurve. Indes resultierte die Verwendung der

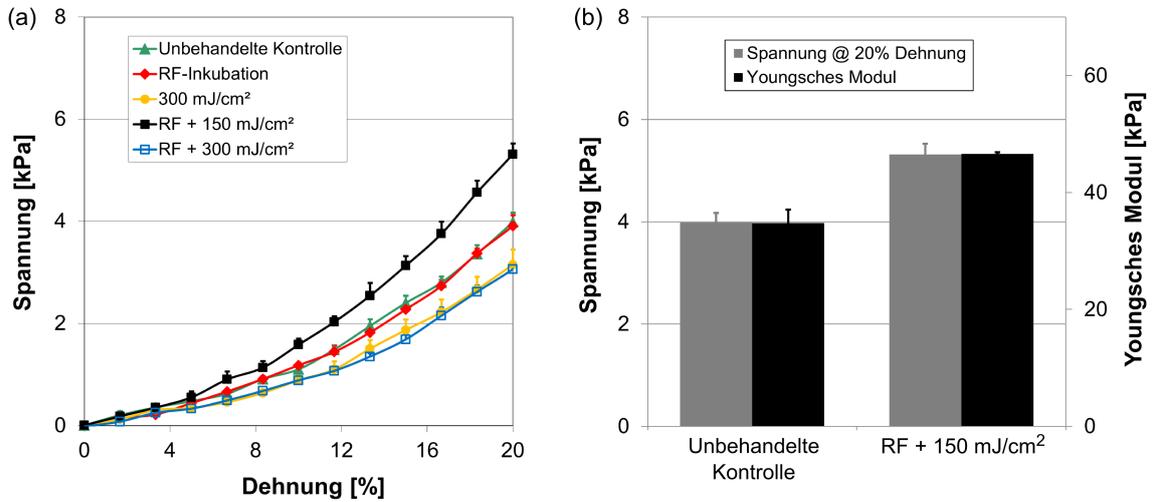


Abbildung 6.8.: (a) Spannungs-Dehnungs-Kurven artifiziereller Bindegewebe. Die alleinige RF-Behandlung hatte keinen Einfluss auf die mechanische Steifigkeit. Nach der Laserbestrahlung RF-inkubierter Gewebekonstrukte mit 150 mJ/cm² wurde eine erhöhte Steifigkeit beobachtet. (b) Der Anstieg des Youngschen Moduls und der Spannung bei einer Dehnung von 20 % betrug im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle etwa 35 %. Jeder Messwert stellt den Mittelwert + Standardfehler aus zwei Wiederholungen dar.

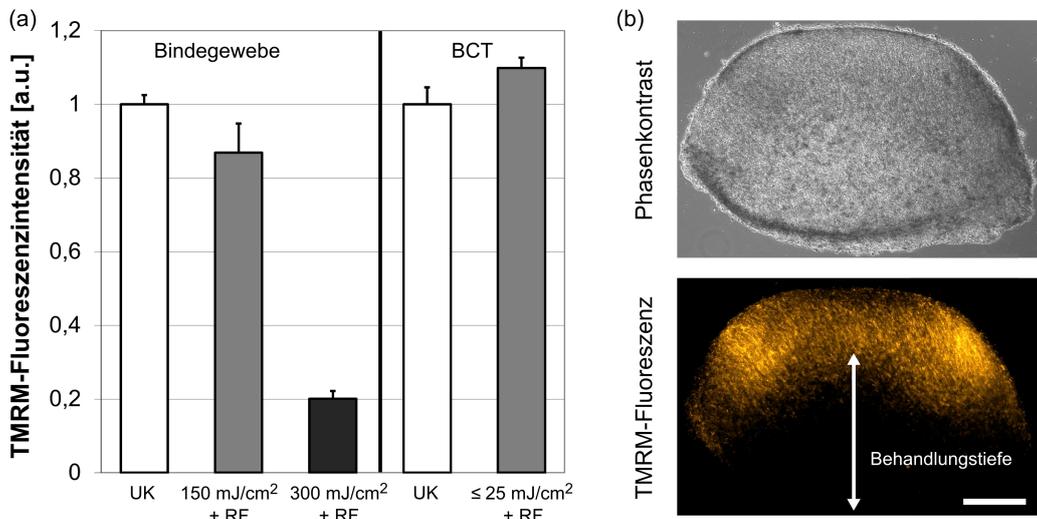


Abbildung 6.9.: (a) Mittlere TMRM-Fluoreszenzintensität in unbehandelten Kontrollen (UK) und RF-inkubierten, bestrahlten Gewebekonstrukten. Jeder Balken stellt den Mittelwert + Standardfehler aus zwei (Bindegewebe) bzw. fünf (Herzmuskelgewebe) Wiederholungen dar. (b) Phasenkontrast- sowie TMRM-Fluoreszenzaufnahmen der Querschnittsfläche eines RF-inkubierten und von unten bestrahlten Gewebes. Die maximale Behandlungstiefe des Lasers betrug ungefähr 520 µm. Skala: 200 µm.

gleichen Parameter für RF-inkubiertes Gewebe im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle in einer um 25 % erhöhten Steifigkeit bei einer Dehnung von 20 %; gleichzeitig stieg das Youngsche Modul nur um 6 % an ($14,9 \pm 1,7$ vs. $14,1 \pm 1,4$ kPa). Bei der doppelten Fluenz von 300 mJ/cm^2 wurden die mechanischen Eigenschaften der Gewebekonstrukte nicht mehr beeinflusst. Auf Grund der starken Abweichungen in der mechanischen Steifigkeit von Gewebe zu Gewebe waren die gemessenen Unterschiede statistisch nicht signifikant ($P = 0,25$, ANOVA).

Die Laserbestrahlung RF-inkubierter Herzmuskelgewebe mit einer Fluenz von 150 mJ/cm^2 hatte keinen Einfluss auf die zelluläre metabolische Aktivität sowie die Zelldichte, erkennbar durch die intensive TMRM- bzw. DAPI-Fluoreszenz (siehe Abbildungen 6.10a und c). Bei der doppelten Fluenz wurde die metabolische Aktivität in den bestrahlten Bereichen deutlich reduziert, aber die volumetrische Zelldichte blieb unverändert (siehe Abbildungen 6.10b und 6.11). TMRM-Fluoreszenzaufnahmen einer Gewebe-Querschnittsfläche in diesem Parameterbereich zeigten, dass die Behandlungstiefe des Lasers mit steigendem Einfallswinkel des Laserstrahls auf die gekrümmte Gewebeoberfläche abnahm (siehe Abbildung 6.9b). Die maximale Behandlungstiefe wurde bei einem Einfallswinkel von 0° experimentell zu ungefähr $520 \text{ }\mu\text{m}$ bestimmt und war damit größer als die Hälfte der Gewebedicke.

Die Gewebekonstrukte der vier experimentellen Gruppen zeigten sowohl vor als auch 24 Stunden nach der Laserbestrahlung spontane Kontraktionen. Ferner induzierte die elektrische Stimulation im Bioreaktorsystem eine Kontraktionskraft von bis zu $0,8 \text{ mN}$ ohne statistisch signifikante Unterschiede zwischen einzelnen Gruppen ($P = 0,31$, ANOVA).

6.2.3. Optimierung des experimentellen Protokolls

Zur Verbesserung der Kulturbedingungen und der Effizienz der Zweiphotonen-induzierten Kollagen-Quervernetzung wurde das experimentelle Protokoll weiter optimiert. Als erstes wurde eine Infrarotlampe (*IL11, Beurer GmbH, Ulm, Deutschland*) in den Aufbau integriert und HEPES-Puffer dem Kulturmedium zugegeben, um optimale Kulturbedingungen (37° , $5\% \text{ CO}_2$) außerhalb des Inkubators beizubehalten. Als zweites wurden die Strahltaile sowie die Scangeschwindigkeit von 65 auf $190 \text{ }\mu\text{m}$ bzw. von 300 auf $1300 \text{ }\mu\text{m/s}$ erhöht und damit die Bestrahlungszeit auf etwa 30 s reduziert. Als drittes ermöglichte ein iteratives Abrastern der Gewebekonstrukte die Verwendung geringerer Pulsenergien, da Multiphotonen-induzierte chemische Effekte über mehrere Pulse akkumulieren [Vog05]. Um gleichzeitig einen hohen Durchsatz zu erreichen, wurde jedes Gewebe insgesamt fünfmal abgerastert. Als viertes wurden die Experimente mit dem *Bright*-Lasersystem bei 780 nm durchgeführt, wo RF einen um 10% höheren Zweiphotonen-Wirkungsquerschnitt besitzt [Zip03a].

Unter optimierten Bedingungen wurde die Laserfluenz für die Bestrahlung RF-inkubierter Herzmuskelgewebe zwischen 9 und 26 mJ/cm^2 variiert. Die resultierenden Spannungs-Dehnungs-Kurven zeigten einen starken Einfluss der Laserfluenz auf die mechanischen Eigenschaften (siehe Abbildung 6.12). Eine signifikante Zunahme der Gewebesteifigkeit um 40% bei einer Dehnung von 20% wurde nur in einem kleinen Prozessfenster bei 14 mJ/cm^2

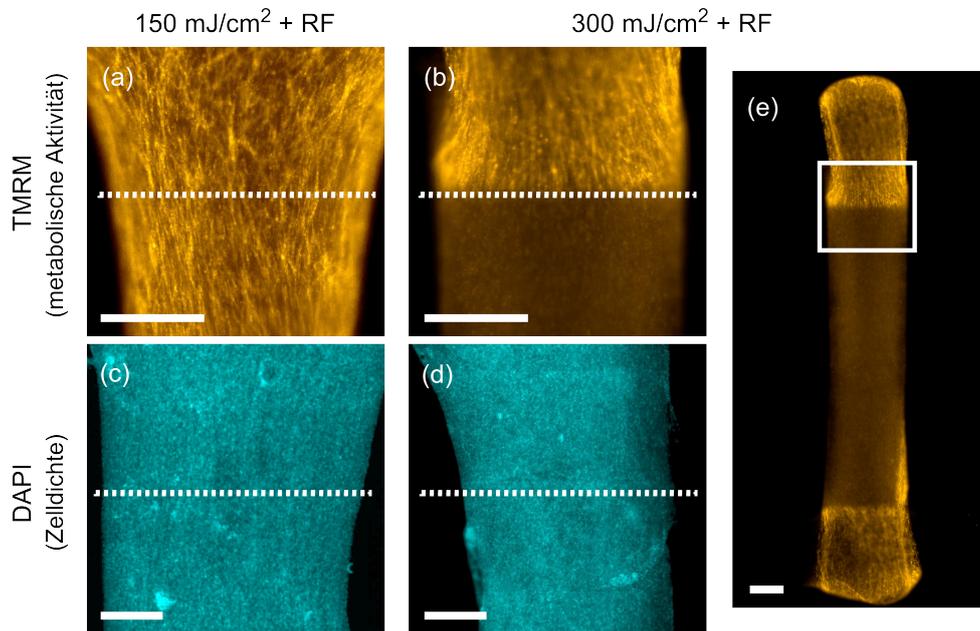


Abbildung 6.10.: (a,b) TMRM- und (c,d) DAPI-Fluoreszenzaufnahmen von RF-inkubierten, bestrahlten Herzmuskelgeweben: (a,c) $150 \text{ mJ/cm}^2 + \text{RF}$; (b,d) $300 \text{ mJ/cm}^2 + \text{RF}$. (b) ist ein stark vergrößerter Ausschnitt des in (e) umrandeten Gebiets. Die weißen, gestrichelten Linien trennen die bestrahlten (unten) von den nicht-bestrahlten Bereichen (oben). Bei der höheren Fluenz wurde ein deutlicher Abfall der TMRM-Fluoreszenzintensität beobachtet, während die DAPI-Fluoreszenzintensität unverändert blieb. Skala: $500 \mu\text{m}$.

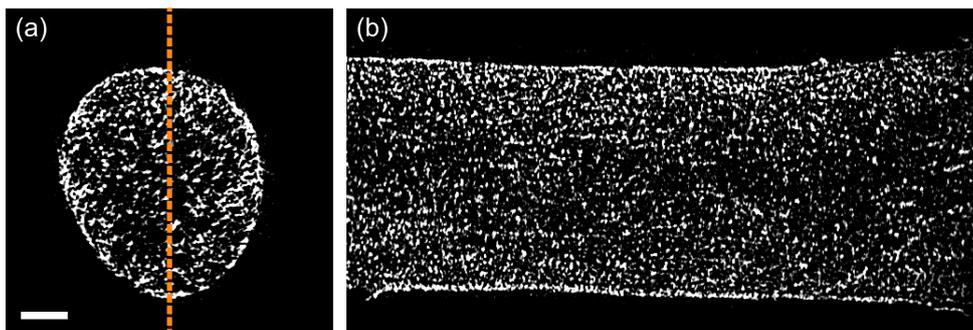


Abbildung 6.11.: SLOT-Fluoreszenzaufnahmen eines Herzmuskelgewebes nach Fixierung und DAPI-Färbung. Die Schnittebene des rechten Bildes ist im linken Bild durch eine orangefarbene, gestrichelte Linie markiert. Die volumetrische Zelldichte war in bestrahlten und nicht-bestrahlten Bereichen vergleichbar. Skala: $200 \mu\text{m}$.

erreicht ($P < 0,05$, ANOVA und Dunnett-Test). In diesem Bereich stieg das Youngsche Modul um etwa 15 % an ($30,6 \pm 0,9$ vs. $26,5 \pm 1,9$ kPa). Folglich wurde die Erhöhung der mechanischen Steifigkeit im Vergleich zu Abschnitt 6.2.2 etwa um den Faktor Zwei verbessert. Gleichzeitig hatte die Laserbestrahlung mit einer Fluenz von bis zu 25 mJ/cm^2 keinen signifikanten Einfluss auf die Kontraktionskraft und die zelluläre metabolische Aktivität ($P = 0,11$, ANOVA, siehe Abbildung 6.9a).

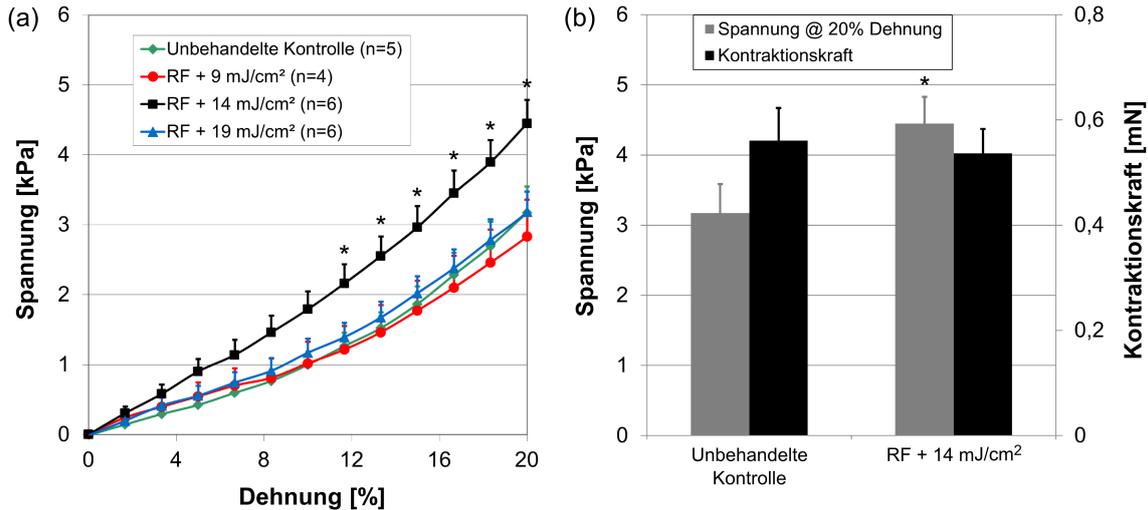


Abbildung 6.12.: (a) Spannungs-Dehnungs-Kurven künstlicher Herzmuskelgewebe nach der Optimierung des experimentellen Protokolls. Eine signifikante Versteifung wurde nur in einem schmalen Prozessfenster bei 14 mJ/cm^2 beobachtet. (b) Die Laserbestrahlung RF-inkubierter Gewebe mit 14 mJ/cm^2 resultierte in einer signifikanten Erhöhung der mechanischen Steifigkeit um 40 % bei einer Dehnung von 20 %, während die Kontraktionskraft mit der von unbehandelten Kontrollen vergleichbar war. Jeder Messwert stellt den Mittelwert + Standardfehler aus mindestens vier Wiederholungen dar. * $P < 0,05$ gegenüber der Kontrolle.

6.3. Zusammenfassung

In diesem Kapitel wurden die Eignung der Bildgebung und Manipulation im Low-Density-Plasma-Regime für die MPM-gesteuerte Laser-Enukleation sowie die Zweiphotonen-induzierte Kollagen-Quervernetzung evaluiert.

Die MPM-gesteuerte Laser-Enukleation wurde mit porzinen MII-Oozyten demonstriert. Anhand eines dreidimensionalen MPM-Bilderstapels erfasste eine *LabView*-basierte Software automatisch die Position und Umrisse der Hoechst-gefärbten Metaphasenplatte. Mit einer Pulsenergie oberhalb der Dissektionsschwelle wurde dieses markierte Volumen abgerastert. Bei optimierten Parametern inaktivierte die Laser-Enukleation mit einer Effizienz von 96 % die Oozyten-DNA, so dass keine parthenogenetische Entwicklung initiiert wurde. Gleichzei-

tig blieb die Morphologie der bestrahlten Oozyten mit mechanisch enukleierten Kontrollen vergleichbar. Nach der Verwendung Laser-enukleierter Oozyten für den Kerntransfer ergab sich im Vergleich zum konventionellen SCNT eine signifikant geringere Teilungsrates (5 vs. 83 %); zusätzlich wurde das Blastozystenstadium nicht erreicht. Durch die Begrenzung der Dissektion auf einen Punkt in der Metaphasenplatte wurde eine höhere Teilungsrates von 53 % und die erfolgreiche embryonale Entwicklung bis zur Blastozyste beobachtet. Jedoch waren deutliche Veränderungen in der Morphologie der Zellkerne sichtbar.

Zur Erhöhung der Gewebesteifigkeit artifizieller Binde- und Herzmuskelgewebe wurden diese mit dem Photosensitizer RF über Nacht inkubiert und mit einem fs-Laser großflächig abgerastert. Die Aufnahme von Spannungs-Dehnungs-Kurven 24 Stunden nach der Laserbestrahlung ermöglichte eine Analyse des Einflusses der Zweiphotonen-induzierten Kollagen-Quervernetzung auf die mechanischen Gewebeeigenschaften. In kollagenreichem Bindegewebe ergab sich im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle ein 35 %-iger Anstieg des Youngschen Moduls und der bei einer Dehnung von 20 % gemessenen Spannung. Mit den gleichen Laserparametern nahmen diese Eigenschaften artifizieller Herzmuskelgewebe nur um 6 bzw. 25 % zu. Durch eine weitere Optimierung des experimentellen Protokolls wurde die Erhöhung der mechanischen Steifigkeit etwa um den Faktor Zwei verbessert. Gleichzeitig zeigten Fluoreszenzaufnahmen der RF-inkubierten und bestrahlten Gewebekonstrukte keine Unterschiede in der zellulären metabolischen Aktivität, der Zelldichte und der Kontraktionskraft im Vergleich zu unbehandelten Kontrollen.

7. Diskussion und Ausblick

In der vorliegenden Arbeit wurde die fs-Lasermanipulation erstmals im Bereich der regenerativen Medizin erfolgreich eingesetzt, sowohl für die MPM-gesteuerte Laser-Enukleation porziner Oozyten als auch für die Zweiphotonen-induzierte Kollagen-Quervernetzung artifizierender Herzmuskelgewebe. Dabei ermöglichte die Verwendung ultrakurzer Laserpulse im Femtosekundenbereich eine automatisierte Kombination aus hochauflösender Bildgebung und selektiver Manipulation in dreidimensionalen biologischen Proben. Im Hinblick auf einen therapeutischen Einsatz des fs-Lasers konnten geeignete Parameter im Low-Density-Plasma-Regime für eine minimal-invasive Nanochirurgie subzellulärer Strukturen ermittelt werden. Ferner wurden erstmals die grundlegenden chemischen und thermischen Effekte in diesem Regime charakterisiert, um durch einen Vergleich mit bisherigen theoretischen Modellen ein besseres Verständnis der Wechselwirkung ultrakurzer Laserpulse mit biologischen Medien zu erhalten. Da die Lokalisierung der Multiphotonenanregung auch in stark streuendem Gewebe erhalten bleibt [Hel05], sind die Erkenntnisse dieser experimentellen *in vitro*-Studien auf *in vivo*-Bedingungen übertragbar.

7.1. Chemische Effekte im Low-Density-Plasma-Regime

Die experimentellen Studien zur Charakterisierung der chemischen Effekte im Low-Density-Plasma-Regime wurden mit Fluorophor-markierten Zellen durchgeführt. Dabei wurden insbesondere die Mechanismen der intrazellulären Dissektion und der Photobleichung höherer Ordnung voneinander abgegrenzt.

Die intrazelluläre Dissektion im Low-Density-Plasma-Regime wurde mit Hoechst 33342-gefärbten Zellkernen untersucht. Bei konstanter applizierter Energiedichte war die Dissektionsschwelle für Linienschnitte unabhängig von der Repetitionsrate zwischen 1 kHz und 80 MHz (siehe Abbildung 5.7a). Folglich hatten thermische Effekte bei hohen Repetitionsraten einen vernachlässigbaren Einfluss, was durch Berechnungen der Temperaturentwicklung im fokalen Volumen gestützt wird [Vog05]. An der Dissektionsschwelle betrug die zu erwartende Temperaturerhöhung bei der verwendeten Wellenlänge, NA und 80 MHz-Repetitionsrate ungefähr 3°C. Daher basierte die Dissektion überwiegend auf der Akkumulation chemischer Einzelpulseffekte [Vog05]. Diese wurden durch nichtlineare Prozesse induziert, da die Schwellen-Pulsenergie in Abhängigkeit der Wellenlänge antiproportional zur vierten bzw. fünften Ordnung der Bestrahlungszeit war (siehe Abbildung 5.8a) [Bou86].

Aus den Ergebnissen in Abbildung 5.7a geht hervor, dass die chemischen Einzelpulseffekte innerhalb eines Zeitraums von etwa 10 ns beendet waren, der dem zeitlichen Abstand

zweier aufeinander folgender Laserpulse bei einer Repetitionsrate von 80 MHz entspricht. Währenddessen werden durch die Laserbestrahlung ROS, freie Elektronen und Hydroxyl-Radikale OH^\bullet mit signifikant hohen Konzentrationen erzeugt [Nik83]; nur letztere reagieren sehr effizient mit DNA-Molekülen [Hut85] und haben in lebenden Zellen eine Lebensdauer von etwa 1 bis 10 ns [Reu73, Roo75]. Daraus kann geschlossen werden, dass die chemische Dissektion überwiegend auf Reaktionen von OH^\bullet -Radikalen mit Biomolekülen beruhte [Vog05].

Die Zugabe von 5 mM Ascorbinsäure als Antioxidans zum Kulturmedium veränderte die Dissektions-Schwellenenergie nicht (siehe Abschnitt 5.2.3), aber verringert die Gesamtanzahl von ROS im intrazellulären Raum [Bau09]. Auf Grund der hohen OH^\bullet -Reaktivität in der zellulären Umgebung wird eine hohe Antioxidans-Konzentration im Molarbereich zur Reduktion der OH^\bullet -induzierten Schädigungen benötigt, was jedoch keine physiologische Umgebung darstellt [War88]. Deswegen konnten mit einer Konzentration im Millimolar-Bereich nur vergleichsweise unreaktive Radikale neutralisiert werden, die nicht zur intrazellulären Dissektion beitragen.

Mit Hoechst-Färbung nahm die Dissektions-Schwellenenergie um den Faktor Vier ab (siehe Abbildung 5.9b); dies wurde von anderen Arbeitsgruppen auch bei der Dissektion einzelner Chromosomen oder der Induktion von DSB beobachtet. Eine Markierung einzelner Chromosomen mit Giemsa reduziert die Dissektions-Schwellenenergie um den Faktor 2,7 [Koe01]. Des Weiteren sind ohne Hoechst-Färbung vier- bis zehnfach höhere Pulsenergien für eine DSB-Induktion notwendig [Din07, Wil07]. Folglich trugen Hoechst-Fluorophore entscheidend zur Produktion freier Elektronen und damit zur Entstehung eines Low-Density-Plasmas bei. Laut Literatur besteht ein Zellkern durchschnittlich zu 85 % aus Wasser [Dow62], 20 % der nukleären Trockenmasse ist DNA [Gol74] und das Verhältnis zwischen Hoechst-Fluorophoren und DNA-Basenpaaren beträgt bei der verwendeten Konzentration etwa 1:10 [Loo90]. Daraus berechnet sich das Verhältnis zwischen Wasser- und Hoechst-Molekülen zu 10000:1, so dass letztere während der Kaskadenionisation einen vernachlässigbaren Einfluss hatten. Auf Grund ihres großen Multiphotonen-Absorptionsquerschnitts [Coh05] erhöhten diese jedoch die Rate der Multiphotonenionisation und damit die Produktion von Seed-Elektronen [Vog05].

Die chemischen Einzelpulseffekte im Low-Density-Plasma-Regime akkumulieren über mehrere Pulse, so dass die Schwellenenergie mit steigender Pulsanzahl abnimmt. Dies tritt sowohl in Dielektrika und Metallen als auch in biologischen Proben auf [Jee88, Ros99, Bou07]. Bei Annahme konstanter optischer Eigenschaften im fokalen Volumen über den gesamten Pulszug sind die Schädigungen subzellulärer Strukturen durch jeden einzelnen Puls gleich. Damit ergibt sich für chemische Effekte die Abhängigkeit der Schwellen-Pulsenergie E von der Anzahl der Laserpulse zu [Jee88, Kol04]

$$E_N = E_1 \cdot N^{-1/k}, \quad (7.1)$$

wobei N die Pulsanzahl, k die Photonenordnung und E_1 sowie E_N die Schwellen-Pulsenergien für einen bzw. N Pulse darstellen. Aus den Ergebnissen in Abbildung 5.8 geht hervor, dass

k dem Exponenten der Potenzfunktion entsprach und von der Wellenlänge sowie Repetitionsrate beeinflusst wurde. Unterhalb von 840 nm war die Photonenzahl im kHz-Regime konstant ($k = 4$), während diese für 80 MHz von $k = 3,5$ bei 720 nm auf $k = 4$ bei 800 nm anstieg. Unabhängig von der Repetitionsrate nahm k ab 840 nm kontinuierlich mit der Wellenlänge auf $k = 5$ bei 950 nm zu. Infolgedessen waren vier und fünf Photonen zur Dissektion von DNA-Molekülen bei 840 bzw. 950 nm notwendig, während bei 900 nm eine Mischung aus beiden Prozessen vorherrschte (siehe Abbildung 5.8b). Durch die Produktion von Seed-Elektronen stellt die Multiphotonenionisation die primäre Ursache chemischer Effekte dar [Vog05]. Daraus kann geschlossen werden, dass k die Anzahl der Photonen für diesen Prozess kennzeichnete. Basierend auf den beschriebenen Ergebnissen lag die Ionisationsenergie zwischen 5,2 und 5,9 eV; dies schließt Wasser mit einer Bandlücke von 6,5 eV aus [Wil76, Nik83]. Jedoch stimmt dieser Wertebereich sehr gut mit der Ionisationsenergie der Hoechst-Moleküle von etwa 5,5 eV überein [Gör01], so dass diese höchstwahrscheinlich die größte Quelle für Seed-Elektronen waren.

Mit dem vorgeschlagenen Modell konnte die signifikante Abnahme der Photonenzahl für 80 MHz und Wellenlängen unterhalb von 840 nm im Vergleich zum kHz-Regime erklärt werden (siehe Abbildung 5.8b). Freie Elektronen werden innerhalb von 300 fs hydratisiert und besitzen in diesem Zustand eine Lebensdauer von ungefähr 250 ns in hoch-konzentrierten Biomolekül-Lösungen [Ora85]. Deswegen befinden sich beim Eintreffen von Laserpulsen mit einer Repetitionsrate oberhalb von 4 MHz verbleibende, hydratisierte Elektronen im fokalen Volumen. Da diese einen maximalen Absorptionsquerschnitt bei 720 nm besitzen [Har62, Nik83], werden Seed-Elektronen bei hohen Repetitionsraten auch durch lineare Absorption erzeugt [Sch88]. Aus diesem Grund war k bei 80 MHz eine Mischung aus der Multiphotonenionisation von Hoechst-Molekülen und der linearen Absorption durch hydratisierte Elektronen. Auf Grund der Produktion zusätzlicher Seed-Elektronen stieg die FWHM der Linienschnitte im Vergleich zum kHz-Regime signifikant steiler mit der Pulsenergie an (siehe Abbildung 5.5b).

Unterhalb der Dissektionsschwelle wurden DSB induziert; bei fünffach geringeren Pulsenergien war ein γ -H2AX-Signal als DSB-Indikator entlang des Linienschnitts erkennbar (siehe Abbildung 5.6a). Dieses Signal breitete sich ungefähr 20 % unter der Dissektionsschwelle auf den gesamten Zellkern aus, was einen Hinweis auf eine beginnende Apoptose [DF10] oberhalb der Schwelle zur Photobleichung höherer Ordnung darstellt [Pat00, Hei05]. Analog zur Dissektion war die Schwellen-Pulsenergie für eine DSB-Induktion unabhängig von der Repetitionsrate und bei 720 nm antiproportional zur vierten Ordnung der Bestrahlungszeit (siehe Abbildung 5.6b). Demzufolge waren die Photonenzahlen der jeweiligen chemischen Effekte identisch.

Die Photobleichung höherer Ordnung wurde exemplarisch für den exogenen Fluorophor Hoechst 33342 und den endogenen Fluorophor eGFP untersucht. Für beide war die Photobleichungsordnung unabhängig von der Repetitionsrate sowie der NA (siehe Abbildung 5.1). Letzteres stimmt mit experimentellen Daten von Chen et al. für einen GFP-Mutanten überein [Che02]. Folglich waren Diffusionsprozesse im Milli- bis Mikrosekundenbereich, wie

beispielsweise für die Reaktion angeregter Fluorophore mit molekularem Sauerstoff, und damit eine Triplett-Besetzung der Fluorophore vernachlässigbar [Dit01]. Da die Halbwertszeit der Photobleichung bei festen Laserparametern proportional zur Größe des abgerasterten Bildausschnitts war, resultierte die Photobleichung höherer Ordnung analog zur intrazellulären Dissektion aus einer Akkumulation von Einzelpulseffekten.

Bei der Photobleichung von eGFP stieg die Photobleichungsordnung bei einer Wellenlänge von 840 nm sprunghaft vom Wert Drei auf Vier an (siehe Abbildung 5.1b), was einer Übergangsenergie von 4,5 eV entsprach. Analog ergibt sich bei der intrazellulären Dissektion GFP-exprimierender Axone mit einer Wellenlänge von 800 nm eine kubische Abhängigkeit der Dissektions-Schwellenenergie von der Pulsanzahl [Bou07]. Folglich wurde die eGFP-Photobleichung durch eine Multiphotonenionisation der Moleküle aus dem Grundzustand S_0 verursacht. Während die Ionisationsenergie vom eGFP-Chromophor im Bereich von 4,6 bis 6,2 eV [Ven04] liegt, beträgt diese für die etwa 15 Å entfernte Tryptophan-Seitenkette [Orm96] analog zur Übergangsenergie etwa 4,5 eV [Amo79]. Die Multiphotonenionisation der Tryptophan-Seitenkette resultierte in der Entstehung eines Hydroxyl-Radikals und eines freien Elektrons [Bis09], die höchstwahrscheinlich mit dem eGFP-Chromophor reagierten und dessen chemische Struktur irreversibel modifizierten.

Die Photobleichungsordnung für Hoechst stimmte über den gesamten Wellenlängenbereich gut mit der jeweiligen Anregungsordnung überein (siehe Abschnitt 5.1.1). Da Hoechst-Moleküle weitere Energieniveaus oberhalb des ersten angeregten Zustands S_1 besitzen [Kal94], war deren Photobleichung auf die Bildung eines Elektron-Kation-Paares (Photolyse) nach gesättigten, sequentiellen Einphotonenabsorptionen von S_1 in höhere Zustände S_N zurückzuführen [Egg05].

Der Einfluss der Photobleichung auf umliegende Moleküle wurde durch eine selektive eGFP-Anregung von Hoechst-gefärbten, eGFP-exprimierenden Zellen untersucht. Bezogen auf den Abfall der eGFP-Fluoreszenzintensität nahm das Hoechst-Fluoreszenzsignal unabhängig von der Repetitionsrate und Laserleistung um etwa 70 % ab (siehe Abbildung 5.2). Aus diesem Verhältnis ließ sich der Einflussradius des Low-Density-Plasmas zu 30 bis 50 nm berechnen [Olm83, Loo90, Paw06], welcher sehr gut mit der Diffusionslänge von ROS in der zellulären Umgebung übereinstimmt [Paw06].

Die zunehmende, chemische Zerstörung der Hoechst-Moleküle über die Zeit korrelierte mit dem Zuwachs von ROS im gesamten Zytoplasma (siehe Abbildung 5.3). Folglich reagierten die durch Photobleichung entstandenen freien Elektronen mit Wassermolekülen oder gelöstem Sauerstoff in der unmittelbaren Umgebung. Dies führte zur Produktion von ROS [Nik83], hatte aber keinen sichtbar negativen Einfluss auf die Zellvitalität, so dass der oxidative Stress durch zelluläre Antioxidantien abgebaut werden konnte [Yu94].

Zusammenfassend wurde in dieser Arbeit erstmals experimentell gezeigt, dass die Photobleichung höherer Ordnung und die Dissektion Fluorophor-markierter, subzellulärer Strukturen für Repetitionsraten bis 80 MHz überwiegend einer Akkumulation chemischer Einzelpulseffekte entspricht. Die Photobleichung höherer Ordnung resultierte entweder aus der Multiphotonenionisation vom Grundzustand (eGFP) oder aus sequentiellen Einphotonen-

absorptionen in höhere Energieniveaus mit anschließender Photolyse (Hoechst). Indes war die Produktion von Seed-Elektronen als primäre Ursache der intrazellulären Dissektion im kHz-Regime ausschließlich auf die Multiphotonenionisation der Fluorophore (Hoechst) zurückzuführen. Bei hohen Repetitionsraten um 80 MHz konnten zusätzlich hydratisierte Elektronen durch lineare Absorption als Seed-Elektronen genutzt werden, so dass eine im Vergleich zum kHz-Regime geringere applizierte Laserenergie notwendig war. Infolgedessen müssen zukünftige Berechnungen der Dichte freier Elektronen den Einfluss von Fluorophoren berücksichtigen, insbesondere bei der Rate der Multiphotonenionisation. Zudem ermöglichen Fluorophor-markierte Strukturen mit hohen Multiphotonen-Absorptionsquerschnitten eine selektive Manipulation in der zellulären Umgebung, was beispielsweise für die Chromophor-assistierte Laserinaktivierung von Proteinen [Tan05] und die Laser-induzierte Freisetzung chemischer Substanzen [Den90] von Vorteil ist.

7.2. Thermische Effekte im Low-Density-Plasma-Regime

Der Einfluss thermischer Effekte bei der Laser-induzierten Zellfusion im Low-Density-Plasma-Regime wurde sowohl mit nicht-adhärenenten HL-60-Zellen als auch mit porzinen 2-Zell-Embryonen untersucht, wobei letztere ein 50-fach größeres Volumen von etwa 200 pl haben. Da die zugrunde liegenden Mechanismen für beide identisch waren, sind die Erkenntnisse dieser experimentellen Studie auch auf weitere Zelltypen übertragbar.

Die Laserbestrahlung der Kontaktstelle von HL-60-Zellen und 2-Zell-Embryonen resultierte jeweils in einer Fusion der aggregierenden Zellen oberhalb einer vom Zelltyp sowie der Bestrahlungszeit abhängigen Schwellenfluenz (siehe Abbildungen 5.10 und 5.13). In allen Fällen entsprach diese der minimal notwendigen Fluenz für die Entstehung einer Gasblase im fokalen Volumen mit einer Lebensdauer im Millisekunden- bis Sekundenbereich. Bei der Optoporation ist dies ein Indikator für eine erfolgreiche Permeabilisierung der Zellmembran [Ste06, Bau08, Uch08b]. Daraus kann geschlossen werden, dass eine Membranperforation auch für die Zellfusion notwendig war.

Hohe Fusionswahrscheinlichkeiten wurden nur bei Gasblasen-Durchmessern zwischen 4 und 8 μm erreicht (siehe Abbildung 5.11a). Diese Werte liegen einen Faktor Zwei bis Vier höher als bei der Optoporation [Ste06]; ähnliche Beobachtungen wurden in experimentellen Studien zur Elektroporation und -fusion gemacht [Zim82]. Die Elektrofusion tritt nur nach Überschreitung eines kritischen Durchmessers für die Membranpore auf, was normalerweise zu einer mechanischen Instabilität der Zellmembran führt. Im Fall eng benachbarter Zellmembranen initiiert dies jedoch die Fusion der äußeren Membranschichten (siehe Abschnitt 2.1.1) [Zim82]. Folglich trat eine Laser-induzierte Zellfusion höchstwahrscheinlich nur bei Erreichen eines ausreichend großen Porendurchmessers auf.

Nach dem Kollaps der langlebigen Gasblase war im bestrahlten Bereich ein dunkler, runder Fleck mit der gleichen Größe wie der fokussierte Laserstrahl sichtbar, welcher innerhalb weniger Minuten verschwand (siehe Abbildung 5.10d). Dies wurde zuvor bereits

bei der Optoporation mit Dauerstrichlasern beobachtet und auf einen lokalen, temporären Temperaturanstieg zurückgeführt [Pal96, Sch02b]. Bei der Verwendung von fs-Pulsen mit 80 MHz sind im Vergleich zur Optoporations-Schwelle zweifach höhere Fluenzen erforderlich, um nach einer Bestrahlungszeit weniger Millisekunden die Siedetemperatur von Wasser im fokalen Volumen zu erreichen [Vog05]. Da hohe Fusionseffizienzen nur deutlich oberhalb der minimal notwendigen Fluenz für eine Gasblasenerzeugung beobachtet wurden (siehe Abbildung 5.12), führte höchstwahrscheinlich die Akkumulation von thermischer Energie zur Veränderung der optischen Eigenschaften im fokalen Volumen.

Der starke Einfluss thermischer Effekte bei der Erzeugung langlebiger Gasblasen wurde durch den mit steigender Bestrahlungszeit asymptotischen Abfall der Fusions-Schwellenfluenz auf einen Sättigungswert gestützt (siehe Abbildung 5.10g). Unter Berücksichtigung thermischer Effekte gilt analog zu Gleichung (7.1) für die Abhängigkeit der Schwellenfluenz F von der Anzahl der Laserpulse [Jee88, Kol04]:

$$F_N = F_\infty + (F_1 - F_\infty) N^{-1/k}. \quad (7.2)$$

Dabei bezeichnen F_1 , F_N und F_∞ die Schwellenfluenzen für jeweils einen, N sowie unendlich Pulse. Im Gegensatz zur von chemischen Effekten induzierten, intrazellulären Dissektion war für die Gasblasen-Erzeugung bei einer $NA = 0,5$ eine minimale Fluenz von $F_\infty = 45 \text{ mJ/cm}^2$ notwendig (siehe Abbildung 5.10g). Folglich dominierten in diesem Fall thermische und nicht chemische Effekte [Kol04]. Zudem betrug die Photonenordnung $k = 2$, so dass die Einphotonenionisation hydratisierter Elektronen bzw. die Kaskadenionisation und damit lineare Prozesse einen deutlich stärkeren Einfluss hatten (siehe Abschnitt 7.1) [Vog05].

Die experimentellen Daten der Gasblasen-Lebensdauer in Abhängigkeit ihres maximalen Durchmessers wurden optimal durch eine Potenzfunktion mit dem Exponenten $p = 1,7$ genähert (siehe Abbildung 5.11b). Gegenüber der linearen Abhängigkeit bei Kavitationsblasen steigt die Lebensdauer einer Wärmediffusions-begrenzten Gasblase quadratisch mit dem maximalen Durchmesser an [Flo65, Ple77]. Infolgedessen wurden die Entstehung und Dynamik der beobachteten langlebigen Gasblasen von thermischen Effekten bestimmt, was durch theoretische Untersuchungen gestützt wird [Vog05].

Die Fusionseffizienz war vom Zelltyp, der Laserfluenz sowie der Bestrahlungszeit abhängig (siehe Abbildungen 5.12 und 5.14). Während der prozentuale Anteil fusionierter HL-60-Zellen maximal 21 % betrug (10 ms, 100 mJ/cm^2), war dieser bei 2-Zell-Embryonen mit 54 % mehr als doppelt so hoch (20 ms, 360 mJ/cm^2); die entsprechenden Fluenzen lagen jeweils etwa 50 % oberhalb der Schwelle. Die Differenz der maximalen Fusionseffizienz wurde vermutlich durch den inhärenten engen Kontakt beider embryonalen Zellen und ihre im Vergleich zu somatischen Zellen 20-fach größere Oberfläche verursacht. Dadurch hatten 2-Zell-Embryonen eine höhere Widerstandsfähigkeit, so dass 50 % größere Gasblasen-Durchmesser von bis zu $15 \text{ }\mu\text{m}$ möglich waren.

Für beide Zelltypen war die maximale Fusionseffizienz bei einer geringeren Bestrahlungszeit höher (siehe Abbildungen 5.12 und 5.14). Weitere Versuche deuteten einen kontinuierlichen Anstieg der maximalen Fusionseffizienz mit abnehmender Bestrahlungszeit an.

Basierend auf den lichtmikroskopischen Aufnahmen war dies wahrscheinlich auf die gleichzeitig abnehmende Varianz des Gasblasen-Durchmessers zurückzuführen. Demgegenüber liegt die optimale Bestrahlungszeit für die Optoporation bei 40 ms [Bau08]. Zur Aufklärung dieser Diskrepanz sind daher weiterführende Experimente notwendig.

In bisherigen experimentellen Studien zur Laser-induzierten Fusion somatischer Zellen wurden deutlich höhere Fusionseffizienzen von bis zu 80 % erreicht [Sat92, Gon08]. Dies kann mit der Zugabe von Polyethylenglycol zum Kulturmedium erklärt werden, das fusogene Eigenschaften besitzt und die Zellaggregation verbessert [Ste91]. Deswegen war der mittlere Abstand der aggregierenden, somatischen Zellen in diesen Studien deutlich geringer und die Fusion benachbarter Zellmembranen wahrscheinlicher. Indes führte die Laserbestrahlung porziner 2-Zell-Embryonen mit inhärentem engen Zellkontakt zu einer mit entsprechenden murinen Embryonen vergleichbaren Fusionseffizienz um 60 % (vgl. Abbildung 5.14 und [Kar09]).

Fusionierte Zellen zeigten unabhängig von den Parametern eine Stunde nach Laserbestrahlung in mehr als 95 % der Fälle keine Anzeichen einer Nekrose. Ferner entwickelten sich 2-Zell-Embryonen ohne signifikanten Unterschied zu Kontrollembryonen bis zum Blastozystenstadium (siehe Abbildung 5.14). Daher hatte die Laserbestrahlung analog zu experimentellen Untersuchungen mit murinen Embryonen keine nachteiligen Auswirkungen auf das Zytoplasma sowie die nukleäre DNA [Kar09]. Im Blastozystenstadium waren in einigen Laser-fusionierten Embryonen polyploide Zellkerne erkennbar (siehe Abbildung 5.15). Ursächlich hierfür war vermutlich die Fusion der beiden Zellkerne innerhalb weniger Stunden nach Laserbestrahlung, was auch nach anderen Zellfusionsmethoden auftritt [Ogl05].

Zusammenfassend wurde in dieser Arbeit erstmals gezeigt, dass für eine Laser-induzierte Fusion unabhängig vom Zelltyp die Entstehung einer langlebigen Gasblase als Indikator für eine Pore in den benachbarten Zellmembranen notwendig ist. Die Gasblase resultierte aus der Akkumulation von thermischer Energie im fokalen Volumen mit einem Temperaturanstieg über die Siedetemperatur von Wasser. Im Gegensatz zur Optoporation lag der Porendurchmesser für eine effiziente Fusion der Membranschichten oberhalb des kritischen Werts für eine mechanische Instabilität. Die maximale Fusionseffizienz betrug für porzine 2-Zell-Embryonen etwa 50 %, deren weitere Entwicklung bis zum Blastozystenstadium mit Kontrollgruppen vergleichbar war. Folglich stellt die Laser-induzierte Zellfusion eine berührunglose, minimal-invasive Methode zur selektiven Zellfusion ohne Zugabe chemischer Substanzen dar. Dies ist insbesondere für den SCNT [Edw03] von hohem Interesse.

7.3. MPM-gesteuerte Laser-Enukleation

Das Potential der MPM-gesteuerten Laser-Enukleation als Alternative zur mechanischen Enukleation beim SCNT wurde mit porzinen MII-Oozyten untersucht. Sowohl die MPM als auch die Hoechst-Färbung der Metaphasenplatte hatten keinen sichtbar negativen Einfluss auf das Entwicklungspotential der Oozyten (siehe Tabellen 6.1 und 6.2). Die gleichen

Beobachtungen wurden auch in Langzeit-Experimenten mit Hamster-Embryonen gemacht [Squ99], so dass sich die MPM für eine minimal-invasive Bildgebung in der Oozyten- und Embryonalentwicklung eignet. Jedoch trat bei der verwendeten Anregungswellenlänge von 720 nm ein starker Abfall der detektierten Fluoreszenzintensität in den tiefsten Schichten der Oozyte auf (siehe Abbildung 6.1). Da die Eindringtiefe in porzinen Oozyten im NIR-Bereich mit steigender Wellenlänge von 700 bis 1000 nm kontinuierlich zunimmt [Koe00, Zeg07], sind andere DNA-Farbstoffen mit Anregungswellenlängen um 1000 nm zur weiteren Optimierung der Eindringtiefe vielversprechend [Dom00].

In dieser Arbeit wurde erstmals die automatisierte Lokalisierung, Erkennung der Umrisse und dreidimensionale Dissektion einer Zellorganelle anhand eines MPM-Bilderstapels gezeigt (siehe Abbildung 6.2). Dadurch wurde der Durchsatz der gesamten Prozedur auf etwa 20 bis 25 Oozyten pro Stunde erhöht, war aber im Vergleich zur mechanischen Enukleation um den Faktor Zwei geringer. Jedoch bietet nur die berührungslose Laser-Enukleation die Möglichkeit zur vollständigen Automatisierung, da jeder Arbeitsschritt in einem mikrofluidischen Aufbau durchgeführt werden kann [Hen06].

Oberhalb einer von der Pulsdichte abhängigen Schwellen-Pulsenergie wurde eine vollständige Dissektion der Hoechst-gefärbten Metaphasenplatte erreicht (siehe Abbildung 6.2b). Diesbezüglich bestand die Möglichkeit, dass kleine DNA-Fragmente im Zytoplasma verblieben, welche nach erneuter Färbung nicht ausreichend viele Fluorophore binden und somit nicht detektiert werden konnten. Zur Widerlegung dieser Hypothese wurde mit dem experimentellen Aufbau in Abbildung 6.7b ein Tropfen mit 100 µg/ml SYBR Green I-markierter, linearisierter Plasmid-DNA (*pEGFP-C1*, Clontech, Mountain View, USA) abgerastert; dabei wurden der Laser-Enukleation entsprechende Laserfluenzen verwendet. Eine Gel-elektrophoretische Trennung der DNA zeigte, dass die Fluoreszenzintensität der Plasmid-DNA-Bande bei 4,7 kbp mit steigender Pulsenergie kontinuierlich abnahm. Zugleich wurden keine DNA-Fragmente bis hinunter zu einer Größe von 20 bp detektiert, so dass diese nach der Laser-Enukleation deutlich kleiner als ganze Gensequenzen waren [Lan01].

Bei den optimierten Laserparametern für eine effiziente Dissektion der Metaphasenplatte wurde nach parthenogenetischer Aktivierung keine mitotische Zellteilung beobachtet (siehe Tabelle 6.2). Gleichzeitig war kein unmittelbarer Einfluss auf die Morphologie und Verteilung der Mitochondrien sichtbar. Ferner war das Oozyten-Entwicklungspotential nach Bestrahlung des Zytoplasmas unter gleichen Bedingungen mit Kontrollgruppen vergleichbar. Daraus kann geschlossen werden, dass die Laser-Enukleation keine direkten Schädigungen des Zytoplasmas sowie der umliegenden Organellen zur Folge hatte, wie beispielsweise die Mitochondrien [Jen08].

In ungefähr 10 % der Laser-enukleierten Oozyten waren nach eintägiger Kultivierung Chromosomenfragmente erkennbar (siehe Abbildung 6.5e), die anhand der MPM-Bilderstapel auf eine unvollständige Dissektion der Metaphasenplatte zurückgeführt werden konnten. Zu deren Vermeidung sollte in zukünftigen Experimenten die stark variierende Transmission der Oozyten vor der Dissektion bestimmt werden, um eine konstante applizierte Energiedichte in der Ebene der Metaphasenplatte zu gewährleisten. Nach siebentägiger Kultivierung

trat in 35 % der Laser-enukleierten Oozyten eine Fragmentierung des Zytoplasmas ohne detektierbare Zellkerne oder Chromosomenfragmente auf (siehe Abbildung 6.5f). Dies wurde auch nach der mechanischen E nukleation beobachtet [Ali05] und damit nicht von der Laserbestrahlung verursacht.

Nach einem Kerntransfer somatischer Zellen in Laser-enukleierte Oozyten trat im Gegensatz zur mechanischen E nukleation keine embryonale Entwicklung bis zum Blastozystenstadium auf (siehe Tabelle 6.2). Ursächlich hierfür war höchstwahrscheinlich die Entstehung eines zellweiten γ -H2AX-Signals nach der vollständigen Dissektion der Metaphasenplatte (siehe Abbildung 6.4); dies stellt ein Anzeichen für die Einleitung der Apoptose durch das Zellzyklus-Kontrollsystem dar [Pie02, DF10]. Durch die Begrenzung der Dissektion auf einen Punkt in der Metaphasenplatte („partielle E nukleation“) wurde eine höhere Teilungsrate und die Entstehung einer Blastozyste beobachtet. Jedoch zeigten diese Embryonen im Vergleich zur mechanischen E nukleation ein deutlich geringeres Entwicklungspotential und eine veränderte Zellkern-Morphologie (siehe Abschnitt 6.1.3). Folglich wurde auch nach der partiellen E nukleation eine normale Embryonalentwicklung vermutlich durch die Einleitung der Apoptose verhindert.

Im Gegensatz zu der in dieser Arbeit durchgeführten Experimente entstehen nach lokaler UV-A-Bestrahlung der Metaphasenplatte von Krallenfrosch-Oozyten [Els60] und einem darauf folgenden Kerntransfer somatischer Zellen lebendige Nachkommen [Gur62]. Nach einer Dissektion der Metaphasenplatte von Zebrafisch-Oozyten mit Mikrosekundenpulsen im NIR-Bereich wird dies nur bei der Verwendung embryonaler Zellen beobachtet [Sir09]. Beide Spezies benötigen nur wenige Stunden bis zum Erreichen des Blastozystenstadiums und damit eine gegenüber Säugetieren deutlich kürzere Entwicklungszeit [Alb08]. Ferner existieren zwischen den Spezies Unterschiede in den jeweiligen Kontrollmechanismen während des Zellzyklus [Nor04, Su06], die jedoch unabhängig von der Wellenlänge und Pulsdauer aktiviert werden [Kon09]. Daraus kann geschlossen werden, dass die Auswirkungen einer Bestrahlung auf das Entwicklungspotential Laser-enukleierter Oozyten entscheidend von der Spezies und nicht vom Lasersystem beeinflusst werden. Zur Überprüfung dieser Hypothese sind weiterführende Experimente notwendig, welche die Eignung der im Rahmen dieser Arbeit entwickelten Laser-E nukleation beim Krallenfrosch, Zebrafisch oder ähnlichen Wirbeltieren untersuchen.

Zusammenfassend wurde in dieser Arbeit erstmals die MPM-gesteuerte Laser-E nukleation als eine voll-automatisierte Alternative zur mechanischen E nukleation mit vergleichbarem Durchsatz realisiert. Die Verwendung ultrakurzer Laserpulse ermöglichte eine simultane, hochauflösende Bildgebung und Dissektion der Metaphasenplatte von Oozyten. Jedoch war das Entwicklungspotential porziner, Laser-enukleierter Oozyten gegenüber der mechanischen E nukleation trotz vernachlässigbarer, unmittelbarer Schädigungen des Zytoplasmas und der umliegenden Organellen deutlich verringert. Dies war auf die Detektion von DNA-Schäden und die vermutlich folgende Einleitung der Apoptose durch das Zellzyklus-Kontrollsystem zurückzuführen. Infolgedessen ist eine routinemäßige Anwendung der Laser-E nukleation im Bereich der regenerativen Medizin unwahrscheinlich.

7.4. Zweiphotonen-induzierte Kollagen-Quervernetzung

Das Potential der Zweiphotonen-induzierten Kollagen-Quervernetzung im Bereich des Tissue Engineering wurde mit artifiziellem Binde- und Herzmuskelgewebe untersucht, um zusätzlich den Einfluss verschiedener Zellpopulationen zu bestimmen. Zur Erhöhung der mechanischen Steifigkeit wurde RF-behandeltes Gewebe mit einem fs-Laser im NIR-Bereich großflächig abgerastert (siehe Abbildung 6.7). Die resultierende maximale Behandlungstiefe des Lasers wurde experimentell zu etwa 520 μm bestimmt und entsprach damit etwa 65 % der durchschnittlichen Gewebedicke (siehe Abbildung 6.9b). Im Gegensatz zu bisherigen Methoden bot das Abrastern eine vollständige, räumliche Kontrolle der Kollagen-Quervernetzung in dreidimensionalem Gewebe [Jay96, Wol03a]; jedoch nahm die Einkopplungseffizienz des Lasers von der Mitte des Gewebes nach außen kontinuierlich ab. Dies kann unter Berücksichtigung der Fresnelschen Formeln und des Snelliusschen Brechungsgesetzes auf die Krümmung der Geweboberfläche zurückgeführt werden [Nie04]. Folglich wurde nur ungefähr die Hälfte des Gewebevolumentums mit einer nahezu homogenen Fluenz bestrahlt. Die in dieser experimentellen Studie verwendete Strahltaile von etwa 100 μm kann durch eine höhere NA auf den Sub-Mikrometerbereich verringert werden [Koe00]. In Kombination mit einem Rotationstisch für die Gewebekonstrukte ermöglicht dies in zukünftigen Experimenten eine homogene applizierte Energiedichte über den gesamten Querschnitt und damit eine selektive Quervernetzung in einem Sub-Femtolitervolumen.

Einen Tag nach der Laserbestrahlung zeigten die Spannungs-Dehnungs-Kurven beider Gewebetypen zunächst ein nichtlineares Verhalten, das ab einer Dehnung von etwa 15 % linear wurde (siehe Abbildungen 6.8a und 6.12a); dieser Verlauf ist charakteristisch für Kollagen-gewebe [Roe02, Wol03b]. Bei einer Fluenz von 150 mJ/cm^2 wurde für RF-behandeltes Bindegewebe eine Versteifung und ein Anstieg des Youngschen Moduls um jeweils 35 % beobachtet (siehe Abbildung 6.8b). Mit den gleichen Laserparametern war die Erhöhung der mechanischen Steifigkeit von RF-behandeltem Herzmuskelgewebe um den Faktor Zwei bis Drei geringer. Ursächlich hierfür war der höhere Fibroblasten-Anteil im Bindegewebe zu Beginn der *in vitro*-Kultivierung und die damit verbundene höhere Konzentration von Molekülen der extrazellulären Matrix, wie beispielsweise Kollagen [Egh90].

Da die Kollagen-Quervernetzung bei der UV-A-Bestrahlung RF-behandelter Korneae durch eine Einphotonenanregung des Photosensitizers entsteht [DR02, McC10], wurde die Gewebeversteifung bei Verwendung eines fs-Lasers im NIR-Bereich höchstwahrscheinlich durch eine Zweiphotonenanregung von RF verursacht. Dies wird dadurch gestützt, dass eine RF-Fluoreszenz während des Abrasterns der Gewebekonstrukte sichtbar war und eine Bestrahlung unbehandelter Gewebe deren mechanische Eigenschaften nicht beeinflusste. Ferner konnte der Einfluss des Vitalitäts-Markers TMRM auf die Zweiphotonenabsorption wegen der im Vergleich zu RF etwa 10000-fach geringeren Konzentration und der selektiven Akkumulation in Mitochondrien ausgeschlossen werden.

Die Optimierung der experimentellen Bedingungen und der Laserparameter ergab für RF-behandeltes Herzmuskelgewebe eine signifikant erhöhte mechanische Steifigkeit um 40 %

(siehe Abbildung 6.12b); gleichzeitig nahm das Youngsche Modul um 15 % zu. Im Vergleich zur ersten Versuchsreihe stellte dies eine Verbesserung um den Faktor Zwei dar. Ein deutlich höherer Anstieg des Youngschen Moduls um den Faktor 4,5 wird nach der UV-A-Bestrahlung RF-behandelter, menschlicher Korneae beobachtet [Wol03b]. Dies ist größtenteils auf den deutlich höheren Kollagengehalt, die längere Bestrahlungszeit und die zehnfach höhere RF-Konzentration zurückzuführen. Aus diesem Grund sollten in weiterführenden Experimenten die gleichen Bedingungen wie bei der UV-A-Bestrahlung verwendet werden, um einen direkten Vergleich zwischen beiden Methoden zu erhalten.

Die UV-A-induzierte Kollagen-Quervernetzung in der Kornea wird im Allgemeinen vom Zelltod im behandelten Gebiet begleitet [Wol04]. Indes wurde durch die fs-Laserbestrahlung von Binde- und Herzmuskelgewebe die zelluläre metabolische Aktivität und damit die Zellvitalität nicht beeinflusst (siehe Abbildung 6.10a). Da zudem die Kontraktionskraft der bestrahlten Herzmuskelgewebe mit unbehandelten Kontrollen vergleichbar war (siehe Abbildung 6.12b), blieb die Funktionalität der Zellen vollständig erhalten. Daraus kann geschlossen werden, dass zelluläre Antioxidantien den oxidativen Stress infolge der Laserbestrahlung abbauen konnten [Yu94]. Dies wurde bis heute nur nach der UV-A-induzierten Quervernetzung fibrinhaltiger, artifizierender Bindegewebe beobachtet [Sye09]. Folglich bot das im Rahmen dieser Arbeit entwickelte experimentelle Protokoll erstmals ein Prozessfenster zur schnellen und minimal-invasiven Erhöhung der mechanischen Steifigkeit kollagenreicher Gewebekonstrukte. Um ein sicheres Prozessfenster zu erhalten, ist ein ausreichend großer Unterschied der Absorptions-Wirkungsquerschnitte von RF und endogenen Fluorophoren notwendig [Koe00]. Dabei skaliert der Zweiphotonen-Absorptionsquerschnitt superlinear mit dem Einphotonen-Absorptionsquerschnitt [Bla01]. Demnach existiert wahrscheinlich nur bei nichtlinearer Anregung von RF im NIR-Bereich ein ausreichend großes Prozessfenster für die minimal-invasive Kollagen-Quervernetzung. In folgenden Arbeiten muss die optimale Laserfluenz im Prozessfenster stärker eingegrenzt werden, um eine weitere Erhöhung der Gewebeversteifung zu erreichen.

Oberhalb des Prozessfensters wurde die zelluläre metabolische Aktivität drastisch reduziert und kein positiver Effekt auf die Gewebesteifigkeit mehr beobachtet (siehe Abbildungen 6.10b und 6.12a). Dies war höchstwahrscheinlich auf einen exzessiven oxidativen Stress und/oder eine progressive Akkumulation von thermischer Energie im fokalen Volumen während des Abrasterns zurückzuführen [Vog03]. Jedoch war die Kontraktionskraft dieser Herzmuskelgewebe mit unbehandelten Kontrollen vergleichbar (siehe Abschnitt 6.2.2), so dass die Funktionalität der Kardiomyozyten vermutlich trotzdem erhalten blieb.

Zusammenfassend wurde in dieser Arbeit erstmals das große Potential der Zweiphotonen-induzierten Kollagen-Quervernetzung in artifiziellem Gewebe aufgezeigt. Im Gegensatz zu bisherigen Methoden bot die nichtlineare Anregung von RF mit fs-Laserpulsen im NIR-Bereich ein ausreichend großes Prozessfenster zur signifikanten Erhöhung der Gewebesteifigkeit ohne Beeinflussung der Zellfunktionalität und -vitalität. In Kombination mit einer hohen Präzision im Nanometerbereich ermöglicht dies in kommenden Forschungsvorhaben eine selektive Quervernetzung beliebiger Strukturen in dreidimensionalen Gewebekonstrukten.

7.5. Fazit

Im Rahmen dieser Arbeit wurde ein experimenteller Aufbau zur MPM-gesteuerten Nanochirurgie realisiert, womit erstmals die fundamentalen Wechselwirkungs-Mechanismen im Low-Density-Plasma-Regime aufgeklärt wurden. Dadurch konnten alle physikalischen Grundlagen für eine minimal-invasive Manipulation beliebiger Strukturen in dreidimensionalen biologischen Medien gelegt werden. In diesem Zusammenhang hatten die Fluorophore zur Markierung der subzellulären Zielstruktur einen signifikanten Einfluss auf die Effizienz der chemischen Dissektion. Folglich müssen diese in zukünftigen theoretischen Modellen zur fs-Nanochirurgie berücksichtigt werden.

Mit Blick auf eine routinemäßige Anwendung der fs-Nanochirurgie in der Biomedizin ist das im experimentellen Aufbau verwendete kostenintensive und sperrige Titan:Saphir-Lasersystem nicht geeignet. Die kürzlich demonstrierte kompakte Kombination aus einem faserbasierten Lasersystem und Mikroendoskop [Liu11] könnte in naher Zukunft diese Lücke schließen. Potentielle Anwendungsfelder sind der SCNT [Ful04], der Gentransfer [Tir02] und die Optogenetik [And10].

In Bezug auf das große Potential des Tissue Engineering für die Heilung von Volkskrankheiten ist der Einsatz des fs-Lasers zur Erhöhung der mechanischen Steifigkeit bei der Herstellung artifiziellen Gewebes sehr vielversprechend. Durch die universelle Verwendung von Kollagen als Polymer-Zellträger in unterschiedlichen Gewebekonstrukten bietet sich für die Zweiphotonen-induzierte Quervernetzung eine Vielzahl medizinischer Anwendungsfelder [Ata08, Fra08]. Zudem hat diese Methode das Alleinstellungsmerkmal, dem Anwender eine vollständige räumliche Prozesskontrolle zu ermöglichen. Dies ist unter anderem für die Imitation der nativen Anisotropie von Herzmuskelgewebe unabdingbar [Zim11], um nach einer Transplantation artifiziellen Gewebes die Pumpfunktion des Herzens und damit die Lebensqualität des Patienten zu verbessern.

Literaturverzeichnis

- [Ahk72] AHKONG Q, CRAMP F, LUCY J, FISHER D, HOWELL J, Studies on chemically induced cell fusion, *Journal of Cell Science*, **10** (3): 769–787, 1972.
- [Alb08] ALBERTS B, JOHNSON A, LEWIS J, RAFF M, ROBERTS K, WALTER P, *Molecular Biology of the Cell*, Garland Science, Taylor & Francis Group, 2008.
- [Ali05] ALIKANI M, SCHIMMEL T, WILLADSEN S, Cytoplasmic fragmentation in activated eggs occurs in the cytokinetic phase of the cell cycle, in lieu of normal cytokinesis, and in response to cytoskeletal disorder, *Molecular Human Reproduction*, **11** (5): 335–344, 2005.
- [AM10] ALLEGRA-MASCARO A, SACCONI L, PAVONE F, Multi-photon nanosurgery in live brain, *Frontiers in Neuroenergetics*, **2**: 21, 2010.
- [Amo79] AMOUYAL E, BERNAS A, GRAND D, On the photoionization energy threshold of tryptophan in aqueous solutions, *Photochemistry and Photobiology*, **29** (6): 1071–1077, 1979.
- [And10] ANDRASFALVY BK, ZEMELMAN BV, TANG J, VAZIRI A, Two-photon single-cell optogenetic control of neuronal activity by sculpted light, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **107** (26): 11.981–11.986, 2010.
- [Arn07] ARNOLD C, *Erzeugung optischer Durchbrüche bei hoher numerischer Apertur*, Dissertation, Leibniz Universität Hannover, 2007.
- [Aru98] ARUOMA O, HALLIWELL B, *DNA and Free Radicals: Techniques, Mechanisms and Applications*, OICA International (UK) Ltd., 1998.
- [Ata08] ATALA A, LANZA R, THOMSON J, NEREM R, *Principles of Regenerative Medicine*, Elsevier GmbH, 2008.
- [Bag99] BAGUISI A, BEHBOODI E, MELICAN D, ET AL, Production of goats by somatic cell nuclear transfer, *Nature Biotechnology*, **17** (5): 456–461, 1999.
- [Bau05] BAUMGART J, *Realisierung eines Multiphotonenmikroskops für die Zellchirurgie*, Diplomarbeit, Leibniz Universität Hannover, 2005.

- [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 MTH53a cells, *Optics Express*, **16** (5): 3021–3031, 2008.
- [Bau09] BAUMGART J, *Fs-Laser-Transfektion - Gen-Transfer mittels ultrakurzer Laserpulse*, Dissertation, Leibniz Universität Hannover, 2009.
- [Bed98] BEDNAR J, HOROWITZ R, GRIGORYEV S, CARRUTHERS L, HANSEN J, KOSTER A, WOODCOCK C, Nucleosomes, linker DNA, and linker histone form a unique structural motif that directs the higher-order folding and compaction of chromatin, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **95** (24): 14.173–14.178, 1998.
- [Bes02] BESTVATER F, SPIESS E, STOBRAWA G, HACKER M, FEURER T, PORWOL T, BERCHNER-PFANNSCHMIDT U, WOTZLAW C, ACKER H, Two-photon fluorescence absorption and emission spectra of dyes relevant for cell imaging, *Journal of Microscopy*, **208** (2): 108–115, 2002.
- [Böh03] BÖHM E, *Einfluss der Dispersion auf die nichtlineare Ausbreitung von Lichtimpulsen*, Dissertation, Universität Rostock, 2003.
- [Bha10] BHATIA SK, Tissue engineering for clinical applications, *Biotechnology Journal*, **5** (12): 1309–1323, 2010.
- [Bis09] BISBY RH, CRISOSTOMO AG, BOTCHWAY SW, PARKER AW, Nanoscale hydroxyl radical generation from multiphoton ionization of tryptophan, *Photochemistry and Photobiology*, **85** (1): 353–357, 2009.
- [Bla01] BLAB G, LOMMERSE P, COGNET L, HARMS G, SCHMIDT T, Two-photon excitation action cross-sections of the autofluorescent proteins, *Chemical Physics Letters*, **350** (1): 71–77, 2001.
- [Bou86] BOULNOIS J, Photophysical processes in recent medical laser developments: a review, *Lasers in Medical Science*, **1** (1): 47–66, 1986.
- [Bou00] BOUDAIFFA B, CLOUTIER P, HUNTING D, HUELS M, SANCHE L, Resonant formation of DNA strand breaks by low-energy (3 to 20 eV) electrons, *Science*, **287** (5458): 1658–1660, 2000.
- [Bou07] BOURGEOIS F, BEN-YAKAR A, Femtosecond laser nanoaxotomy properties and their effect on axonal recovery in *C.elegans*, *Optics Express*, **15** (14): 8521–8531, 2007.
- [Boy08] BOYD R, *Nonlinear Optics*, Academic Press, 2008.

- [Bra05] BRADSHAW P, STAVROPOULOS D, MEYN M, Human telomeric protein TRF2 associates with genomic double-strand breaks as an early response to DNA damage, *Nature Genetics*, **37** (2): 193–197, 2005.
- [Cam07a] CAMPBELL KHS, FISHER P, CHEN WC, CHOI I, KELLY RDW, LEE JH, XHU J, Somatic cell nuclear transfer: past, present and future perspectives, *Theriogenology*, **68** (1): S214–S231, 2007.
- [Cam07b] CAMPBELL N, REECE J, *Biology*, Pearson Education, 2007.
- [Car59] CARSLAW H, JAEGER J, *Conduction of Heat in Solids*, Oxford University Press, 1959.
- [Che02] CHEN T, ZENG S, LUO Q, ZHANG Z, ZHOU W, High-order photobleaching of green fluorescent protein inside live cells in two-photon excitation microscopy, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **291** (5): 1272–1275, 2002.
- [Che05] CHEN E, OLSON E, Unveiling the mechanisms of cell-cell fusion, *Science*, **308** (5720): 369–373, 2005.
- [Cho06] CHOW S, HAKOZAKI H, PRICE D, MACLEAN N, DEERINCK T, BOUWER J, MARTONE M, PELTIER S, ELLISMAN M, Automated microscopy system for mosaic acquisition and processing, *Journal of Microscopy*, **222** (2): 76–84, 2006.
- [Cib98] CIBELLI J, STICE S, GOLUEKE P, KANE J, JERRY J, BLACKWELL C, LEON FD, ROBL J, Cloned transgenic calves produced from nonquiescent fetal fibroblasts, *Science*, **280** (5367): 1256–1258, 1998.
- [Cla03] CLASSEN M, DIEHL V, KOCHSIEK K, *Innere Medizin*, Elsevier GmbH, 2003.
- [Coh05] COHANOSCHI I, HERNANDEZ F, Surface plasmon enhancement of two- and three-photon absorption of Hoechst 33 258 dye in activated gold colloid solution, *Journal of Physical Chemistry B*, **109** (30): 14.506–14.512, 2005.
- [Cox04] COX G, SHEPPARD C, Practical limits of resolution in confocal and non-linear microscopy, *Microscopy Research and Technique*, **63** (1): 18–22, 2004.
- [Dam95] DAMINK LO, DIJKSTRA P, LUYN MV, WACHEM PV, NIEUWENHUIS P, FEIJEN J, Glutaraldehyde as a crosslinking agent for collagen-based biomaterials, *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, **6** (8): 460–472, 1995.
- [Dar76] DARDIK H, IBRAHIM I, BAIER R, SPRAYREGEN S, LEVY M, DARDIK I, Human umbilical cord. A new source for vascular prosthesis, *JAMA, the Journal of the American Medical Association*, **236** (25): 2859–2862, 1976.

- [Den90] DENK W, STRICKLER J, WEBB W, 2-photon laser scanning fluorescence microscopy, *Science*, **248** (4951): 73–76, 1990.
- [Den06] PAWLEY J (Hg.), *Handbook of Biological Confocal Microscopy*, Springer Verlag, 2006, DENK W, PISTON D, WEBB W, Kapitel „Multi-Photon Molecular Excitation in Laser-Scanning Microscopy”, Seiten 535–549.
- [DF10] DE FERAUDY S, REVET I, BEZROOKOVE V, FEENEY L, CLEAVER J, A minority of foci or pan-nuclear apoptotic staining of gammaH2AX in the S phase after UV damage contain DNA double-strand breaks, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **107** (115): 6870–6875, 2010.
- [Dia05] DIASPRO A, CHIRICO G, COLLINI M, Two-photon fluorescence excitation and related techniques in biological microscopy, *Quarterly Reviews of Biophysics*, **38** (2): 97–166, 2005.
- [Die96] DIELS J, RUDOLPH W, *Ultrashort Laser Pulse Phenomena: Fundamentals, techniques and applications on a femtosecond time scale*, Academic Press, 1996.
- [Die08] DIECKHOFF B, PETERSEN B, KUES W, KURTH R, NIEMANN H, DENNER J, Knockdown of porcine endogenous retrovirus (PERV) expression by PERV-specific shRNA in transgenic pigs, *Xenotransplantation*, **15** (1): 36–45, 2008.
- [Din07] DINANT C, DE JAGER M, ESSERS J, VAN CAPPELLEN WA, KANAAR R, HOUTSMULLER AB, VERMEULEN W, Activation of multiple DNA repair pathways by subnuclear damage induction methods, *Journal of Cell Science*, **120** (15): 2731–2740, 2007.
- [Dit01] DITTRICH P, SCHWILLE P, Photobleaching and stabilization of fluorophores used for single-molecule analysis with one- and two-photon excitation, *Applied Physics B: Lasers and Optics*, **73** (8): 829–837, 2001.
- [Dom00] DOMINKO T, CHAN A, SIMERLY C, LUETJENS C, HEWITSON L, MARTINOVICH C, SCHATTEN G, Dynamic imaging of the metaphase II spindle and maternal chromosomes in bovine oocytes: implications for enucleation efficiency verification, avoidance of parthenogenesis, and successful embryogenesis, *Biology of Reproduction*, **62** (1): 150–154, 2000.
- [Dow62] DOWNING J, CHRISTOPHERSON W, BROGHAMER W, Nuclear water content during carcinogenesis, *Cancer*, **15** (6): 1176–1180, 1962.
- [DR02] DE ROSA M, CRUTCHLEY R, Photosensitized singlet oxygen and its applications, *Coordination Chemistry Reviews*, **233**: 351–371, 2002.

- [Eat05] EATON S, ZHANG H, HERMAN P, YOSHINO F, SHAH L, BOVATSEK J, ARAI A, Heat accumulation effects in femtosecond laser-written waveguides with variable repetition rate, *Optics Express*, **13** (12): 4708–4716, 2005.
- [Edw03] EDWARDS J, SCHRICK F, MCCrackEN M, VAN AMSTEL S, HOPKINS F, WELBORN M, DAVIES C, Cloning adult farm animals: a review of the possibilities and problems associated with somatic cell nuclear transfer, *American Journal of Reproductive Immunology*, **50** (2): 113–123, 2003.
- [Egg98] EGGELING C, WIDENGREN J, RIGLER R, SEIDEL C, Photobleaching of fluorescent dyes under conditions used for single-molecule detection: Evidence of two-step photolysis, *Analytical Chemistry*, **70** (13): 2651–2659, 1998.
- [Egg05] EGGELING C, VOLKMER A, SEIDEL C, Molecular photobleaching kinetics of rhodamine 6G by one- and two-photon induced confocal fluorescence microscopy, *ChemPhysChem*, **6** (5): 791–804, 2005.
- [Egh90] EGHBALI M, WEBER K, Collagen and the myocardium: fibrillar structure, biosynthesis and degradation in relation to hypertrophy and its regression, *Molecular and Cellular Biochemistry*, **96** (1): 1–14, 1990.
- [Eic10] EICHLER J, EICHLER H, *Laser: Bauformen, Strahlführung, Anwendungen*, Springer Verlag, 2010.
- [Els60] ELSDALE T, GURDON J, FISCHBERG M, A description of the technique for nuclear transplantation in xenopus-laevis, *Journal of Embryology and Experimental Morphology*, **8** (4): 437–444, 1960.
- [Flo65] FLORSCHUETZ L, CHAO B, On mechanics of vapor bubble collapse, *Journal of Heat Transfer*, **87** (2): 209–220, 1965.
- [Fra08] FRATZL P, *Collagen: Structure and Mechanics*, Springer Verlag, 2008.
- [Fre05] FREDERIKSEN P, MCILROY S, NIELSEN C, NIKOLAJSEN L, SKOVSEN E, JORGENSEN M, MIKKELSEN K, OGILBY P, Two-photon photosensitized production of singlet oxygen in water, *Journal of the American Chemical Society*, **127** (1): 255–269, 2005.
- [Fri03] FRIEDBERG E, DNA damage and repair, *Nature*, **421** (6921): 436–440, 2003.
- [Ful04] FULKA J, LOI P, FULKA H, PTAK G, NAGAI T, Nucleus transfer in mammals: noninvasive approaches for the preparation of cytoplasts, *Trends in Biotechnology*, **22** (6): 279–283, 2004.
- [Fun93] FUNG Y, *Biomechanics: Mechanical Properties of Living Tissues*, Springer Verlag, 1993.

- [Gab08] GABEL CV, Femtosecond lasers in biology: nanoscale surgery with ultrafast optics, *Contemporary Physics*, **49** (6): 391–411, 2008.
- [Gal03a] GALLI C, LAGUTINA I, CROTTI G, COLLEONI S, TURINI P, PONDERATO N, DUCHI R, LAZZARI G, Pregnancy: A cloned horse born to its dam twin, *Nature*, **424** (6949): 635, 2003.
- [Gal03b] GALLI C, LAGUTINA I, LAZZARI G, Introduction to cloning by nuclear transplantation, *Cloning Stem Cells*, **5** (4): 223–232, 2003.
- [Gar05] GARRETT B, DIXON D, CAMAIONI D, ET AL, Role of water in electron-initiated processes and radical chemistry: Issues and scientific advances, *Chemical Reviews*, **105** (1): 355–389, 2005.
- [Gau99] GAUDERON R, SHEPPARD C, Effect of a finite-size pinhole on noise performance in single-, two-, and three-photon confocal fluorescence microscopy, *Applied Optics*, **38** (16): 3562–3565, 1999.
- [GG07] 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, *Journal of Biomedical Optics*, **12** (2): 020.505, 2007.
- [Gol74] GOLOMB H, BAHR G, Electron microscopy of human interphase nuclei - determination of total dry mass and DNA-packing ratio, *Chromosoma*, **46** (3): 233–245, 1974.
- [Gon08] GONG J, ZHAO X, XING Q, LI F, LI H, LI Y, CHAI L, WANG Q, ZHELTIKOV A, Femtosecond laser-induced cell fusion, *Applied Physics Letters*, **92** (9): 093.901, 2008.
- [Gör01] GÖRNER H, Direct and sensitized photoprocesses of bis-benzimidazole dyes and the effects of surfactants and DNA, *Photochemistry and Photobiology*, **73** (4): 339–348, 2001.
- [Gu00] GU M, *Advanced Optical Imaging Theory*, Springer Verlag, 2000.
- [Gui97] GUILD J, XU C, WEBB W, Measurement of group delay dispersion of high numerical aperture objective lenses using two-photon excited fluorescence, *Applied Optics*, **36** (1): 397–401, 1997.
- [Gur62] GURDON J, Adult frogs derived from nuclei of single somatic cells, *Developmental Biology*, **4** (2): 256–273, 1962.
- [Hal92] HALLIWELL B, Reactive oxygen species and the central nervous system, *Journal of Neurochemistry*, **59** (5): 1609–1623, 1992.

- [Han61] HANCOCK J, Fertilization in the pig, *Journal of Reproduction and Fertility*, **2** (3): 307–331, 1961.
- [Har62] HART E, BOAG J, Absorption spectrum of hydrated electron in water and in aqueous solutions, *Journal of the American Chemical Society*, **84** (21): 4090–4095, 1962.
- [Har89] HARTWELL L, WEINERT T, Checkpoints: controls that ensure the order of cell cycle events, *Science*, **246** (4930): 629–634, 1989.
- [Hat10] HATTORI F, CHEN H, YAMASHITA H, ET AL, Nongenetic method for purifying stem cell-derived cardiomyocytes, *Nature Methods*, **7** (1): 61–66, 2010.
- [Hei01] HEIKAL A, HESS S, WEBB W, Multiphoton molecular spectroscopy and excited-state dynamics of enhanced green fluorescent protein (EGFP): acid-base specificity, *Chemical Physics*, **274** (1): 37–55, 2001.
- [Hei05] HEISTERKAMP A, MAXWELL IZ, MAZUR E, UNDERWOOD JM, NICKERSON JA, KUMAR S, INGBER DE, Pulse energy dependence of subcellular dissection by femtosecond laser pulses, *Optics Express*, **13** (10): 3690–3696, 2005.
- [Hel98] HELENA M, BAERVELDT F, KIM W, WILSON S, Keratocyte apoptosis after corneal surgery, *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, **39** (2): 276–283, 1998.
- [Hel05] HELMCHEN F, DENK W, Deep tissue two-photon microscopy, *Nature Methods*, **2** (12): 932–940, 2005.
- [Hen06] HENG B, CAO T, STOJKOVIC M, VAJTA G, Mammalian oocyte polarity can be exploited for the automation of somatic cell nuclear transfer - in the development of a "cloning biochip", *Medical Hypotheses*, **67** (2): 420–421, 2006.
- [Hir76] HIRSCHFELD T, Quantum efficiency independence of the time integrated emission from a fluorescent molecule, *Applied Optics*, **15** (12): 3135–3139, 1976.
- [Höl03] HÖLKER M, *Experimentelle Untersuchungen zum somatischen Klonen beim Schwein: In-vitro- und In-vivo-Entwicklung von Kerntransferkomplexen aus in vitro gereiften Oozyten*, Dissertation, Tierärztliche Hochschule Hannover, 2003.
- [Hop01] HOPT A, NEHER E, Highly nonlinear photodamage in two-photon fluorescence microscopy, *Biophysical Journal*, **80** (4): 2029–2036, 2001.
- [Hue03] HUELS M, BOUDAIFFA B, CLOUTIER P, HUNTING D, SANCHE L, Single, double, and multiple double strand breaks induced in DNA by 3–100 eV electrons, *Journal of the American Chemical Society*, **125** (15): 4467–4477, 2003.

- [Hut85] HUTCHINSON F, Chemical changes induced in DNA by ionizing radiation, *Progress in Nucleic Acid Research and Molecular Biology*, **32**: 115–154, 1985.
- [Ima02] IMAHIE H, TAKAHASHI M, TOYODA Y, SATO E, Differential effects of cytochalasin B on cytokinesis in parthenogenetically activated mouse oocytes, *Journal of Reproduction and Development*, **48** (1): 31–40, 2002.
- [Jar91] JARRELL V, DAY B, PRATHER R, The transition from maternal to zygotic control of development occurs during the 4-cell-stage in the domestic pig, *Biological Reproduction*, **44** (1): 62–68, 1991.
- [Jaw07] JAWAD H, ALI NN, LYON AR, CHEN QZ, HARDING SE, BOCCACCINI AR, Myocardial tissue engineering: a review, *Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine*, **1** (5): 327–342, 2007.
- [Jaw08] JAWAD H, LYON AR, HARDING SE, ALI NN, BOCCACCINI AR, Myocardial tissue engineering, *British Medical Bulletin*, **87** (1): 31–47, 2008.
- [Jay96] JAYAKRISHNAN A, JAMEELA S, Glutaraldehyde as a fixative in bioprostheses and drug delivery matrices, *Biomaterials*, **17** (5): 471–484, 1996.
- [Jee88] JEE Y, BECKER M, WALSER R, Laser-induced damage on single-crystal metal surfaces, *Journal of the Optical Society of America B*, **5** (3): 648–659, 1988.
- [Jen08] JENDRACH M, MAI S, POHL S, VOETH M, BEREITER-HAHN J, Short- and long-term alterations of mitochondrial morphology, dynamics and mtDNA after transient oxidative stress, *Mitochondrion*, **8** (4): 293–304, 2008.
- [Kal94] KALNINSH K, PESTOV D, ROSHCINA Y, Absorption and fluorescence spectra of the probe Hoechst 33258, *Journal of Photochemistry and Photobiology, A: Chemistry*, **83** (1): 39–47, 1994.
- [Kar09] KARMENYAN AV, SHAKHBAZYAN AK, SVIRIDOVA-CHAILAKHYAN TA, KRIVOKHARCHENKO AS, CHIOU AE, CHAILAKHYAN LM, Use of picosecond infrared laser for micromanipulation of early mammalian embryos, *Molecular Reproduction and Development*, **76** (10): 975–983, 2009.
- [Kar10] KARP G, *Cell and Molecular Biology*, Wiley-VCH, 2010.
- [Kat73] KATZ E, LI S, The intermolecular space of reconstituted collagen fibrils, *Journal of Molecular Biology*, **73** (3): 351–369, 1973.
- [Kau76] KAUFMAN M, SACHS L, Complete preimplantation development in culture of parthenogenetic mouse embryos, *Journal of Embryology and Experimental Morphology*, **35** (1): 179–190, 1976.

- [Kel65] KELDYSH L, Ionization in the field of a strong electromagnetic wave, *Soviet Physics JETP*, **20** (5): 1307–1314, 1965.
- [Ken95] KENNEDY P, A first-order model for computation of laser-induced breakdown thresholds in ocular and aqueous media: Part 1 - Theory, *IEEE Journal of Quantum Electronics*, **31** (12): 2241–2249, 1995.
- [Ken11] KENSAH G, GRUH I, VIERING J, SCHUMANN H, DAHLMANN J, MEYER H, SKVORC D, BAER A, AKHYARI P, HEISTERKAMP A, HAVERICH A, MARTIN U, A Novel Miniaturized Multimodal Bioreactor for Continuous In Situ Assessment of Bioartificial Cardiac Tissue During Stimulation and Maturation, *Tissue Engineering Part C, Methods*, **17** (4): 463–473, 2011.
- [Kob08] KOBAYASHI J, IWABUCHI K, MIYAGAWA K, SONODA E, SUZUKI K, TAKATA M, TAUCHI H, Current topics in DNA double-strand break repair, *Journal of Radiation Research*, **49** (2): 93–103, 2008.
- [Koe97] KOENIG K, SO P, MANTULIN W, GRATTON E, Cellular response to near-infrared femtosecond laser pulses in two-photon microscopes, *Optics Letters*, **22** (2): 135–136, 1997.
- [Koe99a] KOENIG K, BECKER T, FISCHER P, RIEMANN I, HALBHUBER K, Pulse-length dependence of cellular response to intense near-infrared laser pulses in multiphoton microscopes, *Optics Letters*, **24** (2): 113–115, 1999.
- [Koe99b] KOENIG K, RIEMANN I, FISCHER P, HALBHUBER K, Intracellular nanosurgery with near infrared femtosecond laser pulses, *Cellular and Molecular Biology*, **45** (2): 195–201, 1999.
- [Koe99c] KOESTER H, BAUR D, UHL R, HELL S, Ca²⁺ fluorescence imaging with pico- and femtosecond two-photon excitation: Signal and photodamage, *Biophysical Journal*, **77** (4): 2226–2236, 1999.
- [Koe00] KOENIG K, Multiphoton microscopy in life sciences, *Journal of Microscopy*, **200** (2): 83–104, 2000.
- [Koe01] KOENIG K, RIEMANN I, FRITZSCHE W, Nanodissection of human chromosomes with near-infrared femtosecond laser pulses, *Optics Letters*, **26** (11): 819–821, 2001.
- [Koh07] KOHLI V, ROBLES V, CANCELA ML, ACKER JP, WASKIEWICZ AJ, ELEZZABI AY, An alternative method for delivering exogenous material into developing zebrafish embryos, *Biotechnology and Bioengineering*, **98** (6): 1230–1241, 2007.

- [Kol04] KOLLER M, HANANIA E, STEVENS J, EISFELD T, SASAKI G, FIECK A, PALSSON B, High-throughput laser-mediated in situ cell purification with high purity and yield, *Cytometry Part A*, **61A** (2): 153–161, 2004.
- [Kon09] KONG X, MOHANTY SK, STEPHENS J, HEALE JT, GOMEZ-GODINEZ V, SHI LZ, KIM JS, YOKOMORI K, BERNS MW, Comparative analysis of different laser systems to study cellular responses to DNA damage in mammalian cells, *Nucleic Acids Research*, **37** (9): e68, 2009.
- [Kor71] KORNBERG R, MCCONNELL H, Lateral diffusion of phospholipids in a vesicle membrane, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **68** (10): 2564–2568, 1971.
- [Kre11] KREUTZIGER K, MURRY C, Engineered human cardiac tissue, *Pediatric Cardiology*, **32** (3): 334–341, 2011.
- [Kro98] KROEMER G, DALLAPORTA B, RESCHE-RIGON M, The mitochondrial death/life regulator in apoptosis and necrosis, *Annual Review of Physiology*, **60**: 619–642, 1998.
- [Kue04] KUES W, NIEMANN H, The contribution of farm animals to human health, *Trends in Biotechnology*, **22** (6): 286–294, 2004.
- [Kue09] KUETEMEYER K, BAUMGART J, LUBATSCHOWSKI H, HEISTERKAMP A, Repetition rate dependency of low-density plasma effects during femtosecond-laser-based surgery of biological tissue, *Applied Physics B: Lasers and Optics*, **97** (3): 695–699, 2009.
- [Kum06] KUMAR S, MAXWELL I, HEISTERKAMP A, POLTE T, LELE T, SALANGA M, MAZUR E, INGBER D, Viscoelastic retraction of single living stress fibers and its impact on cell shape, cytoskeletal organization, and extracellular matrix mechanics, *Biophysical Journal*, **90** (10): 3762–3773, 2006.
- [Lak06] LAKOWICZ J, *Principles of Fluorescence Spectroscopy*, Springer Verlag, 2006.
- [Lan01] LANDER E, LINTON L, BIRREN B, ET AL, Initial sequencing and analysis of the human genome, *Nature*, **409** (6822): 860–921, 2001.
- [Lea96] LEADON S, Repair of DNA damage produced by ionizing radiation: A minireview, *Seminars in Radiation Oncology*, **6** (4): 295–305, 1996.
- [LG08] LE GRAND Y, LERAY A, GUILBERT T, ODIN C, Non-descanned versus descanned epifluorescence collection in two-photon microscopy: Experiments and Monte Carlo simulations, *Optics Communications*, **281** (21): 5480–5486, 2008.

- [Li06] BRONZINO J (Hg.), *Biomedical Engineering Fundamentals*, CRC Press, 2006, Li S, Kapitel „Biologic Biomaterials: Tissue-Derived Biomaterials (Collagen)“, Seiten 43.1–43.23.
- [Lim93] LIMOLI C, WARD J, A new method for introducing double-strand breaks into cellular DNA, *Radiation Research*, **134** (2): 160–169, 1993.
- [Liu11] LIU G, KIEU K, WISE F, CHEN Z, Multiphoton microscopy system with a compact fiber-based femtosecond-pulse laser and handheld probe, *Journal of Biophotonics*, **4** (1-2): 34–39, 2011.
- [Lod07] LODISH H, BERK A, MATSUDAIRA P, KAISER C, KRIEGER M, SCOTT M, ZIPURSKY L, DARNELL J, *Molecular Cell Biology*, Palgrave Macmillan, 2007.
- [Loo90] LOONTIENS F, REGENFUSS P, ZECHEL A, DUMORTIER L, CLEGG R, Binding characteristics of Hoechst 33258 with calf thymus DNA, Poly[d(A-T)], and d(CCGGAATTCCGG): multiple stoichiometries and determination of tight binding with a wide spectrum of site affinities, *Biochemistry*, **29** (38): 9029–9039, 1990.
- [Lor11] LORBEER R, HEIDRICH M, LORBEER C, RAMIREZ-OJEDA D, BICKER G, MEYER H, HEISTERKAMP A, Highly efficient 3D fluorescence microscopy with a scanning laser optical tomograph, *Optics Express*, **19** (6): 5419–5430, 2011.
- [Lou83] LOUDON R, *The Quantum Theory of Light*, Oxford University Press, 1983.
- [Mar79] MARSDEN M, LAEMMLI U, Metaphase chromosome structure: evidence for a radial loop model, *Cell*, **17** (4): 849–858, 1979.
- [Mar06] MARI PO, FLOREA BI, PERSENGIEV SP, VERKAIK NS, BRUEGGENWIRTH HT, MODESTI M, GIGLIA-MARI G, BEZSTAROSTI K, DEMMERS JAA, LUIDER TM, HOUTSMULLER AB, VAN GENT DC, Dynamic assembly of end-joining complexes requires interaction between Ku70/80 and XRCC4, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **103** (49): 18.597–18.602, 2006.
- [Max05] MAXWELL I, CHUNG S, MAZUR E, Nanoprocessing of subcellular targets using femtosecond laser pulses, *Medical Laser Applications*, **20** (3): 193–200, 2005.
- [McC71] MCCCLAIN W, Excited state symmetry assignment through polarized two-photon absorption studies of fluids, *Journal of Chemical Physics*, **55** (6): 2789–2796, 1971.
- [McC10] MCCALL AS, KRAFT S, EDELHAUSER HF, KIDDER GW, LUNDQUIST RR, BRADSHAW HE, DEDEIC Z, DIONNE MJC, CLEMENT EM, CONRAD GW,

- Mechanisms of corneal tissue cross-linking in response to treatment with topical riboflavin and long-wavelength ultraviolet radiation (UVA), *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, **51** (1): 129–138, 2010.
- [McI75] MCINTOSH C, MICHAELIS L, MORROW A, ITSCOITZ S, REDWOOD D, EPSTEIN S, Atrioventricular valve replacement with the Hancock porcine xenograft: a five year clinical experience, *Surgery*, **78** (6): 768–775, 1975.
- [MF80] MACLEAN-FLETCHER S, POLLARD T, Mechanism of action of cytochalasin-B on actin, *Cell*, **20** (2): 329–341, 1980.
- [Mil84] PIEZ K, REDDI A (Hg.), *Extracellular Matrix Biochemistry*, Elsevier, 1984, MILLER E, Kapitel „Chemistry of the Collagens and their distribution”, Seiten 41–82.
- [Mor81] MORTENSEN O, SVENDSEN E, Initial and final molecular states as "virtual states" in two-photon processes, *Journal of Chemical Physics*, **74** (6): 3185–3189, 1981.
- [Mue98] MUELLER M, SQUIER J, WOLLESCHENSKY R, SIMON U, BRAKENHOFF G, Dispersion pre-compensation of 15 femtosecond optical pulses for high-numerical-aperture objectives, *Journal of Microscopy*, **191** (2): 141–150, 1998.
- [Ngo01] NGOI B, VENKATAKRISHNAN K, LIM L, TAN B, Angular dispersion compensation for acousto-optic devices used for ultrashort-pulsed laser micromachining, *Optics Express*, **9** (4): 200–206, 2001.
- [Nib95] NIBBERING E, FRANCO M, PRADE B, GRILLON G, BLANC CL, MYSYROWICZ A, Measurement of the nonlinear refractive index of transparent materials by spectral analysis after nonlinear propagation, *Optics Communications*, **119** (5-6): 479–484, 1995.
- [Nib96] NIBBERING E, CURLEY P, GRILLON G, PRADE B, FRANCO M, SALIN F, MYSYROWICZ A, Conical emission from self-guided femtosecond pulses in air, *Optics Letters*, **21** (1): 62–65, 1996.
- [Nie04] NIEMZ M, *Laser-Tissue Interactions - Fundamentals and Applications*, Springer Verlag, 2004.
- [Nig81] NIGMATULIN R, KHABEEV N, NAGIEV F, Dynamics, heat and mass-transfer of vapor-gas bubbles in a liquid, *International Journal of Mass and Heat Transfer*, **24** (6): 1033–1044, 1981.
- [Nii06] NIIDA H, NAKANISHI M, DNA damage checkpoints in mammals, *Mutagenesis*, **21** (1): 3–9, 2006.

- [Nii08] NIIOKA H, SMITH NI, FUJITA K, INOUE Y, KAWATA S, Femtosecond laser nano-ablation in fixed and non-fixed cultured cells, *Optics Express*, **16** (19): 14.476–14.495, 2008.
- [Nik83] NIKOGOSYAN D, ORAEVSKY A, RUPASOV V, Two-photon ionization and dissociation of liquid water by powerful laser UV radiation, *Chemical Physics*, **77**: 131–143, 1983.
- [Noa98] NOACK J, *Optischer Durchbruch in Wasser mit Laserpulsen zwischen 100 ns und 100 fs*, Dissertation, Universität Lübeck, 1998.
- [Nor04] NORBURY C, ZHIVOTOVSKY B, DNA damage-induced apoptosis, *Oncogene*, **23** (16): 2797–2808, 2004.
- [Ntz10] NTZIACHRISTOS V, Going deeper than microscopy: the optical imaging frontier in biology, *Nature Methods*, **7** (8): 603–614, 2010.
- [Oeh00] OEHRING H, RIEMANN I, FISCHER P, HALBHUBER K, KOENIG K, Ultrastructure and reproduction behaviour of single CHO-K1 cells exposed to near infrared femtosecond laser pulses, *Scanning*, **22** (4): 263–270, 2000.
- [Ogl05] OGLE B, CASCALHO M, PLATT J, Biological implications of cell fusion, *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, **6** (7): 567–575, 2005.
- [Olm83] OLMO E, Nucleotype and cell size in vertebrates: a review, *Basic and Applied Histochemistry*, **27** (4): 227–256, 1983.
- [Ora85] ORAEVSKY A, NIKOGOSYAN D, Picosecond two-quantum UV photochemistry of thymine in aqueous solution, *Chemical Physics*, **100** (3): 429–445, 1985.
- [Orm96] ORMÖ M, CUBITT A, KALLIO K, GROSS L, TSIEN R, REMINGTON S, Crystal structure of the *Aequorea victoria* green fluorescent protein, *Science*, **273**: 1392–1395, 1996.
- [Pal96] PALUMBO G, CARUSO M, CRESCENZI E, TECCE M, ROBERTI G, COLASANTI A, Targeted gene transfer in eucaryotic cells by dye-assisted laser optoporation, *Journal of Photochemistry and Photobiology, B: Biology*, **36** (1): 41–46, 1996.
- [Par01] PARK K, LAI L, CHEONG H, IM G, SUN Q, WU G, DAY B, PRATHER R, Developmental potential of porcine nuclear transfer embryos derived from transgenic fetal fibroblasts infected with the gene for the green fluorescent protein: Comparison of different fusion/activation conditions, *Biology of Reproduction*, **65** (6): 1681–1685, 2001.
- [Par07] PARK J, LAKES R, *Biomaterials: An Introduction*, Springer Verlag, 2007.

- [Pat97] PATTERSON G, KNOBEL S, SHARIF W, KAIN S, PISTON D, Use of the green fluorescent protein and its mutants in quantitative fluorescence microscopy, *Biophysical Journal*, **73** (5): 2782–2790, 1997.
- [Pat00] PATTERSON G, PISTON D, Photobleaching in two-photon excitation microscopy, *Biophysical Journal*, **78** (4): 2159–2162, 2000.
- [Paw06] PAWLEY J, *Handbook of Biological Confocal Microscopy*, Springer Verlag, 2006.
- [Pie02] PIETENPOL J, STEWART Z, Cell cycle checkpoint signaling: Cell cycle arrest versus apoptosis, *Toxicology*, **181**: 475–481, 2002.
- [Ple77] PLESSET M, PROSPERETTI A, Bubble dynamics and cavitation, *Annual Review of Fluid Mechanics*, **9**: 145–185, 1977.
- [Pol00] POLEJAEVA I, CHEN S, VAUGHT T, PAGE R, MULLINS J, BALL S, DAI Y, BOONE J, WALKER S, AYARES D, COLMAN A, CAMPBELL K, Cloned pigs produced by nuclear transfer from adult somatic cells, *Nature*, **407** (6800): 86–90, 2000.
- [QS07] BERNS M, GREULICH K (Hg.), *Laser Manipulation of Cells and Tissues*, Academic Press, 2007, QUINTO-SU P, VENUGOPALAN V, Kapitel „Mechanisms of Laser Cellular Microsurgery”, Seiten 113–151.
- [Reu73] REUVERS A, GREENSTOCK C, BORSA J, CHAPMAN J, Studies on mechanism of chemical radioprotection by dimethyl sulfoxide, *International Journal of Radiation Biology*, **24** (5): 533–536, 1973.
- [Reu96] REUTHER A, NIKOGOSYAN D, LAUBEREAU A, Primary photochemical processes in thymine in concentrated aqueous solution studied by femtosecond UV spectroscopy, *Journal of Physical Chemistry*, **100** (13): 5570–5577, 1996.
- [Rid99] RIDLEY B, *Quantum Processes in Semiconductors*, Oxford University Press, 1999.
- [Roe02] ROEDER B, KOKINI K, STURGIS J, ROBINSON J, VOYTIK-HARBIN S, Tensile mechanical properties of three-dimensional type I collagen extracellular matrices with varied microstructure, *Journal of Biomechanical Engineering*, **124** (2): 214–222, 2002.
- [Roo75] ROOTS R, OKADA S, Estimation of life times and diffusion distances of radicals involved in X-ray-induced DNA strand breaks or killing of mammalian cells, *Radiation Research*, **64** (2): 306–320, 1975.

- [Ros99] ROSENFELD A, LORENZ M, STOIAN R, ASHKENASI D, Ultrashort-laser-pulse damage threshold of transparent materials and the role of incubation, *Applied Physics A: Materials Science & Processing*, **69** (7): S373–S376, 1999.
- [Row99] ROWEIS S, GHAHRAMANI Z, A unifying review of linear gaussian models, *Neural Computation*, **11** (2): 305–345, 1999.
- [Sac91] SACCHI C, Laser-induced electric breakdown in water, *Journal of the Optical Society of America B*, **8** (2): 337–345, 1991.
- [Sac05] SACCONI L, TOLIC-NORRELYKKE I, ANTOLINI R, PAVONE F, Combined intracellular three-dimensional imaging and selective nanosurgery by a nonlinear microscope, *Journal of Biomedical Optics*, **10** (1): 014.002, 2005.
- [Sac07] SACCONI L, O’CONNOR RP, JASAITIS A, MASI A, BUFFELLI M, PAVONE FS, In vivo multiphoton nanosurgery on cortical neurons, *Journal of Biomedical Optics*, **12** (5): 050.502, 2007.
- [Sal08] SALEH B, TEICH M, *Grundlagen der Photonik*, Wiley-VCH, 2008.
- [San97] SANCHEZ E, NOVOTNY L, HOLTOM G, XIE X, Room-temperature fluorescence imaging and spectroscopy of single molecules by two-photon excitation, *Journal of Physical Chemistry A*, **101** (38): 7019–7023, 1997.
- [San05] SANCHE L, Low energy electron-driven damage in biomolecules, *European Physical Journal D*, **35** (2): 367–390, 2005.
- [Sar09] RULLIERE C (Hg.), *Femtosecond laser pulses*, Springer Verlag, 2009, SARGER L, OBERLE J, Kapitel „How To Measure the Characteristics of Laser Pulses“, Seiten 177–202.
- [Sat92] SATO S, HIGURASHI E, TAGUCHI Y, INABA H, Achievement of laser fusion of biological cells using UV pulsed dye-laser beams, *Applied Physics B: Lasers and Optics*, **54** (6): 531–533, 1992.
- [Sch84] SCHIERENBERG E, Altered cell-division rates after laser-induced cell-fusion in nematode embryos, *Developmental Biology*, **101** (1): 240–245, 1984.
- [Sch88] SCHNITKER J, MOTAKABBIR K, ROSSKY P, FRIESNER R, A-priori calculation of the optical absorption spectrum of the hydrated electron, *Physical Review Letters*, **60** (5): 456–459, 1988.
- [Sch98] SCHOENLE A, HELL S, Heating by absorption in the focus of an objective lens, *Optics Letters*, **23** (5): 325–327, 1998.

- [Sch01] SCHAFFER C, *Interaction of Femtosecond Laser Pulses with Transparent Materials*, Dissertation, Harvard University Cambridge, Massachusetts, 2001.
- [Sch02a] SCHAFFER C, NISHIMURA N, GLEZER E, KIM A, MAZUR E, Dynamics of femtosecond laser-induced breakdown in water from femtoseconds to microseconds, *Optics Express*, **10** (3): 196–203, 2002.
- [Sch02b] SCHNECKENBURGER H, HENDINGER A, SAILER R, STRAUSS W, SCHMITT M, Laser-assisted optoporation of single cells, *Journal of Biomedical Optics*, **7** (3): 410–416, 2002.
- [Sha49] SHANNON C, Communication in the presence of noise, *Proceedings of the Institute of Radio Engineers*, **37** (1): 10–21, 1949.
- [Shi05] SHIMADA T, WATANABE W, MATSUNAGA 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, *Optics Express*, **13** (24): 9869–9880, 2005.
- [Sid11] SIDHU K, New approaches for the generation of induced pluripotent stem cells, *Expert Opinion on Biological Therapy*, **11** (5): 569–579, 2011.
- [Sim03] SIMERLY C, DOMINKO T, NAVARA C, PAYNE C, CAPUANO S, GOSMAN G, CHONG K, TAKAHASHI D, CHACE C, COMPTON D, HEWITSON L, SCHATTEN G, Molecular correlates of primate nuclear transfer failures, *Science*, **300** (5617): 297, 2003.
- [Sin72] SINGER S, NICOLSON G, The fluid mosaic model of the structure of cell membranes, *Science*, **175** (4023): 720–731, 1972.
- [Sin02] SINHA R, HADER D, UV-induced DNA damage and repair: a review, *Photochemical & Photobiological Sciences*, **1** (4): 225–236, 2002.
- [Sir09] SIRIPATTARAPRAVAT K, PINMEE B, VENTA PJ, CHANG CC, CIBELLI JB, Somatic cell nuclear transfer in zebrafish, *Nature Methods*, **6** (10): 733–736, 2009.
- [So00] SO P, DONG C, MASTERS B, BERLAND K, Two-photon excitation fluorescence microscopy, *Annual Review of Biomedical Engineering*, **2**: 399–429, 2000.
- [Som00] SOMOSY Z, Radiation response of cell organelles, *Micron*, **31** (2): 165–181, 2000.
- [Son81] VON SONNTAG C, HAGEN U, SCHOEN-BOPP A, SCHULTE-FROHLINDE D, Radiation induced strand breaks in DNA. Chemical and enzymatic analysis of end groups and mechanistic aspects, *Advances in Radiation Biology*, **9**: 110–142, 1981.

- [Son95] SONG L, HENNINK E, YOUNG I, TANKE H, Photobleaching kinetics of fluorescein in quantitative fluorescence microscopy, *Biophysical Journal*, **68** (6): 2588–2600, 1995.
- [Son96] SONG L, VARMA C, VERHOEVEN J, TANKE H, Influence of the triplet excited state on the photobleaching kinetics of fluorescein in microscopy, *Biophysical Journal*, **70** (6): 2959–2968, 1996.
- [Son99] SONNLEITNER M, SCHUTZ G, SCHMIDT T, Imaging individual molecules by two-photon excitation, *Chemical Physics Letters*, **300** (1-2): 221–226, 1999.
- [Spe91] SPENCE D, KEAN P, SIBBETT W, 60-fsec pulse generation from a self-mode-locked Ti:sapphire laser, *Optics Letters*, **16** (1): 42–44, 1991.
- [Squ99] SQUIRRELL J, WOKOSIN D, WHITE J, BAVISTER B, Long-term two-photon fluorescence imaging of mammalian embryos without compromising viability, *Nature Biotechnology*, **17** (8): 763–767, 1999.
- [Ste91] STEUBING R, CHENG S, WRIGHT W, NUMAJIRI Y, BERNS M, Laser induced cell fusion in combination with optical tweezers: the laser cell fusion trap, *Cytometry*, **12** (6): 505–510, 1991.
- [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, *Optics Express*, **14** (16): 7125–7133, 2006.
- [Str85] STRICKLAND D, MOUROU G, Compression of amplified chirped optical pulses, *Optics Communications*, **56** (3): 219–221, 1985.
- [Su06] SU TT, Cellular responses to DNA damage: One signal, multiple choices, *Annual Review of Genetics*, **40**: 187–208, 2006.
- [Sui11] SUI R, LIAO X, ZHOU X, TAN Q, The current status of engineering myocardial tissue, *Stem Cell Reviews and Reports*, **7** (1): 172–180, 2011.
- [Sun05] SUN Q, JIANG H, LIU Y, WU Z, YANG H, GONG Q, Measurement of the collision time of dense electronic plasma induced by a femtosecond laser in fused silica, *Applied Optics*, **30** (3): 320–322, 2005.
- [Sup05] SUPATTO W, DEBARRE D, MOULIA B, BROUZES E, MARTIN J, FARGE E, BEAUREPAIRE E, In vivo modulation of morphogenetic movements in *Drosophila* embryos with femtosecond laser pulses, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **102** (4): 1047–1052, 2005.

- [Sye09] SYEDAIN ZH, BJORK J, SANDO L, TRANQUILLO RT, Controlled compaction with ruthenium-catalyzed photochemical cross-linking of fibrin-based engineered connective tissue, *Biomaterials*, **30** (35): 6695–6701, 2009.
- [Tak07] TAKAHASHI K, TANABE K, OHNUKI M, NARITA M, ICHISAKA T, TOMODA K, YAMANAKA S, Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors, *Cell*, **131** (5): 861–872, 2007.
- [Tan05] TANABE T, OYAMADA M, FUJITA K, DAI P, TANAKA H, TAKAMATSU T, Multiphoton excitation-evoked chromophore-assisted laser inactivation using green fluorescent protein, *Nature Methods*, **2** (7): 503–505, 2005.
- [Tir01] TIRLAPUR U, KOENIG K, PEUCKERT C, KRIEG R, HALBHUBER K, Femtosecond near-infrared laser pulses elicit generation of reactive oxygen species in mammalian cells leading to apoptosis-like death, *Experimental Cell Research*, **263** (1): 88–97, 2001.
- [Tir02] TIRLAPUR U, KOENIG K, Cell biology - Targeted transfection by femtosecond laser, *Nature*, **418** (6895): 290–291, 2002.
- [Tsa02] FROSTIG R (Hg.), *In vivo optical imaging of brain function*, CRC Press, 2002, TSAI P, NISHIMURA N, YODER E, DOLNICK E, WHITE G, KLEINFELD D, Kapitel „Principles, Design and Construction of a Two-Photon Laser Scanning Microscope for In Vitro and In Vivo Brain Imaging”, Seiten 113–172.
- [Tsi98] TSIEN R, The green fluorescent protein, *Annual Review of Biochemistry*, **67**: 509–544, 1998.
- [Tsu88] TSUNODA Y, SHIODA Y, ONODERA M, NAKAMURA K, UCHIDA T, Differential sensitivity of mouse pronuclei and zygote cytoplasm to Hoechst staining and ultraviolet irradiation, *Journal of Reproduction and Fertility*, **82** (1): 173–178, 1988.
- [Uch08a] UCHUGONOVA A, ISEMANN A, GORJUP E, TEMPEA G, BUECKLE R, WATANABE W, KOENIG K, Optical knock out of stem cells with extremely ultrashort femtosecond laser pulses, *Journal of Biophotonics*, **1** (6): 463–469, 2008.
- [Uch08b] UCHUGONOVA A, KOENIG K, BUECKLE R, ISEMANN A, TEMPEA G, Targeted transfection of stem cells with sub-20 femtosecond laser pulses, *Optics Express*, **16** (13): 9357–9364, 2008.
- [Uni09] United States Department of Health and Human Services, *Annual Report of the United States Organ Procurement and Transplantation Network and the Scientific Registry of Transplant Recipients: Transplant Data 1999-2008*, 2009.

- [Val07] VALKO M, LEIBFRITZ D, MONCOL J, CRONIN MTD, MAZUR M, TELSER J, Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease, *International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, **39** (1): 44–84, 2007.
- [Ven04] VENGRIS M, VAN STOKKUM I, HE X, BELL A, TONGE P, VAN GRONDELLE R, LARSEN D, Ultrafast excited and ground-state dynamics of the green fluorescent protein chromophore in solution, *Journal of Physical Chemistry A*, **108** (21): 4587–4598, 2004.
- [Vog03] VOGEL A, VENUGOPALAN V, Mechanisms of pulsed laser ablation of biological tissues, *Chemical Reviews*, **103** (2): 577–644, 2003.
- [Vog05] VOGEL A, NOACK J, HUETTMAN 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): 038.102, 2008.
- [Wal03] WALTER J, CREMER T, MIYAGAWA K, TASHIRO S, A new system for laser-UVA-microirradiation of living cells, *Journal of Microscopy*, **209** (2): 71–75, 2003.
- [War88] WARD J, DNA damage produced by ionizing radiation in mammalian cells - identities, mechanisms of formation and reparability, *Progress in Nucleic Acid Research and Molecular Biology*, **35**: 95–125, 1988.
- [Wat53] WATSON J, CRICK C, Molecular structure of nucleic acids: a structure for deoxyribose nucleic acid, *Nature*, **171** (4356): 737–738, 1953.
- [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, *Optics Express*, **12** (18): 4203–4213, 2004.
- [Weh95] WEHNER R, GEHRING W, *Zoologie*, Georg Thieme Verlag, 1995.
- [Wie80] WIESENFELD J, IPPEN E, Dynamics of electron solvation in liquid water, *Chemical Physics Letters*, **73** (1): 47–50, 1980.
- [Wil76] WILLIAMS F, VARMA S, HILLENUS S, Liquid water as a lone-pair amorphous-semiconductor, *Journal of Chemical Physics*, **64** (4): 1549–1554, 1976.

- [Wil97] WILMUT I, SCHNIEKE A, MCWHIR J, KIND A, CAMPBELL K, Viable offspring derived from fetal and adult mammalian cells, *Nature*, **385** (6619): 810–813, 1997.
- [Wil07] WILLIAMS ES, STAP J, ESSERS J, PONNAIYA B, LUIJSTERBURG MS, KRAWCZYK PM, ULLRICH RL, ATEN JA, BAILEY SM, DNA double-strand breaks are not sufficient to initiate recruitment of TRF2, *Nature Genetics*, **39** (6): 696–698, 2007.
- [Woj83] WOJCIESZYN J, SCHLEGEL R, LUMLEY-SAPANSKI K, JACOBSON K, Studies on the mechanism of polyethylene glycol-mediated cell fusion using fluorescent membrane and cytoplasmic probes, *Journal of Cell Biology*, **96** (1): 151–159, 1983.
- [Wol03a] WOLLENSAK G, SPOERL E, SEILER T, Riboflavin/ultraviolet-A-induced collagen crosslinking for the treatment of keratoconus, *American Journal of Ophthalmology*, **135** (5): 620–627, 2003.
- [Wol03b] WOLLENSAK G, SPOERL E, SEILER T, Stress-strain measurements of human and porcine corneas after riboflavin-ultraviolet-A-induced cross-linking, *Journal of Cataract and Refractive Surgery*, **29** (9): 1780–1785, 2003.
- [Wol04] WOLLENSAK G, SPOERL E, WILSCH M, SEILER T, Keratocyte apoptosis after corneal collagen cross-linking using riboflavin/UVA treatment, *Cornea*, **23** (1): 43–49, 2004.
- [Wor11] World Health Organization, *Cardiovascular Diseases, Fact Sheet Number 317*, 2011.
- [Xu96] XU C, WILLIAMS R, ZIPFEL W, WEBB W, Multiphoton excitation cross-sections of molecular fluorophores, *Bioimaging*, **4** (3): 198–207, 1996.
- [Yam90] YAMAGUCHI T, MURAI SO C, FURUNOFUKUSHI I, TSUBOI A, Water content in cultured mammalian cells for dosimetry of beta-rays from tritiated water, *Journal of Radiation Research*, **31** (4): 333–339, 1990.
- [Yan04] YANIK M, CINAR H, CINAR H, CHISHOLM A, JIN Y, BEN-YAKAR A, Neurosurgery - functional regeneration after laser axotomy, *Nature*, **432** (7019): 822, 2004.
- [Yu94] YU B, Cellular defenses against damage from reactive oxygen species, *Physiological Reviews*, **74** (1): 139–162, 1994.
- [Zeg07] ZEGGARI R, WACOGNE B, PIERALLI C, ROUX C, GHARBI T, A full microfluidic system for single oocyte manipulation including an optical sensor for

- cell maturity estimation and fertilisation indication, *Sensors and Actuators, B: Chemical*, **125** (2): 664–671, 2007.
- [Zei03] ZEIRA E, MANEVITCH A, KHATCHATOURIANTS A, PAPPO O, HYAM E, DARASH-YAHANA M, TAVOR E, HONIGMAN A, LEWIS A, GALUN E, Femtosecond infrared laser - An efficient and safe in vivo gene delivery system for prolonged expression, *Molecular Therapy*, **8** (2): 342–350, 2003.
- [Zho00] ZHOU B, ELLEDGE S, The DNA damage response: putting checkpoints in perspective, *Nature*, **408** (6811): 433–439, 2000.
- [Zim82] ZIMMERMANN U, Electric field-mediated fusion and related electrical phenomena, *Biochimica et Biophysica Acta*, **694** (3): 227–277, 1982.
- [Zim00] ZIMMERMANN W, FINK C, KRALISCH D, REMMERS U, WEIL J, ESCHENHAGEN T, Three-dimensional engineered heart tissue from neonatal rat cardiac myocytes, *Biotechnology and Bioengineering*, **68** (1): 106–114, 2000.
- [Zim07] ZIMMERMANN W, TIBURCY M, ESCHENHAGEN T, Cardiac tissue engineering: a clinical perspective, *Future Cardiology*, **3** (4): 435–445, 2007.
- [Zim11] ZIMMERMANN W, Embryonic and embryonic-like stem cells in heart muscle engineering, *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, **50** (2): 320–326, 2011.
- [Zip03a] ZIPFEL W, WILLIAMS R, CHRISTIE R, NIKITIN A, HYMAN B, WEBB W, Live tissue intrinsic emission microscopy using multiphoton-excited native fluorescence and second harmonic generation, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **100** (12): 7075–7080, 2003.
- [Zip03b] ZIPFEL W, WILLIAMS R, WEBB W, Nonlinear magic: multiphoton microscopy in the biosciences, *Nature Biotechnology*, **21** (11): 1368–1376, 2003.

A. Präparation der Zellen und Gewebe

A.1. Bovine Aorten-Endothelzellen und murine RAT1-Fibroblasten

Adhärente bovine Aorten-Endothelzellen und murine, eGFP-exprimierende RAT1-Fibroblasten wurden in Glasboden-Petrischalen (μ -Dish 35 mm, *ibidi GmbH*) in RPMI 1640- bzw. DMEM-Medium (beide *Biochrom AG*, Berlin, Deutschland) kultiviert. Die Kulturmedien waren jeweils mit 10 % fetalem Kälberserum und 1 % der Antibiotika Penicillin sowie Streptomycin angereichert. Vor der Manipulation der Zellen wurden die Glasboden-Petrischalen einzeln in eine Mikroskop-Inkubationskammer (*Okolab*) bei 37°C und 5 %-iger CO₂-Atmosphäre transferiert.

Die Färbung der nukleären DNA wurde entweder mit Hoechst 33342 oder SYBR Green I (*Invitrogen*, Carlsbad, USA) durchgeführt. Dazu wurden die Zellen 10 min mit dem jeweiligen Fluorophor inkubiert (Hoechst: 5 µg/ml, SYBR Green I: 1:1000 der 10000-fachen Stammlösung) und danach mit RPMI 1640-Medium gewaschen. Die Fluoreszenz beider Fluorophore wurde bei einer Wellenlänge von 720 nm angeregt. Im Falle eGFP-exprimierender RAT1-Fibroblasten wurden die eGFP- und Hoechst-Signale durch Emissionsfilter voneinander getrennt (Hoechst: *Brightline HC 475/42*, eGFP: *Brightline HC 525/50*; *Semrock*).

Für die Detektion von ROS wurden die Endothelzellen 20 min mit 3 µg/ml CM-H2DCFDA (*Invitrogen*) in NaCl-Medium inkubiert und mit NaCl-Medium gewaschen, welches schließlich durch RPMI 1640-Medium ersetzt wurde. Das NaCl-Medium enthielt 121 mM NaCl, 5 mM KCl, 0,8 mM MgCl₂, 1,8 mM CaCl₂, 6 mM NaHCO₃, 5 mM Glucose, 25 mM HEPES und besaß einen pH-Wert von 7,4 sowie eine Osmolarität von 295 ± 5.

Für den Live/Dead-Assay wurden die Zellen 15 min simultan mit 2 µg/ml Calcein AM und 10 µg/ml Propidium Iodid (beide *Invitrogen*) inkubiert. Die Zweiphotonenanregung beider Fluorophore erfolgte bei 900 nm, während die Fluoreszenzsignale durch Emissionsfilter getrennt wurden (Calcein AM: *Brightline HC 525/50*, Propidium Iodid: *Brightline HC 655/40*; *Semrock*).

Der Einfluss von Antioxidantien wurde nach einer 20 minütigen Inkubation der Endothelzellen mit 10 µg/ml Ascorbinsäure (*Invitrogen*) bestimmt.

Die Membranfärbung wurde durch eine zehnminütige Inkubation der Endothelzellen mit 6 µg/ml FM4-64 (*Invitrogen*) realisiert, dessen Fluoreszenz bei 800 nm angeregt wurde. Anschließend wurden die Zellen mit RPMI 1640-Medium gewaschen.

Zur Fixierung wurden die Endothelzellen 20 min mit 4 % Paraformaldehyd (*Sigma*

Aldrich) in Phosphat-gepufferter Kochsalzlösung (PBS, *Sigma Aldrich*) bei Raumtemperatur behandelt.

Für die Detektion von DSB wurden die fixierten Endothelzellen zuerst 15 min mit 0,1 % Triton-X 100 (*Sigma Aldrich*) in PBS permeabilisiert. Danach folgte eine 20 minütige Behandlung mit 0,5 % Rinderalbumin (*Sigma Aldrich*) in PBS zum Blocken unspezifischer Antikörperbindungen. Die permeabilisierten Zellen wurden 24 Stunden mit 2 µg/ml des primären Antikörpers Anti- γ -H2AX (05-636, *Millipore*, Billerica, USA) und schließlich drei Stunden mit 5 µg/ml des sekundären Antikörpers Alexa Fluor 488 (A-11029, *Invitrogen*) behandelt, jeweils in einer 0,5 % Rinderalbumin-Lösung. Die Zweiphotonenanregung der Alexa Fluor 488-Fluoreszenz wurde bei 980 nm durchgeführt, welche durch Emissionsfilter von der Hoechst-Fluoreszenz getrennt wurde (Alexa Fluor 488: *Brightline HC 525/50*, Hoechst: *Brightline HC 475/42*; *Semrock*).

A.2. Humane HL-60-Zellen

Nicht-adhärenente humane HL-60-Zellen wurden in Zellkulturflaschen (*Sarstedt AG*, Nümbrecht, Deutschland) in RPMI 1640-Medium kultiviert, das mit 10 % fetalem Kälberserum und 1 % der Antibiotika Penicillin sowie Streptomycin angereichert war. Vor der Manipulation wurden die Zellen in eine Glasboden-Petrischale (μ -Dish 35 mm, *ibidi GmbH*) und anschließend in eine Mikroskop-Inkubationskammer (*Okolab*) bei 37°C und 5 %-iger CO₂-Atmosphäre transferiert.

Für den Live/Dead-Assay wurden die Zellen 15 min simultan mit 2 µg/ml Calcein AM und 10 µg/ml Propidium Iodid (*Invitrogen*) inkubiert. Die Zweiphotonenanregung beider Fluorophore erfolgte bei 720 nm, während die Fluoreszenzsignale durch Emissionsfilter getrennt wurden (Calcein AM: *Brightline HC 525/50*, Propidium Iodid: *Brightline HC 655/40*; *Semrock*).

A.3. Porzine Oozyten und Embryonen

Unreife Oozyten wurden in einem Schlachthaus aus Ovarien präpubertaler Jungsaunen gewonnen und *in vitro* für 40 Stunden bis zum Metaphase-II-Stadium gereift (siehe [Höl03]). In diesem Stadium wurden die Oozyten in einen Tropfen mit TL-HEPES 296-Manipulationsmedium [Höl03] auf einer Glasboden-Petrischale (μ Dish 35 mm, *ibidi GmbH*) transferiert und für die Laser-Enukleation verwendet; diese erfolgte bei Raumtemperatur und normaler Atmosphäre.

Die Färbung der nukleären DNA wurde entweder mit Hoechst 33342 oder SYBR Green I (*Invitrogen*) durchgeführt. Dazu wurden die MII-Oozyten 10 min mit dem jeweiligen Fluorophor inkubiert (Hoechst: 5 µg/ml, SYBR Green I: 1:1000 der 10000-fachen Stammlösung) und anschließend mit TL-HEPES 296-Medium gewaschen. Die Fluoreszenz beider Fluorophore wurde bei einer Wellenlänge von 720 nm angeregt.

Für die Färbung der Mitochondrien wurden die MII-Oozyten 20 min mit 0,2 µg/ml MitoTracker Orange (*Invitrogen*) inkubiert und mit TL-HEPES 296-Medium gewaschen. Die Zweiphotonenanregung dieses Fluorophors erfolgte bei 900 nm.

Zur Fixierung wurden die MII-Oozyten 20 min mit 4 % Paraformaldehyd (*Sigma Aldrich*) in PBS bei Raumtemperatur behandelt.

Für die Detektion von DSB wurden die fixierten MII-Oozyten zuerst 10 min mit 0,1 % Triton-X 100 (*Sigma Aldrich*) in PBS permeabilisiert. Danach folgte eine 20 minütige Behandlung mit 0,5 % Rinderalbumin (*Sigma Aldrich*) in PBS zum Blocken unspezifischer Antikörperbindungen. Die permeabilisierten Oozyten wurden 24 Stunden mit 2 µg/ml des primären Antikörpers Anti-γ-H2AX (05-636, *Millipore*) und schließlich drei Stunden mit 5 µg/ml des sekundären Antikörpers Alexa Fluor 488 (A-11029, *Invitrogen*) behandelt, jeweils in einer 0,5 % Rinderalbumin-Lösung.

Die parthenogenetische Aktivierung porziner Oozyten erfolgte durch elektrische Stimulation (siehe [Höl03]). Nach einer Inkubation für 24 Stunden wurden die mitotisch geteilten 2-Zell-Embryonen mit normaler Morphologie für die Zellfusion selektiert und in eine Glasboden-Petrischale (*µ-Dish 35 mm, ibidi GmbH*) transferiert. Diese befand sich auf einer Heizplatte (*HT-200, Minitüb GmbH, Tiefenbach, Deutschland*) bei 38°C, welche auf dem motorisierten Verschiebetisch befestigt wurde.

Zur Beurteilung der Vorkernbildung wurden die parthenogenetischen Embryonen 24 Stunden in einer Lösung aus Ethanol sowie Essigsäure (Verhältnis 3:1) fixiert und fünf bis zehn Minuten mit 48 % Lacmoid/Essigsäure (Konzentration: 20 mg/ml) in destilliertem Wasser gefärbt. Abschließend wurden die Embryonen mit Lacmoid-freier Lösung gewaschen.

Für den Live/Dead-Assay wurden die 2-Zell-Embryonen 10 min simultan mit 1 µg/ml Calcein AM und 5 µg/ml Propidium Iodid (beide *Invitrogen*) inkubiert.

Zur Bestimmung des Ploidiegrads wurden die parthenogenetischen Embryonen im Blastozystenstadium zuerst 15 min mit einer 0,9 % Natriumcitrat-Lösung behandelt und weitere 24 Stunden in einer Lösung aus Methanol sowie Essigsäure (Verhältnis 3:1) fixiert. Hiernach erfolgte eine zehnminütige Färbung mit 10 % Giemsa in Sörensen-Puffer und ein Auswaschen des überschüssigen Farbstoffs mit destilliertem Wasser.

A.4. Murines, artifizielles Gewebe

Dreidimensionales artifizielles Gewebe wurde wie in [Ken11] beschrieben hergestellt. Dazu wurden entweder $6 \cdot 10^5$ Gamma-bestrahlte embryonale Fibroblasten von CD1-ICR-Mäusen oder $1 \cdot 10^6$ frisch isolierte Kardiomyozyten von neonatalen Sprague-Dawley-Ratten in einer eigens angefertigten Teflon-Gussform mit flüssiger extrazellulärer Matrix vermischt, die 0,9 mg/ml Kollagen Typ-I (*R&D Systems, Minneapolis, USA*) und 10 % Matrigel (*BD Biosciences, Franklin Lakes, USA*) beinhaltet. Diese Mischung wurde mit 5 ml DMEM-Kulturmedium bedeckt, das mit 12 % Pferdeserum, 2 mM L-Glutamin (*Invitrogen*), 2 % Hühner-Embryo-Extrakt (*US Biological, Swampscott, USA*), 10 µg/ml Insulin (*Sigma Ald-*

rich), 100 U/ml Penicillin und 100 µg/ml Streptomycin (*PAA Laboratories GmbH*, Cölbe, Deutschland) angereichert war, und bei 37°C, 5 %-iger CO₂-Atmosphäre sowie 80 % Luftfeuchtigkeit mit täglichem Mediumwechsel kultiviert. Innerhalb von sieben Tagen verfestigte sich das Gewebe, welches in der Gussform zwischen zwei Titanstiften aufgehängt war. Vor der Manipulation wurden die Gewebekonstrukte einzeln in eine Glasboden-Petrischale (*µ-Dish 35 mm, ibidi GmbH*) transferiert.

Zur Analyse der volumetrischen Zelldichte wurden die Gewebekonstrukte zuerst 20 min in Aceton bei 0°C fixiert. Die Färbung der nukleären DNA erfolgte durch eine zehnminütige Behandlung mit 1 µg/ml DAPI (*Invitrogen*) in PBS. Abschließend wurden die fixierten Gewebe mit PBS gewaschen.

Für die Bestimmung der zellulären metabolischen Aktivität wurden die artifiziellen Gewebe 16 Stunden mit 25 nM TMRM (*Invitrogen*) inkubiert. Direkt nach der Laserbestrahlung erfolgte eine erneute 16-stündige TMRM-Inkubation, um eine eventuelle Photobleichung des Fluorophors zu kompensieren.

Alle Experimente wurden in Übereinstimmung mit den Gesetzen der Versuchstierhaltung (NIH Publikation Nr. 86-23, überarbeitet im Jahr 1985) und des Tierschutzes in Niedersachsen, Deutschland durchgeführt.

B. Reproduktion von Säugetieren

B.1. Oozytenentwicklung

Zu Beginn der Oozytenentwicklung (Oogenese) differenzieren die als Oogonien bezeichneten Urkeimzellen in den Ovarien zu primären Oozyten, was noch vor der Geburt geschieht. In diesem Stadium wird die DNA repliziert, so dass jedes Chromosom aus zwei Schwesterchromatiden besteht. Zusätzlich findet ein „Crossing-over“ zwischen den nicht-Schwesterchromatiden der homologen Chromosomen statt. In der Prophase der ersten meiotischen Zellteilung (Meiose I) verharret die primäre Oozyte Spezies-abhängig für wenige Tage bis zu mehreren Jahren. In diesem Zeitraum werden die Eihülle (Zona Pellucida) und die Rindengranula synthetisiert. Während die Zona Pellucida die Oozyte vor mechanischen Schäden schützt und als artspezifische Barriere für Spermien dient, verhindert die Rindengranula das Eindringen von mehr als einem Spermium [Alb08].

Die nächste Phase der Oogenese wird als Oozytenreifung bezeichnet und findet im Allgemeinen erst nach Erreichen der Geschlechtsreife statt, wenn hormonelle Einflüsse die primäre Oozyte stimulieren. Die Meiose I wird fortgesetzt und die replizierten homologen Chromosomen werden gleichmäßig auf zwei Tochterzellen verteilt. Am Ende der Telophase erfolgt eine asymmetrische Teilung des Zytoplasmas, so dass zwei verschieden große Zellen entstehen; ein kleiner Polkörper und die sekundäre Oozyte. Die Chromosomen der sekundären Oozyte bestehen zu diesem Zeitpunkt noch immer aus zwei Schwesterchromatiden, welche erst im Zuge der zweiten meiotischen Teilung (Meiose II) in unterschiedliche Tochterzellen getrennt werden. In der Metaphase der Meiose II (Metaphase-II-Oozyte) wird die sekundäre Oozyte bis zur Aktivierung durch ein penetrierendes Spermium erneut arretiert. Im Anschluss an die Befruchtung teilt sich das Zytoplasma asymmetrisch, woraus die reife Oozyte und ein zweiter kleiner Polkörper hervorgehen, die jeweils einen haploiden Chromosomensatz enthalten. Durch die beiden asymmetrischen Zellteilungen besitzt die reife Oozyte einen nahezu unveränderten Durchmesser, der für die Spezies Schwein ungefähr 150 μm beträgt [Alb08].

B.2. Frühe Embryonalentwicklung

Nach der Fusion von Spermium und Oozyte bilden sich ein paternaler bzw. maternaler Vorkern, beim Schwein frühestens nach sechs Stunden [Han61], die sich aufeinander zubewegen und zur diploiden Zygote verschmelzen (siehe Abbildung B.1). Während der anschließenden Furchung in der frühen embryonalen Entwicklung erfolgen mitotische Zellteilungen, die keine

Wachstumsvorgänge beinhalten und damit das Gesamtvolumen nicht verändern. Dabei findet eine progressive Umstellung von der maternalen zur embryonalen RNA-Synthese statt. Bei der Spezies Schwein erfolgt die erste Furchungsteilung der Zygote etwa 21 Stunden nach der Befruchtung [Han61] und die Übernahme der RNA-Synthese durch das embryonale Genom im 4-Zell-Stadium [Jar91, Par01]. Nach weiteren Furchungsteilungen entwickelt sich der Embryo zur Blastozyste mit einem inneren Hohlraum (Blastocoel). Dieses Stadium wird beim Schwein etwa fünf Tage nach der Befruchtung erreicht [Han61]. In der Blastozyste sind zwei verschiedene Zellpopulationen vorhanden: die innere Zellmasse aus pluripotenten, embryonalen Stammzellen und der Trophoblast. Während aus der inneren Zellmasse der eigentliche Embryo hervorgeht, bildet der Trophoblast die Wandung des Blastocoels und in der späteren Entwicklung einen Großteil des extraembryonalen Gewebes [Alb08].

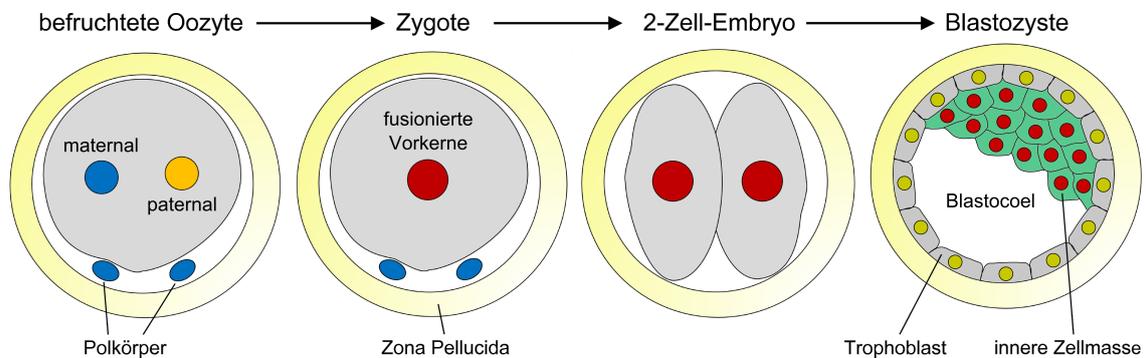


Abbildung B.1.: Frühe Embryonalentwicklung nach der Befruchtung einer Oozyte. Zuerst bilden sich jeweils ein maternaler und paternaler Vorkern, die zur diploiden Zygote fusionieren. Nach einigen Furchungsteilungen entsteht eine Blastozyste mit der inneren Zellmasse aus embryonalen Stammzellen, einem Hohlraum (Blastocoel) und dem Trophoblast.

B.3. Parthenogenetische Entwicklung

Die Parthenogenese ist als reduzierte Form der Fortpflanzung definiert, bei der die embryonale Entwicklung aus einer unbefruchteten Oozyte erfolgt. Im Tierreich stellt diese mit Ausnahme von Säugetieren eine weit verbreitete Art der Reproduktion dar [Weh95]. Durch eine Unterdrückung der Meiose II und damit der Bildung des zweiten Polkörpers entsteht in der sekundären Oozyte ein diploider Chromosomensatz [Kau76]. Bei Säugetieren kann die parthenogenetische Entwicklung durch verschiedene Methoden, wie beispielsweise eine elektrische Stimulation, artifiziell induziert werden [Cam07b]. In Kerntransfer-Experimenten werden parthenogenetische Embryonen im Allgemeinen als Indikator für die Qualität der Oozyten und der Kulturbedingungen verwendet. Jedoch zeigen diese im Verlauf der weiteren Entwicklung schwere Abnormalitäten, so dass bis heute keine Geburt gesunder Nachkommen durch Parthenogenese beobachtet worden ist [Höl03].

C. Gruppengeschwindigkeitsdispersion

Die Erzeugung ultrakurzer Laserpulse mit Pulsdauern um 100 fs erfordert im NIR-Bereich eine spektrale Bandbreite von etwa zehn Nanometern, so dass die Wellenlängen-Abhängigkeit des Brechungsindex nicht mehr vernachlässigt werden kann. Diese lässt sich in spektralen Bereichen ohne Resonanzen durch die Sellmeier-Gleichung [Böh03]

$$n(\lambda) = \sqrt{1 + \sum_{i=1}^3 \frac{B_m \lambda^2}{\lambda^2 - C_m}} \quad (\text{C.1})$$

mit den Sellmeier-Koeffizienten B_m und C_m beschreiben. Für alle Materialien der im Aufbau verwendeten Optiken nimmt der Brechungsindex streng monoton mit steigender Wellenlänge im Bereich von 0,5 bis 1,5 μm ab (siehe Abbildung C.1a).

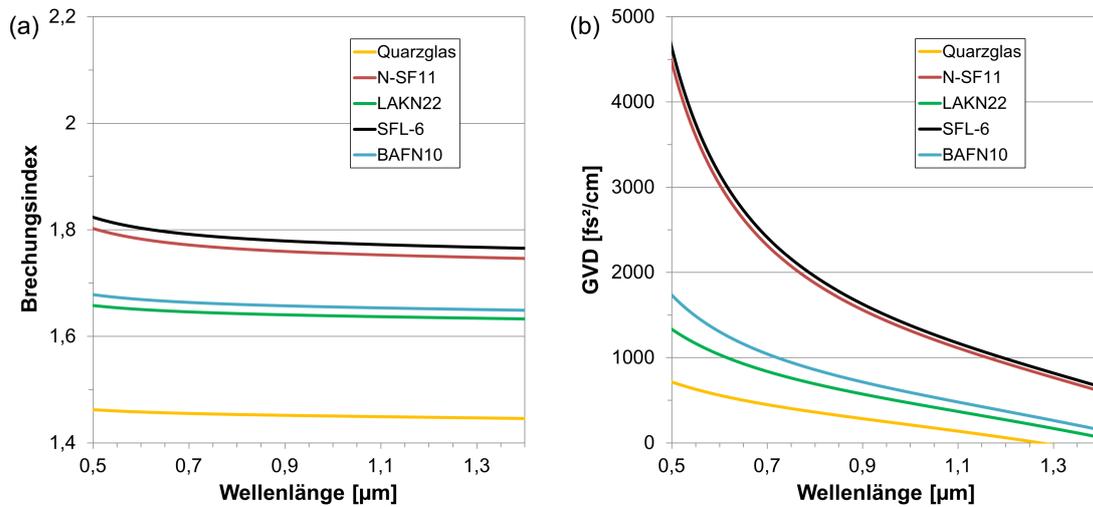


Abbildung C.1.: Der (a) Brechungsindex und die (b) GVD der im experimentellen Aufbau verwendeten Optiken hängen entscheidend vom Material ab und nehmen mit steigender Wellenlänge kontinuierlich ab.

Bei der Propagation in einem dispersiven Medium mit der Länge L wird ein Laserpuls auf Grund der Wellenlängen-Abhängigkeit des Brechungsindex zeitlich verbreitert. Die Phase $\Phi(\omega)$ einzelner spektralen Komponenten lässt sich für hinreichend schmale Frequenz-

intervalle um die zentrale Kreisfrequenz ω_0 in eine Taylor-Reihe entwickeln [Böh03]:

$$\Phi(\omega) = n(\omega) \frac{\omega}{c} L = \sum_{m=0}^{\infty} \frac{\Phi_m}{m!} (\omega - \omega_0)^m \quad \text{mit} \quad \Phi_m = \left. \frac{d^m \Phi}{d\omega^m} \right|_{\omega=\omega_0}. \quad (\text{C.2})$$

Die Entwicklungskoeffizienten $k_m = \frac{\Phi_m}{L}$ sind ein Maß für die Dispersion m -ter Ordnung. k_1 ist das Inverse der Gruppengeschwindigkeit und beschreibt die zeitliche Verzögerung des Pulses als Ganzes. Für k_2 wird der Begriff GVD mit der Einheit $\frac{\text{fs}^2}{\text{cm}}$ verwendet [Böh03]:

$$k_2 = \frac{\lambda^3}{2\pi c^2} \frac{d^2 n(\lambda)}{d\lambda^2}. \quad (\text{C.3})$$

Die GVD führt zu einer zeitlichen Verbreiterung des Pulses. In einem Medium mit positivem (negativem) k_2 eilen die roten, langwelligen (blauen, kurzwelligen) Komponenten voraus; dies wird als positiver (negativer) Chirp bezeichnet. Alle im experimentellen Aufbau verwendeten Optiken haben im gesamten Titan:Saphir-Wellenlängenbereich eine positive GVD und somit einen positiven Chirp (siehe Abbildung C.1b). Im Gegensatz zur Selbstphasenmodulation erfolgt durch die GVD eine räumliche Trennung der spektralen Komponenten [Sch01]. Dieser Effekt wird unter anderem bei der Verstärkung ultrakurzer Laserpulse genutzt [Str85].

D. Spannungs-Dehnungs-Diagramm

Die Materialfestigkeit und -elastizität werden typischerweise in einer Zugprüfmaschine getestet. Dazu wird die Probe mit bekanntem Ausgangsquerschnitt A_0 fest in die Maschine eingespannt und durch einen Schrittmotor mit konstanter Geschwindigkeit in uniaxialer Richtung auseinander gezogen. Hierbei werden sowohl die aktuelle Position des Schrittmotors als auch die entstehende Zugkraft gemessen. Um von den geometrischen Abmessungen des Materials unabhängige Werte zu erhalten, wird die Längenänderung ΔL auf die Ursprungslänge L_0 und die Zugkraft F auf den Ausgangsquerschnitt σ normiert [Fra08]

$$\epsilon = \frac{\Delta L}{L_0} \quad ; \quad \sigma = \frac{F}{A_0}, \quad (\text{D.1})$$

wobei ϵ die dimensionslose Dehnung und σ die Spannung mit der Einheit $\frac{\text{N}}{\text{m}^2} = \text{Pa}$ darstellen. Im Spannungs-Dehnungs-Diagramm wird die Steigung der Kurve als Elastizitätsmodul bezeichnet. Unabhängig vom Material ist die Spannung für $\epsilon \ll 1$ proportional zur Dehnung („Hookesches Gesetz“), während dies für große Dehnungen nicht notwendigerweise der Fall ist [Fra08].

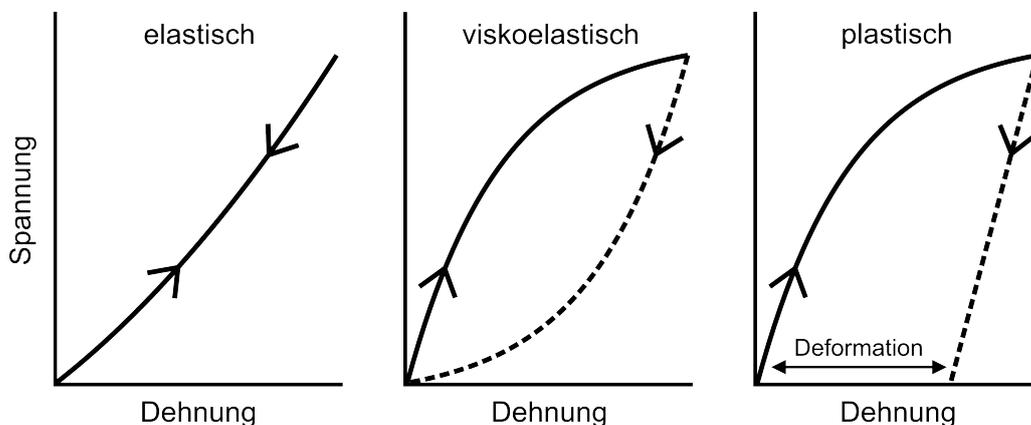


Abbildung D.1.: Elastische und viskoelastische Materialien nehmen nach Applikation einer zyklischen Zugspannung in uniaxialer Richtung ihre ursprüngliche Form an, während plastische Materialien deformiert bleiben (nach [Fra08]).

Nach einer zyklischen Zugspannung in uniaxialer Richtung verhalten sich Materialien sehr unterschiedlich (siehe Abbildung D.1). Elastische Materialien nehmen unverzüglich

ihre ursprüngliche Form an, während viskoelastische Materialien diese nur sehr langsam erreichen. Im Gegensatz dazu behalten plastische Materialien ihre deformierte Form nahezu vollständig bei. Daher sind die Spannungs-Dehnungs-Kurven bei zu- und abnehmender Zugspannung nur für elastische Materialien identisch. Für viskoelastische Materialien ergibt sich eine Hysterese-Kurve, deren eingeschlossene Fläche den Verlust an mechanischer Energie durch viskose Reibung darstellt [Fra08].

E. Liste der Publikationen

1. **K. Kütemeyer**, G. Kensah, M. Heidrich, H. Meyer, U. Martin, I. Gruh, und A. Heisterkamp, „Two-photon induced collagen cross-linking in bioartificial cardiac tissue”, *Optics Express*, **19** (17): 15996–16007, 2011.
2. **K. Kütemeyer**, A. Lucas-Hahn, B. Petersen, H. Niemann, und A. Heisterkamp, „Femtosecond laser-induced fusion of non-adherent cells and two-cell porcine embryos”, *Journal of Biomedical Optics*, **16** (8): 088001, 2011.
3. S. Kalies, **K. Kütemeyer**, und A. Heisterkamp, „Mechanisms of high-order photobleaching and its relationship to intracellular ablation”, *Biomedical Optics Express*, **2** (4): 805–816, 2011.
4. M. Pospiech, M. Emons, **K. Kütemeyer**, A. Heisterkamp, und U. Morgner, „Super-resolved femtosecond laser nanosurgery of cells”, *Biomedical Optics Express*, **2** (2): 264–270, 2011.
5. **K. Kütemeyer**, R. Rezgui, H. Lubatschowski, und A. Heisterkamp, „Mechanisms of femtosecond laser cell surgery in the low-density plasma regime”, *Proceedings of SPIE*, **7897**: 789704, 2011.
6. **K. Kütemeyer**, R. Rezgui, H. Lubatschowski, und A. Heisterkamp, „Influence of laser parameters and staining on femtosecond laser-based intracellular nanosurgery”, *Biomedical Optics Express*, **1** (2): 587–597, 2010.
7. **K. Kütemeyer**, A. Lucas-Hahn, B. Petersen, E. Lemme, P. Hassel, H. Niemann, und A. Heisterkamp, „Combined multiphoton imaging and automated functional enucleation of porcine oocytes using femtosecond laser pulses”, *Journal of Biomedical Optics*, **15** (4): 046006, 2010.
8. **K. Kütemeyer**, A. Lucas-Hahn, B. Petersen, P. Hassel, E. Lemme, H. Niemann, und A. Heisterkamp, „Functional enucleation of porcine oocytes for somatic cell nuclear transfer using femtosecond laser pulses”, *Proceedings of SPIE*, **7589**: 75890A, 2010.
9. **K. Kütemeyer**, J. Baumgart, H. Lubatschowski, und A. Heisterkamp, „Repetition rate dependency of low-density plasma effects during femtosecond-laser-based surgery of biological tissue”, *Applied Physics B*, **97** (3): 695–699, 2009.

10. J. Baumgart, **K. Küttemeyer**, W. Bintig, A. Ngezahayo, W. Ertmer, H. Lubatschowski, und A. Heisterkamp, „Repetition rate dependency of reactive oxygen species formation during femtosecond laser based cell surgery”, *Journal of Biomedical Optics*, **14** (5): 054040, 2009.
11. **K. Küttemeyer**, A. Lucas-Hahn, B. Petersen, P. Hassel, E. Lemme, H. Niemann, und A. Heisterkamp, „Femtosecond laser based enucleation of porcine oocytes for somatic cell nuclear transfer”, *Proceedings of SPIE*, **7373**: 73730C, 2009.

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

F. Lebenslauf

Persönliche Daten

Name: Kai Küttemeyer
Geburtsdatum: 07. April 1984
Geburtsort: Hannover, Deutschland
Staatsangehörigkeit: deutsch
Familienstand: ledig

Beruflicher Werdegang

seit 07/2008 Wissenschaftlicher Mitarbeiter am Laser Zentrum Hannover e.V.
02/2006 - 04/2007 Hilfwissenschaftler am Laser Zentrum Hannover e.V.

Ausbildung

seit 07/2008 Promotionsstudium, Leibniz Universität Hannover
06/2008 Abschluss: Diplom-Physiker
10/2003 - 06/2008 Studium der technischen Physik, Leibniz Universität Hannover
Thema der Diplomarbeit: „Charakterisierung der Puls-zu-Puls Wechselwirkung in biologischen Materialien bei hoher numerischer Apertur“, durchgeführt am Laser Zentrum Hannover e.V.
10/2002 - 06/2003 Wehrpflicht, Panzergrenadierlehrbataillon 92 in Munster
06/2002 Abschluss: Allgemeine Hochschulreife, Geschwister Scholl Gymnasium Berenbostel

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich bei allen bedanken, die mich auf dem Weg der Promotion begleitet und diese zu einem spannenden, herausfordernden sowie lehrreichen Lebensabschnitt gemacht haben. Ohne die im Folgenden genannten Personen würde die Arbeit in dieser Form heute nicht vorliegen.

Herrn Prof. Dr. Alexander Heisterkamp danke ich für die hochinteressante, herausfordernde Aufgabenstellung und die Betreuung meiner Promotion in einem interdisziplinären Umfeld. Die angenehme Arbeitsatmosphäre innerhalb der gesamten Abteilung erlaubte einen direkten und intensiven Gedankenaustausch mit Kollegen. Ohne seine guten Kontakte zu anderen Instituten und stetes Interesse an den Projektfortschritten wäre ein Großteil der Arbeit nicht möglich gewesen.

Herrn Prof. Dr. Anaclet Ngezahayo möchte ich für die Übernahme des Korreferats und die unzähligen Biologie-Nachhilfestunden danken. Durch seinen natürlichen Frohsinn sowie einzigartigen Humor waren die Diskussionen immer sehr interessant und lehrreich.

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

Ganz besonderer Dank gilt „meinen“ Studenten Rachid Rezgui, Stefan Kalies und Michael Schröder, die im Rahmen ihrer Diplom- bzw. Bachelorarbeiten entscheidende Beiträge zu dieser Arbeit geleistet haben. Ohne ihren unermüdlichen Einsatz und ihre tatkräftige Unterstützung im Labor hätten viele Projekte einen signifikant längeren Zeitraum in Anspruch genommen.

Meinen aktuellen und ehemaligen Kollegen der Abteilung *Biomedizinische Optik* am LZH danke ich für den abwechslungsreichen Büroalltag und Feierabend. Hervorheben möchte ich Dr. Judith Baumgart, die mich als Diplomand in die Gruppe *Biophotonik* aufgenommen und trotz anfänglicher Beschädigungen am experimentellen Aufbau immer unterstützt sowie gefördert hat. Eine besondere Anerkennung gebührt Diego Fernando Ramírez Ojeda für die Programmierung der *LabView*-basierten Software, ohne die sowohl die Ausführung als auch Auswertung der Experimente ein mühsames Unterfangen geworden wären. Zu großem Dank bin ich meinem ehemaligen Bürokollegen Dr. Heiko Meyer verpflichtet, der mir durch interessante Diskussionen und die eine oder andere Cola nach Feierabend einen angenehmen Arbeitsalltag verschaffte. Anja Hansen und Dag Heinemann verdanke ich einen außergewöhnlichen Road-Trip von San Francisco nach Las Vegas mit dem Besuch zahlreicher spektakulärer Orte. Bei Nadine Tinne möchte ich mich für die herrlichen Exkurse in die Tiefen der Bubble-Theorie-Welt mit direkter Informationsverbindung und ständiger Reiseroute zur einzig wahren deutschen Grammatik bedanken. Nicht zu vergessen sei

Markus Schomaker, mit dem ich abseits der Arbeit viel über Abseits und die optimale Aufstellung meiner virtuellen Fußballmannschaft fachsimpeln konnte. Unvergessen bleiben die Konferenzbesuche in München und San Francisco, die Dänemark-Fahrten, das Medi-Boßeln bei Familie Schomaker sowie die Weihnachtsfeiern.

Bedanken möchte ich mich bei meinen Kooperationspartnern der LUH, der MHH und des FLI Mariensee. Durch ihren unterschiedlichen fachlichen Hintergrund konnte ich interessante Einblicke in eine Vielzahl innovativer Forschungsbereiche der Tier- und Humanmedizin bekommen. Zudem ermöglichte die außergewöhnlich gute und intensive Zusammenarbeit einen erfolgreichen Abschluss der gemeinsamen Projekte. Erwähnt seien hier insbesondere: Dr. Willem Bintig, Dr. Matthias Pospiech, George Kensah, Dr. Ina Gruh, Dr. Andrea Lucas-Hahn, Dr. Björn Petersen, Erika Lemme, Maren Ziegler, Petra Hassel und Prof. Dr Heiner Niemann.

Ein großer Dank gilt meinen Freunden und meiner Tischtennis-Mannschaft vom SV Marienwerder, die mir eine hervorragende Abwechslung zur wissenschaftlichen Tätigkeit geboten haben. Die jährliche Camping-Tour nach Benersiel bzw. der lang ersehnte Aufstieg in die Verbandsliga in der Saison 2010/2011 werden mir immer in Erinnerung bleiben.

Bei meiner Familie möchte ich mich für die Unterstützung jeglicher Art auf das Allerherzlichste bedanken. Ich bin wirklich glücklich, euch zu haben!

Dir, Vanessa, danke ich für deine bedingungslose Unterstützung und aufmunternden Worte während der Promotion, insbesondere in der hektischen Endphase.